

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**Évaluation d'un vecteur associé à l'adénovirus
recombinant de sérotype 4 (AAV4) pour le
traitement par thérapie génique d'un modèle
canin de l'amaurose congénitale de Leber :
le chien Briard RPE65^{-/-}**

THESE DE DOCTORAT

**Ecole doctorale: Chimie-Biologie
Discipline: Biologie-Médecine-Santé
Spécialité: Transfert de gène et thérapie génique**

*Présentée
et soutenue publiquement par*

LE MEUR Guylène

Le 12 janvier 2007, devant le jury ci-dessous

Président du jury

Pr Billaudel Sylviane

Rapporteurs

*Pr Lorenz Birgit
Dr Hamel Christian*

Examineurs

Dr Cartier Nathalie

Directeur de thèse

Dr Rolling Fabienne

Évaluation d'un vecteur associé à l'adénovirus recombinant de sérotype 4 (AAV4) pour le traitement par thérapie génique d'un modèle canin de l'amaurose congénitale de Leber : le chien Briard RPE65^{-/-}

Résumé :

Les vecteurs dérivés des adéno-associated virus (AAV) permettent un transfert de gène efficace et stable dans la rétine. Les futures applications possibles de ce traitement par transfert de gène en ophtalmologie seront le traitement de dégénérescences rétinienne acquises ou héréditaires. L'Amaurose congénitale de Leber est une forme précoce de dégénérescence rétinienne héréditaire. Un des modèles canins de cette maladie rétinienne est le chien briard RPE65^{-/-}. Après avoir montré que les vecteurs AAV de sérotype 2, 4 et 5 permettaient un transfert stable dans la rétine de chien et de primate non-humain, nous avons évalué un vecteur AAV de sérotype 4, qui cible exclusivement les cellules de l'épithélium pigmentaire, pour le traitement du chien RPE65^{-/-}. Chez les chiots RPE65^{-/-}, ce transfert du gène *rpe65* au moyen d'un vecteur AAV4 portant le cDNA humain *rpe65* sous le contrôle du promoteur spécifique RPE65, a permis une restauration stable de la fonction rétinienne et de la vision.

Mots-clés : Transfert de gène, rétine, adéno-associated virus, Amaurose congénitale de Leber, RPE65, chien, primate non-humain

Assessment of a serotype 4 recombinant adeno-associated virus (AAV4) for the gene therapy of a canine model of Leber congenital amaurosis : the RPE65-deficient Briard

Abstract :

The vectors derived from the adeno-associated virus (AAV) allow an effective and stable gene transfer in the retina. Possible future applications of this gene therapy in ophthalmology will be the treatment of acquired or hereditary retinal degenerations. Leber congenital amaurosis is an early form of hereditary retinal degeneration. The RPE65^{-/-} briard dog is one of the canine models of this retinal degeneration. After having shown that serotypes 2, 4 and 5 of AAV vectors allowed a stable gene transfer in dog and primate retina, we evaluated an AAV4 vector, which specifically targets the retinal pigmented epithelium, for the treatment of the RPE65^{-/-} briard dog. This *rpe65* gene transfer using an AAV4 vector carrying human *rpe65* DNA under the control of a specific RPE65 human promoter, allowed a stable restoration of the retinal function and vision in the RPE65^{-/-} treated dogs.

Key words : gene transfer, retina, adeno-associated virus, Leber congenital amaurosis, RPE65, dog, non-human primate

LE MEUR Guylène

**Unité INSERM U649, 30 Bd Jean Monnet. CHU Hôtel Dieu
44035 Nantes cedex1**

TABLE DES MATIÈRES

Abréviations.....	3
Préambule.....	6
A : Introduction.....	7
I Généralités à propos de thérapie génique.....	8
II Transfert de gènes dans les maladies oculaires et essais cliniques.....	12
III Les dégénérescences rétiniennes héréditaires.....	16
3.1. Clinique.....	17
3.2. Génétique.....	21
3.3. Anomalies moléculaires.....	24
3.4. Quel est le mécanisme de dégénérescence des photorécepteurs dans les dystrophies rétiniennes héréditaires de la rétine.....	34
3.5. Traitement des dystrophies rétiniennes héréditaires.....	39
3.6. L'amaurose congénitale de Leber.....	44
3.7. Particularités de la clinique liée à la mutation du gène rpe65.....	48
IV. Vecteur viral recombinant à partir de l'adéno-associated virus (AAV).....	50
4.1. Généralités sur le virus AAV.....	50
4.2. Le génome viral de l'AAV.....	51
4.3. Les différents sérotypes d'AAV.....	54
4.4. Devenir de l'AAV dans la cellule hôte.....	55
4.5. Production de vecteurs dérivés de l'Adéno-Associated Virus.....	61
V. Étude du tropisme des rAAV de différents sérotypes dans la rétine.....	68
VI. Transfert de gènes thérapeutiques dans la rétine via des vecteurs AAV.....	70
6.1. Thérapie génique corrective de dystrophies rétiniennes héréditaires autosomiques récessives.....	71
6.2. Thérapie génique corrective de dystrophies rétiniennes héréditaires récessives liées à l'X.....	79
6.3. Thérapie génique corrective de l'atteinte rétinienne qui survient dans des maladies lysosomales générales.....	80
6.4. Interruption de l'expression d'allèles dominants dans les dystrophies rétiniennes.....	81
6.5. Expression de facteurs de survie pour le traitement de dystrophies rétiniennes.....	82
6.6. Expression de facteurs antiangiogéniques pour le traitement de pathologies rétiniennes néovasculaires.....	86
VII. Transfert de gènes dont l'expression est régulable via des vecteurs AAV.....	90
7.1. Le système Rapamycine.....	91
7.2. Le système Tétracycline.....	94
7.3. Le promoteur HRE (hypoxia-responsive element).....	96
VIII. Étude de la biodistribution suite au transfert de gène dans la rétine via un vecteur AAV.....	96
B : Résultats.....	100
I. Discussion du premier article.....	111
1.1. Efficacité et stabilité du transfert de gènes dans la rétine via un vecteur AAV.....	111
1.2. Innocuité du transfert de gènes dans la rétine.....	115
II. Discussion du second article.....	133
2.1. Administration du vecteur thérapeutique.....	133
2.2. Comparaison de l'efficacité du transfert du gène rpe65 entre les sérotypes 2 et 4 d'AAV.....	140
2.3. Intérêt de l'utilisation d'un sérotype 4 associé à un promoteur spécifique.....	146
2.4. Conséquences pour l'application future à l'homme.....	148
III. Discussion du troisième article.....	160
3.1. Efficacité de la régulation.....	160
3.2. L'impact sur la rétine du transfert du gène epo avec le système de régulation.....	162

C : Conclusion générale	166
D : Références bibliographiques	169

ABREVIATIONS

AAV : Adéno-Associated Virus
ABCR: ATP Binding Cassette Retina
ACL : Amaurose Congénitale de Leber
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
Ad : adénovirus
AIPL1 : Aryl hydrocarbon Interacting-Protein Line 1
ATP : adénosine triphosphate
at-Rol : *all-trans-retinol*
at-RE : *all-trans-retinylesters*
 α V β 5 : integrin alpha-V-beta-5
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
bi : before injection
BDNF : Brain-derived Neurotrophic Factor
CAG : promoteur chimère de la β -actine de poulet fusionné à l'enhancer du promoteur précoce du cytomégalovirus
C β A : Chiken β Actin
CMV : cytomégalovirus
CNSB : congenital stationary night blindness ou cécité congénitale nocturne
CNTF : Ciliary NeuroTrophic Factor
CRALBP : Cellular RetinALdehyde-Binding Protein
CRBP : Cellular Retinoïd Binding Protein
CRD : *cone-rod* dystrophie
CRX : Cone-Rod homeoboX containing gene
CsCl : Chlorure de Cesium
DHA : acide docosahexaenoïque
DISC : Death-Inducing Signaling Complex
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge
dpi : days post-injection
Dox : doxycycline
Efemp1 : gène EGF-containing fibrillin-like extracellular matrix
EPO : érythropoïétine
EPR : épithélium pigmenté rétinien
ERG : Électrorétinogramme
Erk1/2 : extracellular signal-regulated kinase ½
FGF-2 : fibroblast growth factor
FIV :Feline Immunodeficiency Virus
FGFR-1 : Fibroblast growth factor receptor-1
Flt1 : fms-like tyrosine kinase
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
IRBP : Intertitial Retinal Binding Protein
JNK : c-Jun N terminal kinase
GDNF : glial cell line-derived neurotrophic factor
Gfp : gène de la green fluorescent protéine
GMP : Good manufacturing practices
GMP : guanyle monophosphate
GMPc : guanyle monophosphate cyclique

GUSB : β -glucuronidase
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HGFR : hépatocyte growth factor receptor
HPLC : High Protein Liquid Chromatography
HSPG : Héparan Sulfate proteoglycan
HSV : virus herpès simplex
HRE : Hypoxia-Responsive Element
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell
Hz : hertz
IAP : inhibitor of apoptosis protein
IRBP : Intertitial Retinal Binding Protein
ISR : injection sous-rétinienne
ITR : internal terminaison repeat
IV : injection intravitréenne
kb : kilobases
kd : kilodalton
LAM-PCR : linear-amplification-mediated-PCR
LCRA : linear rolling-circle amplification
LRAT : Lecithin Retinol Acyl Transferase
MAP kinase : Mitogen-activated protein kinase
mg : milligramme
MLV : virus leucémogène murin
mpi : months post-injection
MPSVII : mucopolysaccharidose de type VII
NA : non affecté
NPC : nuclear pore complex
NRPE : N-retinylidène phosphatidyl ethanolamine
OCT : tomographie par cohérence optique
ORF : open reading frame
11c-Ral : 11-cis-retinal;
11-RHD : 11- retinol dehydrogenase;
pb : paire de bases
PBMC : peripheral blood mononuclear cells
PCR : polymerase chaine reaction
PDE : phosphodiesterase
PDGFR- α : platelet-derived growth factor receptor- α
PEDF : Pigment Epithelium-Derived Factor
PEV : potentiels évoqués visuels
pi : particule infectieuse
PI3K : kinase phosphatidylinositol-3 kinase
PROML1 : pour PROMinin Mouse Homolog-Like 1
Prph2^{Rd2/Rd2} : périphérine
pu : particule unit
rAAV : recombinant Adéno-associated virus
RAC : Recombinant DNA Advisory Committee
RBE : Rep Binding Element
RBS : Rep Binding Site
RCA : Replication Center Assay
RDH : Retinol Dehydrogenase
rds : gene retinal degeneration slow
retGC1 : guanylate cyclase spécifique des photorécepteurs
rho : gène de la rhodopsine
RISC : RNA-Induced Silencing Complex
rom1 : gène retinal outer segment membrane protein 1
ROP : rétinopathie du prématuré
RP : rétinopathies pigmentaires
RPE65 : Retinal Pigment Epithelium de 65 kd
RPGRIP1 : retinitis pigmentosa GTPase interacting protein 1
RT-PCR : reverse transcriptase PCR
SIV : Simian Immunodeficiency Virus

siRNA : small interfering RNA
rtTA : reverse tetracycline controlled transactivator
Tet-Off : système de répression de la transcription contrôlé par la doxycycline
Tet-On : système d'activation de la transcription contrôlé par la doxycycline
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TP : perméabilité transitoire
tTA : tetracycline controlled transactivator
TULP1 : TUbby-Like Protein 1
TU : transducing unit
Trs : terminal resolution site
UI : unité internationale
 μ L : microlitre
 μ V : microvolt
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
Vg : vector genome
WPRE : Woodchuck Hepatitis Virus Regulatory Element

PREAMBULE

Le travail de cette thèse a été réalisé dans le laboratoire INSERM U649 dont un des axes principal de recherches est le transfert de gènes à visée thérapeutique dans des maladies génétiques « orphelines » à l'aide de virus viraux recombinants et plus particulièrement ceux dérivés des adéno-associated virus. Les autres axes de recherche sont le développement et l'amélioration des méthodes de production et de purification des vecteurs viraux thérapeutiques ainsi que la caractérisation de ces vecteurs viraux. Ce laboratoire possède sa propre unité de production de vecteurs viraux.

Au cours de nos travaux de thèse, nous avons utilisé les vecteurs dérivés de l'Adéno-Associated Virus (AAV). Plusieurs études ont montré que les vecteurs rAAV permettaient un transfert de gène stable et efficace dans la rétine chez des animaux de grandes tailles (Bennett *et al.*, 1999; Bainbridge *et al.*, 2003b; Acland *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005). De plus, le développement récent de vecteurs AAV de sérotypes différents, qui présentent des tropismes propres, permet de choisir le vecteur adapté à l'organe ou au tissu cible. Pour la rétine, les sérotypes 4 et 5 possèdent un tropisme rétinien spécifique (Rabinowitz *et al.*, 2002) avec notamment une motilité particulière pour le sérotype 4 qui permet de transduire exclusivement des cellules de l'épithélium pigmenté rétinien (Weber *et al.*, 2003).

La première partie du travail de thèse a été d'évaluer, *in vivo*, la stabilité et les effets pour la rétine du transfert de gène au moyen de vecteurs dérivés d'AAV de sérotype 2, 4 et 5 dans la rétine d'animaux sains. La seconde partie du travail a été d'évaluer la capacité thérapeutique d'un AAV de sérotype 4 pour le traitement par thérapie génique de substitution du chien briard RPE65^{-/-}, qui est un modèle canin de l'Amaurose congénitale de Leber. Au cours de cette étude, une attention particulière a été portée à l'évaluation des effets sur la rétine de ce transfert de gène thérapeutique. Enfin, lors de la troisième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression d'un transgène dans la rétine au moyen d'un vecteur AAV régulable grâce au système TetOn qui est inductible par la doxycycline.

Dans la première partie introductive de ce manuscrit seront présentées les études cliniques déjà réalisées en ophtalmologie dans le domaine de la thérapie génique, les généralités sur les dégénérescences rétiniennes, les généralités sur les virus AAV sauvages et les vecteurs qui en sont dérivés, leur utilisation *in vivo* pour le traitement de dégénérescences rétiniennes, la régulation de l'expression d'un transgène dans la rétine et l'étude de biodistribution suite au transfert de gène dans la rétine via des vecteurs rAAV. Puis dans une seconde partie, la présentation de nos résultats sera articulée autour de trois articles qui feront l'objet de discussions séparées.

A : Introduction

I GENERALITES A PROPOS DE THERAPIE GENIQUE

La thérapie génique est l'introduction dans une cellule cible d'un gène d'intérêt thérapeutique sous la forme d'un ADN complémentaire. Les applications sont multiples et sont fonction du gène thérapeutique. Par exemple, il est possible de produire une protéine manquante pour une cellule déficiente, ou un signal de mort cellulaire pour une cellule cancéreuse ou un signal de survie pour une cellule dégénérative.

Le premier mode d'application de la thérapie génique est appelé thérapie génique de substitution lorsqu'il vise la réparation d'une mutation ponctuelle du gène ou d'une délétion. Par contre, elle est appelée thérapie génique de complémentation lorsque le gène est introduit dans une cellule pour assurer l'expression d'une protéine au sein ou à proximité d'une cellule.

Le transfert de gènes lors de l'application de la thérapie génique à un organisme vivant peut être réalisé selon deux modalités:

- L'administration *Ex vivo* où des cellules sont prélevées chez l'individu à traiter. Ces cellules sont transfectées *in vitro* par le vecteur et les cellules transformées par génie génétique sont de nouveau injectées à l'individu.
- L'administration *In vivo* où le vecteur est injecté directement à l'individu, soit dans le flux sanguin, soit *in situ* par délivrance du vecteur directement au niveau du tissu à cibler.

L'apport du gène d'intérêt à la cellule-cible se fait soit en utilisant un vecteur viral, soit en utilisant un vecteur non-viral.

On classe l'ADN nu parmi les vecteurs non-viraux. Les autres vecteurs non-viraux sont des liposomes constitués de lipides ou des conjugués ADN-macromolécules qui favorisent la pénétration de l'ADN dans la cellule. Les avantages de ces vecteurs sont le caractère non-immunogène, le faible coût de revient et l'absence de limitation de taille du transgène. L'inconvénient majeur de ces vecteurs est la faible efficacité, surtout *in vivo* de ce système et le caractère transitoire de l'expression du transgène.

Les vecteurs viraux sont des virus dits recombinants. Ce qui caractérise le vecteur par rapport au virus dont il dérive c'est son incapacité à se répliquer après son entrée dans la cellule-cible. Les principaux vecteurs viraux sont dérivés des rétrovirus, des adénovirus, des

virus adéno-associés (AAV pour adéno-associated virus) ou des virus herpès simplex (HSV) (Figure 1A).

Les vecteurs dérivés des rétrovirus sont des vecteurs à ARN simple brin, qui s'intègrent dans le génome cellulaire de la cellule cible après une étape de rétro-transcription. Dans cette famille des rétrovirus, seul le virus leucémogène murin (MLV) et les lentivirus sont utilisés dans le développement de vecteurs viraux. Les vecteurs recombinants obtenus à partir des rétrovirus leucémogènes murins ne s'intègrent que dans les cellules en division. Les vecteurs dérivés des lentivirus (HIV, SIV, FIV) transduisent efficacement les cellules post-mitotiques comme les cellules de la rétine. Ces derniers vecteurs sont intégratifs, ils permettent une expression stable du transgène. Depuis quelques années, des vecteurs lentiviraux non-intégratifs sont développés afin de diminuer la mutagénèse insertionnelle secondaire à l'intégration du virus dans le génome de la cellule hôte (Lu *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2004).

Les vecteurs dérivés de HSV sont peu développés. Il en existe de deux types : les vecteurs recombinants et les amplicons, tous développés à partir de l'HSV-1. Les deux types ont l'avantage de pouvoir contenir un ADN de grande taille (jusqu'à 150 kb). Trois types de vecteurs recombinants existent : les vecteurs sauvages qui portent le transgène dans la région intergénique du génome viral, les vecteurs atténués où certains gènes du virus ont été éliminés afin de réduire la neurotoxicité du vecteur et les vecteurs défectifs qui portent des délétions dans des gènes essentiels à l'accomplissement du cycle lytique de l'HSV-1. Dans la rétine, c'est uniquement les vecteurs défectifs qui ont été testés (Liu *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2000). Les amplicons sont défectifs pour la réplication, ils sont non toxiques pour les cellules infectées, et non pathogènes pour l'organisme inoculé. Ils dérivent de plasmides contenant le transgène d'intérêt, une origine de réplication, un signal de clivage et d'encapsidation herpétiques. Ils permettent de transduire efficacement les cellules de la rétine (Fraefel *et al.*, 2005).

A.

	Retrovirus	Lentivirus	Adénovirus	AAV	HSV
Type virus	ARN	ARN	ADN	ADN	ADN
Infection de cellules quiescentes	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Intégration	+	+	-	+/-	-
Taille transgène	8 kb	30 kb	8 kb	4,6 kb	30 kb
Stabilité expression transgène	Stable	Stable	Transitoire	Stable	Transitoire
Immunité préexistante	Non	Non	Oui	Oui	Oui

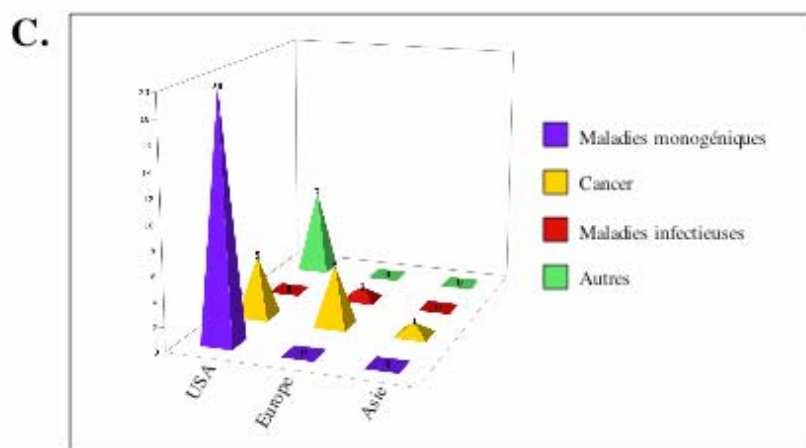
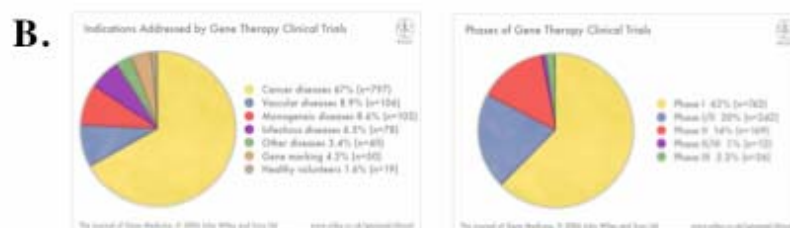


Figure 1: Vecteurs utilisés en transfert de gène et essais cliniques

A. Tableau comparatif des différents vecteurs de transfert de gène. Le tableau regroupe de manière simplifiée les principales caractéristiques des vecteurs viraux les plus utilisés en transfert de gène: les rétrovirus, les lentivirus, les adénovirus, l'AAV (adéno-associated virus) et HSV (herpes simplex virus).

B. Répartition des essais cliniques dans le monde selon les indications thérapeutiques et selon les phases d'essais cliniques (source: www.wiley.co.uk/genmed/clinical). 1192 essais cliniques, tous vecteurs confondus, ont été initiés depuis 1989. Les essais concernant des cancers représentent 67% des essais cliniques. 62% des essais cliniques sont des essais de phase I.

C. Distribution des essais cliniques utilisant un vecteur AAV selon les maladies traitées et la zone géographique de réalisation de l'essai clinique (d'après www.wiley.co.uk/genmed/clinical). 40 essais cliniques utilisant un vecteur AAV ont été initiés. 32 essais ont été effectués aux USA, dont l'indication majeure est le traitement de maladies monogéniques. En Europe, 6 essais ont été réalisés, pour la plupart dans le cadre du traitement de pathologies cancéreuses.

Les adénovirus transduisent efficacement les cellules quiescentes. L'expression du transgène est transitoire du fait d'une réaction immunogène déclenchée par la capsid et les protéines virales. Cette réaction immunogène se produit de façon importante pour les

vecteurs de première et seconde génération. La production d'adénovirus « gutless », délétés de la totalité du génome du virus sauvage, a permis de réduire l'immunogénicité du vecteur et par conséquent de prolonger l'expression du transgène. Ils offrent une grande capacité d'encapsulation (jusqu'à 30 kb).

Les vecteurs dérivés des AAV sont bien tolérés et permettent une expression du transgène à long terme. Ils transduisent les cellules quiescentes. L'ADN transféré persisterait, en grande majorité dans la cellule-cible, sous forme épisomique. Une de ses limitations est leur faible capacité d'encapsulation.

Depuis 1989, il y a 1192 essais cliniques de thérapie génique qui ont été recensés. La majorité des vecteurs utilisés pour ces essais cliniques sont des vecteurs dérivés des adénovirus (26%) et des rétrovirus (24%) (www.abedia.com/wiley/index.html). Les vecteurs dérivés de l'AAV ont été utilisés dans 3,4% des essais cliniques réalisés en thérapie génique. Les principales indications sont les pathologies cancéreuses (787 essais) puis viennent les pathologies vasculaires (106 essais) et les pathologies monogéniques (103 essais). La majorité de ces essais cliniques sont des essais de phase I. Seulement 38 essais sur ces 1192 sont des essais de phase II/III ou III (Voir figure 1B). Avec les vecteurs dérivés des AAV, il y a eu 40 essais cliniques. L'indication majeure de ces essais avec les vecteurs AAV est le traitement des maladies monogéniques (Voir figure 1C).

Actuellement en France, il y a eu 50 essais cliniques autorisés, tous vecteurs confondus. L'indication thérapeutique pour 85% de ces essais était un traitement dans le cadre d'un cancer (www.ogm.gouv.fr).

Par contre avec des vecteurs dérivés de l'AAV, aucun essai clinique n'a été réalisé en France sur les 40 essais cliniques menés dans le monde. La plupart des essais ont été ou vont être prochainement réalisés dans le cadre de maladies monogéniques (mucoviscidose, maladie de Canavan, déficit en lipoprotéine lipase, déficit en α 1 antitrypsine, dystrophie musculaire, Amaurose Congénitale de Leber). En Europe, 7 essais ont été entrepris dont 2 essais cliniques de phase III dans le cadre du cancer de la prostate.

II TRANSFERT DE GENES DANS LES MALADIES OCULAIRES ET ESSAIS CLINIQUES

Les domaines de l'ophtalmologie où la thérapie génique est testée sont nombreux avec un champ d'application allant de la cancérologie aux atteintes rétinienne. L'œil est un organe cible idéal pour le traitement par thérapie génique pour plusieurs raisons. Tout d'abord, du fait de la petite taille de l'organe cible et du faible nombre de cellules à cibler. En effet, la dose de vecteur à délivrer pour soigner l'œil doit être petite, ce qui diminue le risque de diffusion d'une grande quantité de vecteur dans la circulation générale. La production de ce petit volume de vecteur ne nécessite pas d'adaptation des méthodes de production des vecteurs à une production de très grands volumes de vecteurs. Ensuite, l'œil est considéré comme un site immunoprivilégié. Ce qui a deux conséquences : premièrement, de protéger l'œil des atteintes immunitaires extérieures suite au traitement par thérapie génique et secondairement d'éviter la diffusion du traitement intraoculaire à l'extérieur de l'œil. De plus, l'œil est un organe facilement examinable car une partie de ces structures sont transparentes, ce qui permet d'avoir un examen direct du tissu oculaire traité par thérapie génique. Tout cela fait de l'œil un organe idéal pour la mise au point et le développement de traitements par thérapie génique en ophtalmologie. Actuellement, seul deux essais cliniques chez l'homme ont été réalisés dans le domaine de l'ophtalmologie : un en cancérologie et l'autre dans une pathologie rétinienne.

La cancérologie est le domaine où le plus grand nombre d'essais cliniques en thérapie génique ont été réalisés. Le cycle cellulaire est de mieux en mieux connu, de même que l'apoptose. De nombreuses stratégies, agissant sur ces mécanismes afin de bloquer les tumeurs, ont été mises au point.

Plusieurs atteintes cancéreuses ophtalmologiques font actuellement l'objet de recherche dans le domaine du transfert de gène, mais seul le rétinoblastome a vu les recherches aller jusqu'au stade d'une étude clinique. Le rétinoblastome est la tumeur intraoculaire la plus fréquente chez l'enfant. De la naissance à l'âge de 4 ans, il représente 6,5% de tous les cancers (Zografos, 2002). Actuellement, 95% des enfants atteints de rétinoblastome sont sauvés. L'amélioration du taux de survie a été obtenue grâce à une prise en charge plus précoce et à une diversification des modalités de traitements. L'énucléation, la radiothérapie externe, la brachythérapie, la photocoagulation et la chimiothérapie sont les traitements classiques du rétinoblastome. Ces dernières années, des nouvelles stratégies

thérapeutiques ont été développées comme la thermochemiothérapie, la thermothérapie, la chimioréduction ou chimiothérapie néo-adjuvante permettant un traitement conservateur dans la majorité des atteintes cancéreuses de rétinoblastome. Le protocole de traitement des tumeurs massives (2/3 du volume oculaire avec plus ou moins d'essaimage vitréen) comprend la chimioréduction ou la radiothérapie ou l'énucléation (Balmer *et al.*, 2002). Chacune des techniques utilisées pour le traitement de ces tumeurs massives est marquée par l'apparition de complications. L'énucléation, indiquée dans les cas où les chances de recouvrer une fonction visuelle utile sont nulles ou lors de risques réels de dissémination, est marquée par une complication majeure qui survient dans 1,6% à 28% cas ; à savoir l'exposition de l'implant mis en remplacement de l'œil (Lee *et al.*, 2000). La radiothérapie externe, longtemps pierre angulaire du traitement conservateur du rétinoblastome présente des effets secondaires nombreux et parfois dramatiques. L'apparition d'une cataracte post-radique ne pose pas de problème car elle peut être traitée à distance du traitement anticancéreux. Mais l'apparition d'une rétinopathie radique, d'une neuropathie radique, d'un décollement de rétine, d'une hypoplasie du massif facial ou d'une seconde tumeur maligne non-oculaire laisse les thérapeutes sans ressources. La mortalité secondaire par apparition d'une seconde tumeur non oculaire chez l'enfant atteint d'un rétinoblastome bilatéral traité par radiothérapie externe est de 30% à 40 ans (Balmer *et al.*, 2002). En effet, la particularité des patients atteints de rétinoblastome réside dans leur capacité à développer des tumeurs secondaires radio-induites voire chimio-induites. C'est cette particularité, la fréquence de cette tumeur et la recherche de l'amélioration du confort de vie des patients traités, qui ont amené différents chercheurs à considérer cette pathologie comme susceptible de bénéficier du transfert de gène. En effet, dans le domaine de la cancérologie, le transfert de gènes est considéré comme une thérapeutique d'avenir soit en introduisant dans la cellule tumorale un gène suicide, soit en stimulant la réponse immunitaire. Pour le rétinoblastome c'est la thérapie du gène suicide qui est utilisée. Un vecteur adénoviral non répliquatif délivre une thymidine kinase de l'herpès simplex (TK) à sa cellule cible tumorale. Les cellules transduites par ce gène sont exposées dans un second temps au substrat de l'enzyme virale : le ganciclovir administré par voie intraveineuse. Ce substrat est métabolisé par la thymidine kinase de l'herpès virus puis par des enzymes cellulaires en analogues des purines. Ces analogues des purines vont s'incorporer, de façon anormale, dans les chaînes d'ADN au cours de la synthèse de l'ADN pour bloquer la réplication car les ADN polymérases ne peuvent répliquer l'ADN contenant cet analogue nucléosidique phosphorylé. Les mitoses sont interrompues et la cellule cancéreuse meurt. Les cellules eucaryotes sont incapables de métaboliser le ganciclovir et donc de produire des dérivés toxiques. Le métabolite toxique est capable de diffuser aux cellules voisines, élargissant l'effet thérapeutique aux cellules non transduites ou peu accessibles.

Un essai clinique de phase I, utilisant ce principe, a été réalisé aux Etats-Unis. 8 jeunes patients porteurs d'un rétinoblastome bilatéral avec un essaimage vitréen ont été inclus. Toutes les tumeurs étaient résistantes aux traitements « classiques » par chimiothérapie et par radiothérapie. Une énucléation était prévue à court terme à cause de cette résistance au traitement. L'administration du vecteur adénoviral de sérotype 5 porteur de la thymidine kinase de l'herpès simplex s'est faite par injection intracaméculaire avec secondairement l'administration de ganciclovir par voie intraveineuse. Une cryothérapie des lésions rétiniennes, à distance de l'essaimage vitréen, était également adjointe. Il y a eu de 1 à 5 traitements par patient avec un total de 21 injections. Les titres des préparations virales étaient différents (10^8 , 10^9 , 10^{10} et 10^{11} particules infectieuses/ml). Les résultats obtenus ont été l'éclaircissement du vitré sans disparition de la tumeur. L'examen histologique a mis en évidence une absence de cellules tumorales dans le vitré chez tous les patients ayant reçu des injections virales de titre supérieur à 10^{10} particules infectieuses/ml. Les effets secondaires observés ont été en fonction du titre de la solution virale délivrée. Plus le titre était élevé, plus une inflammation intraoculaire était importante. L'apparition d'une inflammation est expliquée par les investigateurs comme provenant de la réaction de lyse des cellules tumorales suite au traitement et également comme provenant du vecteur adénoviral (Chevez-Barrios *et al.*, 2005). En effet, les vecteurs dérivés des adénovirus sont à l'origine de réponses immunitaires après une administration intraoculaire (Reichel *et al.*, 1998). Dans cette étude de phase I, le traitement par thérapie génique n'a pas empêché le recours à l'énucléation. Pour cette raison, les investigateurs n'ont pas prévu, pour le moment, de phase II mais plutôt d'autres études afin de déterminer quelle position pourrait prendre la thérapie génique associant thymidine kinase-ganciclovir dans les schémas thérapeutiques actuels du rétinoblastome (Chevez-Barrios *et al.*, 2005).

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la seconde pathologie dans laquelle un traitement par thérapie génique a été testé chez l'homme. Une des complications majeures de cette pathologie est la néovascularisation choroïdienne. Lorsque le centre de la macula est atteint, la néovascularisation choroïdienne est responsable d'une baisse importante de l'acuité visuelle. D'ailleurs la DMLA est la première cause de malvoyance en Europe et aux Etats-Unis chez les sujets de plus de 55 ans (Rahmani *et al.*, 1996; Ciulla *et al.*, 1998). L'angiogénèse correspond au développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un arbre vasculaire pré-établi. Ce processus complexe est indispensable à de nombreux processus physiologiques (phénomènes de régénération, de cicatrisation tissulaire), mais il est également requis pour le développement de pathologies (cancer, pathologies néovasculaires oculaires). Dans le cas d'angiogénèse pathologique, on parle de

néoangiogénèse ou néovascularisation. Plus de 20 facteurs peuvent influencer ce processus d'angiogénèse : le Fibroblast Growth Factor (FGF), le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), le Vascular Permeability Factor (VPF), la thrombospondine, l'angiostatine, l'interféron-alpha ($INF\alpha$), le Platelet Factor 4 (PF4), l'interleukine 8 (IL8), le Platelet Derived Growth Factor (PEDF), le Tumor Necrosis Factor alpha ($TNF-\alpha$)... Un déséquilibre de l'un ou de l'autre de ces facteurs, voire de facteurs multiples, peut faire basculer la cellule vers la néoangiogénèse. La pathogénie de la néovascularisation comme l'angiogénèse est un phénomène complexe qui se déroule en plusieurs étapes. Le processus débute par la libération de cytokines et de facteurs de croissance produits par des cellules ischémiques, inflammatoires ou tumorales. Ces facteurs de croissance activent les cellules endothéliales, quiescentes, entraînant leur prolifération et leur migration orientée. Lors de la dernière phase de l'angiogénèse, les cellules endothéliales se différencient et forment des tubes capillaires. Les cellules mésenchymateuses environnantes se différencient pour former les péricytes. Enfin, une nouvelle membrane basale est formée autour du tube capillaire.

Il a été montré que l'expression intraoculaire d'inhibiteurs de ces facteurs angiogéniques, grâce à différents vecteurs, permet d'inhiber la néovascularisation choroïdienne (Igarashi et al. 2003., Mori et al. 2001., Takahashi et al. 2000). Le PEDF est un facteur inhibiteur de l'angiogénèse (Dawson et al., 1999). Chez la souris, ce facteur a été utilisé dans plusieurs études de thérapie génique. Un haut taux de PEDF dans différents yeux a été obtenu après injection sous-rétinienne ou intravitréenne d'un adénovirus, délété pour E1, E4 et partiellement pour E3, portant le cDNA du PEDF sous le contrôle du promoteur CMV (AdPEDF.11). Cette forte expression du PEDF a permis la régression de la vascularisation choroïdienne dans trois modèles murins différents (Mori et al., 2001; Mori et al., 2002). La régression de la néovascularisation choroïdienne suite à ces injections d'AdPEDF.11 surviendrait par l'apoptose des cellules vasculaires participant à cette néoangiogénèse (Mori et al., 2002). Cet effet bénéfique a donc été montré dans des yeux de petite taille. Avant le passage à la clinique au cours d'un essai de phase I, ce vecteur a été testé dans des yeux de taille humaine afin de s'assurer du bon fonctionnement dans un modèle animal de grande taille. Dans un modèle porcin de néovascularisation laser-induite, une injection périoculaire ou intravitréenne d'AdPEDF.11 permet de réduire la néovascularisation choroïdienne de 38 à 77% (Saishin et al., 2005). Campochiaro et Al ont publié, dernièrement, les résultats de cette étude clinique de phase I qui évaluait le PEDF délivré par ce vecteur adénoviral AdPEDF.11 pour le traitement de la néovascularisation dans le cadre de la DMLA (Campochiaro et al., 2006). Le but de cette étude multicentrique, réalisée aux Etats-Unis, était d'évaluer la faisabilité des injections intravitréennes d'AdPEDF.11 et la sécurité de ces injections chez des patients atteints de DMLA. 28 patients ont été inclus. Au moment de l'inclusion, leur meilleure acuité visuelle était au maximum de 20/200. Ils présentaient une

néovascularisation rétrofovéolaire supérieure à 12 diamètres papillaires. Chaque patient n'a reçu qu'une injection intravitréenne avec un suivi de 1 an après l'injection. Différents titres de la solution virale ont été injectés allant dans un ordre croissant de 10^6 à $10^{9.5}$ PU en augmentant d'1/2 log à chaque fois. Suite à ces injections, 25% des patients ont présenté des signes transitoires d'inflammation modérée sous la forme d'uvéite de chambre antérieure, d'oedème cornéen ou de kératites. Il semble que ces effets adverses soient survenus lors d'une injection à $10^{9.5}$ PU. Six patients ont présenté une hausse de la tension intra-oculaire qui a été bien régulée par l'emploi de médicaments antiglaucomeux topiques habituels. L'examen des fonds d'yeux ainsi que les angiographies à la fluorescéine n'ont pas mis en évidence d'effets toxiques de l'injection intravitréenne d'AdPEDF.11. Les taux d'anticorps neutralisants contre l'adénovirus après les injections d'AdPEDF.11 n'ont pas systématiquement augmenté. Mais quelques patients ont montré une augmentation de leur taux basal d'anticorps 3 semaines après l'injection. Pour bénéficier d'un effet positif sur la préservation de l'acuité visuelle, il semble qu'il faille utiliser une dose supérieure à 10^8 PU. L'évaluation de l'acuité visuelle suite à l'injection intravitréenne d'AdPEDF.11 sera réalisée dans l'étude prochaine de phase II (Campochiaro *et al.*, 2006).

L'exposition de ces deux essais cliniques de phase I dans le domaine de l'ophtalmologie montre que les vecteurs utilisés pour de telles applications sont dérivés de l'adénovirus. Ceci est lié à l'historique de la thérapie génique. Les vecteurs dérivés de ce virus sont apparus en premier dès 1985 (Mansour *et al.*, 1985). La mise au point des études préliminaires à ces essais cliniques a, par conséquent, été menée en utilisant des vecteurs adénoviraux (Hurwitz *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001; Rasmussen *et al.*, 2001). Actuellement, l'avancée des connaissances dans le développement de vecteurs viraux conduit à préférer l'utilisation de vecteurs dérivés de l'AAV pour une application oculaire, car les vecteurs dérivés des adénovirus entraînent une inflammation oculaire lors de leurs injections intraoculaires (Reichel *et al.*, 1998). Inflammation qui risque d'être délétère pour la fonction visuelle. C'est pourquoi, le transfert de gènes dans la rétine est envisagé via des vecteurs dérivés de l'AAV. Les prochains essais cliniques en ophtalmologie, déclarés à la RAC (Recombinant DNA Advisory Committee), sont prévus avec un vecteur dérivé de l'AAV.

III LES DEGENERESCENCES RETINIENNES HEREDITAIRES

Le traitement par thérapie génique est évalué dans de nombreux domaines de l'ophtalmologie, mais dans ce manuscrit, nous n'aborderons que le cas des dégénérescences rétiniennes et de manière détaillée la thérapie génique dans les dégénérescences rétiniennes d'origines héréditaires.

Les dystrophies héréditaires de la rétine ou dégénérescences tapéto-rétiniennes héréditaires comportent un nombre important d'entités cliniques et/ou génétiques. Elles sont arbitrairement subdivisées en trois groupes : les rétinopathies pigmentaires (*rod-cone* dystrophies), les dystrophies inverses (*cone-rod* dystrophies), les dystrophies maculaires. La prévalence des rétinopathies pigmentaires (RP) est estimée à un pour 4225 en France (Puech *et al.*, 1991), ce qui est en accord avec la prévalence mondiale estimée à un pour 4000 (Berson, 1993). Environ 25000 personnes souffriraient de cette maladie en France.

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires sont caractérisées par une triple hétérogénéité clinique, génétique et moléculaire. Ces trois points seront, tour à tour, exposés puis les traitements actuels de ces pathologies seront évoqués. Un chapitre sera dédié à l'Amaurose Congénitale de Leber (ACL) puis pour finir la particularité clinique liée à la mutation du gène *rpe65* sera développée.

3.1. Clinique

Les critères diagnostiques classiques des RP, retenus par Marmor (Marmor *et al.*, 1983) sont les suivants : atteinte bilatérale, perte du champ visuel périphérique, altération de la fonction des bâtonnets à l'adaptation à l'obscurité, perte progressive de la fonction des photorécepteurs. L'âge du début de la maladie est très variable. L'apparition des premiers signes cliniques peut s'étaler de la naissance (ACL) à plus de 60 ans pour les RP dites tardives.

L'affection est le résultat d'une atteinte primitive dégénérative du couple cellulaire épithélium pigmentaire-photorécepteurs. En fonction de l'atteinte primaire d'un des deux types de photorécepteurs, cônes ou bâtonnets, les signes cliniques seront différents. Voir figure 2 pour un rappel de la structure rétinienne et de celle des photorécepteurs.

Pour les RP typiques, dite à bâtonnets prédominants ou *rod-cone* dystrophies, l'apparition des différents signes cliniques est assez stéréotypée dans la séquence de

survenue. La première gêne remarquée par le patient ou son entourage est la gêne visuelle nocturne ou l'absence de vision nocturne (hespéranopie et héméralopie). Celle-ci peut être associée à une difficulté d'adaptation à l'obscurité. Puis dans un délai variable, allant de quelques années à quelques décennies, survient la perception de la constriction du champ visuel. L'acuité visuelle centrale est souvent conservée jusqu'à des stades avancés de la maladie puis la perte des cônes fovéolaires mène à la cécité. La vision des couleurs est rarement altérée au début. Cette séquence fonctionnelle traduit l'atteinte primitive des bâtonnets, puis survient l'atteinte des cônes. Ce tableau clinique est retrouvé 9 fois sur 10 dégénérescences rétiniennes si l'on excepte les dystrophies maculaires qui ne seront pas évoquées dans ce chapitre.

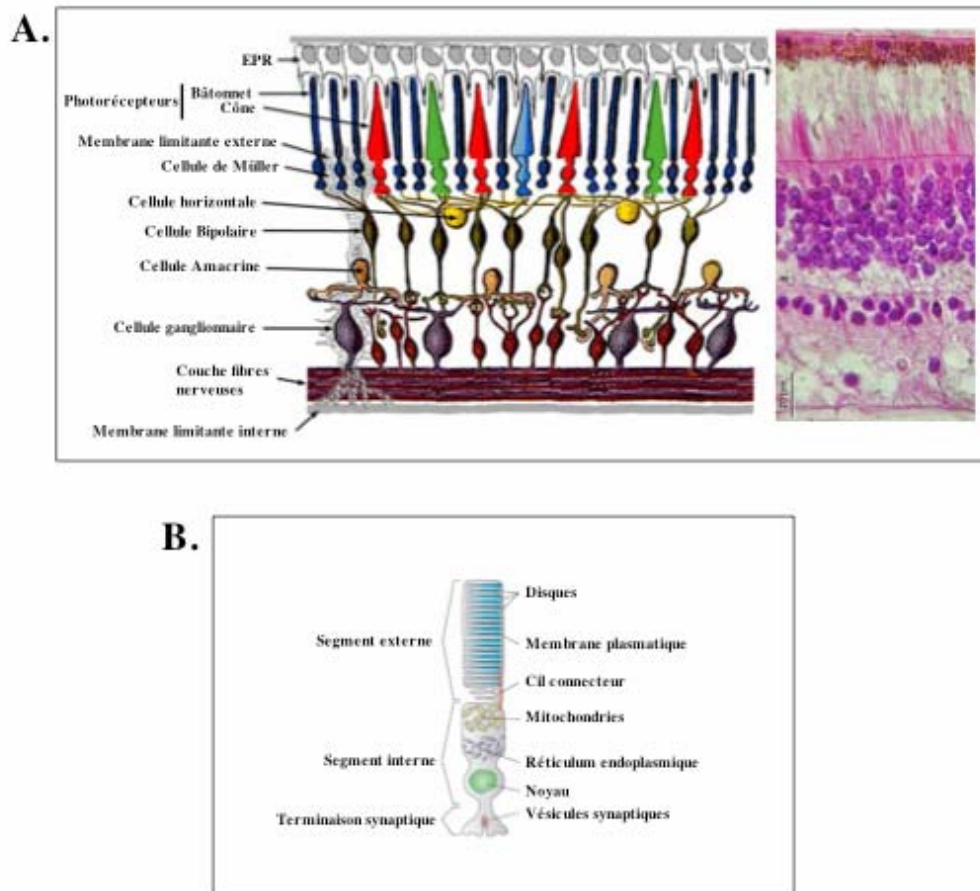


Figure 2: Organisation structurelle de la rétine et d'un photorécepteur

A. schéma simplifié de la structure de la rétine (à gauche) et coupe histologique de la rétine (à droite) (D'après <http://webvision.med.utah.edu/index.html>). Dans la partie la plus profonde de la rétine se trouvent les photorécepteurs qui sont en contact étroit avec les cellules de l'EPR (en haut du dessin). Les cellules ganglionnaires sont situées à la superficie de la rétine (en bas du dessin). Les cellules bipolaires, horizontales et amacrines sont rassemblées dans le milieu de la rétine. EPR, épithélium pigmentaire rétinien

B. Structure d'un bâtonnet. Cette cellule est divisée en trois parties: i) le segment externe qui comprend les disques entourés de membrane plasmatique et le cil connecteur, ii) le segment interne où sont situés les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le noyau, et iii) la terminaison synaptique.

Dans 1 cas sur 10, il s'agit d'une RP inverse ou *cone-rod* dystrophies (CRD) où la symptomatologie est essentiellement maculaire. La baisse de l'acuité visuelle survient rapidement associée à une photophobie, une dyschromatopsie (altération de la vision des couleurs) (Rabb *et al.*, 1986). Plus tard, il survient une héméralopie peu marquée et des troubles du champ visuel périphérique. Cette forme cause, précocement, un handicap plus sévère. Cette séquence fonctionnelle traduit l'atteinte primitive des cônes survenant de façon concomitante ou prééminente à celle des bâtonnets.

Les rétinoopathies pigmentaires peuvent exister de façon isolée. On parle alors de forme non syndromique. Lorsqu'elles sont associées à d'autres symptômes extra-oculaires, on parle de rétinoopathies pigmentaires syndromiques. Dans les syndromes de Usher, une atteinte de l'oreille interne, plus ou moins sévère, est associée. Cette forme syndromique est remarquable par sa fréquence car elle représente 18% des rétinoopathies pigmentaires (Roux, 2005). Les autres formes syndromiques sont le syndrome de Bardet-Biedl, le syndrome de Cohen, le syndrome d'Alström, le syndrome de Senior-Locken, le syndrome de Cockayne. On classe parfois, les rétinoopathies pigmentaires d'origine métaboliques parmi les formes syndromiques car l'atteinte métabolique entraîne l'association à l'atteinte rétinienne d'autres symptômes : diabète, signes neurologiques, hépatopathie, myopathie, néphropathie, myocardiopathie, symptômes digestifs.

Différents examens permettent de poser le diagnostic de dégénérescence rétinienne. Tout d'abord, l'examen du fond d'œil peut mettre en évidence des changements caractéristiques. Les changements précoces sont la modification du calibre artériolaire, un remaniement diffus de l'épithélium pigmentaire, une décoloration globale du fond d'œil. Au stade avancé, le fond d'œil est caractérisé par un rétrécissement artériolaire diffus, une papille décolorée, la présence de migrations pigmentées d'aspect spiculé : les ostéoblastes. Lors d'une atteinte de type CRD, les premiers signes visibles au fond d'œil sont des regroupements pigmentaires dans la région maculaire avec des modifications de la périphérie moins marquées. Les associations ou les complications, fréquemment retrouvées dans ces maladies héréditaires, sont la cataracte en soucoupe postérieure (Fishman *et al.*, 1985), des remaniements vitréens (Sudarshan, 1999), un œdème maculaire cystoïde, une membrane épimaculaire (Fishman *et al.*, 1977).

L'électrorétinogramme (ERG) est un examen complémentaire incontournable pour poser le diagnostic de rétinoopathie pigmentaire. Notamment dans les formes débutantes où l'aspect du fond d'œil peut être quasi normal. Cet examen détecte le potentiel électrique rétinien produit par les cellules rétinienne en réponse à une stimulation lumineuse. Il est possible de

séparer les réponses des cônes et des bâtonnets en fonction de la longueur d'onde et de la fréquence du stimulus lumineux. Les formes avancées se caractérisent par une extinction globale de l'ERG en ambiance photopique et scotopique. Lors d'une forme débutante, l'ERG retrouve de façon variable une diminution des ondes de l'ERG en condition scotopique associée ou non à une altération des réponses photopiques.

La réalisation d'un champ visuel est, également, incontournable. Il est souvent altéré dès le début de la maladie. C'est un examen important pour évaluer le handicap et notamment pour déterminer la capacité à la conduite automobile. En règle, l'évolution du champ visuel d'un patient atteint de RP classique se fait vers une constriction progressive avec une perte environ 10% par an. Le champ visuel caractéristique est tubulaire avec une conservation du champ visuel central. Lorsque cet îlot central est perdu, la cécité est complète.

L'angiographie à la fluorescéine est de moins en moins réalisée sauf si nécessité de caractériser une complication ou lors d'une atteinte maculaire. Par contre l'examen par tomographie par cohérence optique (OCT) est de plus en plus pratiqué. En effet, grâce à cet examen indolore et non invasif, on peut évaluer l'amincissement progressif de la macula qui survient dans de nombreuses RP (Sandberg *et al.*, 2005). L'œdème maculaire cystoïde ou une membrane épirétinienne sont, également, aisément visualisables par cet examen (Hirakawa *et al.*, 1999).

3.2. Génétique

Actuellement, 181 gènes et loci sont connus comme à l'origine de dystrophies rétiniennes héréditaires, 129 d'entre eux ont été clonés (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis.htm>). Les RP se caractérisent par une hétérogénéité dans les modes de transmission génétique, ce qui complique le conseil génétique. Tous les modes de transmission sont décrits. Dans la majorité des cas, ces pathologies suivent le mode de transmission monogénique des maladies génétiques à savoir, une transmission de type dominante, récessive, liée à l'X ou mitochondriale.

Des variations dans la survenue ou non de la maladie chez les individus porteurs de l'allèle muté ou des allèles mutés sont possibles. Cette variation est appelée pénétrance variable. Elle est plus fréquente dans les formes dominantes. Il est vraisemblable que ces variations

soient liées à la modulation de l'effet pathogène d'un gène par d'autres gènes dits modulateurs (Maubaret and Hamel, 2005).

Les pathologies à transmission autosomique dominante résultent d'une mutation survenant dans une seule copie du gène. Quatorze gènes sont connus comme responsables de formes dominantes de RP (*ca4*, *crx*, *guca1b*, *sema4a*, *fscn2*, *impdh1*, *nlr*, *prpf3*, *prpf8*, *prpf31*, *rds*, *rho*, *rom1*, *rp1* et *rp9*). La part de responsabilité de ces différents gènes lors d'une RP autosomique dominante est variable (voir figure 3) mais le gène *rho* est celui qui est le plus fréquemment retrouvé muté, de 10% à 26.5% selon les études (Dryja *et al.*, 1990a; Bunge *et al.*, 1993; Bareil *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 2006). Selon les études, de 45 à 60% des patients présentant tous les signes de ce type de RP ne portent pas de mutations dans les gènes connus comme responsables de RP autosomiques dominantes (Maubaret and Hamel, 2005; Sullivan *et al.*, 2006). En effet, il reste à caractériser des gènes impliqués dans ce type de pathologie.

Les pathologies autosomiques récessives résultent de mutations présentes sur les deux copies du gène. L'incidence de ces formes a été décrite comme plus élevée dans les mariages consanguins. Les individus qui ont une copie normale et une copie anormale (hétérozygote) ne présentent pas la maladie. Sur le site Retnet (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis.htm>), dix-neuf gènes sont annoncés comme responsables de RP autosomiques récessives (*abca4*, *cerkl*, *cnga1*, *cngb1*, *crb1*, *lrat*, *mertk*, *nr2e3*, *nrl*, *pde6a*, *pde6b*, *rgr*, *rho*, *rlbp1*, *rp1*, *rpe65*, *sag*, *tulp1*, *ush2a*). Les principaux gènes de RP autosomiques récessives, pour lesquels une estimation de fréquence est disponible (*abca4*, *cnga1*, *lrat*, *mertk*, *pde6a*, *pde6b*, *rgr*, *rlbp1*, *rpe65*, *tulp1*, *ush2a*), ne représentent pas plus de 25% de ces formes.

Les pathologies liées à l'X sont dues à une anomalie d'un gène se trouvant sur le chromosome X. Dans le cas des RP, ce sont des pathologies récessives liées à l'X qui surviennent chez des sujets de sexe masculin. Les femmes hétérozygotes sont conductrices, il peut arriver qu'elles soient symptomatiques mais de manière moins sévère.

Deux gènes

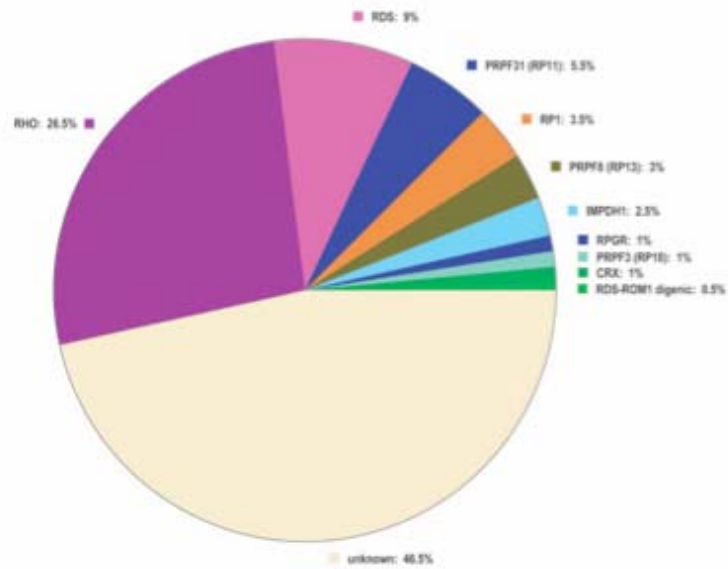


Figure 3: Répartition des RP autosomiques dominantes causées par des mutations dans des gènes connus et dans des gènes encore inconnus.

D'après Sullivan. IOVS. 2006. Dans 46,5% des cas, la mutation génique à l'origine de la rétinopathie autosomique dominante n'est pas mise en évidence, dans 26,5% la mutation du gène de la *rho* (*rhodopsine*) est à l'origine de la pathologie et dans 9% des cas la mutation du gène *rdx* (*retinal degeneration slow*) est à l'origine de la maladie

responsables de cette forme ont été déterminés : *RPGR* et *RP2*. Les mutations du gène *RPGR* sont responsables de 70% des RP liées à l'X (Vervoort *et al.*, 2000), les mutations du gène *RP2* sont responsables de 10% des RP liée à l'X (Hardcastle *et al.*, 1999).

Les maladies mitochondriales sont dûes à des mutations de l'ADN maternel. L'ADN codant pour le fonctionnement des mitochondries est transmis quasi exclusivement par les ovules maternels. Un homme porteur d'une maladie mitochondriale ne transmettra pas, en théorie, cette pathologie à ses enfants. Le syndrome de Kearns-Sayre est transmis suivant ce mode (Puddu *et al.*, 1993).

Il existe une autre forme de transmission possible dans le cadre des rétinopathies pigmentaires, c'est le cas rare de transmission digénique. Ces pathologies ne se développent que si une mutation se trouve simultanément sur deux gènes indépendants. Une forme de RP dépend de ce mode de transmission, elle comporte l'association d'une mutation dans le gène de la *périphérine* et dans le gène *ROM1*. La recherche de mutations dans les gènes codant pour la périphérine et ROM1 a montré que les individus touchés par cette RP avaient une mutation dans chacun des deux gènes. Les individus qui avaient uniquement une mutation dans un gène ne développaient pas la maladie (Kajiwara *et al.*, 1994). Cependant, des mutations dans l'un ou l'autre des gènes peuvent provoquer une forme autosomique dominante de RP.

Ces particularités génétiques montrent qu'une approche simple et sans équivoque de la génétique des rétinopathies pigmentaires est malaisée. En effet, trouver une corrélation phénotype-génotype dans le cadre des RP est une chose difficile. Cette corrélation phénotype-génotype n'est pas évidente car des mêmes mutations d'un même gène peuvent entraîner l'apparition de maladies à phénotype différent. Des mutations différentes dans un même gène peuvent donner des phénotypes identiques pour certains gènes et complètement différents pour d'autres. Et enfin, des phénotypes identiques peuvent être liés à des mutations affectant des gènes différents.

3.3. Anomalies moléculaires

De plus en plus, le rôle des protéines, codées par les gènes mis en évidence comme responsables de RP, est connu. Une étude moléculaire de la fonction de ces protéines permet de connaître de façon plus précise ces pathologies rétinienne. Lors de cette étude, on se rend compte que les mutations des gènes retrouvés dans les rétinopathies pigmentaires concernent des gènes impliqués dans la structure des photorécepteurs ou de la matrice extracellulaire, dans des facteurs de transcription, dans des protéines de transport, et dans le cycle visuel décomposé en deux éléments : la cascade de la transduction visuelle et le cycle des rétinoïdes. Nous ne pourrions pas évoquer tous les gènes responsables de dystrophies rétinienne dans ce chapitre, mais quelques gènes de chaque groupe de fonction protéique seront évoqués afin de comprendre que les dégénérescences rétinienne sont un groupe complexe de maladies dont le niveau de compréhension est de plus en plus important mais qu'il reste parfois des difficultés à déterminer une relation phénotype-génotype-anomalie moléculaire.

3.3.1 Gènes de structure des photorécepteurs

Les photorécepteurs sont des cellules dont l'architecture est complexe. L'empilement précis des disques membranaires des segments externes est essentiel pour le phénomène de transduction visuelle.

- *rom1* (retinal outer segment membrane protein 1) est un gène situé en 11q12.3 de 1386 paires de bases (pb) (MIM 180721) (Bascom *et al.*, 1992a). Il code pour une protéine structurelle des photorécepteurs, qui est située au niveau de l'architecture des disques des segments externes (Clarke *et al.*, 2000). C'est une protéine qui forme un homodimère et qui peut former un hétérodimère avec la protéine produite à partir du gène *RDS* (Retinal Degeneration Slow) grâce à des ponts disulfures (Loewen and Molday, 2000). C'est une protéine essentielle pour la stabilité de ces disques (Clarke *et al.*, 2000). Les mutations de ce gène *rom1* sont retrouvées dans une forme particulière RP digénique.
- *rd5* (Retinal Degeneration Slow) est un gène situé en 6p21.2 (MIM 179605). La protéine codée par ce gène est une périphérine, homologue de la périphérine 2 chez la souris. C'est une glycoprotéine transmembranaire qui est présente au niveau des disques des segments externes des cônes et des bâtonnets (Travis *et al.*, 1991).

Cette protéine, qui peut être liée à la protéine ROM1, a un rôle essentiel pour la stabilisation et la compaction des disques des segments externes des photorécepteurs (Travis *et al.*, 1991). La mutation de ce gène est à l'origine de multiples formes de dégénérescences rétiniennes : rétinopathies autosomiques dominantes (Kajiwara *et al.*, 1991), dystrophies maculaires diverses (en ailes de papillon (Nichols *et al.*, 1993), vitelliforme chez l'adulte (Wells *et al.*, 1993), pattern dystrophie (Kim *et al.*, 1995)), rétinites ponctuées albescentes autosomiques dominantes (Kajiwara *et al.*, 1993).

- Le produit du gène *rpgr1* interviendrait dans le cytosquelette du segment externe du photorécepteur. La description de ce gène sera envisagée dans le chapitre sur l'ACL car sa mutation est retrouvée dans cette pathologie (Dryja *et al.*, 2001). Des mutations du gène *rpgr1* sont, aussi, décrites dans des CRD autosomiques récessives (Hameed *et al.*, 2003).

3.3.2. Gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire, les membranes basales jouent un rôle essentiel dans l'adhésion des différentes cellules rétiniennes, dans la croissance et dans la différenciation cellulaire. Mais également dans les échanges entre les différentes cellules rétiniennes notamment entre les segments externes des photorécepteurs et des cellules de l'EPR dans la matrice interphotoréceptrice.

- Le produit du gène *ush2a*, l'Usherin est un composant des membranes basales de la rétine et de la cochlée (Roux, 2005). La mutation de ce gène *ush2a* serait à l'origine de 25 à 65% des cas de syndrome de Usher de type 2 (Najera *et al.*, 2002; van Wijk *et al.*, 2004) mais également de RP récessive isolée sans altération de la fonction auditive (Rivolta *et al.*, 2000).
- La fibuline 3, également appelée EGF-containing fibrillin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) est codée par le gène *efemp1* situé en 2p16.1. Cette protéine ubiquitaire possède une grande homologie avec les fibulines et les fibrillines, ce qui suggère qu'il s'agit d'une protéine de la matrice extracellulaire (Rozet *et al.*, 2005). Le rôle de cette protéine n'est pas complètement déterminé, il a seulement été décrit que son accumulation anormale interviendrait dans la formation de drusen dans

certaines maculopathies (Marmorstein *et al.*, 2002). La mutation de ce gène est retrouvée dans une maculopathie héréditaire dénommée Malattia Leventinese ou maladies des drusen dominants qui est une maladie de transmission autosomique dominante (Stone *et al.*, 1999)

- Le produit du gène *crb1* est nécessaire au maintien de polarité des photorécepteurs. La seule pathologie décrite associée à une mutation de ce gène est l'ACL par conséquent la fonction de ce gène sera décrite dans le chapitre sur l'ACL.

3.3.3. Gènes codant pour des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des facteurs importants pour le développement de la rétine et notamment pour la différenciation des cellules rétinienne.

- Le gène *nr2e3* également connu sous PNR (Photoreceptor-specific Nuclear Receptor) est situé en 15q23. Il code pour un récepteur nucléaire spécifique des photorécepteurs et est un facteur de transcription. Lors de l'altération de NR2E3, il y a un excès de production de cônes S lors du développement de la rétine. La mutation du gène *nr2e3* est impliquée dans une pathologie dénommée « enhanced S cone syndrome » où la réponse électrophysiologique est augmentée en lumière bleue (Haider *et al.*, 2000), dans le syndrome de Goldmann-Favre (Haider *et al.*, 2000) et dans une RP autosomique récessive (Gerber *et al.*, 2000).
- *rp1* est un gène de 4 exons situé en 8q11.13 (MIM 603937). Il code pour la protéine RP1 anciennement dénommée ORP1 (Oxygen-Regulated Photoreceptor Protein 1) car il avait été montré que l'expression du *rp1* était régulée par le niveau d'oxygène de la rétine (Pierce *et al.*, 1999). La protéine interviendrait durant le développement de la rétine notamment en agissant sur la voie de signalisation JNK (c-Jun N Terminal Kinase) par modification de la phosphorylation de membres de cette voie de signalisation (Liu *et al.*, 2005). Mais le rôle de RP1 serait double car les domaines double cortine de cette protéine agiraient comme stabilisateur des axonèmes des cils des photorécepteurs (Liu *et al.*, 2004a). La mutation de ce gène est à l'origine de 3 % des RP dominantes en l'Amérique du nord (Pierce *et al.*, 1999) et dernièrement, il a

été montré que ce gène était impliqué dans une RP autosomique récessive dans trois familles pakistanaises consanguines (Khaliq *et al.*, 2005).

- Le gène *crx* code pour une protéine qui est un facteur de transcription. Sa description sera envisagée dans le chapitre sur l'ACL. Toutefois, la mutation de ce gène *crx* est à l'origine de RP autosomique dominante de survenue tardive (Sohocki *et al.*, 1998), de CRD autosomique dominante (Freund *et al.*, 1997), d'ACL dominante (Freund *et al.*, 1998).

3.3.4. Gènes codant pour des protéines qui permettent le transport de molécules au sein du photorécepteur

Le photorécepteur est une cellule polarisée. La majorité de la production des protéines a lieu dans la partie proximale du segment interne, une grande partie de ces protéines est utilisée dans le segment externe du photorécepteur. Ces protéines sont transportées d'un segment à l'autre via le cil connecteur le long de microtubules à l'intérieur de vésicules.

- Le gène *prom1* (pour PROminin Mouse Homolog-Like 1) est situé en 4p15.32. Il code pour une glycoprotéine qui comprend 5 domaines transmembranaires. Cette protéine aurait un rôle dans l'évagination membranaire survenant à la base du segment externe des bâtonnets qui permet la formation continue de disques au niveau des segments externes des photorécepteurs (Maw *et al.*, 2000). Cette protéine aurait un rôle dans l'organisation, dans la composition des protusions membranaires plasmiques et par conséquent dans le transport des molécules d'opsine qui sont produites dans le segment interne des photorécepteurs et qui doivent rejoindre les disques des photorécepteurs. La mutation de ce gène *prom1* est à l'origine de RP autosomique récessive (Maw *et al.*, 2000).
- Les produits d'expression du gène *tulp1* interviendraient dans le transport d'éléments entre le segment interne et le segment externe. La description de ce gène aura lieu dans le chapitre sur l'ACL. La mutation du gène *tulp1* est retrouvée dans le cas de RP autosomiques récessives (Hagstrom *et al.*, 1998) et dans l'ACL (Xi *et al.*, 2006).

3.3.5 Gènes dont les produits sont impliqués dans le cycle visuel

Le cycle visuel comprend la cascade de phototransduction et le cycle des rétinoïdes (Figure 4).

➤ La cascade de phototransduction

La phototransduction est l'ensemble des étapes biochimiques qui permettent la détection d'un photon lumineux au niveau de la rétine puis la transformation de ce signal lumineux en signal électrique qui correspond à la genèse d'un message sensoriel.

Cette étape, mieux connue dans les bâtonnets, se déroule au niveau de la partie photosensible des photorécepteurs : le segment externe. La rhodopsine, pigment photosensible des bâtonnets, est constituée de 2 éléments. Le premier élément: l'opsine forme un récepteur à 7 domaines transmembranaires qui est couplé à une protéine G (la transducine). Le second élément : le chromophore sous la forme de 11-*cis*-retinal est lié de manière covalente à l'opsine. Lorsqu'un photon excite la rhodopsine cela induit une isomérisation dissociation du chromophore 11-*cis*-retinal en all-*trans*-retinal. Ce changement entraîne une modification de conformation de la rhodopsine et permet l'exposition des sites de liaisons de la rhodopsine à

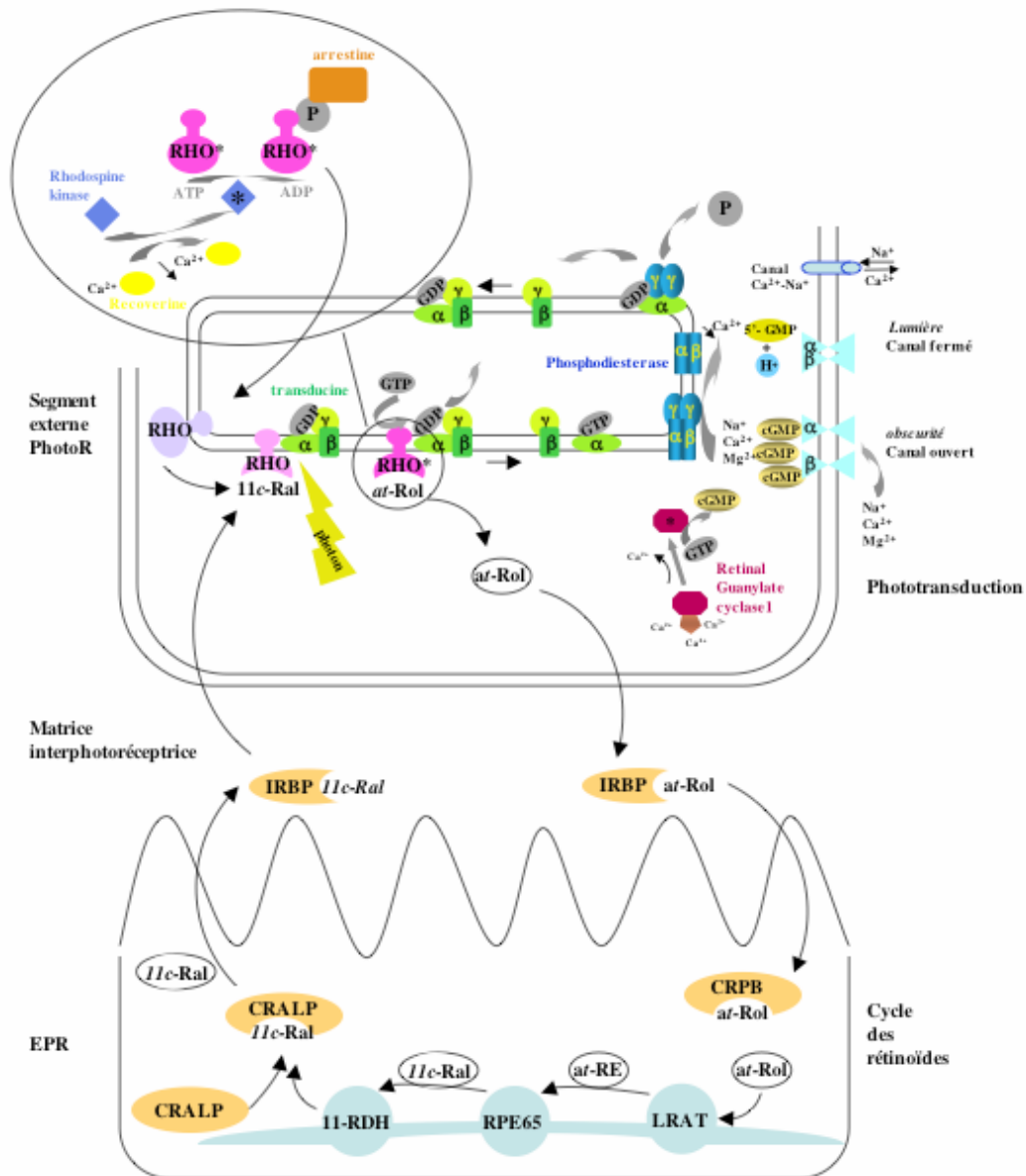


Figure 4: Schéma du cycle visuel: cycle de la phototransduction et cycle des rétinoïdes.
 Le cycle de la phototransduction se déroule dans le segment externe du photorécepteur (en haut du schéma), le cycle des rétinoïdes se déroule dans les cellules de l'EPR (en bas du schéma). *at-Rol*, all-*trans*-retinol; *at-RE*, all-*trans*-retinylesters; *11c-Ral*, 11-*cis*-retinal; 11-RDH, 11- retinol déhydrogenase; CRALP, cellular retinaldehyde binding protein ; CRPB, cellular retinoid binding protein; EPR, épithélium pigmentaire rétinien; IRBP, interstitial retinal binding protein ; LRAT, lecithin retinol acyl transferase ; PDE, phosphodiesterase; PhotoR, photorécepteur; RHO, rhodospine.

la transducine. La rhodopsine, en se fixant au niveau de la sous-unité α de la transducine permet son activation. La transducine active alors la phosphodiesterase (PDE), qui, à son tour, va hydrolyser l'acide guanylique cyclique (GMPc) en 5'GMP. La chute du taux de GMPc cytosolique conduit à la fermeture des canaux GMPc-dépendants. Ce qui induit un arrêt de l'entrée des ions sodium et calcium à l'intérieur du photorécepteur. Ces modifications ioniques induisent une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Celle-ci entraîne la libération d'un neurotransmetteur (le glutamate), ce qui va générer un message sensoriel dirigé vers le cerveau. L'arrêt de la réponse des photorécepteurs nécessite la désactivation de la cascade de transduction visuelle. Cette désactivation s'effectue grâce à la synthèse de GMPc produit par les guanylate-cyclases qui ont été stimulées par la baisse de calcium dans le photorécepteur. L'arrestine se fixe à la rhodopsine, qui a été multiphosphorylée par la rhodopsine kinase, ce qui bloque le couplage de la rhodopsine-transducine et donc l'activation de la phosphodiesterase et l'hydrolyse du GMPc. L'augmentation du GMPc, grâce à la catalyse du GTP, permet la réouverture des canaux ioniques.

Quelques exemples de gènes, dont les produits interviennent dans la phototransduction. Gènes qui sont impliqués dans l'apparition de dégénérescences rétiniennes lors de mutations de ceux-ci :

- Le gène de la rhodopsine *rho* est situé en 3q21.24 (MIM 180380). Ce gène code pour le pigment rhodopsine, qui est impliqué dans la cascade de phototransduction. La mutation de ce gène est à l'origine de 26% des RP dominantes (Sullivan *et al.*, 2006). La mutation du gène *rho* a, également, été retrouvée dans une forme de RP autosomique récessive (Kumaramanickavel *et al.*, 1994) et lors de CNSB (Congenital Stationary Night Blindness) (Dryja *et al.*, 1993). Il existe plus de 100 mutations différentes de ce gène (Gregory-Evans and Bhattacharya, 1998). C'est la présence de la protéine anormale dans le photorécepteur qui est à l'origine de la dégénérescence (Rajan and Kopito, 2005).
- La transducine est une protéine G formée de 3 sous-unités (α , β , γ). La mutation du gène *gnat1* code pour la sous-unité α de la transducine au niveau des bâtonnets et, est à l'origine de formes dominantes du CNSB de type Nougaret (Dryja *et al.*, 1996). Le gène *gnat2* code pour la sous-unité α de la transducine au niveau des cônes. Sa mutation est retrouvée dans de rares cas d'achromatopsie (Kohl *et al.*, 2002).

- La phosphodiesterase est une protéine formée de 2 sous-unités (α et β), elle permet l'hydrolyse du GMP cyclique (GMPc) en GMP lors de la phototransduction. Le gène *PDE6A* code pour la sous-unité α de la GMPc phosphodiesterase. La mutation de ce gène est à l'origine de 3 à 4 % de RP autosomiques récessives (Dryja *et al.*, 1999). Le gène *pde6b* code pour la sous-unité β de la phosphodiesterase. La mutation de *pde6b* est retrouvée dans des cas de RP autosomiques récessives (McLaughlin *et al.*, 1995) pour environ 5% (Bayes *et al.*, 1995) et dans le cas de CNSB autosomique dominante (Gal *et al.*, 1994). Que ce soit pour la mutation du gène *pde6a* ou *pde6b*, la perte de fonction de la phosphodiesterase induit une augmentation du taux de GMPc, qui est toxique pour la cellule (Farber, 1995). Le taux élevé GMPc intracellulaire conduit à un excès de calcium intracellulaire, ce qui modifie la perméabilité des membranes mitochondriales (He *et al.*, 2000). Ce phénomène de modification de la perméabilité de la membrane mitochondriale est à l'origine du déclenchement de l'apoptose du photorécepteur.

- Le gène *retCG1*, dont la description sera réalisée dans le chapitre sur l'ACL, est également dénommé *gucy2d*. La mutation de ce gène a été décrite dans des CRD autosomiques dominantes (Kelsell *et al.*, 1998) où sa mutation est retrouvée dans 7% des cas (RetNet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>) et dans l'Amaurose congénitale de Leber (Perrault *et al.*, 1996).

➤ Le cycle des rétinoïdes

Des gènes, dont les produits interviennent dans le métabolisme du rétinol ou cycle des rétinoïdes, sont à l'origine de dégénérescences rétiniennes. Avant de vous présenter quelques-uns de ces gènes, voici un bref rappel de ce cycle des rétinoïdes, qui est un cycle de recyclage qui se produit entre le segment externe des photorécepteurs et les cellules de l'épithélium pigmentaire (seul, le cycle du bâtonnet est bien connu).

Le chromophore all-*trans*-rétinol, créé lors de la phototransduction, doit être régénéré en 11-*cis*-retinal pour que la phototransduction puisse à nouveau avoir lieu. Cette régénération a lieu lors de ce cycle.

Le tout-*trans*-retinal est libéré de l'opsine au niveau du segment externe du bâtonnet où il est réduit par une déshydrogénase (RDH12) en tout-*trans*-retinol. Celui-ci traverse la matrice interphotoréceptrice véhiculé par l'IRBP (Intertitial Retinal Binding Protein) pour rejoindre l'EPR. Une fois arrivé dans l'EPR, le CRBP (Cellular Retinoïd Binding Protein) le prend en

charge pour l'apporter au contact de l'enzyme LRAT (Lecithin Retinol Acyl Transferase) qui le transforme en tout-*trans*-retinyl ester par trans-estérification. Ce retinyl ester est, ensuite, converti en 11-*cis*-retinol par le rôle d'isomérase de RPE65. Ce 11-*cis*-retinol est oxydé par une 11-*cis* RDH (Retinol DeHydrogenase) pour former le 11-*cis*-retinal qui va être pris en charge par le CRALBP (Cellular RetinALdehyde-Binding Protein) pour rediffuser dans la matrice interphotoréceptrice où il sera véhiculé, à nouveau, par l'IRBP. Une fois arrivé dans le segment externe du photorécepteur, le 11-*cis*-retinal se combine avec l'opsine pour former à nouveau la rhodopsine, qui peut être réutilisée dans la cascade de phototransduction. Dans ce cycle de recyclage, on peut inclure la protéine ATP Binding Cassette de la sous-famille A (ABCA4) qui faciliterait le transport de la lumière du disque vers le cytoplasme du photorécepteur du tout-*trans*-retinal libéré par l'opsine en le complexant avec le N-retinylidène-PE pour former le N-retinylidène phosphatidyl ethanolamine (NRPE) (Beharry *et al.*, 2004).

- La protéine ABCA4 est codée par le gène *abca4*, également connu sous le nom *abcr* (ATP Binding Cassette Retina). L'altération fonctionnelle ce transporteur, lors d'une mutation du gène *ABCA4*, induirait une accumulation de NRPE dans les disques des photorécepteurs lors de l'illumination de la rétine. Lors de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'EPR, le NRPE lors de son passage dans les phagosomes se transformerait en N-retinylidène N-retinylethanolamine (A2E et isoA2E). L'A2E et l'isoA2E, qui sont des composants de la lipofuschine, ont des propriétés apoptotiques qui entraînent la dégénérescence de l'EPR (Wolf, 2003). La mutation du gène *abca4* est retrouvée dans la maladie de Stargardt (Allikmets *et al.*, 1997b), dans la DMLA (Allikmets *et al.*, 1997a), dans des RP récessives (Martinez-Mir *et al.*, 1997), dans les CRD récessives (Cremers *et al.*, 1998) ainsi que dans les fundus flavimaculatus (Rozet *et al.*, 1998).
- La 11-*cis*-retinol dehydrogenase est codé par le gène *rdh5* (MIM 601617). Les mutations de ce gène sont à l'origine de fundus albipunctatus (Yamamoto *et al.*, 1999). L'altération de cette protéine induit un retard dans l'adaptation à l'obscurité de la rétine.
- La protéine CRALBP est codée par le gène *rlbp1*. La mutation de ce gène est retrouvée dans une forme particulière de dystrophie rétinienne : la rétinopathie ponctuée albescente où de petites tâches blanches sont parsemées au fond d'œil (Morimura *et al.*, 1999). En Suède, il a été décrit une forme associée à une

maculopathie qui survient plus précocement et qui est appelée la dystrophie de Bothnia (Burstedt *et al.*, 1999).

Un certain nombre de gènes dont les produits sont engagés dans ce cycle sont à l'origine de dégénérescences rétiniennes graves qui surviennent précocement. La description de ces gènes sera abordée dans le chapitre sur l'Amaurose Congénitale de Leber, mais ici nous évoquerons les différentes formes de dégénérescences rétiniennes dans lesquelles ils peuvent être mis en cause.

- La mutation du gène *rdh12* n'a été mise en évidence que dans l'Amaurose Congénitale de Leber (Janecke *et al.*, 2004; Perrault *et al.*, 2004)
- La mutation du gène *Irat* est à l'origine de dégénérescences rétiniennes précoces et sévères (Thompson *et al.*, 2001).
- La mutation du gène *rpe65* a été retrouvée dans des cas d'Amaurose Congénitale de Leber (Marlhens *et al.*, 1997), dans le cas de dégénérescence rétinienne précoce et sévère autosomique récessive (Gu *et al.*, 1997) dans le cas de rétinopathie pigmentaire autosomique récessive (Morimura *et al.*, 1998).

3.4. Quel est le mécanisme de dégénérescence des photorécepteurs dans les dystrophies rétiniennes héréditaires de la rétine

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires aboutissent à une cécité du fait de la perte des photorécepteurs. Ces photorécepteurs meurent par un phénomène d'apoptose. La perte cellulaire par apoptose est un phénomène fréquent en ophtalmologie. C'est un phénomène bénéfique lors de l'embryogénèse oculaire (involution des vaisseaux hyaloïdiens, de la membrane pupillaire) mais il est aussi l'aboutissement final de différentes pathologies ophtalmologiques (glaucome, décollement de rétine, DMLA, dystrophies rétiniennes héréditaires). Ce phénomène final commun résulte alors de défauts primaires variables, notamment dans les dégénérescences rétiniennes. En effet, dans différents modèles animaux et chez l'homme, la perte des photorécepteurs dans les dégénérescences

rétiniennes héréditaires a été rapportée à l'apoptose (Tso *et al.*, 1994; Naash *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 2005). Dans différents modèles murins, il a été montré que l'apoptose des photorécepteurs pouvait survenir soit durant le développement de la rétine, soit sur une rétine mature. De nombreuses perturbations rétiniennes peuvent être à l'origine de cette apoptose : une altération de la molécule de rhodopsine, une altération du cytosquelette des photorécepteurs, une altération de la cascade de phototransduction, une inhibition de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs... Comment différents mécanismes d'altération induisent-ils le même phénomène final ?

Revenons, tout d'abord, sur le mécanisme de l'apoptose (pour revue voir (Marchetti, 2005)). L'apoptose est un terme anatomopathologique qui désigne les perturbations morphologiques et biochimiques associées au déroulement d'un programme cellulaire de mort. Des altérations de l'ultrastructure nucléaire se produisent : condensation de la chromatine en mottes compactes, puis diminution du volume nucléaire, et destruction par fragmentation du noyau. La membrane plasmique reste imperméable jusqu'à la fin du processus de dégradation. À la fin de ce processus, la cellule se fragmente en corps apoptotiques qui sont ingérés par les cellules avoisinantes ou les macrophages sans déclencher de réaction inflammatoire. Les différentes étapes de ce processus ainsi que le déclenchement du phénomène sont sous le contrôle de nombreux effecteurs. Le schéma de l'apoptose est brièvement décrit dans la figure 5. On distingue 2 voies de l'apoptose : la voie intrinsèque mitochondriale et la voie

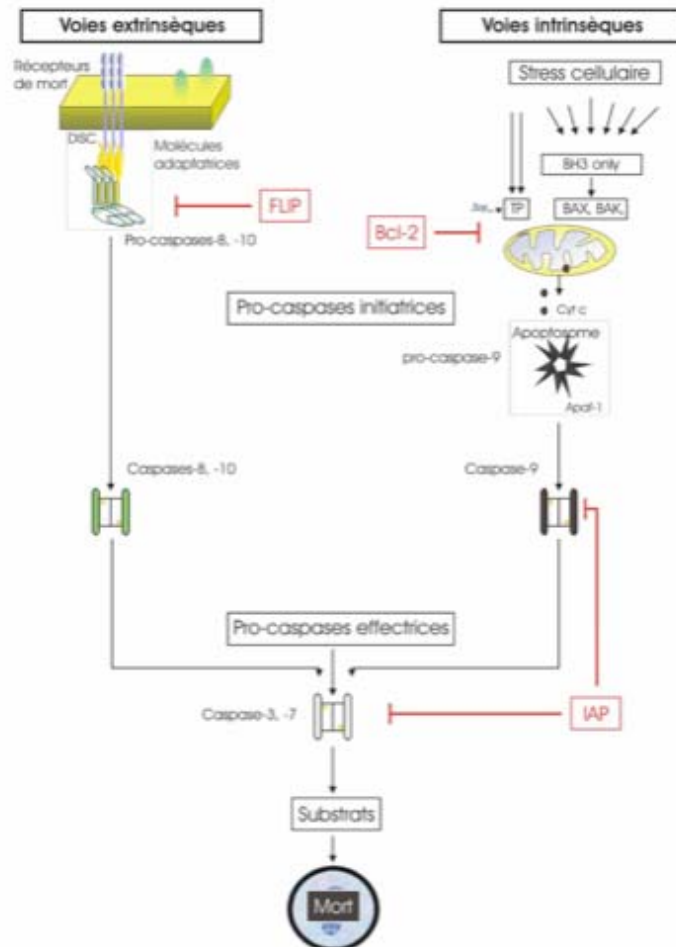


Figure 5: Représentation simplifiée des voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques qui conduisent à la mort de la cellule. D'après Marchetti, 2005, Gynecol Obstet Fertil. Dans la partie gauche du schéma est représenté la voie extrinsèque de l'apoptose. La formation du DISC permet l'activation autocatalytique des procaspases initiatrices 8 et 10 qui vont à leur tour activer les procaspases effectrices 3 et 7. Dans la partie droite du schéma est représenté la voie intrinsèque de l'apoptose. L'augmentation du cytochrome C dans le cytosol mitochondrial permet la formation de l'apoptosome. Les procaspases 9, qui font partie de l'apoptosome, s'autoactivent lors de la formation de ce complexe. Cyt c, cytochrome c; DISC, Death-Inducing Signaling Complex; FLIP, FLICE Inhibitory proteins; IAP, Inhibitor of apoptosis protein; TP, transition de perméabilité

extrinsèque. Ces 2 voies conduisent à l'activation de procaspases effectrices. Procaspases, qui une fois activées, clivent spécifiquement des substrats cytoplasmiques et nucléaires. Ce qui conduit au phénomène de fragmentation décrit ci-dessus. Douze caspases humaines sont connues (Nicholson, 1999), elles sont exprimées sous la forme de proenzymes inactives. L'activation se fait en cascade hiérarchique, les caspases effectrices -3, -7 sont activées par des caspases initiatrices -8, -9, -10.

L'activation de la voie extrinsèque nécessite l'intervention de récepteurs de mort de la super famille du récepteur du $TNF\alpha$ (Tumor Necrosis Factor) (Schmitz *et al.*, 2000) (Figure 5). Parmi, les récepteurs de mort, Fas (DR2) et TNF-R1 (DR1) sont les récepteurs qui ont été les plus étudiés. Après fixation à leur ligand, les récepteurs déclenchent une succession d'événements moléculaires qui conduisent à la formation du DISC (Death-Inducing Signaling Complexe). Il s'ensuit l'activation autocatalytique des caspases initiatrices -8 et -10, qui vont ensuite à leur tour activer les procaspases -3 et -7.

La voie intrinsèque mitochondriale conduit à l'activation de la procaspase -9 (Figure 5). Voici la cascade qui permet l'activation de cette procaspase-9. Le cytochrome C est normalement présent dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie mais peu présent dans le cytosol de la mitochondrie. Sa concentration dans le cytosol augmente suite à une modification de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe. La perméabilité est modifiée par les membres de la famille bcl2 de 2 façons différentes. Soit une perméabilité transitoire est créée par l'ouverture d'un mégacanal mitochondrial situé aux points de contact entre la membrane mitochondriale externe et interne. Cette perméabilité transitoire est favorisée par Bax et inhibée par bcl2. Soit une relocalisation de protéines pro-apoptotiques comme Bak ou Bax au niveau de la membrane mitochondriale externe permet la formation d'un canal au sein de la membrane mitochondriale, ce qui permet la libération de cytochrome C dans le cytosol mitochondrial. La protéine Apaf-1, qui est le cœur de l'apoptosome, change de conformation après son interaction avec le cytochrome C en présence d'ATP ou de dATP. Cet apoptosome, qui est un complexe cytosolique multimoléculaire, se forme suite à la libération dans le cytosol du cytochrome C (Adams and Cory, 2002). Les procaspases-9 qui font partie de ce complexe multimoléculaire s'auto-activent après leur agrégation dans l'apoptosome.

Cette cascade de l'apoptose ainsi que ses effecteurs sont de mieux en mieux connus. Mais pour les dégénérescences rétiniennes héréditaires, les voies de signalisation apoptotiques empruntées sont difficilement mises en évidence. De même, les perturbations qui initient ces voies d'apoptose dans les cellules rétiniennes et dans les photorécepteurs

sont encore peu connues. Une généralisation semble bien difficile car en fonction des modèles animaux de dégénérescences rétiniennes étudiés et des modalités des expériences (lumière forte ou non), les voies empruntées semblent différer (Hao *et al.*, 2002).

C-fos et c-Jun et les protéines de leur famille (Fra-1, Fra-2, Fos B, Jun B et Jin) constituent le facteur de transcription AP-1, qui est considéré comme un médiateur de mort cellulaire. L'exposition à la lumière stimule l'expression de c-fos de manière dose-dépendante au niveau de la rétine (Reme *et al.*, 2000). Une expression de c-fos ou d'AP-1 a été observée dans des modèles murins de dystrophies rétiniennes héréditaires durant la période précédant la phase de mort cellulaire (Rich *et al.*, 1997) mais aussi dans des modèles de dégénérescence rétinienne induite par la lumière (Hafezi *et al.*, 1999; Wenzel *et al.*, 2000). La dégénérescence induite par la lumière, qu'elle soit blanche ou bleue, serait initiée par l'absorption de cette lumière par le pigment visuel rhodopsine (Grimm *et al.*, 2000a; Grimm *et al.*, 2000b) et induirait une activation des effecteurs AP-1 (Wenzel *et al.*, 2000). Un des facteurs important pour cette dégénérescence induite par la lumière est la capacité de renouvellement de la rhodopsine après l'illumination rétinienne. L'exposition à la lumière est retrouvée comme accroissant la perte des photorécepteurs dans des souris portant la mutation ponctuelle de la rhodopsine (Pro23His) (Naash *et al.*, 1996) ou dans un modèle knockout de la rhodopsine kinase (Chen *et al.*, 1999a) ou de l'arrestine (Chen *et al.*, 1999b), indiquant que l'apoptose induite par la lumière se rajoute au déficit génétique. D'ailleurs, quelques mutations ont été identifiées comme augmentant la susceptibilité de la rétine aux lésions induites par la lumière, notamment des mutations dans le gène de la *Rhodopsine* (Cideciyan *et al.*, 1998). Les modifications dans la qualité, la quantité de rhodopsine semble être un élément délétère pour la rétine. La présence d'une mutation dans le gène *prpf31* induit une réduction de l'expression de la rhodopsine. Cette mutation entraîne immédiatement un phénomène d'apoptose dépendant des caspases dès que ce gène mutant *prpf31* est introduit dans des cellules rétiniennes mises en culture (Yuan *et al.*, 2005).

Dans le cadre de pathologies liées à la mutation des gènes *pde6a* ou *pde6b*, le mécanisme apoptotique semble plus simple. La perte de fonction de la phosphodiesterase, codée par ces deux gènes, induit une augmentation du taux du GMPc, qui est toxique pour la cellule (Farber, 1995). Le taux élevé GMPc intracellulaire conduit à un excès de calcium intracellulaire. Cet excès de calcium modifie la perméabilité de la membrane mitochondriale (He *et al.*, 2000), ce qui permet une libération de cytochrome C dans le cytosol de la mitochondrie. Cette libération de cytochrome C active la voie intrinsèque de l'apoptose en

induisant la mort des photorécepteurs. Ce mécanisme a notamment été montré dans le modèle murin *rd* (Jomary *et al.*, 2001).

Dans le cas des dégénérescences rétiniennes héréditaires, les voies de l'apoptose, qui induisent la mort des photorécepteurs, n'ont pas été entièrement élucidées. Il semble, toutefois, que les mécanismes varient en fonction des mutations géniques.

3.5. Traitement des dystrophies rétiniennes héréditaires

Si on considère les indications des médicaments, précisées lors des Autorisations de Mise sur le Marché (AMM), il n'y a aucun traitement disponible pour le traitement des dystrophies rétiniennes héréditaires. C'est pourquoi, il n'y a pas de traitement collégial pour ce type de pathologies. Les seules orientations de traitement sont liées à des publications relatant les effets bénéfiques lors de leur emploi dans le cadre de dégénérescences rétiniennes héréditaires soit chez l'homme dans le cadre d'essai clinique, soit dans des modèles animaux de dégénérescences rétiniennes.

Plusieurs produits pharmacologiques ont été testés pour le traitement de ces pathologies. Ce sont la vitamine A, l'acide docosahexaénoïque (DHA), le CNTF (ciliary neurotrophic factor), la lutéine, le D-*cis* diltiazem. Des dispositifs dérivés de l'électronique sont également en cours d'évaluation afin de pallier le déficit visuel. Au cours de ce chapitre, nous aborderons, brièvement, ces diverses possibilités thérapeutiques ou palliatives.

3.5.1. Traitements pharmacologiques

➤ Supplémentation en vitamine A

La première étude clinique, ayant montré un bénéfice d'une approche thérapeutique pharmacologique dans ces pathologies rétiniennes héréditaires, est une étude qui a testé la supplémentation alimentaire en vitamine A dans les rétinoopathies pigmentaires (Berson *et al.*, 1993). Il s'agissait d'une étude randomisée en double-aveugle qui regroupait 601 patients âgés de 18 à 49 ans. Cette étude a été menée sur 6 ans. Aucune notion de

génomotypage n'intervenait dans l'étude. Les rétinopathies atypiques, les RP sectorielles, les CRD, les amauroses congénitales de Leber, les atrophies gyrées, les choroïdérémies et les RP syndromiques ont été exclues. Les critères d'inclusion comportaient une acuité visuelle \geq 20/100, un champ visuel de Goldmann photopique \geq 8° au V4e, une amplitude \geq 0,12 μ V à l'ERG flicker 30 Hz ou \geq 2,5 μ V à l'ERG 0,5 Hz, des taux sériques de rétinol < 100 μ g/dl, une fonction hépatique normale et une absence de grossesse. Le suivi annuel comportait une étude électrorétinographique, un champ visuel, une acuité visuelle et la mesure du taux sérique de rétinol. Une prise journalière de 15000 unités de palmitate de vitamine A par voie orale a été donnée chez les patients. En France, la posologie recommandée pour ce médicament est de 5000 unités/jour. Dans cette étude, les patients, qui ont reçu ce traitement, ont présenté un déclin annuel de 8,3% dans l'amplitude de la réponse flicker contrairement au 10% de déclin de l'amplitude du flicker retrouvée chez les patients témoins, ceci toutes RP confondues. Le bénéfice thérapeutique n'a pu être mis en évidence de façon significative sur l'acuité visuelle et sur le champ visuel. Par contre, la prise régulière de 400UI/jour de vitamine E accélère le rythme de dégénérescence rétinienne (Berson *et al.*, 1993). Toutefois, les doses de vitamine A administrées durant cette étude représentent 3 fois la dose recommandée par l'AMM. Ce médicament est contre-indiqué en cas de grossesse et d'anomalies hépatiques car il est hépatotoxique. De plus, la prise de vitamine A à 25000 UI/Jour associé à un tabagisme important (\geq 50 paquets années) entraîne une augmentation du risque de cancer pulmonaire de 28% (Goodman *et al.*, 1998). De plus, cette supplémentation vitaminique semble augmenter le risque de fracture du col chez la femme après la ménopause (Feskanich *et al.*, 2002).

➤ L'acide docosahexaénoïque (DHA)

Plusieurs auteurs ont retrouvé, chez des patients atteints de RP, une diminution du taux plasmatique de l'acide docosahexaénoïque ainsi qu'une diminution du DHA dans les membranes des globules rouges (Bazan *et al.*, 1986; Hoffman and Birch, 1995). Les membranes des segments externes des bâtonnets sont composées de peu de phospholipides polyinsaturés comme le DHA. Mais ces lipides sont indispensables à la fluidité membranaire des disques des photorécepteurs (Treen *et al.*, 1992). Cette fluidité permet un fonctionnement optimal des photorécepteurs lors de la transduction. Le taux de DHA des globules rouges est corrélé au taux de DHA dans la rétine (Sarkadi-Nagy *et al.*, 2003). Il y a 10 à 15 fois plus de DHA dans les membranes des segments externes des photorécepteurs que dans la membrane des globules rouges. Les patients ayant un taux

plus faible de DHA dans les globules rouges présentent une perte de l'amplitude de la réponse flicker 30 Hz plus importante indépendamment du type de RP (Berson *et al.*, 1993). C'est pourquoi, plusieurs études ont étudié l'effet sur la fonction visuelle d'une supplémentation en DHA chez patients atteints de RP. L'équipe de Berson a testé l'adjonction d'une supplémentation par 1200mg/jour de DHA au traitement par de la vitamine A (à la dose de 15000UI/jour) (Berson *et al.*, 2004). Ils ont montré que l'adjonction du traitement par DHA serait bénéfique les deux premières années de l'instauration chez les patients atteints de RP. La sensibilité du champ visuel et l'amplitude du flicker 30 Hz décroît moins vite chez les patients ayant reçu les 2 traitements contrairement à ceux qui n'ont reçu que la vitamine A. Par contre, cet effet profitable ne dure que 2 ans car après cette période, il n'y a plus de différences entre les patients qui ont reçu un traitement et ceux qui ont reçu deux traitements. L'adjonction du DHA au traitement par la vitamine A permettrait d'obtenir une action plus rapide de la vitamine A sur la rétine (Berson *et al.*, 2004). Une autre étude a montré que l'administration de DHA seul, chez des jeunes patients présentant une RP liée à l'X, diminue la perte de fonction des bâtonnets chez les patients âgés de moins de 12 ans et préserve la fonction de cônes chez les patients âgés de plus de 12 ans (Hoffman *et al.*, 2004).

Ces deux thérapeutiques (DHA et vitamine A) améliorent des tests visuels fonctionnels sans que les patients ne ressentent un bénéfice sur leur acuité visuelle. C'est pourquoi, ces traitements ne sont pas utilisés couramment de façon collégiale dans le traitement des dystrophies rétinienne héréditaires.

➤ La lutéine

Les pigments maculaires sont la lutéine et la zéaxanthine. Ces pigments jouent un rôle de filtre et de protecteur antiradicalaire des photorécepteurs maculaires. Leur origine est purement alimentaire. Ainsi, on sait qu'un régime enrichi en lutéine permet d'obtenir une augmentation de la concentration du pigment au niveau de la macula (Beatty *et al.*, 2001). Dans la DMLA, les patients possèdent une quantité de pigments maculaires diminuée (Seddon *et al.*, 1994). Dans les dégénérescences rétinienne héréditaires, aucune étude ne s'est intéressée aux modifications de la quantité de pigments maculaires dans ce type de pathologie mais on peut penser qu'un taux élevé de pigments maculaires peut avoir un rôle protecteur sur les photorécepteurs. Une étude pilote de phase I/II a étudié l'effet d'un régime enrichi en lutéine sur l'acuité visuelle et le champ visuel de patients ayant une RP (Bahrami *et al.*, 2006). Seize patients ont ingéré 10 mg/jour pendant 12 semaines puis 30mg/jour de lutéine pendant 24 semaines. Leurs acuités visuelles, auto-évaluées par ordinateur, ont été

améliorées de façon non significative par rapport aux acuités visuelles du groupe témoin ayant ingéré un placebo. Le champ visuel, testé de la même manière, retrouve une amélioration significative dans le groupe traité par la lutéine comparé au groupe témoin. Cette seule étude, dont la rigueur d'évaluation de l'acuité visuelle et du champ visuel est discutable, n'implique pas, pour le moment, d'utilisation courante de la lutéine dans les RP.

➤ Le Ciliary NeuroTrophic Factor (CNTF)

Le CNTF a été identifié comme un facteur de survie des neurones. Au niveau de la rétine, des récepteurs α au CNTF ont été localisés sur les cellules de Müller, sur les deux types de photorécepteurs (Beltran *et al.*, 2003; Valter *et al.*, 2003). Diverses études ont montré que le CNTF pouvait être utilisé dans le traitement des RP. Dans de multiples modèles animaux de RP (souris *rd-PDE6b*, souris *rds-peripherine*, rats P23H, chats *Rdy*, chiens *rcd1-PDE6b*), le CNTF retarde la dégénérescence rétinienne (LaVail *et al.*, 1998; Chong *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 2002). Afin d'obtenir un effet bénéfique, il faut que ce facteur neurotrophique soit diffusé quasi en continu car sa demi-vie est très courte (1 minute 1/2). Il ne passe pas la barrière hémato-rétinienne. L'injection itérative du facteur de survie dans l'œil est peu envisageable. Il y a deux possibilités pour la diffusion du CNTF : la greffe de cellules génétiquement modifiées encapsulées et la thérapie génique qui sera abordée dans le chapitre sur l'AAV et la rétine. Des cellules, dérivées de la lignée ARPE-19 génétiquement modifiées pour produire du CNTF, ont été encapsulées dans des dispositifs semi-perméables. Un essai clinique de phase I a testé l'innocuité de l'implantation de ces dispositifs intravitréens chez 10 patients atteints de RP. La moitié des patients ont reçu un dispositif faiblement dosé, l'autre moitié un dispositif fortement dosé. Les dispositifs ont été maintenus dans le vitré durant 6 mois. Cette étude n'a pas mis en évidence d'effets délétères sur l'acuité visuelle des patients, sur leurs électrorétinogrammes ou sur leur état général (Sieving *et al.*, 2006). Une étude de phase II doit débuter pour tester l'effet bénéfique de ce traitement dans le cadre de RP.

➤ Le D-*cis* diltiazem

Pour finir, un médicament anticalcique à visée cardiaque (le D-*cis* diltiazem) a été testé dans les rétinopathies pigmentaires mais uniquement dans des modèles animaux. L'utilisation détournée de ce médicament découle de la constatation qu'il existe une

anomalie des courants ioniques GMPc dépendants par ouverture permanente des canaux GMPc dépendants lors d'une mutation du gène de la phosphodiesterase. *In vitro* sur des bâtonnets isolés, le Diltiazem inhibe les courants ioniques GMPc dépendants. Des souris *rd* (modèle murin de dégénérescence rétinienne liée à une anomalie de la phosphodiesterase) ont été injectées intrapéritonalement avec du D-*cis* diltiazem au 25 jours post-natal. Ce traitement a permis la préservation de la rétine et des réponses électrorétinographiques chez les souris traitées par ce médicament comparées aux souris injectées par la solution saline (Frasson *et al.*, 1999b). Par contre, l'administration par voie orale de D-*cis* diltiazem, dès l'âge de 4 semaines, au modèle canin *rcd1* (gène de la sous-unité β de la phosphodiesterase muté (Aguirre, 1978)) n'a pas permis d'améliorer les paramètres électrorétinographiques ou histologiques par rapport aux chiens qui n'ont reçu aucun traitement (Pearce-Kelling *et al.*, 2001). Le D-*cis* diltiazem est un médicament largement prescrit en cardiologie. Une étude clinique chez patients cardiaques qui nécessitent cette thérapeutique et qui sont atteints d'une dégénérescence rétinienne permettrait peut-être de conclure sur l'effet de ce médicament.

3.5.2. La vision artificielle

Comme il a été développé des implants cochléaires et des pacemakers, des dispositifs électriques implantés dans la rétine pour transformer une image visuelle en un message électrique à destination du cerveau sont en voie de développement pour pallier les déficiences visuelles que peuvent induire les dystrophies rétiniennes héréditaires. D'après Zrenner, le développement de ces dispositifs est assez long et difficile (Zrenner, 2002). Les premières publications relatant des essais cliniques dans ce domaine remontent aux années 70 (Brindley and Lewin, 1968; Dawson and Radtke, 1977). Depuis plusieurs stratégies ont été mises au point notamment en fonction du site anatomique choisi pour la stimulation des voies visuelles. Tout le long des voies visuelles peut être stimulé afin de recréer une image visuelle.

Les implants corticaux ou les implants directement mis en contact avec le nerf optique sont peu développés du fait de la nécessité d'une chirurgie intracérébrale complexe, de la possibilité d'une douleur cérébrale, de présence de phosphènes de manière continue (Humayun, 2001; Lakhanpal *et al.*, 2003).

Les implants rétiniens semblent plus prometteurs. Deux types d'implants rétiniens existent : les implants épitrétiens et les implants sous-rétiens (Zrenner, 2002).

- Les implants épitrétiens correspondent à une puce qui reçoit un message électrique codé par un système électronique à partir d'une image qui a été captée par une caméra. Ce message électrique est directement délivré aux cellules ganglionnaires. Plusieurs publications relatent des essais cliniques de ces implants épitrétiens chez l'homme (Humayun *et al.*, 1999; Rizzo *et al.*, 2003) qui ont permis à des patients aveugle atteints de RP de percevoir des formes géométriques à une faible distance (Humayun *et al.*, 1999). Un des problèmes rencontrés est la nécessité de dispenser une plus forte énergie de stimulation chez les patients aveugles (Rizzo *et al.*, 2003). La délivrance d'une forte énergie pourrait être délétère à long terme pour la rétine et doit donc être testée.

- Les implants sous-rétiens sont des dispositifs directement sensibles à la stimulation lumineuse qui transforment cette stimulation en un message électrique qui va suivre le chemin habituel vers le cortex visuel. Ces implants sont disposés entre les cellules de l'EPR et les segments externes des photorécepteurs où ils pallient un défaut de transduction visuelle. Plusieurs études ont été publiées avec ce type d'implant sous-rétinien (Pardue *et al.*, 2001; Schwahn *et al.*, 2001; Volker *et al.*, 2004) mais une seule au stade d'étude clinique (Chow *et al.*, 2004). L'implantation sous-rétinienne, par voie transvitreuse, d'une puce en silicone a permis chez 6 patients atteints de RP d'améliorer leur sensation de contraste, leur perception de mouvements et des couleurs ainsi que d'améliorer le relevé de leur champ visuel (Chow *et al.*, 2004).

Le développement de ces dispositifs pourra aboutir à la vision artificielle, mais ces traitements seront adressés aux patients dont l'évolution de la dégénérescence rétinienne héréditaire sera déjà avancée.

Cette revue des différents traitements disponibles pour le traitement des dystrophies rétiniennes héréditaires permet de voir qu'actuellement aucun traitement n'améliore le pronostic visuel grave de ces pathologies. Aucun traitement n'a d'AMM (autorisation de mise sur le marché) dans l'indication de traitement des dystrophies rétiniennes héréditaires. Ce chapitre permet d'évaluer la place qui pourra être allouée à la thérapie génique dans le traitement futur des dystrophies rétiniennes héréditaires.

3.6. L'amaurose congénitale de Leber

L'amaurose congénitale de Leber (ACL) (MIM 204000) est une forme particulière de dystrophie rétinienne. Elle fut décrite en 1869 par Théodor Leber, un ophtalmologiste allemand. La description princeps faite par Leber comprenait une absence de fixation des objets par les enfants, un nystagmus congénital à grandes oscillations, un réflexe photomoteur aboli ou très faible, un signe oculo-digital de Franceschetti et une éventuelle photophobie.

Jusqu'en 1996, rien n'était connu de la physiopathologie ni des bases moléculaires de l'ACL. Depuis en une décennie, une explosion des connaissances a permis une avancée dans la compréhension de la maladie, dans les connaissances génétiques de la maladie et dans l'espoir thérapeutique.

La fréquence de la maladie est estimée à 5% de l'ensemble des dystrophies rétiniennes, soit 1/60000.

La transmission de la maladie est héréditaire. Jusqu'à récemment, elle était considérée comme de transmission autosomique récessive, mais depuis peu, des formes autosomiques dominantes ont été mises en évidence (Tzekov *et al.*, 2001; Perrault *et al.*, 2003; Bowne *et al.*, 2006).

Actuellement, 11 gènes sont notés comme impliqués dans cette maladie : les gènes *imphd1*, *aip1*, *crb1*, *crx*, *gucy2d*, *lrat*, *rdh12*, *rpgr1*, *tulp1*, *rpe65* (<http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/sum-dis.htm>). Dernièrement, le gène *nphp6* a été mis en cause dans cette pathologie (den Hollander *et al.*, 2006). La prévalence des mutations de chacun des gènes incriminés varie en fonction des études. Les derniers gènes incriminés n'ont, en général, pas été recherchés dans les dernières études réalisées sur des grandes cohortes de patients atteints d'ACL. Toutefois, lorsque les principaux gènes sont testés environ 50% des patients restent sans diagnostic moléculaire. Ce qui laisse supposer que tous les gènes impliqués dans l'ACL ne sont pas encore déterminés. Respectivement, les proportions sont comprises pour chaque gène: *gucy2d* : 6-21,2%, *crb1* : 10%, *rpe65* : 3-6,1%, *rpgr1* : 4,5%, *rdh12* : 4,3%, *aip1* : 3,4%-5,8%, *tulp1* : 1,7%, *crx* : 0,6-2% (Dharmaraj *et al.*, 2000; Hanein *et al.*, 2004).

Voici quelques informations concernant ces différents gènes :

Le gène *retGC1* (guanylase cyclase spécifique des photorécepteurs), renommé *gucy2d* a été le premier gène localisé et déclaré responsable de la maladie (Camuzat *et al.*, 1995). Il est situé en 17p13.1. C'est un gène de 1600 paires de bases, organisé en 20

exons. Le produit de ce gène intervient à la fin du cycle de transduction visuelle, et permet en catalysant la conversion du GTP en GMPc, la réouverture des canaux cationiques dépendant du GMPc (Chabre and Deterre, 1989). Son altération conduit à un défaut extrêmement sévère de production de GMPc et à une fermeture des canaux cationiques quelque soit la nature des mutations (Rozet *et al.*, 2001).

Le gène *crx* (Cone-Rod homeoboX containing gene) est un petit gène de 3 exons, localisé en 19q13.3 (Freund *et al.*, 1998). Le produit de ce gène est un facteur de transcription impliqué dans le développement des photorécepteurs. La protéine CRX active les promoteurs des bâtonnets (transducine, arrestine, IRBP, rhodopsine, β -PDE) et des opsines de cônes (Chen *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1997). Dans plusieurs familles, une transmission de type dominante, liée à une mutation de ce gène *crx* avec un phénotype non ambigu d'ACL, a été identifiée (Tzekov *et al.*, 2001; Perrault *et al.*, 2003).

Le gène *aipl1* (Aryl hydrocarbon Interacting-Protein Line 1) est localisé en 17q13.1 (Sohocki *et al.*, 2000). C'est un gène de 6 exons. Il code pour la protéine du même nom AIPL1, qui fait partie de la famille FK-506-binding protein (FKBP) (Snyder *et al.*, 1998). Ce gène est exprimé uniquement dans les bâtonnets adultes (van der Spuy *et al.*, 2002). Cette protéine aurait le rôle d'une protéine chaperone essentielle pour la synthèse de la phosphodiesterase dépendante du GMPc des bâtonnets (Liu *et al.*, 2004b) mais une altération de cette protéine agirait, également, directement ou indirectement dans la phototransduction (Makino *et al.*, 2006).

Le gène *crb1* est localisé en 1q31, il comporte 12 exons. Il est l'homologue du gène *crumbs* de la drosophile. Il code pour la protéine CRB1. Le rôle de cette protéine est surtout connu par extrapolation du rôle de *crumbs*. CRB1 est une protéine transmembranaire présente près des zonula adherens des segments externes qui forment la limitante interne. CRB1 est nécessaire au maintien de la polarisation des photorécepteurs et à l'adhésion des photorécepteurs aux cellules adjacentes lors de l'exposition lumineuse (van de Pavert *et al.*, 2004).

Le gène *rpgr1* est localisé en 14q11.2. Il comporte 3861 paires de bases organisées en 24 exons (Gerber *et al.*, 2001). Il code pour la protéine appelée retinitis pigmentosa GTPase interacting protein 1 (RPGRIP1) qui est connectée, par un domaine appelé RPGR Interacting Domain (RID) (Roepman *et al.*, 2000), à la protéine RPGR, protéine qui est responsable de plus de 70% des RP liée à l'X (Sharon *et al.*, 2003). RPGRIP1 et RPGR seraient co-localisés au niveau des segments externes des 2 types de photorécepteurs chez

l'homme (Mavlyutov *et al.*, 2002). RPGRIP1 est exprimé, également, au niveau des cellules amacrines (Mavlyutov *et al.*, 2002).

Le gène *rdh12*, localisé en 14q24.1, est composé de 7 exons. Il code pour une enzyme, exprimée dans les photorécepteurs qui est appelée retinol deshydrogenase. Elle intervient dans le régénération du rétinol en permettant l'obtention du 11-*cis*-retinal à partir du 11-*cis*-retinol (Haeseleer *et al.*, 2002).

Le gène *tulp1* (TUBby-Like Protein 1) est localisé en 6p21.3 et il code pour la protéine TULP1 qui fait partie de la famille des TULP (North *et al.*, 1997). La protéine est impliquée dans le trafic vésiculaire au niveau des photorécepteurs notamment dans le transport de la rhodopsine (Hagstrom *et al.*, 2001).

Le gène *lrat* (Lecithin Retinol AcylTransferase) est localisé en 4q31.2. Il code pour une enzyme, située dans l'épithélium pigmentaire rétinien, qui catalyse le transfert d'un groupe acyl de la phosphatidylcholine sur le all-*trans*-retinol (Golczak *et al.*, 2005). Des mutations du gène *lrat* ont été retrouvées plutôt dans ce qui est appelé early-onset severe retinal dystrophy (Thompson *et al.*, 2001).

Le gène *imphd1*, localisé en 7q32.1, code pour la protéine IMP (inosine 5' monophosphate) Dehydrogenase 1. La protéine IMPDH1 catalyse la conversion du IMP en XMP (xanthosine-5' monophosphate) avec une réduction concomitante du NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) en NADH (nicotinamide adenine dinucleotide hydrogène) (Hedstrom, 1999). Cette protéine a également la capacité de se lier aux acides nucléiques simple brin (Mortimer and Hedstrom, 2005). Chez deux individus, une mutation, de *novo*, dominante du gène *imphd1* a été dernièrement mis en évidence (Bowne *et al.*, 2006).

Le gène *nphp6* ou *cep290* est localisé en 12q21.32 (den Hollander *et al.*, 2006).

Le gène *rpe65* est le second gène découvert comme impliqué dans l'ACL (Marlhens *et al.*, 1997). Il est localisé en 1q31 (Hamel *et al.*, 1994) et est organisé en 14 exons. Il code pour la protéine RPE65 qui contient 533 acides aminés dont la masse moléculaire est de 61kD (Hamel *et al.*, 1993). La séquence des résidus amino-acides de *rpe65* est relativement bien conservée entre les espèces, l'identité protéique est d'environ 98,7% entre l'homme, les bovins et les chiens (Hamel *et al.*, 1993; Nicoletti *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1998; Veske *et al.*, 1999). La protéine RPE65 est une protéine abondante dans l'épithélium pigmentaire

associée à la membrane microsomale qui a un rôle essentiel dans le cycle de régénération du rétinol (Hamel *et al.*, 1993). Des études récentes ont montré que la protéine RPE65 a une fonction d'isomérase en convertissant les all-*trans* retinyl esters en 11-*cis* rétinol au sein de l'épithélium pigmentaire rétinien (Jin *et al.*, 2005; Moiseyev *et al.*, 2005; Redmond *et al.*, 2005). Deux études de l'équipe de Ma et ses collaborateurs aboutissent à une controverse car ils retrouvent du mRNA RPE65 dans les cônes de la salamandre (Ma *et al.*, 1998). De plus, cette équipe a mis en évidence le RPE65 dans les cônes de souris BALB/c par immunohistochimie (Znoiko *et al.*, 2002). Cette présence dans les cônes de la protéine RPE65 n'a pas été corroborée par d'autres équipes (Hemati *et al.*, 2005). Une altération de la protéine RPE65 aboutit à une accumulation, sous forme de gouttelettes lipidiques dans l'EPR, d'all-*trans* retinyl esters chez les différents modèles animaux de la pathologie (Narfstrom, 1999; Veske *et al.*, 1999; Katz and Redmond, 2001; Pang *et al.*, 2005).

De l'étude génétique, certaines corrélations génotype-phénotype ont été réalisées malgré l'hétérogénéité génétique et physiopathologique. Deux groupes de patients peuvent être distingués en fonction du type de l'atteinte principale des photorécepteurs présentée par l'enfant : une atteinte « cônes-bâtonnets » est retrouvée pour les gènes *gucy2d*, *aipl1*, *rpgr1*, une atteinte « bâtonnets-cônes » est retrouvée pour les gènes *rpe65*, *crb1*, *tulp1*, *crx*. Ensuite, en fonction de l'amétropie de l'enfant, de symptômes ophtalmologiques associés comme le kératocône, un arbre décisionnel permettant de restreindre les gènes candidats à tester peut-être réalisé (figure 6).

3.7. Particularités de la clinique liée à la mutation du gène *rpe65*

Pour les patients, ayant une mutation du gène *rpe65*, d'autres critères peuvent être utilisés pour les détecter. En fait, la majorité des patients ayant une mutation dans le gène *rpe65* présente une clinique un peu différente de l'ACL classique rentrant plus dans le cadre d'une dégénérescence précoce et sévère ou early-onset severe retinal dystrophy (Lorenz *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2000). Ces enfants présentent une atteinte sévère visuelle avec une atteinte de la vision nocturne. Mais la vision est améliorée lors d'une forte illumination et ces enfants ont tendance à fixer la lumière (Thompson *et al.*, 2000). La présence d'un nystagmus n'est pas constante. Le champ visuel peut être relativement peu atteint dans la première enfance mais les isoptères se constrictent ensuite sévèrement (Lorenz *et al.*, 2000;

El Matri *et al.*, 2006). Le fond d'œil est généralement normal dans l'enfance puis apparaissent ensuite un

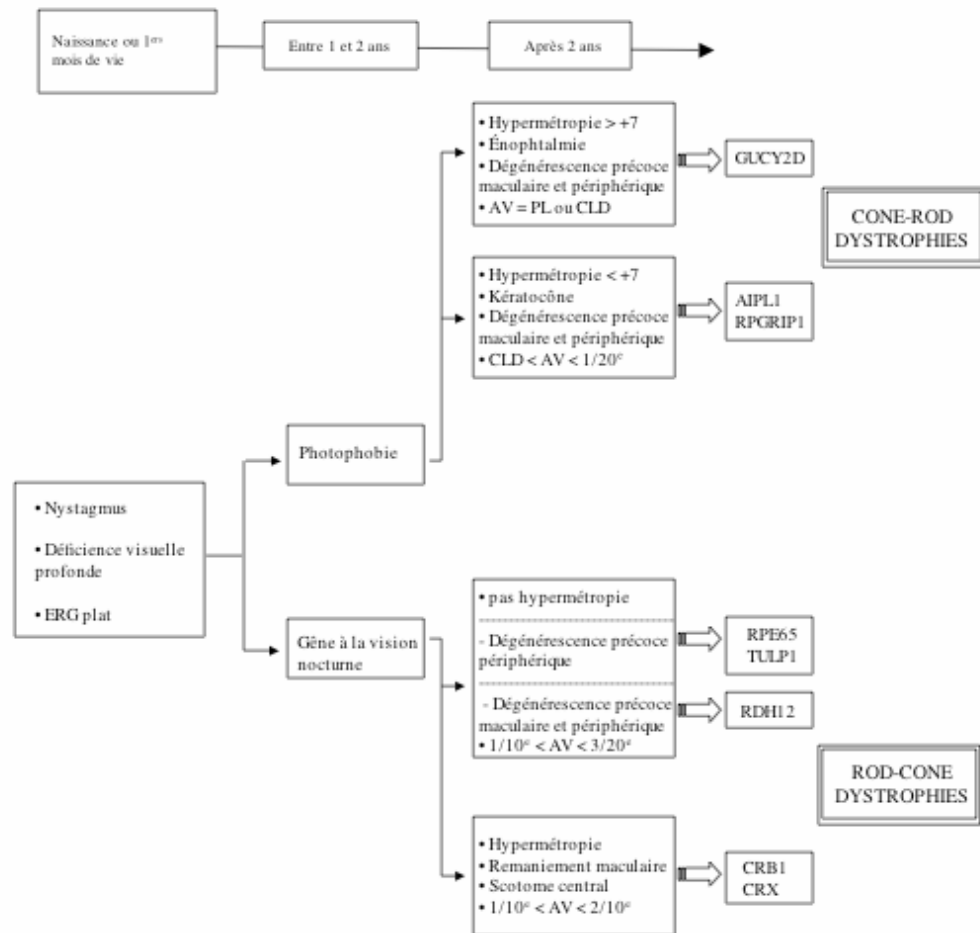


Figure 6: Arbre décisionnel qui permet d'orienter l'étude moléculaire des gènes à l'origine d'un Amaurose congénitale de Leber d'après les signes cliniques. D'après Hanein, J Fr Ophtalmol, 2005. Quatre grands phénotypes d'amaurose congénitale de Leber ont été distingués par la prise en considération du comportement de l'enfant à la lumière, des données de réfractométrie, de l'aspect du fond d'œil, et de l'acuité visuelle. AV, acuité visuelle; CLD, compte les doigts; ERG, électrorétinogramme; PL, perception lumineuse; RP, rétinoopathie pigmentaire.

amincissement du calibre artériel, une atrophie rétinienne, une pigmentation anormale (Lorenz *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2000) ou encore des dépôts ponctiformes jaunâtres (Hamel *et al.*, 2001). Ces patients ayant une mutation du gène *rpe65* ont une caractéristique particulière : ils présentent une faible autofluorescence ou une absence d'autofluorescence lors de l'examen du fond d'œil avec un HRA (Heidelberg Retina Angiograph) dès la première décennie (Lorenz *et al.*, 2004). Dans la première enfance, l'acuité visuelle peut-être relativement bien préservée pour se détériorer ensuite dans la seconde décennie (Lorenz *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2000; Felius *et al.*, 2002; El Matri *et al.*, 2006).

Comme il sera développé dans le chapitre sur la thérapie génique des modèles animaux de dystrophies rétiniennes, des modèles d'ACL sont souvent étudiés pour tester l'efficacité d'un traitement substitutif par transfert de gène. De nombreux modèles animaux d'ACL existent : souris (mutation du gène *rpe65*) (Batten *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2005), (mutation du gène *rpgr1*) (Pawlyk *et al.*, 2005), poulet (mutation du gène *retGC1*) (Semple-Rowland *et al.*, 1998), chiens (mutation du gène *rpe65*) (Narfstrom, 1999; Veske *et al.*, 1999).

IV. VECTEUR VIRAL RECOMBINANT A PARTIR DE L'ADENO-ASSOCIATED VIRUS (AAV)

4.1. Généralités sur le virus AAV

Le virus adéno-associé ou Adéno-Associated Virus (AAV) est un virus non enveloppé à ADN linéaire simple brin de la famille des Parvoviridae appartenant au genre Dependovirus, qui a été découvert il y a plus de 40 ans (Atchison *et al.*, 1965).

Les Parvoviridae sont subdivisés en deux sous-familles : les parvovirinae (Parvovirus autonomes, Erythrovirus et Dependovirus) infectant les vertébrés et les Densovirinae (densovirus, Icterovirus et Contravirus) infectant les insectes. Les Dependovirus auxquels appartiennent les AAV sont uniques dans le monde animal car, ils nécessitent la co-infection d'un autre virus auxiliaire, également appelé helper, pour assurer leur cycle répliatif. Ce

rôle de virus helper peut être joué par l'adénovirus, par l'herpès virus, par le cytomégalovirus ou par le virus de la vaccine.

Les AAV sont résistants à des conditions extrêmes de pH, aux détergents et à la chaleur. Ils sont capables d'infecter des cellules en division mais également des cellules post-mitotiques comme les cellules des tissus oculaires.

Les AAV sont non pathogènes pour l'homme, une majorité d'individus (70 à 90 % selon les études), a été une fois dans la vie au contact de l'AAV, sans conséquences pathologiques connues (Tobiasch *et al.*, 1998). L'infection par les AAV aurait lieu dans l'enfance sous la forme d'infection des voies respiratoires. Toutefois, Arechavaleta-Velasco *et al.* se posent la question de l'implication de l'infection gynécologique par l'AAV2 dans la genèse de troubles de la migration cellulaire au sein du tissu trophoblastique lors de la prééclampsie (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2006).

La plupart des individus possèdent des immunoglobulines dirigées contre l'AAV2. Selon les études, un taux d'anticorps circulants, allant de 80% à 96%, sont retrouvés dans les sérums humains testés. Cependant la plupart de ces anticorps ne sont pas neutralisants, et ne devraient pas perturber l'efficacité des vecteurs. Seulement 18% à 32% des anticorps sont neutralisants (Chirmule *et al.*, 1999; Moskalenko *et al.*, 2000). Toutefois, la production d'anticorps et d'anticorps neutralisants sériques peut survenir après l'utilisation de vecteurs viraux dérivés à partir de l'AAV.

4.2. Le génome viral de l'AAV

Le génome de l'AAV est constitué d'une molécule d'ADN simple brin de 4979 bases (Srivastava *et al.*, 1983), GenBank AF043303). Il contient deux cadres de lecture ouverts (ORF open reading frame), *rep* et *cap*, qui codent respectivement pour quatre protéines régulatrices (Rep) et trois protéines de structure (Cap). Les extrémités de cet ADN sont marquées par la présence d'une structure non-codante palindromique de 145 nucléotides, les ITR (pour *Inverted Terminal Repeat*) formant une structure en « épingle à cheveux » (Muzyczka, 1992; Berns and Giraud, 1996). (Figure 7)

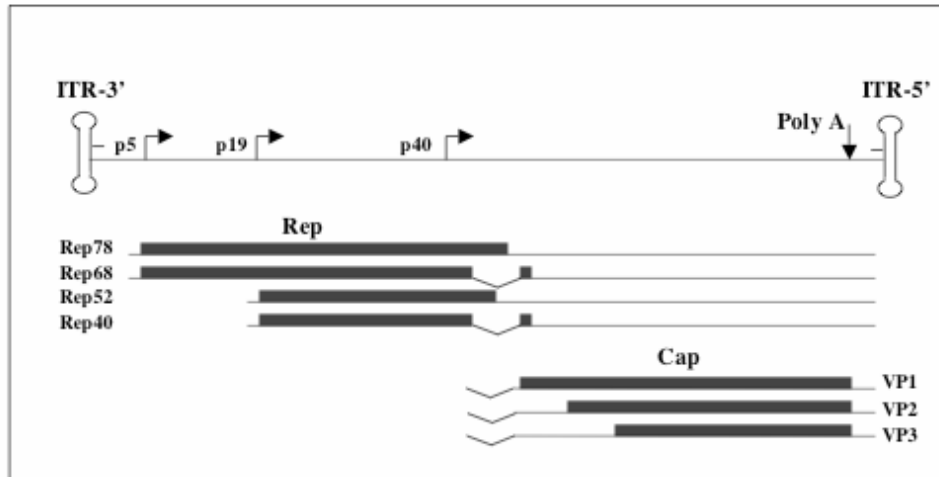


Figure 7: Organisation génomique de l'AAV2 sauvage.

Le génome de l'AAV se compose d'une molécule d'ADN simple brin de 4979 nucléotides. Les gènes *rep* et *cap* sont encadrés par les séquences ITR (Inverted Terminal Repeat) de 145 nucléotides. Les protéines Rep 78, Rep 68, Rep 52 et Rep 40 sont codées par des transcrits initiés par les promoteurs p5 et p19 par épissage alternatif. Les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3 sont issues de transcrits initiés au promoteur p40.

Trois régions promotrices contrôlent l'expression des gènes *rep* et *cap* de l'AAV : les promoteurs p5 et p19 conduisent la transcription d'ARNm, respectivement pour les protéines Rep 78/68 et Rep 52/40. Le promoteur p40, quant à lui, permet la transcription de l'ARNm codant pour les trois protéines de capsid. La régulation de ces trois régions promotrices s'effectue en cascade et est contrôlée de façon complexe par des facteurs cellulaires, des protéines adénovirales et par les protéines Rep elles-mêmes :

- En l'absence d'Adénovirus, les trois promoteurs de l'AAV sont silencieux suite à l'effet répresseur exercé, en trans, par les protéines Rep, et en cis par un site appelé RBE (Rep Binding Element) du promoteur p5 (Pereira *et al.*, 1997). L'élément RBE, qui également présent dans les régions promotrices p19 et p40 et dans les ITR, constitue des sites de fixation des protéines Rep 78 et Rep 68 sur l'ADN double brin.
- En présence d'Adénovirus, le promoteur p5 est trans-activé par la protéine E1A de l'adénovirus (Chang *et al.*, 1989). Les protéines Rep 78 et Rep 68 trans-activent à leur tour les deux autres promoteurs de l'AAV qui sont également régulés par des signaux présents, en cis, dans les ITR et dans les régions promotrices p5 et p19. Les protéines Rep 78 et Rep 68 exercent également un effet trans-répresseur sur leur propre promoteur (Pereira *et al.*, 1997).

Les protéines Rep 78 et Rep 68 sont nécessaires à la réplication du génome (Im and Muzyczka, 1990; Owens *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1997). Elles modulent la transcription de l'AAV et de différents promoteurs hétérologues (Labow *et al.*, 1986; McCarty *et al.*, 1991; Horer *et al.*, 1995). Enfin, elles orientent, *in vitro*, l'intégration site-spécifique de l'AAV dans le génome humain grâce à une activité de liaison à l'ADN au niveau d'un site spécifique appelé RBS (Rep Binding Site) (Weitzman *et al.*, 1994).

Les protéines Rep 52 et Rep 40 sont nécessaires à la production du génome simple brin et à la modulation des promoteurs de l'AAV (Chejanovsky and Carter, 1989; Pereira *et al.*, 1997; Smith and Kotin, 1998).

Il a également été montré que les protéines Rep interagissaient avec les protéines cellulaires impliquées dans l'expression génique (Chiorini *et al.*, 1998; Di Pasquale and Stacey, 1998; Weger *et al.*, 1999).

Les trois protéines structurales de la capsid sont VP1 (90kDa), VP2 (72kDa) et VP3 (60 kDa). Elles sont codées par le même gène *Cap* avec un seul codon stop. Toutefois, Ces protéines diffèrent dans leur partie N-terminale du fait d'un épissage alternatif. Trois protéines plus courtes résultent de cet épissage alternatif. L'association de ces 3 protéines

au ratio 1 :1 :10 aboutit à une capsidie icosaédrale de 25 nm de diamètre (Buller and Rose, 1978).

Les ITR sont constituées de trois régions palindromiques (AA', BB' et CC') de 125 nucléotides et d'une région unique de 20 nucléotides (D) (Muzyczka, 1992; Berns and Giraud, 1996). Les séquences palindromiques de chaque ITR s'apparient pour former une structure secondaire en forme de T, également appelée en « épingle à cheveux ». La région A comporte une séquence RBS et un site de coupure par les protéines Rep 78/68 appelé trs (terminal resolution site) (McCarty *et al.*, 1994). Ces séquences sont nécessaires en *cis* pour la réplication du virus et pour l'encapsidation du génome viral dans des capsides nouvellement formées. Elles servent également à la mobilisation de l'ADN viral.

4.3. Les différents sérotypes d'AAV

Le sérotype 2 de l'AAV a été le premier AAV découvert. Il fut découvert comme contaminant d'un stock d'Adénovirus (Hoggan *et al.*, 1966). Il fut, également, le premier sérotype à être cloné dans des plasmides bactériens pour servir de vecteurs pour le transfert de gènes (Samulski *et al.*, 1982). Par la suite, 10 autres sérotypes ont été découverts puis clonés pour le développement de vecteurs viraux (Choi *et al.*, 2005). De même, les sérotypes 1, 3, 4 et 6 de l'AAV ont été, initialement, trouvés comme contaminants de stocks d'Adénovirus de laboratoires (Atchison *et al.*, 1965; Melnick *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966). Le sérotype 4 de l'AAV, que nous évoquerons longuement dans la seconde partie de la thèse, a été découvert dès 1967 (Parks *et al.*, 1967). Mais il n'a été cloné et utilisé comme vecteur viral pour le transfert de gènes que 30 ans après par Chiorini *et al.* (Chiorini *et al.*, 1997).

L'origine des divers sérotypes est variée. Pour le moment, l'hôte naturel de l'AAV1 n'est pas déterminé. L'AAV2 et 3 sont d'origine infantile. L'AAV 4 a été isolé à partir d'une culture cellulaire rénale d'origine simienne. L'AAV5 a été isolé à partir d'un condylome humain (Bantel-Schaal and zur Hausen, 1984). L'AAV6 semble être un recombinant entre l'AAV 1 et l'AAV2 : ITR gauche et promoteur p5 de l'AAV2, le reste des séquences codantes et l'ITR droit de l'AAV1 (Xiao *et al.*, 1999). L'AAV7, 8 et 9 ont été isolés chez des primates rhésus (Gao *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004b). Alors que les sérotypes 10 et 11 ont été isolés chez des primates cynomolgus (Mori *et al.*, 2004).

Lorsque l'on compare les ressemblances entre les différents sérotypes d'AAV par appariement des séquences nucléotiques, on s'aperçoit que l'AAV5 semble être le sérotype le plus divergent. La séquence nucléotidique *rep* de l'AAV5 est identique à celle de l'AAV2 à 67% alors que la séquence *cap* ne l'est que pour 56%. Les ITR de ce même sérotype ont une homologie de 56% avec les ITR de l'AAV2 mais ils conservent la même structure secondaire (Chiorini *et al.*, 1999). L'AAV3 présente une similarité de séquence assez importante avec l'AAV2 (82%) (Muramatsu *et al.*, 1996). Le gène *rep* de l'AAV4 possède une grande homologie avec celui de l'AAV2 (90%) alors que le gène *cap* ne possède que 62% d'homologie avec celui de l'AAV2 (Chiorini *et al.*, 1997). Pour l'AAV7 et l'AAV8, il existe, respectivement, 78% et 79% de similarité dans la séquence codant pour VP1 à l'AAV2 (Gao *et al.*, 2002). Les protéines de capsid de l'AAV10 et de l'AAV11 partagent respectivement 84% et 65% d'homologie les amino-acides de l'AAV2 (Mori *et al.*, 2004). Enfin, les séquences amino-acides de l'AAV10 ressemblent à celles de l'AAV8 alors que celle de l'AAV11 ressemble à l'AAV4.

La majorité des différences dans les protéines de capsid se situent dans des régions proposées comme étant à la surface extérieure du virus. 2 études récentes ont montré que VP1 est situé à l'intérieur du virion (Bleker *et al.*, 2005; Kronenberg *et al.*, 2005).

Les différences, en relation avec la structure secondaire des protéines de capsid, peuvent expliquer les différences de tropisme cellulaire d'un sérotype à l'autre.

Dernièrement, cent dix isolats d'AAV, pouvant être considérés comme des variants des AAV existants, ont été isolés de prélèvements humains et simiens (Gao *et al.*, 2004b). Ces AAV ont été classées en « clades » selon leur origine phylogénique. Plus de 10 de ces variants AAV ont été clonés pour le développement de vecteurs viraux (Gao *et al.*, 2005).

4.4. Devenir de l'AAV dans la cellule hôte

Au niveau de la cellule hôte, l'AAV doit effectuer plusieurs étapes majeures avant de pouvoir exprimer son génome viral : l'attachement aux récepteurs cellulaires de surface, l'endocytose du virion, le transport de celui-ci par l'endosome jusqu'à la zone périnucléaire, l'échappement de l'endosome, l'atteinte du noyau par le génome viral constitué d'ADN simple brin. Une fois le génome viral dans le noyau de la cellule hôte, la transcription du génome de l'AAV dépendra de la présence ou non du virus helper. (Figure 8).

4.4.1. Arrimage de l'AAV à la cellule hôte

La première étape d'une infection virale notamment par l'AAV est son arrimage à la cellule cible. L'AAV2, dont le cycle cellulaire a été le plus étudié, utilise des récepteurs de surface cellulaire. L'Héparan Sulfate proteoglycan (HSPG), récepteur de surface cellulaire largement exprimé, est le récepteur principalement utilisé par l'AAV pour s'attacher aux cellules cibles. Il a d'ailleurs été montré que l'efficacité de l'infection par l'AAV était directement liée à la présence et la concentration des HSPG récepteurs (Summerford and Samulski, 1998). Le site de liaison de l'AAV à l'HSPG est localisé dans la partie VP3 des protéines de capsid (Wu *et al.*, 2000). L'AAV2 utilise, également, pour potentialiser son internalisation des co-récepteurs incluant le Fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1) (Qing *et al.*, 1999), l'intégrin alpha-V-beta-5 ($\alpha V\beta 5$) (Summerford *et al.*, 1999) et l'hépatocyte growth factor receptor (HGFR) (Kashiwakura *et al.*, 2005). Pour les autres sérotypes, il a été décrit que l'AAV4 s'attachait à un O-linked $\alpha 2-3$ linked sialic acid alors que l'AAV5 se lie à N-linked $\alpha 2-3$ ou 2-6 sialic acid (Kaludov *et al.*, 2001). Un co-récepteur platelet-derived growth factor receptor (PDGFR- α) a aussi été identifié pour l'AAV5 (Di Pasquale *et al.*, 2003).

4.4.2. Entrée de l'AAV dans la cellule et transport cytosolique

L'entrée dans la cellule hôte de l'AAV se réalise par l'endocytose de puits recouverts de clathrine sous le contrôle de la dynamine. L'endocytose nécessiterait l'activation GTP-dépendante de la protéine Rac-1 par l'intégrine $\alpha V\beta 5$. Cette première activation induirait en cascade l'activation de la kinase phosphatidylinositol (PI3K) qui permet, alors, le

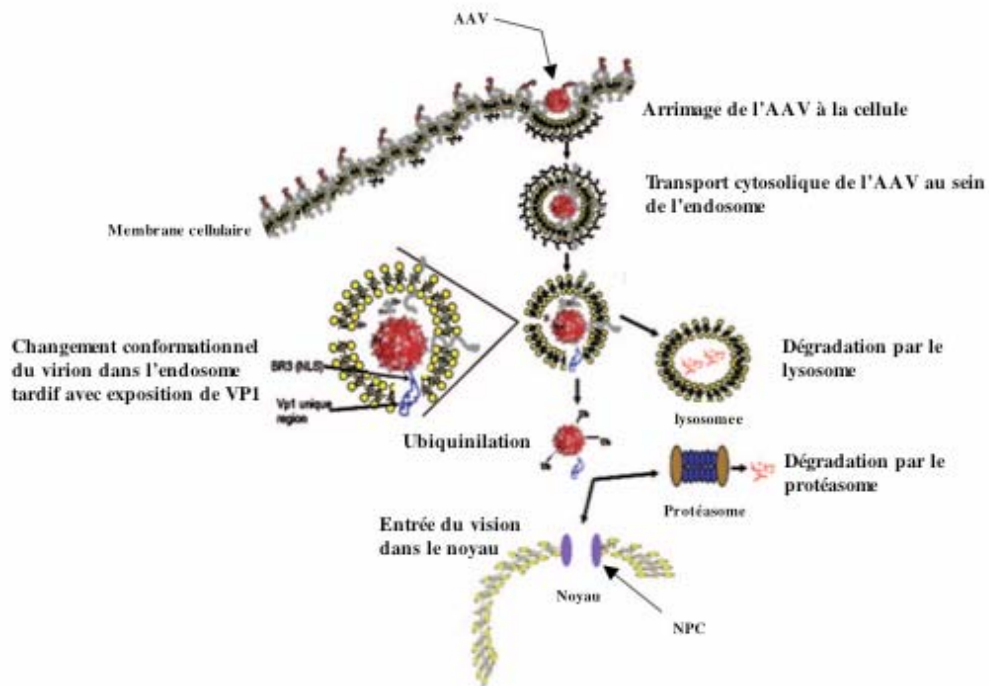


Figure 8: Représentation schématique du trafic intracellulaire de l'AAV2.

D'après Grieger J Virol.2006. La première étape de l'infection d'une cellule par l'AAV2 est la liaison du virion avec son récepteur et son corécepteur. L'AAV2 rentre dans la cellule par endocytose de puits recouverts de clathrine et se retrouve dans le cytoplasme sous forme d'endosome. L'endosome précoce mature en endosome tardif où le pH diminue au environ de 5. Un changement conformationnel dépendant du pH a lieu, ce qui aboutit à l'exposition de la partie N-terminale de VP1. À ce niveau du trajet intracellulaire, si l'AAV2 manque son échappement de l'endosome tardif, il est dégradé dans le lysosome. En s'échappant de l'endosome, l'AAV2 ubiquitiné se positionne dans la zone périnucléaire où soit il est dégradé par le protéasome, soit il rentre dans le noyau de la cellule.

déplacement des endosomes contenant les particules d'AAV vers le noyau le long des microtubules et des microfilaments du cytosquelette (Sanlioglu *et al.*, 2000).

Avant de s'échapper de l'endosome, le virion subit des changements conformationnels aboutissant à l'exposition N terminale de VP1 (Carreira *et al.*, 2004; Reguera *et al.*, 2004). L'étude de Grieger *et al.* suggère, également, que 172 aa de VP1 et 35 aa de VP2 seraient exposés lors de ce passage dans l'endosome par le virion (Grieger *et al.*, 2006). Ces évènements seraient nécessaires pour l'échappement du virion de l'endosome et essentiels pour le cheminement intracellulaire, ultérieur, de la particule virale. De plus, Bartlett *et al.* ont montré qu'une acidification du contenu endosomal était nécessaire pour permettre la libération dans le cytosol des particules virales. Particules qui vont, alors, s'accumuler dans la région périnucléaire (Bartlett *et al.*, 2000).

Au cours de ce passage dans l'endosome, les capsides de l'AAV seraient ubiquitinilées. Ubiquitination qui marque les capsides virales pour la dégradation future de ces capsides par le complexe du protéasome (Yan *et al.*, 2002). Pour d'autres parvovirus comme le MVM (Minute Virus of Mice), il a été évoqué que cette ubiquitination faciliterait la dislocation de la capside virale ; Dislocation qui permettrait au génome viral de pénétrer plus facilement dans le noyau (Ros and Kempf, 2004). Pour le virus AAV, des expériences d'inhibition du complexe du protéasome contredisent cette hypothèse. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome, comme le MG-132, augmente l'efficacité de transduction de certains sérotypes ; le 2 et 5 (Duan *et al.*, 2000; Douar *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004). Ceci laisse penser, qu'une partie des particules virales ayant atteint le cytoplasme de la cellule hôte sont détruites de cette manière. Pour une efficacité infectieuse maximale, le virion AAV doit, par conséquent, éviter les protéasomes cytoplasmiques afin d'arriver jusqu'au noyau non dégradé (Douar *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2004).

4.4.3. Entrée de l'AAV dans le noyau de la cellule hôte

Pour le moment, l'entrée dans le noyau de ce virion AAV n'est pas élucidée. Des particules virales intactes ont été retrouvées dans le noyau (Xiao *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2005). Les premières études suggéraient une entrée du virion via les NPC (nuclear pore complex) (Bartlett *et al.*, 2000). Les NPC sont des complexes protéiques permettant de faire passer d'un côté à l'autre de la membrane nucléaire, par un mécanisme actif, des éléments faisant jusqu'à environ 26nm de diamètre (Talcott and Moore, 1999). Mais une autre étude a montré que l'entrée de l'AAV pouvait se faire par un mécanisme passif qui ne requière pas les NPC (Hansen *et al.*, 2001). Grieger *et al.* ont montré qu'un domaine nommé BR3 (pour

basic region 3), située dans VP1 et VP2, était nécessaire pour la translocation du génome de l'AAV2 au travers de la membrane nucléaire lors de l'infection virale primitive ; région relativement bien conservée entre les différents sérotypes d'AAV qui pourrait servir de NLS (nuclear localization sequence). Plusieurs équipes ont montré que l'adénovirus augmentait l'efficacité de l'entrée des capsides AAV dans le noyau (Xiao *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2005). La translation à l'intérieur du noyau devrait avoir lieu après des modifications de la capside virale ou sans capside virale (Bartlett *et al.*, 2000).

4.4.4. Devenir de l'AAV dans le noyau

Les modalités de décapsidation sont, actuellement, mal connus.

Lorsque le génome AAV arrive sans virus helper dans le noyau cellulaire, il rentre dans une phase latente où les trois promoteurs (p5, p19 et p40) sont silencieux. Durant cette phase latente, il a été montré, *in vitro*, que le génome viral s'intégrait de manière spécifique au niveau du site AAVS1 du chromosome 19 (Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991).

Lorsqu'il y a une co-infection cellulaire d'un AAV avec un virus helper, l'AAV rentre alors dans ce que l'on appelle un cycle lytique. Cette phase est caractérisée par la production des protéines de l'AAV, par la réplication de l'ADN viral puis par l'assemblage de nouvelles particules virales. Les particules néo-formées sont secrétées dans le milieu extracellulaire à la suite de l'effet cytopathologique induit par l'adénovirus.

4.4.5. A propos de l'intégration du génome de l'AAV dans le génome de la cellule hôte

In vitro sur des cultures cellulaires, il a été montré que l'AAV était capable de s'intégrer, de manière site-spécifique, dans le génome humain. Cette intégration se fait au niveau d'un site appelé AAVS1, qui est localisé sur le dix-neuvième chromosome humain en q13.3-qter (Kotin *et al.*, 1990; Kotin *et al.*, 1991; Samulski *et al.*, 1991; Kotin *et al.*, 1992). Cette intégration se fait grâce à une recombinaison, non-homologue, entre le génome de l'AAV et celui de l'AAVS1. Les protéines 68 et 78 seraient nécessaires à cette recombinaison en formant un complexe multimérique (Chiorini *et al.*, 1995; Balague *et al.*, 1997). Ces protéines Rep facilitent la formation d'un complexe entre les ITR de l'AAV et la séquence de l'AAVS1

contenant le RBE (Rep Binding Element) et le *trs* (terminal resolution site). Trois sites portent le RBE : les deux ITRs et une zone proche du promoteur p5, le P5IEE. Ce P5IEE permettrait, par rapport aux seuls ITRs de l'AAV, d'induire une intégration site spécifique dans l'AAVS1 plus efficace et plus spécifique d'après Philpott (Philpott *et al.*, 2002). Toutefois récemment, Feng et Al ont montré que 16 paires de bases du RBE étaient les seuls éléments, en *cis*, suffisants pour induire une recombinaison entre un ADN plasmidique et le site AAVS1 du chromosome 19 (Feng *et al.*, 2006). Le mécanisme précis de cette intégration de l'AAV reste encore à élucider. In vivo, Chen ainsi que Schnepf ont recherché la présence de séquences nucléotidiques d'AAV sauvage, ainsi que leurs caractérisations moléculaires et que leurs localisations cellulaires dans des prélèvements humains. Prélèvements, pour la plupart d'origine oropharyngés, qui provenaient de pièces opératoires d'amygdalectomie ou d'adénoïdectomie chez des enfants âgés de 2 à 13 ans (Chen *et al.*, 2005; Schnepf *et al.*, 2005). Chen, sur 101 prélèvements analysés, a retrouvé la présence du génome de l'AAV dans 9 prélèvements (9%), dont deux prélèvements contaminés de façon conjointes par l'adénovirus (Chen *et al.*, 2005). Dans cette même cohorte, le taux de séropositivité des anticorps dirigés contre l'AAV est retrouvé à 12%, ce qui est en accord avec l'étude génétique réalisée mais en désaccord avec les résultats habituels de la littérature concernant l'infection par l'AAV où la présence d'anticorps atteint jusqu'à 80% des sérums analysés (Moskalenko *et al.*, 2000). Cela serait dû au jeune âge de la cohorte car dès que cette même analyse est faite chez des sujets âgés de plus de 14 ans, le taux de séropositifs contre l'AAV passe à 76% des sérums testés. Sur les mêmes prélèvements de cette cohorte d'enfants, Schnepf a réalisé la caractérisation et la localisation de l'ADN viral de l'AAV sauvage, lors de ces infections à adéno-associated virus acquises et naturelles de l'enfance. Il n'a pas pu détecter la présence de l'ADN viral de l'AAV dans le site d'intégration AAVS1 par des PCR (Schnepf *et al.*, 2005). Afin de rechercher une insertion aléatoire au sein du génome cellulaire, une analyse des neuf échantillons positifs par LAM-PCR (linear-amplification-mediated-PCR) a été réalisée. Une seule jonction AAV-génome cellulaire a été trouvée dans une zone satellite hautement répétitive du chromosome 1 dans un échantillon d'amygdales (Schnepf *et al.*, 2005). L'adaptation à la détection du génome AAV circulaire d'une nouvelle technique de LCRA (linear rolling-circle amplification) a permis de mettre en évidence le génome de l'AAV sauvage sous la forme circulaire, réorganisé en jonction AAV-AAV avec de vastes délétions dans les ITRs et des réarrangements, dans les 8 autres prélèvements positifs (Schnepf *et al.*, 2005). Cette équipe pense que ces génomes AAV circulaires détectés seraient des épisomes extrachromosomiques (Schnepf *et al.*, 2005).

4.4.6 Cinétique de l'infection par l'AAV dans la cellule hôte

De nombreux travaux ont étudié la cinétique d'infection de cellule hôte par l'AAV. Les premières étapes surviennent rapidement après l'infection par le virus AAV. Pour Seisenberger *et al.*, l'entrée par endocytose du virion survient dès 60 millisecondes après l'infection (Seisenberger *et al.*, 2001). Après les 10 premières minutes, deux tiers des particules virales attachées à la membrane cellulaire seraient internalisées (Bartlett *et al.*, 2000). Certaines études ont montré que l'accumulation périnucléaire de particules d'AAV était observée 1 à 2 heures après l'infection alors que l'équipe de Büning retrouve cette accumulation dès 15 minutes après l'infection (Xiao *et al.*, 2002; Ward, 2004; Lux *et al.*, 2005). En comparaison, l'entrée dans le noyau de capsides intactes, en l'absence d'adénovirus, est relativement lente car il faut attendre de 11 à 24 heures post-infection pour pouvoir détecter des particules virales à l'intérieur du noyau (Lux *et al.*, 2005). Résultats discordants avec ceux de Bartlett et de Sanlioglu qui retrouvaient dès 2 heures ou 3 heures post-infection des particules virales d'AAV intranucléaires (Bartlett *et al.*, 2000; Sanlioglu *et al.*, 2000). Par contre, la co-infection de cellules par l'adénovirus et l'AAV permet de retrouver des particules virales dans les noyaux cellulaires dès 2 heures après l'infection (Xiao *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2005). L'adénovirus serait capable d'augmenter l'entrée des capsides d'AAV dans le noyau cellulaire.

4.5. Production de vecteurs dérivés de l'Adéno-Associated Virus

Les méthodes de production des vecteurs dérivés de l'AAV-2 seront, en premier lieu, exposées puis celles des autres sérotypes seront envisagées.

4.5.1 Production des vecteurs AAV de sérotype 2

➤ Les méthodes de production

Les vecteurs AAVr dérivent de l'AAV sauvage. Les ITRs sont les seules séquences du virus sauvage retenues. Les gènes *rep* et *cap* sont remplacés par le transgène associé aux éléments de régulation nécessaires à son expression (promoteur et signal de polyadénylation) (Figure 9). La taille du vecteur, ITRs comprises, ne peut excéder 105% de la taille du virus sauvage. Ce qui laisse 4,6 kb à insérer. Au delà, de cette taille, l'ADN encapsidé est souvent incomplet (Dong *et al.*, 1996).

Les ITRs sont les seuls éléments en *cis* nécessaires à la réplication et à l'encapsidation des virus recombinants. Les fonctions Reps et Cap sont apportées en *trans* par un plasmide ne comportant pas les ITRs (Muzyczka, 1992).

Historiquement, la première méthode consistait à une double transfection des cellules productrices Hela par un plasmide pAAV portant la cassette d'expression plus les deux ITRs et par un plasmide pHelper portant les fonctions Rep et Cap. Secondairement, les cellules étaient infectées par l'adénovirus sauvage. Quelques jours plus tard, on pouvait récolter un lysat cellulaire contenant des rAAV puis le purifier. Mais cette méthode, outre qu'elle soit laborieuse, produisait des solutions de vecteurs rAAV avec une forte contamination par l'adénovirus sauvage malgré la purification. Cette contamination par l'adénovirus peut être à l'origine de réactions immunogènes (pour revue voir (Merten *et al.*, 2005) + figure de ce papier). De plus, la réplication de l'adénovirus sauvage par cette méthode de production était possible. Afin d'éviter ces risques, un système déficient pour la réplication de l'adénovirus a été créé. Une lignée cellulaire de 293, cellules dérivées de cellules embryonnaires rénales, exprime de façon stable la région E1 de l'adénovirus. Ces cellules sont transfectées par le pAAV et le pHelper. Puis secondairement les cellules sont infectées par un adénovirus délété de la région E1 (Figure 10). Pour réduire la contamination des préparations virales en adénovirus, les fonctions *helper* peuvent être apportées par un plasmide adénoviral pAd qui est transfecté au niveau des cellules 293 en même tant que les plasmides pAAV et pHelper (Salveti *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1998). L'utilisation du plasmide pAd permet de supprimer l'effet cytopathique dû à l'infection adénovirale, ce qui simplifie la méthode de production en augmentant le rendement de production. Une amélioration dans la procédure de transfection a été réalisée en générant un plasmide pDG portant les gènes *rep* et *cap* ainsi que les gènes *E2*, *E4* et *VA1* adénoviraux (Grimm *et al.*, 1998). Ce protocole ne nécessite alors qu'une double transfection des cellules 293, ce qui a permis d'augmenter les titres de production par 10.

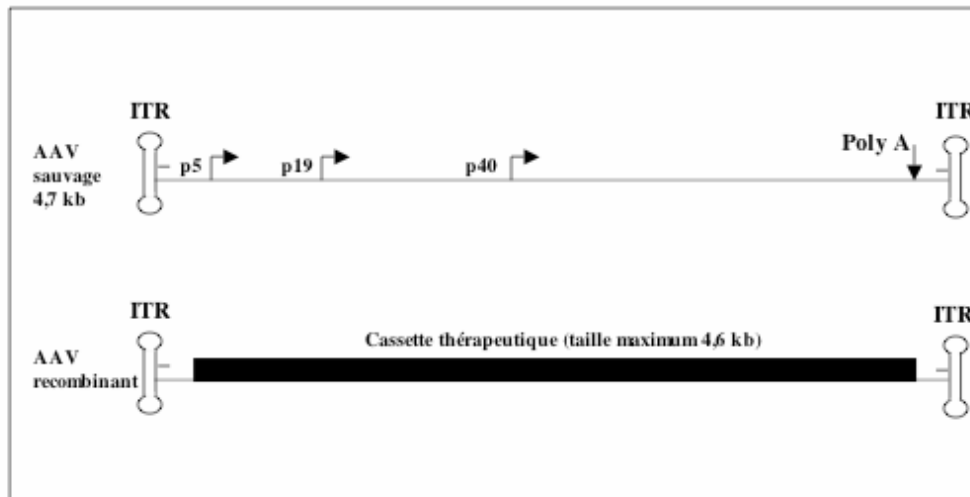


Figure 9: Organisation génomique de l'AAV recombinant (AAVr)

Le génome des vecteurs AAVr est obtenu en remplaçant les gènes *rep* et *cap* de l'AAV par la cassette d'expression du transgène. Les seules séquences virales conservées sont les ITR (Inverted Terminal Repeat) qui sont nécessaire en cis à la répllication et à l'encapsidation du génome recombinant lors d'une phase de production.

➤ Les méthodes de purification

La purification des stocks de rAAV se fait après lyse du culot cellulaire par action de détergents ou de nucléases (Clark *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000) ou par succession de cycle congélation/décongélation (Salveti *et al.*, 1998; Zolotukhin *et al.*, 1999; Brument *et al.*, 2002). Les méthodes conventionnelles de purification des vecteurs AAV sont basées sur l'ultracentrifugation des lysats cellulaires sur gradient Chlorure de Cesium (CsCl) (Salveti *et al.*, 1998). L'affinité de l'AAV2 pour les groupements d'héparane sulfate a permis d'utiliser des protocoles de chromatographies sur colonne d'héparine. La combinaison d'une ultracentrifugation sur gradient de densité de iodixanol suivie par une purification des particules sur colonne d'héparine permet d'obtenir des lots plus purs qu'une double purification sur gradient de CsCl (Zolotukhin *et al.*, 1999; Brument *et al.*, 2002). Salvetti *et al.* ont développé une méthode de purification basée sur la technique de chromatographie échangeuse d'ions FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) qui permet d'obtenir des stocks de rAAV purs sans traitement préalable du lysat par des détergents ou des nucléases (Brument *et al.*, 2002)(Figure 10).

La pureté des suspensions virales est testée par une coloration des protéines au nitrate d'argent après migration sur gel SDS.

➤ Les méthodes de titration

Différentes techniques de titration existent.

Le dot blot permet de quantifier l'ADN viral encapsidé en comparaison avec des quantités connues d'ADN plasmidique ayant servi à la production du vecteur. Cette méthode permet de connaître le nombre de particules « pleines » par millilitre de solution virale. L'unité est alors le nombre de particules/ml ou vector genome/ml. Le dot blot ne renseigne pas sur le caractère infectieux des particules virales.

De plus en plus, certains laboratoires développent des méthodes de PCR quantitatives afin de pouvoir titrer les solutions virales (Veldwijk *et al.*, 2002; Rohr *et al.*, 2005).

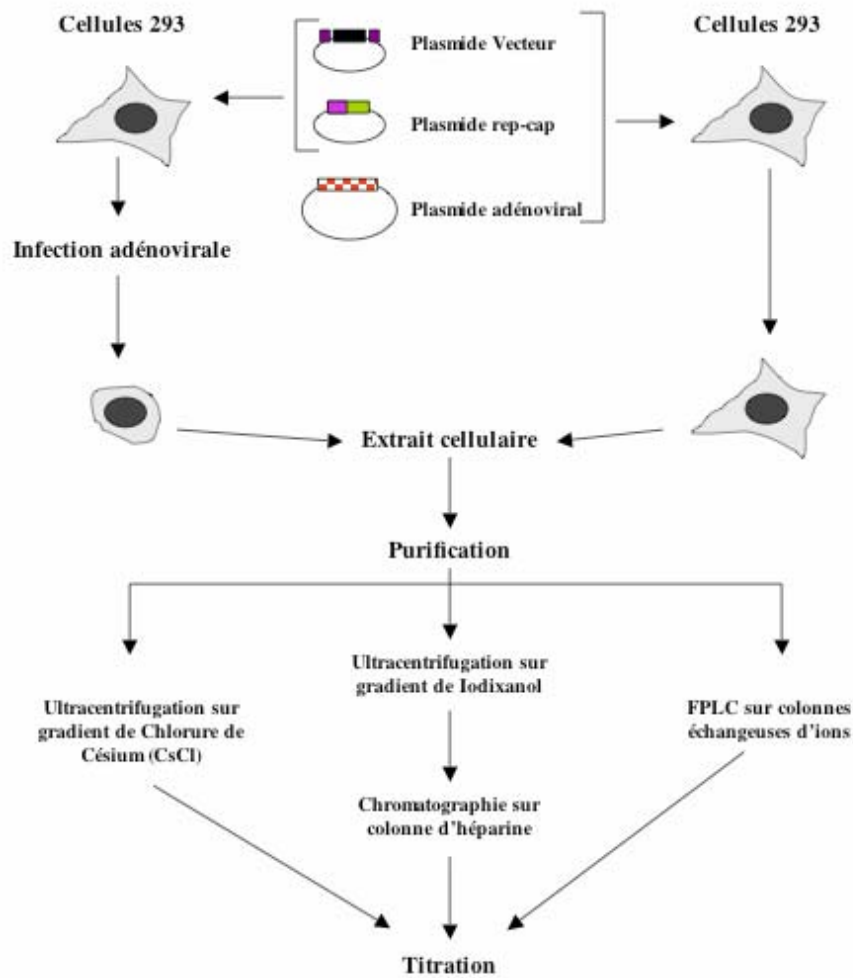


Figure 10: Production de vecteurs AAV. D'après Salvetti. Hum Gene Ther. 1998.

Classiquement les cellules 293 sont transfectées au moyen du plasmide vecteur et d'un plasmide transcomplémentant apportant les gènes *rep-cap*. Les gènes auxiliaires adénoviraux sont soit apportés par infection adénovirale (voie de gauche), soit par transfection d'un plasmide adénoviral (voie de droite) ou d'un plasmide portant les gènes *rep-cap* et *helper* adénoviraux. Le schéma ne figure pas de production à partir de lignée. Stables. Après récolte et lyse des cellules, l'extrait cellulaire est purifié sur gradient de densité ou chromatographie par FPLC. Le titre des préparations est déterminé en particules infectieuses ou en génome encapsidé.

Le RCA (Replication Center Assay) permet de détecter le nombre de particules infectieuses par ml de solution. Il permet aussi de détecter les contaminations des stocks de rAAV en particules Rep+ et en adénovirus. Il est basé sur la mesure de réplication du vecteur en présence d'adénovirus et de Rep. Des clones de cellules HeLa, qui expriment de façon constitutive les fonctions Rep, sont infectés par le rAAV à titrer et par de l'adénovirus (Chadeuf *et al.*, 2000). Après resuspension, les cellules sont transférées sur une membrane puis sont lysées. L'hybridation avec une sonde spécifique de l'ADN encapsidé permet de détecter l'ADN amplifié lors de la réplication. La technique repose sur la réalisation de dilutions limites pour infecter les cellules HeLa à une faible MOI. On considère alors qu'un spot après hybridation correspond à un événement d'infection et matérialise une particule infectieuse.

Un dernier test peut être réalisé lorsque le vecteur code pour un gène rapporteur. La titration est alors basée sur la détermination du nombre de cellules transduites en présence d'adénovirus. Le produit d'expression du transgène *gfp* est visualisé par microscopie électronique, pour le transgène *LacZ* par la coloration du substrat X-Gal. Pour ces deux exemples, les titres sont exprimés en TU (transducing unit).

4.5.2. Production des vecteurs AAV d'autres sérotypes

➤ Les méthodes de production

La production de vecteurs AAV dérivés d'autres sérotypes que le sérotype 2 de l'AAV nécessite des méthodes de pseudotypage. Les AAV recombinants obtenus sont en fait des chimères qui possèdent les ITRs de l'AAV2 mais la capsid de leur sérotype. En terme de nomenclature, le vecteur est dénommé rAAV2/1 quand il porte les ITRs de l'AAV2 et la capsid de l'AAV1.

La technique présentée en 2002 par le groupe de Samulski est la technique qui a été utilisée pour la production des différents sérotypes de rAAV que nous avons utilisés (Rabinowitz *et al.*, 2002)(Figure 11). Les plasmides helper utilisés, dénommés pXR# (# représentant le numéro du sérotype) véhiculent le gène *cap* propre à chaque sérotype et tout ou une partie du gène *rep* de l'AAV2. Les protocoles de production font appel à une

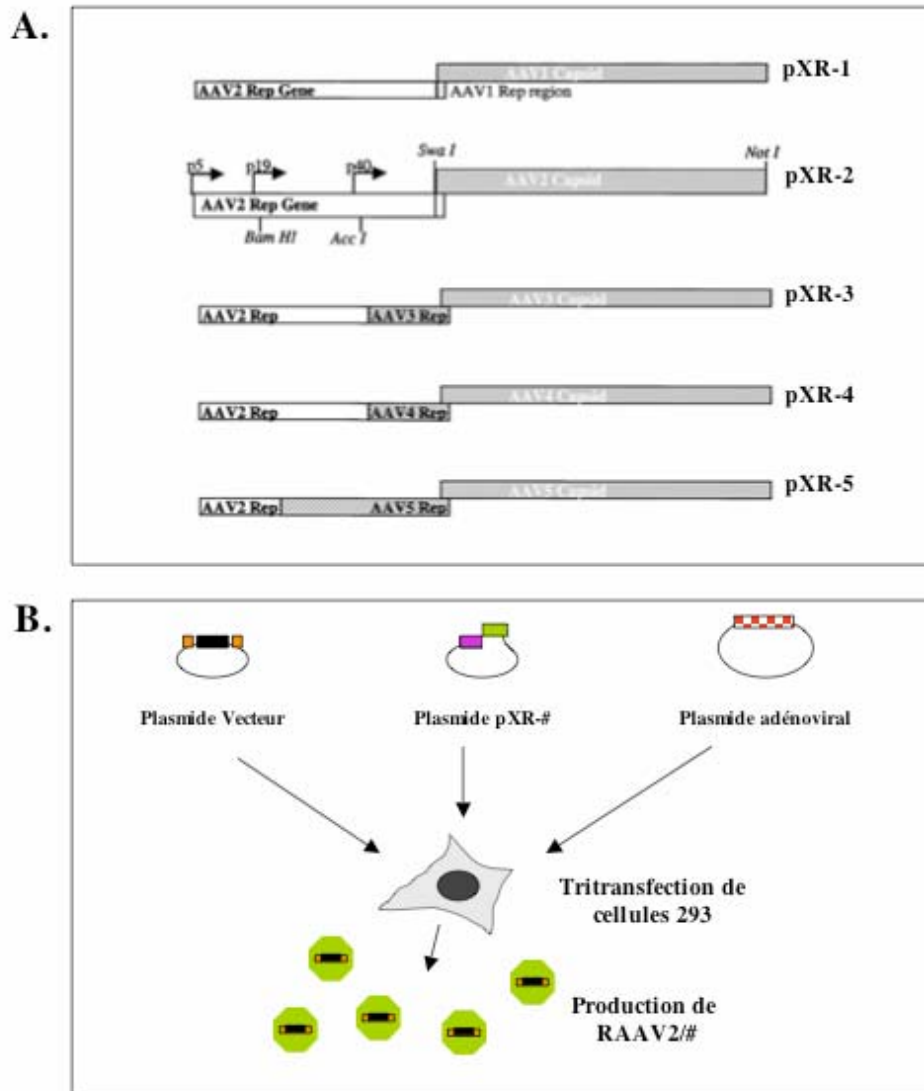


Figure 11: Production de vecteurs AAV pseudotypés de sérotypes 1 à 5. D'après Rabinowitz. J Virol.2002.

A. Représentation schématique des plasmides helper pXR-1 à 5: les séquences conservées codant pour l'extrémité N terminale des Rep sont figurées en blanc, les séquences insérées codant pour les extrémités C terminale des Rep pour chaque sérotype sont représentées en hachurées. Les séquences codant pour les protéines de capsid sont figurées en gris.

B. Méthode de production des vecteurs pseudotypés: une tritransfection des cellules 293 par trois plasmides: le plasmide vecteur qui porte la cassette d'expression choisie, le plasmide adénoviral et le plasmide pXR-# qui véhicule le gène *cap* propre à chaque sérotype et le gène *rep*.

tritransfection des cellules 293 par 3 plasmides : un plasmide vecteur contenant les ITRs de l'AAV2 et le transgène, un plasmide adénoviral dérivé de pXX6 et le plasmide helper pXR# choisi en fonction du sérotype voulu pour le rAAV (Rabinowitz *et al.*, 2002).

Cette méthode de production permet de produire des vecteurs dont les propriétés de transduction sont dues uniquement à la capsid.

➤ Les méthodes de purification

Pour les divers sérotypes (1, 4, 5 et 8), plusieurs protocoles de purification, basés les chromatographies échangeuse d'ions, ont été développés (Brument *et al.*, 2002; Kaludov *et al.*, 2002; Zolotukhin *et al.*, 2002; Davidoff *et al.*, 2004). Concernant l'AAV4 et l'AAV5, qui n'ont aucune interaction avec l'héparine, l'équipe de Chiorini a développé une méthode d'HPLC (high-performance liquid chromatography) pour purifier les rAAV de sérotype 4 et 5 (Kaludov *et al.*, 2002). De plus pour la purification des rAAV5, il a été développé une colonne riche en mucine, qui est une protéine riche en acide sialique, du fait de la propriété de ce sérotype à se lier aux résidus d'acide sialique (Auricchio *et al.*, 2001b). Dans le laboratoire de thérapie génique INSERM U649, les rAAV5 sont purifiés grâce à une méthode de FPLC (Brument *et al.*, 2002). Grâce à leur capacité à se lier avec l'héparine, les vecteurs AAV de sérotype 6 peuvent être purifiés par colonne d'affinité à l'héparine (Halbert *et al.*, 2001).

V. ÉTUDE DU TROPISME DES RAAV DE DIFFERENTS SEROTYPES DANS LA RETINE

Comme il a été évoqué dans le chapitre sur les AAV, il a été retrouvé plus de 100 isolats différents d'AAV (Atchison *et al.*, 1965; Melnick *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966; Mori *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2005) dont plus d'une dizaine ont été clonés pour le développement de vecteurs viraux pour le transfert de gènes (Gao *et al.*, 2005).

C'est surtout des vecteurs recombinants chimères, dérivés de ces différents sérotypes, qui ont été étudiés. Par vecteur chimère, on sous-entend que les ITRs de l'AAV2 sont conservés et flanquent la cassette d'expression choisie mais que ce génome est encapsidé dans la capsid virale du sérotype d'AAV sélectionné. Pour quelques-uns de ces sérotypes d'AAV, l'efficacité de transduction de la rétine ainsi que le tropisme cellulaire, c'est-à-dire l'étude des différents types cellulaires transduits, ont été évalués. En effet, comme pour les différents

sérotypes de virus sauvages, chaque sérotype de vecteur recombinant n'a pas la même efficacité pour transduire différents types cellulaires. Ces études de tropisme ont été réalisées en utilisant un transgène dit rapporteur comme le gène *gfp* (green fluorescent protein) ou le gène *LacZ*. Les vecteurs recombinants de sérotype 2 sont capables de fournir une expression efficace et prolongée du transgène dans de nombreux tissus et ont été utilisés pour délivrer des gènes thérapeutiques afin de corriger des déficits dans des modèles animaux d'une grande variété de maladies humaines.

Au niveau de la rétine, de multiples types cellulaires peuvent être transduits par les vecteurs dérivés du sérotype 2 de l'AAV. Les cellules ganglionnaires le sont après injection intravitréenne (Dudus *et al.*, 1999; Guy *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2001a; Folliot *et al.*, 2003). Après une injection intravitréenne d'AAV2/1, AAV2/4 et d'AAV2/5, aucune cellule de la rétine n'a été transduite. Dans la rétine de souris, après une injection sous-rétinienne, les vecteurs AAV de sérotype 2 transduisent les cellules de l'EPR, les photorécepteurs et de manière plus anecdotique les cellules bipolaires, les cellules de Müller, les cellules amacrines et les cellules horizontales (Ali *et al.*, 1996). Chez le rat, les vecteurs AAV de sérotype 2 transduisent les cellules de l'EPR, les photorécepteurs après une injection sous-rétinienne (Rabinowitz *et al.*, 2002). Chez les chiens de l'utilisation du même sérotype et de la même voie d'injection résulte une transduction efficace des cellules de l'EPR, des cônes et des bâtonnets (Bainbridge *et al.*, 2003b). Chez le primate, par contre, les cônes semblent être moins transduits par cette méthode alors qu'une transduction efficace des bâtonnets est obtenue (Bennett *et al.*, 1999).

Pour ce qui concerne les autres sérotypes : après une injection sous-rétinienne d'un rAAV2/1, les cellules de l'EPR murin sont transduites, quelques photorécepteurs ainsi que quelques cellules de Müller (Auricchio *et al.*, 2001a). Avec le sérotype 3, aucune expression du transgène n'a lieu dans la rétine de souris après une injection sous-rétinienne (Yang *et al.*, 2002) ou une expression très faible dans la rétine de rat (Rabinowitz *et al.*, 2002). Le sérotype 4 permet une transduction exclusive des cellules de l'EPR dans la rétine de rat, de chien et de primate (Weber *et al.*, 2003). Dans la rétine de souris après une injection sous-rétinienne, le vecteur AAV-2/5 permet une transduction efficace des photorécepteurs et des cellules de l'épithélium pigmentaire (Auricchio *et al.*, 2001a; Yang *et al.*, 2002). Chez la souris, le rAAV2/6 transduit uniquement les cellules de l'EPR (Yang *et al.*, 2002). Des résultats de tropisme dans la rétine avec les autres sérotypes n'ont pas été publiés.

Auricchio *et al.* ont montré que le choix de la capsid virale influençait également le délai d'apparition de l'expression du transgène après injection sous-rétinienne. Le sérotype 1 permet une expression rapide du transgène en 24 à 48 heures, en 3 jours pour le sérotype 5

dans la rétine de souris (Auricchio *et al.*, 2001a), 8 jours pour le sérotype 2 dans une rétine fœtale murine (Surace *et al.*, 2003) et en 2 semaines pour le sérotype 4 (Weber *et al.*, 2003).

Le choix de la capsid influence, également, le degré de l'expression du transgène. Une hiérarchie du taux d'expression du transgène *gfp* dans les cellules rétinienne de rat a été établie après une injection sous-rétinienne à titre égal de différents AAV chimères codant pour la GFP. L'AAV2/5 permet une transduction plus importante et plus efficace des cellules de la rétine après une injection sous-rétinienne chez le rat. Puis sont classés, selon cette étude, dans un ordre hiérarchique d'expression du transgène l'AAV2/4 puis le 2/1, puis le 2/2 et le 2/3 (Rabinowitz *et al.*, 2002).

Ces subtilités d'efficacité cellulaire de transduction ainsi que la vitesse d'apparition de l'expression du transgène en fonction du sérotype doit être prise en compte lors de la réalisation de projet de thérapie génique. L'adaptation du choix du sérotype à l'atteinte pathologique cellulaire ainsi qu'à la vitesse de progression de la maladie doit être effectuée.

VI. TRANSFERT DE GENES THERAPEUTIQUES DANS LA RETINE VIA DES VECTEURS AAV

La thérapie génique corrective a pour but d'apporter à la cellule déficiente le gène, qui suite à une mutation quelconque, entraîne l'apparition d'une maladie, d'une insuffisance cellulaire. L'apport de ce gène et du promoteur, qui contrôle l'expression de ce gène permet d'obtenir, dans la cellule ciblée, l'expression de la protéine qui faisait jusqu'alors défaut. Ce mode thérapeutique est utilisé pour les dégénérescences rétinienne récessives où les photorécepteurs ou les cellules de l'EPR deviennent les cellules cibles. De multiples modèles animaux, soit naturels ou soit transgéniques, existent pour les dystrophies rétinienne. Dans ce chapitre, nous aborderons le traitement par thérapie génique de différentes pathologies rétinienne.

6.1. Thérapie génique corrective de dystrophies rétiniennes héréditaires autosomiques récessives

6.1.1. Remplacement de gènes de structure des photorécepteurs

➤ Le gène de la *périphérine 2*

La première thérapie génique convaincante d'un modèle animal de RP a été le traitement du modèle murin *Prph2*^{Rd2/Rd2}, également appelé *rd*s pour retinal degeneration slow. C'est un modèle de rétinite pigmentaire récessive, qui présente une mutation dans le gène de la *périphérine 2*. Cette protéine est nécessaire pour la formation des disques externes des photorécepteurs. La *périphérine 2*, qui est une glycoprotéine membranaire, forme un complexe avec la protéine ROM1, complexe qui stabilise la membrane des segments externes des disques des photorécepteurs (Bascom *et al.*, 1992b). Cette souris *Prph2*^{Rd2/Rd2} présente un défaut dans le développement des articles externes des photorécepteurs, une diminution de la rhodopsine. Ces anomalies aboutissent à la perte de photorécepteurs par apoptose. La fonction rétinienne est rapidement altérée, l'ERG devient indétectable dès l'âge de 2 mois. L'injection sous-rétinienne d'une solution virale d'AAV de sérotype 2 portant l'ADNc de *prph2* sous le contrôle du promoteur rhodopsine (AAV2/2-RHO-*prph2*) permet l'apparition de segments externes des photorécepteurs au niveau de la zone de la rétine qui a été traitée chez la souris *Prph2*^{Rd2/Rd2} âgée de 10 jours lors du traitement (Ali *et al.*, 2000). Ces néo-segments externes sont visibles sur des coupes histologiques mais également lors de la réalisation de microscopie à transmission électronique 6 semaines après l'injection sous-rétinienne de l'AAV2/2-RHO-*prph2* chez ces souris (Ali *et al.*, 2000). Le traitement par l'AAV2/2-RHO-*prph2* aboutit à la formation de segments externes dont l'ultrastructure est comparable à celles de segments externes des photorécepteurs de rétine de souris normale. Le métabolisme des photorécepteurs traités est également amélioré car un taux représentant 15% du taux normal de rhodopsine est retrouvé au niveau des cellules traitées (Schlichtenbrede *et al.*, 2004). L'amélioration du métabolisme des photorécepteurs s'accompagne d'une amélioration de la fonction rétinienne. En effet 6 semaines après le traitement, les amplitudes des ERGs au niveau des yeux traités par AAV2/2-RHO-*prph2* ont doublé comparé aux résultats obtenus chez des souris *Prph2*^{Rd2/Rd2} non-injectées (Schlichtenbrede *et al.*, 2004). La dégénérescence des photorécepteurs survient progressivement sur plus d'un an (Sanyal and Jansen, 1981). Le suivi histologique à long terme (42 semaines) a permis de mettre en évidence, que ce

traitement par l'AAV2/2-RHO-*prph2* chez les souris *Prph2*^{Rd2/Rd2} ne permettait pas un maintien de la restauration de l'ultrastructure des segments externes dans le temps (Sarra *et al.*, 2001). La dégénérescence lente des photorécepteurs se poursuit malgré le traitement. L'effet d'une surexpression de *Prph2* sur la rétine, qui pourrait expliquer le bénéfice à cours terme du traitement par AAV2/2-RHO-*prph2* chez les souris *Prph2*^{Rd2/Rd2}, a été testé. Sarra et ses collaborateurs ont réalisé l'injection sous-rétinienne de AAV2/2.RHO.*prph2* chez des souris normales. Dans la zone rétinienne injectée, ils ont retrouvé une perte de photorécepteurs liée à l'expression de *prph2* car les yeux-contrôles injectés par un AAV2/2.CMV.*gfp* ne présentaient pas de perte de photorécepteurs. Le contrôle du niveau de l'expression du transgène lors de traitement de rétinopathie pigmentaire par thérapie génique corrective sera donc une nécessité absolue avant de réaliser ces traitements en clinique. Ce contrôle de l'expression pourra être réalisé en utilisant des sérotypes particuliers de rAAV, des promoteurs différents mais également des systèmes de régulation de l'expression du transgène.

Schlichtenbrede et ses collaborateurs sont allés encore plus loin dans l'analyse de la restauration de fonction rétinienne après traitement des souris *Prph2*^{Rd2/Rd2} par injection sous rétinienne d'AAV2/2.RHO.*prph2*. Ils ont montré une amélioration des réponses visuelles au niveau du colliculus supérieur par l'enregistrement des potentiels évoqués visuels (PEV) au niveau de cette structure neuronale en rapport avec des yeux traités comparés aux réponses PEV des colliculus en rapport avec des yeux non traités (Schlichtenbrede *et al.*, 2004). L'amélioration des PEV au niveau du colliculus est surtout visible pour les stimulations de faibles intensités entre 20 et 24 cd/m² et elle représente une amélioration de 166% par rapport aux résultats trouvés au niveau des colliculus supérieurs des souris non traitées à l'intensité 24 cd/m². Cette amélioration est retrouvée 6 semaines après le traitement par injection sous-rétinienne et est en étroite relation avec l'amélioration des ERGs au niveau des yeux traités ainsi qu'avec l'augmentation du taux de rhodopsine retrouvé au niveau de ces rétines. C'étaient les premiers résultats qui montraient un effet positif d'un traitement par thérapie génique sur les réponses neuronales visuelles du cortex ; réponses qui ne dépendent pas des seules réponses fonctionnelles rétinienne mais également de la capacité des axones des cellules ganglionnaires à maintenir ou à réutiliser des connexions synaptiques normales avec le cerveau dans un modèle de dégénérescence rétinienne héréditaire.

➤ Le gène *rpgr1*

L'équipe de Li a montré qu'une protéine intervenant dans la structure des photorécepteurs semblait, à priori, reprendre strictement sa place au sein de la cellule une fois qu'elle était exprimée grâce à une thérapie génique (Pawlyk *et al.*, 2005). Chez la souris, la protéine RPGRIP1 est située au niveau du cil connecteur des photorécepteurs. Une souris déficiente *rpgr1*^{-/-} présente des anomalies au niveau du cil connecteur, ce qui induit une dégénérescence rétinienne dès le 15^{ème} jour post-natal. Cette souris est le modèle d'une ACL liée à la mutation du gène *rpgr1* qui s'exprime dans les photorécepteurs. L'expression de la protéine RPGRIP1, après une injection sous-rétinienne d'un rAAV2 codant pour le gène *rpgr1* sous le contrôle du promoteur photorécepteur-spécifique *ospine*, est retrouvée uniquement au niveau du cil connecteur chez ces souris. Cette protéine est naturellement associée à la protéine RPGR au niveau du cil connecteur. Cette particularité fonctionnelle est retrouvée dans le cadre de cette néo-protéine RPGRIP1. Bien entendu les fonctions rétiniennes de ces souris, testées par ERG, sont améliorées (Pawlyk *et al.*, 2005).

Ces différents exemples montrent, qu'au niveau des photorécepteurs, une protéine, qu'elle soit de nature enzymatique ou structurale, reprend son rôle premier, sa place « naturelle » après que cette protéine ait été produite par un transcrit provenant d'un ADNc apporté par thérapie génique.

6.1.2. Remplacement d'un gène impliqué dans la phagocytose des segments externes des photorécepteurs

La première thérapie génique corrective concernant les cellules de l'épithélium pigmentaire et notamment le remplacement d'une protéine intervenant dans le jeu complexe de phagocytose des segments externes des photorécepteurs a été réalisée dès 2001 (Vollrath *et al.*, 2001). Le rat RCS (Royal College of Surgeons) présente une délétion dans le gène *mertk* qui code pour une protéine transmembranaire de l'EPR : un récepteur tyrosine kinase qui transporte les débris des photorécepteurs à l'intérieur de l'EPR. Cette délétion induit une dégénérescence rapide des photorécepteurs rétiniens par incapacité des cellules de l'EPR à phagocyter les segments externes des photorécepteurs. L'équipe de Robin Ali a

montré une amélioration de l'électrorétinogramme suite à l'injection sous-rétinienne d'un vecteur dérivé d'un AAV2 codant pour la protéine MERTK (Smith *et al.*, 2003).

6.1.3. Remplacement d'un gène de la phototransduction visuelle

La thérapie génique corrective, la plus ancienne, réalisée à l'aide d'un vecteur rAAV au niveau des photorécepteurs a été publiée dès 1997 (Jomary *et al.*, 1997). Le modèle murin *rd* présente une dégénérescence rétinienne très rapide liée à la mutation du gène *pde-β*. Ce gène code pour la sous-unité β de la phosphodiésterase dépendante du GMPc, qui est une enzyme du cycle de transduction visuelle. L'injection intravitréenne d'un AAV2/2.OPSIN. *pde-β* a été réalisé chez des souris *rd/rd*, l'expression de la protéine PDE-β a été confirmée par RT-PCR et par immunohistochimie. La présence de la protéine PDE-β a permis de diminuer la perte des noyaux des photorécepteurs chez les souris traitées. L'amélioration, *in vivo*, des performances électrorétinographiques des souris injectées n'a pas été étudiée. Par contre, un ERG *in vitro*, qui mesure les variations de potentiels électriques au sein de la rétine après l'éclairement, a démontré que l'expression de la protéine PDE-β permettait l'apparition des courants électriques dépendant de la lumière dans les rétines isolées des souris traitées comparées aux rétines isolées de souris non-traitées (Jomary *et al.*, 1997). Il existe, également, un modèle canin de cette dégénérescence rétinienne, le chien setter *rcd1* (Aguirre *et al.*, 1999). Plusieurs équipes dont celle de R Ali ont tenté en vain de réaliser un transfert du gène *pde-β* dans ce modèle (résultats non publiés). La dégénérescence rétinienne est si rapide que le transfert de gène *pde-β* à un jeune âge ne suffit pas à arrêter cette dégénérescence ni à améliorer les capacités visuelles de ces chiens.

6.1.4. Remplacement de gènes du cycle des rétinoïdes

➤ le gène *rpe65*

La pathologie la plus ciblée et la plus étudiée, pour une thérapie génique de substitution est l'Amaurose Congénitale de Leber liée à la mutation du gène *Rpe65*. Ceci car cette pathologie possède un modèle canin spontané. Disposer d'un modèle canin en fait une maladie d'intérêt car cela permet aux chercheurs d'être dans une situation pré-clinique pour

évaluer les bénéfices et les risques d'un traitement par transfert de gène thérapeutique. En effet, effectuer des essais chez des animaux plus grands est important pour l'étude de la toxicologie du vecteur, mais également car ces animaux possèdent une immunologie se rapprochant plus de celle de l'homme. Mais encore car l'abord chirurgical, pour délivrer la solution virale, se rapproche de celle qui pourrait être utilisée chez l'homme où un abord transvitréen est utilisé pour la réalisation d'une injection sous-rétinienne. De surcroît, ce cas particulier de dystrophie rétinienne liée à une mutation du gène *rpe65* est une pathologie récessive, condition nécessaire pour un transfert de gène correctif. Deux modèles murins (la souris knockout RPE65^{-/-} et la souris *rd12*) ainsi qu'un modèle canin (le chien briard RPE65^{-/-}) existent (Narfstrom, 1999; Veske *et al.*, 1999; Pang *et al.*, 2005)

Différents sérotypes d'AAV (1, 2 et 5) et différentes cassettes d'expression codant pour le gène *rpe65* ont été testés dans ces différents modèles (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003a; Dejneka *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2004; Acland *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2006).

C'est dans le modèle canin que le bénéfice d'un traitement correctif de cette maladie génétique ophtalmologique par un rAAV a été publié en premier. Dès 2001, Acland et ses collaborateurs ont publié un article montrant la restauration de la fonction visuelle d'un chien briard RPE65^{-/-} après traitement par un vecteur AAV de sérotype 2 portant le gène *rpe65* sous le contrôle du promoteur CAG (Acland *et al.*, 2001). Cette première étude était focalisée sur la restauration de la fonction rétinienne. En effet, cette fonction testée par des ERGs est quasi non-enregistrable chez les chiens briards RPE65^{-/-} non-traités après 4 mois de vie pour les réponses scotopiques, un peu plus tard pour les réponses photopiques (Aguirre *et al.*, 1998). La maladie canine est liée à une délétion de 4 paires (AAGA) de base dans le gène *rpe65*. Cette délétion entraîne l'apparition prématurée d'un codon stop avec la production d'une protéine non fonctionnelle (Aguirre *et al.*, 1998; Veske *et al.*, 1999). L'administration du vecteur AAV2/2.CAG.*rpe65*, par voie sous-rétinienne chez des chiots âgés de 4 mois a permis de retrouver des amplitudes électrorétinographiques enregistrables. L'amplitude des ERGs photopiques et scotopiques s'est améliorée et correspond à 16% de l'amplitude des ERGs d'un chien briard normal (Acland *et al.*, 2001). Une seconde étude a retrouvé des améliorations électrorétinographiques semblables avec un vecteur qui diffère par son promoteur. L'équipe d'Acland a utilisé le promoteur CAG, qui est un couplage entre le promoteur chicken β actin et l'enhancer du CMV (Acland *et al.*, 2001), l'équipe de Narfström a utilisé un promoteur CMV seul au sein du vecteur AAV2/2.CMV.*rpe65*(Narfstrom *et al.*, 2003a). Les deux équipes ont noté que l'amélioration de la fonction visuelle ne se produit pas si l'administration du vecteur se fait par voie

intravitréenne (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003a). Dans ces 2 premières études, l'apparition post-opératoire d'une uvéite chez la plupart des chiens opérés, avait été rapportée. Après diverses analyses, il a été mis en évidence que les préparations virales, injectées chez les premiers chiens, n'étaient pas purifiées correctement. Une contamination protéique serait à l'origine de l'apparition de ces inflammations intra-oculaires (Acland *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005). Des publications récentes concernant le suivi à long terme des premiers animaux injectés et le suivi d'une cohorte d'animaux plus importante ont été publiées (Acland *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2006a). Vingt six yeux RPE65^{-/-} ont été opérés dans l'étude d'Acland, 5 yeux dans l'étude de Narfström et 32 dans l'étude de Jacobson (Jacobson *et al.*, 2006a).

Pour l'équipe d'Acland, la restauration de la fonction électrorétinographique (scotopique et photopique) chez les chiens opérés avec l'AAV2/2.CAG.*rpe65* est stable à 3 ans (Acland *et al.*, 2005) alors que l'équipe de Narfström retrouve une baisse de l'amplitude des ERGs qui survient à partir d'un an après le traitement par AAV2/2.CMV.*rpe65*. Cette diminution d'amplitudes survient progressivement pour les réponses scotopiques et pour les réponses photopiques (Narfstrom *et al.*, 2005).

L'apport du gène *rpe65* au niveau de la rétine des chiens RPE65^{-/-} permet une reprise du cycle des rétinoïdes. La présence de 11-*cis* rétinol est détectée au niveau de zones rétinienne qui ont été injectées par l'AAV2/2.CAG.*rpe65* (Acland *et al.*, 2005). La détection de ce rétinoïde permet de conclure que la protéine RPE65 joue à nouveau son rôle d'isomérase dans le cycle des rétinoïdes car dans les yeux contrôles RPE65^{-/-} non traités, il n'y a pas de détection de cette forme en 11-*cis* mais uniquement la forme en all-*trans* rétinol, ce qui prouve l'arrêt du cycle des rétinoïdes en l'absence d'injection d'AAV2/2.CAG.*rpe65* (Acland *et al.*, 2005). La diminution des dépôts lipidiques présents dans l'EPR des chiens opérés reflète également l'amélioration de ce cycle des rétinoïdes. En effet, chez les chiens RPE65^{-/-}, on retrouve des vacuoles lipidiques dans l'EPR dès l'âge de 4 mois, liées à l'accumulation lysosomale de dérivés lipidiques, associés à une désorganisation des segments externes des photorécepteurs (Wrigstad *et al.*, 1992; Aguirre *et al.*, 1998). Que ce soit avec le traitement par AAV2/2.CAG.*rpe65* ou par AAV2/2.CMV.*rpe65*, les segments externes des photorécepteurs apparaissent moins désorganisés dans les zones opérées lors d'un examen par histologie en paraffine (Acland *et al.*, 2005) ou en microscopie électronique (Narfstrom *et al.*, 2005). Dans les deux études de biosécurité réalisées par Jacobson, les analyses histologiques ont mis en évidence la présence de modifications de la structure rétinienne après les injections sous-réiniennes (Jacobson *et al.*, 2006a; Jacobson *et al.*, 2006b). L'analyse histologique, réalisée sur 15 yeux de chiens RPE65^{-/-} injectés par voie sous-réiniennes par AAV2/2.CAG.*rpe65*, met en évidence des altérations de deux origines (Jacobson *et al.*, 2006a). Certaines anomalies, comme la perforation locale de la rétine ou la

désorganisation des segments externes des photorécepteurs dans la zone de la rétine où l'aiguille, qui permet l'injection sous-rétinienne, a pénétré, semblent liées au geste opératoire (Jacobson *et al.*, 2006a). L'origine d'autres lésions, comme des fragmentations rétiniennes ou des atrophies rétiniennes, est discutée : manifestations liées à la maladie rétinienne *rpe65* ou liées au vecteur (Jacobson *et al.*, 2006a) ? L'étude récente de Jacobson chez le primate a montré que l'injection sous-rétinienne de ce vecteur chez le primate n'induisait pas l'apparition de telle anomalie (Jacobson *et al.*, 2006b). Dans cette étude, l'examen histologique réalisé une semaine après l'injection sous-rétinienne du vecteur AAV2/2.CAG.*rpe65* chez 4 primates, a retrouvé des trous rétiens avec une rétine adjacente décollée où des cellules gliales, des cellules de l'EPR et des mélanophages ont été détectés. Ce même type de lésions a été retrouvé chez les deux primates témoins injectés en sous-rétinien par une solution tampon. Dans l'étude histologique réalisée 3 mois chez 6 primates injectés en sous-rétinien par l'AAV2/2.CAG.*rpe65*, la désorganisation des couches rétiniennes dans la zone de contact avec l'aiguille a été mise en évidence sans autre complications au terme de ces trois mois. Par contre, les bulles sous-rétiniennes effectuées chez ces primates incluaient un décollement de la macula. Dans la zone fovéolaire, des remaniements de la fovéa avec plus ou moins un décollement persistant à 3 mois et la présence de pigments entre les photorécepteurs et les cellules de l'EPR est noté lors de l'examen histologique que ce soit chez les primates injectés avec le vecteur ou avec la solution témoin (Jacobson *et al.*, 2006b). Narfström, qui a utilisé un autre vecteur (AAV2/2.CMV.*rpe65*), retrouve lors de la réalisation d'une angiographie à la fluorescéine des zones d'atrophie rétinienne dans la zone opérée chez les chiens RPE65^{-/-} (Narfstrom *et al.*, 2005). Ces différentes constatations suggèrent que la zone rétinienne par laquelle l'aiguille pénètre dans l'espace sous-rétinien subit un remaniement suite à la chirurgie que ce soit chez le chien RPE65 ou chez le primate sain, que le décollement de la fovéa induit l'apparition de modifications focales histologiques chez le primate et enfin que les modifications rétiniennes apparues chez les chiens RPE65^{-/-} suite à une injection sous-rétinienne semblent être liées à la pathologie rétinienne.

L'intérêt des modèles murins de cette pathologie liée à la mutation du gène *rpe65* réside dans la possibilité d'effectuer les études préliminaires sur un grand nombre de sujets (Dejneka *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2006). La petite taille de l'animal permet de développer des tests d'appréciation de la restauration de la vision de manière plus aisée. Pang et ses collaborateurs ont mis au point une technique d'immersion dans l'eau des souris traitées, par injection sous rétiniennne AAV2/5-CAG-*rpe65*, afin de tester la restauration de la vision. Les souris traitées sont capables de retrouver une plate-forme située sur l'eau en

ambiance nocturne alors que les souris non-traitées nagent désespérément sans jamais retrouver la plate-forme (Pang *et al.*, 2004). Ce genre de tests, dont la reproductibilité est sans reproche, est irréalisable chez des animaux comme les chiens RPE65^{-/-}. Enfin, le modèle murin a permis l'étude de l'effet d'un traitement ultraprécoce par thérapie génique. Suite aux constatations réalisées par Porto *et al.* sur les yeux d'un fœtus humain RPE65^{-/-}, âgé de 33 semaines, qui présentaient déjà des altérations rétinienne (Porto *et al.*, 2002), l'équipe de Bennett a réalisé des injections sous-rétinienne, au quatorzième jour de gestation, dans l'un des deux yeux d'embryons de souris RPE65^{-/-} avec un vecteur AAV2/1.CMV.*rpe65*. Dans les yeux qui ont reçu ce traitement, la fonction, la biochimie et l'aspect histologique de la rétine ont été améliorés, mais le taux de perte de souriceaux secondaire à cette chirurgie foetale est important rendant assez aberrant qu'une telle modalité d'administration du gène soit envisagée (Dejneka *et al.*, 2004).

➤ le gène *Lrat*

LRAT est une enzyme, située dans l'épithélium pigmentaire rétinien, qui catalyse le transfert d'un groupe acyl de la phosphatidylcholine sur le all-*trans*-retinol (Golczak *et al.*, 2005). Des mutations du gène *LRAT* sont associées à des dystrophies rétinienne précoces ou des formes d'ACL (Thompson *et al.*, 2001). Un modèle murin *Lrat*^{-/-} a été produit par transgénèse, il présente des anomalies similaires à la pathologie humaine (Batten *et al.*, 2004). L'injection sous-rétinienne d'un AAV2/1-VMD2-*LRAT*, permet de retrouver rapidement une amplitude aux ERGs. La fonction enzymatique au sein de l'EPR est distinguée uniquement dans les cellules de l'EPR et permet une reprise du recyclage du retinol car de la rhodopsine (11-*cis* retinal + opspine) est augmentée après le transfert de gène (Batten *et al.*, 2005). L'utilisation du promoteur VMD2 a pour but de limiter l'expression du transgène *LRAT* aux cellules de l'EPR car la protéine codée par le gène *VMD2* est la bestrophine-1. Cette protéine est localisée au niveau de la membrane basale des cellules de l'EPR (Rosenthal *et al.*, 2006). Batten *et al.*, ont également montré que l'association de traitements était complémentaire et efficace (Batten *et al.*, 2005). En effet, l'association d'un traitement, chez les souris *Lrat*^{-/-}, comprenant une injection sous-rétinienne d'AAV2/1-VMD2-*LRAT* et d'un gavage par voie orale avec du 9-*cis* retinyl acétate (prodrogue du 9-*cis* retinol) permet d'améliorer les réponses des ERGs comparés à l'utilisation d'un traitement seul (Batten *et al.*, 2005).

6.2. Thérapie génique correctrice de dystrophies rétiniennes héréditaires récessives liées à l'X

Le traitement par thérapie génique à l'aide d'un vecteur dérivé d'un AAV a été testé dans deux atteintes rétiniennes liées à une mutation dans des gènes du chromosome X : le rétinosischisis et l'albinisme oculaire.

6.2.1. Le rétinosischisis

Le rétinosischisis est une maculopathie et une vitréorétinoopathie congénitale, secondaire à un clivage anormal de la rétine au niveau de sa couche la plus interne. Cliniquement, cette pathologie est caractérisée par une lésion maculaire bilatérale kystique associée, dans à peu près un tiers des cas, à un soulèvement bulleux de la périphérie rétinienne. Le gène *rs1* est situé en X p22.2, il code pour la protéine rétinosischisine ou RS1 dont l'absence ou la présence sous une forme mutante est responsable de la maladie chez les hommes. Une souris knockout *Rs1h-KO* reproduit les caractéristiques de la maladie notamment la négativation de l'onde b de l'ERG (Zeng *et al.*, 2004). Quand un AAV2/2.CMV.*Rs1h* est injecté en sous-rétinien chez des souris *Rs1h^{-Y}* âgées de 9 semaines, l'onde b de l'ERG redevient normale mais par contre il n'y a pas d'amélioration de la structure des photorécepteurs (Zeng *et al.*, 2004). Par contre, quand un rAAV2/5 codant pour le gène humain *Rs1* sous le contrôle du promoteur opsin, spécifique des photorécepteurs, est injecté par voie sous-rétinienne chez des souriceaux âgés de 15 jours, ce traitement permet une restauration de l'intégrité de la structure rétinienne et de la fonction rétinienne jusqu'à 1 an après la réalisation de la chirurgie (Min *et al.*, 2005).

6.2.2. L'albinisme oculaire lié à la mutation du gène *Oa1*

Il existe 2 types d'albinisme : l'albinisme oculaire et l'albinisme oculo-cutané. L'albinisme oculaire pur est lié à la mutation du gène *Oa1*. C'est une maladie liée à l'X car ce gène est situé sur le chromosome X en Xp22.3. Les patients atteints de cette pathologie ont une acuité visuelle réduite, un nystagmus, un strabisme, une photophobie marquée. Le fond d'œil apparaît comme décoloré avec une hypoplasie fovéolaire associée à une anomalie de décussation chiasmatique. Les anomalies retrouvées dans cette pathologie sont liées à une altération d'une protéine exprimée uniquement dans la peau et dans les cellules de

l'épithélium pigmentaire : un récepteur couplé à une protéine G . Un modèle murin knockout existe : la souris *Oa1*^{-/-} (Incerti *et al.*, 2000). Un AAV2/1 codant pour le gène *Oa1* sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV a été injecté en sous-rétinien chez des souris *Oa1*^{-/-} âgées de 1 mois (Surace *et al.*, 2005). Les yeux controlatéraux, servant de témoins, ont été injectés par un vecteur codant pour la GFP. Ce traitement a permis la détection de la protéine *Oa1* dans les cellules de l'EPR et dans les photorécepteurs dès 1 mois après le traitement. L'ERG, qui est altéré chez les souris *Oa1*^{-/-} non-traitées ou traitées avec le vecteur codant pour la GFP, est améliorée lors du traitement par le vecteur AAV2/1.CMV.*Oa1*. La fonction des cônes et des bâtonnets est partiellement recouverte. Au niveau histologique, une diminution des macromélanosomes, caractéristiques de la maladie, est également visible. La souris n'ayant pas de macula, on ne peut connaître l'effet de ce traitement sur l'hypoplasie fovéolaire. Mais il faut bien noter que l'absence d'amélioration de cette particularité suite à ce traitement correctif par thérapie génique serait un facteur limitant car sans fovéola, l'acuité visuelle est limitée à 1/10. Il faut donc s'attacher à essayer cette thérapeutique chez des modèles animaux d'albinisme ayant une macula. Or ce type de modèle est très rare. Seul le cas de deux primates, qui présentent un albinisme oculo-cutané lié à une mutation d'un autre gène (le gène *Tyr*), a été décrit dans la littérature (Ding *et al.*, 2000).

6.3. Thérapie génique corrective de l'atteinte rétinienne qui survient dans des maladies lysosomales générales

Certaines maladies lysosomales ont une répercussion sur l'œil et notamment sur la rétine. Deux publications font part de leurs résultats encourageants suite à un traitement correctif du déficit enzymatique par thérapie génique par voie intraoculaire (Hennig *et al.*, 2003; Griffey *et al.*, 2005). Ce mode thérapeutique permet de passer la barrière hémato-rétinienne qui peut bloquer le traitement enzymatique oral.

La mucopolysaccharidose de type VII (MPSVII) est secondaire à un déficit en une enzyme : la β -glucuronidase qui dégrade normalement des portéoglycanes. Le déficit enzymatique induit une surcharge lysosomale qui est responsable des différents signes cliniques très hétérogènes. Au niveau ophtalmologique, divers tissus oculaires comme la cornée, le corps ciliaire, la sclère ou la choroïde présentent une surcharge lysosomale. Au niveau de la rétine, une dégénérescence rétinienne survient par apoptose des

photorécepteurs accompagnée d'une surcharge lysosomale des cellules de l'EPR. Cette atteinte rétinienne est visualisable en histologie, mais est également quantifiable lors d'un ERG. Un modèle murin reproduisant les différents symptômes liés à la MPSVII est disponible (Lazarus *et al.*, 1993). L'injection intravitréenne d'un AAV2/2- β GENh-*Gusb* permet l'obtention d'un taux enzymatique suffisant à l'intérieur de l'œil pour améliorer les amplitudes des ERG chez les souris traitées ainsi que diminuer la surcharge lysosomale de l'EPR (Hennig *et al.*, 2003).

Le même mode d'injection d'un rAAV2 permet l'expression en quantité satisfaisante de l'enzyme PPT1 (palmitoyl protein thioesterase-1) dans le modèle murin de la maladie de Batten (Griffey *et al.*, 2005). Dans cette maladie neurodégénérative liée à l'accumulation de fer dans le cerveau, une dégénérescence rétinienne survient progressivement dans les premières années de vie (Birch, 1999).

Un AAV de sérotype 2, injecté en intravitréen dans l'œil, transduit les cellules ganglionnaires voire quelques cellules de la couche nucléaire interne. Dans les deux atteintes rétiniennes présentées ci-dessus, il semble que l'expression de l'enzyme déficiente à une distance moindre de la couche des photorécepteurs et des cellules de l'EPR suffise à effacer les différentes manifestations rétiniennes de la maladie.

6.4. Interruption de l'expression d'allèles dominants dans les dystrophies rétiniennes

Les thérapies géniques correctives ne sont pas le traitement approprié pour les formes autosomiques dominantes des dystrophies rétiniennes où la pathologie est liée à un gain de fonction d'une seule copie d'un gène. L'apport d'une ou plusieurs copies du gène non-muté ne pourra contrecarrer ce gain de fonction. L'approche thérapeutique pour de telles pathologies doit être différente, il faut supprimer l'expression du gène muté ou anormal soit par un système de ribozyme, soit par un système de siRNA. Les ribozymes ou ARN catalytiques suppriment les transcrits en clivant les ARNm cibles, après appariement, grâce à une activité hydrolase (Haseloff and Gerlach, 1988). Deux types de ribozymes (en tête d'épingle et en marteau) ont été utilisés dans le traitement d'une dystrophie rétinienne dominante (Lewin *et al.*, 1998; LaVail *et al.*, 2000). Le modèle transgénique de rats P23H est un modèle de dystrophie rétinienne dominante suite à une substitution de l'histidine par la proline dans le codon 23 du gène de la *rhodospine*, substitution qui est retrouvée chez 10%

des patients ayant une RP dominante (Dryja *et al.*, 1990b). Deux rAAV2/2 codant pour les ribozymes (Hp11 ou Hh13), injectés en sous-rétinien, permettent un ralentissement de la dégénérescence rétinienne dans ce modèle chez le rat plus de 225 jours après la chirurgie (LaVail *et al.*, 2000). Même lors d'une injection du vecteur plus tardive, à 45 jours post-natal au lieu de 15 jours, la même protection est quasi retrouvée (LaVail *et al.*, 2000). L'effet bénéfique de ces ribozymes sur la vitesse de dégénérescence rétinienne est lié au clivage spécifique de l'ARNm mutant de la rhodopsine. Par contre, que ce soit avec un ribozyme en tête d'épingle ou en forme de marteau, l'appariement et la reconnaissance de l'ARNm cible se fait à une base près. Or, plus de 100 mutations différentes de gène de la *rhodopsine* ont été rapportées, ce qui signifie que pour chaque mutation un ribozyme particulier devra être produit. Pour faciliter le traitement par les ribozymes des dystrophies liées à une mutation du gène *rhodopsine*, un ribozyme universel Rz 397 dirigé contre l'ARNm de la rhodopsine a été développé. Ce ribozyme Rz 397 codé par un AAV2 a été testé dans la rétine de souris RHO+/- où il permet une diminution de 80% de production de la protéine rhodopsine (Gorbatyuk *et al.*, 2005). Pour le moment, l'efficacité de ce ribozyme Rz 397 n'a pas été testé dans des modèles animaux de RP dominantes.

Les siRNA (small interfering RNA), double brin d'une vingtaine de paires de bases, clivent l'ARNm par un mécanisme différent de celui des ribozymes. Ces siRNA s'assemblent à des enzymes pour former le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Ce complexe, après avoir dissocié les doubles brins des siRNA, dirige l'appariement du siRNA-ARNm cible, phénomène qui induit le clivage de l'ARNm cible en plusieurs morceaux (Novina and Sharp, 2004). Les siRNA ont été testés sur rétine de souris normale où un siRNA dirigé contre le transcrite murin de la rhodopsine permet de diminuer de 90% ce transcrite dans des rétines en culture (Kiang *et al.*, 2005). La prochaine étape sera le test de ces siRNA en les dirigeant contre le transcrite d'un gène responsable d'une dystrophie rétinienne héréditaire autosomique.

6.5. Expression de facteurs de survie pour le traitement de dystrophies rétinienne

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur le mécanisme de dégénérescence des photorécepteurs dans les dystrophies rétinienne, les processus qui conduisent à cette mort cellulaire dans le cas d'atteintes héréditaires ne sont pas encore totalement élucidés. Il est

donc difficile d'organiser un traitement dirigé contre un mécanisme de mort cellulaire particulier. Plusieurs facteurs neurotrophiques (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor ; FGF-2, fibroblast growth factor ; BDNF, brain-derived neurotrophic factor ; CNTF, ciliary neurotrophic factor) ont été identifiés comme susceptibles d'induire la survie des photorécepteurs dans une variété de modèles animaux de dégénérescence rétinienne (Frasson *et al.*, 1999a; Lau *et al.*, 2000; McGee Sanftner *et al.*, 2001a). Plusieurs de ces facteurs de survie ont été testés pour un transfert de gènes.

6.5.1. Le CNTF (ciliary neurotrophic factor)

Le CNTF est exprimé par la rétine en voie de développement et la rétine adulte chez le rat de façon prédominante au niveau des cellules de Müller (Kirsch *et al.*, 1997). Cette protéine CNTF possède un récepteur spécifique, la sous-unité α du complexe récepteur au CNTF, localisée au niveau des cellules de Müller, des cellules horizontales, des cellules amacriques et des cellules ganglionnaires. Ce récepteur n'a pas été retrouvé au niveau des photorécepteurs (Wahlin *et al.*, 2000). Une seule injection de la protéine recombinante de CNTF dans le vitré permet dans une grande variété de modèles murins de dégénérescence rétinienne de prolonger, à court terme (7 à 10 jours), la survie des photorécepteurs (LaVail *et al.*, 1998). Le CNTF a une demi-vie très courte (1,5 minute), ce qui nécessite la recherche de dispositifs qui permettent de libérer de façon prolongée ce facteur neurotrophique (Dittrich *et al.*, 1994). Le transfert de gène peut être un de ces dispositifs. Dès 1997, ce facteur de survie, délivré à l'aide de vecteurs adénoviraux, a montré sa capacité à retarder la perte des photorécepteurs dans des modèles murins de RP (Cayouette and Gravel, 1997). Après une injection intravitréenne d'un vecteur rAAV codant pour le CNTF, Liang *et al.* ont montré une préservation des photorécepteurs 9 mois après le traitement de souris *Prph2*^{Rd2/Rd2} et 8 mois après le traitement de deux modèles de dégénérescence rétinienne dominante chez des rats transgéniques porteurs d'une mutation dans le gène de la rhodopsine (rat P23H et rat S334ter). Cette préservation de la dégénérescence rétinienne par le CNTF a été jugée sur deux données objectives : l'épaisseur de la couche nucléaire externe et le nombre de rangées de noyaux présents dans cette couche cellulaire. Ces deux données sont significativement plus importantes dans les yeux injectés par un rAAV-*cntf-gfp* chez le modèle murin *Prph2*^{Rd2/Rd2} et chez les deux modèles de rats P23H et S334ter comparés aux yeux contrôles injectés par le rAAV codant uniquement pour la GFP (Liang *et al.*, 2001a). Malgré l'amélioration structurelle de la rétine suite à l'injection de rAAV-*cntf-gfp*, des effets secondaires à l'administration du CNTF semblent exister. En effet, la même équipe a retrouvé des différences d'amplitude de l'électrorétinogramme (ERG) entre les yeux injectés

par rAAV-*cntf-gfp* comparés aux yeux contrôle chez les souris et chez les rats avec une différence en défaveur du vecteur codant pour le CNTF. Cette atteinte de la fonction rétinienne a également été retrouvée par d'autres équipes dans la souris *Prph2*^{Rd2/Rd2} et dans la souris *rds*^{+/-P216L} qui présente une mutation dominante dans le gène *Prph2*. Cette anomalie est marquée par la décroissance paradoxale de l'amplitude de l'onde a et b au niveau de l'ERG scotopique et de l'amplitude de l'onde b dans l'ERG photopique malgré la préservation morphologique chez la souris *rds*^{+/-P216L} après injection sous rétinienne de rAAV.CMV.*cntf* ou rAAV.CβA.*cntf* (Bok *et al.*, 2002). Schlichtenbrede et ses collaborateurs ont mis en évidence cette altération de l'amplitude de l'ERG uniquement pour l'onde b chez la souris *Prph2*^{Rd2/Rd2} traitée par rAAV.CMV.*cntf*. Ils ont également montré que l'injection de ce même vecteur chez une souris sauvage "normale" entraînait de la même façon une réduction de l'amplitude de l'onde b de l'ERG (Schlichtenbrede *et al.*, 2003). Dernièrement, Buch *et al.* ont montré que cette altération de l'ERG était dépendante de la dose de CNTF délivrée (Buch *et al.*, 2006). Par contre à la dose non toxique, l'AAV.CMV.*cntf* ne permettait pas de préserver les photorécepteurs de la dégénérescence dans le modèle murin *Prph2*^{Rd2/Rd2} (Buch *et al.*, 2006). Quelques hypothèses concernant cet effet secondaire toxique ont été faites. Les souris ont, peut être, une sensibilité particulière au CNTF car chez le lapin, après traitement par le CNTF à dose efficace contre la dégénérescence, il n'y a pas de différences dans l'amplitude des ERG de contrôle (Bush *et al.*, 2004). Walkin *et al.* ont une explication physiologique. Ce sont les neurones internes de la rétine et les cellules de Müller qui sont à l'origine de l'onde b de l'ERG. Walhin *et al.* ont montré qu'après l'injection intraoculaire de CNTF recombinant, un message d'activation parvenait aux cellules de Müller, aux cellules amacrines et aux cellules ganglionnaires mais pas aux photorécepteurs (Wahlin *et al.*, 2000). Ce message d'activation suite à l'injection de CNTF est retrouvé dans les rétines normales ou dégénératives (Wahlin *et al.*, 2001). C'est peut-être l'absence de ce message d'activation au niveau des photorécepteurs qui est à l'origine de leur préservation et sa présence au niveau des cellules ganglionnaires et amacrines qui est à l'origine de l'effet sur l'onde b de l'ERG. Il est également rapporté un second effet lié à l'injection de CNTF. En effet, suite à l'administration sous rétinienne d'AAV codant pour le CNTF chez la souris transgénique *rds*^{+/-P216L}, il se produit un changement morphologique au niveau du noyau des bâtonnets, avec un accroissement de taille du noyau et une augmentation de l'euchromatine, signes qui traduisent habituellement un changement dans l'expression génique d'une cellule (Bok *et al.*, 2002). Ces modifications nucléaires survenant au niveau des bâtonnets sont dose-dépendantes du CNTF. Les liens entre les changements de configuration du noyau des photorécepteurs, le chemin d'activation des cellules de la couche interne de la rétine et de la diminution de l'amplitude de l'ERG suite à l'administration du CNTF ne sont pas encore connus. Le rôle du CNTF et son mécanisme d'action ne sont pas

encore complètement élucidés. Peut-être une fenêtre thérapeutique serait-elle nécessaire pour ne pas voir apparaître d'effets délétères au niveau de la rétine? Cette fenêtre pourrait être réalisée en utilisant des promoteurs régulables comme le système tétracycline. Les résultats de l'étude de phase II concernant des dispositifs intravitréens diffusant du CNTF dans le vitré de patients atteints de RP devrait nous donner des conclusions quant à la préservation des fonctions visuelles par ce traitement (Sieving *et al.*, 2006).

6.5.2. Le GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor)

Le GDNF a un effet neuroprotecteur contre la dégénérescence des cellules rétinienne dans le glaucome et dans les dystrophies rétiniennes (Martin *et al.*, 2003; Buch *et al.*, 2006) mais aussi dans le cerveau où il protège les cellules de l'ischémie (Miyazaki *et al.*, 1999). Ce facteur retarderait l'induction de l'apoptose dans des cellules rétiniennes mises en culture (Politi *et al.*, 2001). Le mécanisme d'action du GDNF n'est pas entièrement connu. Dans le tissu nerveux, il a été montré que le GDNF, agirait comme antiapoptotique, en activant la voie MAP kinase (Mitogen-activated protein kinase) et du phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (Ho *et al.*, 2000; Sawada *et al.*, 2000; Nicole *et al.*, 2001). L'injection intraoculaire d'un vecteur AAV2 codant pour le GDNF chez le rat RCS a permis un accroissement des amplitudes des ERG uniquement à court terme car 8 semaines après le traitement, il n'y a plus de différences significatives entre les yeux traités par le GDNF et les yeux contrôle. Par contre si dans le même temps, le traitement par l'AAV2.C β A-*gdnf* est combiné à un traitement correctif qui apporte la protéine MERTK déficiente, il est retrouvé une préservation de la fonction rétinienne. Celle-ci est quantifiée à environ 10 fois plus de réponses ERG dans les yeux traités par cette combinaison comparés aux les yeux n'ayant pas reçu de traitement (Buch *et al.*, 2006). Dans le modèle murin, cette combinaison potentialise, également, le bénéfice du traitement correctif par la périphérine (Buch *et al.*, 2006). Par contre il semble que ce traitement par AAV2.C β A-*gdnf* ne peut être utilisé seul si la dégénérescence rétinienne est liée à une anomalie dans un gène responsable de structure cellulaire (Buch *et al.*, 2006).

6.5.3. L'érythropoïétine (EPO)

De façon assez surprenante, l'érythropoïétine a été décrite comme facteur de survie dans un modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière (Grimm *et al.*, 2002). L'EPO, produit par le rein à l'âge adulte, est une cytokine dont le rôle est d'être un facteur de croissance naturel lors de la fabrication de globules rouges. La présence de récepteurs de l'EPO à la surface des photorécepteurs chez les rongeurs a laissé suggérer un rôle de ce facteur sur la rétine (Grimm *et al.*, 2002; Gassmann *et al.*, 2003). L'expression de l'EPO, suite à une injection intraoculaire d'un vecteur AAV codant pour cette cytokine, n'a pas eu d'effet protecteur sur la dégénérescence des photorécepteurs dans le modèle murin *rd5* (*Prph2*^{Rd2/Rd2}) ou dans le modèle *rd10* lié à une mutation du gène *pde6β* ni même dans un modèle de dégénérescence induit par la lumière chez le rat (Rex *et al.*, 2004). Par contre, de façon inattendue, le même vecteur AAV2-CMV-*Epo* injecté dans le muscle a permis de préserver les photorécepteurs dans le modèle *rd5* et dans le modèle induit par la lumière mais pas dans le modèle *rd10* (Rex *et al.*, 2004). Cette équipe n'a pas trouvé de différences dans le poids moléculaire de l'EPO produite par le vecteur et l'EPO commerciale. Mais l'étude des isoformes de l'EPO après transfert du gène *Epo* dans le muscle ou dans les photorécepteurs ou dans les cellules de l'épithélium pigmentaire montre que chacune de ces formes d'EPO produites diffère selon le type de cellules par laquelle elle a été produite (Stieger *et al.*, 2006). On peut donc penser que les récepteurs rétiens à l'EPO ne sont pas sensibles à l'isoforme d'EPO produit dans l'œil.

Une seconde conclusion peut être déduite de cette étude (Rex *et al.*, 2004). Il semble que l'EPO n'agit pas aussi efficacement sur les différents modèles animaux de dégénérescence rétinienne. Or il semblerait que les voies signalétiques pour aboutir à l'apoptose soient diverses dans le cadre de dégénérescence rétinienne et notamment en fonction de la mutation à l'origine de la pathologie (Hao *et al.*, 2002). L'EPO agirait en bloquant la voie AP-1 de l'apoptose (Grimm *et al.*, 2002). Par conséquent l'EPO ne pourrait agir que dans les modèles de dégénérescences rétiniennes héréditaires qui présentent une surstimulation de cette voie de signalisation.

6.6. Expression de facteurs antiangiogéniques pour le traitement de pathologies rétiniennes néovasculaires

Les pathologies néovasculaires de la rétine comprenant la rétinopathie diabétique, la dégénérescence liée à l'âge (DMLA) et la rétinopathie du prématuré sont des causes importantes de cécité dans le monde développé (Bressler and Bressler, 1995; Rahmani *et*

al., 1996; Steinkuller *et al.*, 1999). La DMLA est la première cause de malvoyance chez les personnes âgées de plus de 50 ans. La prévalence de la DMLA en Europe est estimée à 1% avant 70 ans et à 12% après 70 ans (Augood *et al.*, 2004). Le diabète est une des cinq principales causes de cécité en Europe. La prévalence est de 2% à 2,5% de la population française, 90% des patients ayant un diabète de type 2.

6.6.1. Traitements existants dont les antiVEGF

Les traitements conventionnels de ces pathologies comprennent la chirurgie, le laser, la cryothérapie et depuis un peu plus de 5 ans, la photothérapie dynamique pour la DMLA. Malheureusement, la photothérapie dynamique ne suffit pas, à elle seule, à maintenir l'acuité visuelle chez la plupart des patients présentant la forme exsudative de DMLA ; seule forme pouvant être traitée. C'est pourquoi de nouvelles stratégies de traitement sont en évaluation. Ces nouvelles stratégies impliquent notamment l'emploi de médicaments bloquant le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Cette stratégie anti-VEGF a été développée car ce facteur de croissance a été retrouvé dans des cellules de l'épithélium pigmentaire au niveau de membranes néo-vasculaires excisées provenant d'yeux atteints de DMLA (Lopez *et al.*, 1996) ainsi que dans le vitré de patients souffrant de rétinopathie diabétique proliférante (Aiello *et al.*, 1994). Le VEGF est un puissant facteur angiogénique. Il agit sur les cellules endothéliales via deux récepteurs spécifiques : Flt1 (fms-like tyrosine kinase) ou VEGFR1 (de Vries *et al.*, 1992) et Flk/KDR (fetal liver kinase) ou VEGFR2, qui sont des récepteurs tyrosine kinase de haute affinité présents sur les cellules endothéliales (Mustonen and Alitalo, 1995). Flt-1 présente une affinité 10 fois plus forte avec le VEGF que Flk/KDR. Une forme soluble de Flt-1 existe : sFlt-1. Elle a été découverte dans les cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) (Kendall and Thomas, 1993). Le rôle des deux récepteurs est différent. Le récepteur Flk/KDR est essentiel pour la prolifération des cellules endothéliales, pour leurs migrations ainsi que pour la survie de ces cellules, également pour la vasoperméabilité des vaisseaux (Brekken *et al.*, 2000). Alors que le récepteur Flt1 est nécessaire pour l'organisation du réseau vasculaire ainsi que pour son remodelage (Fong *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1995). Ces phénomènes sont à la base de la néovascularisation qui est un processus de prolifération vasculaire anormal, présent dans des pathologies oculaires comme la DMLA ou la rétinopathie diabétique proliférante. Des médicaments bloquant le VEGF viennent d'avoir ou sont sur le point d'obtenir leur AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) en ophtalmologie ou bien l'ont déjà dans d'autres domaines d'application. Ces médicaments sont le Macugen® qui est un aptamère anti-VEGF, ou le Rhufab V2

(Lucentis®) qui est un anticorps soluble du VEGF ou encore l'Avastin® qui est également un anticorps soluble du VEGF qui n'a pour le moment qu'une AMM en cancérologie. Les médicaments comme le Macugen® ou le Rhufab V2 ou l'Avastin® semblent permettre une diminution de la taille des membranes néovasculaires dans la DMLA, mais ils nécessitent l'injection intravitréenne fréquente du produit antiangiogénique. L'injection itérative du produit peut être à l'origine de complications (détachement de rétine, infections) ou de difficultés (déplacement des patients, blocs opératoires surchargés). C'est pourquoi une approche par transfert de gènes, qui permettrait une injection unique, est à l'étude. Un inhibiteur naturel spécifique du VEGF existe. C'est le récepteur soluble du VEGF : sFlt-1. Ce récepteur soluble a montré un potentiel d'inhibition des effets du VEGF sur des cellules endothéliales (Kendall and Thomas, 1993). Plusieurs équipes ont travaillé avec un vecteur adénoviral exprimant cet sFlt-1 (Honda *et al.*, 2000; Rota *et al.*, 2004) et d'autres avec un vecteur rAAV (Bainbridge *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002b; Lai *et al.*, 2005).

6.6.2. Thérapie génique antiVEGF

Afin de tester, ces facteurs antiangiogéniques, délivrés par des rAAV, deux modèles de néovascularisation (rétinienne et choroïdienne) ont été mis au point chez la souris. Le premier est créé par un modèle de rétinopathie ischémique en exposant des souriceaux âgés de 7 jours (p7) à des hauts taux d'oxygène 75% durant 5 jours puis en les remettant ensuite à vivre à un taux normal d'oxygène 21%. Il se développe alors une néovascularisation rétinienne dépendante de la sécrétion du VEGF chez tous les animaux. Le second modèle est créé par la réalisation d'un laser rétinien avec une forte intensité permettant de rompre la membrane de Bruch. Cette rupture est à l'origine de l'apparition d'une plaque néovasculaire choroïdienne dans la zone lasérisée. Bainbridge *et al.* ont testé un vecteur dérivé de l'AAV de sérotype 2 dans le premier modèle de néovascularisation rétinienne. Sept jours après le retour des souriceaux en élevage à un taux d'oxygène normal, ils ont été injectés en intravitréen soit par un vecteur contrôle : l'AAV.CMV.*gfp* soit par un AAV.CMV.*sFlt-1*. L'analyse quantitative par comptage des noyaux des cellules endothéliales dans les zones néo-vascularisées a été choisie comme méthode de suivi de l'effet des traitements sur la néo-vascularisation. Le comptage par cette méthode a retrouvé une diminution significative de la néovascularisation dans les yeux injectés par le gène codant pour sFlt-1 avec une moyenne de 23,3 noyaux par zone comparée à celle des yeux injectés par le gène codant pour la GFP où la moyenne est de 52.1 noyaux par zone. L'analyse histologique des rétines retrouvait une rétine normale après transfert de gènes (Bainbridge *et al.*, 2002). Ce même vecteur, dans le modèle murin laser-induit, permet une diminution de la

néovascularisation choroïdienne dans les yeux injectés par l'AAV.CMV.sFlt-1 (Lai *et al.*, 2002b). Chez les souris transgéniques (trVEGF029), qui présentent une rétinopathie néovasculaire associée à une dégénérescence des photorécepteurs à la suite d'une surexpression du gène VEGF, le traitement par l'AAV2.CMV.Flt1 a permis, une regression des néovaisseaux dans 85% des yeux injectés jusqu'à 8 mois après le traitement (Lai *et al.*, 2005). Ce vecteur est également capable de prévenir, à long terme, l'apparition d'une néovascularisation chorio-rétinienne post-laser chez le primate (Lai *et al.*, 2005). L'expression du VEGF est augmentée par l'hypoxie *in vitro* (Shweiki *et al.*1992) et *in vivo* (Shima *et al.*1996). Le promoteur régulable HRE(Hypoxia-Responsive Element) permet une expression du transgène lors de l'hypoxie (Bainbridge *et al.*, 2003a). En mettant le transgène de ce facteur antiangiogénique Flt1 sous le contrôle du promoteur HRE, on peut penser que le traitement par thérapie génique sera le plus proche possible de la physiologie. D'autant plus qu'une administration en continu d'un produit comme un produit anti-angiogénique n'est pas concevable car le VEGF à d'autres fonctions. Il permet le maintien de fonctions basales pour la rétine mature et il est un facteur de survie pour les cellules endothéliales (Alon *et al.*, 1995).

D'autres molécules antiangiogéniques existent. Des peptides venant de l'exon 6 et de l'exon 7 du VEGF ont montré des propriétés anti-angiogéniques *in vitro* (Soker *et al.*, 1997; Jia *et al.*, 2001). Vingt acides aminés, dérivés de l'exon 6, ont été identifiés comme étant à l'origine de ce phénomène antiangiogénique. Ces acides aminés réalisent un blocage de l'interaction du VEGF avec le récepteur KDR et son corécepteur Npn1 (Jia *et al.*, 2001). Le peptide dérivé de l'exon 7 de VEGF a montré une inhibition de la prolifération de cellules endothéliales en bloquant l'interaction du VEGF avec le corécepteur Npn1 (Soker *et al.*, 1997). De cette découverte, Deng *et al.* ont développé un AAV2 codant pour ces deux peptides sous le contrôle du promoteur C β A (Chicken β Actin) avec une stabilisation des ARNm par WPRE (Deng *et al.*, 2005). L'AAV2 qui code pour les 20 aa dérivés de l'exon 6 du VEGF est appelé AAV2-C β A-VEGF6, celui dérivé de l'exon 7 du VEGF AAV2-C β A-VEGF6. L'expression de chacun de ces peptides, suite à une injection intravitréenne d'AAV2-C β A-*vegf6* ou d'AAV2-C β A-*vegf7*, permet une inhibition de 71 à 83 % de l'apparition d'une néovascularisation rétinienne dans un modèle murin de rétinopathie oxygène-induite, ceci quinze jours après le traitement lorsque l'injection est réalisée chez ces souris à l'âge de 2 jours (Deng *et al.*, 2005).

6.6.3. Le PDEF (Pigment Epithelium-Derived Factor)

Le PDEF (Pigment Epithelium-Derived Factor) est aussi un facteur inhibiteur de l'angiogenèse (Dawson *et al.* 1999). Il a été montré que ce puissant facteur anti-angiogénique permettait de réduire le développement de la néovascularisation choroïdienne quand l'administration de ce facteur était faite avant le début de la stimulation angiogénique. Une injection intravitréenne ou sous rétinienne de AAV.CAG.PEDF est réalisée 4 à 6 semaines avant l'exécution d'un laser rétinien chez une souris. Elle permet de réduire de façon significative la taille des zones néovascularisées qui apparaissent dans ce modèle murin secondairement à la rupture de la membrane de Bruch par le laser (Mori *et al.* 2002). Un AAV2.CMV.PEDF injecté en sous-rétinien, chez des souris modèle de rétinopathie du prématuré, permet de diminuer la néovascularisation rétinienne (Auricchio *et al.*, 2002a).

VII. TRANSFERT DE GENES DONT L'EXPRESSION EST REGULABLE VIA DES VECTEURS AAV

Dans le chapitre précédent, nous avons abordé les traitements par thérapie génique de complémentation. La délivrance par thérapie génique de facteurs neurotrophiques ou antiangiogéniques a montré son effet bénéfique pour le traitement, respectivement, des dystrophies rétiniennes héréditaires (Liang *et al.*, 2001a; Schlichtenbrede *et al.*, 2003) et des pathologies rétiniennes néovasculaires (Bainbridge *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002b). La régulation, à long terme, de l'expression de telles protéines, qui sont généralement solubles, est essentielle pour la sécurité future d'applications cliniques. De plus, on peut penser que certaines molécules neurotrophiques ou antiangiogéniques possèdent une fenêtre thérapeutique, au dessous de laquelle ces produits sont inactifs et au dessus de laquelle une toxicité rétinienne pourrait être observée. En effet dans trois modèles animaux de dégénérescences rétiniennes, trois études récentes ont démontré que l'expression intraoculaire de CNTF suite à un transfert du gène *cntf* par un rAAV2/2 était responsable d'une diminution significative de l'amplitude des ERGs (Bok *et al.*, 2002; Schlichtenbrede *et al.*, 2003; Buch *et al.*, 2006). La nécessité de pouvoir, si besoin, arrêter la sécrétion d'une protéine soluble, l'existence possible d'une fenêtre thérapeutique, la possibilité d'avoir à faire varier le niveau de l'expression du transgène en fonction de l'histoire naturelle de la maladie sont autant d'éléments en faveur d'un développement de systèmes de régulation de l'expression du transgène pour certaines thérapies oculaires.

Plusieurs systèmes de régulation du transgène existent, ils ont tous un fonctionnement de base identique : ils associent une protéine transactivatrice dont l'action stimulatrice sur la transcription dépend d'un inducteur, et des sites de fixation, pour cette protéine, placés en amont d'un promoteur. Différents systèmes d'induction ont été utilisés avec succès *in vivo* : la rapamycine (Rivera *et al.*, 1996), le mifepristone (Serguera *et al.*, 1999), l'ecdysone (No *et al.*, 1996), la tétracycline (Gossen and Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995). Dans l'œil avec un vecteur rAAV, seuls deux systèmes ont été testés : le système rapamycine et le système tétracycline.

7.1. Le système Rapamycine

Le système rapamycine est basé sur l'hétérodimérisation de deux protéines chimériques (Rivera *et al.*, 1996)(Figure 12). L'une est constituée du domaine de liaison à l'ADN de la protéine non eucaryote ZFHD-1 associé à la protéine FKBP et l'autre de la protéine FRAP associée au domaine de transactivation p65 du facteur nucléaire NF κ B. L'hétérodimérisation de ces deux protéines chimères, rend fonctionnel le facteur de transcription et permet l'expression du gène cible de façon dépendante de la présence de la rapamycine ou d'un analogue non immunosuppresseur. Pour contrôler l'expression d'un gène par ce système, il suffit de placer avant l'ensemble promoteur-transgène des sites de fixation à l'ADN de ZFHD-1. La rapamycine est un médicament immunosuppresseur. Afin de réduire les effets secondaires liés à la rapamycine lors de l'utilisation de ce système de régulation lors d'essais futurs, des analogues de la rapamycine non-immunosuppresseurs (rapalogs) ont été développés et la sécurité de ces traitements a été testée chez l'homme (Iulucci *et al.*, 2001). Après avoir testé avec succès dans le muscle (Rivera *et al.*, 1999) et dans le foie (Auricchio *et al.*, 2002b) un rAAV ayant incorporé ce système de régulation, l'équipe de Wilson a testé ce système dans la rétine de rats et de primates (Auricchio *et al.*, 2002c; Lebherz *et al.*, 2005). Le gène de l'érythropoïétine a été utilisé comme gène rapporteur car suite au transfert de gène, érythropoïétine (EPO) exprimée diffuse à l'intérieur de l'œil ; ce qui permet le dosage de l'EPO dans l'humeur aqueuse suite à une ponction de chambre antérieure par un kit commercial Elisa. Un mélange de 2 vecteurs (AAV-2/2-CMV-*TF1Nc* et AAV-2/2-Z12I-*rhEpo2S6*) a été injecté par voie sous rétinienne ou par voie intravitréenne chez des rats nude ou chez des primates. Chez le rat, il n'y a pas de différence entre les 2 voies d'administration, le pic d'expression d'EPO apparaît rapidement 3 jours après l'injection de la rapamycine et revient au niveau basal en 21 jours. Chez le

primate, le pic d'expression d'EPO est plus tardif et apparaît entre 7 et 14 jours suivant l'induction. Le niveau basal d'expression n'est atteint qu'en plusieurs semaines. À la différence du rat chez le primate, le pic d'expression d'EPO est environ 6 fois moins important après une injection intravitréenne qu'après une injection sous rétinienne. Un analogue de la rapamycine (AP22594) a été testé chez le primate, mais il semble induire une expression plus faible d'EPO. Il faut noter que, chez le primate, une perte de poids est associée à l'administration de rapamycine à la dose de 2 mg/Kg, ce qui est la dose habituelle. Cet effet peut être gênant pour l'utilisation future de ce système dans des essais cliniques.

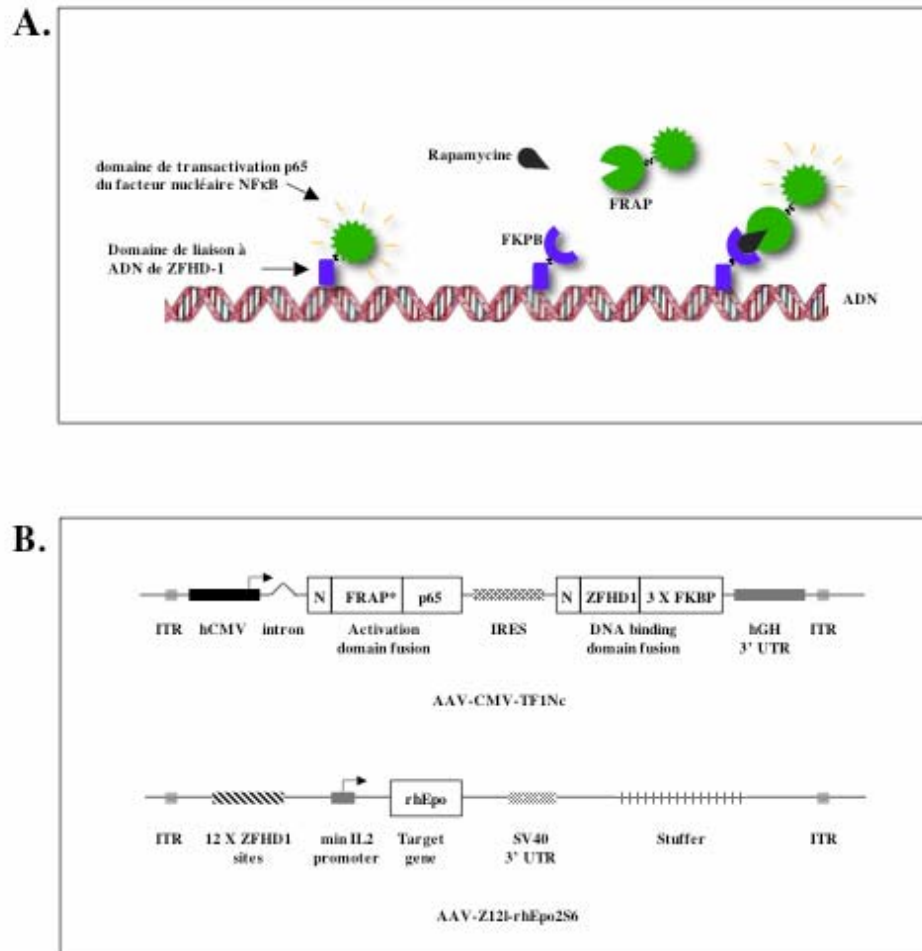


Figure 12: Système rapamycine

A. Schéma d'obtention du système d'expression génique dépendant de la rapamycine d'après Rivera et al., 1996. Le domaine de liaison à l'ADN de ZFHD-1 est fusionné à la protéine FKBP, le domaine d'activation p65 du facteur nucléaire NFκB est fusionné avec la protéine FRAP. Les deux facteurs de transcription artificiellement séparés sont activés en présence de la rapamycine.

B. Constructions utilisées par Auricchio et al., 2002 et Lebherz et al., 2005. L'AAV-CMV-TF1Nc contient le promoteur CMV (cytomégalovirus) qui dirige l'expression d'un message bicistronique codant pour l'activation et le domaine de liaison à l'ADN des domaines fusionnés N-FRAP-p65 et N-ZFHD1-3XFKBP. Le signal de localisation nucléaire (N) est dérivé du c-myc humain. Le domaine FRAP* contient une mutation au niveau de l'acide aminé 2098 permettant la liaison avec un analogue nonimmunosuppresseur de la rapamycine. L'IRES (Internal Ribosome Entry Sequence) dérive du virus encéphalomyocarditis. Dans l'AAV-Z121-rhEpo2S6, l'expression du gène cible rhEPO est sous le contrôle de 12 sites de liaison pour les facteurs de transcription ZFHD1.

7.2. Le système Tétracycline

Le second système testé dans l'œil est le système Tétracycline. Ce système fait intervenir comme inducteur la doxycycline, un antibiotique analogue de la tétracycline. Ce système, développé par Gossen et Bujard il y a plus d'une dizaine d'années, dérive de l'opéron de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 d'*Escherichia coli*. Dans cette *Escherichia coli*, c'est une protéine membranaire qui élimine la drogue hors de la bactérie et qui est à l'origine de la résistance à l'antibiotique. L'expression de la protéine membranaire est sous la dépendance de la présence de la tétracycline, par le biais d'un mécanisme qui fait intervenir une protéine répresseur de la transcription (TetR), normalement fixée sur l'opérateur Tet-O, qui est déplacé en présence de l'antibiotique. Ce système de l'opéron a été artificiellement transformé. Le domaine de transactivation de la protéine VP16 du virus Herpes Simplex a été fusionné avec le domaine de liaison à Tet-O de la protéine TetR pour donner une protéine transactivatrice artificielle tTA (tetracycline controlled Trans-Activator). Un promoteur minimal dérivé du Cytomégalovirus (promoteur CMVmin) a été placé en amont de la séquence Tet-O pour former le promoteur P_{tet}-1. En l'absence de la tétracycline, la protéine tTA se fixe sur la séquence Tet-O, ce qui induit l'initiation de la transcription. En présence de la tétracycline ou d'analogues comme la doxycycline, le tTA se lie à l'antibiotique de façon préférentielle, ce qui entraîne une baisse d'affinité de tTA pour la séquence Tet-O puis secondairement un arrêt de la transcription (Figure 13A). Ce système, supprimable par la Dox, a été baptisé Tet-Off. Un système inverse, inductible par la Dox (système Tet-On) a également été développé par le même groupe. Une version rTet-R, obtenue par mutagenèse chimique, possède des caractéristiques inverses de celles du Tet-R : elle se fixe avec une forte affinité sur la séquence tet-O en présence de l'inducteur (tétracycline ou doxycycline). Cette protéine rTet-R a été, également, fusionnée avec le domaine de transactivation de la protéine VP16 du virus Herpes Simplex pour former la protéine rTA (reverse tetracycline-controlled Trans-Activator) (Figure 13B). Ces 2 systèmes Tet-Off et Tet-On ont été testés dans l'œil.

Le système Tet-Off a été testé dans le laboratoire de Thérapie génique (INSERM U649, CHU Nantes) chez le rat. Après une injection intravitréenne d'un AAV2/2 qui cible les cellules ganglionnaires, l'expression du transgène *gfp* disparaît entre 5 et 7 jours après l'administration de doxycycline dans l'eau de boisson des rats puis retrouve son niveau basal en 21 jours après l'arrêt de l'administration de la doxycycline. Cette cinétique a été reproductible plusieurs fois

durant les 6 mois de la durée de l'étude (Folliot *et al.*, 2003). Est-ce que le lent retour au niveau basal de l'expression du transgène est lié à la présence prolongée de la doxycycline dans l'œil ? Dans le sérum, sa présence est d'assez courte durée car la demi-vie de cet antibiotique après une administration orale est de 16 à 22 heures. Cette hypothèse semble la plus juste car la certaine inertie dans la disparition de l'expression du transgène *gfp* ne peut être liée à la persistance de la protéine *gfp* car c'est la *gfp* déstabilisée dont la demi-vie est réduite à 2 heures qui a été choisie pour cette étude. Malgré une régulation reproductible dans la rétine, ce système semble peu adapté à une application clinique. En effet, l'utilisation d'un système Tet-Off induirait une expression du transgène sans l'adjonction d'antibiotique, ce qui est la configuration la moins sécuritaire possible car le sujet traité serait contraint de prendre cet antibiotique à vie si un problème survenait suite au traitement par thérapie génique. Le système Tet-On permet, également, une régulation fine dans la rétine. Mc Gee Sanftner reporte une régulation, *in vivo*, de l'expression du transgène *gfp* dans les photorécepteurs et les cellules de l'épithélium pigmentaire, après une injection sous-rétinienne chez le rat d'un AAV2/2 portant le rtTA et cDNA de la *gfp* sous le contrôle du promoteur Tet-O (McGee Sanftner *et al.*, 2001b). Cette première étude de la régulation de l'expression d'un transgène dans la rétine par le système Tet-On dans la rétine n'a pas mis en évidence d'altération de la fonction rétinienne après le transfert de gène lors d'un examen électrorétinographique chez les rats ayant eu une injection sous-rétinienne du vecteur. De plus, outre l'étude classique du tropisme, cette équipe a montré qu'une dose minimale de doxycycline permettait d'obtenir l'expression du transgène, ce qui laisse supposer, qu'avec un tel système, la dose d'antibiotique administrée pourrait être la plus faible possible, en dessous des doses classiques de l'antibiotique. Dans le laboratoire de thérapie génique de Nantes, ce système Tet-On a été testé chez le primate avec des variations dans la construction et l'élaboration du vecteur afin d'affiner le plus possible le système de régulation : différents sérotypes d'AAV pour cibler au mieux certaines cellules rétiniennes ainsi qu'un promoteur spécifique de l'épithélium pigmentaire (promoteur RPE65) ont été testés (Stieger *et al.*, 2006). Chez le primate, comme la visualisation de la *gfp* au fond d'œil est difficile (rétine fortement pigmentée), c'est le gène de *érythropoïétine* qui a été utilisé comme gène rapporteur. Différents taux d'EPO ont été obtenus en fonction du sérotype d'AAV utilisé et du promoteur choisi. Trois vecteurs différents ont été injectés par voie sous-rétinienne chez le primate : un AAV2/5.CAG.TetOn.Epo, un AAV2/4.CAG.TetOn.Epo et un AAV2/5.RPE65.TetOn.Epo. Le dosage de l'EPO a été réalisé dans l'humeur aqueuse qui a été prélevée à différents moments des cycles d'induction ; induction réalisée par doxycycline

qui a été administrée par voie intraveineuse. Le sérotype 4, comme il ne transduit qu'un type de cellules (EPR), entraîne l'obtention d'un taux plus bas d'EPO par rapport au sérotype 5. Le promoteur RPE65 entraîne également un taux plus bas d'EPO que le promoteur ubiquitaire CAG. Contrairement à ce qui a été trouvé lors de l'utilisation du même système Tet-On exprimant de l'EPO dans le muscle (Favre *et al.*, 2002; Chenuaud *et al.*, 2004a), il n'y a pas eu dans l'œil de développement de réponse immune contre le rtTA ou contre l'EPO. Ce système Tet-On permet dans l'œil une régulation de l'expression du transgène, régulation qui peut être affinée en utilisant différents sérotypes d'AAV ainsi que des promoteurs spécifiques.

7.3. Le promoteur HRE (*hypoxia-responsive element*)

Pour les méthodes de régulation qui viennent d'être décrites ci-dessus, il faut à chaque fois, l'administration d'une drogue pour réguler ce système. On est donc loin de la régulation physiologique fine de l'expression des gènes. Une équipe a développé un système de régulation en situation d'hypoxie rétinienne. Bainbridge et ses collaborateurs ont montré une expression régulable par l'hypoxie grâce à un promoteur particulier : le promoteur HRE (*hypoxia-responsive element*). En effet, ce promoteur permet de réguler l'expression d'un transgène GFP en fonction de l'hypoxie de la rétine. Le test d'efficacité de ce promoteur régulable s'est fait grâce à l'utilisation du transgène visualisable *gfp*. L'injection intravitréenne d'AAV2/2.CMV.GFP a été comparée à l'injection intravitréenne d'AAV2/2.HRE.GFP. Les injections ont été réalisées chez les deux modèles murins de néo-vascularisation. L'utilisation du transgène *gfp* a permis de suivre l'évolution de l'expression du transgène en fonction de l'hypoxie et du promoteur. Les souris injectées avec le promoteur HRE ont montré des zones GFP positives uniquement dans les zones soumises à l'hypoxie alors que les souris injectées avec le promoteur CMV présentent des cellules GFP positives réparties sur l'ensemble de la rétine (Bainbridge *et al.*, 2003a). Ces résultats montrent que certains systèmes comme ce promoteur HRE, peuvent permettre de réaliser un contrôle et une expression du gène transféré dans les conditions le plus proche de la physiologie.

VIII. ÉTUDE DE LA BIODISTRIBUTION SUITE AU TRANSFERT DE GENE DANS LA RETINE VIA UN VECTEUR AAV

Le développement de projets thérapeutiques par transfert de gènes nécessite des études précliniques de biosécurité pour étudier la toxicité, la biodistribution et la sécurité des vecteurs viraux utilisés.

La technique de référence pour l'étude de la biodistribution d'un rAAV est la PCR et récemment depuis son développement, la PCR quantitative en temps réel. D'après Gonin et Gaillard, la validation de la technique, le choix judicieux des primers, une organisation minutieuse du prélèvement des organes afin d'éviter les contaminations, une durée d'étude adéquate sont autant de paramètres indispensables à une bonne étude de biodistribution (Gonin and Gaillard, 2004). De nombreuses études ont été réalisées montrant la variabilité des résultats en fonction de la voie d'administration du vecteur, du promoteur utilisé dans la construction ainsi que la construction en elle-même (Conrad *et al.*, 1996; Ponnazhagan *et al.*, 1997; Arruda *et al.*, 2001; Favre *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2002a). Chez le primate non humain, le vecteur rAAV2/2 (AAVcm-ET(LTR) ou AAVcm-ET(CAG)) est détectable dans le sérum durant 6 jours après une injection intramusculaire (Favre *et al.*, 2001) et 14 jours après une administration pulmonaire d'un AAV2/2.cfr (Conrad *et al.*, 1996). Après une injection par voie intraveineuse, Ponnazhagan *et al.* retrouvent une distribution du vecteur AAV2/2.CMV. β gal dans le foie, le cœur et le muscle dès une semaine après l'injection intraveineuse (Ponnazhagan *et al.*, 1997). Une recherche à long terme est intéressante pour savoir combien de temps, après une injection de vecteur, l'ADN de celui-ci est-il encore détectable ? Après une injection intramusculaire d'un rAAV2/2 ((AAVcm-ET(LTR) ou AAVcm-ET(CAG)), une séquence d'ADN du vecteur peut être retrouvée dans le foie et dans le nœud lymphatique de drainage du muscle d'injection 18 mois après l'injection du vecteur (Favre *et al.*, 2001). Le vecteur est, également, détecté dans les cellules mononuclées blanches (PBMC) jusqu'à 10 mois après cette injection (Favre *et al.*, 2001). En ce qui concerne les injections intraoculaires : après une injection sous-rétinienne d'un AAV2/4.CMV.gfp, l'ADN du vecteur peut être détecté dans le sérum dès 15 minutes après l'injection et ce jusqu'à 25 jours post-injection. Dans le liquide nasal et lacrymal, l'ADN du vecteur viral est détecté 25 minutes après l'injection et ce durant 4 jours suite au geste chirurgical (Weber *et al.*, 2003). L'étude de biodistribution du vecteur AAV2/2.CAG.rpe65 chez 4 chiens RPE65^{-/-} injectés par voie sous-rétinienne a été réalisée par PCR (polymerase chain reaction) trois mois après l'injection (Jacobson *et al.*, 2006a). Aucune trace du génome du vecteur n'a été détectable ni dans le nerf optique ni dans le cerveau (Jacobson *et al.*, 2006a). Par contre, la présence du génome du vecteur AAV2/2.CAG.rpe65 a été détectée dans le cœur, le diaphragme et un nœud lymphatique mandibulaire par PCR en utilisant des primers encadrant le promoteur CAG (Jacobson *et al.*, 2006a). L'étude de la biodistribution de ce même vecteur chez le primate a mis en évidence des différences dans la détection de

l'ADN du vecteur après injection sous-rétinienne en fonction du temps écoulé entre l'étude de biodistribution et le moment de l'injection (Jacobson *et al.*, 2006b). En effet, quand l'étude est réalisée une semaine après l'injection chez 4 primates, le génome du vecteur est détecté dans le muscle chez 2 primates et dans un nœud lymphatique péri auriculaire chez un primate (Jacobson *et al.*, 2006b). Par contre 3 mois après l'injection, il n'a pas été mis en évidence de génome du vecteur AAV2/2.CAG.*rpe65* dans les organes à distance des voies visuelles chez les 8 primates étudiés (Jacobson *et al.*, 2006b). Dans une autre étude, qui a étudié la biodistribution d'un vecteur AAV de sérotype 2 codant pour le gène *gfp* après injection sous-rétinienne ou injection intravitréenne, il n'a pas été mis en évidence de diffusion à distance de l'œil dans les organes comme le foie, le muscle, un mois, deux mois ou trois mois après ces deux types d'injections chez le rat (Provost *et al.*, 2005). Par contre, chez 3 chiens injectés par voie intravitréenne par un vecteur AAV2.CMV.*gfp*, le génome du vecteur a été détecté dans les PBMC, les nœuds lymphatiques axillaires, sous-mandibulaires ou prétraggiens, les amygdales et les glandes lacrymales. La même étude chez le primate injecté en sous rétinién par un AAV4.CMV.*gfp* a détecté le génome du vecteur 2 mois après l'injection au niveau des PBMC et au niveau d'un nœud lymphatique sous-mandibulaire (Provost *et al.*, 2005).

Intéressons-nous maintenant à la diffusion au cerveau, organe très proche de l'œil avec des connexions importantes du fait de l'embryogénèse. Après injection intravitréenne d'un rAAV-2/2.*gusb*, l'activité enzymatique GUSB a pu être retrouvée dans le cerveau d'une souris modèle de la mucopolysaccharidose VII (Hennig *et al.*, 2003). Plus récemment, ce n'est pas la protéine transgénique mais l'ADN du vecteur lui-même qui a été retrouvé dans le cerveau après une injection intravitréenne d'un AAV2/2.CMV.*gfp* chez le rat et le chien (Provost *et al.*, 2005). La présence d'une séquence du génome du rAAV a été détectée le long des voies visuelles : nerf optique, chiasma, tractus optique, corps géniculé latéral, colliculus supérieur, radiation optique et cortex visuel (Provost *et al.*, 2005). Ceci suggère qu'un transport transynaptique du vecteur AAV2 est possible et non uniquement une diffusion de protéine transgénique comme on pouvait le supposer dans l'étude de Hennig qui n'a pas mis en évidence de séquence du vecteur. Toutefois, la voie d'administration semble importante pour cette diffusion car aucun ADN viral n'est détectable dans le cerveau au-delà du nerf optique de l'œil injecté 1 mois ou 2 mois ou 3 mois après une injection sous-rétinienne de cet AAV2/2.CMV.*gfp* chez le rat (Provost *et al.*, 2005). Ce type d'injection induit seulement la présence de séquence du vecteur dans le nerf optique de l'œil injecté (Provost *et al.*, 2005). D'ailleurs, l'étude récente de biodistribution du vecteur AAV2/2.CAG.*rpe65* chez 4 chiens RPE65^{-/-}, injectés par voie sous-rétinienne à une dose comprise entre 0,1.10⁸ et 0,3.10⁹ Vg retrouve la trace du génome du vecteur détectable par PCR dans le nerf optique

chez 1 animal mais pas dans le cerveau (Jacobson *et al.*, 2006a). Une étude de biodistribution cérébrale de ce même vecteur chez le primate a mis en évidence des différences dans la détection de l'ADN du vecteur après injection sous-rétinienne dans le cerveau (Jacobson *et al.*, 2006b). En effet, l'étude de biodistribution du vecteur dans le cerveau réalisée une semaine après l'injection sous-rétinienne d'AAV2/2.CAG.*rpe65*, à une dose comprise entre 1,5 et 4,5. 10¹² Vg, chez 4 primates a mis en évidence la présence du génome du rAAV dans le nerf optique, dans le tractus optique, dans le corps géniculé latéral et dans le cortex visuel chez 3 primates (Jacobson *et al.*, 2006b). La présence du génome du vecteur n'a été détectée qu'au niveau du corps géniculé latéral trois mois après l'injection sous-rétinienne d'AAV2/2.CAG.*rpe65* chez un primate sur les huit analysés (Jacobson *et al.*, 2006b).

L'étude du risque de transmission d'un ADN étranger à la descendance, suite à l'injection d'un vecteur rAAV par différentes voies d'administration, a été étudié par de nombreuses équipes (Monahan *et al.*, 1998; Arruda *et al.*, 2001; Favre *et al.*, 2001). Une équipe a dédié une étude complète à l'étude de la transmission germinale du rAAV2/2 (Couto *et al.*, 2004). Des spermatozoïdes matures ont été mis en contact avec un vecteur AAV2/2-*hFIX16* puis ces spermatozoïdes ont été utilisés pour une fertilisation *in vitro* d'ovocytes. Aucune trace du vecteur n'a été retrouvée au niveau des 102 embryons nés de cette fertilisation. Par contre, dernièrement, avec ce même vecteur, il a été rapporté le cas d'une transmission germinale suite à une injection dans la veine porte chez 6 des 7 patients hémophiliques B injectés (Manno *et al.*, 2006). Alors que les 8 sujets injectés, par voie intramusculaire, n'ont pas présenté de dissémination germinale (Manno *et al.*, 2003). Une étude chez le lapin a permis de déterminer par RCA (replication center assay) qu'après une injection intraveineuse, les particules infectieuses d'AAV ne sont présentes dans le liquide séminal que durant les 4 jours suivant l'injection (Schuettrumpf *et al.*, 2006). Pour ce qui est des injections intraoculaires (intravitréenne (IV) ou sous-rétinienne (ISR)), aucune trace d'ADN du vecteur n'a été retrouvé dans les gonades chez le rat, le chien ou le primate après IV de rAAV-2/2.CMV.*gfp* ou une ISR rAAV-2/2.CMV.*gfp* ou rAAV-2/4.CMV.*gfp* ou rAAV-2/5.CMV.*gfp* (Provost *et al.*, 2005). De même chez le chien ou chez le primate après une ISR d'AAV-2/2.CAG.*rpe65* (Jacobson *et al.*, 2006a; Jacobson *et al.*, 2006b).

B : RESULTATS

Dans la première partie du manuscrit, nous avons abordé les différents aspects des thérapies géniques, via des rAAV, envisageables pour les pathologies rétiniennes néovasculaires ou héréditaires. Deux éventualités sont concevables pour le transfert de gènes dans la rétine : une thérapie génique de complémentation permettant l'apport de facteurs neurotrophiques ou antiangiogéniques et une thérapie génique de substitution essentiellement pour les dégénérescences rétiniennes héréditaires (Auricchio and Rolling, 2005). Il est nécessaire que ces deux modes de thérapie génique répondent à certains critères pour permettre de garantir le succès du traitement par thérapie génique. Dans cet objectif, la stabilité de l'expression du transgène est essentielle afin d'éviter les réinjections, car dans un organe comme l'œil ces réinjections peuvent être à l'origine d'effets secondaires handicapants (détachement de rétine, infection...). De même, l'innocuité du traitement pour la rétine, qui est un tissu fragile et complexe, doit être garantie. Bien entendu, l'efficacité et la sécurité du transfert de gènes pour la rétine et l'individu sont des critères nécessaires. Ensuite, en fonction du type de thérapie génique, des critères propres peuvent être défini:

- La thérapie génique de substitution implique que le transfert du transgène assure la restauration des propriétés de la protéine naturelle, en faisant que cette « néoprotéine » soit fidèle à la qualité de la protéine naturelle afin que le déficit génétique soit corrigé.
- La thérapie génique de complémentation qui apporte à la rétine une protéine absente ou présente en faible quantité dans la rétine, nécessite la mise au point de système de régulation afin de préserver l'intégrité rétinienne.

C'est pourquoi l'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer ces différents points qualitatifs, indispensables à la viabilité d'un projet de thérapie génique pour des maladies rétinienne.

Dans cette première partie de thèse, nos objectifs étaient de tester l'efficacité et la stabilité du transfert de gènes au moyen d'un vecteur AAV de sérotype 2, 4 et 5 dans la rétine d'animaux sains. Nous souhaitions évaluer l'innocuité pour la rétine du transfert du transgène dans la cellule-cible. Afin de compléter, les études réalisées chez les rongeurs (Ali *et al.*, 1996; Auricchio *et al.*, 2001a; Rabinowitz *et al.*, 2002; Surace *et al.*, 2003), nous avons réalisé ces évaluations chez le chien et le primate où peu d'études avaient été réalisées (Bennett *et al.*, 1999; Bainbridge *et al.*, 2003b). Pour cette étude, nous avons utilisé le transgène *gfp* sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV (Doll *et al.*, 1996).

Dans la seconde partie de thèse, nous avons évalué l'effet d'une thérapie génique de substitution dans un modèle de dégénérescence rétinienne héréditaire. Le modèle utilisé est le chien briard RPE65^{-/-}, qui est un des modèles canins de l'amaurose congénitale de Leber. L'objectif de ce travail était d'évaluer, pour le traitement de cette pathologie rétinienne dont l'anomalie est située au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien. le sérotype 4 de l'AAV, qui cible spécifiquement les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Contrairement aux publications déjà réalisées sur le sujet (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003a), nous avons choisi d'utiliser dans la construction de la cassette du vecteur un promoteur spécifique des cellules à cibler : le promoteur RPE65 (Boulanger *et al.*, 2000).

Dans la troisième partie du travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur la régulation de l'expression d'un transgène dans la rétine au moyen d'un vecteur AAV. Nous avons opté pour le système de régulation TetOn dont l'induction est réalisée par l'administration d'un antibiotique : la doxycycline. Ce système de régulation TetOn a été testé au sein du laboratoire INSERM U649 pour la régulation de l'expression d'un transgène dans le muscle chez le macaque fascicularis (Favre *et al.*, 2001; Chenuaud *et al.*, 2004b). Notre

objectif était d'évaluer l'efficacité et la stabilité de ce système de régulation pour le transfert de gène dans la rétine chez le primate lors d'inductions répétitives.

Premier article

Post-surgical assessment and long-term safety of recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV)-mediated gene transfer into the retina of dogs and primates

Guyène Le Meur, Michel Weber, Yann Péréon, Alexandra Mendes-Madeira, Delphine Nivard, Jack-Yves Deschamps, Philippe Moullier, and Fabienne Rolling. 2005. *Archives of Ophthalmology*.123(4):500-6.

Postsurgical Assessment and Long-term Safety of Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer Into the Retinas of Dogs and Primates

Guyène Le Meur, MD; Michel Weber, MD, PhD; Yann Péroon, MD; Alexandra Mendes-Madeira, BS; Delphine Nivard, BS; Jack-Yves Deschamps, DVM; Philippe Moullier, MD, PhD; Fabienne Rolling, PhD

Objective: To evaluate, in dogs and primates, the short-term effects of subretinal injection and the safety of long-term recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated transgene expression with respect to retinal morphology and function.

Methods: Subretinal delivery of rAAV (serotype 2, 4, or 5) was performed unilaterally in 14 beagles and 9 macaques. Postsurgical condition was evaluated during a 2-month follow-up study. Three dogs and 1 primate were examined for the long-term study. Green fluorescent protein expression was monitored by fluorescent retinal imaging. Retinal anatomy and function were assessed by angiography and electroretinography, respectively.

Results: Transgene expression was observed in 20 of 23 subretinally injected animals (both with and without vitrectomy). We did not detect an inflammatory response in any of the 23 treated subjects. In the long-term study, transgene expression was detected at the latest points evaluated: 36 months for the rAAV-2-injected dog, 24 months for the rAAV-4 and rAAV-5 dogs, and more than 18 months for the rAAV-4-injected primate. Angiogra-

phy examinations were performed and showed no retinal abnormalities. Functional evaluation showed normal electroretinographic amplitude responses that were similar to those of the noninjected contralateral eyes.

Conclusions: Subretinal injection of the rAAV vector in dogs and primates is a safe procedure with no perioperative complications and a high rate of successful retinal gene transfer. The retinal anatomy and function remained unchanged, despite persistent transgene expression up to 36 months postinjection with rAAV-2, -4, or -5. Additionally, we observed no other adverse effects, such as tumor formation due to possible insertional mutagenesis. These short- and long-term studies on rAAV transgene expression using large animals are encouraging for the prospects of ocular gene therapy applications in humans.

Clinical Relevance: These short- and long-term studies on rAAV transgene expression using large animals are encouraging for the prospects of ocular gene therapy applications in humans.

Arch Ophthalmol. 2005;123:500-506

SIGNIFICANT PROGRESS IN UNDERSTANDING the molecular basis of a variety of retinal diseases has promoted the development of gene therapy approaches to treat these diseases.

Adeno-associated virus type 2 (AAV-2) is a human parvovirus that has gained increasing attention because of its successful use, in many different organisms, as a gene transfer vector.^{1,2} The AAV-2 genome consists of a 4.7-kilo-base pair (kbp) single-stranded DNA molecule, which consists of 2 open reading frames, rep (replication) and cap (capsid), flanked by 2 145-bp inverted terminal repeats. Recombinant AAV-2 (rAAV-2) vectors used for gene therapy are derived from the wild-type virus by deleting the entire viral coding region (rep and cap) and replacing it with a reporter or therapeutic gene. More recently, 7 other rAAV serotypes (rAAV-1,

-3, -4, -5, -6, -7, and -8) have been isolated and cloned.^{3,4}

Recombinant AAV vectors are among the most efficient vehicles for treatment of retinal diseases because the tropisms and transduction patterns of these vectors lead to efficient and stable gene transfer in retinal pigment epithelial (RPE), photoreceptor, and ganglion cells.⁵⁻¹⁸ As a consequence, an increasing number of strategies for the molecular treatment of retinal disease relies on rAAV vectors. To date, rAAV-mediated gene therapy studies have involved gene transfer to spontaneous and genetically engineered animal models of retinal diseases. The diseases that have been studied include neovascular diseases (age-related macular degeneration, diabetic retinopathy, and retinopathy of prematurity) and retinal degenerative diseases (retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis). In rodents, success-

Author Affiliations: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR U649 (Drs Le Meur, Moullier, and Rolling and Mss Mendes-Madeira and Nivard), Service d'Ophthalmologie (Dr Weber), and Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle (Dr Péroon), Centre Hospitalier Universitaire-Hôtel Dieu, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (Dr Deschamps), Nantes, France.
Financial Disclosure: None.

ful treatment of neovascularization and retinal degeneration has been demonstrated.^{19,23} In dogs, 2 studies have reported the restoration of vision in a canine model of Leber congenital amaurosis.^{24,25} Although restoration of vision was observed in some Briard dogs using AAV-2-mediated delivery of the canine *RPE65* gene, rAAV serotypes that lead to exclusive transgene expression in RPE, such as rAAV-4,¹⁹ might be a better candidate for safe and stable long-term gene transfer in humans. As shown previously, rAAV-2 and rAAV-5 are the most appropriate vectors to treat retinal degeneration where ganglion cells or photoreceptors are targeted.^{12,15-16,18,20} Although the therapeutic potential of these novel rAAV-mediated treatments appears promising for retinal degenerative diseases, such as retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis, additional safety studies should be carefully conducted and evaluated in large animals before proceeding to clinical application in humans. Evaluation of rAAV-mediated gene transfer into the eyes of large animals is relevant to the future clinical development of human applications: the ocular anatomy of large animals is more similar to humans than that of either the mouse or the rat. Nonhuman primates possess ocular anatomic features virtually identical to those of humans. Its components are of similar proportion and the retina possesses a macula. Also, the surgical procedures for vector delivery and the amount of injected vector would be similar in dogs and primates to what is projected for use in humans. In addition, dogs or primates have greater immunological and biological similarity to humans, which is critical in determining how well vectors are tolerated before clinical trials can proceed in humans.

In this report, we have evaluated the postsurgical condition and the long-term safety of rAAV-2, -4, and -5-mediated transgene expression with respect to retinal morphology and function in dogs and primates. Because direct examination of the green fluorescent protein (GFP) expression in the retina can be easily done on anesthetized animals using fluorescence fundus photography, we used vectors encoding for the GFP gene. Following a single subretinal injection of either rAAV-2, -4, or -5, each carrying a cytomegalovirus promoter and green fluorescent protein (CMV_gfp) genome, we examined 3 dogs and 1 primate for up to 36 months. Green fluorescent protein expression in these animals was monitored by fluorescent retinal imaging. The retinal morphology and function of these long-term transgene expressing animals were evaluated by angiography and electroretinography (ERG), respectively.

METHODS

All rAAV vectors carried a CMV_gfp cassette flanked by the AAV-2 inverted terminal repeats and encapsidated in an AAV-2, -4, or -5 capsid, yielding rAAV-2/2CMV_gfp, rAAV-2/4CMV_gfp, or rAAV-2/5CMV_gfp, respectively. The rAAV-2/2, rAAV-2/4, and rAAV-2/5 vectors were produced as previously described.^{27,28} The rAAV titer was determined by dot blot and is expressed as vector genomes (vg) per milliliter.³⁰ The titers were 1.5×10^{12} vg/mL, 4×10^{12} vg/mL, and 2×10^{12} vg/mL for rAAV-2/2, rAAV-2/4, and rAAV-2/5, respectively.

We purchased the dogs (D1-D14) and macaques (Mac1-Mac9) from the Centre d'Élevage du Domaine des Souches (Mez-

illes, France) and from BioPrim (Baziège, France), respectively. All animals were cared for in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Rockville, Md) statement about the use of animals in ophthalmic and vision research. Subretinal injections were performed via a transvitreal approach under isoflurane gas anesthesia as previously described.¹⁸ The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes.

We monitored the GFP expression in live animals with fluorescence retinal imaging using a Canon UVI retinal camera (Lheritier SA, Saint-Ouen-l'Aumône, France) connected to a digital imaging system (Lhedioh Win Software; Lheritier SA). We examined the retinas at monthly intervals following injection. Identical experimental conditions and parameters were used for fluorescence fundus photography at each point.

The pupils were dilated 20 minutes before anesthesia with tropicamide (Ciba Vision Faure, Novartis Pharma SAS, Annonay, France) and phenylephrine hydrochloride (10% Neosynephrine, Novartis Pharma SAS). Animals were anesthetized as described earlier. Fluorescein angiography and indocyanine green angiography were imaged using a Canon UVI retinal camera connected to a digital imaging system (Lhedioh Win Software). We injected intravenously 0.1 mg/kg of 10% fluorescein sodium solution (Ciba Vision Ophthalmics, Bagnac, France). The photograph sequence was started after injection with the fluorescein exciter and barrier filters in place until dye elimination. We injected intravenously 0.5 mg/kg of indocyanine green dye (indocyanine, Laboratoires SERB, Paris, France). Late-phase angiograms were obtained 15 minutes after injection.

Retinal function was tested using simultaneous bilateral flash photopic and scotopic ERG. We recorded ERGs in a standardized fashion, according to International Society for Clinical Electrophysiology of Vision protocols,³¹ using a computer-based system (Neuropack p MEB-9102K, Nihon-Kohden, Tokyo, Japan) and contact lens electrodes (ERGjet; Universo Plastique SA, Le Crêt-du-Loche, Switzerland). Bandpass filter cut-off frequencies were 1 Hz and 100 Hz for all measurements. Analysis time was 100 milliseconds. The a-wave amplitude was measured from the baseline to the a-wave peak, and the b-wave amplitude was measured from the a-wave peak to the b-wave peak, while flicker amplitude was measured peak to peak. Each uninjected eye served as an intra-individual control.

RESULTS

Subretinal delivery of rAAV serotypes -2, -4, or -5 encoding for GFP was performed unilaterally in 14 beagles (D1-D14) and in 9 macaques (Mac1-Mac9) (Table 1). Total volumes of 60 μ L to 100 μ L of vector were injected into the right eye of each animal. For all the dogs injected, a 44-gauge cannula was inserted through a sclerotomy and advanced through the vitreous, creating a single retinotomy, before injecting the vector, which caused a retinal bleb. For D14, the retina did not detach properly during the subretinal injection, and therefore no transgene expression could be detected. In all other dogs treated (13 [93%]), we made the following observations: retinas spontaneously flattened by 24 to 48 hours postinjection, no inflammatory response was detected by fundus photography within 2 months postinjection, and transgene expression was observed by live fluorescence imaging within 1 week, persisting to the last point. Two primates (Mac1 and Mac2) were injected using the same transvitreal approach. For both macaques, the retina reattached as soon as the cannula was removed, resulting

Table 1. Postsurgical Morbidity Following Subretinal Injection of rAAV Vectors

Animal Subject	Breed (Dogs) or Species (Primates)	Pars Plana Vitrectomy	Age at Procedure, y	Clinical Signs of Intracocular Inflammation	Transgene Expression
D1 through D13	Beagle	No	1-2	None	Yes
D14	Beagle	No	2	None	No
Mac1	Macaco fascicularis	No	NA	None	No
Mac2	<i>M fascicularis</i>	No	NA	None	No
Mac3 through Mac9	<i>M fascicularis</i>	Yes	NA	None	Yes

Abbreviations: NA, not available; rAAV, recombinant adeno-associated virus.

in the vector suspension being immediately released into the vitreous. As expected, primates Mac1 and Mac2 never displayed transgene expression. For the 7 other macaques (Mac3-Mac9), in which a vitrectomy was performed before subretinal injection, retinas spontaneously flattened by 24 to 48 hours postinjection, no inflammatory response was detected, and transgene expression was observed. In all successfully injected retinas, the transduced area seen by live fluorescence imaging matched exactly the retinal detachment created by the injection. The GFP expression gradually increased over time to reach a maximal level at approximately 60 days postinjection.¹⁰ Although most of the animals expressing GFP were killed for histology and biodistribution studies, dogs D4, D5, and D6 and macaque Mac5 were kept for the long-term study.

LONG-TERM ASSESSMENT OF TRANSGENE EXPRESSION BY FUNDUS FLUORESCENT PHOTOGRAPHY

Subretinal injection of rAAV-2/2CMV.gfp, rAAV-2/4CMV.gfp, and rAAV-2/5CMV.gfp was performed within the tapetal retinas of dogs D4, D5, and D6, respectively. We chose the tapetal retina because RPE cells are not pigmented in this region. In Mac5, we performed the subretinal injection of rAAV-2/4CMV.gfp outside the macula. We monitored retinal morphology and GFP expression with color fundus photographs for up to 36 months (D4), 24 months (D5, D6), or 18 months (Mac5) (**Figure 1**). Noticeably, when compared with live fluorescent imaging obtained in the dog treated with rAAV-2/4CMV.gfp, the GFP signal was less intense in primate Mac5. This result is not surprising because in primates, RPE cells are strongly pigmented, resulting in partial fluorescence quenching. The GFP expression levels in the retinas of the 3 dogs and the primate remained remarkably stable during the respective monitoring periods.

LONG-TERM EVALUATION OF RETINAL MORPHOLOGY BY ANGIOGRAPHY

To clinically monitor eventual chorioretinal alterations due to rAAV-mediated long-term transgene expression, we performed angiographies in the dogs and in the primate at different points after vector administration. As previously reported, hyperfluorescence or hypofluorescence detected by fluorescein and indocyanine green angiograms, respectively, is a sign of anatomical abnormalities such as RPE or choroidal atrophies.^{12,13} In dogs,

the presence of the tapetum lucidum in the retina prevents any interpretation of indocyanine green angiograms; therefore, we performed only fluorescein angiography. No abnormalities were detected in fluorescein angiograms, as shown in the posterior fundus color photographs taken 36 months postinjection for dog D4 and 24 months postinjection for dogs D5 and D6 (**Figure 2**). In the 3 dogs, the transduced retinas had normal angiograms, except for the presence of a hyperfluorescent dot caused by a window defect at the needle intrusion site for dog D4. In the dogs D4 and D6, which both presented high levels of GFP expression, the GFP fluorescent signal became visible during the late phase of the angiogram because the fluorescein was gradually eliminated from the retinal and choroidal vasculature. This result was expected because the fluorescein and GFP have the same excitation and emission wavelengths. In the primate treated with rAAV-2/4CMV.gfp, the posterior fundus was normal at 18 months postinjection, and we observed no abnormalities in the fluorescein and indocyanine green angiograms (**Figure 3**). Similar to dog D4, the hyperfluorescent dot, a window defect at the injection site, is visible on the fluorescein angiogram. Together, these results indicate that long-term rAAV-mediated expression of a transgene in subretinally injected eyes does not alter retinal morphology.

LONG-TERM ASSESSMENT OF RETINAL FUNCTION BY FULL-FIELD BILATERAL FLASH ERG

The effect of long-term transgene expression following subretinal delivery of rAAV vectors on global retinal function in dogs was evaluated using flash photopic and scotopic ERG. The same investigator (G.L.) recorded the ERGs in a standardized fashion up to 36 months postinjection for dog D4, 24 months postinjection for dogs D5 and D6, and 18 months postinjection for primate Mac5. Normal patterns of ERG amplitudes were elicited in both the treated and untreated eyes of all 4 animals studied. The ERG recordings of D4 and Mac5 are shown in **Figure 4**. The summary of the ERG responses in the 3 treated dogs are reported as mean a-wave and b-wave amplitudes for each stimulus, rod ERG, ERG max, cone ERG, and flicker (**Table 2**). The ERG findings support the conclusion that normal rod and cone functions in dogs and primates are preserved for up to 36 months after efficient rAAV-mediated gene transfer and in the face of continual transgene expression.

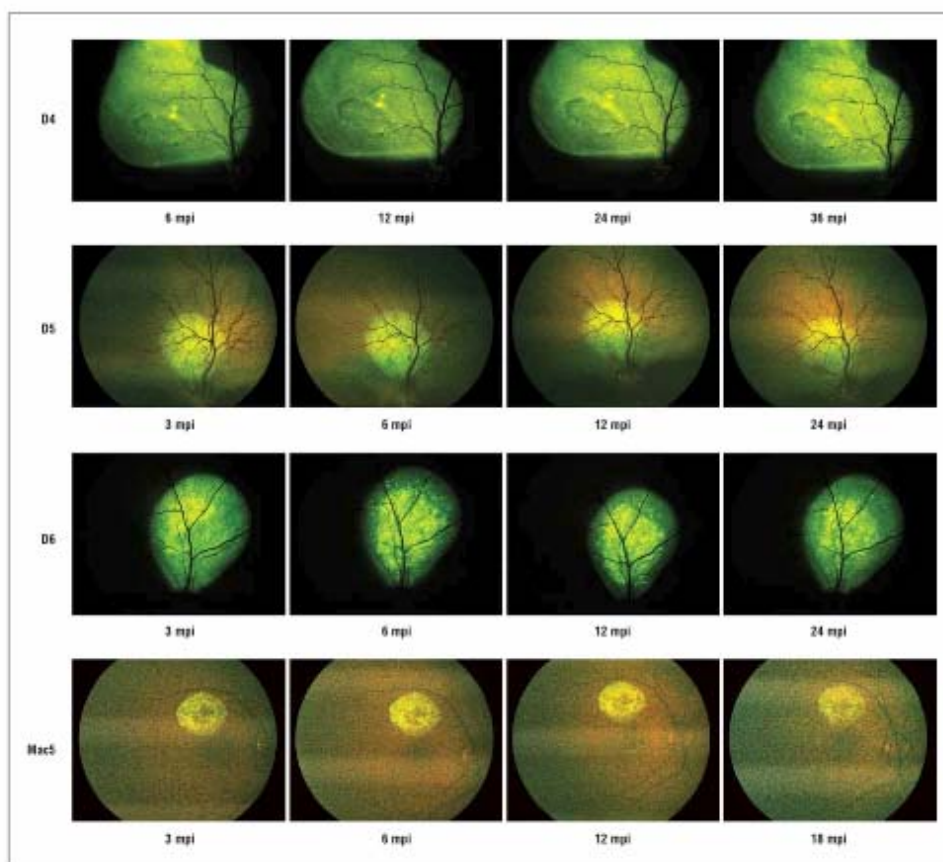


Figure 1. Live fluorescent retinal imaging at different points following subretinal injection in 3 dogs and 1 primate. The dog D4 was injected with recombinant adeno-associated virus type 2/adeno-associated virus 2 capsid cytomegalovirus promoter and green fluorescent protein genome (rAAV-2/2.CMV.gfp), dog D5 with rAAV-2/4.CMV.gfp, dog D6 with rAAV-2/5.CMV.gfp, and the primate Mac5 with rAAV-2/4.CMV.gfp. mpi indicates months postinjection.

COMMENT

In this study, we have found that subretinal rAAV delivery was possible using a transvitreal approach without vitrectomy in dogs. Unlike our findings in dogs, a pars plana vitrectomy was required in the primates before we could make a successful transvitreal subretinal injection. We have demonstrated that a single subretinal injection of rAAV vector into dogs or primates can sustain constitutive transgene expression in the retina for at least 36 months for AAV-2 and 24 months for AAV-4 and -5 in the dogs and 18 months for AAV-4 in the macaque. Monitoring GFP expression in the dogs treated with rAAV-2, -4, and -5 and in the primate injected with rAAV-4 clearly demonstrated the stability of transgene expression level in the retina over time. To our knowledge, this ongoing study represents the longest reported transgene expression following rAAV injection into

the retina. We have shown that several years of stable rAAV-2, -4, and -5-mediated gene transfer alter neither the structure nor the function of the retina.

Taking into account the 14 dogs and 7 primates (in which vitrectomy was performed), 20 of the 21 subretinally injected animals demonstrated an efficient gene transfer without perioperative complications. This result suggests that our surgical technique for subretinal injection in dogs and primates is both reliable and reproducible. We chose the volume of vector suspension delivered to create 1 single bleb easily visible with live fluorescence imaging. Gene replacement therapy for retinitis pigmentosa due to a mutated *MERTK* gene²³ or for Leber congenital amaurosis^{24,25} might require delivery of the vector to a larger area of the retina. The creation of a larger bleb or multiple blebs could cause adverse postoperative complications and has yet to be evaluated.

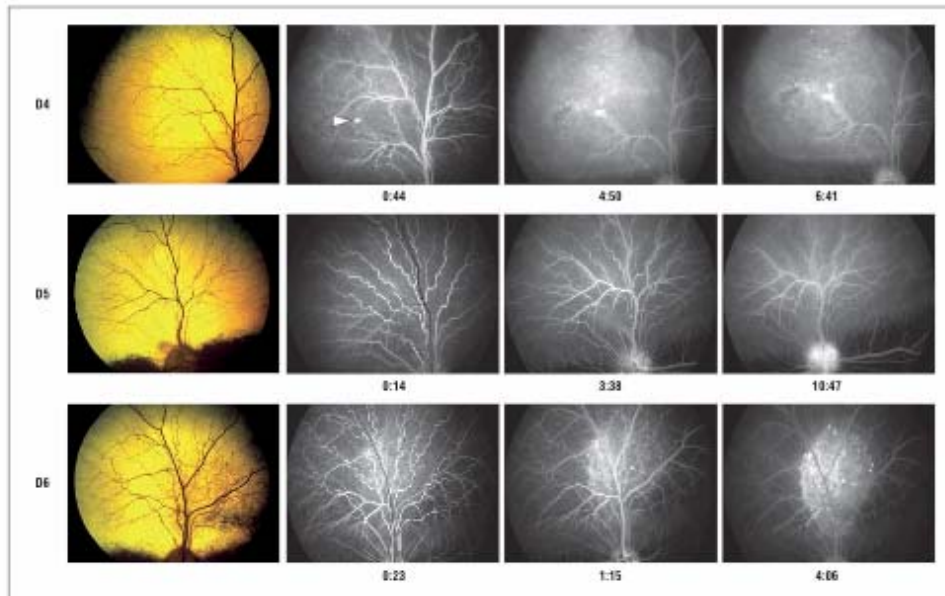


Figure 2. Fundus photographs and fluorescein angiograms of the eye expressing green fluorescent protein at 36 months postinjection for dog D4 and at 24 months postinjection for dogs D5 and D6. Early- and late-phase fluorescein angiograms are shown. The arrow indicates a window defect at the needle intrusion site.

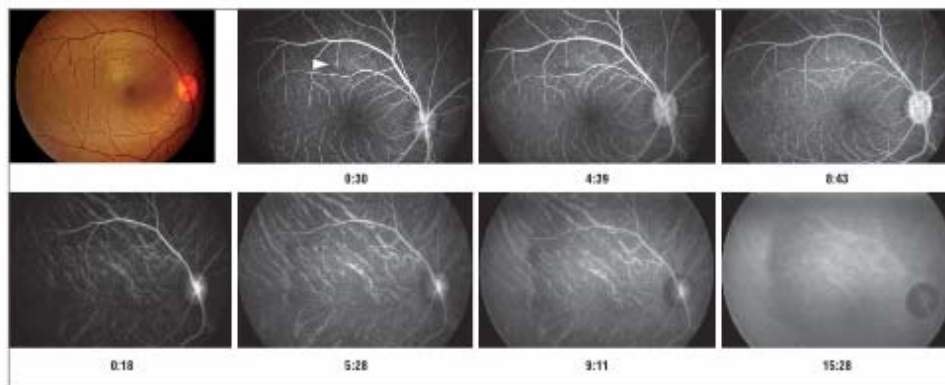


Figure 3. Fundus photograph, fluorescein angiograms (top row), and indocyanine green angiograms (bottom row) of the eye expressing green fluorescent protein in the primate Mac5 at 18 months postinjection. Early and late phases of both angiograms are shown. The arrow indicates a window defect at the needle intrusion site.

From the perspective of gene therapeutics, we consider it essential to assess clinically the morphology of the retina to evaluate any possible adverse effects of long-term gene transfer. To this end, we performed fluorescein or indocyanine angiography in all the animals and detected no abnormalities or lesions. A recent study on rAAV-2.gfp-mediated gene transfer into the canine retina reported that 3 of the 8 subretinally injected animals developed a delayed-onset intraocular inflammatory response 4 to 6 weeks following vector delivery.³⁴ Similarly, in a study test-

ing gene replacement therapy using AAV-2/2-mediated delivery of a canine *RPE65* gene into the retinas of Briard dogs affected by Leber congenital amaurosis,²⁵ uveitis developed in 75% of the eyes treated with rAAV-2.rpe65. In both cases, the inflammation response was attributed either to the presence of a contaminant in the vector preparation or to an immune response to the expressed foreign protein (GFP or RPE65). Neither of these studies clinically assessed the retinas using angiography. It is known that during early stages of posterior uveitis, RPE may show fo-

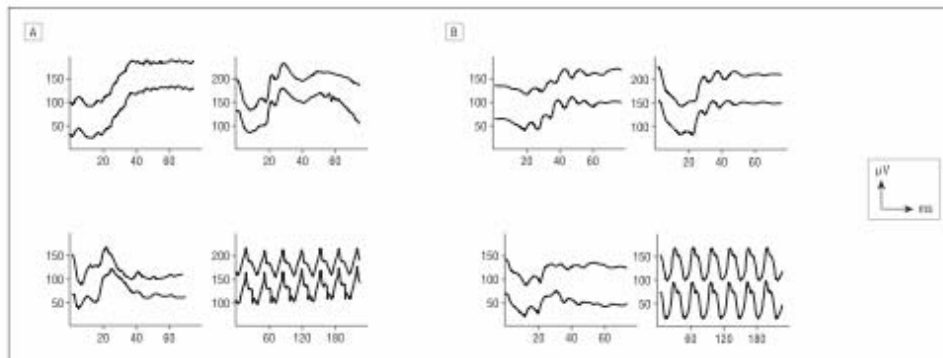


Figure 4. Bilateral full-field electroretinographic recordings in dog D4 (A) and primate Mac5 (B) at 36 months and 18 months postinjection, respectively. The top traces are the injected right eyes. The bottom traces are the control left eyes. The top 2 recordings are low- and high-intensity scotopic responses, but the bottom 2 recordings show photopic responses (responses to light-adapted single-flash and 30-Hz flicker stimuli, respectively). μV indicates microvolt; ms, milliseconds.

Table 2. ERG Amplitudes of Dogs D4, D5, D6, and Mac5 After Long-term rAAV-Mediated Gene Transfer in the Retina*

Animal Subject	Rod ERG				ERG Max				Cone ERG				Flicker	
	a Wave		b Wave		a Wave		b Wave		a Wave		b Wave		R	L
	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L
D4 (36 mpi)	9.1	14.3	100.3	100.6	172.7	183.5	236.8	230.1	28.3	25	58.3	54.7	122.4	128.9
D5 (24 mpi)	14.8	8.8	123.9	132.3	245.9	247	251.4	268.1	20.6	20.2	47.6	43.8	79.1	96.4
D6 (24 mpi)	17.4	14.4	97.4	104.1	140.1	141.1	194.9	186.6	46.7	60.5	79.1	82.2	117.9	134.5
Mean \pm SD	13.7 \pm 4.2	12.5 \pm 3.2	107.2 \pm 14.5	112.3 \pm 17.3	186.2 \pm 54.1	190.5 \pm 53.3	227.7 \pm 29.3	228.3 \pm 40.8	31.9 \pm 13.4	35.2 \pm 22	61.7 \pm 16	60.2 \pm 19.8	106.5 \pm 23.8	119.9 \pm 20.6
Mac5 (18 mpi)	17.2	24	52	62.1	163.5	146.3	143.3	145.4	59.4	45.4	48.7	53	70.7	78.4

Abbreviations: ERG, electroretinogram; L, left control eye; Mac5, *Macaca fascicularis* No. 5; mpi, months postinjection; R, right injected eye; rAAV, recombinant adeno-associated virus.

*Values are shown in microvolts.

cal areas of damage or may undergo atrophy, both detected by angiography.³¹ Therefore, clinical assessments of the retinal morphology over the transduced area in these 2 cohorts of dogs would have been of inestimable value to the field. Angiography examinations in dogs and primates are essential for any preclinical evaluation of retinal gene therapies.

Few studies have assessed the functional effects of rAAV vector delivery to the retina in normal animals. We found that rAAV-2, -4, or -5 transduced eyes expressing the transgene for several years all had intact retinal function. No ERG evidence of toxic effects was detected over the 36-month period for dog D4, over the 24-month period for dog D5 or dog D6, and over the 18-month period for primate Mac5. These findings are consistent with a study where normal ERG photoreponses were observed 4 months after the administration of rAAV-2 gfp in 3 of 4 primates.³¹ However, our data contrast with a study in which a significant reduction in global retinal function was observed at 8 weeks following subretinal delivery of rAAV-2 gfp in normal dogs.³¹ Assessing the function of the transduced part of the retina using multifocal ERGs would be the most accurate evaluation method. However, because animals are unable to fix their gaze on command as humans can, this examination

is far more complicated than in humans. As a result, in animals, multifocal ERG recordings require simultaneous scanning-laser ophthalmoscope stimulation.³⁶

A few years ago, a disturbing finding in an rAAV-2/2-mediated gene therapy experiment using a mouse model of the lysosomal storage disease mucopolysaccharidosis VII triggered the gene therapy community to reevaluate the safety of these vectors. In this study, some of the mice intravenously injected with the AAV-2/2 vector developed hepatocellular carcinoma at 8 months after vector administration.³⁷ Results from quantitative polymerase chain reaction performed on the tumor samples could not determine if the tumors identified in these mice were a consequence of the rAAV treatment.³⁸ This observation highlighted the need for long-term studies designed to address the tumorigenic potential of rAAV-based gene transfer vectors.

In summary, we have found that the subretinal injection of rAAV is a safe procedure that leads to efficient gene transfer in dogs and primates. We have shown the persistence of transgene expression over several years following the administration of rAAV-2, -4, or -5 and have further found no pathological effect on retinal anatomy or function. Our findings support the further develop-

ment of rAAV serotypes 2, 4, and 5 for the clinical application of retinal gene therapy.

Submitted for Publication: February 20, 2004; final revision received October 4, 2004; accepted October 4, 2004.

Correspondence: Fabienne Rolling, PhD, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR U649, Centre Hospitalier Universitaire-Hôtel Dieu, 30 Avenue J Monnet, 44035 Nantes CEDEX 01, France (fabienne.rolling@univ-nantes.fr).

Funding/Support: Vector Core (<http://www.vectors-nantes.inserm.fr>) at the University Hospital of Nantes (Nantes, France) is supported by the Association Française Contre les Myopathies (Evry, France), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Paris, France), and the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire (Nantes). This work was also supported by the French Lions Club (Paris) and the Lions Clubs International Foundation (Oak Brook, Ill).

Acknowledgment: We thank Matthew Elinwood and Anna Skulimowski for critical reading and editing.

REFERENCES

- Snyder RD. Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J Gene Med*. 1999; 1:166-175.
- Morahan PE, Samolski RJ. AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther*. 2000;7:24-30.
- Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol*. 1999;73:3994-4003.
- Muramatsu S, Mizukami H, Young NS, Brown KE. Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology*. 1990; 221:208-217.
- Chiorini JA, Yang L, Liu Y, Safer B, Kotin RM. Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J Virol*. 1997; 71:6823-6833.
- Chiorini JA, Kim F, Yang L, Kotin RM. Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol*. 1999;73:1309-1319.
- Rutledge EA, Hubert CL, Russell DW. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol*. 1998; 72:309-319.
- Gao GP, Lu F, Sammiquel JC, et al. Rep/Cap gene amplification and high-yield production of AAV in an A649 cell line expressing Rep/Cap. *Mol Ther*. 2002; 5:644-649.
- Ali RR, Reichel MB, Thrasher AJ, et al. Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet*. 1996;5:591-594.
- Ali RR, Reichel MB, De Alwis M, et al. Adeno-associated virus gene transfer to mouse retina. *Hum Gene Ther*. 1998;9:81-86.
- Bennett J, Maguire AM, Gidecy AV, et al. Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:9920-9925.
- Dudas L, Anand V, Acland GM, et al. Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vision Res*. 1999;39: 2545-2553.
- Lobry AJ, Yang GS, Mullins RF, et al. Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther*. 2003; 14:1663-1671.
- Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, et al. Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*. 2001;4:461-472.
- Guy J, Di X, Muzyczka N, Hauswirth WW. Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch Ophthalmol*. 1999;117:929-937.
- Foliot S, Briot D, Carrath H, et al. Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *J Gene Med*. 2003;5:493-501.
- Auricchio A, Kobinger G, Anand V, et al. Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet*. 2001;10:3075-3081.
- Weber M, Rabinowitz J, Provost N, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther*. 2003;7:774-781.
- Raisler BJ, Berns KI, Grant MB, Beliaev D, Hauswirth WW. Adeno-associated virus type-2 expression of pigmented epithelium-derived factor or Kirtin5 1-3 of angiostatin reduce retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:8909-8914.
- Bainbridge JW, Mistry A, De Alwis M, et al. Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther*. 2002;9:320-326.
- Mori K, Gellibach P, Yamamoto S, et al. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:1994-2000.
- Ali RR, Sarra GM, Stephens C, et al. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet*. 2000; 25:306-310.
- Smith AJ, Schlichtkenbrede FC, Tschlemutter M, Bainbridge JW, Thrasher AJ, Ali RR. AAV-mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*. 2003;8:188-195.
- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet*. 2001;28:92-95.
- Narstrom K, Katz ML, Bragadottir R, et al. Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:1663-1672.
- Yang GS, Schmidt M, Yan Z, et al. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol*. 2002; 76:7651-7660.
- Grimm D, Kleinschmidt JA. Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther*. 1999;10: 2445-2450.
- Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol*. 2002;76:791-801.
- Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J, Chiorini JA. 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*. 2001;75:6884-6893.
- Sahwail A, Olive S, Chadeuf G, et al. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther*. 1998;9:695-705.
- Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc Ophthalmol*. 1998;97:143-156.
- Schaltz H. Fluorescein angiography: basic principles and interpretation. In: Ryan SJ, ed. *Retina*, 2nd ed. St Louis, Mo: Mosby-Year Book, Inc; 1994:911-984.
- Guyer D, Yamuzzi L, Skolter J, Sorenson J, Orlock D. Diagnostic indocyanine green videoangiography. In: Ryan SJ, ed. *Retina*, 2nd ed. St Louis, Mo: Mosby-Year Book, Inc; 1994:985-996.
- Bainbridge JW, Mistry A, Schlichtkenbrede FC, et al. Stable rAAV-mediated transduction of rod and cone photoreceptors in the canine retina. *Gene Ther*. 2003; 10:1336-1344.
- Rao N. Inflammations and infections of the retinal pigment epithelium. In: Marmor MF, Wolfensberger TJ, eds. *The Retinal Pigment Epithelium*. New York, NY: Oxford University Press; 1998:528-541.
- Seeliger MW, Narstrom K. Functional assessment of the regional distribution of disease in a cat model of hereditary retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1998-2005.
- Daly TM, Chienmiller KK, Roberts MS, Vogler CA, Sands MS. Prevention of systemic clinical disease in MPS VII mice following AAV-mediated neonatal gene transfer. *Gene Ther*. 2001;8:1291-1296.
- Donsante A, Vogler CA, Muzyczka N, et al. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther*. 2001;8:1343-1346.

I. DISCUSSION DU PREMIER ARTICLE

Le but de ce premier travail a été l'évaluation ophtalmologique post-chirurgicale suite à une injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV ainsi que l'évaluation de la sécurité à long terme lors de l'expression d'un transgène via un vecteur AAV de sérotype 2, 4 ou 5 dans la rétine de chien et de primate non-humain. Après une injection unique d'un vecteur AAV de sérotype 2, 4 ou 5 portant le transgène *gfp* sous le contrôle du promoteur CMV, l'expression du transgène dans la rétine a été stable plus de 36 mois chez 3 chiens et un primate. Aucune altération rétinienne n'a été mise en évidence lors des angiographies à la fluorescéine ou au vert d'indocyanine. De même, aucune altération de la fonction rétinienne n'a été démontrée lors des tests électrorétinographiques suite à ce transfert de gène chez les 4 animaux.

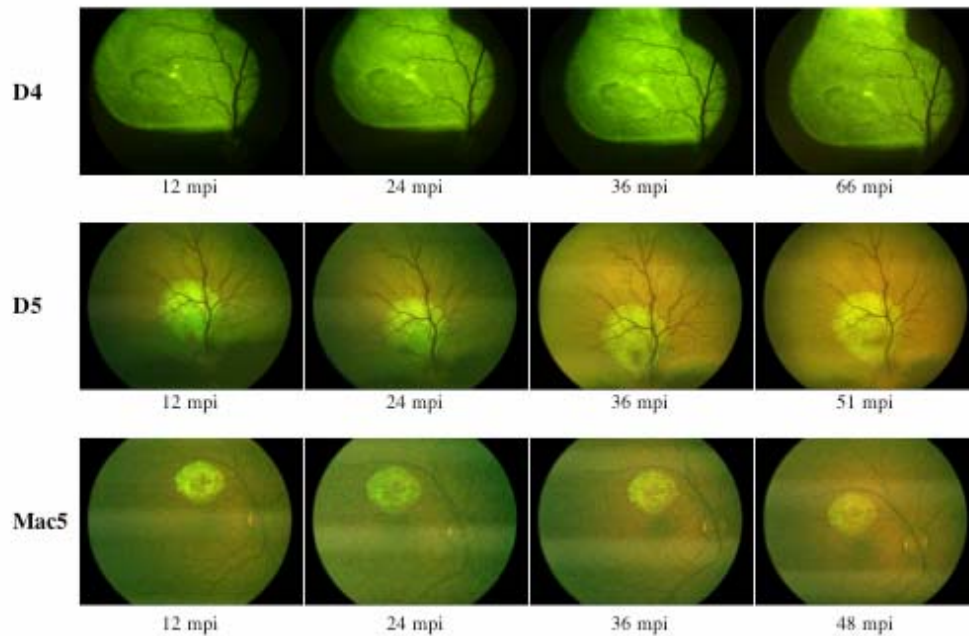
1.1. Efficacité et stabilité du transfert de gènes dans la rétine via un vecteur AAV

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre V de la première partie dédiée au tropisme des vecteurs AAV, il existe plusieurs types d'injections intraoculaires. En ce qui concerne le transfert de gènes dans la rétine deux types d'injections sont envisageables : l'injection intravitréenne et l'injection sous-rétinienne. L'injection intravitréenne, au cours de laquelle le vecteur est déposé dans la cavité vitréenne, permet notamment avec l'utilisation d'un vecteur AAV2/2.CMV.*gfp*, la transduction des cellules ganglionnaires chez les souris et les chiens (Dudus *et al.*, 1999). L'injection sous-rétinienne, réalisée par voie transclérale chez les souris et les rats et par voie transvitréenne chez les animaux de plus grandes tailles, permet de transduire les cellules rétinienne des couches internes de la rétine. Les types cellulaires transduits varient en fonction des sérotypes d'AAV injectés. Chez le rat, les vecteurs AAV de sérotype 2 transduisent les cellules de l'EPR et les photorécepteurs après une injection sous-rétinienne (Rabinowitz *et al.*, 2002). Le sérotype 4 permet une transduction exclusive des cellules de l'EPR dans la rétine de rat, de chien et de primate après une injection sous-rétinienne (Weber *et al.*, 2003). Dans la rétine de souris après une injection sous-rétinienne, le vecteur AAV2/5.CMV.*gfp* permet une transduction efficace des photorécepteurs et des cellules de l'épithélium pigmentaire (Auricchio *et al.*, 2001a; Yang *et al.*, 2002). Chez les gros animaux, les injections sous-rétiennes sont réalisées avec ou

sans vitrectomie en fonction des équipes (Bennett *et al.*, 1999; Bainbridge *et al.*, 2003b; Weber *et al.*, 2003). Dans le laboratoire INSERM U649, plusieurs tests non publiés nous ont permis de mettre au point une stratégie concernant la conduite chirurgicale à tenir. Nous réalisons une vitrectomie chez le primate car sinon le décollement sous-rétinien est fugace avec un réapplatissage de ce décollement sous-rétinien quelques minutes après la chirurgie. Cette fugacité ne permet pas un transfert de gène correct, car le temps de contact du vecteur avec les cellules cibles est alors trop court, les particules de vecteurs ne peuvent pas rentrer dans les cellules cibles. Chez les jeunes chiots, qui ont un vitré dense, à cause de leur jeune âge, nous utilisons la même procédure chirurgicale d'injection sous-rétinienne avec vitrectomie.

Pour ce travail sur la stabilité du transfert de gène, le choix du modèle animal a été essentiel. En effet, un des buts de la thérapie génique est notamment d'éviter les injections itératives réalisées actuellement, par exemple lors de traitements antiVEGF (Macugen®, Avastin®, Lucentis®) dans le cadre de pathologies rétiniennes néovasculaires (Bashshur *et al.*, 2006; Heier *et al.*, 2006; Tobin, 2006). Par conséquent, il est préférable que l'efficacité de ce traitement par thérapie génique soit stable dans le temps. Il est donc nécessaire de s'assurer que le transfert de gène est stable à long terme chez des animaux qui ont une espérance de vie suffisante. Afin d'atteindre cet objectif, les études chez le chien et le primate sont intéressantes car l'espérance de vie de ces animaux est plus longue que celle des rongeurs, ce qui permet de réaliser des études avec un recul d'évaluation du transfert de gène bien plus grand que dans les études chez les rongeurs. De plus chez ces gros animaux, l'abord chirurgical pour réaliser les administrations intra-oculaires des vecteurs est quasi identique à l'abord chirurgical à employer chez l'homme : injection sous-rétinienne par voie transvitréenne. Mais encore, les gros animaux type chiens-primates ont une immunité plus complexe que les rongeurs, ce qui permet de tester la thérapie génique dans des conditions les plus proches des futures conditions de protocole d'essai clinique. Et enfin, la taille de l'œil de tels animaux se rapproche de celle de l'homme (Osuobeni and Hamidzada, 1999; Goyal *et al.*, 2003). C'est pourquoi, la dose de vecteur utilisé se rapproche de celle qui serait nécessaire d'administrer à l'homme pour espérer un effet thérapeutique et par voie de conséquence, les études sur la biosécurité, sur la diffusion du vecteur semble plus adaptées chez ces animaux de grande taille. Ces études à long terme chez les gros animaux ont un autre avantage : elles permettent d'évaluer l'apparition d'une éventuelle pathologie tumorale secondaire au transfert de gène.

Les chiens de cette première étude étaient âgés de plus de 2 ans au moment de l'injection sous-rétinienne. C'est pourquoi, ces chiens n'ont pas eu de vitrectomie avant l'injection sous-rétinienne. Par contre, une vitrectomie a été réalisée chez le primate Mac 5 avant l'injection sous-rétinienne. Dans la Figure 1 du premier article, le transfert du gène *gfp*, suite à l'injection sous-rétinienne d'un vecteur dérivé d'un AAV, est stable. Le recul d'une expression stable et efficace du transgène *gfp* est actuellement de plus 5 ans chez le chien D4 injecté avec un sérotype 2 (AAV2.CMV.*gfp*), de plus de 4 ans chez le chien D5 et chez le primate Mac 5 injectés tous les deux avec un sérotype 4 (AAV4.CMV.*gfp*) (Figure 14). Comme on peut le remarquer sur cette figure complémentaire numéro 14, il y a une variation dans l'intensité du signal GFP lors des derniers time-points. La GFP est une protéine qui est excitée par des lumières d'ondes d'environ 475 nm puis qui émet une lumière à 509 nm. Pour la détection du signal GFP, nous utilisons un angiographe numérisé, en utilisant le filtre barrier/exciter de l'angiographe qui diffuse une lumière d'excitation adéquate à 470 nm puis qui capte la lumière d'émission diffusée par le signal GFP après l'excitation de cette GFP. Ce signal GFP nous est alors redistribué sur un moniteur après analyse par le logiciel ledioph qui dirige l'angiographe numérisé. Avant la réalisation des derniers clichés funduscopiques de cette figure complémentaire, nous avons adopté la nouvelle version du logiciel ledioph, qui permet l'analyse et l'enregistrement des données captées par l'appareil angiographique. Malgré nos réglages, il persiste une différence entre le signal GFP détecté par l'angiographe et le signal GFP enregistré par l'angiographe. Car lorsque le fond d'œil est regardé directement dans l'angiographe avec les filtres sans analyse par le logiciel ledioph, nous ne percevons pas de diminution du signal GFP. Par contre, une diminution de la force du signal GFP apparaît lors d'une prise de cliché photographique avec utilisation de la dernière version du logiciel Ledioph qui gère l'analyse des photographies prises par l'angiographe. Cette modification de logiciel rend la plaquette de suivi du signal GFP moins expressive. Toutefois, cette étude sur la stabilité de l'expression du transgène *gfp* dans la rétine après transfert de gène via un vecteur AAV est l'étude qui chez des gros animaux a été menée à plus long terme. Auparavant, une stabilité de l'expression de ce transgène *gfp* via un AAV2 avait été montrée à 1 an dans la rétine de primate (Bennett *et al.*, 1999) et à 6 mois dans la rétine de chiens (Bainbridge *et al.*, 2003b).



Résultats complémentaires (1)

Figure 14: Suivi de la fluorescence rétinienne, suite à une injection sous-rétinienne d'un vecteur codant pour le transgène *gfp*, par des photographies du fond d'œil réalisées à différents temps post-injection chez deux chiens et un primate: le chien D4 a été injecté par un AAV2/2.CMV.*gfp*, le chien D5 par un AAV2/4.CMV.*gfp* et le primate Mac5 par un AAV2/4.CMV.*gfp*. mpi, mois post-injection.

1.2. Innocuité du transfert de gènes dans la rétine

L'autre intérêt de cet article a été de s'intéresser à l'effet de la chirurgie sur la rétine et à l'effet du transfert de gènes, via un vecteur AAV, à long terme sur la rétine. Comme l'œil est système optique qui possède des milieux transparents, l'examen, *in vivo*, de la rétine a été possible par application aux études de thérapie génique de systèmes d'examen propres à l'ophtalmologie. Le système visuel étant un système complexe notamment la rétine, qui est constituée de 10 couches de cellules neuronales différentes, il a fallu s'assurer que ces cellules neuronales n'avaient pas perdu leurs interactions après une injection sous-rétinienne ou après une longue expression d'un transgène.

La meilleure compréhension des événements électriques qui surviennent dans la rétine lors de la phototransduction a permis le développement de l'électrorétinographie clinique (ERG) dès 1933 (Granit, 1933). La technique a été, petit à petit, améliorée notamment grâce aux progrès informatiques avec l'apparition dans les années 1990 de protocoles de stimulations lumineuses et d'enregistrements des ERGs afin de pouvoir avoir dans le monde des résultats plus facilement comparatifs. Cette standardisation est liée au travail d'un comité qui a mis en place des recommandations internationales d'examen : recommandations de l'ISCEV (International Society of Clinical Electrophysiology for Vision) (Marmor and Zrenner, 1998). C'est ce protocole clinique d'examen qui a été suivi pour les travaux de cette thèse. L'ERG enregistre l'activité électrique émise par la rétine après une stimulation lumineuse. L'enregistrement fait apparaître une courbe avec différents pics (onde a, onde b, onde c onde d, potentiels oscillatoires) qui représentent l'activité électrique de différentes cellules rétinienne. L'onde a, représente l'activité des photorécepteurs, l'onde b représente l'activité des couches internes de la rétine notamment celle des cellules de Müller (Newman and Odette, 1984). L'onde c, n'est pas toujours visible en fonction de la stimulation lumineuse choisie, son origine serait les cellules de l'épithélium pigmentaire et les cellules de Müller. Cette onde est surtout visible dans les rétines où la présence de bâtonnets est grande, L'onde d, quant à elle, représente l'inactivation (réponse OFF) des photorécepteurs (cônes) et des cellules de Müller (Sieving, 1993). Cette onde d est surtout visible dans les cellules à fortes concentrations de cônes. Les potentiels oscillatoires représentent l'activité des cellules amacrine,

L'onde b représente l'onde la plus étudiée

de l'ERG car c'est la plus facile à enregistrer et la plus ample. Mais aussi car c'est l'onde la plus sensible qui a un seuil de réponse très bas. C'est pourquoi dans les études de thérapie génique, c'est surtout l'onde b qui est analysée. Dans le tableau 2 du premier article sont mentionnées les amplitudes des ondes a et b dans les différentes conditions de stimulations lumineuses recommandées par l'ISCEV. Lorsque l'on compare les réponses obtenues dans les yeux injectés par les vecteurs AAV2/2-CMV-*gfp* ou AAV2/4-CMV-*gfp* ou AAV2/5-CMV-*gfp*, il n'y a pas de différences avec les réponses obtenues dans les yeux non-injectés. Ceci montre, qu'après une injection sous-rétinienne, une fois que la rétine est réappliquée, les connections rétiniennes et intrarétiniennes se font à nouveau correctement. Le transfert du gène *gfp* et de ces éléments de régulation dans les photorécepteurs et les cellules de l'épithélium pigmentaires pour les sérotypes 2 et 5 et dans les cellules de l'EPR pour le sérotype 4 n'ont pas effet délétères sur l'activité électrique rétinienne. Bainbridge *et al.*, dans une étude similaire, ont noté une différence d'amplitudes des l'onde b entre les yeux ayant bénéficié du traitement par thérapie génique par le même AAV2/2.CMV.*gfp* et les yeux contrôles (Bainbridge *et al.*, 2003b). Le protocole d'examen utilisé pour l'ERG, dans l'étude de Bainbridge, n'est pas le même : l'intensité des stimulations lumineuses est progressivement augmentée en condition photopique, ce qui diffère du protocole de l'ISCEV. Cette différence d'enregistrement peut expliquer que nous ne sommes pas arrivés aux mêmes conclusions. Une seconde explication peut venir du volume de vecteur injecté. Dans notre étude, les volumes étaient compris entre 60 et 100 μ L alors que dans l'étude de Bainbridge ils étaient compris entre 200 et 400 μ L (Bainbridge *et al.*, 2003b). La zone rétinienne décollée a donc été plus importante or il a été montré qu'une rétine présente rapidement une décroissance de l'ERG en peropérateur lors du décollement (Hisatomi *et al.*, 2002). De plus, même après la réapplication de la rétine, une amplitude plus faible de l'ERG peut persister si la zone de rétine qui a été décollée est grande (Kim *et al.*, 1996; Luke *et al.*, 2001). Ces paramètres peuvent expliquer la différence entre nos 2 études. Néanmoins, dans une étude chez le primate, aucune différence entre les amplitudes d'ERG enregistrées au niveau des yeux injectés avec un AAV2/2-CMV-*gfp* et les amplitudes enregistrées au niveau des yeux non injectés n'a été mises en évidence 1 an après la chirurgie (Bennett *et al.*, 1999).

Au cours de notre travail, nous avons étudié, *in vivo*, la structure rétinienne par deux types d'angiographies qui utilisent un colorant différent. La première est l'angiographie à la fluorescéine. Elle a été développée dans les années 1970 et est actuellement une technique

de routine en ophtalmologie. Elle utilise un colorant : le fluorescéinate de sodium qui a la propriété d'être fluorescent lorsqu'il est excité par une longueur d'onde se situant entre 465 et 470 nm. Ce colorant, une fois excité, émet un signal qui peut être capté par le même appareil qui réalise de façon conjointe les excitations lumineuses, la captation du signal émis par le colorant excité et la prise de photographies du fond d'œil (= l'angiographe). Ce colorant après injection par voie intraveineuse va se lier pour 80% aux protéines plasmatiques. Les 20% qui restent libres vont pouvoir diffuser dans le tissu rétinien après leur passage dans les vaisseaux rétinien. L'analyse des séquences angiographiques après l'injection du colorant permet de détecter des anomalies de la circulation choroïdienne, de la rétine et du nerf optique. Le second type d'angiographie est l'angiographie infrarouge au vert d'indocyanine, le vert d'indocyanine est le nom du colorant utilisé. Elle a été utilisée dans ce premier travail de thèse chez le primate afin d'étudier la vascularisation choroïdienne. Récemment le développement d'angiographes numérisés CCD (Charge Couple Device) ainsi que la possibilité de production de vert d'indocyanine sans iode a permis le développement de cette technique surtout utilisée en clinique pour la caractérisation des néovaisseaux dans les dégénérescences maculaires liées à l'âge (Guyer *et al.*, 1992). Contrairement à la fluorescéine, le vert d'indocyanine utilisé pour cet examen se fixe totalement aux protéines plasmatiques, ce qui explique la faible diffusion aux travers des tissus rétinien. Cet examen permet l'étude plus précise de la choroïde. C'est la première étude évaluant le transfert de gènes qui a utilisé ces techniques d'évaluation clinique de la rétine. L'emploi des angiographies afin de connaître les effets du transfert de gènes sur la rétine ou les conséquences de ce transfert de gènes est une originalité de cet article. Pourtant, lorsque le traitement par thérapie génique chez l'homme aura été réalisé, il faudra pouvoir faire un parallèle entre les signes observés chez l'homme et ceux qui étaient préalablement présents lors des études chez les animaux. Dans les figures 2 et 3 de ce premier article, nous avons montré que seul le site de rétinotomie, qui permet l'injection sous-rétinienne, apparaît sous la forme d'un effet fenêtre (lésion hyperfluorescente) du fait d'une altération probable de l'épithélium pigmentaire rétinien au niveau du site de piqûre dans la rétine. Le reste de la zone rétinienne décollée lors de l'injection sous-rétinienne des différents vecteurs ne présente pas de signes angiographiques particuliers. Le transfert de gène *gfp* via les vecteurs AAV2/2-CMV-*gfp* ou AAV2/4-CMV-*gfp* ou AAV2/5-CMV-*gfp* ne modifie pas les séquences angiographiques

Second article

Restoration of vision in RPE65 null mutation dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium

Guylène Le Meur, Knut Stieger, Alexander Smith, Michel Weber, Jack Yves Deschamps, Delphine Nivard, Alexandra Mendes-Madeira, Nathalie Provost, Yann Péréon, Yan Cherel, Robin Ali, Christian Hamel, Philippe Moullier and Fabienne Rolling.



ORIGINAL ARTICLE

Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium

G Le Meur^{1,2}, K Stieger¹, AJ Smith³, M Weber^{1,2}, JY Deschamps⁴, D Nivard¹, A Mendes-Madeira¹, N Provost¹, Y Pèrèon⁵, Y Chereh⁶, RR Ali³, C Hamel⁷, P Moullier¹ and F Rolling¹

¹INSERM U649, CHU Hotel-Dieu, Nantes Cedex, France; ²CHU Hotel-Dieu, Service d'Ophthalmologie, Nantes, France; ³Division of Molecular Therapy, Institute of Ophthalmology, University College of London, London, UK; ⁴Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Service d'urgences, Nantes, France; ⁵CHU Hotel-Dieu, Laboratoire d'Exploration fonctionnelle, Nantes, France; ⁶INRA UMR 703, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, France and ⁷INSERM U583, Hôpital Saint-Eloi, Institut des Neurosciences de Montpellier, Montpellier, France

Previous studies have tested gene replacement therapy in RPE65-deficient dogs using recombinant adeno-associated virus 2/2 (rAAV2/2), -2/1 or -2/5 mediated delivery of the RPE65 gene. They all documented restoration of dark- and light-adapted electroretinography responses and improved psychophysical outcomes. Use of a specific RPE65 promoter and a rAAV vector that targets transgene expression specifically to the RPE may, however, provide a safer setting for the long-term therapeutic expression of RPE65. Sub-retinal injection of rAAV2 pseudotyped with serotype 4 (rAAV2/4) specifically targets the RPE. The purpose of our study was to evaluate a rAAV2/4 vector carrying a human RPE65cDNA driven by a human RPE65 promoter, for the ability to restore vision in RPE65^{-/-} purebred Briard dogs and to assess the safety of gene transfer with respect to retinal morphology and function. rAAV2/4 and rAAV2/2 vectors containing similar human RPE65 promoter and cDNA cassettes were generated and administered subretin-

ally in eight affected dogs, ages 8–30 months (n = 6 with rAAV2/4, n = 2 with rAAV2/2). Although fluorescein angiography and optical coherence tomography examinations displayed retinal abnormalities in treated retinas, electrophysiological analysis demonstrated that restoration of rod and cone photoreceptor function started as soon as 15 days post-injection, reaching maximal function at 3 months post-injection, and remaining stable thereafter in all animals treated at 8–11 months of age. As assessed by the ability of these animals to avoid obstacles in both dim and normal light, functional vision was restored in the treated eye, whereas the untreated contralateral eye served as an internal control. The dog treated at a later age (30 months) did not recover retinal function or vision, suggesting that there might be a therapeutic window for the successful treatment of RPE65^{-/-} dogs by gene replacement therapy. Gene Therapy advance online publication, 5 October 2006; doi:10.1038/sj.gt.3302861

Keywords: AAV4; retina; early onset retinal dystrophy; Leber congenital amaurosis; RPE65; canine model

Introduction

Inherited retinal dystrophies are a heterogeneous group of disorders that nearly always share one critical feature, degeneration of photoreceptors. Retinal dystrophies often lead to blindness and currently there are no effective treatments. The most common retinal dystrophy is retinitis pigmentosa (RP), affecting approximately 20 000 individuals in France.¹ Onset of RP is characterized by a severe night blindness, followed by a progressive constriction of the peripheral visual fields, and finally by central vision impairment, resulting in total blindness.

Leber congenital amaurosis (LCA) is a specific type of retinal dystrophy, more severe than RP and responsible

for infantile blindness. This congenital blindness has a worldwide prevalence of three in 100 000 newborns and affects 1000–2000 children in France. LCA was first described in 1869 by a German ophthalmologist, Theodor Leber. His original description is still used today and includes the following features: severe visual loss at or near birth, wandering nystagmus, amaurotic pupils and a pigmentary retinopathy. Non-detectable or a severely reduced electroretinogram is also recognized as an important diagnostic feature.² There are now eight genes identified, whose mutations cause LCA.^{3,4} These genes are all expressed preferentially in the photoreceptor cells or in the retinal pigment epithelium (RPE). In photoreceptors, these genes encode enzymes of the phototransduction cascade, photoreceptor-specific structural proteins or transcription factors. In the RPE, LCA-associated genes encode proteins involved in vitamin A (all-*trans* retinol) metabolism and recycling of retinoids between photoreceptors and RPE (visual cycle). A recent study reported a comprehensive mutational analysis

Correspondence: Dr F Rolling, Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM U649, CHU Hotel-Dieu, Bât. J. Monnet, 30 Avenue J. Monnet, 44035 Nantes, Cedex 01, France.
E-mail: fabienne.rolling@univ-nantes.fr
Received 9 June 2006; revised 3 August 2006; accepted 4 August 2006

of all the known genes in 179 unrelated patients. Accounting for most cases was GUCY2D (21.2%), followed by CRB1 (10%), RPE65 (6.1%), RPGRIP1 (4.5%), AIPL1 (3.4%), TULP1 (1.7%) and CRX (0.6%).³ Extrapolating from this report, one can then estimate that 100–200 LCA patients in France are carrying a mutation in the RPE65 gene. Currently, there are no effective treatments for these disorders and gene therapy offers an attractive approach to treatment. Recombinant adeno-associated virus 2 (rAAV2) vectors are among the most efficient gene delivery vehicles for treatment of retinal diseases, as the tropisms and transduction patterns of these vectors lead to efficient and stable gene transfer in RPE, photoreceptor and/or ganglion cells.³ Since the discovery of AAV2, over 100 AAV isolates have been described and more than 10 cloned for development as gene therapy vectors.^{6,7}

RPE65 is an abundant protein in the RPE and is associated with the microsomal membrane.^{9,9} It plays an essential role in vitamin A metabolism and is necessary for the synthesis of the visual pigment chromophore 11-*cis* retinal.¹⁰ Two recent studies have identified RPE65 as the isomerase that efficiently generates 11-*cis* retinol from all-*trans* retinyl ester.^{11,12} A number of mutations in the RPE65 gene are associated with inherited retinal dystrophies in humans^{13–15} and in dogs.^{16,17}

The fact that there are close similarities between humans and dogs, in terms of the clinical characteristics of disease resulting from RPE65 gene mutations, make the RPE65^{-/-} Briard a valuable model for the evaluation of gene replacement therapy. Two groups have now reported restoration of vision in beagle-Briard RPE65^{-/-} dogs^{18–21} using rAAV2/2-, rAAV2/1- or rAAV2/5-mediated delivery of an RPE65 gene.

The use of the native human RPE65 promoter and an rAAV vector that targets transgene expression specifically to the RPE might provide a safer approach for the long-term therapeutic expression of RPE65. We have previously demonstrated that, in contrast to rAAV2/2, rAAV2/4 allowed exclusive transduction of RPE in the rat, dog and primate.²²

The present study was designed to evaluate the efficacy of rAAV2/4-mediated gene therapy to restore vision in RPE65^{-/-} purebred Briard dogs and to assess the safety of gene transfer with respect to retinal morphology and function.

Results

Subretinal injection of AAV2/4.hrpe65 and AAV2/2.hrpe65 in RPE65^{-/-} Briard dogs

We have produced an AAV2 backbone containing a human RPE65cDNA gene driven by a human RPE65 promoter. The RPE65cDNA was placed under the control of a 1.6 kb fragment of its natural promoter in order to minimize ectopic expression of the transgene. The AAV2 backbone containing the therapeutic construct (hrpe65) was packaged as either rAAV2/2 or rAAV2/4.

A total of nine affected purebred Briards (A1–A9) were injected subretinally within the tapetal retina. The first six affected Briards (A1–A6) were treated with AAV2/4.hrpe65, whereas A7, A8 were injected with AAV2/2.hrpe65 (Table 1). An affected Briard (A9) was injected with vehicle alone, to serve as a negative control. In all animals, only one eye was treated, with the contralateral eye serving as an internal control for ophthalmic examination and vision testing. Based on our previous experience with subretinal injection in dogs and primates,^{22,25} our initial aim was to inject 400–500 μ l of vector suspension into each treated retina. We observed that in contrast to normal retinas, the retinal detachment, or bleb, created during subretinal injections in RPE65^{-/-} dogs was not reproducible in all animals, and was likely due to individual variation in retinal adhesion. The amount of vector injected therefore varied from 150 to 500 μ l.

Evaluation of retinal morphology after subretinal injection in Briard dogs

In order to monitor retinal morphology and eventual chorioretinal alterations owing to rAAV2/4- or rAAV2/2-mediated gene transfer, all dogs received ophthalmic examination including funduscopy, fluorescein angiography and optical coherence tomography (OCT). The fundus of the most pigmented eyes displayed hyperpigmentation that delineates the border of the bleb area (Figure 1a and e).

Surprisingly, the angiograms of all the subretinally injected affected Briards, except A2, displayed hyperfluorescent zones within the portion of the retina that was detached during the injection of the rAAV vector or vehicle (Figure 1a–e). These hyperfluorescent areas were detected as soon as 2 weeks post-injection (during the first

Table 1 List of dogs and rAAV doses injected

Animal	rAAV serotype	Vector titer (vg/ml)	Injected volume (μ l)	Age at injection (months)	ERG max. (μ V)			Vision
					ERG age (m.p.i.)	Treated	Untreated	
A1	AAV4	10 ¹¹	220	8	12	123	6	+
A2	AAV4	10 ¹¹	150	8	12	86	7	+
A3	AAV4	10 ¹¹	280	10	9	104	9	+
A4	AAV4	10 ¹¹	300	10	9	131	10	+
A5	AAV4	10 ¹¹	400	10	9	124	8	+
A6	AAV4	10 ¹¹	300	30	5	4	1	–
A7	AAV2	10 ¹¹	330	11	9	75	5	+
A8	AAV2	10 ¹¹	500	11	9	102	8	+
A9	Vehicle	—	300	11	9	6	5	–
NA	Vehicle	—	400	12	—	—	144, 155	+

Abbreviations: AAV4, adeno-associated virus 4; ERG, electroretinography; m.p.i., months post-injection; NA, non affected; rAAV, recombinant adeno-associated virus; vg, vector genome.

Gene Therapy

of all the known genes in 179 unrelated patients. Accounting for most cases was GUCY2D (21.2%), followed by CRB1 (10%), RPE65 (6.1%), RPGRIP1 (4.5%), AIPL1 (3.4%), TULP1 (1.7%) and CRX (0.6%).³ Extrapolating from this report, one can then estimate that 100–200 LCA patients in France are carrying a mutation in the RPE65 gene. Currently, there are no effective treatments for these disorders and gene therapy offers an attractive approach to treatment. Recombinant adeno-associated virus 2 (rAAV2) vectors are among the most efficient gene delivery vehicles for treatment of retinal diseases, as the tropisms and transduction patterns of these vectors lead to efficient and stable gene transfer in RPE, photoreceptor and/or ganglion cells.³ Since the discovery of AAV2, over 100 AAV isolates have been described and more than 10 cloned for development as gene therapy vectors.^{6,7}

RPE65 is an abundant protein in the RPE and is associated with the microsomal membrane.^{9,9} It plays an essential role in vitamin A metabolism and is necessary for the synthesis of the visual pigment chromophore 11-*cis* retinal.¹⁰ Two recent studies have identified RPE65 as the isomerase that efficiently generates 11-*cis* retinol from all-*trans* retinyl ester.^{11,12} A number of mutations in the RPE65 gene are associated with inherited retinal dystrophies in humans^{13–15} and in dogs.^{16,17}

The fact that there are close similarities between humans and dogs, in terms of the clinical characteristics of disease resulting from RPE65 gene mutations, make the RPE65^{-/-} Briard a valuable model for the evaluation of gene replacement therapy. Two groups have now reported restoration of vision in beagle-Briard RPE65^{-/-} dogs^{18–21} using rAAV2/2-, rAAV2/1- or rAAV2/5-mediated delivery of an RPE65 gene.

The use of the native human RPE65 promoter and an rAAV vector that targets transgene expression specifically to the RPE might provide a safer approach for the long-term therapeutic expression of RPE65. We have previously demonstrated that, in contrast to rAAV2/2, rAAV2/4 allowed exclusive transduction of RPE in the rat, dog and primate.²²

The present study was designed to evaluate the efficacy of rAAV2/4-mediated gene therapy to restore vision in RPE65^{-/-} purebred Briard dogs and to assess the safety of gene transfer with respect to retinal morphology and function.

Results

Subretinal injection of AAV2/4.hrpe65 and AAV2/2.hrpe65 in RPE65^{-/-} Briard dogs

We have produced an AAV2 backbone containing a human RPE65cDNA gene driven by a human RPE65 promoter. The RPE65cDNA was placed under the control of a 1.6 kb fragment of its natural promoter in order to minimize ectopic expression of the transgene. The AAV2 backbone containing the therapeutic construct (hrpe65) was packaged as either rAAV2/2 or rAAV2/4.

A total of nine affected purebred Briards (A1–A9) were injected subretinally within the tapetal retina. The first six affected Briards (A1–A6) were treated with AAV2/4.hrpe65, whereas A7, A8 were injected with AAV2/2.hrpe65 (Table 1). An affected Briard (A9) was injected with vehicle alone, to serve as a negative control. In all animals, only one eye was treated, with the contralateral eye serving as an internal control for ophthalmic examination and vision testing. Based on our previous experience with subretinal injection in dogs and primates,^{22,25} our initial aim was to inject 400–500 μ l of vector suspension into each treated retina. We observed that in contrast to normal retinas, the retinal detachment, or bleb, created during subretinal injections in RPE65^{-/-} dogs was not reproducible in all animals, and was likely due to individual variation in retinal adhesion. The amount of vector injected therefore varied from 150 to 500 μ l.

Evaluation of retinal morphology after subretinal injection in Briard dogs

In order to monitor retinal morphology and eventual chorioretinal alterations owing to rAAV2/4- or rAAV2/2-mediated gene transfer, all dogs received ophthalmic examination including funduscopy, fluorescein angiography and optical coherence tomography (OCT). The fundus of the most pigmented eyes displayed hyperpigmentation that delineates the border of the bleb area (Figure 1a and e).

Surprisingly, the angiograms of all the subretinally injected affected Briards, except A2, displayed hyperfluorescent zones within the portion of the retina that was detached during the injection of the rAAV vector or vehicle (Figure 1a–e). These hyperfluorescent areas were detected as soon as 2 weeks post-injection (during the first

Table 1 List of dogs and rAAV doses injected

Animal	rAAV serotype	Vector titer (vg/ml)	Injected volume (μ l)	Age at injection (months)	ERG max. (μ V)			Vision
					ERG age (m.p.i.)	Treated	Untreated	
A1	AAV4	10 ¹¹	220	8	12	123	6	+
A2	AAV4	10 ¹¹	150	8	12	86	7	+
A3	AAV4	10 ¹¹	280	10	9	104	9	+
A4	AAV4	10 ¹¹	300	10	9	131	10	+
A5	AAV4	10 ¹¹	400	10	9	124	8	+
A6	AAV4	10 ¹¹	300	30	5	4	1	–
A7	AAV2	10 ¹¹	330	11	9	75	5	+
A8	AAV2	10 ¹¹	500	11	9	102	8	+
A9	Vehicle	—	300	11	9	6	5	–
NA	Vehicle	—	400	12	—	—	144, 155	+

Abbreviations: AAV4, adeno-associated virus 4; ERG, electroretinography; m.p.i., months post-injection; NA, non affected; rAAV, recombinant adeno-associated virus; vg, vector genome.

Gene Therapy

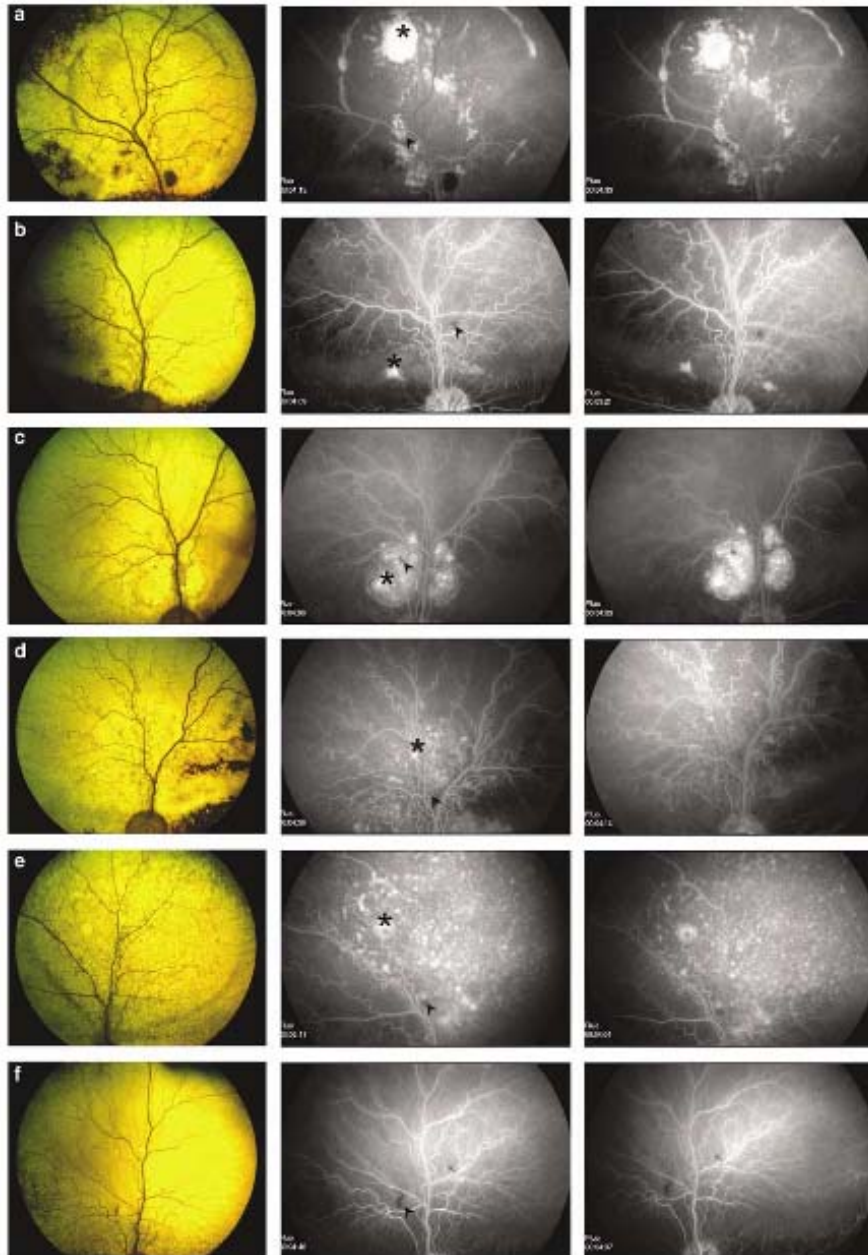


Figure 1 Fundus photographs and fluorescein angiograms of subretinally injected eyes in RPE65^{-/-} Briard dogs at 2 and 4 months post-injection. (a) A1 injected with AAV2/4.hrpe65, (b) A2 injected with AAV2/4.hrpe65, (c) A7 injected with AAV2/2.hrpe65, (d) A8 injected with AAV2/2.hrpe65, (e) A9 with vehicle alone and (f) non-affected injected with vehicle alone. The fundusoscopic appearance and a midphase (4–5 min) phase fluorescein angiogram of the RPE65^{-/-} dogs is shown. ► injection site; * hyperfluorescent areas.

angiography performed after the surgery) but did not expand overtime (up to 12 months post-injection). When compared with the fundus photographs, the hyperfluorescent areas detected on angiograms corresponded to the brighter areas observed in the fundus (Figure 1c and e). These abnormalities suggest that subretinal injections cause localized trauma leading to retinal thinning and cell destruction in that part of the retina which was detached during injection in RPE65^{-/-} dogs. Interestingly, these abnormalities have never been observed in normal beagle dogs, treated with either the AAV2/4.hrpe65 or with AAV2/2.hrpe65 vector (data not shown), or in non-affected Briard dogs treated with vehicle alone (Figure 1d).

OCT is a non-contact, non-invasive optical imaging technique that measures the intensity of backscattered light.^{24,25} OCT produces cross-sectional images of optical reflectivity in the tissue, analogous to B-scan ultrasonography, thus providing greater resolution by using light instead of sound waves. OCT imaging was performed in all treated animals in order to monitor the success of the subretinal injection and subsequent recovery from the initial subretinal bleb. OCT imaging at 15 min post-injection documented that the vector preparation was successfully injected in the subretinal

space, between the RPE and the photoreceptors in all nine dogs (Figure 2a, dog A2 as example). In all cases, retinas spontaneously flattened by 24–48 h post-injection and remained attached thereafter (Figure 2b and c). Long-term OCT monitoring documented the preservation of retinal thickness in most of the treated retinas in all animals (Figure 2c and e). However, some areas of the treated retinas that were hyperfluorescent on the fluorescein angiograms showed retinal thinning, suggesting cell destruction (Figure 2f).

Kinetics of retinal function recovery in treated Briard dogs

Retinal function was tested using simultaneous bilateral full-field flash electroretinography (ERG) before surgery and, in order to assess the kinetics of recovery of function, at different time-points post-injection. The same investigator (GL) recorded the ERGs in a standardized manner. Follow-up with ERG was 12 months post-injection for A1 and A2, 9 months for A3, A4, A5, A7 and A8, and 5 months for A6. The ERG profiles of A1 and A8, and 5 months for A6. The ERG profiles of A1 and A5 overtime are presented in Figure 3. The kinetics of recovery of function in all treated affected Briards are

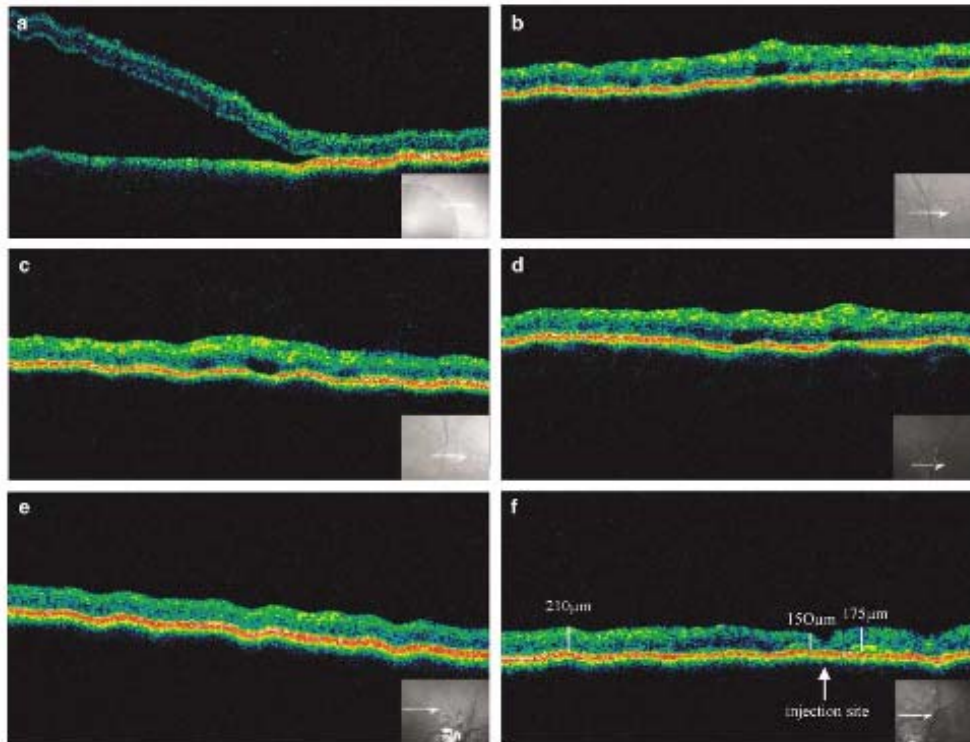


Figure 2 OCT images of subretinally injected eyes. (a) A2 treated eye at 15 min post-injection, at the edge of the bleb. (b and c) A2 treated eye, within the bleb area, at 2 and 8 months post-injection, respectively. (d) Non-affected control eye. (e) A7 treated eye at 6 months post-injection within the bleb area and outside the hyperfluorescent area observed by fluorescein angiography. (f) A7 treated eye at 6 months post-injection within the bleb area and inside the hyperfluorescent area observed by fluorescein angiography.

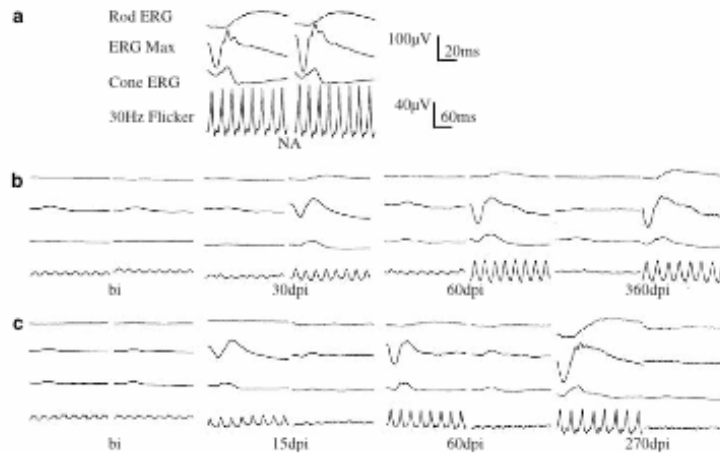


Figure 3 Bilateral full-field electroretinographic recordings of RPE65^{-/-} treated dogs. (a) Non-affected (NA) at 6 months of age. (b and c) A1 and A5 before and at different time-points post-injection. A1 was treated in the left eye and A5 was treated in the right eye. The top two recordings are low- and high-intensity scotopic responses, whereas the bottom two recordings show photopic responses (responses to light-adapted single flash and 30 Hz flicker stimuli, respectively).

presented in Figure 4. All affected Briards treated with AAV2/4.hrpe65 or AAV2/2.hrpe65 vector between the age of 8 and 11 months (A1–A5 and A7–A8, respectively) displayed rod and cone function recovery in the treated retina in contrast to A6 which was injected with AAV2/4.hrpe65 at the age of 30 months and to A9 which received the vehicle alone (Table 1, Figures 3 and 4). For the seven animals that displayed ERG improvements, restoration of rod and cone photoreceptor function started as soon as 15 days post-injection, was maximal at 3–4 months post-injection, and remained stable thereafter in all treated retinas. The cone-ERG response improved dramatically between 15 days and 2 months post-injection and increased slowly thereafter. The rod-ERG response gradually increased between 45 days and 3 months post-injection and remained stable thereafter. For example, in A1, the maximum recovered amplitude of the dark-adapted *b*-wave was 78% of unaffected RPE65^{-/-} dogs. The maximum recovered amplitude of the 30 Hz flicker amplitude is 70% of RPE65^{-/-} unaffected dogs. Although the general trend of ERG recovery is similar in all Briard dogs treated between the age of 8 and 11 months, individual variations were observed. In A2, for example, a dramatic improvement of the ERG response occurred later than in other animals and was observed between 3 and 4 months post-injection (ERG max. varied from 44 to 71 µV). This might be due to the smaller volume of AAV2/4.hrpe65 vector injected in A2 (150 µl) compared with A1, A3, A4 and A5 (220–400 µl). In spite of the larger volume of vector injected into the two AAV2/2.hrpe65-treated dogs (330 and 500 µl for A7 and A8, respectively), the onset of function recovery was slower than in AAV2/4.hrpe65 dogs (Figure 4). In a majority of the seven affected dogs with ERG improvements, the ERG max. levels obtained were correlated with the amount of AAV2/4.hrpe65 or AAV2/2.hrpe65 injected. A4 and A5, which received 300 and 400 µl of vector, respectively, showed better

recovery than did A2 and A3, which received 150 and 280 µl, respectively, of the same vector suspension. Similarly, between the AAV2/2.hrpe65-treated dogs, A8 (500 µl) displayed higher ERG max. than A7 (300 µl).

The full-field ERG reflects electrical activity summed across the entire retina and provides no information about local retinal activity. The development of the multifocal ERG (MF-ERG) technique allows to gain information about localized retinal function. MF-ERG has been demonstrated to be very useful in the detection of topographical distribution of disease in many inherited retinal degenerations.²⁶ The treated affected dog A1 was examined at 12 months post-injection with the RETiscan MF-ERG system using 61 equal sizing hexagonal elements within a visual field of approximately 32° radius. Trace arrays of recordings obtained in the untreated and treated eyes are presented in Figure 5. In the untreated right retina (Figure 5a), baseline or very low levels of MF-ERG amplitudes were detected across the stimulated area (ampl.b 0.4–5.2 nV/degree²). In the treated left retina (Figure 5b), high levels of amplitudes were found in the transduced area of the retina. Interestingly, a gradient in the MF-ERG amplitudes was observed between areas corresponding to the middle of the bleb (ampl.b 21.5 nV/degree²) and the edge of the bleb (12.5 nV/degree²). It is important to note that the maximum MF-ERG amplitude detected in the treated retina of A1 is lower (60%) than the one found in the unaffected dog (48.2 nV/degree²) (Figure 5b and c).

Restoration of vision

We evaluated vision in all nine treated Briards using behavioral testing at different time-points post-injection. This evaluation started at 150 days post-injection (d.p.i.) for A1 and A2, 60 d.p.i. for A3–A5 and 45 d.p.i. for A6–A9 (Table 2). Visual assessment was based on the ability to avoid obstacles in both dim and normal light. The obstacle course was arranged such that the

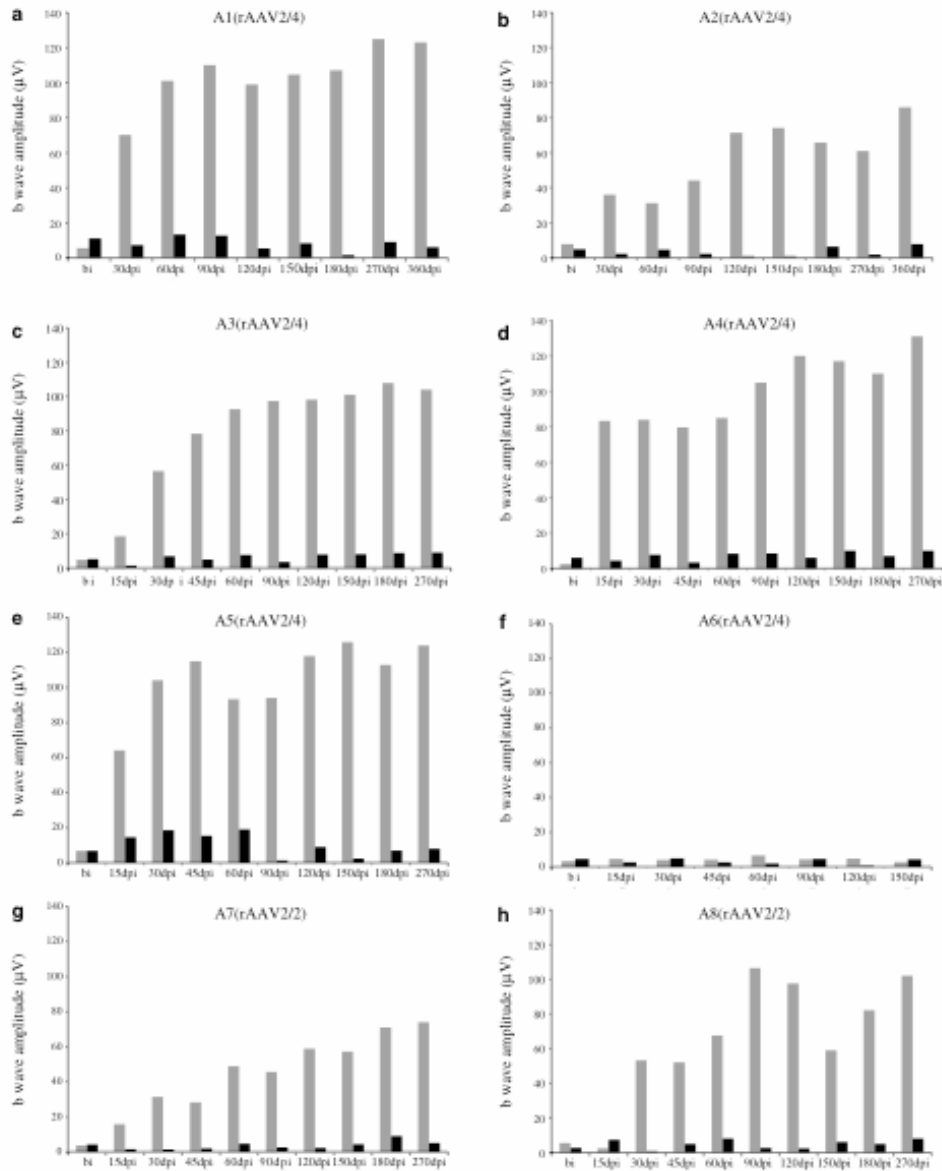


Figure 4 Kinetics of retinal function recovery in RPE65^{-/-} treated dogs. The b-wave amplitudes of the ERG max. (scotopic) of the treated and untreated eyes were measured at different times post-injection and reported in the graphs. (a) A1, (b) A2, (c) A3, (d) A4, (e) A5, (f) A6, (g) A7 and (h) A8. ■ treated eye; ■ untreated contralateral eye.

placement of obstacles was unique from trial to trial. Given that residual vision might have varied between affected individuals, we used the untreated contralateral eye as an internal control. All treated dogs, except A6, consistently avoided obstacles when the untreated eye

was covered with an opaque contact lens and the treated eye was left uncovered. However, when the opaque contact lens was placed on the injected eye and the untreated eye was left uncovered, dogs consistently failed to avoid obstacles (Supplementary video 1). It was

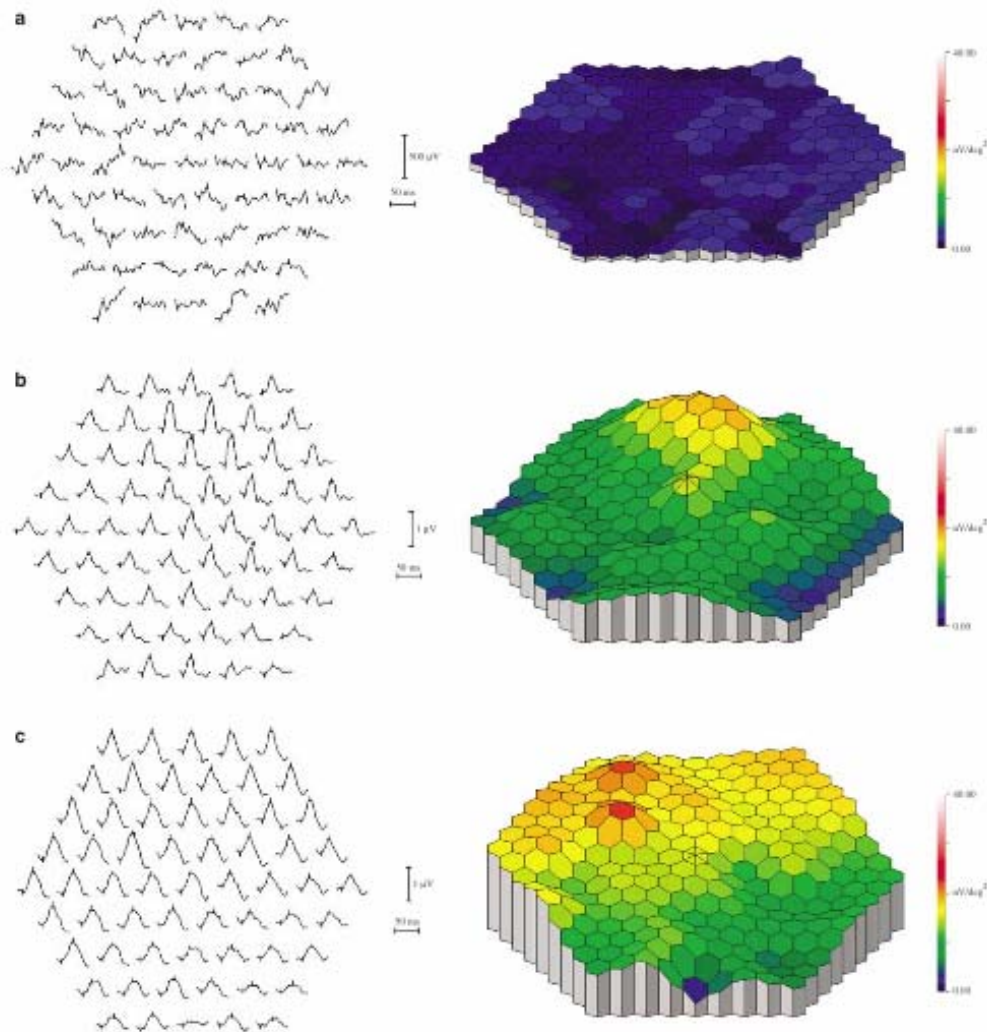


Figure 5 MF-ERG recordings of A1 at 12 months post-treatment, trace arrays and functional topography. (a) A1 right untreated eye, (b) A1 left treated eye and (c) control RPE65^{+/+}.

interesting to observe that restoration of vision was stable up to 12 months post-injection for A1 and A2 (duration of the experiment). A6 consistently failed to avoid obstacles.

Expression of RPE65 in treated eyes: immunocytochemistry and histopathology

All the treated dogs that responded to treatment were kept for long-term study. A6 was killed at 6 months post-injection for histological assessment of the retina. The right treated eye was used for immunocytochemical studies, whereas the uninjected contralateral eye was used for histopathological examination (Figure 6). The

eye receiving the AAV2/4.hrpe65 vector showed very distinct RPE65 labeling in the RPE cells of the treated area (Figure 6b). No other cells showed RPE65 protein expression; in particular, the photoreceptors remained RPE65 negative. The non-treated area of the retina did not display any RPE65 immunolabeling (Figure 6c). Although there were no appreciable differences in the thickness of the nuclear layers in comparison with equivalent regions of the retina from a normal dog (Figure 6d and e), the structure of the photoreceptor outer segments did not appear normal in A6 (Figure 6e).

In order to better evaluate the retinal alterations observed on the fluorescein angiograms and the OCT

Table 2 Evaluation of vision in treated dogs using behavioral testing

Animal	Days post-injection						
	45	60	90	150	180	240	360
A1	ND	ND	ND	+	+	+	+
A2	ND	ND	ND	+	+	+	+
A3	ND	+	+	+	+	+	ND
A4	ND	+	+	+	+	+	ND
A5	ND	+	+	+	+	+	ND
A6	-	-	-	-	-	-	Killed
A7	+	+	+	+	+	+	ND
A8	+	+	+	+	+	+	ND
A9	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviation: ND, not done.

images, A9, the mock-injected RPE65^{-/-} dog, was killed at 12 months post-injection and the injected eye was used for histopathology. Two types of lesions were observed. At the injection site that appears as a 'black spot' on the fluorescein angiogram (Figure 1e), accumulation of debris and macrophages is detected in the subretinal space (Figure 6f). In the transduced part of the retina showing hyperfluorescence on the fluorescein angiogram (Figure 1e), loss of RPE and photoreceptors outer segments was observed with disorganization of the inner and the outer nuclear layer (Figure 6g).

Discussion

In this study, we have demonstrated that a single subretinal injection of an rAAV2/4 vector containing a

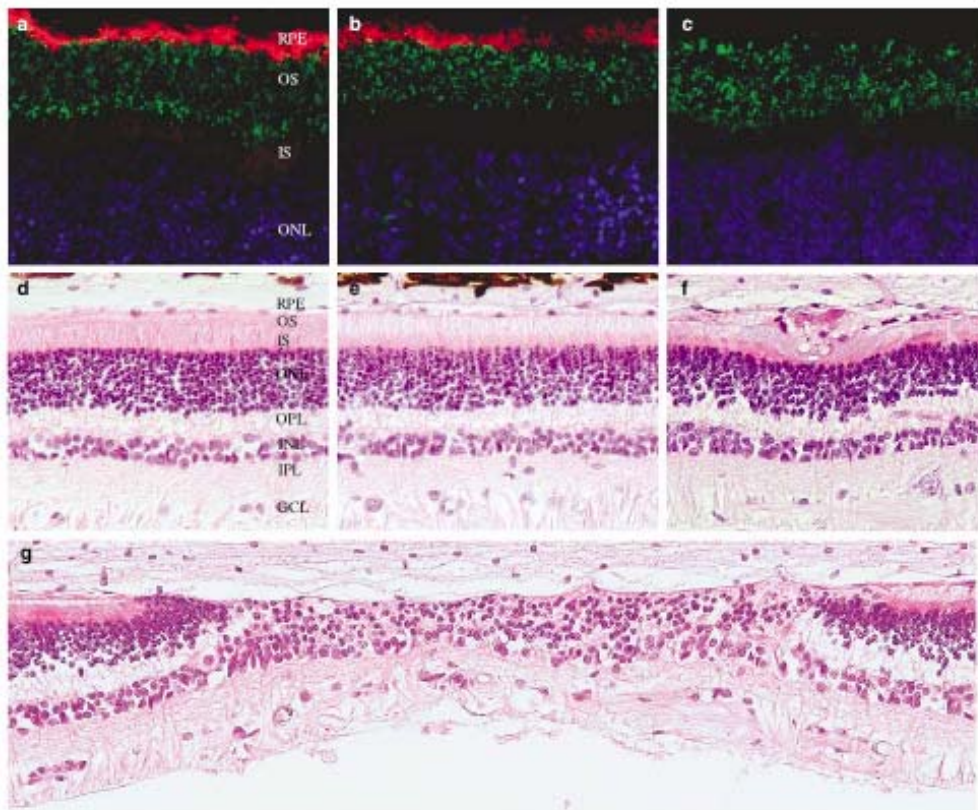


Figure 6 Retinal immunocytochemistry and histopathology. RPE65 immunolabeling (red) is detected in the RPE layer of a non-affected control eye (a), and in the injected area of the treated eye in A6 (b). No signal is detected in the eye of A6 outside of the injected area (c). Rhodopsin staining (green) in the rod outer segments remains unchanged in all three retinas. RPE, retinal pigment epithelium; OS, outer segments; IS, inner segments; ONL, outer nuclear layer. As observed on paraffin section, there were no appreciable differences in the thickness of the nuclear layers of comparable regions of the retina of a normal dog (d) with the untreated contralateral retina of A6 (e). Histological sections of the subretinally injected eye of A9 (vehicle only) illustrate the two types of lesions caused by the subretinal injection, one is located at the injection point (f) and the other correspond to the part of the retina that was hyperfluorescent on the fluorescein angiogram (g).

human-specific RPE65 promoter and cDNA, into five RPE65^{-/-} purebred Briard dogs aged between 8 and 11 months, restores retinal function and vision. Moreover, rescue of rod and cone function in these animals was as efficient, if not more efficient, than in dogs treated with an rAAV2/2 vector carrying the same therapeutic cassette. The dog treated at the age of 30 months, using the same batch of AAV2/4.hrpe65 vector, did not show any ERG or visual improvements despite expression of the therapeutic transgene.

The volume of vector suspension delivered in affected dogs varies from 150 to 500 μ l. We found that retinal adhesion differs between individual RPE65-deficient animals and this affected the size of the retinal detachment created during the subretinal injection. This variation, which has not been observed in the retina of normal dogs or primates,^{22,23,27} is likely to be associated with RPE65^{-/-} disease status. This type of complication may also occur in RPE65-deficient LCA patients and should be taken into account when designing gene therapy protocols. In contrast with the previous study by Narfstrom *et al.*,²⁰ we have never observed perioperative complications such as ocular inflammation or uveitis.

Fluorescein angiograms of the treated retina of all affected dogs, except A2, displayed areas of hyperfluorescence within those parts of the retina that were detached during the subretinal injection. The fact that normal beagle dogs, injected with the same rAAV2/4 or rAAV2/2 vector suspension, did not have this abnormality suggests that this phenomenon is not due to the vector itself. Moreover, A9, which was injected with vehicle only, also had similar hyperfluorescent spots as early as few days post-injection. For all injected eyes, the hyperfluorescent areas observed on the fluorescein angiograms did not expand overtime. As observed by OCT, some areas of the retina that are hyperfluorescent on the fluorescein angiograms displayed a reduction in normal retinal thickness, suggesting cell destruction. All together, these observations suggest that the abnormal retinal morphology found in treated affected Briard dogs is related to the retinal detachment created during subretinal injection of an RPE65^{-/-} affected retina. Similar structural alterations specific to subretinal injection of affected dogs has been previously described in one RPE65^{-/-} dog.²¹ The fact that angiograms and OCT are normal in A2 may be due to the small size of the bleb (only 150 μ l was injected) and therefore the small area of retinal detachment. In previous studies involving subretinal injection of rAAV vectors in normal dogs and macaques, such abnormalities were never observed.^{22,23,27}

Fortunately, the detected retinal abnormalities seen in all animals treated under a year of age did not prevent rescue of retinal function. All the treated dogs, except A6 that was treated at a much older age, showed retinal and visual functions. For most of the animals that displayed ERG improvements, restoration of rod and cone photoreceptor function started as soon as 15 days post-injection. Direct comparison between rAAV2/4- and rAAV2/2-treated animals suggested that rAAV2/4 displayed faster onset in restoration of retinal function. Although both vectors were of the same titer (10¹¹ vector genomes/ml (vg/ml)), one cannot exclude that the ratio between total particles and transducing units was different, especially as the vectors were produced by

different facilities. rAAV2/4 was produced by the vector core facility in Nantes and the rAAV2/2 was produced by Targeted Genetics (Seattle, WA, USA).

The striking behavioral improvements seen in the treated individuals was due entirely to functional restoration in the treated eye, as dogs consistently failed to avoid obstacles when the treated eye was covered. This also demonstrated that rAAV treatment in one eye does not lead to improved visual function in the contralateral eye in the dog model. The same observation was made in the rd12 mice, carrying a recessive nonsense RPE65 mutation, treated with a AAV5-CBA-hrpe65 vector.²⁸ Although recombinant RPE65 protein was expressed in the transduced retina of A6 (as observed by immunocytochemistry), no rescue of function or vision was observed in this affected Briard following treatment at the age of 30 months. In RPE65^{-/-} patients or dogs, reduced vision is consistent with two possible disease mechanisms or a combination thereof: (i) an interrupted retinoid cycle that is potentially treatable by RPE65 gene replacement, and (ii) death and loss of photoreceptors. It is not clear why defects in RPE65 produce cell death. In RPE65^{-/-} mice, it has been reported that it is the activation of phototransduction by unliganded opsin, and not the accumulation of retinyl ester, which causes light-independent retinal degeneration in LCA.²⁹ Thinning of the retina was not observed in A6, suggesting that the photoreceptors were still alive but with abnormal outer segments. It is possible that at 30 months of age, in this dog, dysfunction of RPE or photoreceptors prevented rescue of vision. Additional studies on a larger cohort of older RPE65^{-/-} dogs will be required to elucidate this question.

In conclusion, we have demonstrated that targeted gene transfer to the RPE followed by cell-specific transgene expression using a rAAV2/4 vector, can be used to correct the RPE65 defect in RPE65^{-/-} purebred Briard dogs, leading to the stable restoration of normal retinal function and vision-dependent behavior. The main potential advantage for the use of an rAAV2/4 vector that targets transgene expression specifically to the RPE is to provide a safer approach to treat LCA patients. Although the problem of retinal alterations linked to the subretinal injection in RPE65^{-/-} retina does not prevent the rescue of vision, it is important to be aware of this potential complication when designing gene therapy protocols. Subretinal injection of the therapeutic vector will have to be performed outside the fovea. Finally, the relative contributions of dysfunction or cell death to the extreme visual loss in human RPE65 deficiency are unknown. However, analysis of our results in dogs suggests that for successful gene therapy to occur in humans, patients should be treated at a relatively young age.

Materials and methods

AAV-2/4.hrpe65 vector

Construct pD10-hRPE65P-hRPE65, used for the production of both AAV2/4-hrpe65 and AAV2/2-hrpe65, consists of the coding sequence of the human RPE65cDNA between a fragment of the human RPE65 promoter (bp -1556 to +23 relative to the transcription start site) and an simian virus 40 polyadenylation site. This expression

cassette was cloned replacing the CMV-GFP cassette of construct AAV-CMV-GFP,³⁰ which contains the ITRs of AAV2. The AAV2/4.hrpe65 vector was produced as previously described by Rabinowitz *et al.*³¹ in the Vector Core at the University Hospital of Nantes (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>). The AAV2/2.hrpe65 vector (provided by Targeted Genetics Corporation, Seattle, WA, USA) was produced using the B50 AAV2 packaging cell line and an Ad/AAV hybrid containing the same rAAV construct that was used to make the AAV2/4.hrpe65 vector.³²

For both rAAV vectors, the titer was determined by dot blot and is expressed as vg/ml.³³ The titers were 10^{12} and 10^{11} vg/ml for rAAV-2/2 and rAAV-2/4, respectively. The rAAV2/2 was diluted in order to generate 10^{11} vg/ml aliquots.

Subretinal injection

A colony of Briard dogs carrying the RPE65 null mutation was developed at the Boisbonne Center (Veterinary School of Nantes). All animals were cared for in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. The subretinal injections were performed via a transvitreal approach, following vitrectomy. Procedures were conducted on dogs under isoflurane gas anesthesia as previously described by Weber *et al.*²³ The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes.

Fluorescein angiography

Pupils of the animals were dilated 20 min before anesthesia using tropicamide (Ciba Vision Faure, Novartis, Annonay, France) and phenylephrine hydrochloride (10% Neosynephrine, Novartis). Animals were anesthetized with an intravenous injection of ketamine (Imalgène, Rhone Merieux, France) and medetomidin (Domitor, Pfizer, Paris, France). Fluorescein angiography were imaged using a Canon UVI retinal camera connected to a digital imaging system (Lhedioph Win Software, Lheritier SA, Saint-Ouen-l'Aumône, France). Sodium fluorescein solution (fluorescein sodique Faure 10%, Ciba Vision Ophthalmics, 0.1 mg/Kg) was injected intravenously. The photograph sequence, using barrier filters, was begun after injection with the fluorescein exciter and continued until the dye was eliminated from circulation.

Optical coherence tomography

Retinal morphology was assessed by OCT (Stratus 3000, Zeiss, Oberkochen, Germany). Dilatation of the pupils and intravenous anesthesia of the animals were performed as described above. Examination was performed at different time-points post-injection, by doing a 3 mm scan in the area of the bleb in the injected eye and the corresponding area of the contralateral, non-injected eye.

Electroretinography

Global retinal function was tested using simultaneous bilateral flash photopic and scotopic ERG. ERGs were recorded in a standardized manner, according to the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) protocols,³⁴ using a computer-based system (Neuropack μ MEB-9102K, Nikon-Kohden, Tokyo,

Japan) and contact lens electrodes (ERGjet, Microponent, Le Cret-du-Lozier, Switzerland). Bandpass filter cutoff frequencies were 1 and 100 Hz for all measurements. Analysis time was 100 ms. The *a*-wave amplitude was measured from the baseline to the *a*-wave peak and the *b*-wave amplitude was measured from the *a*-wave peak to the *b*-wave peak, whereas flicker amplitude was measured peak to peak. The uninjected eye served as a within animal control.

MF-ERG

MF-ERG responses of A1 were obtained with the RETIscan system (Roland Consult, Wiesbaden, Germany), using 61 equal sizing hexagonal elements within a visual field of approximately 32° radius. The stimulus was presented on a 21-inch monitor viewed at 24 cm distance within a central 64° total visual field (visual angle of 32°). Each hexagon element changed in time between black and white (contrast was approximately 98%) following a binary *m*-sequence. Each hexagon was modulated at the frequency of 60 Hz with an on/off-probability of 0.5. The traces produced by the computational procedure were twice smoothed by an algorithm within the software (RETIscan version 3.15).

Data acquisition consisted of eight sessions of 47 s each. The signals were band pass-filtered with a high cutoff at 100 Hz and a low cutoff at 1 Hz. By cross-correlation analysis between stimulation patterns and their responses, 61 focal mfPERGs can be displayed, and shown in the figures in their relative topographical positions. The position of the treated area of the A1 retina was evaluated using a binocular indirect ophthalmoscope.

Behavioral studies

We recorded ambulation of treated and untreated RPE65^{-/-} dogs through an obstacle course in both dim and normal light using a camcorder. An opaque lens, specifically designed for dogs, was used to alternatively cover the treated or the untreated eye. The number of collisions through the obstacle course was compared between the course for which the untreated eye was covered and the course in which the treated eye was covered.

Histopathology and immunocytochemistry

Eyecups were obtained from normal and affected dogs and were either processed by a 4% paraformaldehyde fixation, for embedding in inclusion compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and immunocytochemistry, or fixed for 48 h in Bouin's solution, followed by paraffin embedding for histopathological examination. For immunocytochemical studies, 10 μ m sections of OCT embedded retinas were thawed and rehydrated with phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). The sections were blocked with 5% bovine serum albumin in 0.1% PBS/Tween for 20 min at room temperature, and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies in blocking solution: mouse monoclonal anti-Rho-4D2 antibody (1:100; kindly provided by Dr Molday, Vancouver, Canada) and rabbit polyclonal anti-RPE65 antibody (1:200; this antibody was raised against the full-length recombinant RPE65 protein, and purified on a protein A column). After washing with PBS, sections were incubated with fluorescein isothiocyanate-conju-

cassette was cloned replacing the CMV-GFP cassette of construct AAV-CMV-GFP,³⁰ which contains the ITRs of AAV2. The AAV2/4.hrpe65 vector was produced as previously described by Rabinowitz *et al.*³¹ in the Vector Core at the University Hospital of Nantes (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>). The AAV2/2.hrpe65 vector (provided by Targeted Genetics Corporation, Seattle, WA, USA) was produced using the B50 AAV2 packaging cell line and an Ad/AAV hybrid containing the same rAAV construct that was used to make the AAV2/4.hrpe65 vector.³²

For both rAAV vectors, the titer was determined by dot blot and is expressed as vg/ml.³³ The titers were 10^{12} and 10^{11} vg/ml for rAAV-2/2 and rAAV-2/4, respectively. The rAAV2/2 was diluted in order to generate 10^{11} vg/ml aliquots.

Subretinal injection

A colony of Briard dogs carrying the RPE65 null mutation was developed at the Boisbonne Center (Veterinary School of Nantes). All animals were cared for in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. The subretinal injections were performed via a transvitreal approach, following vitrectomy. Procedures were conducted on dogs under isoflurane gas anesthesia as previously described by Weber *et al.*²³ The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes.

Fluorescein angiography

Pupils of the animals were dilated 20 min before anesthesia using tropicamide (Ciba Vision Faure, Novartis, Annonay, France) and phenylephrine hydrochloride (10% Neosynephrine, Novartis). Animals were anesthetized with an intravenous injection of ketamine (Imalgène, Rhone Merieux, France) and medetomidin (Domitor, Pfizer, Paris, France). Fluorescein angiography were imaged using a Canon UVI retinal camera connected to a digital imaging system (Lhedioph Win Software, Lheritier SA, Saint-Ouen-l'Aumône, France). Sodium fluorescein solution (fluorescein sodique Faure 10%, Ciba Vision Ophthalmics, 0.1 mg/Kg) was injected intravenously. The photograph sequence, using barrier filters, was begun after injection with the fluorescein exciter and continued until the dye was eliminated from circulation.

Optical coherence tomography

Retinal morphology was assessed by OCT (Stratus 3000, Zeiss, Oberkochen, Germany). Dilatation of the pupils and intravenous anesthesia of the animals were performed as described above. Examination was performed at different time-points post-injection, by doing a 3 mm scan in the area of the bleb in the injected eye and the corresponding area of the contralateral, non-injected eye.

Electroretinography

Global retinal function was tested using simultaneous bilateral flash photopic and scotopic ERG. ERGs were recorded in a standardized manner, according to the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) protocols,³⁴ using a computer-based system (Neuropack μ MEB-9102K, Nikon-Kohden, Tokyo,

Japan) and contact lens electrodes (ERGjet, Microponent, Le Cret-du-Loisic, Switzerland). Bandpass filter cutoff frequencies were 1 and 100 Hz for all measurements. Analysis time was 100 ms. The *a*-wave amplitude was measured from the baseline to the *a*-wave peak and the *b*-wave amplitude was measured from the *a*-wave peak to the *b*-wave peak, whereas flicker amplitude was measured peak to peak. The uninjected eye served as a within animal control.

MF-ERG

MF-ERG responses of A1 were obtained with the RETIscan system (Roland Consult, Wiesbaden, Germany), using 61 equal sizing hexagonal elements within a visual field of approximately 32° radius. The stimulus was presented on a 21-inch monitor viewed at 24 cm distance within a central 64° total visual field (visual angle of 32°). Each hexagon element changed in time between black and white (contrast was approximately 98%) following a binary *m*-sequence. Each hexagon was modulated at the frequency of 60 Hz with an on/off-probability of 0.5. The traces produced by the computational procedure were twice smoothed by an algorithm within the software (RETIscan version 3.15).

Data acquisition consisted of eight sessions of 47 s each. The signals were band pass-filtered with a high cutoff at 100 Hz and a low cutoff at 1 Hz. By cross-correlation analysis between stimulation patterns and their responses, 61 focal mfPERGs can be displayed, and shown in the figures in their relative topographical positions. The position of the treated area of the A1 retina was evaluated using a binocular indirect ophthalmoscope.

Behavioral studies

We recorded ambulation of treated and untreated RPE65^{-/-} dogs through an obstacle course in both dim and normal light using a camcorder. An opaque lens, specifically designed for dogs, was used to alternatively cover the treated or the untreated eye. The number of collisions through the obstacle course was compared between the course for which the untreated eye was covered and the course in which the treated eye was covered.

Histopathology and immunocytochemistry

Eyecups were obtained from normal and affected dogs and were either processed by a 4% paraformaldehyde fixation, for embedding in inclusion compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and immunocytochemistry, or fixed for 48 h in Bouin's solution, followed by paraffin embedding for histopathological examination. For immunocytochemical studies, 10 μ m sections of OCT embedded retinas were thawed and rehydrated with phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). The sections were blocked with 5% bovine serum albumin in 0.1% PBS/Tween for 20 min at room temperature, and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies in blocking solution: mouse monoclonal anti-Rho-4D2 antibody (1:100; kindly provided by Dr Molday, Vancouver, Canada) and rabbit polyclonal anti-RPE65 antibody (1:200; this antibody was raised against the full-length recombinant RPE65 protein, and purified on a protein A column). After washing with PBS, sections were incubated with fluorescein isothiocyanate-conju-

gated donkey anti-mouse (1:400) and tetramethyl rhodamine isothiocyanate-conjugated donkey anti-rabbit (1:200) secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Europe Ltd, Newmarket, UK) diluted in blocking solution for 2 h at room temperature. After washing with PBS, nuclei of photoreceptors were stained by incubation with TOPRO-3 (1:1000; Molecular Probes Inc., Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in blocking solution for 30 min at room temperature. Sections were mounted with antifade medium (ProLong Antifade Kit, Molecular Probes Inc.) and examined by epifluorescence microscopy (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). For histopathological examinations, paraffin-embedded sections were stained using a standard hematoxylin-eosin-saffranin staining protocol and viewed with bright-light microscopy and differential interference contrast optics (Nikon, France).

Acknowledgements

We thank Matthew Ellinwood for critical reading and editing. We also thank the Vector Core (www.vectors.nantes.inserm.fr) at the University Hospital of Nantes, supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), INSERM and the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire. This work was also supported by the French Lions Club and the Lions Clubs International foundation (LCIF). We thank the Association du Berger de Brie and the Fédération des Aveugles et Handicapés Visuels de France. We also thank Graham Holder and Chris Hogg for assistance with the ERG.

References

- 1 Kaplan J, Bonneau D, Frezal J, Munnich A, Dufier JL. Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 1990; **85**: 635–642.
- 2 Koenekoop RK. An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol* 2004; **49**: 379–398.
- 3 Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbé F, Ducroq D et al. Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat* 2004; **23**: 306–317.
- 4 Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbé F, Ducroq D, Dollfus H et al. Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 2004; **75**: 639–646.
- 5 Auricchio A, Rolling F. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases. *Curr Gene Ther* 2005; **5**: 339–348.
- 6 Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 2005; **5**: 299–310.
- 7 Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 2005; **5**: 285–297.
- 8 Hamel CP, Tsilou E, Pfeffer BA, Hooks JJ, Detrick B, Redmond TM. Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated *in vitro*. *J Biol Chem* 1993; **268**: 15751–15757.
- 9 Bavik CO, Busch C, Eriksson U. Characterization of a plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* 1992; **267**: 23035–23042.
- 10 Thompson DA, Gal A. Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res* 2003; **22**: 683–703.

- 11 Jin M, Li S, Moghrabi WN, Sun H, Travis GH. Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* 2005; **122**: 449–459.
- 12 Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma JX. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 12413–12418.
- 13 Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C et al. Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 1997; **17**: 139–141.
- 14 Gu SM, Thompson DA, Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A et al. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 1997; **17**: 194–197.
- 15 Lorenz B, Gyurus P, Preising M, Bremser D, Gu S, Andrassi M et al. Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 2735–2742.
- 16 Aguirre GD, Baldwin V, Pearce-Kelling S, Narfstrom K, Ray K, Acland GM. Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Mol Vis* 1998; **4**: 23.
- 17 Veske A, Nilsson SE, Narfstrom K, Gal A. Retinal dystrophy of Swedish Briard/Briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. *Genomics* 1999; **57**: 57–61.
- 18 Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001; **28**: 92–95.
- 19 Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bencicelli J et al. 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* 2005; **12**: 1072–1082.
- 20 Narfstrom K, Katz ML, Bragadottir R, Seeliger M, Boulanger A, Redmond TM et al. Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 1663–1672.
- 21 Narfstrom K, Vaegan, Katz M, Bragadottir R, Rakoczy EP, Seeliger M. Assessment of structure and function over a 3-year period after gene transfer in RPE65^{-/-} dogs. *Doc Ophthalmol* 2005; **111**: 39–48.
- 22 Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* 2003; **7**: 774–781.
- 23 Le Meur G, Weber M, Pereaon Y, Mendes-Madeira A, Nivard D, Deschamps JY et al. Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates. *Arch Ophthalmol* 2005; **123**: 500–506.
- 24 Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W et al. Optical coherence tomography. *Science* 1991; **254**: 1178–1181.
- 25 Fujimoto JG, Brezinski ME, Tearney GJ, Boppart SA, Bouma B, Hee MR et al. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nat Med* 1995; **1**: 970–972.
- 26 Hologian K, Seiple W, Greenstein VC, Hood DC, Carr RE. Local cone and rod system function in progressive cone dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 2364–2373.
- 27 Stieger K, Le Meur G, Lasne F, Weber M, Deschamps JY, Nivard D et al. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther* 2006; **13**: 967–975.
- 28 Pang JJ, Chang B, Kumar A, Nusinowitz S, Noorwez SM, Li J et al. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. *Mol Ther* 2005; **10**: 10.



- 29 Woodruff ML, Wang Z, Chung HY, Redmond TM, Fain GL, Lem J. Spontaneous activity of opsin apoprotein is a cause of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 2003; **35**: 158–164.
- 30 Zhang X, De Alwis M, Hart SL, Fitzke FW, Inglis SC, Bournsnel ME et al. High-titer recombinant adeno-associated virus production from replicating amplicons and herpes vectors deleted for glycoprotein H. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 2527–2537.
- 31 Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; **76**: 791–801.
- 32 Gao GP, Qu G, Faust LZ, Engdahl RK, Xiao W, Hughes JV et al. High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 2353–2362.
- 33 Salvetti A, Oreye S, Chadeuf G, Favre D, Cherel Y, Champion-Arnaud P et al. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 695–706.
- 34 Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc Ophthalmol* 1998; **97**: 143–156.

Supplementary Information accompanies the paper on Gene Therapy website (<http://www.nature.com/gt>)

II. DISCUSSION DU SECOND ARTICLE

L'objectif de ce second travail était d'évaluer l'effet d'un traitement par un vecteur AAV de sérotype 4, qui cible spécifiquement les cellules de l'épithélium pigmentaire dans un des modèles canins de l'Amaurose Congénitale de Leber : le chien briard RPE65^{-/-}. Huit chiens RPE65^{-/-}, âgés de 8 à 30 mois au moment de la chirurgie, ont été injectés par un AAV2/2.RPE65.*rpe65* pour deux d'entre eux et par un AAV2/4.RPE65.*rpe65* pour les autres. La restauration de la fonction visuelle, évaluée par des électrorétinogrammes, a été observée dès quinze jours après le traitement. La restauration de la vision, testée par un parcours d'obstacles, apparaît environ 2 mois après la chirurgie. L'utilisation d'angiographies à la fluorescéine et d'exams OCT (tomographe par cohérence optique) nous ont permis d'évaluer les effets de la chirurgie et du transfert de gène sur la rétine chez les chiens RPE65^{-/-}traités.

2.1. Administration du vecteur thérapeutique

➤ Injection sous-rétinienne versus injection intravitréenne

Le type ou mode d'injection intra-oculaire est important pour la réussite du traitement de thérapie génique corrective *rpe65*. En effet, dans deux publications, les injections intravitréennes du vecteur thérapeutique AAV2.CMV.*rpe65* ou AAV2.CAG.*rpe65* chez les chiens RPE65^{-/-} ne permettent pas une restauration de l'électrorétinogramme (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003a). Il est logique que ce mode d'injection du vecteur ne soit pas efficace. En effet, l'injection intravitréenne d'un AAV de sérotype 2 cible les cellules ganglionnaires (Dudus *et al.*, 1999; Guy *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2001a; Folliot *et al.*, 2003). Or la protéine RPE65 est une protéine associée, pour la grande majorité, à la membrane du réticulum endoplasmique de l'EPR (Bavik *et al.*, 1992; Hamel *et al.*, 1993). C'est pourquoi apporter dans les cellules ganglionnaires de la protéine RPE65 par transfert de gène ne peut avoir aucun effet car la protéine RPE65 doit être située dans l'EPR pour que la boucle de recyclage du all-*trans* retinal puisse reprendre. D'autant plus que chez l'homme, la présence de la protéine RPE65 dans d'autres cellules rétinienne que les cellules de l'EPR n'a pas été prouvée (Kociok *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1998; Znoiko *et al.*, 2002). C'est pourquoi dans notre

étude, nous avons réalisé uniquement des injections sous-rétiniennes afin de cibler les cellules de l'EPR.

➤ Choix du site de l'injection sous- rétinienn

Le fond d'oeil canin est divisé en deux zones : le tapétum lucidum, situé dans la partie centrale et supérieure, qui permet d'augmenter les capacités visuelles des chiens à l'obscurité en faisant réfléchir la lumière vers les photorécepteurs et la partie pigmentée (tapétum nigrum) située à la partie inférieure du fond d'œil et à la périphérie de la partie supérieure (Clerc, 1997). De manière statistiquement significative, Acland et *al* retrouvent une récupération fonctionnelle, mesurée par ERG, plus importante dans les yeux qui ont été injectés dans la partie du tapétum lucidum ou dans la partie supérieure du fond d'œil comparés aux yeux qui ont été injectés dans la partie inférieure pigmentée ; que ce soit pour les réponses des bâtonnets ou pour les réponses des cônes (Acland *et al.*, 2005). Dans notre étude, les injections ont toutes été réalisées dans le tapétum lucidum avec plus ou moins de débordement vers les zones supérieures adjacentes, en fonction du volume injecté en sous rétinienn chez les chiens RPE65^{-/-}. Nous avons choisi ce site d'injection, car les injections réalisées dans la partie inférieure pigmentée donnent des bulles sous-rétiniennes qui se ré-appliquent plus rapidement (résultats non publiés). Cette ré-application plus précoce induit un contact moins long du vecteur avec les cellules cibles, ce qui peut diminuer le taux d'efficacité de la transduction tissulaire. Le temps nécessaire pour l'entrée du vecteur dans une cellule *in vivo* n'a pas été déterminé mais *in vitro* avec un AAV2 sauvage, Bartlett et *al* ont montré que deux tiers des particules virales attachées à la membrane cellulaire seraient internalisées après 10 minutes de contact avec cette cellule (Bartlett *et al.*, 2000). Une seconde particularité du fond d'œil canin nous a fait opter pour une injection sous rétinienn dans la zone supérieure de la rétine chez les chiens RPE65^{-/-}. En effet chez le chien, l'area centralis est située dans la partie supérieure de la rétine en temporal du nerf optique. Cette zone est la zone la plus dense en photorécepteurs. On peut donc penser que le traitement par thérapie génique corrective rpe65 de la zone de la rétine qui contient cette area centralis chez les chiens RPE65^{-/-} peut permettre une récupération fonctionnelle plus importante. C'est d'ailleurs les constatations réalisées par l'équipe d'Acland qui a observé une amplitude plus forte de l'ERG pour les animaux qui ont été traités dans la zone supérieure comparés aux amplitudes des ERG des animaux traités dans la zone inférieure (Acland *et al.*, 2005). Les injections sous rétiniennes chez les chiens RPE65^{-/-} dans notre étude ont donc été réalisées dans la partie supérieure de la rétine pour les deux

particularités évoquées : une bulle sous-rétinienne persistant plus longtemps et la présence de l'area centralis.

➤ Effets délétères

Nous avons pu observer que près du site d'injection et dans cette zone décollée pendant la chirurgie, il survenait des modifications rétinienne au niveau de cette zone. Ces modifications sont visibles, rapidement après la chirurgie, sur les angiographies à la fluorescéine (Figure 1). Ces altérations rétinienne apparaissent sous la forme de zones hyperfluorescentes lors des angiographies, elles sont stables dans le temps car il n'y a pas de modifications entre nos deux examens réalisés à 2 et à 4 mois post-injection. Ces anomalies apparaissent uniquement chez les chiens malades RPE65^{-/-} qu'ils soient injectés avec un vecteur AAV2/4.RPE65.*rpe65* ou avec un vecteur AAV2/2.RPE65.*rpe65*. De même, nous avons observé les mêmes altérations rétinienne chez les chiens RPE65^{-/-} injectés en sous-rétinien uniquement avec la solution de tampon (aqsia®). Il faut noter que les solutions de vecteurs utilisées (AAV2/2.RPE65.*rpe65* et AAV2/4.RPE65.*rpe65*) ont été testées par injection sous-rétinienne chez des beagles sains sans que ne soient apparues au niveau de la rétine et particulièrement au niveau de la zone rétinienne injectée d'altérations rétinienne lors des examens angiographiques ou lors des examens OCT (résultat non publiés). Nous avons constaté que ces modifications rétinienne chez les chiens RPE65^{-/-} étaient, également, visibles lors de l'examen par OCT où la rétine apparaît plus fine dans ces zones qui apparaissent altérées aux angiographies (Figure 2). L'examen histologique de cette zone hyperfluorescente chez un chien RPE65^{-/-} injecté en sous-rétinien par la solution tampon aqsia® a mis évidence une désorganisation de la couche nucléaire interne et externe de la rétine associée à une perte de cellules de l'EPR et des segments externes des photorécepteurs (Figure 6). Dans notre expérience au sein du laboratoire, nous n'avons jamais noté de telles altérations rétinienne lors d'examens angiographiques après des injections sous-rétiniennes chez le chien sain ou chez le primate sain. Que ce soit lors d'une injection d'AAV2, 4 ou 5 codant pour la GFP (Le Meur *et al.*, 2005) ou lors d'une injection d'un AAV4 ou 5 TetOn.*epo* (Stieger *et al.*, 2006). Lors de ces deux études citées, certains animaux avaient bénéficié d'une vitrectomie avant la chirurgie, ce qui nous laisse penser que cette pratique chirurgicale n'est pas à l'origine de ces altérations rétinienne. D'ailleurs, Narfström a décrit le même type d'altération angiographique chez un chien RPE65^{-/-} après l'injection sous rétinienne d'un AAV2/2.CMV.*rpe65* sans réalisation préalable d'une vitrectomie (Narfstrom *et al.*, 2005). De même, les modifications histologiques que nous avons observées ont été décrites par Jacobson chez les chiens RPE65^{-/-} suite à une injection

sous-rétinienne d'AAV2/2.CAG. *rpe65* sans vitrectomie (Jacobson *et al.*, 2006a). Il semble que du fait de la dégénérescence rétinienne, la rétine des animaux RPE65^{-/-} soit plus fragile et par conséquent plus sensible au décollement lors d'une injection sous-rétinienne. Car quel que soit le vecteur utilisé, ces altérations surviennent. Ce risque sera à prendre en considération lors de l'établissement des protocoles d'essais cliniques chez l'homme. Car même la réalisation précoce des injections sous-rétiniennes chez l'homme, afin de se prémunir d'une potentielle fragilité rétinienne, risque de ne pas permettre d'éviter ces altérations car il a été décrit des anomalies rétinienne (amincissement de la couche nucléaire externe, désorganisation de la couche interne, inclusions dans les cellules de l'EPR) dans l'œil d'un fœtus humain RPE65^{-/-} âgé seulement de 33 semaines (Porto *et al.*, 2002). Toutefois, l'étude récente de Jacobson (Jacobson *et al.*, 2006b), réalisée chez des primates, a mis en évidence que des lésions rétinienne survenaient dans la zone où l'aiguille a transpercé la rétine ; altérations que nous avons noté lors d'angiographies à la fluorescéine réalisées chez les chiens ou le primate sains, injectés en sous rétinien par un AAV de sérotype 2, 4 ou 5 portant le transgène *gfp* sous le contrôle du promoteur CMV (Le Meur *et al.*, 2005). L'étude de Jacobson a démontré, également, que lorsque la macula était soulevée, il apparaissait des lésions fovéolaires lors de l'examen histologique (Jacobson *et al.*, 2006b). Dans cette étude, l'examen histologique, réalisé une semaine après l'injection sous-rétinienne du vecteur AAV2/2.CAG.*rpe65* chez 4 primates, a retrouvé des trous rétinienne avec une rétine adjacente décollée où des cellules gliales, des cellules de l'EPR et des mélanophages ont été détectés près de la zone de la rétinotomie nécessaire à l'injection. Ce même type de lésions a été retrouvé chez les deux primates témoins injectés en sous-rétinien par une solution tampon. Dans l'étude histologique réalisée à 3 mois chez 6 primates injectés en sous-rétinien par l'AAV2/2.CAG.*rpe65*, la désorganisation des couches rétinienne dans la zone de contact avec l'aiguille a été mise en évidence sans autre complications au terme de ces trois mois. Il faut noter que les bulles sous-rétiniennes effectuées chez ces primates incluait un décollement de la macula. L'examen histologique de la zone fovéolaire a mis en évidence des remaniements de la fovéa avec plus ou moins un décollement rétinien persistant à 3 mois (Jacobson *et al.*, 2006b). La présence de pigments entre les photorécepteurs et les cellules de l'EPR a, également, été notée lors de l'examen histologique que ce soit chez les primates injectés avec le vecteur ou avec la solution témoin (Jacobson *et al.*, 2006b). En conclusion, la zone rétinienne, où est réalisée la rétinotomie qui permet l'injection sous-rétinienne d'un vecteur thérapeutique ou d'une solution tampon, est remaniée à l'examen angiographique, à l'examen histologique, que l'injection soit réalisée chez des animaux sains ou chez des chiens RPE65^{-/-} (Le Meur *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2006b; Le Meur *et al.*, 2006). Par contre, une altération rétinienne survenant dans la rétine décollée en dehors de la zone de rétinotomie

ne semble survenir que chez les chiens malades RPE65^{-/-} (Narfstrom *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2006a; Le Meur *et al.*, 2006).

➤ Dose de vecteur à injecter

Du fait de la variabilité de décollement de la rétine chez les chiens RPE65^{-/-} à cause de la fragilité rétinienne liée à la maladie rétinienne, les différents chiens n'ont pas reçu la même dose de vecteur. Ce qui nous a permis de mettre en évidence que la valeur de l'amplitude ERG récupérée dépendait de la dose de vecteur injectée (Figure 4). Plus le volume de vecteur est important, et par conséquent plus la dose de particules du vecteur est importante, plus l'amplitude de l'onde b de l'ERG Max regagné est grande. Les chiens A4 et A5, qui ont été injectés respectivement avec 300 μ L et 400 μ L d'AAV2/4.RPE65.*rpe65*, ont une amplitude de l'onde b de l'ERG max à 131 μ V et 124 μ V. Ce qui représente les plus fortes valeurs de récupération d'amplitude d'ERG. Alors que le chien A2, qui a été injecté avec le plus faible volume (150 μ L) d'AAV2/4.RPE65.*rpe65*, a regagné l'amplitude de l'onde b de l'ERG Max la plus faible à 86 μ V (Figure 4). Les doses de vecteurs que nous avons injectées sont comprises entre $1,5 \cdot 10^{10}$ à $4 \cdot 10^{10}$ particules par injection pour le vecteur AAV2/4.RPE65.*rpe65* et de $3,3 \cdot 10^{10}$ à $5 \cdot 10^{10}$ pour le vecteur AAV2/2.RPE65.*rpe65*. Il est difficile de comparer les résultats de notre étude et les résultats des autres études en terme de comparaison résultats d'ERGs obtenus/dose de vecteur utilisé. La méthode de titration de la solution de vecteur n'a pas été réalisée de la même façon pour chacune des études. Dans notre étude (Le Meur *et al.*, 2006) comme dans celles de Narfström (Narfstrom *et al.*, 2003a; Narfstrom *et al.*, 2005), la titration des solutions de vecteurs a été effectuée par dot blot alors que pour les autres études les titres ont été déterminés par PCR quantitative (Acland *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2006a). De plus entre les différents laboratoires, les méthodes de production et de purification ne sont pas les mêmes. Une purification par chromatographie sur colonne d'héparine a été utilisée pour l'étude de Narfström (Narfstrom *et al.*, 2003a; Narfstrom *et al.*, 2005) et une ultracentrifugation sur gradient de iodixanol plus FPLC pour celle de l'équipe Acland-Jacobson (Acland *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2006a). En ce qui concerne les préparations de vecteurs utilisés dans notre étude, elles ont été purifiées par double chlorure de césium pour les AAV4 sauf pour le chien A16. La préparation d'AAV4*, injectée chez A16, a été purifiée par FPLC et produite selon un protocole se rapprochant du GMP (« Good manufacturing practices») qui pourrait être utilisé pour la phase clinique (Le Meur *et al.*, 2006). Ces variations induisent une impossibilité de comparaison quantité de vecteurs injectée/récupération électrorétinographique entre les

différentes études. Du moins tant qu'il n'existe pas d'unité « étalon » qui permette de comparer directement les valeurs des titres des vecteurs produits au travers du monde dans divers laboratoires. Toutefois, les deux autres équipes, qui ont publié sur ce sujet, retrouvent cette notion de dose-réponse. Pour l'équipe de Narfström lors d'une injection en sous-rétinien d'un faible volume (environ 50 μ L) du vecteur AAV2/2.CMV.*rpe65* (ce qui correspond à 1.10^{11} particules), les chiens RPE65^{-/-} récupèrent très peu de réponses fonctionnelles aux ERGs où seule la valeur de l'onde a en condition scotopique en forte luminosité est significativement différente entre les yeux opérés et les yeux contrôles non traités (8 μ V contre 2 μ V) (Ford *et al.*, 2003). Par contre, les chiens injectés en sous-rétinien avec le même vecteur mais avec un volume plus important (environ 100 μ L, ce qui correspond à 2.10^{11} particules) récupèrent un ERG détectable et amélioré de façon significative pour toutes les conditions lumineuses testées (Ford *et al.*, 2003). Par exemple, l'amplitude de l'onde a en condition scotopique en forte luminosité est de 24 μ V pour les yeux traités par le vecteur AAV2/2.CMV.*rpe65* contre 2 μ V pour les yeux non traités (Ford *et al.*, 2003). Pour l'équipe d'Acland, seules les amplitudes ERG des chiens, injectés par l'AAV2/2.CAG.*rpe65*, ont été comparées (Jacobson *et al.*, 2006a). Pour cette étude, les doses injectées sont comprises entre de 1.10^8 à $4,5.10^{12}$ particules par injection sous-rétinienne. Que ce soit pour la réponse des cônes ou pour celle des bâtonnets, les amplitudes sont plus grandes pour les plus fortes doses à $4,5.10^{12}$ particules. Pour les doses à 1.10^8 particules par injection, les amplitudes d'ERG diffèrent peu des amplitudes des ERGs des chiens RPE65^{-/-} n'ayant pas eu de traitement (Jacobson *et al.*, 2006a).

La dose semble aussi importante pour la sécurité de la rétine. En effet, Jacobson montre qu'une inflammation oculaire apparaît pour les plus fortes doses ($4,5.10^{12}$ particules par injection) de vecteur AAV2/2.CAG.*rpe65* (Jacobson *et al.*, 2006a). On sait, qu'au début des études de transfert du gène *rpe65* chez les chiens Rpe65, les équipes d'Acland et Narfström ont rapporté le problème d'uvéites post-opératoires (Narfstrom *et al.*, 2003a; Acland *et al.*, 2005). Ces problèmes étaient liés à une purification incomplète des solutions de vecteurs, mais dans la publication où Jacobson rapporte ce problème inflammatoire lors d'injection de fortes doses de vecteur, la pureté de la solution de vecteur utilisé avait été vérifiée donc une autre origine doit être recherchée. Dans notre étude, nous n'avons pas remarqué d'apparition d'inflammation post-opératoire que ce soit avec la solution d'AAV2/2 ou d'AAV2/4. Nous avons choisi, pour injecter les animaux, un titre de la solution de vecteur à 10^{11} Vg/ml. Car dans les études précédentes faites au laboratoire de Thérapie génique U649, ce titre de solution de vecteurs a été défini comme optimal pour le transfert de gène dans la rétine. En effet, les doses de vecteurs injectées, comprises entre 5.10^{10} et $2,4.10^{11}$

particules, ont montré une innocuité au niveau de la rétine chez le rat, le chien et le primate pour les sérotypes 2, 4 et 5 de l'AAV (Weber *et al.*, 2003; Le Meur *et al.*, 2005). De plus, nous avons effectué plusieurs essais, non publiés, testant l'effet sur la toxicité rétinienne de la variation du titre de la solution de vecteur injectée. Lorsque le titre de la solution de vecteur AAV injecté en sous-rétinien chez le rat dépasse 10^{12} Vg/ml, nous avons constaté une toxicité rétinienne. Lors d'une injection sous-rétinienne chez le rat d'un vecteur AAV à un titre de 10^{11} vg/ml, 100% des cellules rétiniennees sont transduites dans la zone traitée. Par contre, dès que le titre atteint $5 \cdot 10^{11}$ vg/ml, une toxicité instantanée sur les cellules rétiniennees a été observée au cours de ces travaux préalables. Notre hypothèse est que, lors de l'utilisation d'une solution de vecteur à un titre de $5 \cdot 10^{11}$ vg/ml, le taux de particules par cellule rétinienne doit être trop élevé, ce qui est responsable de la toxicité immédiate constatée sur la rétine. En conclusion, il faut noter que la dose de vecteur délivrée est essentielle pour l'efficacité de la thérapie mais aussi pour éviter l'apparition d'une toxicité rétinienne. Nous avons défini « notre titre optimal » à 10^{11} Vg/ml.

➤ Âge du chien au moment du traitement

L'âge du chien au moment de l'injection semble, également, être un point important. Le chien RPE65^{-/-} que nous avons injecté à l'âge de 30 mois (A6) n'a pas récupéré de fonction visuelle. Nous n'avons détecté aucune réponse électrorétinographique, ni aucune amélioration de la fonction visuelle lors des tests comportementaux (Figure 4 et Tableau 2). L'histologie, réalisée au niveau de l'œil controlatéral du chien A6 (Figure 6e), retrouve une désorganisation dans la couche des segments externes des photorécepteurs comme il est décrit dans la littérature chez les chiens RPE65^{-/-} (Wrigstad *et al.*, 1992; Aguirre *et al.*, 1998). Les photorécepteurs sont encore présents chez cet animal avec le reste de la morphologie de ces cellules qui semble être normale. Acland *et al.* ont publié le cas d'un chien injecté en sous rétinien à un âge 8 mois qui n'a pas récupéré de fonction rétinienne à l'ERG (Acland *et al.*, 2005). Par contre chez ce chien, l'analyse des différents rétinoïdes présents dans la rétine a mis en évidence la présence de 11-*cis* retinal (Acland *et al.*, 2005). La présence du 11-*cis* retinal signe la reprise du cycle de recyclage du all-*trans* retinal de l'épithélium pigmentaire rétinien. Ce qui signifie que le transfert du gène *rpe65* a été efficace chez ce chien mais qu'il doit falloir une certaine dose de 11-*cis* retinal pour voir les signes d'une restauration fonctionnelle à l'ERG (Acland *et al.*, 2005). Dans notre étude concernant ce chien âgé 30 mois, nous n'avons pu analyser la production de 11-*cis* retinal car nous ne disposons que d'un seul œil injecté qui a fait l'objet d'une étude immunohistologique.

L'explication concernant cet « échec » fonctionnel reste donc en suspend car Acland et Narfström ont injecté des animaux âgés de 1 an à plus de 2 ans avec une restauration de la réponse à l'ERG (Ford *et al.*, 2003; Narfstrom *et al.*, 2003b; Acland *et al.*, 2005). Cette différence de résultats entre notre étude et celles d'Acland et de Narfström est-elle liée à une différence dans la vitesse de survenue de la dégénérescence rétinienne, qui pourrait, elle-même, être liée à la différence de pureté de race entre les modèles canins RPE65^{-/-} des différentes études? En effet, notre modèle canin est un pure race briard (Le Meur *et al.*, 2006) alors que le modèle canin des deux études sus-citées est la résultante d'un croisement briard-beagle (Narfstrom *et al.*, 2003b; Acland *et al.*, 2005). Pour appuyer cet unique résultat, il faudrait réaliser d'autres injections sous-réiniennes d'AAV4.RPE65.*rpe65* chez des chiens RPE65^{-/-} âgés également de 30 mois afin de vérifier ce résultat qui laisse supposer qu'il existe une fenêtre temporelle pour effectuer le traitement. La perte des photorécepteurs qui survient dans la dégénérescence rétinienne pourrait être une explication possible à cette fenêtre temporelle. Mais chez le chien A6 (Figure 6e), les photorécepteurs sont encore présents. Par contre, on ne sait pas s'ils sont fonctionnels. En effet, les photorécepteurs dans les dégénérescences réiniennes meurent par apoptose. Il est possible, qu'une fois la cellule photoréceptrice engagée dans cette voie apoptotique, elle ne puisse plus revenir en arrière, sans qu'au tout début du processus une différence d'aspect histologique dans le photorécepteur puisse être notable. Cette hypothèse est peut-être une explication à cet « échec » de récupération fonctionnelle. Dans cet objectif, des études orientées sur l'évaluation de l'apoptose au niveau des photorécepteurs seraient peut-être susceptibles d'apporter une explication à cet échec.

2.2. Comparaison de l'efficacité du transfert du gène *rpe65* entre les sérotypes 2 et 4 d'AAV

Dans les études de thérapie génique corrective *rpe65* réalisées par les autres équipes chez le chien RPE65^{-/-} (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003a), les vecteurs AAV injectés en sous-rétinien chez les chiens sont de sérotype 2. Sauf dans sa dernière étude, Acland a injecté dans 4 yeux RPE65^{-/-}, en sous-rétinien, un AAV de sérotype 1 portant le transgène *rpe65* sous le contrôle du promoteur CAG, dans 4 autres yeux RPE65^{-/-} un AAV2/1.RPE65.*rpe65* et dans 6 autres yeux RPE65^{-/-} un AAV2/5.CAG.*rpe65*. Il a été démontré que le sérotype 1 ciblait les cellules de l'épithélium pigmentaire quand il est injecté

en sous-rétinien chez des embryons de souris âgés de 14 jours (Dejneka *et al.*, 2004), le tropisme dans la rétine après la naissance n'a pas été décrit. Il est décrit qu'après une injection sous-rétinienne, le sérotype 5 transduit les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien et les photorécepteurs (Rabinowitz *et al.*, 2002). Par contre, aucune précision concernant l'efficacité et le résultat fonctionnel obtenu suite à ces injections d'AAV de sérotypes différents n'est précisée dans l'étude (Acland *et al.*, 2005). L'amélioration de l'enregistrement de l'ERG suite aux injections des différents vecteurs AAV dans l'étude d'Acland permet une restauration des réponses des cônes et des bâtonnets (Acland *et al.*, 2005). Dans la première étude publiée, l'administration du vecteur AAV2/2.CAG.*rpe65*, par voie sous-rétinienne chez des chiots RPE65^{-/-} âgés de 4 mois permet de retrouver des amplitudes électrorétinographiques enregistrables. L'amplitude des ERGs photopiques et scotopiques s'est améliorée et correspond à 16% de l'amplitude des ERGs d'un chien briard normal (Acland *et al.*, 2001). Narfström rapporte qu'avec une injection sous-rétinienne d'un AAV2/2.CMV.*rpe65* il faut un 1 mois pour obtenir une réponse électrorétinographique chez les chiens opérés (Narfstrom *et al.*, 2005). La moyenne des amplitudes de l'onde b de l'ERG Max, mesurées chez 5 chiens RPE65^{-/-} injectés par un AAV2/2.CMV.*rpe65*, décroît sur les 33 mois de suivi et est compris entre 67,9+/- 6,1 μ V pour les premiers mois et 37+/-12,3 μ V pour les derniers mois.

Toutefois, il est impossible de comparer les amplitudes électrorétinographiques des différentes études pour deux raisons. La première est que les vecteurs n'ont pas été produits dans les mêmes laboratoires. Nous avons abordé, précédemment, l'impossibilité de comparer les titres de solutions de vecteurs produites dans différentes unités. Donc une corrélation dose injectée, résultats ERG obtenus entre les différentes études est impossible. De plus, la seconde raison est que les protocoles de réalisations des électrorétinogrammes ne sont pas identiques entre les différentes études (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003a; Acland *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2006a). Le matériel utilisé pour la réalisation et pour l'enregistrement des ERGs n'est pas le même pour les différentes études. De même, les protocoles de stimulations lumineuses utilisés pour la réalisation des ERGs sont différents. Donc, il n'est pas possible de comparer les amplitudes d'ERG obtenues par les différentes équipes suite à la thérapie génique chez les chiens RPE65^{-/-} et par conséquent les comparaisons entre les sérotypes ne peuvent être réalisées qu'au sein de chaque étude. Dans notre travail, nous avons injecté un vecteur AAV de sérotype 2 et un vecteur AAV de sérotype 4, les deux vecteurs portant la même cassette d'expression : le gène *rpe65* sous le contrôle du promoteur RPE65. L'évaluation des deux sérotypes peut être réalisée au sein de notre travail car les chiens sont nés de mêmes portées de briard pure race, les chirurgies sont identiques, les cassettes d'expression sont identiques, les méthodes

de réalisations de ERGs aussi. Seule la capsid du vecteur diffère entre les deux vecteurs AAV testés. Lorsque nous réalisons la comparaison entre les amplitudes des ERGs obtenues en fonction du sérotype d'AAV injecté, il semble que l'AAV de sérotype 2 induise une réponse électrorétinographique plus lente que le sérotype 4 (Figure 4). En effet, il faut au moins 1 mois pour obtenir une réponse ERG distincte du bruit de fond électrorétinographique avec le sérotype 2. Par contre dès 15 jours post-injection avec le sérotype 4, on obtient une réponse distincte voire quasi maximale (Chien A4 de la Figure 4). Dès 3 mois, l'amplitude de l'onde b de l'ERG Max est maximale pour le sérotype 2 et pour le sérotype 4 (Figure 4). Ces différences de cinétiques, dans l'apparition et dans l'expression du transgène en fonction du sérotype de vecteurs recombinants AAV avaient été décrites pour le transgène *gfp*. Notre étude laisse suggérer une autre différence dans les réponses obtenues avec les sérotypes 2 et 4 de l'AAV. Les chiens RPE65^{-/-} qui ont été injectés avec le vecteur de sérotype 2 ont des amplitudes de l'onde b de l'ERG Max plus faible que les chiens opérés avec le sérotype 4. Ceci pour des volumes de vecteur injecté équivalent avec un titre équivalent (chiens A4, A14 et chiens A7, A17 du tableau 2 complémentaire et Figure 15). Cette différence en défaveur du sérotype 2 a été retrouvée pour les quatre chiens opérés avec le vecteur AAV2/2.RPE65.*rpe65*. Les âges des chiens, au moment des injections, ne peuvent pas être considérés comme un facteur de variation car ces âges sont dans les mêmes fourchettes pour chacun des sérotypes injectés. Par exemple, les chiens A14 (sérotype 4) et A17 (sérotype2) (Tableau 2 complémentaire) ont été injectés à l'âge de 7 mois. Dans nos mains, l'utilisation du sérotype 4 pour le transfert du gène thérapeutique *rpe65* chez les chiens RPE65^{-/-} semble permettre une restauration de l'ERG le plus proche de l'ERG des chiens non atteints car l'amplitude de l'onde b des ERG Max pour les chiens traités avec le sérotype 4 est compris entre 87 μ V et 174 μ V, excepté pour le chien A13. Ce chien A13 est le chien qui a été injecté le plus précocement, lors de la chirurgie, la rétine était plus difficilement décollable, ce qui nous laisse penser que le temps de contact entre les cellules de l'EPR et la solution de vecteur n'a pas été assez longue pour obtenir un transfert de gène suffisamment efficace. Les amplitudes retrouvées chez le chien non atteint sont de l'ordre de 150 μ V (tableau 2 complémentaire). L'amplitude de l'onde b des ERG Max pour les chiens traités avec le sérotype 2 est compris entre 66 μ V et 105 μ V.

Après l'étude de l'aspect quantitatif de la restauration de l'ERG, nous nous sommes intéressés à l'aspect qualitatif de la restauration de l'ERG. En effet, lors de l'enregistrement d'un ERG, les réponses des différentes cellules rétinienne à une stimulation lumineuse peuvent être déduites de l'enregistrement réalisé (Marmor and Zrenner, 1998; Narfstrom *et al.*, 2002). L'activité des cônes est enregistrée lors d'un flicker ou d'une stimulation en condition lumineuse forte. L'activité des bâtonnets est enregistrée dans l'obscurité avec une faible stimulation lumineuse. L'onde a donne une vision de l'activité des photorécepteurs,

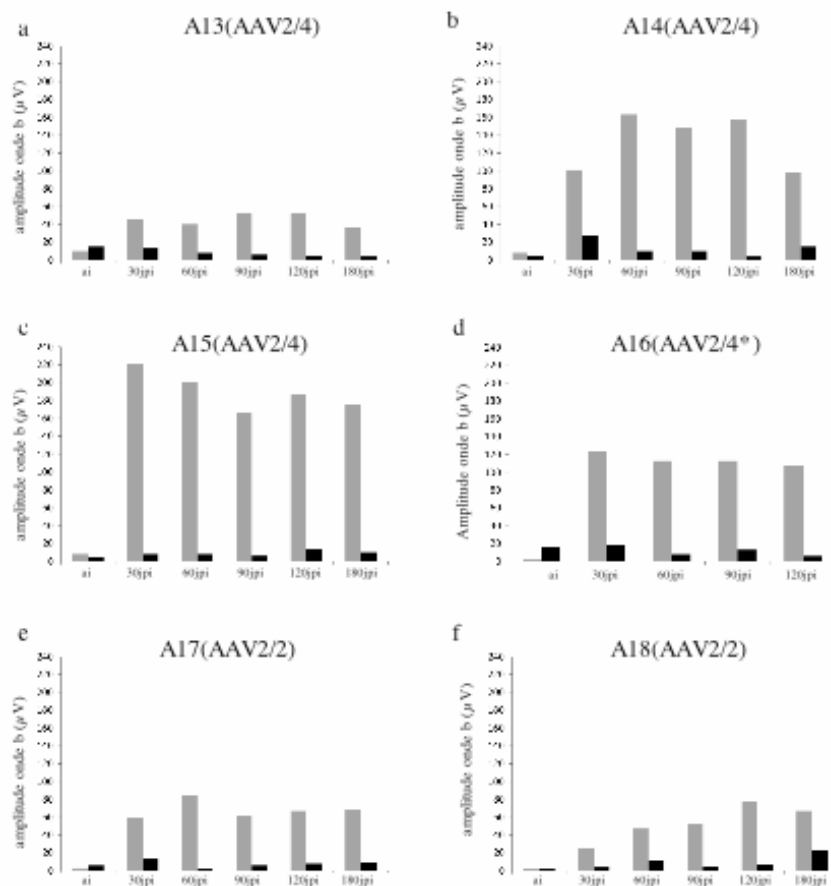
l'onde b des cellules de Müller et des couches internes de la rétine. Les potentiels oscillatoires représentent l'activité des cellules amacrines (Voir Figure complémentaire 16 pour localisation des différentes ondes sur un enregistrement ERG). Nous avons pu remarquer que ce soit avec le vecteur *AAV2/2.RPE65.rpe65* ou le vecteur *AAV2/4.RPE65.rpe65* que les courbes d'ERG obtenues représentaient une restauration de l'activité des cônes et des

Animal	rAAV serotype	Vector titer (vg/ml)	Injected volume (μ l)	Age at injection (months)	ERG max(μ v)			Vision
					ERG age(mpi)	Treated	Untreated	
A1	AAV4	10 ¹¹	220	8	18	138	10	+
A2	AAV4	10 ¹¹	150	8	18	87	7	+
A3	AAV4	10 ¹¹	280	10	12	104	14	+
A4	AAV4	10 ¹¹	300	10	12	133	4	+
A5	AAV4	10 ¹¹	400	10	12	145	9	+
A6	AAV4	10 ¹¹	300	30	5	4	1	-
A7	AAV2	10 ¹¹	330	11	12	105	6	+
A8	AAV2	10 ¹¹	500	11	12	104	10	+
A9	vehicle	-	300	11	9	6	5	-
NA	vehicle	-	400	12	-	-	144, 155	+
A13	AAV4	10 ¹¹	440	7	6	43	3	+
A14	AAV4	10 ¹¹	520	7	6	98	10	+
A15	AAV4	10 ¹¹	650	7	6	174	10	+
A16	AAV4*	10 ¹¹	400	11	4	107	6	+
A17	AAV2	10 ¹¹	520	7	6	68	8	+
A18	AAV2	10 ¹¹	370	7	6	66	6	+

AAV4*, purifié par FPLC ; vg, vector genome; mpi, months post injection

Résultats complémentaires (2)

Tableau 2: tableau récapitulatif précisant la liste des chiens traités, ainsi que pour chaque animal le sérotype et de la dose d'AAV injecté, l'âge du chien au moment du traitement, les amplitudes de l'onde b de l'ERG max et les résultats des tests comportementaux.



Résultats complémentaires (2)

Figure 15: Cinétique de recouvrement de la fonction rétinienne, évaluée par l'ERG max, chez les chiens briards Rpe65^{+/+} A13 à A18. L'amplitude de l'onde b de l'ERG max des yeux traités et des yeux non traités a été mesurée à différents temps après l'injection sous rétinienne du vecteur et les valeurs ont été reportées sur les graphes. (a) A13, (b) A14, (c) A15, (d) A16, (e) A17 et (f) A18. AAV2/2, AAV2/2.RPE65.rpe65; AAV2/4, AAV2/2.RPE65.rpe65; AAV2/4*, AAV2/2.RPE65.rpe65 produit selon les GMP; ai, avant injection; jpi, jour post-injection. œil traité, œil non traité

bâtonnets (Figure 3). Au fur et à mesure que le temps passe après l'injection sous-rétinienne, il semble que les connexions intercellulaires dans la rétine s'améliorent car on voit apparaître des potentiels oscillatoires, une onde b1 et une onde b2. Par exemple en c de la figure 3 de troisième article et en b de la figure complémentaire16, à 15 jours post-injection, il n'y a pas de potentiels oscillatoires visibles sur la courbe d'ERG Max alors que ces potentiels deviennent visibles dès 60 jours post-injections pour avoir un aspect bien formé à 180 jours post-injections. Nous n'avons pas noté de différence dans cet affinement des courbes d'ERG entre les chiens injectés avec le sérotype 2 ou le sérotype 4.

Il faut noter que les chiens, qui ont été injectés avec un sérotype 2 ou avec un sérotype 4, réalisent avec succès le test de comportement qui n'est qu'un test qualitatif de la vision. L'amélioration quantitative de la vision ne pourra être testée que chez l'homme. Par conséquent, une comparaison des différents sérotypes en ce qui concerne la qualité de la restauration de vision dans l'amaurose congénitale de Leber ne pourra être déduite que suite aux essais cliniques.

2.3. Intérêt de l'utilisation d'un sérotype 4 associé à un promoteur spécifique

Les études qui ont évalué l'effet du transfert du gène *rpe65* chez les chiens RPE65^{-/-} sont toutes différentes car elles n'ont pas testé des vecteurs portant les mêmes cassettes d'expression (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003a; Acland *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2006a; Le Meur *et al.*, 2006). Les différences sont marquées par l'emploi de sérotype d'AAV ; mais surtout pour les premières études, qui ont toutes utilisé un rAAV2, la différence provient de l'utilisation de promoteurs différents. Au total, trois promoteurs ont été testés: le promoteur CMV, le promoteur CAG et le promoteur RPE65. Les deux premiers promoteurs sont dits ubiquitaires (Doll *et al.*, 1996), le promoteur RPE65 est spécifique des cellules de l'EPR (Boulanger *et al.*, 2000). La spécificité d'un promoteur peut être essentielle pour la sécurité de l'individu lors de l'utilisation d'une thérapie génique via un rAAV. En effet, certaines études de biodistribution des vecteurs AAV après injections intraoculaires ont mis en évidence une diffusion du vecteur en dehors de l'œil notamment dans le cerveau. Cette diffusion est probablement liée aux connexions neuronales étroites qui existent entre ces deux organes. Chez le rat ou chez le chien, lors d'une injection intravitréenne du vecteur AAV2/2.CMV.*gfp* à une dose comprise entre 5.10^{10} Vg et 10^{11} Vg, le génome du vecteur est décelé par une PCR, dont les primers encadrent le transgène, au niveau du nerf optique de l'œil injecté mais aussi au niveau du chiasma optique, du tractus

optique, du corps géniculé latéral, du colliculus supérieur, des radiations optiques et du cortex visuel (Provost *et al.*, 2005). Après des injections sous-rétiniennes d'AAV2/2.CMV.*gfp* chez le rat à la dose de $5 \cdot 10^{10}$ Vg, le génome d'un vecteur est retrouvé par PCR au niveau du nerf optique de l'œil injecté mais pas dans le cerveau (Provost *et al.*, 2005). Par contre, lors d'une injection sous-rétinienne d'AAV2/5.CMV.*gfp* à la dose de $2 \cdot 10^{11}$ Vg chez le chien, le génome du vecteur est décelé dans le nerf optique et le colliculus supérieur (Provost *et al.*, 2005). L'étude récente de biodistribution du vecteur AAV2/2.CAG.*rpe65* chez 4 chiens RPE65^{-/-}, injectés par voie sous-rétinienne à une dose comprise entre $0,1 \cdot 10^8$ et $0,3 \cdot 10^9$ Vg, ne retrouve aucune trace du génome du vecteur détectable par PCR ni dans le nerf optique ni dans le cerveau (Jacobson *et al.*, 2006a). Par contre, cette étude a détecté la présence du génome du vecteur AAV2/2.CAG.*rpe65* dans le cœur, le diaphragme et un ganglion lymphatique mandibulaire par PCR en utilisant des primers encadrant le promoteur CAG (Jacobson *et al.*, 2006a). Une étude de biodistribution cérébrale de ce même vecteur chez le primate a mis en évidence des différences dans la détection de l'ADN du vecteur après injection sous-rétinienne (Jacobson *et al.*, 2006b). En effet, l'étude de biodistribution du vecteur dans le cerveau réalisée une semaine après l'injection sous-rétinienne d'AAV2/2.CAG.*rpe65*, à une dose comprise entre 1,5 et $4,5 \cdot 10^{12}$ Vg, chez 4 primates a mis en évidence la présence du génome du rAAV dans le nerf optique, dans le tractus optique, dans le corps géniculé latéral et dans le cortex visuel chez 3 primates (Jacobson *et al.*, 2006b). De même, la présence du génome du vecteur a été détectée au niveau du corps géniculé latéral jusqu'à trois mois après l'injection sous-rétinienne d'AAV2/2.CAG.*rpe65* chez un primate sur les huit analysés (Jacobson *et al.*, 2006b). Par mesure de précaution, il semble donc essentiel d'utiliser des promoteurs spécifiques des cellules à cibler pour éviter une production délocalisée d'une protéine RPE65 car les études sus citées montrent que le génome du vecteur peut-être détecté à distance du site d'injection. L'association à l'utilisation d'un promoteur spécifique RPE65 d'un sérotype d'AAV de tropisme particulier comme l'AAV4 peut sécuriser l'injection intraoculaire d'un rAAV codant pour le transgène *rpe65* en évitant la production à distance du site d'injection de la protéine RPE65.

Le choix du promoteur RPE65 associé au sérotype 4 de l'AAV, qui cible spécifiquement les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (Weber *et al.*, 2003), permet aussi d'obtenir une expression la plus proche possible de l'expression physiologique de cette protéine. Néanmoins, il ne faut pas oublier que l'état actuel des connaissances des éléments régulateurs de l'expression du gène *rpe65*, ne nous permettent pas de savoir si une régulation plus fine du transgène *rpe65* pourra être proposée. L'objectif d'atteindre une production de la protéine transgénique la plus proche de l'état physiologique est renforcé par les résultats de l'étude de l'équipe de R Ali. Ils ont démontré que la surexpression de la

protéine Prph2 entraînait une perte des photorécepteurs quand le vecteur codant pour le gène *Prph2* (AAV2/2.RHO. *Prph2*) était injecté par voie sous-rétinienne chez une souris normale (Sarra *et al.*, 2001). Ce qui laisse supposer que la production d'une trop grande quantité d'une protéine rétinienne par thérapie génique peut être délétère pour la rétine.

2.4. Conséquences pour l'application future à l'homme

Dans notre étude chez les chiens RPE65^{-/-}, nous avons remarqué que le choix du site d'injection serait fondamental pour la possibilité de récupération visuelle chez les patients RPE65^{-/-}. Lors de l'application clinique, il faudra garder en mémoire les altérations rétiniennes qui surviennent dans la zone où l'aiguille d'injection transperce la rétine. La zone de la fovéa devra être évitée afin de prévenir l'apparition d'altération rétinienne dans cette zone essentielle pour la vision. Mais pour que la récupération visuelle soit notable il faudra toutefois que le geste chirurgical ne soit pas trop éloigné de la fovéa car si aucun transfert de gène n'est effectué dans cette zone fovéolaire, l'acuité visuelle chez les patients traités sera limitée à moins de 1/10. La difficulté opératoire va résider dans cette approche de la zone fovéolaire sans traumatisme afin que la récupération visuelle soit la plus importante possible. De notre expérience chez les chiens RPE65^{-/-}, on peut dire que la prévision du déroulement de la chirurgie sera malaisée. Aucun signe particulier n'est visible au fond d'œil chez les chiens dont la rétine s'est décollée plus difficilement lors de la chirurgie. L'information la plus claire sur ces écueils chirurgicaux devra être donnée lors du passage chez l'homme. Il semble que cette variabilité chirurgicale soit liée à la structure de la rétine qui dans le cas d'une dystrophie rétinienne liée à la mutation du gène *rpe65* est altérée.

De notre étude chez le chien, d'autres caractéristiques pour l'étude clinique peuvent être déduites. Les injections chez l'homme devront être réalisées en sous rétinien pour être efficaces. Le titre de la solution de vecteur AAV4.RPE65.*rpe65* sera de 10¹¹ Vg/ml. Les volumes des injections s'échelonneront entre 200 et 600 µL, en sachant que des variations pourront survenir en fonction de la fragilité rétinienne. Comme, il semble qu'il y ait une fenêtre thérapeutique pour réaliser le traitement, les patients devront avoir un jeune âge pour que ce traitement soit bénéfique pour le patient. On peut penser que le traitement devra avoir lieu dans la première décennie avant que l'acuité visuelle ne se détériore (Lorenz *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2000; Felius *et al.*, 2002; El Matri *et al.*, 2006). Des examens comme l'OCT qui semble permettre, chez les patients RPE65^{-/-}, de préciser le degré de dégénérescence des cônes fovéolaires seront à réaliser avant les traitements par thérapie génique (Jacobson *et al.*, 2005).

Troisième article

Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors.

Knut Stieger, Guylène Le Meur, Françoise Lasne, Michel Weber, Jack-Yves Deschamps, Delphine Nivard, Alexandra Mendes-Madeira, Nathalie Provost, Laurent Martin, Philippe Moullier, Fabienne Rolling. 2006. *Molecular Therapy*. 13(5):967-75.

Long-Term Doxycycline-Regulated Transgene Expression in the Retina of Nonhuman Primates Following Subretinal Injection of Recombinant AAV Vectors

Knut Stieger,¹ Guylène Le Meur,^{1,2} Françoise Lasne,³ Michel Weber,^{1,2} Jack-Yves Deschamps,⁴ Delphine Nivard,¹ Alexandra Mendes-Madeira,¹ Nathalie Provost,¹ Laurent Martin,³ Philippe Moullier,^{1,5} and Fabienne Rolling^{1,*}

¹INSERM UMR U649, CHU-Hôtel Dieu, Bât. J. Moynet, 30 Avenue J. Moynet, 44035 Nantes Cedex 01, France

²Service d'Ophtalmologie, CHU-Hôtel Dieu, 1 Place Alexis Ricordeau, 44000 Nantes, France

³Laboratoire National de Dépistage du Dopage, 92290 Châtenay-Malabry, France

⁴Service d'Urgences, Ecole Nationale Vétérinaire, 44000 Nantes, France

⁵EFS-Pays de Loire, 44000 Nantes, France

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: +33 2 40 08 74 91. E-mail: fabienne.rolling@univ-nantes.fr.

Available online 25 January 2006

Adeno-associated viral gene therapy has shown promise for the treatment of inherited and acquired retinal disorders. In most applications, regulation of expression is a critical concern for both safety and efficacy. The purpose of our study was to evaluate the ability of the tetracycline-regulatable system to establish long-term transgene regulation in the retina of nonhuman primates. Three rAAV vectors expressing the tetracycline-dependent transactivator (rtTA) under the control of either the ubiquitous CAG promoter or the specific RPE65 promoter (AAV2/5.CAG.TetOn.epo, AAV2/4.CAG.TetOn.epo, and AAV2/4.RPE65.TetOn.epo) were generated and administered subretinally to seven macaques. We demonstrated that repeated inductions of transgene expression in the nonhuman primate retina can be achieved using a Tet-inducible system via rAAV vector administration over a long period (2.5 years). Maximum erythropoietin (EPO) secretion in the anterior chamber depends upon the rAAV serotype and the nature of the promoter driving rtTA expression. We observed that the EPO isoforms produced in the retina differ from one another based on the transduced cell type of origin within the retina and also differ from both the physiological EPO isoforms and the isoforms produced by AAV-transduced skeletal muscle.

Key Words: doxycycline-regulated transgene expression, retina, nonhuman primate, AAV vectors, erythropoietin

INTRODUCTION

Gene replacement therapy constitutes the most straightforward approach for treating autosomal recessive retinal disease. However, inherited retinal degenerations are triggered by mutations in a variety of genes [1]. Although the mechanisms by which the genetic defects lead to photoreceptor death are still not clear, the final common pathway is apoptosis [2]. Therefore, there is a major interest in developing a more generally applicable survival factor therapy that does not target the mutant gene product but rather alters the photoreceptor environment in a manner that promotes cell survival. Specific examples of such survival factors include neurotrophic factors that have the ability to modulate neuronal growth during development to maintain existing cells and to allow recovery of injured neuronal populations [3].

Recombinant AAV2-mediated gene transfer using neurotrophic factors such as fibroblast growth factor [4,5] and glial cell line-derived neurotrophic factor [6] have increased photoreceptor survival in different rodent models of retinal degeneration. Recombinant AAV2-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in an opsin^{-/-} mouse prolonged photoreceptor survival following subretinal injection [7]. Interestingly, the same vector injected intravitreally in postnatal Prph2^{Rd2/Rd2} mice and in adult P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats showed prominent morphological protection of photoreceptors, but with no improved electroretinography (ERG) in the Prph2^{Rd2/Rd2} mice and with lower ERG amplitudes in rat models [8]. Two recent reports clearly demonstrate that intraocular CNTF expression using rAAV2-mediated gene delivery, in

FIG. 1. Structure of rAAV vectors. Vectors encode the macaque erythropoietin cDNA (mEpo) under the control of the doxycycline-inducible TetO. CMV promoter and the rTA chimeric transactivator (rTA-M2) under the control of either the CAG promoter or the human RPE65 promoter. pA (rTA-M2), bovine growth hormone polyadenylation signal; pA (mEpo), SV40 polyadenylation signal; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; ITR, inverted terminal repeat of AAV2. Cassettes were incorporated into AAV4 or AAV5 capsids as indicated.



wild-type mice, in Prph2^{Red/Red} mice, and in mice with a P216L rds/peripherin mutation, resulted in a significant decrease in function as assessed by ERG [9,10]. It is possible that CNTF has a narrow therapeutic window and that overproduction results in toxicity. Hence, a key issue for successful ocular gene therapy using such neurotrophic factors may be the ability to regulate transgene expression.

Several regulation systems, including rapamycin [11,12], mifepristone [13], ecdysone [14], and tetracycline (Tet) [15,16] have been developed to control transgene expression *in vivo*. Rapamycin-mediated regulation of erythropoietin (EPO) expression has been demonstrated in rats and nonhuman primates following intramuscular and subretinal administration of two rAAV vectors, one encoding the transactivator, the other EPO [17–19]. Although the rapamycin analog-regulatable system appears promising, it is yet a rather recent development in gene therapy and therefore likely deserves further pharmacological and toxicological studies.

The tetracycline-regulatable or its derivative the doxycycline-regulatable system is extremely attractive simply because the drug used to induce transcription is a well-known antibiotic, essentially devoid of major secondary effects. Doxycycline (Dox) has been extensively used in patients and its pharmacological and toxicological characteristics are known.

Dox has also proved to be efficient and reliable in controlling transgene expression *in vivo* following intramuscular injection of rAAV carrying the tetracycline transactivator (tTA) and EPO cDNA in mice [20,21] and primates [22,23]. In the retina, tetracycline-controlled expression of green fluorescent protein (GFP) in retinal pigmented epithelium (RPE) and photoreceptor cells has been demonstrated in rats following subretinal injection of the rAAV2 vector [24]. In a previous report, we showed that a single rAAV2 vector carrying the tTA and the GFP cDNAs can provide controlled transgene expression in rat ganglion cells after intravitreal injection and that repeated induction and regulation of the transgene was sustained over a 6-month period [25]. However, the current development of the Dox-regulatable system seems to be doomed simply because when translated in skeletal muscle of nonhuman primates, the Dox-sensitive tetracycline-dependent transactivator (rtTA) is eventually recognized by the immune system in 80% of the primates challenged with such a system [22,26].

In this study, however, we demonstrate the ability of the tetracycline-regulatable system to establish long-term transgene regulation in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of both AAV vectors type 4 and type 5. EPO was chosen as a “reporter gene” because it is a secreted protein and expression levels can easily be quantified. Since previous studies reported abnormal posttranslational modifications of transgene products

TABLE 1: List of primates and AAV doses injected

Macaque	Vector	Vector titer (vg/ml)	Volume (μl)	EPO concentration in a.c.f. (mU/ml)		Duration of study (mpt)
				Baseline before induction	Peak 1	
P5.1	AAV2/5.CAG.TetOn.epo	1×10^{12}	100	45	1662*	28
P5.2 (Mac1)	AAV2/5.CAG.TetOn.epo	5×10^{11}	100	26	760	9
P5.3L	AAV2/5.CAG.TetOn.epo	2×10^{11}	100	14	423	9
P5.3R	AAV2/5.CAG.TetOn.epo	2×10^{11}	150	37	584	9
P4.1 (Mac2)	AAV2/4.CAG.TetOn.epo	2×10^{11}	100	5	99	9.5
P4.2	AAV2/4.CAG.TetOn.epo	2×10^{11}	90	6	75	9.5
P4.3	AAV2/4.hRPE65.TetOn.epo	2×10^{11}	100	1	14	12.5
P4.4	AAV2/4.hRPE65.TetOn.epo	2×10^{11}	100	0	13	12.5

EPO concentrations are shown before and during the first induction, eg, vector genome, a.c.f., anterior chamber fluid; mpt, months postinjection.

* EPO concentration measured in the vitreous.

when expressed from an ectopic site [27,28] with possible adverse effects [26], we compared isoelectric profiles of retinal-derived EPO with both physiological EPO isoforms and the isoforms produced by AAV-transduced muscle.

RESULTS

Vector Design

We generated rAAV vectors of different serotypes containing the macaque EPO cDNA and the rTA driven by

either the CAG or the RPE65 promoter. We have previously demonstrated that, following subretinal injection in dogs and nonhuman primates, rAAV2/4 leads to transduction exclusively of the RPE [29], in contrast to rAAV2/5, which transduces both the RPE and photoreceptors [29,30]. Therefore we produced three different vectors: AAV2/5.CAG.TetOn.epo and AAV2/4.CAG.TetOn.epo vectors, in which the CAG promoter controls the rTA expression (Figs. 1A and 1B), and rAAV2/4.RPE65.TetOn.epo vector, in which the RPE65-specific promoter controls rTA expression (Fig. 1C).

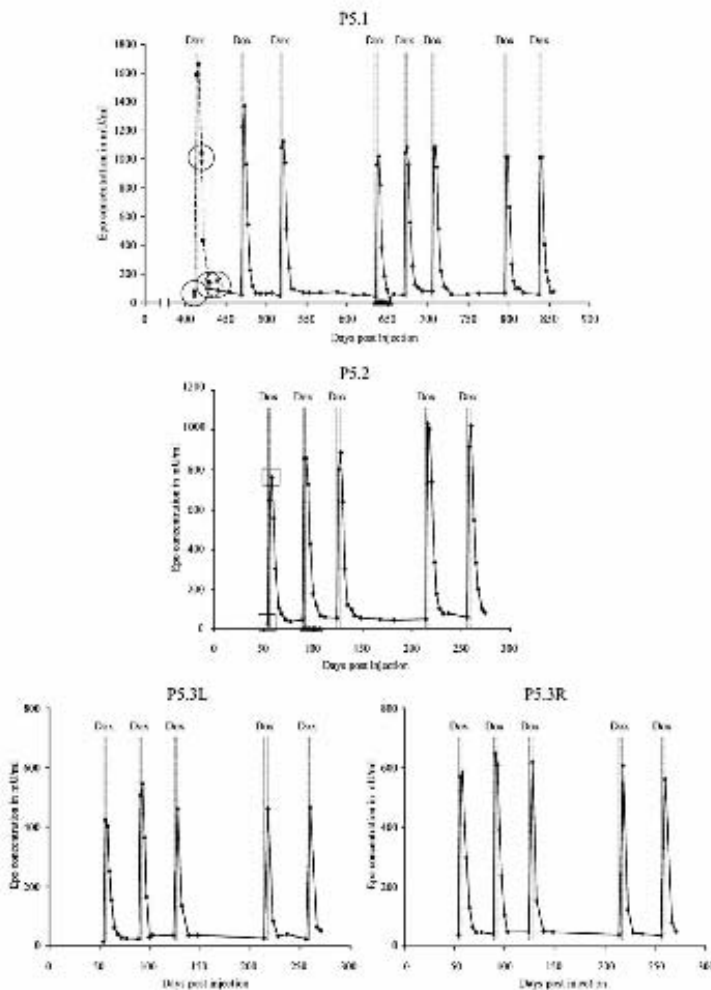


FIG. 2. Time course of EPO concentration in the anterior chamber fluid or vitreous of three nonhuman primates after subretinal delivery of AAV2/5.CAG.TetOn.epo. Three-day induction cycles are indicated as "Dox." For macaque P5.1, EPO concentrations in the anterior chamber fluid and vitreous of the injected eye were compared (indicated by a circle). For macaque P5.2, squares indicate time points for which IEF patterns of EPO were evaluated (see Figs. 5A and 5B). For macaques P5.1 and P5.2: (●) anterior chamber fluid right eye (injected), (■) vitreous right eye (injected), (▲) anterior chamber fluid left eye (uninjected control).

We treated a total of seven macaques: P5.1 through P5.3 with rAAV2/5 and P4.1 through P4.4 with rAAV2/4 (Table 1). We injected all the macaques unilaterally in the right retina except for P5.3, which we treated in both eyes (P5.3L and P5.3R).

Long-Term Regulation of EPO Expression in Macaques Following Subretinal Injection of the AAV2/5.CAG.TetOn.epo Vector

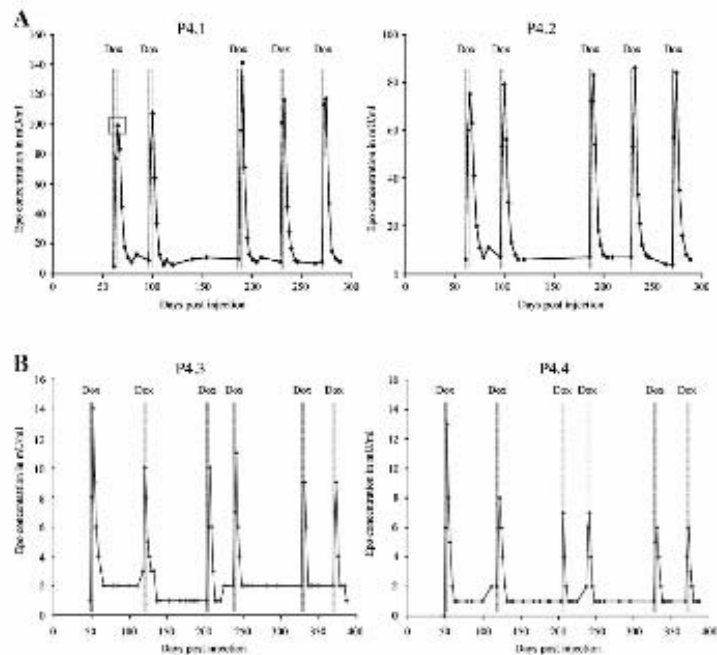
Cycles of Dox induction of the AAV2/5.CAG.TetOn.epo vector-treated macaques started at 8 weeks postinjection except for the pilot macaque (P5.1), in which the first induction occurred at 58 weeks postinjection (Fig. 2).

Since the vitreous fluid, adjacent to the retina, connects to the anterior chamber fluid, diffusion of EPO through the vitreous into the anterior chamber fluid allowed for repeated sampling of protein levels in the same animal. To compare the concentration of EPO in the vitreous and in the anterior chamber fluids, we sampled both compartments during the first induction of P5.1 (circles in Fig. 2). As expected, we found similar levels of EPO in both compartments (at 8 days post-induction for example, 1042 mU/ml in the vitreous and 983 mU/ml in the anterior chamber fluid). Since sampling the anterior chamber fluid is less invasive than

sampling the vitreous fluid, we punctured only the anterior chamber fluid for all other time points and animals.

All AAV2/5.CAG.TetOn.epo-treated retinas showed tightly regulated EPO synthesis, over a 2-year period for P5.1 and over an 8-month period for P5.2 and P5.3 (duration of the experiment). In all macaques, the peak of EPO production consistently occurred at 48 h post-Dox induction and returned to baseline level within 10 days upon the withdrawal of Dox (Fig. 2). The peak levels obtained showed a tight correlation between the amount of AAV2/5.CAG.TetOn.epo injected and the transgene expression. Macaque P5.2, which received 2 times fewer particles than P5.1, displayed a 2.2 times lower level of EPO at the first induction. Indeed, 2.5 times fewer AAV2/5 vector genomes injected into P5.3L versus P5.2 resulted in a 2 times lower EPO concentration. Similarly, the 1.5 times fewer particles injected into P5.3R versus P5.2 resulted in 1.4 times lower EPO concentration. Another relevant finding was the tight control of the transgene expression during the off state (-Dox). In the on state, all animals expressed 20 to 30 times the baseline EPO level. For P5.1 and P5.2, we collected the anterior chamber fluid of the contralateral eye and analyzed it during the fourth or the second induction, respectively (triangles in Fig. 2).

FIG. 3. Time course of EPO concentration in the anterior chamber fluid of four nonhuman primates after subretinal delivery of AAV2/4.CAG.TetOn.epo and AAV2/4.RPE65.TetOn.epo vectors. Three-day induction cycles are indicated as "Dox." A square indicates the time point at which IEF patterns of EPO were evaluated (see Fig. 5C). (A) AAV2/4.CAG.TetOn.epo subretinally injected macaques P4.1 and P4.2. (B) AAV2/4.RPE65.TetOn.epo subretinally injected macaques P4.3 and P4.4.



EPO was never detected in the anterior chamber fluid of the uninjected contralateral eye.

Long-Term Regulation of EPO Expression in Macaques Following Subretinal Injection of AAV2/4.CAG.TetOn.epo and AAV2/4.RPE65.TetOn.epo Vectors

We injected four macaques (P4.1 through P4.4) with AAV2/4.CAG.TetOn.epo ($n = 2$) and AAV2/4.RPE65.TetOn.epo ($n = 2$) (Table 1). Cycles of Dox induction started at 8 weeks postinjection in all macaques. Upon Dox induction and withdrawal, all four AAV2/4-injected primates showed similar EPO expression profiles compared to the AAV2/5 animals, albeit with lower resultant EPO concentrations (Fig. 3). Following injection of the same amount of vector genomes, AAV2/4.CAG.TetOn.epo-treated macaques (P4.1 and P4.2) displayed 4 times lower EPO concentrations than AAV2/5.CAG.TetOn.epo-treated macaques. This result can be explained by the fact

that, given the tropism of the different AAV serotypes, in AAV2/4-injected primates, EPO is produced exclusively by the RPE, while in AAV2/5-treated animals both the RPE and the photoreceptors secrete EPO. Interestingly, when control of the rTA expression is under the RPE65 promoter (P4.3 and P4.4) versus the CAG promoter, there is a 10-fold decrease in EPO concentration. This result shows the difference of relative strength between the activity of the CAG and the RPE65 promoters in macaque RPE cells *in vivo*. Finally, in both AAV2/4 vector constructs, the level of EPO expression in the on state was 15 to 20 times the baseline EPO level.

Assessment of Retinal Morphology and Retinal Function Following Long-Term Tet-Regulated EPO Expression

Optical coherence tomography (OCT) is a noncontact, noninvasive optical imaging technique that measures the intensity of back-scattered light [31,32]. OCT produces

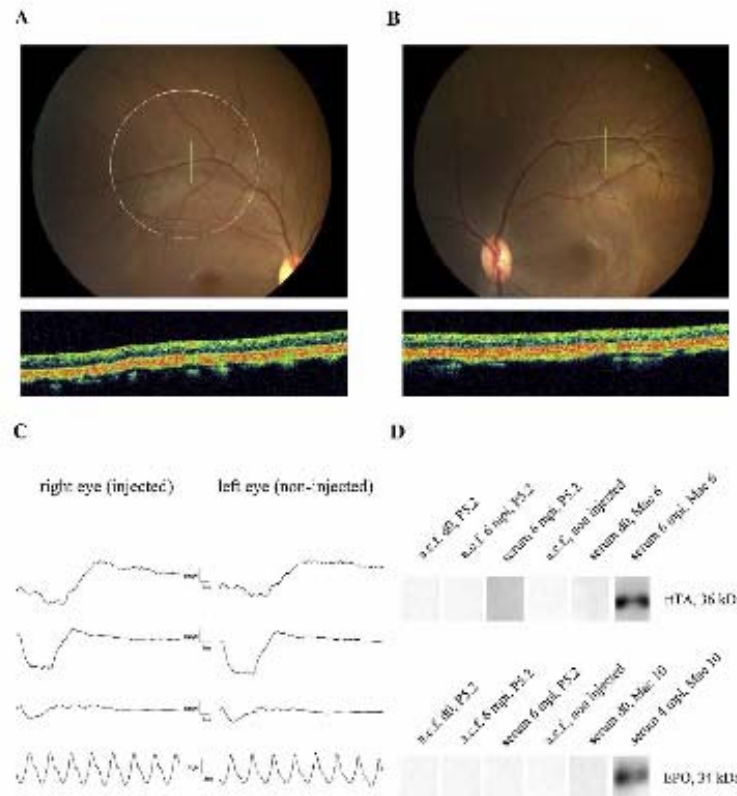


FIG. 4. Assessment of retinal morphology and function following long-term Tet-regulated EPO expression and evaluation of humoral immune response against the rTA-M2 and EPO proteins. (A) Fundus photography and OCT image of the right eye of macaque 5.2 (injected). The green line indicates the scanning path. The white dotted circle indicates the zone of the bleb. (B) Fundus photography and OCT image of the left eye of macaque 5.2 (uninjected control). The green line indicates the scanning area of the retina. (C) Standard ERG recordings of both eyes of macaque 5.2. Graphs correspond to rod ERG, maximum ERG, cone ERG, and flicker (from the top to the bottom line). (D) Evaluation of antibody generation against rTA-M2 and EPO by Western blot analysis. a.c.f., anterior chamber fluid; mpi, months postinjection.

cross-sectional images of optical reflectivity in the tissue analogous to an ultrasound B-scan, but providing greater resolution by using light instead of sound waves. We performed OCT imaging in all treated animals to monitor subsequent recovery from the initial subretinal bleb and the morphology of the retina after long-term expression of rTA and several inductions of EPO expression. Long-term OCT monitoring documented preservation of the retinal thickness in both treated and untreated retinas, in all animals (Figs. 4A and 4B).

We evaluated the effects of long-term rTA and EPO expression on global retinal function in macaques using flash photopic and scotopic ERG. The same investigator (G.L.) recorded the ERGs in a standardized fashion up to

24 months p.i. for P5.1 and 8 months for P5.3 and P4.1–P4.4. Normal patterns of ERG amplitudes were elicited in both the treated and the untreated eye of all seven animals studied. As an example, the ERG recordings of P5.2 are presented in Fig. 4C.

Anterior chamber fluid and serum were evaluated for the presence of antibodies against rTA and EPO. As assessed by Western blot, none of the animals developed antibodies against these two proteins (Fig. 4D).

Isoelectric Profile of Transgene-Derived Erythropoietin is Cell Type Dependent in Macaques

We evaluated the isoelectric profiles of the secreted EPO of all treated macaques from various time points follow-

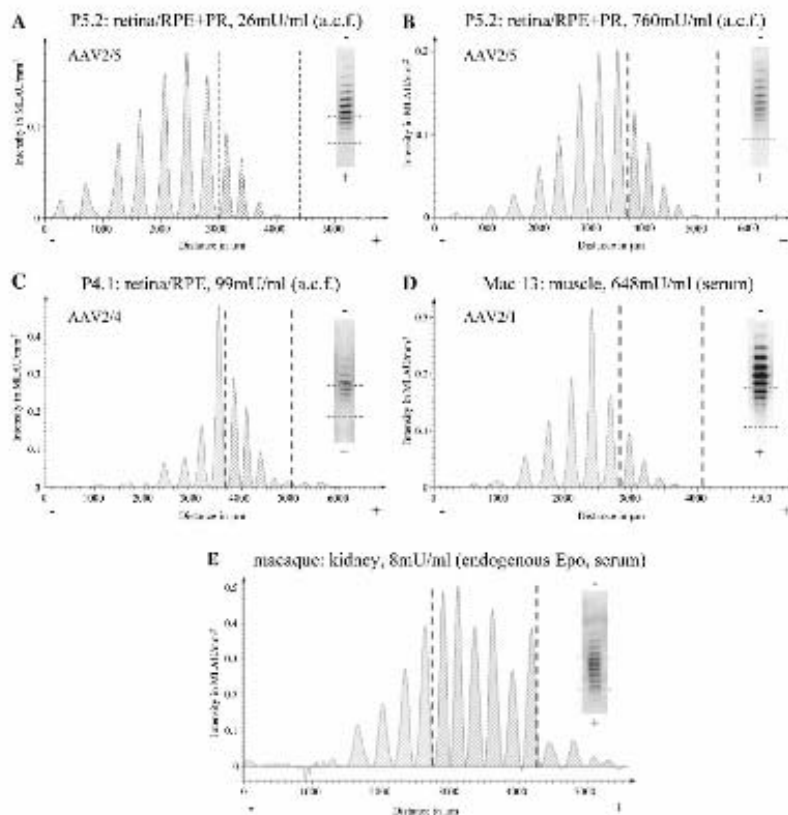


FIG. 5. Isoelectric focusing patterns and corresponding integrated profiles of EPO. Fluorescence intensity is reported in mega linear arbitrary units (MLAU). (A, B) AAV2/5.CAG.TetOn.epo subretinally injected macaque P5.1. (C) AAV2/4.CAG.TetOn.epo subretinally injected macaque P4.1. (D) AAV2/1.CAG.TetOn.epo intramuscularly injected primate (Mac13 in [23]). (E) Uninjected macaque.

ing the first Dox induction. As observed for P5.2 (time points are presented in Fig. 1 as squares), the isoelectric focusing (IEF) patterns of EPO from the aqueous humor were identical in both the uninduced (26 mU/ml) and the induced (760 mU/ml) state, for all individuals. Another observation is that secreted EPO of the AAV2/5 (P5.2) and AAV2/4 (P4.1) subretinally injected primates displayed differing IEF patterns (Figs. 5A–5C). Moreover, the patterns were different from those of physiological EPO isoforms (Fig. 5E) or from isoforms produced by AAV-transduced skeletal muscle (Fig. 5D).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that a single subretinal injection into macaques of an AAV2/4 or -2/5 vector containing a transgene under a tetracycline-dependent expression system results in an effective regulation of gene expression in the retina for at least 2.5 years. Maximum EPO secretion in the anterior chamber depends on the rAAV serotype used and the nature of the promoter driving rTA expression.

All (100%) treated macaques displayed tightly regulated EPO synthesis with similar induction kinetics. The peak of EPO production consistently occurred at 48 h after Dox induction, returning to baseline level within 10 days upon withdrawal of Dox. The peak EPO levels obtained were 1000, 100, and 10 mU/ml for macaques injected with AAV2/5.CAG.TetOn.epo, AAV2/4.CAG.TetOn.epo, and AAV2/4.RPE65.TetOn.epo, respectively. Although the regulation was fairly tight in all seven macaques, AAV2/5.CAG.TetOn.epo-injected primates displayed leaky expression in the uninduced state (14 to 45 mU/ml) that exceeded levels of induced EPO expression in the AAV2/4.RPE65.TetOn.epo animals (13 to 14 mU/ml).

The 1-log difference of expression between AAV2/5.CAG.TetOn.epo and AAV2/4.CAG.TetOn.epo can be explained by the fact that, in AAV2/4-injected primates, EPO is exclusively produced by the RPE, while in AAV2/5-treated animals both the RPE and the photoreceptors are transduced [29]. This explanation is in agreement with the 20:1 mean ratio of photoreceptors to RPE in the macaque retina [33]. In contrast, the 1-log difference of EPO expression between AAV2/4.CAG.TetOn.epo and AAV2/4.RPE65.TetOn.epo-treated animals is likely to be due to the strength of the promoter that drives the rTA transactivator (CAG vs RPE65). This result suggests that the RPE65-specific promoter is 10 times less active than the CMV-derived promoter in primate RPE cells *in vivo*.

We previously reported that no vector genomes could be detected in the contralateral eye following subretinal injection in dogs and primates [34]. Consistent with this previous observation, in this study we were unable to detect EPO in the contralateral untreated eye.

An important finding in the present study is the long-term persistence of Dox-mediated transgene inducibility in 100% of the primates. Indeed, we previously reported that, using a similar AAVTetOn construct administered to the muscle via an AAV vector, iterative Dox inductions resulted in the complete loss of EPO secretion in 80% of the primates after two or three challenges [22]. The mechanism involved was a humoral and cytotoxic T cell response directed against the rTA transactivator protein resulting in the destruction of the genetically modified muscle fibers. The fact that no antibody against rTA or EPO could be detected in the anterior chamber fluid or in the serum, as assessed by Western blot analysis, and that 100% of macaques injected in the retina displayed persistent regulation of EPO secretion is consistent with the retina's status as an immune-privileged tissue. The Dox-regulatable system appears to be consistently and permanently functional in the nonhuman primate retina, suggesting that this could also be the case in patients. To our knowledge, this is the first demonstration that a therapeutic transgene can be tightly regulated using a safe and fully characterized drug essentially devoid of secondary effects. In our opinion, the only currently available alternative for clinical use is the recently described rapamycin-regulatable system using nonimmunosuppressive analogs [17]. Studies using rapamycin-inducible dual-expression vectors describe successfully regulated gene expression in the retina of macaques [18,19]. The kinetics of induction and de-induction are different, however, from that of the Dox-regulated system. EPO expression in the anterior chamber fluid peaked 7–14 days postdelivery (2 days with the Dox-inducible system) and took several weeks to return to baseline (10 days with the Dox-inducible system) [19]. Moreover, expression levels never returned to baseline but stayed at slightly elevated levels after each induction in two of four subretinally injected eyes.

The IEF patterns of EPO from the aqueous humor of all individuals were identical in both the uninduced and the induced state. This observation suggests that in contrast to what has been previously suggested for highly expressed myotube-derived factor IX [28], overexpression of EPO in the retina was not a contributing factor for posttranslational modifications of EPO. Another observation made in the present study is that the secreted EPO of the AAV2/5 (RPE and photoreceptors) and AAV2/4 (RPE only) subretinally injected primates displayed differing IEF patterns and were both different from physiological EPO. The most consistent explanation for this is that posttranslational modifications of transgene-derived EPO in the retina differ with respect to the transduced cell type of origin. The retina-derived EPO isoforms are distinctive from the recombinant EPO produced by skeletal muscle [27]. This difference could explain the observed discrepancy between intramuscular and intraocular administration of AAV.epo with respect to the

subsequent rescue of retinal function in animal models of retinitis pigmentosa [35]. It is possible that a specific isoform secreted from transduced muscle, but not in the transduced retina, may act directly on the EPO receptors of the retina. Further investigations will be needed to identify the functional isoform(s) involved.

In conclusion, we have developed and validated, in primate retina, stringent and long-term Dox-regulated transgene expression using the delivery of a single AAV2/5 or AAV2/4 vector. Three different ranges of EPO concentrations were achieved depending on the rAAV serotype and the nature of the promoter driving rTA expression. We observed that recombinant EPO produced in the retina has distinctive characteristics depending on the transduced cell type and is different from the physiological EPO and the EPO produced by transduced muscle. This type of complication may also occur with other proteins, particularly when subject to a high degree of posttranslational modification, suggesting that this new parameter should be taken in account when designing and evaluating gene therapy protocols.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant AAV-TetOnEPO vectors. Generation of expression cassettes encoding EPO (P_{hsc} -1-mEpo-WPRE-pA) and the transactivator rTA-M2 under the control of the CAG promoter (CAG-rTA-M2-pA) was previously described [23]. The expression cassette RPE65-rTA-M2-pA was produced by replacing the 1149-bp CAG promoter fragment with the 806-bp human RPE65-specific promoter fragment (kindly provided by Robin Ali, London, UK). Two different vector plasmids flanked by the two AAV2 ITRs were constructed. The first vector plasmid, CAG-rTA-M2-pA/ P_{hsc} -1-mEpo-WPRE-pA, was encapsidated into AAV5 and AAV4 shells, while the second vector plasmid, RPE65-rTA-M2-pA/ P_{hsc} -1-mEpo-WPRE-pA, was encapsidated only into AAV4. Thus, three different vectors were produced, AAV2/5.CAG.TetOn.Epo, AAV2/4.CAG.TetOn.Epo, and AAV2/4.RPE65.TetOn.Epo (Fig. 1), as previously described [16]. The rAAV titers were determined by dot blot and expressed as vector genomes/vg/ml [37].

Subretinal injection of rAAV vectors and Dox administration. Primates were purchased from BioPrim, Bazège, France. All animals were cared for in accordance with the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. Subretinal injections were performed via a transvitreal approach under isoflurane gas anesthesia as described previously [29]. Briefly, after a vitrectomy had been performed, a 44-gauge cannula was inserted through a sclerotomy and advanced through the vitreous. Under microscopic control, vector suspension was injected into the subretinal space underlying the central tapetal retina using a viscous fluid injection system (DOBC International, The Netherlands). Volumes injected were between 90 and 150 μ l and vector titers were 2×10^{11} vg/ml for AAV-2/4 and 5×10^{11} and 1×10^{12} vg/ml for AAV-2/5 (Table 1). The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes. All subretinal injections were performed unilaterally on the right eye (except for macaque P5.3, who was injected into both eyes).

Induction of EPO expression was initiated 2 months after vector administration (except for macaque P5.1) and induction cycles consisted of a 3-day Dox pulse (doxycycline-Ratiopharm SF, Ratiopharm; 10 mg/kg) given intravenously and repeated every 1 or 2 months.

In vivo transgene regulation analysis. Sampling of the anterior chamber fluid and the vitreous was performed as follows. Primates were anesthe-

tized with an im injection of ketamine (Imalgène; Rhône Merieux, France) and Medetomidin (Domitor; Pfizer). For sampling the anterior chamber fluid, a 27-gauge epicranial cannula was used. For sampling the vitreous, a 30-gauge cannula connected to a 1-ml syringe was used.

EPO concentration in the anterior chamber fluid and vitreous was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine IVD; R and D Systems) and reported in mU/ml.

Humoral immune response against rTA-M2 and EPO. Detection of anti-rTA-M2 and anti-EPO antibodies was performed using Western blot analysis as recently described [22]. Briefly, recombinant rTA-M2 protein (240 ng, kindly provided by Hermann Bujard, Heidelberg) or recombinant human EPO (504 ng, NeoRecormon; Roche) was subjected to SDS-PAGE and transferred to a Hybond ECL nitrocellulose membrane (Amersham) for subsequent immunoblotting. Anterior chamber fluid (1/400) and sera (1/200) from our experimental macaques were tested for the presence of antibodies. Sera from macaques that have previously been shown to contain antibodies against rTA-M2 and EPO were used as a positive control [22,26] and anterior chamber fluid from an uninjected macaque as a negative control. Incubation with sera and anterior chamber fluids was performed overnight at 4°C. Peroxidase-conjugated goat anti-rhesus monkey IgG (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) was used as secondary antibody (1/2000, 2 h at 4°C) followed by enhanced chemiluminescence detection.

Funduscopy. We monitored retinal morphology in our experimental macaques with fundus photography using a Canon UVI retinal camera (Lheritier SA, Saint-Ouen-l'Aumône, France) connected to a digital imaging system (Ledioph Win software; Lheritier SA) as previously described [38]. Briefly, pupils of the animals were dilated 20 min before anesthesia using tropicamide (Ciba Vision Faure; Novartis, France) and phenylephrine hydrochloride (10% Neosynephrine; Novartis) and anesthesia was given by intramuscular delivery of agents as described above.

Electroretinography. Retinal function was tested using simultaneous bilateral flash photopic and scotopic ERG using a computer-based system (Neuropack m ME8-9102K; Nihon-Kohden, Tokyo, Japan) and contact lens electrodes (ERGjet; Universo Plastic SA, Switzerland) as described previously [38]. Dilatation of the pupils was performed as described above and animals were kept under isoflurane gas anesthesia. We recorded ERGs in a standardized fashion, according to International Society for Clinical Electrophysiology of Vision protocols. Each contralateral eye served as uninjected control.

Optical coherence tomography. Retinal morphology was assessed by optical coherence tomography (Stratus 3000; Zeiss, Germany). Dilatation of the pupils and intramuscular anesthesia of the animals were performed as described above. Examination was performed by doing a 3-mm scan in the area of the bleb in the injected eye and the corresponding area of the contralateral, uninjected eye.

Isoelectric focusing and immunoblotting of EPO isoforms. To evaluate the isoelectric profiles of EPO, an isoelectric focusing method combined with a double immunoblotting technique previously developed for urine and serum was adapted for the anterior chamber fluid [27,39,40]. Briefly, after a refocusing step at 250 V for 30 min, 20 μ l of samples was applied to a polyacrylamide gel and subjected to IEF using the Multiphor II electrophoresis system (Amersham-Pharmacia) at 1 W/cm. Migration width was 9 cm. The run was stopped at 4000 Vh. After the IEF run, proteins were transferred to an Immobilon-P membrane for subsequent immunoblotting. The membrane was then washed, blocked, and incubated with the primary monoclonal anti-EPO antibody (1/1000). To prevent nonspecific binding of the secondary antibody, the membrane was subjected to a second blotting step. After the second transfer to an Immobilon-P membrane, incubation with a secondary biotinylated anti-mouse IgG antibody (1/4000) was performed followed by enhanced chemiluminescence detection using a charge-coupled device camera (Fuji, Japan). Profiles corresponding to the isoelectric patterns were obtained using AIDA 1D-Evaluation software from Fuji.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Matthew Ellwood and Anna Skolimowski for critical reading and editing. We also thank the Vector Core (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr/>) at the University Hospital of Nantes, supported by the Association Française contre les Myopathies, the INSERM, and the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire. This work was also supported by the French Lions Club and the Lions Clubs International Foundation. K.S. receives a fellowship from the Etablissement Français du Sang, France.

RECEIVED FOR PUBLICATION NOVEMBER 14, 2005; REVISED DECEMBER 13, 2005; ACCEPTED DECEMBER 13, 2005.

REFERENCES

- Phelan, J. K., and Bok, D. (2000). A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol. Vis* 6: 116–124.
- Chang, G. Q., Hao, Y., and Wong, F. (1993). Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rd, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 11: 595–605.
- Chauri, E. (2003). Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *J. Cell Biochem.* 88: 57–75.
- Lau, D., et al. (2000). Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest. Ophthalmol. Vis* 41: 3622–3633.
- Green, E. S., et al. (2001). Two animal models of retinal degeneration are rescued by recombinant adeno-associated virus-mediated production of FGF-5 and FGF-18. *Mol. Ther.* 3: 507–515.
- McGee Sarntinor, L. H., Abel, H., Hauswirth, W. W., and Flannery, J. G. (2001). Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.* 4: 622–629.
- Liang, F. Q., et al. (2001). AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol. Ther.* 3: 241–248.
- Liang, F. Q., et al. (2001). Long-term protection of retinal structure but not function using rAAV-CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.* 4: 461–472.
- Bok, D., et al. (2002). Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rd/rd peripherin mutation. *Exp. Eye Res.* 74: 719–735.
- Schlichterbrede, F. C., et al. (2003). Intraocular gene delivery of ciliary neurotrophic factor results in significant loss of retinal function in normal mice and in the Pnp12842/R42 model of retinal degeneration. *Gene Ther.* 10: 523–527.
- Rivera, V. M., et al. (1996). A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat. Med.* 2: 1028–1032.
- Ye, X., et al. (1999). Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science* 283: 88–91.
- Seiguera, C., Bohl, D., Rolland, E., Prevost, P., and Heard, J. M. (1999). Control of erythropoietin secretion by doxycycline or methylglucoside in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells. *Hum. Gene Ther.* 10: 375–383.
- Nao, D., Yao, T. P., and Evans, R. M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3346–3351.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547–5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766–1769.
- Rivera, V. M., et al. (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105: 1424–1430.
- Auricchio, A., et al. (2002). Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol. Ther.* 6: 238–242.
- Leibner, C., et al. (2005). Long-term inducible gene expression in the eye via adeno-associated virus gene transfer in nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 16: 178–186.
- Bohl, D., Nalliah, N., and Heard, J. M. (1997). Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat. Med.* 3: 299–305.
- Bohl, D., Salvetti, A., Moulier, P., and Heard, J. M. (1998). Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* 92: 1512–1517.
- Favre, 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.
- Chenuaud, P., 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.
- McGee Sarntinor, L. H., et al. (2001). Recombinant AAV-mediated delivery of a Tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol. Ther.* 3: 688–696.
- Foliot, S., et al. (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: 491–501.
- Chenuaud, P., et al. (2004). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* 103: 3303–3304.
- Laine, F., Martin, L., de Coaruz, J., Larcher, T., Moulier, P., and Chenuaud, P. (2004). "Genetic doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol. Ther.* 10: 409–410.
- Arnuda, V. R., et al. (2001). Posttranslational modifications of recombinant myc-tagged human factor D. *Blood* 97: 130–138.
- Wiber, M., et al. (2005). 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.* 2: 774–781.
- Auricchio, A., et al. (2001). Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum. Mol. Genet.* 10: 3075–3081.
- Huang, D., et al. (1991). Optical coherence tomography. *Science* 254: 1178–1181.
- Fujimoto, J. G., et al. (1995). Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nat. Med.* 1: 970–972.
- Snodderly, D. M., Sandstrom, M. M., Leung, J. Y., Zucker, C. L., and Neuringer, M. (2002). Retinal pigment epithelial cell distribution in central retina of rhesus monkeys. *Invest. Ophthalmol. Vis* 43: 2815–2818.
- Provost, N., et al. (2005). Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol. Ther.* 11: 275–283.
- Rea, T. S., et al. (2004). Systemic but not intraocular Epo gene transfer protects the retina from light- and genetic-induced degeneration. *Mol. Ther.* 10: 855–861.
- Rabinowitz, J. E., et al. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* 76: 791–801.
- Salvetti, A., et al. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Gene Ther.* 9: 695–706.
- Le Meur, G., et al. (2005). Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates. *Arch. Ophthalmol.* 123: 500–506.
- Laine, F., and de Coaruz, J. (2000). Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 405: 633.
- Laine, F., Martin, L., Crepin, N., and de Coaruz, J. (2002). Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal. Biochem.* 311: 119–126.

III. DISCUSSION DU TROISIEME ARTICLE

L'objectif de cette étude était d'évaluer la régulation du transgène *epo* dans la rétine de primates grâce au système de régulation tétracycline inductible par administration de doxycycline. La régulation est une étape essentielle dans le développement de la thérapie génique de complémentation. Au cours de ce type de thérapie génique, des facteurs, comme des facteurs antiangiogéniques ou neurotrophiques, pourraient être fortement exprimés dans la rétine où ils ne sont pas forcément exprimés de manière naturelle. Afin d'éviter la survenue d'effets secondaires liés à une expression continue ou trop forte dans l'œil de ces facteurs, il est nécessaire de développer des systèmes régulables de l'expression de transgène.

3.1. Efficacité de la régulation

Dans notre étude, sept primates ont été injectés soit par un vecteur AAV2/5.CAG.TetOn.*epo*, soit par un AAV2/4.CAG.TetOn.*epo* ou soit par un AAV2/4.RPE65.TetOn.*epo* par voie sous-rétinienne unilatéralement sauf P5.3 qui a été injecté dans les 2 yeux (Tableau 1). L'induction réalisée par l'administration de doxycycline intraveineuse a permis une régulation, stable et efficace de l'expression du transgène *epo* plus de 2 ans pour le primate P5.1 et plus de 8 mois pour les autres primates (Figure 2 et 3). Chaque induction par la doxycycline a induit une cinétique d'expression de l'EPO identique à chaque induction. Le taux maximum d'EPO, dosée dans la chambre antérieure par ELISA, est atteint rapidement en 48 heures après le début de l'induction puis le taux basal d'expression est retrouvé dix jours après l'arrêt de l'induction par doxycycline (Figure 2 et 3). Le taux maximum d'EPO, dosé dans la chambre antérieure, varie d'un individu à l'autre en fonction du sérotype du vecteur injecté, du promoteur utilisé dans la construction et du titre de la solution de vecteurs. Le plus haut taux détecté lors du premier pic est d'environ 1662 mU/ml pour le primate P5.1 injecté par le vecteur AAV2/5.CAG.TetOn.*epo* avec la dose de 1.10^{12} particules. Les animaux P5.2, P5.3, injectés avec le même vecteur mais avec des doses allant de 2.10^{10} à 5.10^{10} particules, présentent un taux maximal d'EPO au premier pic plus faible qui est compris entre 423 et 760 mU/ml. En ce qui concerne les primates injectés par un vecteur AAV de sérotype 4, les taux maximums sont compris entre 99 et 75 mU/ml respectivement pour P4.1 et P4.2 (promoteur CAG) injectés respectivement avec 2.10^{10} et $1,8.10^{10}$ particules alors que ce taux n'est que de 14 et 13 mU/ml pour les primates P4.3 et

p4.4 (promoteur RPE65) injectés avec la dose de 2.10^{10} particules (Tableau 1). Le taux basal d'expression d'EPO, quant à lui, n'est pas égal à zéro et est variable d'un animal à l'autre. Ce taux basal d'expression d'EPO représente le niveau de fuite du système de régulation. Il est compris entre 1 mU/ml pour P4.3 et P4.4 et 60mU/ml pour P5.1 (Figure 2 et 3). Ce taux basal d'expression d'EPO dans l'œil correspond de 0,3 à 20 fois le taux d'EPO endogène, car le taux basal d'EPO endogène chez le primate est de 3 mU/ml (Rivera *et al.*, 2005). La valeur de ce taux basal d'EPO dans l'œil après le transfert de gène dépend du niveau d'expression d'EPO obtenu lors des inductions. En effet, pour le primate P5.1 qui a le plus fort taux d'EPO lors du pic (environ 1000 mU/ml), la valeur du taux d'EPO lors du retour à l'état basal est aussi la plus forte (50 mU/ml). Le primate P4.4, dont l'EPO au pic est de 6 mU/ml, présente le taux le plus faible d'EPO à l'état basal à savoir 1 mU/ml (Figure 2 et 3). Avec le système rapamycine, l'équipe de Wilson a également retrouvé une fuite représentée par le niveau basal d'expression d'EPO (Lebherz *et al.*, 2005). Les valeurs de ces taux basaux d'EPO s'échelonnent d'environ 50 mU/ml pour le primate injecté en sous-rétinien à la dose de $2,84.10^{11}$ copies du mélange des vecteurs (AAV-2/2-CMV-*TF1Nc* et AAV-2/2-CMV-*Z12rhepo* au ratio 1:1) à 1 mU/ml pour le primate injecté en sous-rétinien à la dose de $1,41.10^{11}$ copies de ce même mélange de vecteurs (Lebherz *et al.*, 2005).

La régulation de l'expression du transgène *epo* dans la rétine de primate après une injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV2/5.CAG.TetOn.*epo* ou AAV2/4.CAG.TetOn.*epo* ou AAV2/4.RPE65.TetOn.*epo* est reproductible après plusieurs inductions par doxycycline. C'est un point important de la publication car au sein du laboratoire, il a été décrit une perte complète de l'expression de l'EPO après 2 ou 3 inductions par doxycycline chez 80% des primates injectés dans le muscle par un vecteur AAV2/2.CAG.TetOn.*epo* codant pour une cassette d'expression TetOn.*epo* possédant la première version du rtTA (Favre *et al.*, 2002). Le mécanisme responsable de cette chute de sécrétion de l'EPO est une réponse humorale et cytotoxique des lymphocytes T dirigée contre la protéine transactivatrice rtTA, réponse immune qui induit une destruction des fibres musculaires traitées. Malgré le remplacement dans la cassette d'expression du rtTA par le rtTA-M2, version du rtTA qui est moins toxique dans les cellules Hela (Urlinger *et al.*, 2000), le même ratio de perte d'efficacité de régulation de l'expression de l'EPO a été constaté après injection d'un AAV1 ou 2 dans le muscle chez le primate (Chenuaud *et al.*, 2004b). C'est cette seconde version du rtTA (rtTA-M2) que nous avons utilisée dans notre étude.

Dans la littérature, il existe plusieurs travaux rapportant le développement d'une réponse immune dirigée contre l'EPO après injection soit d'une EPO recombinante chez l'homme (Locatelli and Del Vecchio, 2003) ou soit d'un vecteur AAV2 codant pour l'EPO injecté dans le muscle chez le macaque (Chenuaud *et al.*, 2004a; Gao *et al.*, 2004a). Or

dans notre étude comme dans celle de l'équipe de Wilson, il n'a été retrouvé aucun développement d'anticorps dirigé contre l'EPO après expression du gène de l'EPO par la rétine de primate que ce soit avec le système inductible avec le système TetOn (Stieger *et al.*, 2006) ou rapamycine (Lebherz *et al.*, 2005). Le statut de site immunoprivilégié de l'œil est ici mis en évidence car l'étude par immunowestern n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'anticorps dirigé ni contre le rtTA ni contre l'EPO dans l'humeur aqueuse ou dans le sérum chez le primate P5.2 après 3 inductions (Figure 4D). Le système de régulation de l'expression d'un transgène TetOn est un système qui permet une régulation de l'expression d'un transgène dans la rétine de manière efficace, stable à long terme sans développement de réponses immunitaires contre le système inductible.

3.2. L'impact sur la rétine du transfert du gène *epo* avec le système de régulation

La durée d'expression du système tétracycline dans la rétine de primate a été comprise entre plus de 2 ans pour P5.1 et 8 mois pour les autres primates de l'étude (P5.2-5.3, P4.1-4.4). L'expression du rtTA et de l'Epo sur la rétine n'a pas montré d'altération de la fonction rétinienne lors d'un examen par ERG chez chacun des primates (Figure 4C).

L'OCT (tomographie par cohérence optique) permet, de manière non-invasive, d'obtenir une image de la rétine avec une définition de 7-10 μm . Après transfert d'un vecteur AAV codant pour le gène de l'*epo* avec le système de régulation TetOn, la structure rétinienne par examen OCT apparaît identique entre l'œil opéré et l'œil non-opéré (Figure 4A et 4B). La surexpression du gène de l'*epo* ne semble pas, dans notre étude, avoir d'effets adverses. Lors d'une étude histologique de la rétine de primates injectés en sous-rétinien par un mélange de vecteurs codant pour le système de contrôle rapamycine et pour l'EPO (AAV-2/2-CMV-*TF1Nc* et AAV-2/2-CMV-*Z12rhepo*), Lebherz *et al.* ont montré une dégénérescence des photorécepteurs et des cellules de l'EPR dans les zones rétiniennes injectées par ce mélange de vecteurs sans qu'une explication claire ait été trouvée (Lebherz *et al.*, 2005). L'érythropoïétine est une hormone dont le rôle neuroprotecteur dans plusieurs organes a été démontré (Siren *et al.*, 2001; Celik *et al.*, 2002) et notamment dans la rétine. Dans la rétine, le rôle neuroprotecteur de l'EPO a été montré dans les photorécepteurs lors d'une dégénérescence induite par la lumière (Grimm *et al.*, 2002) et dans les cellules ganglionnaires lors d'une apoptose induite par axotomie chez le rat (Weishaupt *et al.*, 2004). La manière dont l'EPO joue ce rôle antiapoptotique dans la rétine n'est pas bien claire. Dans ce modèle de glaucome induit par axotomie chez le rat, l'action antiapoptotique de l'EPO au

niveau des cellules ganglionnaires est jouée en inhibant la voie PI-3-kinase/Akt en empêchant le clivage de la caspase 3 (Weishaupt *et al.*, 2004) mais dans un autre modèle où l'axotomie est réalisée chez une souris transgénique tg12, qui exprime l'EPO humaine en permanence, ce rôle antiapoptotique au niveau des cellules ganglionnaires est joué en activant la voie ERK-1/2 (Kilic *et al.*, 2005). Dans la dégénérescence des photorécepteurs induite par la lumière, l'EPO activerait le facteur HIF-1 (hypoxia inductible factor-1) (Grimm *et al.*, 2002). L'expression d'EPO permet de retarder la dégénérescence des photorécepteurs dans un modèle de dégénérescence induite par la lumière chez le rat albinos et également dans le modèle murin *rds* de dégénérescence rétinienne héréditaire lié à une mutation du gène de la *périphérine* lorsque l'EPO est exprimée grâce à un AAV2/2.CMV.*epo* injecté directement dans le muscle (Rex *et al.*, 2004). Par contre dans le modèle murin *rd10*, qui présente une mutation dans le gène de la sous-unité β de la phosphodiesterase, l'AAV2/2.CMV.*epo* injecté dans le muscle n'a aucun effet sur la dégénérescence rétinienne (Rex *et al.*, 2004). De même dans ces trois modèles (rats albinos, souris *rds* et souris *rd10*) lorsque l'AAV2/2.CMV.*epo* est injecté directement dans l'œil, aucun effet neuroprotecteur de l'EPO n'a été mis en évidence (Rex *et al.*, 2004). Le poids moléculaire de l'EPO recombinante est identique qu'elle soit produite dans l'œil ou dans le muscle suite à un transfert de gène (Rex *et al.*, 2004). Par contre dans la littérature, il est décrit que l'EPO recombinante présente des modifications post-traductionnelles différentes en fonction des conditions environnementales cellulaires et donc en fonction du tissu où celle-ci est produite (Lasne *et al.*, 2002). Ces modifications post-traductionnelles et notamment les glycosylations post-traductionnelles de l'EPO sont à l'origine d'une différence d'acidité entre les différentes EPO. Ces différences d'acidités induisent des variations de migrations lors de l'électrophorèse de ces différentes EPO au sein d'un gel polyacrylamide, les points de migrations de chaque EPO sont appelés pI pour points isoélectriques et la technique migration en Isoelectric focusing (IEF) (Lasne *et al.*, 2002). Dans notre étude, l'analyse des profils de migration en IEF des protéines recombinantes EPO produite par transfert de gène diffère selon que la protéine est produite par les photorécepteurs et/ou les cellules de l'EPR (Figure 5A, 5B et 5C). La différence dans la migration de l'EPO est également présente entre l'EPO recombinante produite par le muscle et celle produite dans la rétine (Figure 5D). Aucune des isoformes d'EPO recombinantes ne possède le même profil de migration que l'EPO endogène (Figure 5E). Notre étude a confirmé l'existence d'une différence entre l'isoforme d'EPO dérivant de la rétine et l'isoforme recombinante produite par le muscle qui avait déjà été démontrée (Lasne *et al.*, 2004). Cette différence peut expliquer le décalage observé entre l'administration intramusculaire et l'administration intraoculaire d'un AAV.*epo* dans la capacité de restitution de la fonction rétinienne dans des modèles de dégénérescence rétinienne (Rex *et al.*, 2004). L'explication de cette différence de sensibilité

de la rétine aux différentes isoformes d'EPO doit être étudiée avec notamment l'étude de spécificité des récepteurs rétiniens à l'EPO.

Deux perspectives peuvent être envisagées à la suite de cet article traitant de la régulation du transgène *epo* par le système tétracycline.

La première consiste en la régulation de l'expression de facteurs neurotrophiques divers utilisés en ophtalmologie. Nous avons évoqué, à plusieurs reprises dans la première partie, l'emploi du PEDF dans le traitement de la DMLA avec notamment un essai clinique de phase II pour le traitement de cette pathologie rétinienne par un adénovirus codant pour le PEDF (Campochiaro *et al.*, 2006). Dans la DMLA exsudative, la période active néovasculaire est plus importante les premières années de la maladie (Polito *et al.*, 2006). On peut penser que l'expression en continu du PEDF au niveau de la rétine, alors qu'il n'y a plus de phase néovasculaire active, pourrait être nocive pour la rétine. Du moins, la possibilité de réguler l'expression du PEDF en fonction de l'histoire naturelle de la maladie serait plus satisfaisante. D'autres facteurs neurotrophiques, comme le CNTF, le GDNF (McGee Sanftner *et al.*, 2001a; Buch *et al.*, 2006) et le FGF (Lau *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2001; Lau and Flannery, 2003) exprimés dans l'œil suite à un transfert de gène via un rAAV2, ont été utilisés pour prolonger la survie des photorécepteurs dans des modèles de dégénérescences rétiniennes héréditaires. Les premiers résultats publiés qui concernaient le transfert du gène *cntf* dans la rétine ont démontré l'efficacité de ce facteur neurotrophique à préserver la couche des noyaux des photorécepteurs après une injection intravitréenne d'un AAV.CMV.*cntf* chez les souris *opsin*^{-/-} et chez les rats transgéniques P23H et S334ter ainsi que dans le modèle murin *Prph2*^{Rd2/Rd2} (Liang *et al.*, 2001a; Liang *et al.*, 2001b). Par contre, l'étude électrophysiologique, réalisée chez les mêmes animaux injectés avec ce vecteur exprimant le CNTF, a mis en évidence une altération des amplitudes des ERGs au niveau des yeux injectés avec le vecteur codant pour le CNTF comparés aux yeux témoins injectés par un AAV2.CMV.*gfp*. Il semble que l'effet néfaste sur l'ERG soit dose-dépendant. En effet, lors d'une injection sous-rétinienne d'un AAV2.CMV.*cntf* à une dose équivalente à 1/100 d'une solution à 5.10⁸ particules, les altérations de l'ERG sont moins importantes que lors d'une injection sous-rétinienne d'un même vecteur à la dose équivalente à 1/10 d'une solution à 5.10⁸ particules (Buch *et al.*, 2006). Il semble que la dose de CNTF rétinienne à atteindre, pour obtenir une efficacité sans nocivité de ce facteur neurotrophique, soit comprise dans une fenêtre thérapeutique (Bok *et al.*, 2002; Schlichtenbrede *et al.*, 2003; Buch *et al.*, 2006). Le système de régulation TetOn pourrait permettre l'expression d'un taux déterminé de CNTF.

Taux qui pourrait être ajusté en fonction du sérotype de vecteur ou du promoteur ou du titre de la solution de vecteurs injectée comme nous l'avons démontré dans cet article.

La seconde perspective concerne le caractère neuroprotecteur de l'EPO. Les études relatées dans cette discussion et dans la première partie semblent démontrer que l'effet neuroprotecteur de l'érythropoïétine diffère d'un modèle animal de rétinopathie pigmentaire à l'autre, qu'il diffère également en fonction de l'EPO utilisée (recombinante, produite par le muscle ou l'œil suite à un transfert de gène) (Grimm *et al.*, 2002; Rex *et al.*, 2004). Toutefois, une constatation clinique de l'équipe du Pr Dufier semble montrer que l'érythropoïétine est une voie possible pour le traitement des dégénérescences rétiniennes héréditaires et que cette molécule doit être testée dans le cadre de ces dégénérescences. En effet, ils ont exposé le cas d'un jeune homme âgé de 19 ans ayant un syndrome de Bardet Biedl qui présentait une anémie sidérolastique réfractaire pour laquelle un traitement d'EPO recombinante à 30000 UI/semaine a été instauré pour une durée de 2 ans. L'épaisseur rétinienne mesurée par OCT ainsi que les capacités visuelles de ce jeune patient (ERG et acuité visuelle) ont été améliorées après la mise en place du traitement par l'érythropoïétine (Roche *et al.*, 2006). C'est pourquoi, un des objectifs prochains de l'équipe « rétine » de l'unité INSERM U649 est de tester le vecteur régulable exprimant le gène de *l'érythropoïétine*, utilisé dans cet article, dans un modèle animal de dégénérescence rétinienne d'évolution rapide : le chien teckel RPGRIP1, qui est un modèle canin d'Amaurose Congénitale de Leber.

C : Conclusion générale

Le premier objectif que nous nous étions fixé dans cette thèse était d'évaluer l'efficacité et la stabilité du transfert de gènes via un AAV dans la rétine d'animaux sains. Nous avons montré qu'après une injection unique d'un vecteur AAV de sérotype 2, 4 ou 5 portant le transgène *gfp* sous le contrôle du promoteur CMV, l'expression du transgène dans la rétine était stable plus de 36 mois chez 3 chiens et un primate. Durant ce travail, nous avons pu évaluer, *in vivo*, le retentissement pour la rétine d'une injection sous-rétinienne et d'un transfert de gène à long terme via un rAAV. Les angiographies à la fluorescéine ou au vert d'indocyanine réalisés chez les animaux traités n'ont pas mis en évidence d'altération rétinienne. L'évaluation électrorétinographique réalisée chez les 4 animaux n'a pas montré d'altération de la fonction rétinienne suite à ce transfert de gène. La procédure chirurgicale d'injection sous-rétinienne par voie transvitreuse est une procédure sûre car, sur la durée de l'étude, aucun animal n'a présenté d'effets adverses comme un décollement de rétine ou une infection intraoculaire ou une cataracte. Le suivi à long terme de tels animaux est nécessaire également pour s'assurer de la non-survenue de processus tumoraux ou dégénératifs. Nous continuons donc à examiner régulièrement ces animaux. Plus de 66 mois après le début de l'étude, aucune rectification dans les conclusions de ce premier travail n'a été nécessaire.

Notre deuxième objectif était d'évaluer un AAV de sérotype 4 pour une thérapie génie de substitution dans un modèle animal de dégénérescence rétinienne. L'injection en sous-rétinien d'AAV2/4.RPE65.*rpe65* chez des chiens Briard RPE65^{-/-}, modèle de l'Amaurose congénitale de Leber, a permis une restauration de la fonction visuelle et de la vision. L'utilisation d'un sérotype 4 couplé à un promoteur spécifique RPE65, a pour but d'éviter la transduction et l'expression de la protéine RPE65 dans des cellules autres que les cellules de l'épithélium pigmenté rétinien. Ce travail nous a, également, permis de préciser les paramètres des injections du vecteur AAV2/4.RPE65.*rpe65* chez les chiens RPE65^{-/-} (dose de vecteur, âge au moment du traitement, définition de la zone de traitement). Les injections dans ce modèle canin de dégénérescence rétinienne ont mis en évidence une fragilité rétinienne au décours des injections sous-rétiennes ; fragilité qui est à l'origine d'altérations rétiniennes dans la zone traitée. Cette particularité de la rétine RPE65^{-/-} sera à prendre en compte lors de l'établissement de protocoles cliniques de thérapie génique dans l'amaurose congénitale de Leber liée au gène *rpe65*. La perspective principale qui découle de ce travail est le projet de mise au point d'un protocole d'essai clinique de thérapie génique via un AAV de sérotype 4 de l'Amaurose congénitale de Leber liée à la mutation du gène *rpe65*^{-/-}. Aux Etats-Unis, deux protocoles d'essai clinique de phase I/II ont été acceptés par le RAC (Recombinant DNA Advisory Committee)(www4.od.nih.gov/oba/Rdna.htm). Dans ces deux projets, l'injection d'un AAV de sérotype 2, qui transduit les photorécepteurs et les cellules de l'épithélium pigmentaire codant pour le transgène *rpe65* contrôlé par un promoteur chimère ubiquitaire CAG doit être réalisée chez des enfants RPE65^{-/-} âgés de 8 à 18 ans. Les inclusions pour ces deux essais cliniques sont en passe de démarrer.

La possibilité de réaliser une régulation reproductible et efficace de l'expression du transgène *epo* dans la rétine de primate via un rAAV-TetOn ouvre des perspectives thérapeutiques importantes pour le transfert de gène dans la rétine. La régulation de l'expression du transgène est facilement réalisée par l'administration d'un antibiotique. Les inductions itératives sur une durée de 8 à 24 mois n'induisent pas une diminution de l'expression du transgène, ni l'apparition de réactions immunes contre le rTta du système TetOn comme il a pu être constaté lors de l'utilisation de ce système de régulation dans le muscle (Favre *et al.*, 2002; Chenuaud *et al.*, 2004b). De plus, nous avons montré qu'en fonction de la dose du vecteur AAV injecté, en fonction du promoteur utilisé et en fonction du sérotype de l'AAV injecté (4 ou 5), la quantité d'EPO exprimée dans l'humeur aqueuse pouvait varier d'un facteur 150. Si on transpose au système Tétracycline, les constatations réalisées par Lebherz lors des variations des doses d'inducteur avec l'utilisation du système rapamycine (Lebherz *et al.*, 2005), on peut penser que l'on disposera d'une nouvelle possibilité de faire varier les quantités du transgène exprimé et par conséquent les quantités

de la protéine thérapeutique par variation de la dose de doxycycline en cours du traitement. Ces différentes possibilités pourront permettre de s'adapter aux évolutions des maladies rétiniennes traitées par thérapie génique et aux besoins d'adaptation *in situ* de différentes thérapeutiques. Les perspectives d'application pour la rétine d'un tel système de régulation de l'expression d'un transgène sont la régulation de l'expression de facteurs antiangiogéniques ou neurotrophiques dans le traitement par thérapie génique de complémentation via des rAAV des pathologies rétiniennes néovasculaires ou dégénératives. De manière plus mineure, la régulation d'un facteur de transcription (CRX, RP1, NR2E3...) dont les gènes peuvent être mutés dans des pathologies rétiniennes héréditaires dégénératives pourrait être envisagée avec le système Tétracycline.

Toutefois, il reste à tester différentes possibilités de variations de l'induction notamment l'effet d'une induction continue par la doxycycline ainsi que l'effet de variations des doses de doxycycline. La stabilité de ce système d'induction pour le transfert de gène dans la rétine doit être évaluée sur une période plus importante.

De plus, l'utilisation dans la construction de ce système de régulation du transgène rapporteur *epo*, pourrait nous amener à tester les capacités neuroprotectrices de cette protéine dans un modèle de dégénérescence rétinienne. Comme nous avons déjà le système de régulation avec le transgène *epo*, nous projetons d'étudier les effets neuroprotecteurs de l'EPO chez le teckel RPGRIP1^{-/-}.

D : Références bibliographiques

- ACLAND, G.M., AGUIRRE, G.D., BENNETT, J., ALEMAN, T.S., CIDECIYAN, A.V., BENNICELLI, J., DEJNEKA, N.S., PEARCE-KELLING, S.E., MAGUIRE, A.M., PALCZEWSKI, K., HAUSWIRTH, W.W., and JACOBSON, S.G. (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**, 1072-1082.
- ACLAND, G.M., AGUIRRE, G.D., RAY, J., ZHANG, Q., ALEMAN, T.S., CIDECIYAN, A.V., PEARCE-KELLING, S.E., ANAND, V., ZENG, Y., MAGUIRE, A.M., JACOBSON, S.G., HAUSWIRTH, W.W., and BENNETT, J. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* **28**, 92-95.
- ADAMS, J.M., and CORY, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 715-720.
- AGUIRRE, G. (1978). Retinal degenerations in the dog. I. Rod dysplasia. *Exp Eye Res* **26**, 233-253.
- AGUIRRE, G.D., BALDWIN, V., PEARCE-KELLING, S., NARFSTROM, K., RAY, K., and ACLAND, G.M. (1998). Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Mol Vis* **4**, 23.
- AGUIRRE, G.D., BALDWIN, V., WEEKS, K.M., ACLAND, G.M., and RAY, K. (1999). Frequency of the codon 807 mutation in the cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in Irish setters and other dog breeds with hereditary retinal degeneration. *J Hered* **90**, 143-147.
- AIELLO, L.P., AVERY, R.L., ARRIGG, P.G., KEYT, B.A., JAMPEL, H.D., SHAH, S.T., PASQUALE, L.R., THIEME, H., IWAMOTO, M.A., PARK, J.E., and ET AL. (1994). Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* **331**, 1480-1487.
- ALI, R.R., REICHEL, M.B., THRASHER, A.J., LEVINSKY, R.J., KINNON, C., KANUGA, N., HUNT, D.M., and BHATTACHARYA, S.S. (1996). Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet* **5**, 591-594.
- ALI, R.R., SARRA, G.M., STEPHENS, C., ALWIS, M.D., BAINBRIDGE, J.W., MUNRO, P.M., FAUSER, S., REICHEL, M.B., KINNON, C., HUNT, D.M., BHATTACHARYA, S.S., and THRASHER, A.J. (2000). Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* **25**, 306-310.
- ALLIKMETS, R., SHROYER, N.F., SINGH, N., SEDDON, J.M., LEWIS, R.A., BERNSTEIN, P.S., PEIFFER, A., ZABRISKIE, N.A., LI, Y., HUTCHINSON, A., DEAN, M., LUPSKI, J.R., and

- LEPPERT, M. (1997a). Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* **277**, 1805-1807.
- ALLIKMETS, R., SINGH, N., SUN, H., SHROYER, N.F., HUTCHINSON, A., CHIDAMBARAM, A., GERRARD, B., BAIRD, L., STAUFFER, D., PEIFFER, A., RATTNER, A., SMALLWOOD, P., LI, Y., ANDERSON, K.L., LEWIS, R.A., NATHANS, J., LEPPERT, M., DEAN, M., and LUPSKE, J.R. (1997b). A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* **15**, 236-246.
- ALON, T., HEMO, I., ITIN, A., PE'ER, J., STONE, J., and KESHET, E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* **1**, 1024-1028.
- ARECHAVALETA-VELASCO, F., MA, Y., ZHANG, J., MCGRATH, C.M., and PARRY, S. (2006). Adeno-Associated Virus-2 (AAV-2) Causes Trophoblast Dysfunction, and Placental AAV-2 Infection Is Associated with Preeclampsia. *Am J Pathol* **168**, 1951-1959.
- ARRUDA, V.R., FIELDS, P.A., MILNER, R., WAINWRIGHT, L., DE MIGUEL, M.P., DONOVAN, P.J., HERZOG, R.W., NICHOLS, T.C., BIEGEL, J.A., RAZAVI, M., DAKE, M., HUFF, D., FLAKE, A.W., COUTO, L., KAY, M.A., and HIGH, K.A. (2001). Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther* **4**, 586-592.
- ATCHISON, R.W., CASTO, B.C., and HAMMON, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**, 754-756.
- AUGOOD, C., FLETCHER, A., BENTHAM, G., CHAKRAVARTHY, U., DE JONG, P.T., RAHU, M., SELAND, J., SOUBRANE, G., TOMAZZOLI, L., TOPOUZIS, F., VIOQUE, J., and YOUNG, I. (2004). Methods for a population-based study of the prevalence of and risk factors for age-related maculopathy and macular degeneration in elderly European populations: the EUREYE study. *Ophthalmic Epidemiol* **11**, 117-129.
- AURICCHIO, A., BEHLING, K.C., MAGUIRE, A.M., O'CONNOR, E.M., BENNETT, J., WILSON, J.M., and TOLENTINO, M.J. (2002a). Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther* **6**, 490-494.
- AURICCHIO, A., GAO, G.P., YU, Q.C., RAPER, S., RIVERA, V.M., CLACKSON, T., and WILSON, J.M. (2002b). Constitutive and regulated expression of processed insulin following in vivo hepatic gene transfer. *Gene Ther* **9**, 963-971.
- AURICCHIO, A., KOBINGER, G., ANAND, V., HILDINGER, M., O'CONNOR, E., MAGUIRE, A.M., WILSON, J.M., and BENNETT, J. (2001a). Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet* **10**, 3075-3081.
- AURICCHIO, A., O'CONNOR, E., HILDINGER, M., and WILSON, J.M. (2001b). A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* **4**, 372-374.
- AURICCHIO, A., RIVERA, V.M., CLACKSON, T., O'CONNOR, E.E., MAGUIRE, A.M., TOLENTINO, M.J., BENNETT, J., and WILSON, J.M. (2002c). Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol Ther* **6**, 238-242.
- AURICCHIO, A., and ROLLING, F. (2005). Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases. *Curr Gene Ther* **5**, 339-348.
- BAHRAMI, H., MELIA, M., and DAGNELIE, G. (2006). Lutein supplementation in retinitis pigmentosa: PC-based vision assessment in a randomized double-masked placebo-controlled clinical trial [NCT00029289]. *BMC Ophthalmol* **6**, 23.

- BAINBRIDGE, J.W., MISTRY, A., BINLEY, K., DE ALWIS, M., THRASHER, A.J., NAYLOR, S., and ALI, R.R. (2003a). Hypoxia-regulated transgene expression in experimental retinal and choroidal neovascularization. *Gene Ther* **10**, 1049-1054.
- BAINBRIDGE, J.W., MISTRY, A., DE ALWIS, M., PALEOLOG, E., BAKER, A., THRASHER, A.J., and ALI, R.R. (2002). Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther* **9**, 320-326.
- BAINBRIDGE, J.W., MISTRY, A., SCHLICHTENBREDE, F.C., SMITH, A., BRODERICK, C., DE ALWIS, M., GEORGIADIS, A., TAYLOR, P.M., SQUIRES, M., SETHI, C., CHARTERIS, D., THRASHER, A.J., SARGAN, D., and ALI, R.R. (2003b). Stable rAAV-mediated transduction of rod and cone photoreceptors in the canine retina. *Gene Ther* **10**, 1336-1344.
- BALAGUE, C., KALLA, M., and ZHANG, W.W. (1997). Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J Virol* **71**, 3299-3306.
- BALMER, A., MUNIER, F., and ZOGRAFOS, L. (2002). [New strategies in the management of retinoblastoma]. *J Fr Ophtalmol* **25**, 187-193.
- BANTEL-SCHAAL, U., and ZUR HAUSEN, H. (1984). Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* **134**, 52-63.
- BAREIL, C., HAMEL, C., PALLARES-RUIZ, N., ARNAUD, B., DEMAILLE, J., CLAUSTRES, M. (1999). Molecular analysis of the rhodopsin gene in southern France: identification of the first duplication responsible for retinitis pigmentosa, c.998999ins4. *Ophthalmic Genet* **20**, 173-182.
- BARTLETT, J.S., WILCHER, R., and SAMULSKI, R.J. (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* **74**, 2777-2785.
- BASCOM, R.A., GARCIA-HERAS, J., HSIEH, C.L., GERHARD, D.S., JONES, C., FRANCKE, U., WILLARD, H.F., LEDBETTER, D.H., and MCINNES, R.R. (1992a). Localization of the photoreceptor gene ROM1 to human chromosome 11 and mouse chromosome 19: sublocalization to human 11q13 between PGA and PYGM. *Am J Hum Genet* **51**, 1028-1035.
- BASCOM, R.A., MANARA, S., COLLINS, L., MOLDAY, R.S., KALNINS, V.I., and MCINNES, R.R. (1992b). Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disk rim protein family implicated in human retinopathies. *Neuron* **8**, 1171-1184.
- BASHSHUR, Z.F., BAZARBACHI, A., SCHAKAL, A., HADDAD, Z.A., EL HAIBI, C.P., and NOUREDDIN, B.N. (2006). Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* **142**, 1-9.
- BATTEN, M.L., IMANISHI, Y., MAEDA, T., TU, D.C., MOISE, A.R., BRONSON, D., POSSIN, D., VAN GELDER, R.N., BAEHR, W., and PALCZEWSKI, K. (2004). Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem* **279**, 10422-10432.
- BATTEN, M.L., IMANISHI, Y., TU, D.C., DOAN, T., ZHU, L., PANG, J., GLUSHAKOVA, L., MOISE, A.R., BAEHR, W., VAN GELDER, R.N., HAUSWIRTH, W.W., RIEKE, F., and PALCZEWSKI, K. (2005). Pharmacological and rAAV gene therapy rescue of visual functions in a blind mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS Med* **2**, e333.
- BAVIK, C.O., BUSCH, C., and ERIKSSON, U. (1992). Characterization of a plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* **267**, 23035-23042.
- BAYES, M., GIORDANO, M., BALCELLS, S., GRINBERG, D., VILAGELIU, L., MARTINEZ, I., AYUSO, C., BENITEZ, J., RAMOS-ARROYO, M.A., CHIVELET, P., and ET AL. (1995). Homozygous tandem duplication within the gene encoding the beta-subunit of rod

- phosphodiesterase as a cause for autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* **5**, 228-234.
- BAZAN, N.G., SCOTT, B.L., REDDY, T.S., and PELIAS, M.Z. (1986). Decreased content of docosahexaenoate and arachidonate in plasma phospholipids in Usher's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **141**, 600-604.
- BEATTY, S., MURRAY, I.J., HENSON, D.B., CARDEN, D., KOH, H., and BOULTON, M.E. (2001). Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 439-446.
- BEHARRY, S., ZHONG, M., and MOLDAY, R.S. (2004). N-retinylidene-phosphatidylethanolamine is the preferred retinoid substrate for the photoreceptor-specific ABC transporter ABCA4 (ABCR). *J Biol Chem* **279**, 53972-53979.
- BELTRAN, W.A., ZHANG, Q., KIJAS, J.W., GU, D., ROHRER, H., JORDAN, J.A., and AGUIRRE, G.D. (2003). Cloning, mapping, and retinal expression of the canine ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha). *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 3642-3649.
- BENNETT, J., MAGUIRE, A.M., CIDECIYAN, A.V., SCHNELL, M., GLOVER, E., ANAND, V., ALEMAN, T.S., CHIRMULE, N., GUPTA, A.R., HUANG, Y., GAO, G.P., NYBERG, W.C., TAZELAAR, J., HUGHES, J., WILSON, J.M., and JACOBSON, S.G. (1999). Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9920-9925.
- BERNS, K.I., and GIRAUD, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**, 1-23.
- BERSON, E.L. (1993). Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**, 1659-1676.
- BERSON, E.L., ROSNER, B., SANDBERG, M.A., HAYES, K.C., NICHOLSON, B.W., WEIGEL-DIFRANCO, C., and WILLETT, W. (1993). A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* **111**, 761-772.
- BERSON, E.L., ROSNER, B., SANDBERG, M.A., WEIGEL-DIFRANCO, C., MOSER, A., BROCKHURST, R.J., HAYES, K.C., JOHNSON, C.A., ANDERSON, E.J., GAUDIO, A.R., WILLETT, W.C., and SCHAEFER, E.J. (2004). Further evaluation of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment: subgroup analyses. *Arch Ophthalmol* **122**, 1306-1314.
- BIRCH, D.G. (1999). Retinal degeneration in retinitis pigmentosa and neuronal ceroid lipofuscinosis: An overview. *Mol Genet Metab* **66**, 356-366.
- BLEKER, S., SONNTAG, F., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2005). Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *J Virol* **79**, 2528-2540.
- BOK, D., YASUMURA, D., MATTHES, M.T., RUIZ, A., DUNCAN, J.L., CHAPPELOW, A.V., ZOLUTUKHIN, S., HAUSWIRTH, W., and LAVAIL, M.M. (2002). Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp Eye Res* **74**, 719-735.
- BOULANGER, A., LIU, S., HENNINGSGAARD, A.A., YU, S., and REDMOND, T.M. (2000). The upstream region of the Rpe65 gene confers retinal pigment epithelium-specific expression in vivo and in vitro and contains critical octamer and E-box binding sites. *J Biol Chem* **275**, 31274-31282.
- BOWNE, S.J., SULLIVAN, L.S., MORTIMER, S.E., HEDSTROM, L., ZHU, J., SPELLICY, C.J., GIRE, A.I., HUGHBANKS-WHEATON, D., BIRCH, D.G., LEWIS, R.A., HECKENLIVELY, J.R., and

- DAIGER, S.P. (2006). Spectrum and frequency of mutations in IMPDH1 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa and leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 34-42.
- BREKKNEN, R.A., OVERHOLSER, J.P., STASTNY, V.A., WALTENBERGER, J., MINNA, J.D., and THORPE, P.E. (2000). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* **60**, 5117-5124.
- BRESSLER, N.M., and BRESSLER, S.B. (1995). Preventative ophthalmology. Age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **102**, 1206-1211.
- BRINDLEY, G.S., and LEWIN, W.S. (1968). The visual sensations produced by electrical stimulation of the medial occipital cortex. *J Physiol* **194**, 54-55P.
- BRUMENT, N., MORENWEISER, R., BLOUIN, V., TOUBLANC, E., RAIMBAUD, I., CHEREL, Y., FOLLIOU, S., GADEN, F., BOULANGER, P., KRONER-LUX, G., MOULLIER, P., ROLLING, F., and SALVETTI, A. (2002). A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5. *Mol Ther* **6**, 678-686.
- BUCH, P.K., MACLAREN, R.E., DURAN, Y., BALAGGAN, K.S., MACNEIL, A., SCHLICHTENBREDE, F.C., SMITH, A.J., and ALI, R.R. (2006). In Contrast to AAV-Mediated Cntf Expression, AAV-Mediated Gdnf Expression Enhances Gene Replacement Therapy in Rodent Models of Retinal Degeneration. *Mol Ther*.
- BULLER, R.M., and ROSE, J.A. (1978). Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. *J Virol* **25**, 331-338.
- BUNGE, S., WEDEMANN, H., DAVID, D., TERWILLIGER, D.J., VAN DEN BORN, L.I., AULEHLA-SCHOLZ, C., SAMANNS, C., HORN, M., OTT, J., SCHWINGER, E., and ET AL. (1993). Molecular analysis and genetic mapping of the rhodopsin gene in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Genomics* **17**, 230-233.
- BURSTEDT, M.S., SANDGREN, O., HOLMGREN, G., and FORSMAN-SEMB, K. (1999). Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 995-1000.
- BUSH, R.A., LEI, B., TAO, W., RAZ, D., CHAN, C.C., COX, T.A., SANTOS-MUFFLEY, M., and SIEVING, P.A. (2004). Encapsulated cell-based intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor in normal rabbit: dose-dependent effects on ERG and retinal histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 2420-2430.
- CAMPOCHIARO, P.A., NGUYEN, Q.D., SHAH, S.M., KLEIN, M.L., HOLZ, E., FRANK, R.N., SAPERSTEIN, D.A., GUPTA, A., STOUT, J.T., MACKO, J., DIBARTOLOMEO, R., and WEI, L.L. (2006). Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* **17**, 167-176.
- CAMUZAT, A., DOLLFUS, H., ROZET, J.M., GERBER, S., BONNEAU, D., BONNEMAISON, M., BRIARD, M.L., DUFIER, J.L., GHAZI, I., LEOWSKI, C., and ET AL. (1995). A gene for Leber's congenital amaurosis maps to chromosome 17p. *Hum Mol Genet* **4**, 1447-1452.
- CARREIRA, A., MENENDEZ, M., REGUERA, J., ALMENDRAL, J.M., and MATEU, M.G. (2004). In vitro disassembly of a parvovirus capsid and effect on capsid stability of heterologous peptide insertions in surface loops. *J Biol Chem* **279**, 6517-6525.
- CAYOUILLE, M., and GRAVEL, C. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther* **8**, 423-430.

- CELIK, M., GOKMEN, N., ERBAYRAKTAR, S., AKHISAROGLU, M., KONAKC, S., ULUKUS, C., GENC, S., GENC, K., SAGIROGLU, E., CERAMI, A., and BRINES, M. (2002). Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2258-2263.
- CHABRE, M., and DETERRE, P. (1989). Molecular mechanism of visual transduction. *Eur J Biochem* **179**, 255-266.
- CHADEUF, G., FAVRE, D., TESSIER, J., PROVOST, N., NONY, P., KLEINSCHMIDT, J., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2000). Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *J Gene Med* **2**, 260-268.
- CHANG, L.S., SHI, Y., and SHENK, T. (1989). Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J Virol* **63**, 3479-3488.
- CHEJANOVSKY, N., and CARTER, B.J. (1989). Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication. *Virology* **173**, 120-128.
- CHEN, C.K., BURNS, M.E., SPENCER, M., NIEMI, G.A., CHEN, J., HURLEY, J.B., BAYLOR, D.A., and SIMON, M.I. (1999a). Abnormal photoresponses and light-induced apoptosis in rods lacking rhodopsin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3718-3722.
- CHEN, C.L., JENSEN, R.L., SCHNEPP, B.C., CONNELL, M.J., SHELL, R., SFERRA, T.J., BARTLETT, J.S., CLARK, K.R., and JOHNSON, P.R. (2005). Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol* **79**, 14781-14792.
- CHEN, J., SIMON, M.I., MATTHES, M.T., YASUMURA, D., and LAVAIL, M.M. (1999b). Increased susceptibility to light damage in an arrestin knockout mouse model of Oguchi disease (stationary night blindness). *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2978-2982.
- CHEN, S., WANG, Q.L., NIE, Z., SUN, H., LENNON, G., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., and ZACK, D.J. (1997). Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* **19**, 1017-1030.
- CHENUAUD, P., LARCHER, T., RABINOWITZ, J.E., PROVOST, N., CHEREL, Y., CASADEVALL, N., SAMULSKI, R.J., and MOULLIER, P. (2004a). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* **103**, 3303-3304.
- CHENUAUD, P., LARCHER, T., RABINOWITZ, J.E., PROVOST, N., JOUSSEMET, B., BUJARD, H., SAMULSKI, R.J., FAVRE, D., and MOULLIER, P. (2004b). Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* **9**, 410-418.
- CHEVEZ-BARRIOS, P., CHINTAGUMPALA, M., MIELER, W., PAYSSE, E., BONIUK, M., KOZINETZ, C., HURWITZ, M.Y., and HURWITZ, R.L. (2005). Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *J Clin Oncol* **23**, 7927-7935.
- CHIORINI, J.A., KIM, F., YANG, L., and KOTIN, R.M. (1999). Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol* **73**, 1309-1319.
- CHIORINI, J.A., YANG, L., LIU, Y., SAFER, B., and KOTIN, R.M. (1997). Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J Virol* **71**, 6823-6833.
- CHIORINI, J.A., YANG, L., SAFER, B., and KOTIN, R.M. (1995). Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection. *J Virol* **69**, 7334-7338.

- CHIORINI, J.A., ZIMMERMANN, B., YANG, L., SMITH, R.H., AHEARN, A., HERBERG, F., and KOTIN, R.M. (1998). Inhibition of PrKX, a novel protein kinase, and the cyclic AMP-dependent protein kinase PKA by the regulatory proteins of adeno-associated virus type 2. *Mol Cell Biol* **18**, 5921-5929.
- CHIRMULE, N., PROPERT, K., MAGOSIN, S., QIAN, Y., QIAN, R., and WILSON, J. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* **6**, 1574-1583.
- CHOI, V.W., MCCARTY, D.M., and SAMULSKI, R.J. (2005). AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* **5**, 299-310.
- CHONG, N.H., ALEXANDER, R.A., WATERS, L., BARNETT, K.C., BIRD, A.C., and LUTHERT, P.J. (1999). Repeated injections of a ciliary neurotrophic factor analogue leading to long-term photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 1298-1305.
- CHOW, A.Y., CHOW, V.Y., PACKO, K.H., POLLACK, J.S., PEYMAN, G.A., and SCHUCHARD, R. (2004). The artificial silicon retina microchip for the treatment of vision loss from retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* **122**, 460-469.
- CIDECIYAN, A.V., HOOD, D.C., HUANG, Y., BANIN, E., LI, Z.Y., STONE, E.M., MILAM, A.H., and JACOBSON, S.G. (1998). Disease sequence from mutant rhodopsin allele to rod and cone photoreceptor degeneration in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7103-7108.
- CIULLA, T.A., DANIS, R.P., and HARRIS, A. (1998). Age-related macular degeneration: a review of experimental treatments. *Surv Ophthalmol* **43**, 134-146.
- CLARK, K.R., LIU, X., MCGRATH, J.P., and JOHNSON, P.R. (1999). Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Hum Gene Ther* **10**, 1031-1039.
- CLARKE, G., GOLDBERG, A.F., VIDGEN, D., COLLINS, L., PLODER, L., SCHWARZ, L., MOLDAJ, L.L., ROSSANT, J., SZEL, A., MOLDAJ, R.S., BIRCH, D.G., and MCINNES, R.R. (2000). Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis. *Nat Genet* **25**, 67-73.
- CLERC, B. (1997). *ophtalmologie vétérinaire. édition du point vétérinaire 2ème édition.*
- CONRAD, C.K., ALLEN, S.S., AFIONE, S.A., REYNOLDS, T.C., BECK, S.E., FEE-MAKI, M., BARRAZZA-ORTIZ, X., ADAMS, R., ASKIN, F.B., CARTER, B.J., GUGGINO, W.B., and FLOTTE, T.R. (1996). Safety of single-dose administration of an adeno-associated virus (AAV)-CFTR vector in the primate lung. *Gene Ther* **3**, 658-668.
- COUTO, L., PARKER, A., and GORDON, J.W. (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**, 287-291.
- CREMERS, F.P., VAN DE POL, D.J., VAN DRIEL, M., DEN HOLLANDER, A.I., VAN HAREN, F.J., KNOERS, N.V., TIJMES, N., BERGEN, A.A., ROHRSCHEIDER, K., BLANKENAGEL, A., PINCKERS, A.J., DEUTMAN, A.F., and HOYNG, C.B. (1998). Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet* **7**, 355-362.
- DAVIDOFF, A.M., NG, C.Y., SLEEP, S., GRAY, J., AZAM, S., ZHAO, Y., MCINTOSH, J.H., KARIMIPOOR, M., and NATHWANI, A.C. (2004). Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. *J Virol Methods* **121**, 209-215.

- DAWSON, D.W., VOLPERT, O.V., GILLIS, P., CRAWFORD, S.E., XU, H., BENEDICT, W., and BOUCK, N.P. (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* **285**, 245-248.
- DAWSON, W.W., and RADTKE, N.D. (1977). The electrical stimulation of the retina by indwelling electrodes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **16**, 249-252.
- DE VRIES, C., ESCOBEDO, J.A., UENO, H., HOUCK, K., FERRARA, N., and WILLIAMS, L.T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**, 989-991.
- DEJNEKA, N.S., SURACE, E.M., ALEMAN, T.S., CIDECIYAN, A.V., LYUBARSKY, A., SAVCHENKO, A., REDMOND, T.M., TANG, W., WEI, Z., REX, T.S., GLOVER, E., MAGUIRE, A.M., PUGH, E.N., JR., JACOBSON, S.G., and BENNETT, J. (2004). In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness. *Mol Ther* **9**, 182-188.
- DEN HOLLANDER, A.I., KOENEKOOP, R.K., YZER, S., LOPEZ, I., ARENDS, M.L., VOESENEK, K.E., ZONNEVELD, M.N., STROM, T.M., MEITINGER, T., BRUNNER, H.G., HOYNG, C.B., VAN DEN BORN, L.I., ROHRSCHEIDER, K., and CREMERS, F.P. (2006). Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* **79**, 556-561.
- DENG, W.T., YAN, Z., DINCULESCU, A., PANG, J., TEUSNER, J.T., CORTEZ, N.G., BERNS, K.I., and HAUSWIRTH, W.W. (2005). Adeno-associated virus-mediated expression of vascular endothelial growth factor peptides inhibits retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Hum Gene Ther* **16**, 1247-1254.
- DHARMARAJ, S.R., SILVA, E.R., PINA, A.L., LI, Y.Y., YANG, J.M., CARTER, C.R., LOYER, M.K., EL-HILALI, H.K., TRABOULSI, E.K., SUNDIN, O.K., ZHU, D.K., KOENEKOOP, R.K., and MAUMENEE, I.H. (2000). Mutational analysis and clinical correlation in Leber congenital amaurosis. *Ophthalmic Genet* **21**, 135-150.
- DI PASQUALE, G., DAVIDSON, B.L., STEIN, C.S., MARTINS, I., SCUDIERO, D., MONKS, A., and CHIORINI, J.A. (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* **9**, 1306-1312.
- DI PASQUALE, G., and STACEY, S.N. (1998). Adeno-associated virus Rep78 protein interacts with protein kinase A and its homolog PRKX and inhibits CREB-dependent transcriptional activation. *J Virol* **72**, 7916-7925.
- DING, B., RYDER, O.A., WANG, X., BAI, S.C., ZHOU, S.Q., and ZHANG, Y. (2000). Molecular basis of albinism in the rhesus monkey. *Mutat Res* **449**, 1-6.
- DING, W., YAN, Z., ZAK, R., SAAVEDRA, M., RODMAN, D.M., and ENGELHARDT, J.F. (2003). Second-strand genome conversion of adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and AAV-5 is not rate limiting following apical infection of polarized human airway epithelia. *J Virol* **77**, 7361-7366.
- DITTRICH, F., THOENEN, H., and SENDTNER, M. (1994). Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Ann Neurol* **35**, 151-163.
- DOLL, R.F., CRANDALL, J.E., DYER, C.A., AUCCOIN, J.M., and SMITH, F.I. (1996). Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. *Gene Ther* **3**, 437-447.
- DONG, J.Y., FAN, P.D., and FRIZZELL, R.A. (1996). Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* **7**, 2101-2112.

- DOUAR, A.M., POULARD, K., STOCKHOLM, D., and DANOS, O. (2001). Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* **75**, 1824-1833.
- DRYJA, T.P., ADAMS, S.M., GRIMSBY, J.L., MCGEE, T.L., HONG, D.H., LI, T., ANDREASSON, S., and BERSON, E.L. (2001). Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* **68**, 1295-1298.
- DRYJA, T.P., BERSON, E.L., RAO, V.R., and OPRIAN, D.D. (1993). Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nat Genet* **4**, 280-283.
- DRYJA, T.P., HAHN, L.B., REBOUL, T., and ARNAUD, B. (1996). Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. *Nat Genet* **13**, 358-360.
- DRYJA, T.P., MCGEE, T.L., HAHN, L.B., COWLEY, G.S., OLSSON, J.E., REICHEL, E., SANDBERG, M.A., and BERSON, E.L. (1990a). Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* **323**, 1302-1307.
- DRYJA, T.P., MCGEE, T.L., REICHEL, E., HAHN, L.B., COWLEY, G.S., YANDELL, D.W., SANDBERG, M.A., and BERSON, E.L. (1990b). A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* **343**, 364-366.
- DRYJA, T.P., RUCINSKI, D.E., CHEN, S.H., and BERSON, E.L. (1999). Frequency of mutations in the gene encoding the alpha subunit of rod cGMP-phosphodiesterase in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 1859-1865.
- DUAN, D., YUE, Y., YAN, Z., YANG, J., and ENGELHARDT, J.F. (2000). Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* **105**, 1573-1587.
- DUDUS, L., ANAND, V., ACLAND, G.M., CHEN, S.J., WILSON, J.M., FISHER, K.J., MAGUIRE, A.M., and BENNETT, J. (1999). Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vision Res* **39**, 2545-2553.
- EL MATRI, L., AMBRESIN, A., SCHORDERET, D.F., KAWASAKI, A., SEELIGER, M.W., WENZEL, A., ARSENIJEVIC, Y., BORRUAT, F.X., and MUNIER, F.L. (2006). Phenotype of three consanguineous Tunisian families with early-onset retinal degeneration caused by an R91W homozygous mutation in the RPE65 gene. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*.
- FARBER, D.B. (1995). From mice to men: the cyclic GMP phosphodiesterase gene in vision and disease. The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**, 263-275.
- FAVRE, D., BLOUIN, V., PROVOST, N., SPISEK, R., PORROT, F., BOHL, D., MARME, F., CHEREL, Y., SALVETTI, A., HURTREL, B., HEARD, J.M., RIVIERE, Y., and MOULLIER, P. (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.
- FAVRE, D., PROVOST, N., BLOUIN, V., BLANCHO, G., CHEREL, Y., SALVETTI, A., and MOULLIER, P. (2001). Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther* **4**, 559-566.
- FELIUS, J., THOMPSON, D.A., KHAN, N.W., BINGHAM, E.L., JAMISON, J.A., KEMP, J.A., and SIEVING, P.A. (2002). Clinical course and visual function in a family with mutations in the RPE65 gene. *Arch Ophthalmol* **120**, 55-61.
- FENG, D., CHEN, J., YUE, Y., ZHU, H., XUE, J., and JIA, W.W. (2006). A 16bp Rep binding element is sufficient for mediating Rep-dependent integration into AAVS1. *J Mol Biol* **358**, 38-45.

- FESKANICH, D., SINGH, V., WILLETT, W.C., and COLDITZ, G.A. (2002). Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women. *Jama* **287**, 47-54.
- FISHMAN, G.A., ANDERSON, R.J., and LOURENCO, P. (1985). Prevalence of posterior subcapsular lens opacities in patients with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* **69**, 263-266.
- FISHMAN, G.A., FISHMAN, M., and MAGGIANO, J. (1977). Macular lesions associated with retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* **95**, 798-803.
- FOLLIOT, S., BRIOT, D., CONRATH, H., PROVOST, N., CHEREL, Y., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2003). Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *J Gene Med* **5**, 493-501.
- FONG, G.H., ROSSANT, J., GERTSENSTEIN, M., and BREITMAN, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70.
- FORD, M., BRAGADOTTIR, R., RAKOCZY, P.E., and NARFSTROM, K. (2003). Gene transfer in the RPE65 null mutation dog: relationship between construct volume, visual behavior and electroretinographic (ERG) results. *Doc Ophthalmol* **107**, 79-86.
- FRAEFEL, C., MENDES-MADEIRA, A., MABON, O., LEFEBVRE, A., LE MEUR, G., ACKERMANN, M., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2005). In vivo gene transfer to the rat retina using herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-based amplicon vectors. *Gene Ther* **12**, 1283-1288.
- FRASSON, M., PICAUD, S., LEVEILLARD, T., SIMONUTTI, M., MOHAND-SAID, S., DREYFUS, H., HICKS, D., and SABEL, J. (1999a). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2724-2734.
- FRASSON, M., SAHEL, J.A., FABRE, M., SIMONUTTI, M., DREYFUS, H., and PICAUD, S. (1999b). Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat Med* **5**, 1183-1187.
- FREUND, C.L., GREGORY-EVANS, C.Y., FURUKAWA, T., PAPAIOANNOU, M., LOOSER, J., PLODER, L., BELLINGHAM, J., NG, D., HERBRICK, J.A., DUNCAN, A., SCHERER, S.W., TSUI, L.C., LOUTRADIS-ANAGNOSTOU, A., JACOBSON, S.G., CEPKO, C.L., BHATTACHARYA, S.S., and MCINNES, R.R. (1997). Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* **91**, 543-553.
- FREUND, C.L., WANG, Q.L., CHEN, S., MUSKAT, B.L., WILES, C.D., SHEFFIELD, V.C., JACOBSON, S.G., MCINNES, R.R., ZACK, D.J., and STONE, E.M. (1998). De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* **18**, 311-312.
- FURUKAWA, T., MORROW, E.M., and CEPKO, C.L. (1997). Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* **91**, 531-541.
- GAL, A., ORTH, U., BAEHR, W., SCHWINGER, E., and ROSENBERG, T. (1994). Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet* **7**, 64-68.
- GAO, G., LEBHERZ, C., WEINER, D.J., GRANT, R., CALCEDO, R., MCCULLOUGH, B., BAGG, A., ZHANG, Y., and WILSON, J.M. (2004a). Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* **103**, 3300-3302.

- GAO, G., QU, G., BURNHAM, M.S., HUANG, J., CHIRMULE, N., JOSHI, B., YU, Q.C., MARSH, J.A., CONCEICAO, C.M., and WILSON, J.M. (2000). Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo. *Hum Gene Ther* **11**, 2079-2091.
- GAO, G., VANDENBERGHE, L.H., ALVIRA, M.R., LU, Y., CALCEDO, R., ZHOU, X., and WILSON, J.M. (2004b). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* **78**, 6381-6388.
- GAO, G., VANDENBERGHE, L.H., and WILSON, J.M. (2005). New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* **5**, 285-297.
- GAO, G.P., ALVIRA, M.R., WANG, L., CALCEDO, R., JOHNSTON, J., and WILSON, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11854-11859.
- GASSMANN, M., HEINICKE, K., SOLIZ, J., OGUNSHOLA, O.O., MARTI, H.H., HOFER, T., GRIMM, C., HEINICKE, I., and EGLI, B. (2003). Non-erythroid functions of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol* **543**, 323-330.
- GERBER, S., PERRAULT, I., HANEIN, S., BARBET, F., DUCROQ, D., GHAZI, I., MARTIN-COIGNARD, D., LEOWSKI, C., HOMFRAY, T., DUFIER, J.L., MUNNICH, A., KAPLAN, J., and ROZET, J.M. (2001). Complete exon-intron structure of the RPGR-interacting protein (RPGRIP1) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis. *Eur J Hum Genet* **9**, 561-571.
- GERBER, S., ROZET, J.M., TAKEZAWA, S.I., DOS SANTOS, L.C., LOPES, L., GRIBOUVAL, O., PENET, C., PERRAULT, I., DUCROQ, D., SOUJED, E., JEANPIERRE, M., ROMANA, S., FREZAL, J., FERRAZ, F., YU-UMESONO, R., MUNNICH, A., and KAPLAN, J. (2000). The photoreceptor cell-specific nuclear receptor gene (PNR) accounts for retinitis pigmentosa in the Crypto-Jews from Portugal (Marranos), survivors from the Spanish Inquisition. *Hum Genet* **107**, 276-284.
- GOLCZAK, M., IMANISHI, Y., KUKSA, V., MAEDA, T., KUBOTA, R., and PALCZEWSKI, K. (2005). Lecithin:retinol acyltransferase is responsible for amidation of retinylamine, a potent inhibitor of the retinoid cycle. *J Biol Chem* **280**, 42263-42273.
- GONIN, P., and GAILLARD, C. (2004). Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development. *Gene Ther* **11 Suppl 1**, S98-S108.
- GOODMAN, G.E., VALANIS, B., MEYSKENS, F.L., JR., WILLIAMS, J.H., JR., METCH, B.J., THORNQUIST, M.D., and OMENN, G.S. (1998). Strategies for recruitment to a population-based lung cancer prevention trial: the CARET experience with heavy smokers. Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 405-412.
- GORBATYUK, M.S., PANG, J.J., THOMAS, J., JR., HAUSWIRTH, W.W., and LEWIN, A.S. (2005). Knockdown of wild-type mouse rhodopsin using an AAV vectored ribozyme as part of an RNA replacement approach. *Mol Vis* **11**, 648-656.
- GOSSEN, M., and BUJARD, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-5551.
- GOSSEN, M., FREUNDLIEB, S., BENDER, G., MULLER, G., HILLEN, W., and BUJARD, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769.
- GOYAL, R., NORTH, R.V., and MORGAN, J.E. (2003). Comparison of laser interferometry and ultrasound A-scan in the measurement of axial length. *Acta Ophthalmol Scand* **81**, 331-335.
- GRANIT, R. (1933). The components of the retinal action potential in mammals and their relation to discharge in the optic nerve. *J Physiol* **77**, 207-239.

- GREEN, E.S., RENDAHL, K.G., ZHOU, S., LADNER, M., COYNE, M., SRIVASTAVA, R., MANNING, W.C., and FLANNERY, J.G. (2001). Two animal models of retinal degeneration are rescued by recombinant adeno-associated virus-mediated production of FGF-5 and FGF-18. *Mol Ther* **3**, 507-515.
- GREGORY-EVANS, K., and BHATTACHARYA, S.S. (1998). Genetic blindness: current concepts in the pathogenesis of human outer retinal dystrophies. *Trends Genet* **14**, 103-108.
- GRIEGER, J.C., SNOWDY, S., and SAMULSKI, R.J. (2006). Separate Basic Region Motifs within the Adeno-Associated Virus Capsid Proteins Are Essential for Infectivity and Assembly. *J Virol* **80**, 5199-5210.
- GRIFFEY, M., MACAULEY, S.L., OGILVIE, J.M., and SANDS, M.S. (2005). AAV2-mediated ocular gene therapy for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol Ther* **12**, 413-421.
- GRIMM, C., REME, C.E., ROL, P.O., and WILLIAMS, T.P. (2000a). Blue light's effects on rhodopsin: photoreversal of bleaching in living rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 3984-3990.
- GRIMM, C., WENZEL, A., GROSZER, M., MAYSER, H., SEELIGER, M., SAMARDZIJA, M., BAUER, C., GASSMANN, M., and REME, C.E. (2002). HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* **8**, 718-724.
- GRIMM, C., WENZEL, A., HAFEZI, F., YU, S., REDMOND, T.M., and REME, C.E. (2000b). Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* **25**, 63-66.
- GRIMM, D., KERN, A., RITTNER, K., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 2745-2760.
- GU, S.M., THOMPSON, D.A., SRIKUMARI, C.R., LORENZ, B., FINCKH, U., NICOLETTI, A., MURTHY, K.R., RATHMANN, M., KUMARAMANICKAVEL, G., DENTON, M.J., and GAL, A. (1997). Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* **17**, 194-197.
- GUY, J., QI, X., MUZYCZKA, N., and HAUSWIRTH, W.W. (1999). Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch Ophthalmol* **117**, 929-937.
- GUYER, D.R., PULIAFITO, C.A., MONES, J.M., FRIEDMAN, E., CHANG, W., and VERDOONER, S.R. (1992). Digital indocyanine-green angiography in chorioretinal disorders. *Ophthalmology* **99**, 287-291.
- HAESELEER, F., JANG, G.F., IMANISHI, Y., DRIESSEN, C.A., MATSUMURA, M., NELSON, P.S., and PALCZEWSKI, K. (2002). Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J Biol Chem* **277**, 45537-45546.
- HAFEZI, F., MARTI, A., GRIMM, C., WENZEL, A., and REME, C.E. (1999). Differential DNA binding activities of the transcription factors AP-1 and Oct-1 during light-induced apoptosis of photoreceptors. *Vision Res* **39**, 2511-2518.
- HAGSTROM, S.A., ADAMIAN, M., SCIMECA, M., PAWLYK, B.S., YUE, G., and LI, T. (2001). A role for the Tubby-like protein 1 in rhodopsin transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1955-1962.
- HAGSTROM, S.A., NORTH, M.A., NISHINA, P.L., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (1998). Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* **18**, 174-176.
- HAIDER, N.B., JACOBSON, S.G., CIDECIYAN, A.V., SWIDERSKI, R., STREB, L.M., SEARBY, C., BECK, G., HOCKEY, R., HANNA, D.B., GORMAN, S., DUHL, D., CARMİ, R., BENNETT, J.,

- WELEBER, R.G., FISHMAN, G.A., WRIGHT, A.F., STONE, E.M., and SHEFFIELD, V.C. (2000). Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nat Genet* **24**, 127-131.
- HALBERT, C.L., ALLEN, J.M., and MILLER, A.D. (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**, 6615-6624.
- HAMEED, A., ABID, A., AZIZ, A., ISMAIL, M., MEHDI, S.Q., and KHALIQ, S. (2003). Evidence of RPGRIP1 gene mutations associated with recessive cone-rod dystrophy. *J Med Genet* **40**, 616-619.
- HAMEL, C.P., GRIFFOIN, J.M., LASQUELLEC, L., BAZALGETTE, C., and ARNAUD, B. (2001). Retinal dystrophies caused by mutations in RPE65: assessment of visual functions. *Br J Ophthalmol* **85**, 424-427.
- HAMEL, C.P., JENKINS, N.A., GILBERT, D.J., COPELAND, N.G., and REDMOND, T.M. (1994). The gene for the retinal pigment epithelium-specific protein RPE65 is localized to human 1p31 and mouse 3. *Genomics* **20**, 509-512.
- HAMEL, C.P., TSILOU, E., PFEFFER, B.A., HOOKS, J.J., DETRICK, B., and REDMOND, T.M. (1993). Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *J Biol Chem* **268**, 15751-15757.
- HANEIN, S., PERRAULT, I., GERBER, S., TANGUY, G., BARBET, F., DUCROQ, D., CALVAS, P., DOLLFUS, H., HAMEL, C., LOPPONEN, T., MUNIER, F., SANTOS, L., SHALEV, S., ZAFEIRIOU, D., DUFIER, J.L., MUNNICH, A., ROZET, J.M., and KAPLAN, J. (2004). Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat* **23**, 306-317.
- HANSEN, J., QING, K., and SRIVASTAVA, A. (2001). Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2. *Mol Ther* **4**, 289-296.
- HAO, W., WENZEL, A., OBIN, M.S., CHEN, C.K., BRILL, E., KRASNOPEROVA, N.V., EVERSOLE-CIRE, P., KLEYNER, Y., TAYLOR, A., SIMON, M.I., GRIMM, C., REME, C.E., and LEM, J. (2002). Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* **32**, 254-260.
- HARDCASTLE, A.J., THISELTON, D.L., VAN MALDERGEM, L., SAHA, B.K., JAY, M., PLANT, C., TAYLOR, R., BIRD, A.C., and BHATTACHARYA, S. (1999). Mutations in the RP2 gene cause disease in 10% of families with familial X-linked retinitis pigmentosa assessed in this study. *Am J Hum Genet* **64**, 1210-1215.
- HASELOFF, J., and GERLACH, W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* **334**, 585-591.
- HE, L., POBLENZ, A.T., MEDRANO, C.J., and FOX, D.A. (2000). Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **275**, 12175-12184.
- HEDSTROM, L. (1999). IMP dehydrogenase: mechanism of action and inhibition. *Curr Med Chem* **6**, 545-560.
- HEIER, J.S., BOYER, D.S., CIULLA, T.A., FERRONE, P.J., JUMPER, J.M., GENTILE, R.C., KOTLOVKER, D., CHUNG, C.Y., and KIM, R.Y. (2006). Ranibizumab combined with verteporfin photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration: year 1 results of the FOCUS Study. *Arch Ophthalmol* **124**, 1532-1542.

- HEMATI, N., FEATHERS, K.L., CHRISPELL, J.D., REED, D.M., CARLSON, T.J., and THOMPSON, D.A. (2005). RPE65 surface epitopes, protein interactions, and expression in rod- and cone-dominant species. *Mol Vis* **11**, 1151-1165.
- HENNIG, A.K., LEVY, B., OGILVIE, J.M., VOGLER, C.A., GALVIN, N., BASSNETT, S., and SANDS, M.S. (2003). Intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in specific areas of the CNS in mucopolysaccharidosis VII mice. *J Neurosci* **23**, 3302-3307.
- HIRAKAWA, H., IJIMA, H., GOHDO, T., and TSUKAHARA, S. (1999). Optical coherence tomography of cystoid macular edema associated with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* **128**, 185-191.
- HISATOMI, T., SAKAMOTO, T., GOTO, Y., YAMANAKA, I., OSHIMA, Y., HATA, Y., ISHIBASHI, T., INOMATA, H., SUSIN, S.A., and KROEMER, G. (2002). Critical role of photoreceptor apoptosis in functional damage after retinal detachment. *Curr Eye Res* **24**, 161-172.
- HO, T.W., BRISTOL, L.A., COCCIA, C., LI, Y., MILBRANDT, J., JOHNSON, E., JIN, L., BAR-PELED, O., GRIFFIN, J.W., and ROTHSTEIN, J.D. (2000). TGFbeta trophic factors differentially modulate motor axon outgrowth and protection from excitotoxicity. *Exp Neurol* **161**, 664-675.
- HOFFMAN, D.R., and BIRCH, D.G. (1995). Docosahexaenoic acid in red blood cells of patients with X-linked retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**, 1009-1018.
- HOFFMAN, D.R., LOCKE, K.G., WHEATON, D.H., FISH, G.E., SPENCER, R., and BIRCH, D.G. (2004). A randomized, placebo-controlled clinical trial of docosahexaenoic acid supplementation for X-linked retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* **137**, 704-718.
- HOGGAN, M.D., BLACKLOW, N.R., and ROWE, W.P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 1467-1474.
- HONDA, M., SAKAMOTO, T., ISHIBASHI, T., INOMATA, H., and UENO, H. (2000). Experimental subretinal neovascularization is inhibited by adenovirus-mediated soluble VEGF/flt-1 receptor gene transfection: a role of VEGF and possible treatment for SRN in age-related macular degeneration. *Gene Ther* **7**, 978-985.
- HORER, M., WEGER, S., BUTZ, K., HOPPE-SEYLER, F., GEISEN, C., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1995). Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *J Virol* **69**, 5485-5496.
- HUMAYUN, M.S. (2001). Intraocular retinal prosthesis. *Trans Am Ophthalmol Soc* **99**, 271-300.
- HUMAYUN, M.S., DE JUAN, E., JR., WEILAND, J.D., DAGNELIE, G., KATONA, S., GREENBERG, R., and SUZUKI, S. (1999). Pattern electrical stimulation of the human retina. *Vision Res* **39**, 2569-2576.
- HURWITZ, M.Y., MARCUS, K.T., CHEVEZ-BARRIOS, P., LOUIE, K., AGUILAR-CORDOVA, E., and HURWITZ, R.L. (1999). Suicide gene therapy for treatment of retinoblastoma in a murine model. *Hum Gene Ther* **10**, 441-448.
- IGARASHI, T., MIYAKE, K., KATO, K., WATANABE, A., ISHIZAKI, M., OHARA, K., and SHIMADA, T. (2003). Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in murine proliferative retinopathy model. *Gene Ther.* **10**, 219-226.
- IM, D.S., and MUZYCZKA, N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* **61**, 447-457.
- INCERTI, B., CORTESE, K., PIZZIGONI, A., SURACE, E.M., VARANI, S., COPPOLA, M., JEFFERY, G., SEELIGER, M., JAISSE, G., BENNETT, D.C., MARIGO, V., SCHIAFFINO, M.V., TACCHETTI, C., and BALLABIO, A. (2000). Oa1 knock-out: new insights on the pathogenesis of ocular albinism type 1. *Hum Mol Genet* **9**, 2781-2788.

- IULIUCCI, J.D., OLIVER, S.D., MORLEY, S., WARD, C., WARD, J., DALGARN, D., CLACKSON, T., and BERGER, H.J. (2001). Intravenous safety and pharmacokinetics of a novel dimerizer drug, AP1903, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* **41**, 870-879.
- JACOBSON, S.G., ACLAND, G.M., AGUIRRE, G.D., ALEMAN, T.S., SCHWARTZ, S.B., CIDECIYAN, A.V., ZEISS, C.J., KOMAROMY, A.M., KAUSHAL, S., ROMAN, A.J., WINDSOR, E.A., SUMAROKA, A., PEARCE-KELLING, S.E., CONLON, T.J., CHIODO, V.A., BOYE, S.L., FLOTTE, T.R., MAGUIRE, A.M., BENNETT, J., and HAUSWIRTH, W.W. (2006a). Safety of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2-RPE65 Vector Delivered by Ocular Subretinal Injection. *Mol Ther*.
- JACOBSON, S.G., ALEMAN, T.S., CIDECIYAN, A.V., SUMAROKA, A., SCHWARTZ, S.B., WINDSOR, E.A., TRABOULSI, E.I., HEON, E., PITTLER, S.J., MILAM, A.H., MAGUIRE, A.M., PALCZEWSKI, K., STONE, E.M., and BENNETT, J. (2005). Identifying photoreceptors in blind eyes caused by RPE65 mutations: Prerequisite for human gene therapy success. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6177-6182.
- JACOBSON, S.G., BOYE, S.L., ALEMAN, T.S., CONLON, T.J., ZEISS, C.J., ROMAN, A.J., CIDECIYAN, A.V., SCHWARTZ, S.B., KOMAROMY, A.M., DOOBRAJH, M., CHEUNG, A.Y., SUMAROKA, A., PEARCE-KELLING, S.E., AGUIRRE, G.D., KAUSHAL, S., MAGUIRE, A.M., FLOTTE, T.R., and HAUSWIRTH, W.W. (2006b). Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis. *Hum Gene Ther* **17**, 845-858.
- JANECKE, A.R., THOMPSON, D.A., UTERMANN, G., BECKER, C., HUBNER, C.A., SCHMID, E., MCHENRY, C.L., NAIR, A.R., RUSCHENDORF, F., HECKENLIVELY, J., WISSINGER, B., NURNBERG, P., and GAL, A. (2004). Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* **36**, 850-854.
- JIA, H., JEZEQUEL, S., LOHR, M., SHAIKH, S., DAVIS, D., SOKER, S., SELWOOD, D., and ZACHARY, I. (2001). Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 164-173.
- JIN, M., LI, S., MOGHRABI, W.N., SUN, H., and TRAVIS, G.H. (2005). Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* **122**, 449-459.
- JOMARY, C., NEAL, M.J., and JONES, S.E. (2001). Characterization of cell death pathways in murine retinal neurodegeneration implicates cytochrome c release, caspase activation, and bid cleavage. *Mol Cell Neurosci* **18**, 335-346.
- JOMARY, C., VINCENT, K.A., GRIST, J., NEAL, M.J., and JONES, S.E. (1997). Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene Ther* **4**, 683-690.
- KAJIWARA, K., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (1994). Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* **264**, 1604-1608.
- KAJIWARA, K., HAHN, L.B., MUKAI, S., TRAVIS, G.H., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (1991). Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* **354**, 480-483.
- KAJIWARA, K., SANDBERG, M.A., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (1993). A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctata albescens. *Nat Genet* **3**, 208-212.
- KALUDOV, N., BROWN, K.E., WALTERS, R.W., ZABNER, J., and CHIORINI, J.A. (2001). Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for

- hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* **75**, 6884-6893.
- KALUDOV, N., HANDELMAN, B., and CHIORINI, J.A. (2002). Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther* **13**, 1235-1243.
- KASHIWAKURA, Y., TAMAYOSE, K., IWABUCHI, K., HIRAI, Y., SHIMADA, T., MATSUMOTO, K., NAKAMURA, T., WATANABE, M., OSHIMI, K., and DAIDA, H. (2005). Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **79**, 609-614.
- KATZ, M.L., and REDMOND, T.M. (2001). Effect of Rpe65 knockout on accumulation of lipofuscin fluorophores in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 3023-3030.
- KELSELL, R.E., GREGORY-EVANS, K., PAYNE, A.M., PERRAULT, I., KAPLAN, J., YANG, R.B., GARBERS, D.L., BIRD, A.C., MOORE, A.T., and HUNT, D.M. (1998). Mutations in the retinal guanylate cyclase (RETGC-1) gene in dominant cone-rod dystrophy. *Hum Mol Genet* **7**, 1179-1184.
- KENDALL, R.L., and THOMAS, K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10705-10709.
- KHALIQ, S., ABID, A., ISMAIL, M., HAMEED, A., MOHYUDDIN, A., LALL, P., AZIZ, A., ANWAR, K., and MEHDI, S.Q. (2005). Novel association of RP1 gene mutations with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet* **42**, 436-438.
- KIANG, A.S., PALFI, A., ADER, M., KENNA, P.F., MILLINGTON-WARD, S., CLARK, G., KENNAN, A., O'REILLY, M., TAM, L.C., AHERNE, A., MCNALLY, N., HUMPHRIES, P., and FARRAR, G.J. (2005). Toward a gene therapy for dominant disease: validation of an RNA interference-based mutation-independent approach. *Mol Ther* **12**, 555-561.
- KILIC, U., KILIC, E., SOLIZ, J., BASSETTI, C.I., GASSMANN, M., and HERMANN, D.M. (2005). Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *Faseb J* **19**, 249-251.
- KIM, R.Y., DOLLFUS, H., KEEN, T.J., FITZKE, F.W., ARDEN, G.B., BHATTACHARYA, S.S., and BIRD, A.C. (1995). Autosomal dominant pattern dystrophy of the retina associated with a 4-base pair insertion at codon 140 in the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* **113**, 451-455.
- KIM, S.D., NAO-I, N., MARUIWA, F., and SAWADA, A. (1996). Electrical responses from locally detached retina and its recovery after reattachment. *Ophthalmologica* **210**, 195-199.
- KIRSCH, M., LEE, M.Y., MEYER, V., WIESE, A., and HOFMANN, H.D. (1997). Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. *J Neurochem* **68**, 979-990.
- KOCIOK, N., HEPPEKAUSEN, H., SCHRAERMAYER, U., ESSER, P., THUMANN, G., GRISANTI, S., and HEIMANN, K. (1998). The mRNA expression of cytokines and their receptors in cultured iris pigment epithelial cells: a comparison with retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* **67**, 237-250.
- KOHL, S., BAUMANN, B., ROSENBERG, T., KELLNER, U., LORENZ, B., VADALA, M., JACOBSON, S.G., and WISSINGER, B. (2002). Mutations in the cone photoreceptor G-protein alpha-subunit gene GNAT2 in patients with achromatopsia. *Am J Hum Genet* **71**, 422-425.
- KOTIN, R.M., LINDEN, R.M., and BERNS, K.I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J* **11**, 5071-5078.

- KOTIN, R.M., MENNINGER, J.C., WARD, D.C., and BERNS, K.I. (1991). Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* **10**, 831-834.
- KOTIN, R.M., SINISCALCO, M., SAMULSKI, R.J., ZHU, X.D., HUNTER, L., LAUGHLIN, C.A., MCLAUGHLIN, S., MUZYCZKA, N., ROCCHI, M., and BERNS, K.I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2211-2215.
- KRONENBERG, S., BOTTCHER, B., VON DER LIETH, C.W., BLEKER, S., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2005). A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden VP1 N termini. *J Virol* **79**, 5296-5303.
- KUMARAMANICKAVEL, G., MAW, M., DENTON, M.J., JOHN, S., SRIKUMARI, C.R., ORTH, U., OEHLMANN, R., and GAL, A. (1994). Missense rhodopsin mutation in a family with recessive RP. *Nat Genet* **8**, 10-11.
- LABOW, M.A., HERMONAT, P.L., and BERNS, K.I. (1986). Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J Virol* **60**, 251-258.
- LAI, C.M., SHEN, W.Y., BRANKOV, M., LAI, Y.K., BARNETT, N.L., LEE, S.Y., YEO, I.Y., MATHUR, R., HO, J.E., PINEDA, P., BARATHI, A., ANG, C.L., CONSTABLE, I.J., and RAKOCZY, E.P. (2005). Long-term evaluation of AAV-mediated sFlt-1 gene therapy for ocular neovascularization in mice and monkeys. *Mol Ther* **12**, 659-668.
- LAI, C.M., YU, M.J., BRANKOV, M., BARNETT, N.L., ZHOU, X., REDMOND, T.M., NARFSTROM, K., and RAKOCZY, P.E. (2004). Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe65^{-/-} knockout mouse eye results in limited rescue. *Genet Vaccines Ther* **2**, 3.
- LAI, L., DAVISON, B.B., VEAZEY, R.S., FISHER, K.J., and BASKIN, G.B. (2002a). A preliminary evaluation of recombinant adeno-associated virus biodistribution in rhesus monkeys after intrahepatic inoculation in utero. *Hum Gene Ther* **13**, 2027-2039.
- LAI, Y.K., SHEN, W.Y., BRANKOV, M., LAI, C.M., CONSTABLE, I.J., and RAKOCZY, P.E. (2002b). Potential long-term inhibition of ocular neovascularisation by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy. *Gene Ther* **9**, 804-813.
- LAKHANPAL, R.R., YANAI, D., WEILAND, J.D., FUJII, G.Y., CAFFEY, S., GREENBERG, R.J., DE JUAN, E., JR., and HUMAYUN, M.S. (2003). Advances in the development of visual prostheses. *Curr Opin Ophthalmol* **14**, 122-127.
- LASNE, F., MARTIN, L., CREPIN, N., and DE CEARRIZ, J. (2002). Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem* **311**, 119-126.
- LASNE, F., MARTIN, L., DE CEARRIZ, J., LARCHER, T., MOULLIER, P., and CHENUAUD, P. (2004). "Genetic Doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol Ther* **10**, 409-410.
- LAU, D., and FLANNERY, J. (2003). Viral-mediated FGF-2 treatment of the constant light damage model of photoreceptor degeneration. *Doc Ophthalmol* **106**, 89-98.
- LAU, D., MCGEE, L.H., ZHOU, S., RENDAHL, K.G., MANNING, W.C., ESCOBEDO, J.A., and FLANNERY, J.G. (2000). Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 3622-3633.
- LAVAIL, M.M., YASUMURA, D., MATTHES, M.T., DRENSER, K.A., FLANNERY, J.G., LEWIN, A.S., and HAUSWIRTH, W.W. (2000). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11488-11493.

- LAVAIL, M.M., YASUMURA, D., MATTHES, M.T., LAU-VILLACORTA, C., UNOKI, K., SUNG, C.H., and STEINBERG, R.H. (1998). Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 592-602.
- LAZARUS, H.S., SLY, W.S., KYLE, J.W., and HAGEMAN, G.S. (1993). Photoreceptor degeneration and altered distribution of interphotoreceptor matrix proteoglycans in the mucopolysaccharidosis VII mouse. *Exp Eye Res* **56**, 531-541.
- LE MEUR, G., STIEGER, K., SMITH, A.J., WEBER, M., DESCHAMPS, J.Y., NIVARD, D., MENDES-MADEIRA, A., PROVOST, N., PEREON, Y., CHEREL, Y., ALI, R.R., HAMEL, C., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2006). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther*.
- LE MEUR, G., WEBER, M., PEREON, Y., MENDES-MADEIRA, A., NIVARD, D., DESCHAMPS, J.Y., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2005). Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates. *Arch Ophthalmol* **123**, 500-506.
- LEBHERZ, C., AURICCHIO, A., MAGUIRE, A.M., RIVERA, V.M., TANG, W., GRANT, R.L., CLACKSON, T., BENNETT, J., and WILSON, J.M. (2005). Long-term inducible gene expression in the eye via adeno-associated virus gene transfer in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* **16**, 178-186.
- LEE, V., SUBAK-SHARPE, I., HUNGERFORD, J.L., DAVIES, N.P., and LOGANI, S. (2000). Exposure of primary orbital implants in postenucleation retinoblastoma patients. *Ophthalmology* **107**, 940-945; discussion 946.
- LEWIN, A.S., DRENSER, K.A., HAUSWIRTH, W.W., NISHIKAWA, S., YASUMURA, D., FLANNERY, J.G., and LAVAIL, M.M. (1998). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med* **4**, 967-971.
- LIANG, F.Q., ALEMAN, T.S., DEJNEKA, N.S., DUDUS, L., FISHER, K.J., MAGUIRE, A.M., JACOBSON, S.G., and BENNETT, J. (2001a). Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* **4**, 461-472.
- LIANG, F.Q., DEJNEKA, N.S., COHEN, D.R., KRASNOPEROVA, N.V., LEM, J., MAGUIRE, A.M., DUDUS, L., FISHER, K.J., and BENNETT, J. (2001b). AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol Ther* **3**, 241-248.
- LIU, J., HUANG, Q., HIGDON, J., LIU, W., XIE, T., YAMASHITA, T., CHEON, K., CHENG, C., and ZUO, J. (2005). Distinct gene expression profiles and reduced JNK signaling in retinitis pigmentosa caused by RP1 mutations. *Hum Mol Genet* **14**, 2945-2958.
- LIU, Q., ZUO, J., and PIERCE, E.A. (2004a). The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *J Neurosci* **24**, 6427-6436.
- LIU, X., BRANDT, C.R., GABELT, B.T., BRYAR, P.J., SMITH, M.E., and KAUFMAN, P.L. (1999). Herpes simplex virus mediated gene transfer to primate ocular tissues. *Exp Eye Res* **69**, 385-395.
- LIU, X., BULGAKOV, O.V., WEN, X.H., WOODRUFF, M.L., PAWLYK, B., YANG, J., FAIN, G.L., SANDBERG, M.A., MAKINO, C.L., and LI, T. (2004b). AIPL1, the protein that is defective in Leber congenital amaurosis, is essential for the biosynthesis of retinal rod cGMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13903-13908.
- LOCATELLI, F., and DEL VECCHIO, L. (2003). Pure red cell aplasia secondary to treatment with erythropoietin. *J Nephrol* **16**, 461-466.

- LOEWEN, C.J., and MOLDAY, R.S. (2000). Disulfide-mediated oligomerization of Peripherin/Rds and Rom-1 in photoreceptor disk membranes. Implications for photoreceptor outer segment morphogenesis and degeneration. *J Biol Chem* **275**, 5370-5378.
- LOPEZ, P.F., SIPPY, B.D., LAMBERT, H.M., THACH, A.B., and HINTON, D.R. (1996). Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 855-868.
- LORENZ, B., GYURUS, P., PREISING, M., BREMSER, D., GU, S., ANDRASSI, M., GERTH, C., and GAL, A. (2000). Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 2735-2742.
- LORENZ, B., WABELS, B., WEGSCHEIDER, E., HAMEL, C.P., DREXLER, W., and PREISING, M.N. (2004). Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with mutations in RPE65. *Ophthalmology* **111**, 1585-1594.
- LU, R., NAKAJIMA, N., HOFMANN, W., BENKIRANE, M., JEANG, K.T., SODROSKI, J., and ENGELMAN, A. (2004). Simian virus 40-based replication of catalytically inactive human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants in nonpermissive T cells and monocyte-derived macrophages. *J Virol* **78**, 658-668.
- LUKE, C., AISENBREY, S., LUKE, M., MARZELLA, G., BARTZ-SCHMIDT, K.U., and WALTER, P. (2001). Electrophysiological changes after 360 degrees retinotomy and macular translocation for subfoveal choroidal neovascularisation in age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* **85**, 928-932.
- LUX, K., GOERLITZ, N., SCHLEMMINGER, S., PERABO, L., GOLDNAU, D., ENDELL, J., LEIKE, K., KOFLE, D.M., FINKE, S., HALLEK, M., and BUNING, H. (2005). Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol* **79**, 11776-11787.
- MA, J., XU, L., OTHERSEN, D.K., REDMOND, T.M., and CROUCH, R.K. (1998). Cloning and localization of RPE65 mRNA in salamander cone photoreceptor cells. *Biochim Biophys Acta* **1443**, 255-261.
- MAKINO, C.L., WEN, X.H., MICHAUD, N., PESHENKO, I.V., PAWLYK, B., BRUSH, R.S., SOLOVIEV, M., LIU, X., WOODRUFF, M.L., CALVERT, P.D., SAVCHENKO, A.B., ANDERSON, R.E., FAIN, G.L., LI, T., SANDBERG, M.A., and DIZHOOR, A.M. (2006). Effects of low AIPL1 expression on phototransduction in rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 2185-2194.
- MANNO, C.S., CHEW, A.J., HUTCHISON, S., LARSON, P.J., HERZOG, R.W., ARRUDA, V.R., TAI, S.J., RAGNI, M.V., THOMPSON, A., OZELO, M., COUTO, L.B., LEONARD, D.G., JOHNSON, F.A., MCCLELLAND, A., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W., KAY, M.A., HIGH, K.A., and GLADER, B. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**, 2963-2972.
- MANNO, C.S., PIERCE, G.F., ARRUDA, V.R., GLADER, B., RAGNI, M., RASKO, J.J., OZELO, M.C., HOOTS, K., BLATT, P., KONKLE, B., DAKE, M., KAYE, R., RAZAVI, M., ZAJKO, A., ZEHNDER, J., RUSTAGI, P.K., NAKAI, H., CHEW, A., LEONARD, D., WRIGHT, J.F., LESSARD, R.R., SOMMER, J.M., TIGGES, M., SABATINO, D., LUK, A., JIANG, H., MINGOZZI, F., COUTO, L., ERTL, H.C., HIGH, K.A., and KAY, M.A. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**, 342-347.
- MANSOUR, S.L., GRODZICKER, T., and TJIAN, R. (1985). An adenovirus vector system used to express polyoma virus tumor antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1359-1363.

- MARCHETTI, P. (2005). [Apoptosis: basic knowledge and applications]. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 632-641.
- MARLHENS, F., BAREIL, C., GRIFFOIN, J.M., ZRENNER, E., AMALRIC, P., ELIAOU, C., LIU, S.Y., HARRIS, E., REDMOND, T.M., ARNAUD, B., CLAUSTRES, M., and HAMEL, C.P. (1997). Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* **17**, 139-141.
- MARMOR, M.F., AGUIRRE, G., and ARDEN, G. (1983). Retinis pigmentosa: a symposium on terminology and methods of examinations. *ophthalmology* **90**, 126-131.
- MARMOR, M.F., and ZRENNER, E. (1998). Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc Ophthalmol* **97**, 143-156.
- MARMORSTEIN, L.Y., MUNIER, F.L., ARSENIJEVIC, Y., SCHORDERET, D.F., MCLAUGHLIN, P.J., CHUNG, D., TRABOULSI, E., and MARMORSTEIN, A.D. (2002). Aberrant accumulation of EFEMP1 underlies drusen formation in Malattia Leventinese and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13067-13072.
- MARTIN, K.R., QUIGLEY, H.A., ZACK, D.J., LEVKOVITCH-VERBIN, H., KIELCZEWSKI, J., VALENTA, D., BAUMRIND, L., PEASE, M.E., KLEIN, R.L., and HAUSWIRTH, W.W. (2003). Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 4357-4365.
- MARTINEZ-MIR, A., BAYES, M., VILAGELIU, L., GRINBERG, D., AYUSO, C., DEL RIO, T., GARCIA-SANDOVAL, B., BUSSAGLIA, E., BAIGET, M., GONZALEZ-DUARTE, R., and BALCELLS, S. (1997). A new locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP19) maps to 1p13-1p21. *Genomics* **40**, 142-146.
- MAUBARET, C., and HAMEL, C. (2005). [Genetics of retinitis pigmentosa: metabolic classification and phenotype/genotype correlations]. *J Fr Ophtalmol* **28**, 71-92.
- MAVLYUTOV, T.A., ZHAO, H., and FERREIRA, P.A. (2002). Species-specific subcellular localization of RPGR and RPGRIP isoforms: implications for the phenotypic variability of congenital retinopathies among species. *Hum Mol Genet* **11**, 1899-1907.
- MAW, M.A., CORBEIL, D., KOCH, J., HELLWIG, A., WILSON-WHEELER, J.C., BRIDGES, R.J., KUMARAMANICKAVEL, G., JOHN, S., NANCARROW, D., ROPER, K., WEIGMANN, A., HUTTNER, W.B., and DENTON, M.J. (2000). A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum Mol Genet* **9**, 27-34.
- MCCARTY, D.M., CHRISTENSEN, M., and MUZYCZKA, N. (1991). Sequences required for coordinate induction of adeno-associated virus p19 and p40 promoters by Rep protein. *J Virol* **65**, 2936-2945.
- MCCARTY, D.M., PEREIRA, D.J., ZOLOTUKHIN, I., ZHOU, X., RYAN, J.H., and MUZYCZKA, N. (1994). Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J Virol* **68**, 4988-4997.
- MCGEE SANFTNER, L.H., ABEL, H., HAUSWIRTH, W.W., and FLANNERY, J.G. (2001a). Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* **4**, 622-629.
- MCGEE SANFTNER, L.H., RENDAHL, K.G., QUIROZ, D., COYNE, M., LADNER, M., MANNING, W.C., and FLANNERY, J.G. (2001b). Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol Ther* **3**, 688-696.
- MCLAUGHLIN, M.E., EHRHART, T.L., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (1995). Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3249-3253.

- MELNICK, J.L., MAYOR, H.D., SMITH, K.O., and RAPP, F. (1965). Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses. *J Bacteriol* **90**, 271-274.
- MERTEN, O.W., GENY-FIAMMA, C., and DOUAR, A.M. (2005). Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther* **12 Suppl 1**, S51-61.
- MIN, S.H., MOLDAY, L.L., SEELIGER, M.W., DINCULESCU, A., TIMMERS, A.M., JANSSEN, A., TONAGEL, F., TANIMOTO, N., WEBER, B.H., MOLDAY, R.S., and HAUSWIRTH, W.W. (2005). Prolonged recovery of retinal structure/function after gene therapy in an Rs1h-deficient mouse model of x-linked juvenile retinoschisis. *Mol Ther* **12**, 644-651.
- MIYAZAKI, H., OKUMA, Y., FUJII, Y., NAGASHIMA, K., and NOMURA, Y. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in rats. *Neuroscience* **89**, 643-647.
- MOISEYEV, G., CHEN, Y., TAKAHASHI, Y., WU, B.X., and MA, J.X. (2005). RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12413-12418.
- MONAHAN, P.E., SAMULSKI, R.J., TAZELAAR, J., XIAO, X., NICHOLS, T.C., BELLINGER, D.A., READ, M.S., and WALSH, C.E. (1998). Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther* **5**, 40-49.
- MORI, K., DUH, E., GEHLBACH, P., ANDO, A., TAKAHASHI, K., PEARLMAN, J., MORI, K., YANG, H.S., ZACK, D.J., ETTYREDDY, D., BROUGH, D.E., WEI, L.L., and CAMPOCHIARO, P.A. (2001). Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* **188**, 253-263.
- MORI, K., GEHLBACH, P., ANDO, A., MCVEY, D., WEI, L., and CAMPOCHIARO, P.A. (2002). Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 2428-2434.
- MORI, S., WANG, L., TAKEUCHI, T., and KANDA, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* **330**, 375-383.
- MORIMURA, H., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (1999). Recessive mutations in the RLBP1 gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctata albescens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 1000-1004.
- MORIMURA, H., FISHMAN, G.A., GROVER, S.A., FULTON, A.B., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (1998). Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3088-3093.
- MORTIMER, S.E., and HEDSTROM, L. (2005). Autosomal dominant retinitis pigmentosa mutations in inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type I disrupt nucleic acid binding. *Biochem J* **390**, 41-47.
- MOSKALENKO, M., CHEN, L., VAN ROEY, M., DONAHUE, B.A., SNYDER, R.O., MCARTHUR, J.G., and PATEL, S.D. (2000). Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* **74**, 1761-1766.
- MURAMATSU, S., MIZUKAMI, H., YOUNG, N.S., and BROWN, K.E. (1996). Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology* **221**, 208-217.
- MUSTONEN, T., and ALITALO, K. (1995). Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* **129**, 895-898.
- MUZYCZKA, N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **158**, 97-129.

- NAASH, M.L., PEACHEY, N.S., LI, Z.Y., GRYCZAN, C.C., GOTO, Y., BLANKS, J., MILAM, A.H., and RIPPES, H. (1996). Light-induced acceleration of photoreceptor degeneration in transgenic mice expressing mutant rhodopsin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 775-782.
- NAJERA, C., BENEYTO, M., BLANCA, J., ALLER, E., FONTCUBERTA, A., MILLAN, J.M., and AYUSO, C. (2002). Mutations in myosin VIIA (MYO7A) and usherin (USH2A) in Spanish patients with Usher syndrome types I and II, respectively. *Hum Mutat* **20**, 76-77.
- NARFSTROM, K. (1999). Retinal dystrophy or 'congenital stationary night blindness' in the Briard dog. *Vet Ophthalmol* **2**, 75-76.
- NARFSTROM, K., EKESTEN, B., ROSOLEN, S.G., SPIESS, B.M., PERCICOT, C.L., and OFRI, R. (2002). Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Doc Ophthalmol* **105**, 83-92.
- NARFSTROM, K., KATZ, M.L., BRAGADOTTIR, R., SEELIGER, M., BOULANGER, A., REDMOND, T.M., CARO, L., LAI, C.M., and RAKOCZY, P.E. (2003a). Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 1663-1672.
- NARFSTROM, K., KATZ, M.L., FORD, M., REDMOND, T.M., RAKOCZY, E., and BRAGADOTTIR, R. (2003b). In vivo gene therapy in young and adult RPE65^{-/-} dogs produces long-term visual improvement. *J Hered* **94**, 31-37.
- NARFSTROM, K., VAEGAN, KATZ, M., BRAGADOTTIR, R., RAKOCZY, E.P., and SEELIGER, M. (2005). Assessment of structure and function over a 3-year period after gene transfer in RPE65^{-/-} dogs. *Doc Ophthalmol* **111**, 39-48.
- NEWMAN, E.A., and ODETTE, L.L. (1984). Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K⁺ hypothesis. *J Neurophysiol* **51**, 164-182.
- NICHOLS, B.E., SHEFFIELD, V.C., VANDENBURGH, K., DRACK, A.V., KIMURA, A.E., and STONE, E.M. (1993). Butterfly-shaped pigment dystrophy of the fovea caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene. *Nat Genet* **3**, 202-207.
- NICHOLSON, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-1042.
- NICOLE, O., ALI, C., DOCAGNE, F., PLAWINSKI, L., MACKENZIE, E.T., VIVIEN, D., and BUISSON, A. (2001). Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* **21**, 3024-3033.
- NICOLETTI, A., WONG, D.J., KAWASE, K., GIBSON, L.H., YANG-FENG, T.L., RICHARDS, J.E., and THOMPSON, D.A. (1995). Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* **4**, 641-649.
- NO, D., YAO, T.P., and EVANS, R.M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3346-3351.
- NORTH, M.A., NAGGERT, J.K., YAN, Y., NOBEN-TRAUTH, K., and NISHINA, P.M. (1997). Molecular characterization of TUB, TULP1, and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3128-3133.
- NOVINA, C.D., and SHARP, P.A. (2004). The RNAi revolution. *Nature* **430**, 161-164.
- OSUOBENI, E.P., and HAMIDZADA, W.A. (1999). Ultrasonographic determination of the dimensions of ocular components in enucleated eyes of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Res Vet Sci* **67**, 125-129.

- OWENS, R.A., WEITZMAN, M.D., KYOSTIO, S.R., and CARTER, B.J. (1993). Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol* **67**, 997-1005.
- PANG, J., CHANG, B., HECKENLIVELY, J., HAWES, N.L., NUSINOWITZ, S., NOORWEZ, S.M., MCDOWELL, J.H., TIMMERS, A.M., and HAUSWIRTH, W. (2004). Gene therapy restores vision in a natural model of RPE65 leber congenital amaurosis: the rd12 mouse. Abstract ARVO #3486.
- PANG, J.J., CHANG, B., HAWES, N.L., HURD, R.E., DAVISSON, M.T., LI, J., NOORWEZ, S.M., MALHOTRA, R., MCDOWELL, J.H., KAUSHAL, S., HAUSWIRTH, W.W., NUSINOWITZ, S., THOMPSON, D.A., and HECKENLIVELY, J.R. (2005). Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Mol Vis* **11**, 152-162.
- PANG, J.J., CHANG, B., KUMAR, A., NUSINOWITZ, S., NOORWEZ, S.M., LI, J., RANI, A., FOSTER, T.C., CHIODO, V.A., DOYLE, T., LI, H., MALHOTRA, R., TEUSNER, J.T., MCDOWELL, J.H., MIN, S.H., LI, Q., KAUSHAL, S., and HAUSWIRTH, W.W. (2006). Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. *Mol Ther* **13**, 565-572.
- PARDUE, M.T., STUBBS, E.B., JR., PERLMAN, J.I., NARFSTROM, K., CHOW, A.Y., and PEACHEY, N.S. (2001). Immunohistochemical studies of the retina following long-term implantation with subretinal microphotodiode arrays. *Exp Eye Res* **73**, 333-343.
- PARKS, W.P., GREEN, M., PINA, M., and MELNICK, J.L. (1967). Physicochemical characterization of adeno-associated satellite virus type 4 and its nucleic acid. *J Virol* **1**, 980-987.
- PAWLYK, B.S., SMITH, A.J., BUCH, P.K., ADAMIAN, M., HONG, D.H., SANDBERG, M.A., ALI, R.R., and LI, T. (2005). Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 3039-3045.
- PEARCE-KELLING, S.E., ALEMAN, T.S., NICKLE, A., LATIES, A.M., AGUIRRE, G.D., JACOBSON, S.G., and ACLAND, G.M. (2001). Calcium channel blocker D-cis-diltiazem does not slow retinal degeneration in the PDE6B mutant rcd1 canine model of retinitis pigmentosa. *Mol Vis* **7**, 42-47.
- PEREIRA, D.J., MCCARTY, D.M., and MUZYCZKA, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol* **71**, 1079-1088.
- PERRAULT, I., HANEIN, S., GERBER, S., BARBET, F., DUCROQ, D., DOLLFUS, H., HAMEL, C., DUFIER, J.L., MUNNICH, A., KAPLAN, J., and ROZET, J.M. (2004). Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* **75**, 639-646.
- PERRAULT, I., HANEIN, S., GERBER, S., BARBET, F., DUFIER, J.L., MUNNICH, A., ROZET, J.M., and KAPLAN, J. (2003). Evidence of autosomal dominant Leber congenital amaurosis (LCA) underlain by a CRX heterozygous null allele. *J Med Genet* **40**, e90.
- PERRAULT, I., ROZET, J.M., CALVAS, P., GERBER, S., CAMUZAT, A., DOLLFUS, H., CHATELIN, S., SOUIED, E., GHAZI, I., LEOWSKI, C., BONNEMAISON, M., LE PASLIER, D., FREZAL, J., DUFIER, J.L., PITTLER, S., MUNNICH, A., and KAPLAN, J. (1996). Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* **14**, 461-464.
- PHILPOTT, N.J., GIRAUD-WALI, C., DUPUIS, C., GOMOS, J., HAMILTON, H., BERNS, K.I., and FALCK-PEDERSEN, E. (2002). Efficient integration of recombinant adeno-associated virus DNA vectors requires a p5-rep sequence in cis. *J Virol* **76**, 5411-5421.

- PIERCE, E.A., QUINN, T., MEEHAN, T., MCGEE, T.L., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (1999). Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet* **22**, 248-254.
- POLITI, L.E., ROTSTEIN, N.P., and CARRI, N.G. (2001). Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 3008-3015.
- POLITO, A., ISOLA, M., LANZETTA, P., GREGORI, D., and BANDELLO, F. (2006). The natural history of occult choroidal neovascularisation associated with age-related macular degeneration. A systematic review. *Ann Acad Med Singapore* **35**, 145-150.
- PONNAZHAGAN, S., MUKHERJEE, P., YODER, M.C., WANG, X.S., ZHOU, S.Z., KAPLAN, J., WADSWORTH, S., and SRIVASTAVA, A. (1997). Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice. *Gene* **190**, 203-210.
- PORTO, F.B., PERRAULT, I., HICKS, D., ROZET, J.M., HANOTEAU, N., HANEIN, S., KAPLAN, J., and SAHEL, J.A. (2002). Prenatal human ocular degeneration occurs in Leber's congenital amaurosis (LCA2). *J Gene Med* **4**, 390-396.
- PROVOST, N., LE MEUR, G., WEBER, M., MENDES-MADEIRA, A., PODEVIN, G., CHEREL, Y., COLLE, M.A., DESCHAMPS, J.Y., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2005). Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol Ther* **11**, 275-283.
- PUDDU, P., BARBONI, P., MANTOVANI, V., MONTAGNA, P., CERULLO, A., BRAGLIANI, M., MOLINOTTI, C., and CARAMAZZA, R. (1993). Retinitis pigmentosa, ataxia, and mental retardation associated with mitochondrial DNA mutation in an Italian family. *Br J Ophthalmol* **77**, 84-88.
- PUECH, B., KOSTRUBIEC, B., HACHE, J.C., and FRANCOIS, P. (1991). [Epidemiology and prevalence of hereditary retinal dystrophies in the Northern France]. *J Fr Ophtalmol* **14**, 153-164.
- QING, K., MAH, C., HANSEN, J., ZHOU, S., DWARKI, V., and SRIVASTAVA, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* **5**, 71-77.
- RABB, M.F., TSO, M.O., and FISHMAN, G.A. (1986). Cone-rod dystrophy. A clinical and histopathologic report. *Ophthalmology* **93**, 1443-1451.
- RABINOWITZ, J.E., ROLLING, F., LI, C., CONRATH, H., XIAO, W., XIAO, X., and SAMULSKI, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* **76**, 791-801.
- RAHMANI, B., TIELSCH, J.M., KATZ, J., GOTTSCH, J., QUIGLEY, H., JAVITT, J., and SOMMER, A. (1996). The cause-specific prevalence of visual impairment in an urban population. The Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* **103**, 1721-1726.
- RAJAN, R.S., and KOPITO, R.R. (2005). Suppression of wild-type rhodopsin maturation by mutants linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Biol Chem* **280**, 1284-1291.
- RASMUSSEN, H., CHU, K.W., CAMPOCHIARO, P., GEHLBACH, P.L., HALLER, J.A., HANDA, J.T., NGUYEN, Q.D., and SUNG, J.U. (2001). Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose-escalation study of ADGVPEDF.11D (ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Hum Gene Ther* **12**, 2029-2032.

- REDMOND, T.M., POLIAKOV, E., YU, S., TSAI, J.Y., LU, Z., and GENTLEMAN, S. (2005). Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13658-13663.
- REGUERA, J., CARREIRA, A., RIOLOBOS, L., ALMENDRAL, J.M., and MATEU, M.G. (2004). Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2724-2729.
- REICHEL, M.B., ALI, R.R., THRASHER, A.J., HUNT, D.M., BHATTACHARYA, S.S., and BAKER, D. (1998). Immune responses limit adenovirally mediated gene expression in the adult mouse eye. *Gene Ther* **5**, 1038-1046.
- REME, C.E., GRIMM, C., HAFEZI, F., WENZEL, A., and WILLIAMS, T.P. (2000). Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision. *News Physiol Sci* **15**, 120-124.
- REX, T.S., ALLOCCA, M., DOMENICI, L., SURACE, E.M., MAGUIRE, A.M., LYUBARSKY, A., CELLERINO, A., BENNETT, J., and AURICCHIO, A. (2004). Systemic but not intraocular Epo gene transfer protects the retina from light-and genetic-induced degeneration. *Mol Ther* **10**, 855-861.
- RICH, K.A., ZHAN, Y., and BLANKS, J.C. (1997). Aberrant expression of c-Fos accompanies photoreceptor cell death in the rd mouse. *J Neurobiol* **32**, 593-612.
- RIVERA, V.M., CLACKSON, T., NATESAN, S., POLLOCK, R., AMARA, J.F., KEENAN, T., MAGARI, S.R., PHILLIPS, T., COURAGE, N.L., CERASOLI, F., JR., HOLT, D.A., and GILMAN, M. (1996). A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* **2**, 1028-1032.
- RIVERA, V.M., GAO, G.P., GRANT, R.L., SCHNELL, M.A., ZOLTICK, P.W., ROZAMUS, L.W., CLACKSON, T., and WILSON, J.M. (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* **105**, 1424-1430.
- RIVERA, V.M., YE, X., COURAGE, N.L., SACHAR, J., CERASOLI, F., JR., WILSON, J.M., and GILMAN, M. (1999). Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8657-8662.
- RIVOLTA, C., SWEKLO, E.A., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (2000). Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet* **66**, 1975-1978.
- RIZZO, J.F., 3RD, WYATT, J., LOEWENSTEIN, J., KELLY, S., and SHIRE, D. (2003). Methods and perceptual thresholds for short-term electrical stimulation of human retina with microelectrode arrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 5355-5361.
- ROCHE, O., SUAREZ, F., SCHMITT, D., DOLLFUS, H., KAPLAN, J., HERMINE, O., and DUFIER, J.L. (2006). Effet neuroprotecteur de l'érythropoïétine sur la rétinopathie pigmentaire humaine. Abstract SFO #342.
- ROEPMAN, R., BERNOUD-HUBAC, N., SCHICK, D.E., MAUGERI, A., BERGER, W., ROPERS, H.H., CREMERS, F.P., and FERREIRA, P.A. (2000). The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors. *Hum Mol Genet* **9**, 2095-2105.
- ROHR, U.P., HEYD, F., NEUKIRCHEN, J., WULF, M.A., QUEITSCH, I., KROENER-LUX, G., STEIDL, U., FENK, R., HAAS, R., and KRONENWETT, R. (2005). Quantitative real-time PCR for titration of infectious recombinant AAV-2 particles. *J Virol Methods* **127**, 40-45.
- ROS, C., and KEMPF, C. (2004). The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology* **324**, 350-360.

- ROSENTHAL, R., BAKALL, B., KINNICK, T., PEACHEY, N., WIMMERS, S., WADELIUS, C., MARMORSTEIN, A., and STRAUSS, O. (2006). Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells. *Faseb J* **20**, 178-180.
- ROTA, R., RICCIONI, T., ZACCARINI, M., LAMARTINA, S., GALLO, A.D., FUSCO, A., KOVESDI, I., BALESTRAZZI, E., ABENI, D.C., ALI, R.R., and CAPOGROSSI, M.C. (2004). Marked inhibition of retinal neovascularization in rats following soluble-flt-1 gene transfer. *J Gene Med* **6**, 992-1002.
- ROUX, A.F. (2005). [Molecular updates on Usher syndrome]. *J Fr Ophtalmol* **28**, 93-97.
- ROZET, J.M., GERBER, S., DUCROQ, D., HAMEL, C., DUFIER, J.L., and KAPLAN, J. (2005). [Hereditary macular dystrophies]. *J Fr Ophtalmol* **28**, 113-124.
- ROZET, J.M., GERBER, S., SOUIED, E., PERRAULT, I., CHATELIN, S., GHAZI, I., LEOWSKI, C., DUFIER, J.L., MUNNICH, A., and KAPLAN, J. (1998). Spectrum of ABCR gene mutations in autosomal recessive macular dystrophies. *Eur J Hum Genet* **6**, 291-295.
- ROZET, J.M., PERRAULT, I., GERBER, S., HANEIN, S., BARBET, F., DUCROQ, D., SOUIED, E., MUNNICH, A., and KAPLAN, J. (2001). Complete abolition of the retinal-specific guanylyl cyclase (retGC-1) catalytic ability consistently leads to leber congenital amaurosis (LCA). *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1190-1192.
- SAISHIN, Y., SILVA, R.L., SAISHIN, Y., KACHI, S., ASLAM, S., GONG, Y.Y., LAI, H., CARRION, M., HARRIS, B., HAMILTON, M., WEI, L., and CAMPOCHIARO, P.A. (2005). Periocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization in a human-sized eye. *Hum Gene Ther* **16**, 473-478.
- SALVETTI, A., OREVE, S., CHADEUF, G., FAVRE, D., CHEREL, Y., CHAMPION-ARNAUD, P., DAVID-AMELINE, J., and MOULLIER, P. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* **9**, 695-706.
- SAMULSKI, R.J., BERNS, K.I., TAN, M., and MUZYCZKA, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2077-2081.
- SAMULSKI, R.J., ZHU, X., XIAO, X., BROOK, J.D., HOUSMAN, D.E., EPSTEIN, N., and HUNTER, L.A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J* **10**, 3941-3950.
- SANDBERG, M.A., BROCKHURST, R.J., GAUDIO, A.R., and BERSON, E.L. (2005). The association between visual acuity and central retinal thickness in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 3349-3354.
- SANLIOGLU, S., BENSON, P.K., YANG, J., ATKINSON, E.M., REYNOLDS, T., and ENGELHARDT, J.F. (2000). Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* **74**, 9184-9196.
- SANYAL, S., and JANSEN, H.G. (1981). Absence of receptor outer segments in the retina of rds mutant mice. *Neurosci Lett* **21**, 23-26.
- SARKADI-NAGY, E., WIJENDRAN, V., DIAU, G.Y., CHAO, A.C., HSIEH, A.T., TURPEINEN, A., NATHANIELSZ, P.W., and BRENNAN, J.T. (2003). The influence of prematurity and long chain polyunsaturate supplementation in 4-week adjusted age baboon neonate brain and related tissues. *Pediatr Res* **54**, 244-252.
- SARRA, G.M., STEPHENS, C., DE ALWIS, M., BAINBRIDGE, J.W., SMITH, A.J., THRASHER, A.J., and ALI, R.R. (2001). Gene replacement therapy in the retinal degeneration slow (rds) mouse:

- the effect on retinal degeneration following partial transduction of the retina. *Hum Mol Genet* **10**, 2353-2361.
- SAWADA, H., IBI, M., KIHARA, T., URUSHITANI, M., NAKANISHI, M., AKAIKE, A., and SHIMOHAMA, S. (2000). Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor in mesencephalic neurons. *J Neurochem* **74**, 1175-1184.
- SCHLICHTENBREDE, F.C., MACNEIL, A., BAINBRIDGE, J.W., TSCHERNUTTER, M., THRASHER, A.J., SMITH, A.J., and ALI, R.R. (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**, 523-527.
- SCHLICHTENBREDE, F.C., SMITH, A.J., BAINBRIDGE, J.W., THRASHER, A.J., SALT, T.E., and ALI, R.R. (2004). Improvement of neuronal visual responses in the superior colliculus in Prph2(Rd2/Rd2) mice following gene therapy. *Mol Cell Neurosci* **25**, 103-110.
- SCHMITZ, I., KIRCHHOFF, S., and KRAMMER, P.H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 1123-1136.
- SCHNEPP, B.C., JENSEN, R.L., CHEN, C.L., JOHNSON, P.R., and CLARK, K.R. (2005). Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* **79**, 14793-14803.
- SCHUETTRUMPF, J., LIU, J.H., COUTO, L.B., ADDYA, K., LEONARD, D.G., ZHEN, Z., SUMMER, J., and ARRUDA, V.R. (2006). Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol Ther* **13**, 1064-1073.
- SCHWAHN, H.N., GEKELER, F., KOHLER, K., KOBUCH, K., SACHS, H.G., SCHULMEYER, F., JAKOB, W., GABEL, V.P., and ZRENNER, E. (2001). Studies on the feasibility of a subretinal visual prosthesis: data from Yucatan micropig and rabbit. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **239**, 961-967.
- SEDDON, J.M., AJANI, U.A., SPERDUTO, R.D., HILLER, R., BLAIR, N., BURTON, T.C., FARBER, M.D., GRAGOUDAS, E.S., HALLER, J., MILLER, D.T., and ET AL. (1994). Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *Jama* **272**, 1413-1420.
- SEISENBERGER, G., RIED, M.U., ENDRESS, T., BUNING, H., HALLEK, M., and BRAUCHLE, C. (2001). Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* **294**, 1929-1932.
- SEMPLE-ROWLAND, S.L., LEE, N.R., VAN HOOSER, J.P., PALCZEWSKI, K., and BAEHR, W. (1998). A null mutation in the photoreceptor guanylate cyclase gene causes the retinal degeneration chicken phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1271-1276.
- SERGUERA, C., BOHL, D., ROLLAND, E., PREVOST, P., and HEARD, J.M. (1999). Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells. *Hum Gene Ther* **10**, 375-383.
- SHALABY, F., ROSSANT, J., YAMAGUCHI, T.P., GERTSENSTEIN, M., WU, X.F., BREITMAN, M.L., and SCHUH, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66.
- SHARON, D., SANDBERG, M.A., RABE, V.W., STILLBERGER, M., DRYJA, T.P., and BERSON, E.L. (2003). RP2 and RPGR mutations and clinical correlations in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* **73**, 1131-1146.
- SHIMA, DT., KUROKI, M., DEUTSCH, U., Ng, YS., ADAMIS, AP., D'AMORE, PA.

- (1996). Themouse gene for vascular endothelium growth factor,. Genomic structure, definition of transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem.* **16**, 3877-3883.
- SHWEIKI, D., ITIN, A., SOFFER, D., KESHET, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* **29**, 843-845.
- SIEVING, P.A. (1993). Photopic ON- and OFF-pathway abnormalities in retinal dystrophies. *Trans Am Ophthalmol Soc* **91**, 701-773.
- SIEVING, P.A., CARUSO, R.C., TAO, W., COLEMAN, H.R., THOMPSON, D.J., FULLMER, K.R., and BUSH, R.A. (2006). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3896-3901.
- SIREN, A.L., FRATELLI, M., BRINES, M., GOEMANS, C., CASAGRANDE, S., LEWCZUK, P., KEENAN, S., GLEITER, C., PASQUALI, C., CAPOBIANCO, A., MENNINI, T., HEUMANN, R., CERAMI, A., EHRENREICH, H., and GHEZZI, P. (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4044-4049.
- SMITH, A.J., SCHLICHTENBREDE, F.C., TSCHERNUTTER, M., BAINBRIDGE, J.W., THRASHER, A.J., and ALI, R.R. (2003). AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* **8**, 188-195.
- SMITH, R.H., and KOTIN, R.M. (1998). The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *J Virol* **72**, 4874-4881.
- SMITH, R.H., SPANO, A.J., and KOTIN, R.M. (1997). The Rep78 gene product of adeno-associated virus (AAV) self-associates to form a hexameric complex in the presence of AAV ori sequences. *J Virol* **71**, 4461-4471.
- SNYDER, S.H., LAI, M.M., and BURNETT, P.E. (1998). Immunophilins in the nervous system. *Neuron* **21**, 283-294.
- SOHOCKI, M.M., BOWNE, S.J., SULLIVAN, L.S., BLACKSHAW, S., CEPKO, C.L., PAYNE, A.M., BHATTACHARYA, S.S., KHALIQ, S., QASIM MEHDI, S., BIRCH, D.G., HARRISON, W.R., ELDER, F.F., HECKENLIVELY, J.R., and DAIGER, S.P. (2000). Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* **24**, 79-83.
- SOHOCKI, M.M., SULLIVAN, L.S., MINTZ-HITTNER, H.A., BIRCH, D., HECKENLIVELY, J.R., FREUND, C.L., MCINNES, R.R., and DAIGER, S.P. (1998). A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene. *Am J Hum Genet* **63**, 1307-1315.
- SOKER, S., GOLLAMUDI-PAYNE, S., FIDDER, H., CHARMAHELLI, H., and KLAGSBRUN, M. (1997). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem* **272**, 31582-31588.
- SPENCER, B., AGARWALA, S., MISKULIN, M., SMITH, M., and BRANDT, C.R. (2000). Herpes simplex virus-mediated gene delivery to the rodent visual system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 1392-1401.
- SRIVASTAVA, A., LUSBY, E.W., and BERNS, K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* **45**, 555-564.
- STEINKULLER, P.G., DU, L., GILBERT, C., FOSTER, A., COLLINS, M.L., and COATS, D.K. (1999). Childhood blindness. *J Aapos* **3**, 26-32.

- STIEGER, K., LE MEUR, G., LASNE, F., WEBER, M., DESCHAMPS, J.Y., NIVARD, D., MENDES-MADEIRA, A., PROVOST, N., MARTIN, L., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2006). Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther* **13**, 967-975.
- STONE, E.M., LOTERY, A.J., MUNIER, F.L., HEON, E., PIGUET, B., GUYMER, R.H., VANDENBURGH, K., COUSIN, P., NISHIMURA, D., SWIDERSKI, R.E., SILVESTRI, G., MACKEY, D.A., HAGEMAN, G.S., BIRD, A.C., SHEFFIELD, V.C., and SCHORDERET, D.F. (1999). A single EFEMP1 mutation associated with both Malattia Leventinese and Doyme honeycomb retinal dystrophy. *Nat Genet* **22**, 199-202.
- SUDARSHAN, A.P. (1999). Vitreous change in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* **106**, 210.
- SULLIVAN, L.S., BOWNE, S.J., BIRCH, D.G., HUGHBANKS-WHEATON, D., HECKENLIVELY, J.R., LEWIS, R.A., GARCIA, C.A., RUIZ, R.S., BLANTON, S.H., NORTHRUP, H., GIRE, A.I., SEAMAN, R., DUZKALE, H., SPELLICY, C.J., ZHU, J., SHANKAR, S.P., and DAIGER, S.P. (2006). Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a screen of known genes in 200 families. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3052-3064.
- SUMMERFORD, C., BARTLETT, J.S., and SAMULSKI, R.J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* **5**, 78-82.
- SUMMERFORD, C., and SAMULSKI, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72**, 1438-1445.
- SURACE, E.M., AURICCHIO, A., REICH, S.J., REX, T., GLOVER, E., PINELES, S., TANG, W., O'CONNOR, E., LYUBARSKY, A., SAVCHENKO, A., PUGH, E.N., JR., MAGUIRE, A.M., WILSON, J.M., and BENNETT, J. (2003). Delivery of adeno-associated virus vectors to the fetal retina: impact of viral capsid proteins on retinal neuronal progenitor transduction. *J Virol* **77**, 7957-7963.
- SURACE, E.M., DOMENICI, L., CORTESE, K., COTUGNO, G., DI VICINO, U., VENTURI, C., CELLERINO, A., MARIGO, V., TACCHETTI, C., BALLABIO, A., and AURICCHIO, A. (2005). Amelioration of both functional and morphological abnormalities in the retina of a mouse model of ocular albinism following AAV-mediated gene transfer. *Mol Ther* **12**, 652-658.
- TAKAHASHI, T., NAKAMURA, T., HAYASHI, A., KAMEI, M., NAKABAYASHI, M., OKADA, A., TOMITA, K., KANEDA, Y., TANO, Y. (2000). Inhibition of experimental choroidal neovascularization by overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in retinal pigment epithelium cells. *Am J Ophthalmol* **130**, 774-781.
- TALCOTT, B., and MOORE, M.S. (1999). Getting across the nuclear pore complex. *Trends Cell Biol* **9**, 312-318.
- TAO, W., WEN, R., GODDARD, M.B., SHERMAN, S.D., O'ROURKE, P.J., STABILA, P.F., BELL, W.J., DEAN, B.J., KAUPER, K.A., BUDZ, V.A., TSIARAS, W.G., ACLAND, G.M., PEARCE-KELLING, S., LATIES, A.M., and AGUIRRE, G.D. (2002). Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3292-3298.
- THOMPSON, D.A., GYURUS, P., FLEISCHER, L.L., BINGHAM, E.L., MCHENRY, C.L., APFELSTEDT-SYLLA, E., ZRENNER, E., LORENZ, B., RICHARDS, J.E., JACOBSON, S.G., SIEVING, P.A., and GAL, A. (2000). Genetics and phenotypes of RPE65 mutations in inherited retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 4293-4299.
- THOMPSON, D.A., LI, Y., MCHENRY, C.L., CARLSON, T.J., DING, X., SIEVING, P.A., APFELSTEDT-SYLLA, E., and GAL, A. (2001). Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* **28**, 123-124.

- TOBIASCH, E., BURGUETE, T., KLEIN-BAUERNSCHMITT, P., HEILBRONN, R., and SCHLEHOFER, J.R. (1998). Discrimination between different types of human adeno-associated viruses in clinical samples by PCR. *J Virol Methods* **71**, 17-25.
- TOBIN, K.A. (2006). Macugen treatment for wet age-related macular degeneration. *Insight* **31**, 11-14.
- TRAVIS, G.H., SUTCLIFFE, J.G., and BOK, D. (1991). The retinal degeneration slow (rds) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein. *Neuron* **6**, 61-70.
- TREEN, M., UAUY, R.D., JAMESON, D.M., THOMAS, V.L., and HOFFMAN, D.R. (1992). Effect of docosahexaenoic acid on membrane fluidity and function in intact cultured Y-79 retinoblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* **294**, 564-570.
- TSO, M.O., ZHANG, C., ABLER, A.S., CHANG, C.J., WONG, F., CHANG, G.Q., and LAM, T.T. (1994). Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**, 2693-2699.
- TZEKOV, R.T., LIU, Y., SOHOCKI, M.M., ZACK, D.J., DAIGER, S.P., HECKENLIVELY, J.R., and BIRCH, D.G. (2001). Autosomal dominant retinal degeneration and bone loss in patients with a 12-bp deletion in the CRX gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1319-1327.
- URLINGER, S., BARON, U., THELLMANN, M., HASAN, M.T., BUJARD, H., and HILLEN, W. (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**, 7963-7968.
- VALTER, K., BISTI, S., and STONE, J. (2003). Location of CNTFRalpha on outer segments: evidence of the site of action of CNTF in rat retina. *Brain Res* **985**, 169-175.
- VAN DE PAVERT, S.A., KANTARDZHIEVA, A., MALYSHEVA, A., MEULEMAN, J., VERSTEEG, I., LEVELT, C., KLOOSTER, J., GEIGER, S., SEELIGER, M.W., RASHBASS, P., LE BIVIC, A., and WIJNHOLDS, J. (2004). Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* **117**, 4169-4177.
- VAN DER SPUIY, J., CHAPPLE, J.P., CLARK, B.J., LUTHER, P.J., SETHI, C.S., and CHEETHAM, M.E. (2002). The Leber congenital amaurosis gene product AIPL1 is localized exclusively in rod photoreceptors of the adult human retina. *Hum Mol Genet* **11**, 823-831.
- VAN WIJK, E., PENNING, R.J., TE BRINKE, H., CLAASSEN, A., YNTEMA, H.G., HOEFSLOOT, L.H., CREMERS, F.P., CREMERS, C.W., and KREMER, H. (2004). Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II. *Am J Hum Genet* **74**, 738-744.
- VARGAS, J., JR., GUSELLA, G.L., NAJFELD, V., KLOTMAN, M.E., and CARA, A. (2004). Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* **15**, 361-372.
- VELDWIJK, M.R., TOPALY, J., LAUFS, S., HENGGE, U.R., WENZ, F., ZELLER, W.J., and FRUEHAUF, S. (2002). Development and optimization of a real-time quantitative PCR-based method for the titration of AAV-2 vector stocks. *Mol Ther* **6**, 272-278.
- VERVOORT, R., LENNON, A., BIRD, A.C., TULLOCH, B., AXTON, R., MIANO, M.G., MEINDL, A., MEITINGER, T., CICCODICOLA, A., and WRIGHT, A.F. (2000). Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet* **25**, 462-466.
- VESKE, A., NILSSON, S.E., NARFSTROM, K., and GAL, A. (1999). Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. *Genomics* **57**, 57-61.
- VOLKER, M., SHINODA, K., SACHS, H., GMEINER, H., SCHWARZ, T., KOHLER, K., INHOFFEN, W., BARTZ-SCHMIDT, K.U., ZRENNER, E., and GEKELER, F. (2004). In vivo assessment of

- subretinally implanted microphotodiode arrays in cats by optical coherence tomography and fluorescein angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **242**, 792-799.
- VOLLRATH, D., FENG, W., DUNCAN, J.L., YASUMURA, D., D'CRUZ, P.M., CHAPPELOW, A., MATTHES, M.T., KAY, M.A., and LAVAIL, M.M. (2001). Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of *Mertk*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12584-12589.
- WAHLIN, K.J., ADLER, R., ZACK, D.J., and CAMPOCHIARO, P.A. (2001). Neurotrophic signaling in normal and degenerating rodent retinas. *Exp Eye Res* **73**, 693-701.
- WAHLIN, K.J., CAMPOCHIARO, P.A., ZACK, D.J., and ADLER, R. (2000). Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 927-936.
- WARD, B.M. (2004). Pox, dyes, and videotape: making movies of GFP-labeled vaccinia virus. *Methods Mol Biol* **269**, 205-218.
- WEBER, M., RABINOWITZ, J., PROVOST, N., CONRATH, H., FOLLIOU, S., BRIOT, D., CHEREL, Y., CHENUAUD, P., SAMULSKI, J., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* **7**, 774-781.
- WEGER, S., WENDLAND, M., KLEINSCHMIDT, J.A., and HEILBRONN, R. (1999). The adeno-associated virus type 2 regulatory proteins rep78 and rep68 interact with the transcriptional coactivator PC4. *J Virol* **73**, 260-269.
- WEISHAUPT, J.H., ROHDE, G., POLKING, E., SIREN, A.L., EHRENREICH, H., and BAHR, M. (2004). Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 1514-1522.
- WEITZMAN, M.D., KYOSTIO, S.R., KOTIN, R.M., and OWENS, R.A. (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5808-5812.
- WELLS, J., WROBLEWSKI, J., KEEN, J., INGLEHEARN, C., JUBB, C., ECKSTEIN, A., JAY, M., ARDEN, G., BHATTACHARYA, S., FITZKE, F., and ET AL. (1993). Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nat Genet* **3**, 213-218.
- WENZEL, A., GRIMM, C., MARTI, A., KUENG-HITZ, N., HAFEZI, F., NIEMEYER, G., and REME, C.E. (2000). *c-fos* controls the "private pathway" of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors. *J Neurosci* **20**, 81-88.
- WOLF, G. (2003). Lipofuscin and macular degeneration. *Nutr Rev* **61**, 342-346.
- WRIGSTAD, A., NILSSON, S.E., and NARFSTROM, K. (1992). Ultrastructural changes of the retina and the retinal pigment epithelium in Briard dogs with hereditary congenital night blindness and partial day blindness. *Exp Eye Res* **55**, 805-818.
- WU, P., XIAO, W., CONLON, T., HUGHES, J., AGBANDJE-MCKENNA, M., FERKOL, T., FLOTTE, T., and MUZYCZKA, N. (2000). Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol* **74**, 8635-8647.
- XI, Q., PAUER, G.J., TRABOULSI, E.I., and HAGSTROM, S.A. (2006). Mutation screen of the *TUB* gene in patients with retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Exp Eye Res* **83**, 569-573.

- XIAO, W., CHIRMULE, N., BERTA, S.C., MCCULLOUGH, B., GAO, G., and WILSON, J.M. (1999). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* **73**, 3994-4003.
- XIAO, W., WARRINGTON, K.H., JR., HEARING, P., HUGHES, J., and MUZYCZKA, N. (2002). Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol* **76**, 11505-11517.
- XIAO, X., LI, J., and SAMULSKI, R.J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* **72**, 2224-2232.
- YAMAMOTO, H., SIMON, A., ERIKSSON, U., HARRIS, E., BERSON, E.L., and DRYJA, T.P. (1999). Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat Genet* **22**, 188-191.
- YAN, Z., ZAK, R., LUXTON, G.W., RITCHIE, T.C., BANTEL-SCHAAL, U., and ENGELHARDT, J.F. (2002). Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol* **76**, 2043-2053.
- YAN, Z., ZAK, R., ZHANG, Y., DING, W., GODWIN, S., MUNSON, K., PELUSO, R., and ENGELHARDT, J.F. (2004). Distinct classes of proteasome-modulating agents cooperatively augment recombinant adeno-associated virus type 2 and type 5-mediated transduction from the apical surfaces of human airway epithelia. *J Virol* **78**, 2863-2874.
- YANG, G.S., SCHMIDT, M., YAN, Z., LINDBLOOM, J.D., HARDING, T.C., DONAHUE, B.A., ENGELHARDT, J.F., KOTIN, R., and DAVIDSON, B.L. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* **76**, 7651-7660.
- YUAN, L., KAWADA, M., HAVLIOGLU, N., TANG, H., and WU, J.Y. (2005). Mutations in PRPF31 inhibit pre-mRNA splicing of rhodopsin gene and cause apoptosis of retinal cells. *J Neurosci* **25**, 748-757.
- ZENG, Y., TAKADA, Y., KJELLSTROM, S., HIRIYANNA, K., TANIKAWA, A., WAWROUSEK, E., SMAOUI, N., CARUSO, R., BUSH, R.A., and SIEVING, P.A. (2004). RS-1 Gene Delivery to an Adult Rs1h Knockout Mouse Model Restores ERG b-Wave with Reversal of the Electronegative Waveform of X-Linked Retinoschisis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 3279-3285.
- ZNOIKO, S.L., CROUCH, R.K., MOISEYEV, G., and MA, J.X. (2002). Identification of the RPE65 protein in mammalian cone photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1604-1609.
- ZOGRAFOS, L. (2002). *Tumeurs intraoculaires*. Rapport SFO; Masson. (Paris).
- ZOLOTUKHIN, S., BYRNE, B.J., MASON, E., ZOLOTUKHIN, I., POTTER, M., CHESNUT, K., SUMMERFORD, C., SAMULSKI, R.J., and MUZYCZKA, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* **6**, 973-985.
- ZOLOTUKHIN, S., POTTER, M., ZOLOTUKHIN, I., SAKAI, Y., LOILER, S., FRAITES, T.J., JR., CHIODO, V.A., PHILLIPSBERG, T., MUZYCZKA, N., HAUSWIRTH, W.W., FLOTTE, T.R., BYRNE, B.J., and SNYDER, R.O. (2002). Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* **28**, 158-167.
- ZRENNER, E. (2002). Will retinal implants restore vision? *Science* **295**, 1022-1025.