

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Année 2012

---

**Pharmacologie moléculaire des vecteurs adéno-associés  
*in situ* dans le muscle squelettique : Implications de la  
régulation épigénétique endogène sur l'expression  
du génome recombinant**

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, santé

Spécialité : Biologie moléculaire

*Présenté et soutenue publiquement par :*

**Adrien LÉGER**

*Le 29 juin 2012, devant le jury ci-dessous*

Président : Prof. Michael Linden

Rapporteurs : Prof. Andràs Paldi

Dr. Luis Garcia

Directeur de thèse : Philippe Moullier

# Affiliations des contributeurs et des jurys

---

## Contributeurs par ordre alphabétique

Bertil Emilie <sup>2</sup>, **Dubreil Laurence**<sup>4</sup>, **Dupont Jean-Baptiste**<sup>1</sup>, Ferry Nicolas<sup>5</sup>, **Georger Christophe** <sup>2</sup>, Gjata Bernard<sup>2</sup>, Le Guiner Caroline<sup>1,2</sup>, **Léger Adrien**<sup>1</sup>, Marolleau Béatrice<sup>2</sup>, McGee Im Kate<sup>3</sup>, **Moullier Philippe**<sup>1,2,6</sup>, Nickerson Michael<sup>3</sup>, **Penaud-Budloo Magalie**<sup>1</sup>, **Snyder Richard**<sup>1,6,7</sup>, Thibaut Larcher<sup>4</sup> et Van Wittenberghe Laetitia<sup>2</sup>

**1)** INSERM UMR1089, Nantes, France. **2)** Généthon, Evry, France. **3)** National Cancer Institute, NIH, Frederick, Maryland, USA. **4)** INRA UMR703, Nantes, France. **5)** ANSM, Département de thérapie cellulaire et génique, tissus, organes, Saint Denis, France. **6)** Department of Molecular Genetics and Microbiology, Univ of Florida, Gainesville, USA. **7)** Center of Excellence for Regenerative Health Biotechnology, Univ of Florida, Alachua, USA.

**Direction scientifique :** Moullier Philippe et Snyder Richard

**Gestion du projet et conception des expériences :** Léger Adrien et Penaud-Budloo Magalie

**Analyses moléculaires :** Dupont Jean-Baptiste, Léger Adrien et Penaud-Budloo Magalie

**Séquençage haut débit :** McGee Im Kate et Nickerson Michael

**Analyses histologiques :** Bertil Emilie, Laurence Dubreil et Christophe Georger

**Expérimentation animale :** Léger Adrien, Marolleau Béatrice, Van Wittenberghe Laetitia et Penaud-Budloo Magalie

**Expertise scientifique :** Gjata Bernard, Le Guiner Caroline et Thibaut Larcher

## Jury de thèse par ordre alphabétique

Garcia Luis<sup>8</sup>, Linden Michael<sup>9</sup> et Paldi Andràs<sup>2, 10</sup>

**8)** UMR 7215 CNRS - U974 INSERM - Institut de Myologie, Faculté Pierre et Marie Curie, Paris, France. **9)** King's College London School of Medicine - Department of Infectious Diseases - Guy's Hospital, London, UK. **10)** U 951-INSERM, Université d'Evry, EPHE, Evry, France.

“Small, DNA-containing particles were separated from preparations of a simian adenovirus. (...) Replication of the particles in cell cultures was obtained only when they were inoculated simultaneously with adenoviruses.”

Robert Atchison, Bruce Casto and William Mcd. Hammon - 1965

“The first successful genetic engineering will be done with the patient's own cells (...) The desired new gene will be introduced (...) by direct DNA transfer. The rare cell with the desired change will then be selected, grown into a mass culture, and reimplanted”

Edward Tatum - 1966

“Avoir, dans les maladies, deux choses en vue : être utile ou du moins ne pas nuire”

Hippocrates - 410 av. J.C.

“The recent death of a research subject, Jesse Gelsinger, as a direct result of a gene transfer (...) leads to concerns for future of gene therapy. Some had said research moved too quickly. the field of gene therapy is now under intense scrutiny from scientists, the government and the public. ”

Doris Teichler Zallen - 2000

“In sum, this gene therapy trial with an AAV8 vector for hemophilia B is truly a landmark study, since it is the first to achieve long-term expression of a blood protein at therapeutically relevant levels (...) but the risks of this procedure are not yet totally clear”

Katherine Ponder - 2011

# Table des matières

---

<b>Abréviations</b> .....	<b>vii</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>xi</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. La thérapie génique</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2. Le virus adéno-associé et les vecteurs recombinants dérivés</b> .....	<b>13</b>
<b>I.3. Application et amélioration des vecteurs AAVr pour la thérapie génique</b> .....	<b>39</b>
<b>I.4. Chromatine et régulation de la transcription</b> .....	<b>55</b>
<b>I.5. La Dystrophie musculaire de Duchenne</b> .....	<b>93</b>
<b>II Présentation générale de l'étude</b> .....	<b>111</b>
<b>III Evaluation du niveau de méthylation des CpG du promoteur RSV porté par le génome de l'AAVr dans le muscle et le foie de macaque.</b> .....	<b>121</b>
<b>IV Impacts de l'altération des mécanismes épigénétiques et de l'instabilité du génome sur la sécurité et l'efficacité de transduction par un AAVr dans le muscle murin déficient en dystrophine</b> .....	<b>133</b>
<b>IV.1. Objectifs du projet</b> .....	<b>134</b>
<b>IV.2. Matériels et méthodes</b> .....	<b>136</b>
<b>IV.3. Résultats préliminaires</b> .....	<b>145</b>
<b>V Discussion et perspectives</b> .....	<b>165</b>
<b>VI Bibliographie</b> .....	<b>187</b>

# Liste des figures et des tableaux

---

## Figures

Les figures empruntées à d'autres auteurs sans modification sont indiquées par la mention « tiré de » dans le cas où les images proviennent d'un article scientifique ou « crédit » dans les autres cas. Si les figures ont subi des modifications ou si un élément provenant du travail d'un autre auteur est introduit dans une illustration, la mention « adapté de » est utilisée. Enfin, toutes les figures que j'ai entièrement réalisées à l'aide des logiciels d'Inkscape, PAINT.NET, PRISM© ou Powerpoint© sont indiquées par le signe (cc) et sont publiées sous [licence Creative Commons BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/). Elles peuvent être reproduites, modifiées et diffusées librement pour toute utilisation autre que commerciale sous réserve d'être publiées sous le même type de licence et de me créditer de façon claire en indiquant mon nom et prénom ainsi que mon adresse mail ([adrien.leger@inserm.fr](mailto:adrien.leger@inserm.fr)).



Fig. 1) Photographie d'archive prise lors du symposium sur la médecine du futur à New York en 1966. -----	xi
Fig. 2) Occurrences normalisées du terme "gene therapy" dans la base de donnée bibliographique Pubmed et nombres d'essais cliniques de thérapie génique en cours en fonction des années (cc). -----	xii
Fig. 3) Représentation schématique de la formation des lipoplexes et polyplexes. -----	5
Fig. 4) Modifications nécessaires ou souhaitables pour générer un vecteur viral déficient pour la réplication à partir d'un virus sauvage (cc).-----	6
Fig. 5) Vecteurs utilisés dans les essais cliniques des maladies génétiques monogéniques en cours (cc). -----	8
Fig. 6) Utilisation des ZFN pour le traitement des maladies génétiques à gain ou à perte de fonction (cc). -----	12
Fig. 7) Représentation schématique de l'AAV de sérotype 2 en coupe et en 3D. -----	13
Fig. 8) Cadres ouverts de lecture présents sur le génome de l'AAV 2 et messagers rep et cap dérivés (cc).-----	14
Fig. 9) Structure secondaire de l'ITR de l'AAV 2 et modèle de réplication du génome de l'AAV. -----	18
Fig. 10) Modèle d'encapsidation des génomes AAV à l'aide de l'activité hélicase de Rep 52/40. -----	19
Fig. 11) Contaminants ADN observés et attendus dans des particules d'AAVr purifiées (cc). -----	23
Fig. 12) Schéma récapitulatif des étapes de transduction par un vecteur AAVr (cc).-----	25

Fig. 13) Modèle de restriction de la synthèse du second brin d'ADN par la protéine FKBP52 (cc).	-----	32 -
Fig. 14) Modèle de formation des multimères par recombinaison homologue (cc).	-----	35 -
Fig. 15) Arbre phylogénétique des sérotypes naturels d'AAV (cc).	-----	47 -
Fig. 16) Comparaison de la production et de la transduction à l'aide de vecteur ssAAV et scAAV (cc).	-----	50 -
Fig. 17) Fréquence d'utilisation des codons chez l'homme dans les gènes hautement exprimés.	-----	53 -
Fig. 18) Illustration de la division cellulaire et de la condensation de la chromatine.	-----	55 -
Fig. 19) Structure d'un nucléosome obtenu par cristallographie à une résolution de 1,9Å.	-----	56 -
Fig. 20) Observation en microscopie électronique de la structure en collier de perle de la chromatine.	-----	56 -
Fig. 21) Organisation de la chromatine en fonction de la concentration.	-----	57 -
Fig. 22) Ultrastructure d'un noyau en microscopie électronique à transmission.	-----	58 -
Fig. 23) Facteurs participant à la transition de l'euchromatine en hétérochromatine (cc).	-----	60 -
Fig. 24) Représentation comparative des domaines fonctionnels des différentes DNMT des mammifères (cc).	---	61 -
Fig. 25) Mécanismes de méthylation et de déméthylation probables des cytosines chez les mammifères (cc).	----	63 -
Fig. 26) Distribution et fréquence de méthylation des CGI dans les génomes humain et murin.	-----	64 -
Fig. 27) Détail de la réaction chimique de conversion bisulfite (cc).	-----	67 -
Fig. 28) Représentation de la localisation de HPTM courantes sur les 5 histones canoniques humaines.	-----	69 -
Fig. 29) Modèle schématique de l'implication des HPTM dans la modulation de l'environnement chromatinien.	--	74 -
Fig. 30) Différentes possibilités de lecture des HPTM selon un mode combinatoire.	-----	75 -
Fig. 31) Représentation graphique de quelques « couleurs » de la chromatine.	-----	76 -
Fig. 32) Résumé de la méthodologie générale de CHIP (cc).	-----	78 -
Fig. 33) Représentation de l'ARN messager de la dystrophine (cc).	-----	94 -
Fig. 34) Représentation du complexe associé à la dystrophine.	-----	98 -
Fig. 35) Récapitulatif des vecteurs injectés et détails des cassettes d'expression (cc).	-----	115 -
Fig. 36) Détail du promoteur RSV utilisé dans cette étude (cc).	-----	117 -
Fig. 37) Diagramme organisationnel des différentes tâches du projet (cc).	-----	135 -
Fig. 38) Récapitulatif des points de cinétique en fonction de la lignée murine utilisée (cc).	-----	137 -
Fig. 39) Représentation graphique d'une série de donnée sous forme de boîte à moustache (cc).	-----	144 -
Fig. 40) Mesure de l'anisocytose dans le tibialis anterior des souris mdx4cv (cc).	-----	147 -
Fig. 41) Nombre de vg/hdg dans le foie des souris (cc).	-----	150 -
Fig. 42) Nombre de vg/hdg dans le muscle tibialis anterior des souris (cc).	-----	150 -
Fig. 43) Mesure de variabilité de l'expression des 11 gènes endogènes obtenus pour le muscle et le foie de souris à l'aide de l'algorithme NormFinder (cc).	-----	151 -
Fig. 44) Observation de la GFP dans le muscles injectés des souris C57B/6J (cc).	-----	153 -
Fig. 45) Quantité relative d'ARNm transgénique dans le foie des souris (cc).	-----	154 -
Fig. 46) Quantité relative d'ARNm transgénique dans le muscle tibialis anterior des souris (cc).	-----	154 -

Fig. 47) Quantité relative d'ARNm transgénique par vg dans le foie des souris (cc). ----- 158 -  
 Fig. 48) Quantité relative d'ARNm transgénique par vg dans le muscle tibialis anterior des souris (cc). ----- 158 -  
 Fig. 49) Quantité relative de différentes HPTM présentes sur le génome de l'AAVr et des gènes endogène murins de  
 contrôle dans le tibialis anterior de souris C57B/6J (cc).----- 160 -  
 Fig. 50) Quantité relative normalisée de différentes HPTM présentes sur le génome de l'AAVr dans le tibialis  
 anterior de souris C57B/6J (cc). ----- 162 -

## Tableaux

Tableau 1) Caractéristiques des principaux vecteurs utilisés pour le transfert de gène chez les mammifères. ----- 7 -  
 Tableau 2) Caractéristiques des principales voies d'injection utilisées en thérapie génique *in vivo* ----- 44 -  
 Tableau 3) Tropisme des principaux sérotypes d'AAVr.----- 48 -  
 Tableau 4) Récapitulatif des principales techniques d'analyse de la méthylation des CpG. ----- 68 -  
 Tableau 5) Récapitulatif des enzymes impliquées dans l'acétylation des histones. ----- 71 -  
 Tableau 6) Récapitulatif des enzymes impliquées dans la méthylation des histones.----- 72 -  
 Tableau 7) Récapitulatif des enzymes impliquées dans la phosphorylation des histones. ----- 73 -  
 Tableau 8) Caractéristiques des inhibiteurs de DNMT.----- 80 -  
 Tableau 9) Caractéristiques des inhibiteurs de HDAC. ----- 81 -  
 Tableau 10) Caractéristiques des inhibiteurs de HMT. ----- 82 -  
 Tableau 11) Caractéristiques des anticorps utilisés pour les expériences de CHIP. ----- 140 -  
 Tableau 12) Liste des primers utilisés en PCR quantitative.----- 141 -  
 Tableau 13) Liste des conditions de PCR quantitative. ----- 142 -  
 Tableau 14) Nombre de copie de génome de vecteur par génome diploïde de la cellule hôte dans le foie et le  
 muscle *tibialis anterior* des souris injectées. ----- 148 -  
 Tableau 15) Quantité relative d'ARNm transgénique dans le foie et le muscle *tibialis anterior* des souris injectées. ---  
 ----- 152 -  
 Tableau 16) Quantité relative d'ARNm transgénique par copie de vecteur de génome dans le foie et le muscle  
*tibialis anterior* des souris injectées. ----- 155 -

# Abréviations

---

<b>5mC</b>	Cytosine méthylé en 5'
<b>8oxoG</b>	8-oxo-guanine
<b>AA</b>	Acide aminé
<b>AAT</b>	A1 anti-trypsin
<b>AAV</b>	Virus adéno associé
<b>AAVr</b>	Vecteur AAV recombinant
<b>AAVS1</b>	Site d'intégration 1 de l'AAV
<b>Ab</b>	Anticorps
<b>Ad</b>	Adénovirus
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AFSSAPS</b>	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
<b>Alb</b>	Albumine
<b>AMM</b>	Autorisation de mise sur le marché
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>B6</b>	C57b/6j
<b>BER</b>	Base excision repair (réparation par excision de base)
<b>BMD</b>	Dystrophie musculaire de Becker
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin (albumine sérique bovine)
<b>Ca</b>	Calcium
<b>CaCMK</b>	Calmoduline kinase calcium dépendante
<b>CaMK</b>	Calmoduline kinase
<b>CBA</b>	Chicken $\beta$ actine
<b>CBP</b>	Creb-binding protein
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b>cDNA</b>	Complementary dna (DNA complémentaire)
<b>CGI</b>	Cpg island (ilots CpG)
<b>cHC</b>	Hétérochromatine constitutive
<b>ChIP</b>	Immunoprécipitation de la chromatine
<b>CLIC</b>	Clathrin independent carrier
<b>CMD</b>	Chromatin modifying drug (drogues modifiant la structure de la chromatine)
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'histocompatibilité
<b>CMV</b>	Cytomégalovirus
<b>CpG</b>	Dinucléotide CG
<b>CPV</b>	Canine parvovirus (Parvovirus canin)
<b>CXMDj</b>	Canine x-linked muscular dystrophy in Japan
<b>DAPC</b>	Dystrophin associated protein complex (complexe protéique associé à la dystrophine)
<b>ddITR</b>	ITR double d
<b>DM</b>	Duplex monomérique
<b>DMD</b>	Dystrophie musculaire de Duchenne
<b>DNA-PK</b>	DNA-dependant protein kinase
<b>DNMT</b>	DNA methyltransferase (ADN méthyl-transférase)

<b>DNMTi</b>	Inhibiteur de DNMT
<b>DSB</b>	Double strand break (cassures double brin)
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virus
<b>EC</b>	Euchromatine
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>EF1<math>\alpha</math></b>	Translation elongation factor 1- $\alpha$
<b>EGFR</b>	Récepteurs des facteurs de croissance épidermique
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay (méthode immuno-enzymatique)
<b>EMEA</b>	European medicines agency
<b>EZ#</b>	Enhancer de zeste
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>FGFR</b>	Récepteurs des facteurs de croissance des fibroblastes
<b>fHC</b>	Hétérochromatine facultative
<b>FISH</b>	Fluorescent in situ hybridization) hybridation in situ à fluorescence
<b>FIX</b>	Facteur ix de coagulation
<b>GEEC</b>	Glycosyl-phosphatidyl-inositol enriched endocytosis compartment
<b>GFP</b>	(Enhanced) green fluorescent protein
<b>Grb</b>	Growth factor receptor bound protein
<b>GRMD</b>	Golden retriever muscular dystrophy
<b>HAT</b>	Histone acétyle-transférase
<b>HC</b>	Hétérochromatine
<b>HDAC</b>	Histone déacétylase
<b>HDACi</b>	Inhibiteur de HDAC
<b>HDM</b>	Histones déméthylase
<b>HGFR</b>	Récepteurs des facteurs de croissance des hépatocytes
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus (Virus De l'immunodéficience Humaine)
<b>HMT</b>	Histones méthyl-transférases
<b>HMTi</b>	Inhibiteur de HMT
<b>HP1</b>	Heterochromatin protein 1
<b>HPRT</b>	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase
<b>HPTM</b>	Modifications post traductionnelles des histones
<b>HPV</b>	Papillomavirus humain
<b>HR</b>	Recombinaison homologue
<b>HSPG</b>	Protéoglycane à héparane sulfate
<b>HSV</b>	Herpes simplex virus
<b>IC</b>	Intracérébrale
<b>ICA</b>	Infectious center assay
<b>IF</b>	Immunofluorescence
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IM</b>	Intramusculaire
<b>IP</b>	Immunoprécipitation
<b>IS</b>	Immunosuppresseurs
<b>IT</b>	Intrathécale
<b>ITR</b>	Inverted terminal repeat
<b>IV</b>	Intraveineuse
<b>Kb</b>	Kilo base (1000 bases)
<b>KD</b>	Knock down
<b>KHSV</b>	Kaposi's herpes sarcoma virus
<b>KI</b>	Knock in
<b>KO</b>	Knock out

<b>LAM PCR</b>	Linear amplification-mediated PCR
<b>LamR</b>	Récepteur de la laminine
<b>LCA</b>	Amaurose congénitale de Leber
<b>LINE</b>	Long interspersed elements (retro-transposon long sans LTR)
<b>LM PCR</b>	Linker mediated PCR
<b>LPL</b>	Lipoprotein lipase
<b>LTR</b>	Long terminal repeat (longue répétition terminale)
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>Mb</b>	Méga-Base (1e6 Bases)
<b>MB</b>	Myoglobine
<b>MBD</b>	Methyl-cpg binding domain
<b>MC</b>	Minicircles
<b>MCK</b>	Muscle creatine kinase
<b>mdx</b>	Muscle dystrophy X linked
<b>Mg</b>	Magnésium
<b>MHCd</b>	Isoforme développementale des chaînes lourdes de la myosine
<b>MHCK</b>	A -myosin heavy-chain
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>MLV</b>	Murine leukemia virus
<b>Mnase</b>	Micrococcal nuclease
<b>MOI</b>	Multiplicity Of Infection (Multiplicité d'infection)
<b>MoMLV</b>	Moloney murine leukemia virus
<b>MRF</b>	Myogenic regulatory factor
<b>Mtase</b>	Méthyl-transférase
<b>MVM</b>	Minute virus of mice (Virus minute murin)
<b>NaBut</b>	Sodium butyrate
<b>NAD(P)H</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>NES</b>	Signal d'export Nucléaire
<b>NF-κB</b>	Nuclear transcription factor kappa b
<b>NGS</b>	Next-generation sequencing (Séquençage nouvelle génération)
<b>NHEJ</b>	Non homologous end junction (recombinaison non homologue)
<b>NHP</b>	Non human primate (primate non humain)
<b>NLS</b>	Nuclear localization signal (signal de localisation nucléaire)
<b>NMD</b>	Non sense mediated decay (dégradation des ARNm non-sens)
<b>NO</b>	Nitric Oxide (Oxyde Nitrique Ou Monoxyde d'azote)
<b>NOS</b>	Nitric Oxide Synthétase (Synthétase d'oxyde Nitrique)
<b>NPC</b>	Pores nucléaire
<b>OCT</b>	Ornithine transcarbamylyase
<b>ORF</b>	Open reading frame (cadre ouvert de lecture)
<b>pb</b>	Paire de base
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (amplification en chaîne par polymérisation)
<b>PDGFR</b>	Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
<b>PEI</b>	Polyéthylène imine
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>pi</b>	Post injection
<b>PI</b>	Particules infectieuses
<b>PLA2</b>	Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PMDLP</b>	Petite maison dans la prairie
<b>polyA</b>	Signal de poly-adénylation

<b>PTM</b>	Modifications post-traductionnelles
<b>QPCR</b>	PCR quantitative
<b>RBE</b>	Rep-binding element (site de fixation de rep)
<b>RI</b>	Regional intravenous (infusion régionale de membre isolé)
<b>RNAPII</b>	ARN polymérase II
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species (radicaux libres oxygénés)
<b>RPE</b>	Retinal pigment epithelium (épithélium pigmenté rétinien)
<b>RQ</b>	Relative quantity (quantité relative)
<b>RSV</b>	Rous sarcoma virus (virus du sarcome de Rous)
<b>RT-QPCR</b>	Reverse transcription QPCR
<b>SAC</b>	Canaux calciques mécano-sensitifs
<b>SAHA</b>	Acide subéryloyl-anilide hydroxamique
<b>SAM</b>	S-adenosyl-méthionine
<b>scAAV</b>	Self complementary AAV (AAV auto-complémentaire)
<b>SCEP</b>	AAV simple brin
<b>SCID-X</b>	Déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X
<b>Set</b>	Su(var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax
<b>shRNA</b>	Small hairpin RNA (petit ARN en épingle à cheveux)
<b>SIN</b>	Self inactivating vector (vecteur auto-inactivant)
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA (petit ARN interférant)
<b>SMA</b>	Spinal muscular atrophy (amyotrophie spinale proximale)
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>snoRNA</b>	Small nucleolar RNA (petit ARN nucléolaire)
<b>snRNA</b>	Small nuclear RNA (petits ARN nucléaires)
<b>SPF</b>	Specific pathogen free
<b>SR</b>	Sous rétinienne
<b>ssAAV</b>	Single stranded AAV (AAV simple brin)
<b>Su5</b>	Satellite5
<b>Su(var)</b>	Variation suppressor (suppresseur de variégation)
<b>SV40</b>	Simian virus 40 (virus simien 40)
<b>TA</b>	Température ambiante
<b>TC-PTP</b>	T-cell protein tyrosine phosphatase
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>TET</b>	Ten-eleven translocation
<b>TF</b>	Facteur de transcription
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alpha (facteur de nécrose tumorale alpha)
<b>trs</b>	Terminal resolution site (site terminal de résolution)
<b>TSA</b>	Trichostatine A
<b>UMR</b>	Unité mixte de recherche
<b>UTR</b>	Untranslated regions
<b>vg</b>	Génome viral
<b>vg/hdg</b>	Génome viraux par copie de génome de la cellule hôte
<b>WPRE</b>	Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional response element
<b>ZFN</b>	Zinc finger nuclease (nucléase à doigts de zinc)

# Avant-propos

---

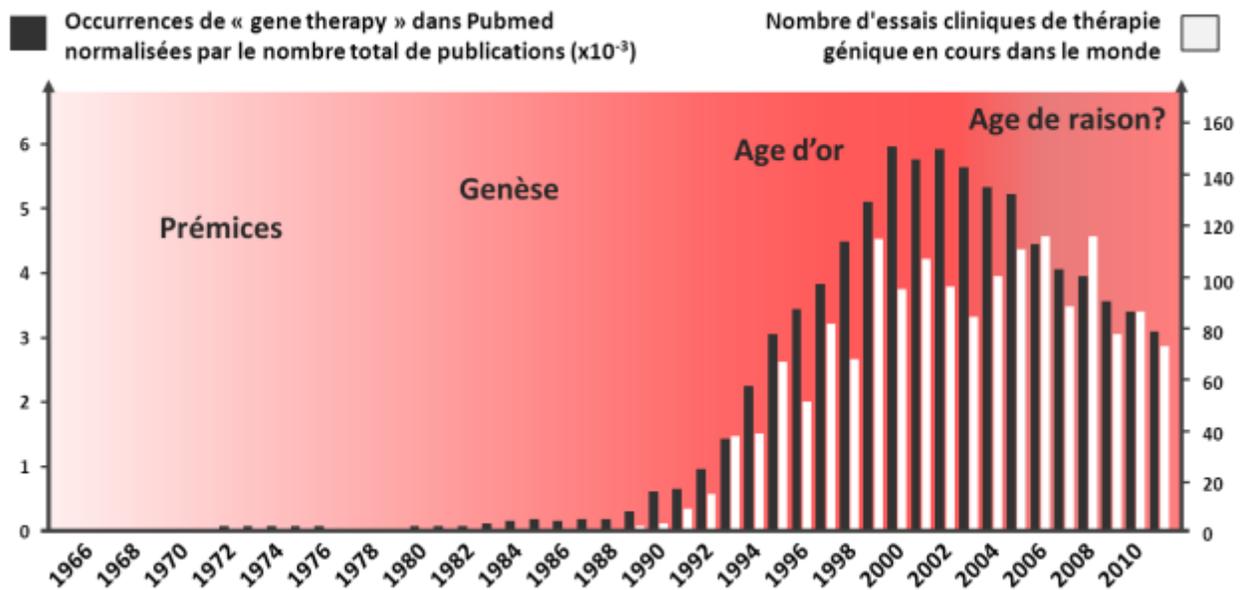
Les virus sont de formidables nanoparticules semi autonomes qui ont développé au cours de plusieurs millions d'années une capacité unique à transférer leur matériel génétique pour pirater à leur avantage la machinerie de leurs cellules cibles. Ils se sont ainsi disséminés à travers tous les règnes du vivant ; des procaryotes les plus simples aux plantes et animaux les plus complexes. Cependant, ce serait une erreur de penser que les virus sont tous des parasites du vivant. Les génomes des mammifères regorgent d'éléments viraux « fossilisés » (dont principalement des retro et des parvovirus) qui loin d'être de la place perdue contribuent à la plasticité du génome, à la défense contre les pathogènes et au développement du placenta ([Katzourakis 2010](#)). Mais je m'éloigne un peu du sujet... La possibilité de détourner ces spécialistes du transfert de matériel génétique pour modifier le génome humain a été évoquée en 1966 par le prix Nobel de médecine Edward Tatum lors d'un symposium international sur la médecine du futur ([Campbell 1966](#)) (**Fig. 1**), soit seulement 13 ans après la découverte de la structure de l'ADN par James Watson, Francis Crick et Rosalind Franklin ([Watson 1953](#)).



**Fig. 1) Photographie d'archive prise lors du symposium sur la médecine du futur à New York en 1966.**

Les intervenants présents sur la photo sont de gauche à droite, Ernst Chain (Nobel Médecine 1945), Sir George Pickering (Doyen de l'université d'Oxford, UK), Edward Tatum (Nobel Médecine 1958), Francis Schmitt (Directeur du département de biologie du MIT) et Sir Macfarlane Burnet (Nobel Médecine 1960)

La première preuve de concept de transfert de gène dans des cellules de mammifère à l'aide d'un vecteur viral dérivé d'un polyomavirus simien (SV40) sera apportée une dizaine d'années plus tard ([Hammer, 1979](#), [Mulligan 1979](#)). Il faudra attendre 1990 pour que la FDA (food and drug administration) autorise le premier essai clinique chez l'homme avec un vecteur rétroviral recombinant pour le traitement d'un déficit en adénosine désaminase ([Blaese 1990](#), [Blaese 1995](#)). Malgré des résultats mitigés et une correction transitoire, cet évènement marque le début d'un engouement considérable de la communauté scientifique pour la thérapie génique. Comme le montre la figure 2 qui représente le nombre d'occurrences du terme « gene therapy » dans Pubmed et le nombre d'essais cliniques en fonction des années, les années 1990 peuvent être considérées comme un véritable « âge d'or » de la discipline. La législation était moins définie qu'actuellement, ce qui a permis à un nombre croissant d'essais cliniques de démarrer rapidement. Malheureusement, entre 1999 et 2002, une série de déconvenues majeures écorcent la crédibilité de cette approche innovante auprès du grand public, des politiques et des scientifiques ([Raper 2003](#), [Hacein-Bey 2003](#)). De nombreux essais cliniques sont suspendus, le nombre de publications relatif qui ne cessait d'augmenter jusque-là amorce alors une décroissance (**Fig. 2**).



**Fig. 2) Occurrences normalisées du terme "gene therapy" dans la base de donnée bibliographique Pubmed et nombres d'essais cliniques de thérapie génique en cours en fonction des années (cc).**

Source: [the Journal of Gene Medicine Clinical Trial site](#)

Après la remise en question indispensable et nécessaire des protocoles de thérapie génique, les 10 dernières années ont amorcé un tournant majeur dans la spécialité. Nous sommes passés de mécanicien en herbe tentant de mettre des rustines dans le génome avec les mains pleines de cambouis, à une position plus prudente d'observateur minutieux s'efforçant d'évaluer et d'atténuer les perturbations de son intervention avant même de penser à soigner « *primum non nocere* ». La compréhension plus fine des interactions entre l'hôte et le virus modifié est en effet capitale pour une approche thérapeutique sécurisée, efficace et durable. Les autorités sanitaires sont d'ailleurs particulièrement demandeuses de ce type d'informations qui bien que plus abondantes à l'heure actuelle présentent toujours de larges zones estampillées *terra incognita*.

Les connaissances actuelles concernant un des vecteurs utilisés en thérapie génique, le vecteur viral adéno-associé recombinant (AAVr), indiquent que la minimisation de la quantité de particules administrées est capitale pour limiter la réponse immunitaire contre le vecteur ([Mingozi 2009](#)), la dissémination dans les tissus germinaux ([Favaro 2009](#), [Favoro 2011](#)) et aussi probablement la fréquence des événements intégratifs ([Donsante 2007](#)). Cela peut paraître un peu contradictoire à l'heure où il est question de produire plus pour injecter plus afin d'observer une restauration fonctionnelle. Une étude récente a mis en évidence le fait que l'infectiosité d'une particule d'AAVr est 50 à 120 fois inférieure à celle d'un virion sauvage ([Zeltner 2010](#)). Il apparaît donc clairement que les vecteurs viraux utilisés actuellement sont encore loin d'être optimisés. Pour éviter de tomber à nouveau dans le piège de la course à l'effet thérapeutique, il semblerait plus judicieux d'augmenter préalablement l'efficacité des vecteurs, tout en développant de nouvelles techniques de production permettant d'obtenir un produit pharmaceutique hautement homogène.

A l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de médicament de thérapie génique disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des maladies génétiques, mais il faut pourtant reconnaître que pas à pas, nous avons fait depuis 50 ans un bon technologique de géant. Ce manuscrit présente ma modeste contribution à la discipline. Elle s'inscrit dans le souci de s'assurer de l'innocuité et de l'efficacité des vecteurs de thérapie génique. Ainsi, ce travail de thèse explore les interactions génome viral recombinant / génome cellulaire et en particulier l'impact de la régulation épigénétique cellulaire *in situ* sur l'efficacité d'expression d'un transgène véhiculé par un vecteur AAVr.



# Introduction générale

---

<b>I.1. La thérapie génique</b> -----	<b>3 -</b>
I.1.1. Vectorisation-----	4 -
I.1.1. Stratégies de thérapie génique pour les maladies génétiques monogéniques-----	8 -
<b>I.2. Le virus adéno-associé et les vecteurs recombinants dérivés</b> -----	<b>13 -</b>
I.2.1. Le virus adéno-associé (AAV)-----	13 -
I.2.1.1. Caractéristiques générales-----	13 -
I.2.1.2. Infection de la cellule cible-----	14 -
I.2.1.3. Réplication et Latence-----	16 -
I.2.2. Les vecteurs AAV recombinants-----	22 -
I.2.2.1. Production des vecteurs-----	22 -
I.2.2.2. Caractéristiques générales-----	24 -
I.2.2.3. Devenir moléculaire des particules virales recombinantes-----	26 -
I.2.2.4. Devenir moléculaire des génomes recombinants-----	30 -
<b>I.3. Application et amélioration des vecteurs AAVr pour la thérapie génique</b> -----	<b>39 -</b>
I.3.1. Balance bénéfique/risque et complications-----	39 -
I.3.2. Expression transitoire et infra-thérapeutique-----	42 -
I.3.3. Amélioration de l'efficacité du transfert de gène à l'aide d'AAVr-----	43 -
I.3.3.1. Optimisation des protocoles d'administration-----	43 -
I.3.3.2. Optimisation des vecteur viraux-----	47 -
I.3.3.3. Combinaison des améliorations-----	54 -

<b>I.4. Chromatine et régulation de la transcription</b>	<b>55</b>
I.4.1. Rôle structurel de la chromatine dans le noyau interphasique	55
I.4.2. Organisation fonctionnelle du noyau interphasique	58
I.4.3. Chromatine et modulation de l'expression des gènes	59
I.4.3.1. La méthylation de l'ADN	60
I.4.3.2. Modifications post traductionnelles des histones (HPTM)	69
I.4.1. Drogues modifiant la structure de la chromatine (CMD)	79
I.4.2. Virus à ADN chromatine et transcription	83
I.4.2.1. Régulations épigénétiques du cycle viral	83
I.4.2.2. Altération de l'épigénome cellulaire par les virus	85
I.4.3. Vecteur de transfert de gène chromatine et transcription	86
<b>I.5. La Dystrophie musculaire de Duchenne</b>	<b>93</b>
I.5.1. Généralités sur les myopathies	93
I.5.2. Caractéristiques de la DMD humaine	94
I.5.3. Modèles murins de la DMD	96
I.5.4. De la recherche fondamentale à la recherche clinique	97
I.5.5. Caractéristiques moléculaires de la DMD	97
I.5.5.1. Rôle mécanique du DAPC	98
I.5.5.2. Rôle du DAPC dans la signalisation et l'homéostasie cellulaire	99
I.5.6. Stabilité du génome et régulations épigénétiques du muscle déficient en dystrophine	105
I.5.6.1. Altérations de la stabilité génomique	105
I.5.6.2. Altérations de la régulation épigénétique	106

## I.1. La thérapie génique

La thérapie génique est une stratégie de médecine moléculaire en plein développement qui a le potentiel de révolutionner la santé humaine au cours du siècle à venir. Par extension, le terme « thérapie génique » désigne le transfert de séquences d'ADN ou d'ARN exogènes à finalité thérapeutique, dans une cellule, un tissu ou un organisme entier. L'amélioration génétique des capacités physiques ou cognitives dans un but non médical n'est pas autorisé chez l'homme ([Oliveira 2011](#), [Friedmann 2010](#), [Solomon 2009](#)) et est formellement interdite par l'agence mondiale antidopage ([WADA 2012 Prohibited List](#)).

Les approches des thérapies génique sont généralement catégorisées en 2 grands types: *ex vivo* et *in vivo*. La première comporte plusieurs étapes : (i) prélèvement des cellules du patient, (ii) transfert du matériel génétique exogène *ex vivo*, (iii) sélection des cellules ayant été transformées et (iv) réimplantation des cellules « corrigées » *in vivo*. La seconde approche se veut plus directe puisqu'elle consiste à administrer le matériel génétique *in vivo* dans l'organisme à traiter. Dans les 2 cas l'acide nucléique peut être administré « nu » mais l'efficacité du transfert de matériel génétique est nettement augmentée grâce à l'utilisation de vecteurs de natures chimique, physique ou virale. Si la thérapie génique de la lignée somatique est largement autorisée et soutenue par les pouvoirs publics, la modification du patrimoine génétique de la lignée germinale humaine pose quant à elle des problèmes éthiques majeurs. Cette approche est unanimement condamnée dans de nombreux pays et par l'UNESCO ([UNESCO - Report on Human Gene Therapy 1994](#)). En France par exemple, la loi de bioéthique du 29 Juillet 1994 relative au respect du corps humain précise que "*Nul ne peut porter atteinte à l'intégrité de l'espèce humaine (...) sans préjudice des recherches tendant à la prévention et au traitement des maladies génétiques, aucune transformation ne peut être apportée aux caractères génétiques dans le but de modifier la descendance de la personne*" ([LOI no 94-653](#)).

La thérapie génique somatique promet d'apporter le remède à un grand nombre de pathologies depuis maintenant plus de 20 ans parmi lesquels, les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies génétiques monogéniques. Après les revers du début du siècle ([Raper 2003](#), [Hacein-Bey 2003](#)), l'heure semble être à nouveau à l'espoir avec la mise sur le marché d'un premier traitement mondial de thérapie génique contre le cancer en Chine ([Peng 2005](#), [Wilson 2005](#)) et plusieurs essais récents cliniques encourageant concernant les maladies

génétiques telles que l'adrénoleucodystrophie liée à l'X ([OMIM#300100](#)) ([Cartier 2009](#)), l'hémophilie de type B ([OMIM#30690](#)) ([Nathwani 2011b](#)), la déficience en adénosine désaminase ([OMIM#102700](#)) ([Gaspar 2011](#)) ou encore l'amaurose congénitale de Leber ([OMIM#204100](#)) ([Bennett 2012](#)).

### **I.1.1. Vectorisation**

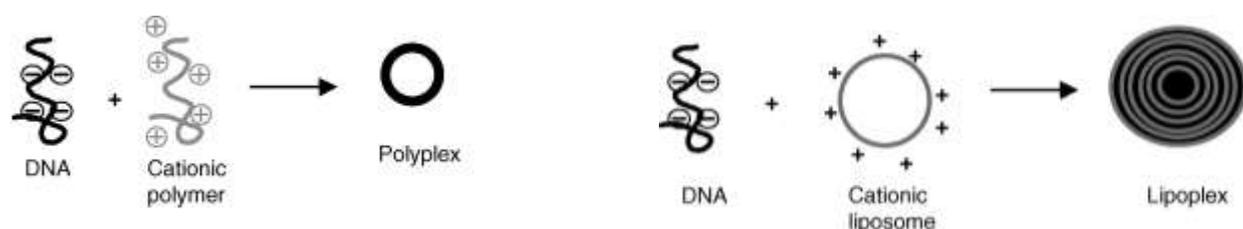
L'efficacité du transfert du matériel génétique est un facteur capital de la réussite d'un traitement par thérapie génique. Dans l'idéal, la séquence d'acide nucléique exogène doit franchir de nombreux obstacles pour arriver intacte dans les noyaux de toutes les cellules cibles. Parmi les barrières les plus évidentes, on peut citer : la paroi des vaisseaux sanguins si le produit est administré par voie intraveineuse (IV), la membrane plasmique cellulaire, le cytoplasme et la membrane nucléaire ([Kaneda 2001](#)). Ainsi, l'administration d'ADN nu sans aucun système de vectorisation est généralement inefficace et transitoire *in vivo* ([Lukacs 2000](#)). Dans le but d'augmenter l'efficacité de transduction, 3 grandes catégories de vecteurs ont été développées: les vecteurs dérivés de virus sauvages, les vecteurs synthétiques et les méthodes de vectorisation physiques.

#### **a. Vectorisation non virale (vecteurs synthétiques et méthodes physiques)**

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses méthodes de vectorisation physique ont été développées pour le transfert de gènes. Ces méthodes visent à faciliter le transfert du matériel génétique exogène depuis le milieu extracellulaire jusqu'au noyau en désorganisant ou en créant des trous dans les membranes biologiques de façon transitoire. Parmi les techniques les plus répandues et applicables *in vivo*, on trouve, l'injection systémique hydrodynamique ([Zhang 2004](#)), l'impact de particules à l'aide d'un gene gun ([Goudy 2008](#)) l'électroporation ([Andre 2008](#)) et la sonoporation à ultrason ([Li 2009](#)). Bien qu'elles soient simples et peu coûteuses, certaines de ces techniques d'altération mécanique sont difficilement envisageables dans des tissus pathologiques déjà fragilisés tel que le muscle de patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Les vecteurs synthétiques sont quant à eux en développement depuis le milieu des années 1980. Il en existe 2 grandes familles, les lipides cationiques tels que la DOPE ([Zhang 2012](#)) et les polymères cationiques tels que le polyéthylénimine (PEI) ([Sun 2010a](#)). Ces molécules ont pour

caractéristique de s’auto-assembler avec les acides nucléiques pour former des complexes moléculaires uni- ou multi-lamellés au sein desquels l’ADN est protégé (**Fig. 3**). En outre, ces complexes appelés lipoplexes et polyplexes participent de façon passive ou active aux transferts à travers les membranes biologiques ([Pichon 2010](#)).



**Fig. 3) Représentation schématique de la formation des lipoplexes et polyplexes.**

Tiré de [Pichon 2010](#)

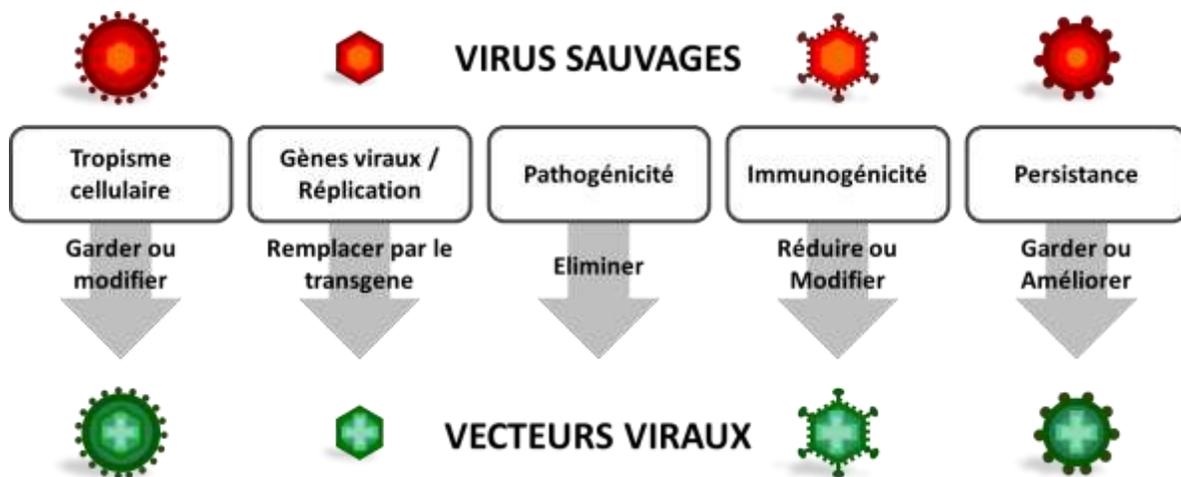
Leur production par synthèse chimique, rend possible l’obtention d’un produit final contrôlé et défini, ce qui est un avantage majeur sur les vecteurs viraux. Leur faible immunogénicité est malheureusement contrebalancée par une toxicité hépatique et pulmonaire qui limite la dose pouvant être administrée ([Yew 2005](#)). Au fil du temps, les systèmes de vectorisation non viraux ont été considérablement améliorés et certains permettent désormais une expression du transgène pendant plusieurs mois après leur administration *in vivo* ([Argyros 2008](#), [Ferrer 2004](#)). Malheureusement, dans la majorité des cas l’expression reste temporaire et de niveau nettement inférieur à ce qui peut être observé avec des vecteurs viraux ([Jiao 1992](#), [Guo 2011](#)). À l’heure actuelle les vecteurs non viraux sont utilisés dans plus de 450 essais cliniques de thérapie génique dont les cibles principales sont les cancers (65%) et les maladies cardiovasculaires (20%) ([The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site](#)). Seuls 4% concernent les maladies génétiques monogéniques qui nécessitent souvent un taux d’expression du gène thérapeutique élevé et à très long terme.

## **b. Vectorisation virale**

Les virus ont des structures complexes et précises, qui ont été adaptées au cours de l’évolution pour transférer de façon très efficace leur matériel génétique dans la cellule cible avec une spécificité pouvant être large ou extrêmement restreinte. L’infection de la cellule hôte permet aux virus de se répliquer et de se multiplier mais s’accompagnent souvent d’effets indésirables pour l’hôte allant d’une simple perturbation transitoire du métabolisme intracellulaire à la mort de

la cellule, voire de l'organisme. Certains virus sont des spécialistes de la persistance à très long terme et peuvent même être présent tout au long de la vie de l'organisme infecté.

Les vecteurs viraux ont été élaborés à partir de certains virus sauvages et exploitent leurs capacités de transfert d'acides nucléiques tout en étant déficients pour la réplication. Pour générer un vecteur viral, il s'agit donc d'identifier les composantes du virus impliquées dans le tropisme, la réplication, la pathogénicité, l'immunogénicité et la persistance et de modifier celles qui conduisent à un effet néfaste en s'efforçant de garder les caractéristiques souhaitables pour l'application envisagée (**Fig. 4**). Les principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique sont dérivés des adénovirus ([Vetrini 2010](#)), des rétro/lentivirus ([Escors 2010](#), [Yi 2011](#)), des virus adéno-associés (AAV) ([Büning 2008](#), [Gonçalves 2005](#)), des poxvirus ([Moroziewicz 2005](#)) ou du virus de l'herpès (HSV1) ([Berto 2005](#), [Manservigi 2005](#)).



**Fig. 4) Modifications nécessaires ou souhaitables pour générer un vecteur viral déficient pour la réplication à partir d'un virus sauvage (cc).**

Adapté de [Bouard 2009](#)

Les vecteurs viraux sont utilisés dans la grande majorité des essais cliniques de thérapie génique en cours (70%). De façon général, ce sont les vecteurs pour lesquels nous avons le plus de recul et qui permettent l'efficacité de transduction la plus élevée. Néanmoins, les reproches couramment adressés aux vecteurs viraux sont une immunotoxicité et une génotoxicité variables en fonction du vecteur considéré. Les caractéristiques ainsi que les avantages et inconvénients des vecteurs viraux et non viraux les plus courants sont indiqués dans le **Tableau 1**. L'AAV et les vecteurs dérivés font quant à eux l'objet d'une revue approfondie dans le chapitre **I.2**.

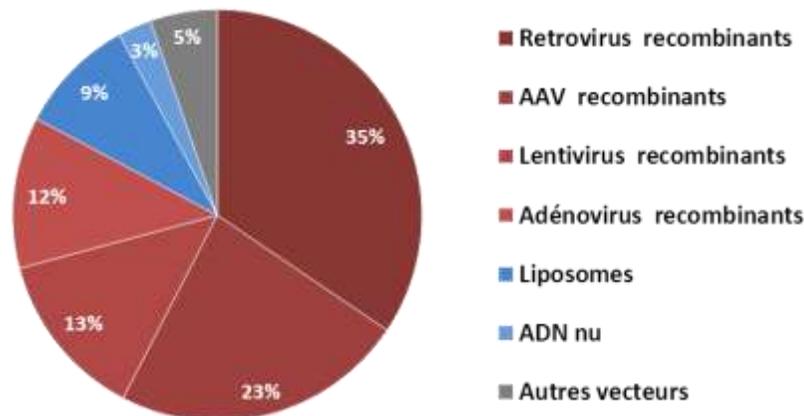
Vecteur	AAV recombinant	Adénovirus recombinant	Rétro/lentivirus recombinant	Herpes virus recombinant	Vectorisation physique	Lipofection
Matériel génétique	ADN simple brin	ADN double brin	ARN simple brin de polarité positive	ADN double brin	Variable ADN ou ARN	Variable ADN ou ARN
Coûts relatifs de production d'une production clinique	+++	+++	+ (si <i>ex vivo</i> )	+++	--	-
Nombre d'essais cliniques en cours (2012)	86 (5%)	415 (23%)	410 (23%)	58 (3%)	333 (19%)	110 (6%)
Application principale dans les essais cliniques (2012)	Maladies monogéniques <i>in vivo</i>	Cancers / Maladies cardiovasculaires <i>in vivo</i>	Cancers / Maladies monogéniques <i>ex vivo</i>	Cancers <i>in vivo</i>	Cancers / Maladies cardiovasculaires	Cancers
Efficacité de transduction	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé	Faible à modéré	Modéré
Stabilité de l'expression	Long terme (tissus quiescents)	Transitoire	Long terme	Transitoire (sauf dans les neurones)	Transitoire au mieux quelques mois	Transitoire au mieux quelques mois
Forme de maintien <i>in vivo</i>	Episomal (mono ou multimérique) et intégration rare	Episomale	Intégré	Episomale	Episomale	Episomale
Tropisme /Spectre de transduction	Large + Nombreux sérotypes spécifiques	Large	Large Efficace dans les cellules immunitaires	Tropisme neuronal	Large	Large / Possibilité de ciblage préférentiel
Transduction des cellules quiescentes	Oui	Oui	Oui (lentivirus)	Neurones	Oui	Oui
Capacité de transfert	4,7 kb	8 kb-30kb	8 kb	Jusqu'à 150kb	Jusqu'à plusieurs dizaines de kb	Jusqu'à plusieurs dizaines de kb
Immunogénicité	Inflammation faible / Réponse humorale et cellulaire modérée à forte	Inflammation forte/ Réponse humorale et cellulaire modérée à forte	Inflammation très faible / Réponse cytotoxique possible	Inflammation forte/ Réponse humorale forte	Inflammation forte contre CpG de l'ADN non méthylés	Inflammation forte contre CpG de l'ADN non méthylés
Génotoxicité	Mise en évidence à très forte dose en néonatal chez la souris	Non documentée	Déjà observée chez l'homme (transactivation de LMO2)	Non documentée	Non documentée	Non documentée
Références	<a href="#">Bessis 2004</a> <a href="#">Gonçalves 2005</a> <a href="#">Donsante 2007</a>	<a href="#">Ehrhardt 2003</a> <a href="#">Bessis 2004</a> <a href="#">Vetrini 2010</a>	<a href="#">Escors 2010</a> <a href="#">Hacein-Bey 2011</a>	<a href="#">Berto 2005</a> <a href="#">Manservigi 2005</a> <a href="#">Broberg 2005</a>	<a href="#">Braun 2004</a> <a href="#">Lui 2005</a>	<a href="#">Yew 2005</a> <a href="#">Guo 2011</a> <a href="#">Pichon 2010</a>

**Tableau 1) Caractéristiques des principaux vecteurs utilisés pour le transfert de gène chez les mammifères.**

Données sur les études clinique d'après [The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site](#).

### I.1.1. Stratégies de thérapie génique pour les maladies génétiques monogéniques

Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ([OMIM #310200](#)), déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (SCID-X) ([OMIM #300400](#)), amaurose congénitale de Leber (LCA) ([OMIM#204100](#)), syndrome de Crigler-Najjar ([OMIM #218800](#)), mucoviscidose ([OMIM #219700](#)), amyotrophie spinale proximale (SMA) ([OMIM#253300](#)), chorée de Huntington ([OMIM #143100](#))... Toutes ces pathologies ont en commun d'être causées par la présence d'une ou plusieurs mutations dans un seul gène, d'être très handicapantes et d'avoir au mieux un traitement lourd en effets secondaires. La plupart sont qualifiées de maladies orphelines du fait de leur faible incidence dans la population générale. En conséquence, elles ont été pendant longtemps délaissées par l'industrie pharmaceutique mais font tout de même l'objet d'une myriade de programmes de thérapie génique souvent portés par des organisations académiques. Dans la plupart des cas, pour traiter efficacement une maladie génétique monogénique il faut s'efforcer d'obtenir un effet durable, si possible toute la vie du patient. Les vecteurs viraux et en particulier les vecteurs rétroviraux et les AAV recombinants ont montré leur supériorité en ce qui concerne l'expression à très long terme *in vivo* ([Ikeda 2009](#), [Kim 2009](#), [Rivera 2005](#), [Nathwani 2011a](#)). Cet avantage décisif des vecteurs viraux explique pourquoi à l'heure actuelle près de 85% des essais cliniques en cours pour le traitement des maladies génétiques monogéniques impliquent des vecteurs viraux (**Fig. 5**)



**Fig. 5) Vecteurs utilisés dans les essais cliniques des maladies génétiques monogéniques en cours (cc).**

Source des données [The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site](#)

Pour traiter les maladies génétiques monogéniques, de nombreuses stratégies ont été envisagées : la compensation du gène déficient soit (a) par une version fonctionnelle de ce même gène soit (b) par un autre gène qui atténue les effets du gène mutant, (c) la modification des ARN messagers issus du gène déficient ou (d) plus récemment la réparation du gène muté par recombinaison.

#### **a. Thérapie génique par complémentation ou remplacement**

Il s'agit de l'approche historique qui consiste à apporter une copie fonctionnelle du gène identifié comme étant déficient dans la pathologie ciblée. Le gène déficient n'est donc pas corrigé, mais coexiste avec une version transgénique qui assure au moins partiellement le rôle de ce dernier. Cette stratégie est relativement simple à mettre en œuvre et est adaptée à la majorité des maladies récessives (DMD, mucoviscidose, LCA). Pour des problématiques de limite de place disponible dans les vecteurs, le gène est souvent administré sous forme de cDNA (ADN complémentaire). Dans le cas des gènes très longs, le cDNA peut être encore raccourci en enlevant certains domaines qui ne sont pas critiques pour la fonction de la protéine ([Rodino-Klapac 2007](#), [Wang 2000](#)). Dans les constructions couramment utilisées, l'expression du transgène est rarement contrôlée par son promoteur endogène, ce qui entraîne souvent une production de la protéine transgénique à des taux non physiologiques. D'autre part ce type d'approche peut être considéré comme une « rustine » plutôt qu'une vraie réparation. Néanmoins, la thérapie génique par complémentation a donné lieu récemment à quelques succès cliniques ([Nathwani 2011b](#), [Bennett 2012](#)).

#### **b. Thérapie génique par compensation**

Cette stratégie consiste à apporter un gène différent de celui qui est déficient pour atténuer les conséquences néfastes provoquées par le défaut génétique primaire. Bien que moins fréquente, cette approche est parfois envisagée quand la thérapie génique par complémentation n'est pas applicable ou manque d'efficacité et que les mécanismes moléculaires de déclenchement ou d'évolution de la pathologie laissent entrevoir un levier pouvant compenser le déficit. Étant donné qu'il s'agit d'agir en aval de la déficience primaire, l'avantage de cette stratégie est de permettre éventuellement d'utiliser le même produit pour corriger différentes maladies génétiques proches mais impliquant des gènes différents. Par exemple pour la DMD et de la bêta-thalassémie il a été montré que le transfert du gène codant respectivement pour la

Follistatine ou l' Erythropoïétine permet de compenser partiellement les perturbations engendrées par l'absence de la dystrophine ou de la  $\beta$ -globine ([Samakoglu 2002](#), [Qiao 2008](#), [Haidet 2008](#), [Bish 2011](#)). Haidet *et al* suggèrent que le transfert de la follistatine pourrait être également bénéfique pour d'autres dystrophies musculaires telles que les myopathies des ceintures.

### **c. Stratégies ARN**

Plutôt que de remplacer le gène déficient impliqué dans une maladie génétique, plusieurs techniques permettent de modifier qualitativement ou quantitativement les ARN messagers issus de ce gène. Elles sont basées sur les principes du saut et d'inclusion d'exon(s) ainsi que de sur l'interférence ARN. Les effecteurs de ces deux techniques sont de courtes séquences d'ARN qui peuvent être apportés par transfert de minigène les exprimant de façon constitutive. Ces stratégies ARN sont attirantes car la taille très réduite de la cassette d'expression de ces petits ARN leur permet de rentrer dans tous les vecteurs viraux.

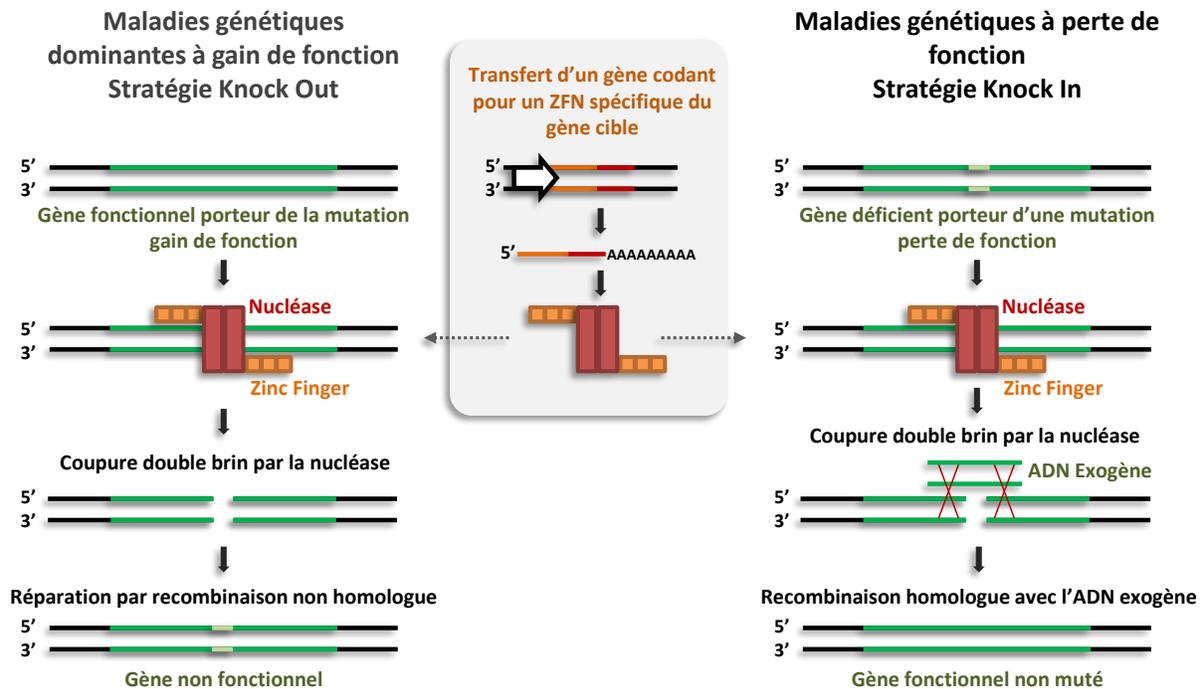
Le principe du saut d'exon est d'exclure les exons porteurs de mutations au moment de l'épissage de l'ARN messenger pour restaurer un cadre de lecture plus court mais permettant la traduction d'une protéine fonctionnelle. Pour se faire, une séquence ARN anti-sens fusionnée à un petit ARN nucléaire modifié (U7snRNA ou U1snRNA) vient masquer les signaux accepteurs d'épissage de l'exon à exclure et ainsi gêner la machinerie d'épissage ([Gorman 1998](#)). La stratégie saut d'exon vectorisée appliquée à la DMD a fait l'objet d'un intense effort de recherche ce qui s'est traduit par des résultats très encourageants ([Goyenvalle 2005](#), [Denti 2006](#)). Une étude multicentrique en cours impliquant le laboratoire montre une restauration de la dystrophine dans plus de 80% des fibres musculaires de chiens déficients en dystrophine traité avec un AAVr exprimant un ARN U7 antisens (communication interne, résultats non publiés). Il est également possible d'augmenter l'inclusion d'un exon qui est sauté lors de l'épissage alors qu'il devrait être inclus dans le messenger. Pour cela, le signal accepteur d'épissage de l'exon suivant est affaibli par la même technique que pour le saut d'exon. Cette stratégie a été évaluée *in vitro* dans un modèle de SMA ([Madocsai 2005](#), [Geib 2009](#)). Le saut et l'inclusion d'exon permettent de restaurer une protéine fonctionnelle (ou partiellement fonctionnelle) tout en conservant la régulation de l'expression du gène endogène. Ces 2 stratégies ne sont cependant pas applicables à toutes les mutations et doivent être mis au point spécifiquement pour chaque exon. Par exemple pour la DMD, seules 65% des mutations peuvent être traitées par saut d'exon ([Van Deutekom 2001](#)).

L'interférence ARN est quant à elle un mécanisme de régulation spécifique de la stabilité des ARNm qui fait intervenir de petits ARN interférant (siRNA) dont le mécanisme a été décrypté en 1998 chez *C.Elegans* par Fire *et al* ([Fire 1998](#)). Chez les mammifères il est possible d'utiliser cette technique pour venir dégrader spécifiquement un transcrite (Knock Down ou KD) soit en apportant directement un siRNA complémentaire de l'ARNm cible, soit en le faisant s'exprimer par un minigène *in situ* sous la forme d'un ARN en épingle à cheveux (shRNA) ([Cullen 2006](#)). Cette approche est particulièrement intéressante pour les maladies génétiques dominantes à gain de fonction, d'autant plus qu'aucune autre stratégie de thérapie génique ne permet de traiter ce type de pathologie. L'approche s'est révélée concluante dans plusieurs modèles de rongeurs de maladies autosomiques dominantes dont l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 ([Haibin Xia 2004](#)), la chorée de Huntington ([Drouet 2009](#)) et la rétinite pigmentaire RP10 ([Tam 2008](#)).

#### **d. Modifications ciblées de gènes par les Zinc finger nucléases (ZFN).**

La découverte des domaines de liaison spécifique à l'ADN de type doigt de zinc (ZF) a permis de développer une technologie adaptée à une intervention ciblée sur le génome. Plusieurs modules ZF reconnaissant chacun spécifiquement 3pb peuvent être assemblés à façon pour reconnaître une séquence donnée ([Desjarlais 1993](#)). En associant une combinaison de ZF à un domaine catalytique nucléase, il est possible d'obtenir une « super enzyme de restriction » ou Zinc finger nucléase (ZFN) ([Kim 1996](#)). Cette technologie permet donc d'introduire une coupure spécifique quasiment n'importe où dans le génome humain. La coupure est ensuite réparée par les mécanismes endogènes de recombinaison non homologue (NHEJ) aboutissant couramment à la présence d'insertions ou de délétions de taille variable ([Bibikova 2002](#)). Cette technique utilisée contre un gène se traduira donc souvent par une disruption du cadre de lecture (Knock Out ou KO) ([Santiago 2008](#)). La présence simultanée d'une séquence ADN exogène en grande quantité favorise l'incorporation de cette dernière au site de coupure (Knock In ou KI) ([Urnov 2005](#)). En théorie, il est donc possible d'appliquer ces technologies aux maladies génétiques soit en provoquant le KO d'un gène anormalement exprimé (maladie génétique dominante à gain de fonction) soit en venant corriger spécifiquement une mutation présente dans un gène déficient par KI (**Fig. 6**). Etant donnée la difficulté à transférer ce type de protéine dans les tissus à corriger *in vivo*, il est possible de faire synthétiser *in situ* les ZFN en incorporant la séquence codante dans un vecteur vira. Ces 5 dernières années, plusieurs travaux ont montré la possibilité d'utiliser des

ZFN administrées sous forme de cDNA vectorisé pour modifier efficacement le génome de cellules en culture ([Ellis 2012](#), [Händel 2011](#), [Perez 2008](#), [Lombardo 2007](#)).



**Fig. 6) Utilisation des ZFN pour le traitement des maladies génétiques à gain ou à perte de fonction (cc).**

Dans les deux stratégies, le ZFN peut être produit *in situ* par transfert de gène. Pour le KI, l'ADN exogène peut être d'origine plasmique, provenir d'un autre vecteur viral ou être présente dans le même vecteur que celui qui code pour le ZFN.

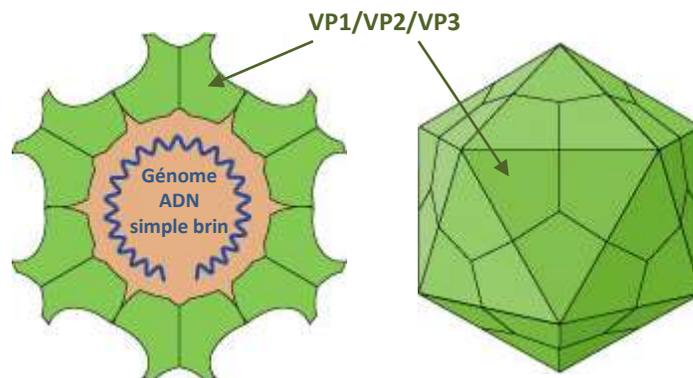
Pour le moment, une seule étude rapporte un effet thérapeutique *in vivo* après administration de 2 AAV, l'un codant pour un ZFN et le second portant une séquence donneuse, dans un modèle murin d'hémophilie B ([Li 2011](#)). Etant donné le potentiel des approches KO/KI pour le traitement des maladies génétiques *in vivo*, il y a fort à parier que cette étude va faire des émules dans les années qui viennent. Ces technologies récentes présentent l'avantage de proposer une vraie correction de la mutation et non pas une « réparation de fortune ». En ce sens, elles peuvent être considérées comme l'idéal à atteindre de la thérapie génique. En outre, dans le cas du KI la régulation endogène du gène corrigé est conservée. Néanmoins, le point critique à l'heure actuelle est l'activité non spécifique des ZFN qui doit être réduite pour éviter d'éventuels effets indésirables ([Cornu 2010](#), [Pattanayak 2011](#)). Dans l'idéal, le ZFN vectorisé devrait s'exprimer de façon transitoire pour éviter d'exacerber cet effet.

## I.2. Le virus adéno-associé et les vecteurs recombinants dérivés

### I.2.1. Le virus adéno-associé

#### I.2.1.1. Caractéristiques générales

Le virus adéno-associé est dépourvu d'enveloppe et possède une capsidie icosaédrique d'environ 20 nm, ce qui fait de lui l'un des plus petits virus connus ([Xie 2002](#)) (**Fig. 7**). Sa petite taille lui impose une optimisation maximale de son génome. Ainsi, avec environ 4700 bases d'ADN simple brin le génome de l'AAV est constitué de deux cadres ouverts de lecture (ORF), *rep* et *cap*, encadrés par deux séquences répétées inversées appelées ITR (inverted terminal repeat). Dans une cellule hôte, le virus est capable de produire 4 protéines impliquées dans son cycle viral (Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40) et 3 protéines de structure qui formeront la capsidie (VP1, VP2 et VP3) (**Fig. 8**). Avec ce matériel génétique restreint, l'AAV doit s'appuyer à la fois sur la machinerie de la cellule hôte et sur l'aide d'autres virus pour se répliquer (Ward 2006 Parvovirus). L'AAV a été isolé en 1965 comme contaminant des préparations d'adénovirus ([Atchison 1965](#)). Sa dépendance vis-à-vis de l'adénovirus pour se répliquer avait déjà été notée, ce qui lui a valu d'être classé dans un nouveau genre ; les [Dependovirus](#) dans la famille [Parvoviridae](#).



**Fig. 7) Représentation schématique de l'AAV de sérotype 2 en coupe et en 3D.**

La capsidie virale de symétrie icoahédrale (T=1) est constituée de 60 protéines VP1, VP2 et VP3 (ratio 1:1:10) et contient un génome ADN simple brin d'environ 4700 pb. Crédit Swiss Institute of Bioinformatics.

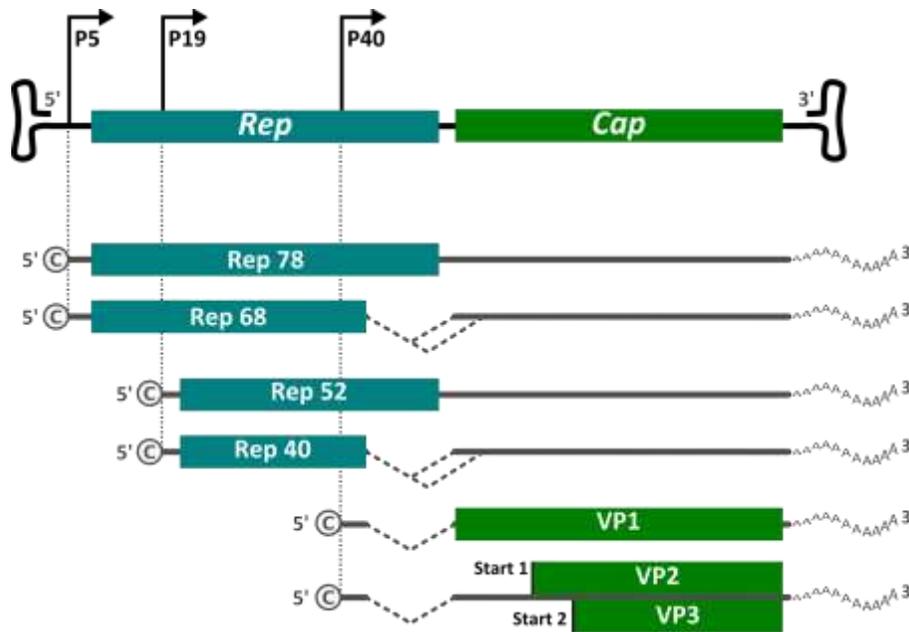


Fig. 8) Cadres ouverts de lecture présents sur le génome de l'AAV 2 et messagers *rep* et *cap* dérivés (cc).

L'AAV est représenté par une douzaine de sérotypes et plus d'une centaine de variants isolés à partir de différents tissus de mammifères ([Gao 2004](#), [Gao 2002](#), [Schmidt 2004](#)). La majorité de la population humaine est séropositive pour le virus adéno-associé notamment pour les sérotypes humains 1 et 2 ([Erles 1999](#), [Halbert 2005](#), [Boutin 2010](#)). Le virus qui se transmet *in utero* et par voie sexuelle ([Burguete 1999](#), [Han 1996](#)) est généralement considéré comme étant non pathogène pour l'homme. Cependant, plusieurs études épidémiologiques suggèrent une possible association entre l'infection par l'AAV et des problèmes au cours de la grossesse (avortement spontané, pré-éclampsie...) ([Arechavaleta-Velasco 2006](#), [Arechavaleta-Velasco 2008](#), [Kiehl 2002](#)), sans pour autant avoir d'effet significatif sur la fertilité ([Schlehofer 2011](#)). Il semblerait par contre qu'il joue un rôle de protection vis-à-vis des cancers du col de l'utérus en inhibant la réplication du papillomavirus humain (HPV) ([Coker 2002](#)).

### I.2.1.2. Infection de la cellule cible

Etant donné la diversité des sérotypes d'AAV, il ne semble pas qu'une voie commune d'infection de la cellule hôte se dégage. Cependant, les travaux concernant cycle viral ont été réalisés principalement avec le sérotype 2. Ce chapitre s'efforce de rassembler les données concernant le virus AAV sauvage, mais il arrive que par manque d'information disponible les données présentées concernent les AAV recombinant, dans ce cas, cela sera clairement indiqué.

### **a. Fixation aux récepteurs membranaires**

Les interactions à la surface des cellules entre récepteurs et virus ont souvent été identifiées à l'aide de vecteurs viraux recombinant (AAVr) ce qui rend les informations concernant les sérotypes d'AAV sauvages assez rares. Le récepteur primaire des AAV de sérotypes 2 et 6 est un protéoglycane à héparane sulfate (HSPG) ([Summerford 1999-1](#), [O'Donnell 2008](#), [Xie 2011](#), [Ng 2010](#)). Plusieurs corécepteurs de l'AAV 2 ont été identifiés parmi lesquels FGFR1 ([Qing 1999](#)), c-Met ([Kashiwakura 2005](#)) et l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  ([Summerford 1999-2](#)) bien que ce dernier partenaire soit un sujet de polémique ([Qiu 1999](#)).

### **b. Internalisation des virions et trafic intracellulaire**

Après attachement, l'internalisation de l'AAV 2 ferait intervenir la dynéine associée à un mécanisme d'endocytose par manteau de clathrine ([Bartlett 2000](#)). Cependant, Douar *et al* suggèrent que les AAV 2 utilisent probablement en parallèle des voies d'entrée indépendantes de la clathrine dans des proportions qui varient en fonction du contexte cellulaire et de la MOI (multiplicité d'infection) ([Douar 2001](#)). Un papier plus récent suggère de façon convaincante que la voie d'internalisation majoritaire du vecteur AAVr 2 est la voie indépendante de la clathrine CLIC/GEEC et que l'endocytose par manteau de clathrine est une voie secondaire facultative ([Nonnenmacher 2011](#)). Après internalisation, l'AAV 2 (sauvage ou recombinant) est retrouvé dans plusieurs compartiments cellulaires dont les endosomes précoces tardifs et de recyclage ([Bartlett 2000](#), [Douar 2001](#)), desquels il s'échappe par lipolyse à l'aide de l'activité Phospholipase A2 portée par la protéine de capsid VP1 ([Stahnke 2011](#), [Girod 2002](#)).

Le trafic intracellulaire de l'AAV a été suivi par une technique de microscopie sur molécule unique et a montré une phase de diffusion libre dans les endosomes puis un mouvement directionnel attribué au déplacement des particules le long du cytosquelette ([Seisenberger 2001](#)). Cependant, ce rapport manque de détails en ce qui concerne la nature de l'AAV, du fluorochrome et de leurs interactions pour être en mesure d'évaluer la pertinence des résultats. Sanlioglu *et al* appuient également cette hypothèse en suggérant un mouvement intracellulaire de l'AAV 2 le long des microfilaments et microtubes ([Sanlioglu 2000](#)). En conclusion, l'étape d'accumulation périnucléaire de l'AAV demeure encore floue à l'heure actuelle, il est possible qu'elle n'implique pas de mécanisme actif ([Bantel-Schaal 2002](#), [Xiao 2002](#)).

En ce qui concerne le transfert du génome de l'AAV dans le noyau, des résultats

contradictoires suggèrent que la décapsidation et la libération de l'ADN se passent soit (i) dans le cytoplasme avec des particules qui stationnent à l'extérieur de la membrane nucléaire (ii) soit au moment de l'entrée dans le noyau par les pores nucléaires (iii) ou dans le noyau, ce qui doit se traduire par la présence de virions intègres dans le nucléoplasme. Xiao *et al* suggèrent pour l'AAV 2 que la décapsidation a lieu avant ou pendant la translocation dans le noyau des cellules HeLa ([Xiao 2002](#)) alors qu'en présence d'Adénovirus, ils observent une importante présence de particules d'AAV intactes dans le noyau. Cette dernière observation serait due à une altération du trafic nucléaire par l'adénovirus. Dans le même modèle cellulaire, une autre étude a montré qu'il est possible de détecter des particules AAV 2 dans le noyau en présence d'Adénovirus et de très forte MOI (1e6 vg/cellule) (vg : génome viraux), mais que la translocation dans le noyau est un phénomène inefficace ([Lux 2005](#)). En outre, aucun génome d'AAV détecté par FISH (hybridation *in situ* à fluorescence) ne co-localise avec des particules virales. En estimant, peut-être à tort, que la sensibilité du FISH anti génome AAV 2 et de l'IF anti capsid est équivalente, les auteurs suggèrent une décapsidation avant ou pendant l'entrée dans le noyau.

### **I.2.1.3. Réplication et Latence**

Après l'entrée dans le noyau de la cellule hôte, l'AAV peut initier sa réplication en cas de co-infection avec un virus auxiliaire (phase lytique), ou entrer en latence dans l'attente d'être réactivé.

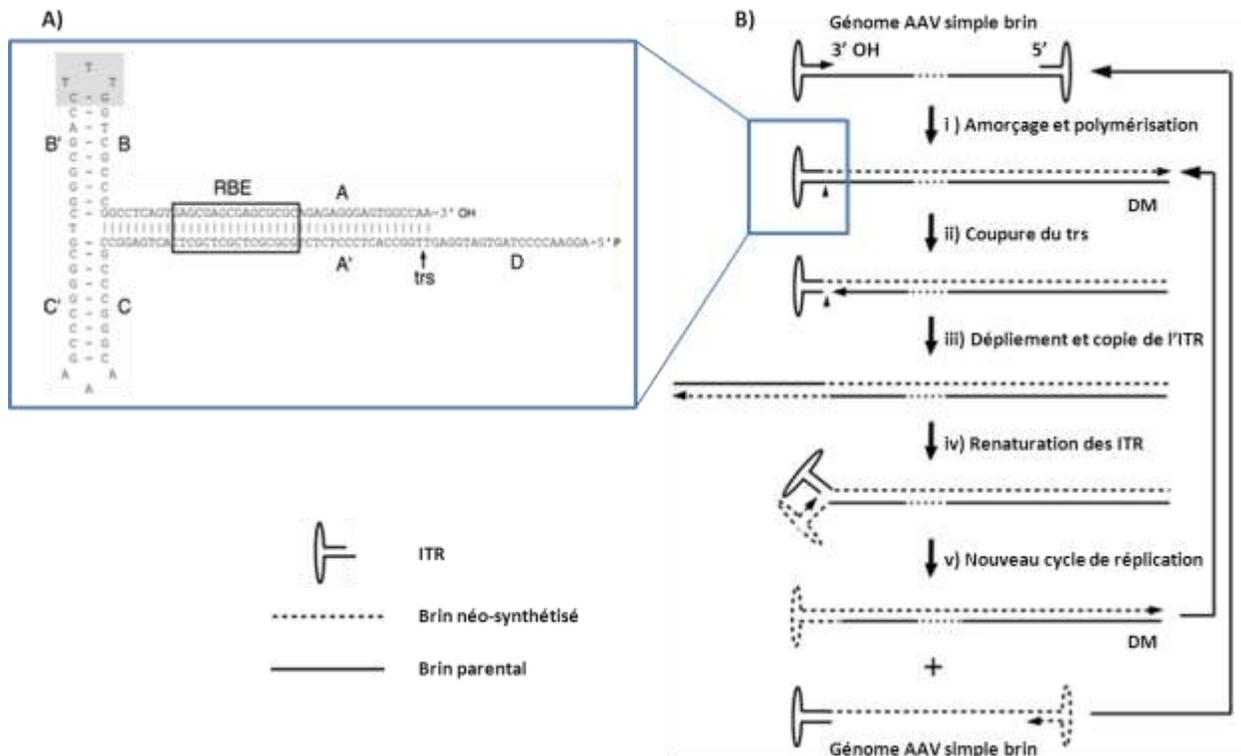
#### **a. Phase réplivative ou lytique**

Dans la quasi-totalité des modèles cellulaires utilisés, l'AAV seul n'est pas en mesure d'initier la transcription de ses propres gènes *rep* et *cap*. Pour cela, il doit donc être stimulé par un ou plusieurs facteurs extérieurs pouvant être de différentes natures. Le premier des facteurs auxiliaires identifié est la co-infection ou la super-infection avec un adénovirus ([Atchison 1965](#)). Par la suite, d'autres virus auxiliaires ont été identifiés parmi lesquels le HSV ([Alazard-Dany 2009](#), [Schlehofer 1986](#), [Robert 1981](#)), le virus de la vaccine ([Schlehofer 1986](#)) ou le HPV ([Walz, 1997](#)). De façon intéressante en l'absence de virus auxiliaires, l'administration de plusieurs composés chimiques carcinogènes ou induisant des dommages sur l'ADN ainsi que l'exposition aux rayons ultraviolets sont également capables d'induire la réplication de l'AAV avant ou après l'infection ([Schlehofer 1986](#), [Yalkinoglu 1988](#)). Il semble tout de même que ces fonctions auxiliaires non virales entraînent une réplication de l'AAV beaucoup moins efficace que ce qui

est observé avec l'adénovirus ([Yakobson 1989](#)). Etant donné la grande variabilité des stimuli qui peuvent induire la réplication de l'AAV, il semblerait que les facteurs auxiliaires agissent plutôt en perturbant l'intégrité cellulaire et particulièrement la stabilité du génome de la cellule hôte. Les protéines de l'adénovirus et du HSV vont certainement un peu plus loin en apportant un soutien à l'AAV non seulement pendant l'activation de la transcription de *rep* et *cap* mais aussi à différentes étapes telles que le trafic intracellulaire ([Xiao 2002](#)) et la réplication ([Fisher 1996](#), [Ward 1998](#), [Alazard-Dany 2009](#)).

L'activation de l'AAV par les facteurs auxiliaires permet l'expression des protéines Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40 impliquées dans le cycle viral du parvovirus. Ces 4 protéines sont codées par le gène *rep* et exprimées à partir des promoteurs p5 et p19 et un signal d'épissage alternatif (**Fig. 8**). Les grandes protéines Rep (Rep78/68) assurent des fonctions de liaison à l'ADN double brin, d'endonucléase et d'hélicase ([Im 1990](#)) et sont indispensables lors de nombreuses étapes du cycle viral telles que la réplication ([Tratschin 1984](#), [Snyder 1990](#)) et la régulation des promoteurs viraux ([Pereira 1997](#), [Hölscher 1995](#)).

Les extrémités terminales (ITR) de l'AAV servent d'origine de réplication au génome viral. Les ITR de l'AAV 2 sont constitués de 145 nucléotides dont 125 sont multi-palindromiques aboutissant à un repliement bidimensionnel caractéristique en forme de T ([Lusby 1980](#)) (**Fig. 9**). Cette structure particulière permet de fournir un site d'initiation de la réplication à la polymérase cellulaire ([Berns 1990](#)). Dans une moindre mesure, il a également été montré que le promoteur p5 a également une activité répliquative en absence des ITR ([François 2005](#)). Lors de la co-infection avec le HSV, il semblerait que l'hélicase/primase et la polymérase virale participent également directement à la réplication du génome de l'AAV ([Alazard-Dany 2009](#), [Slanina 2006](#)). L'ITR contient également la séquence *RBE* (Rep-binding element) qui joue un rôle très important pour la résolution de l'ITR lors de la réplication du génome viral. Le mécanisme d'action implique la fixation de Rep78/68 au niveau du *RBE* puis une coupure simple brin par l'activité endonucléase au niveau du site *trs* (terminal resolution site) et enfin un déroulement de l'ITR par la fonction hélicase ([Im 1990](#), [Berns 1990](#), [Snyder 1990](#)). Le modèle généralement accepté de réplication de l'AAV et de résolution des ITR est présenté ci-après (**Fig. 9**).



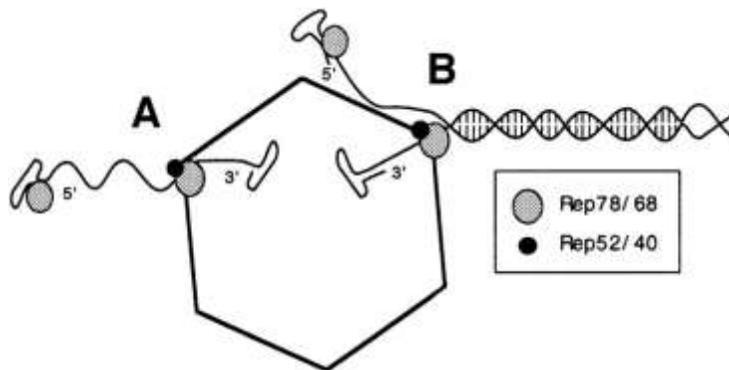
**Fig. 9) Structure secondaire de l'ITR de l'AAV 2 et modèle de réplication du génome de l'AAV.**

**A)** La structure secondaire de l'ITR de l'AAV 2 est composée de deux bras palindromiques (BB' et CC') incorporés dans une tige palindromique plus grande (AA'). En plus de cette région multi palindromique de 125 pb, la répétition terminale comprend 20 bases non appariées appelées séquence D qui reste sous forme simple brin. Après fixation de Rep 78/68 sur la séquence RBE (5'-GNGC-3') leurs activités hélicases et endonucléases permettent un clivage simple brin entre A' et D au niveau du site *trs* (Brister 2000). **B)** (i) La structure secondaire de l'ITR 3' fournit une amorce pour la réplication pour les polymérasés cellulaires. La synthèse du second brin conduit à une structure ADN double brin dont l'une des 2 extrémités est fermée de façon covalente (duplex monomères DM). (ii) Ces structures sont résolues par coupure au niveau du site de résolution terminal *trs*. (iii) L'extrémité 3' OH libre au niveau de la coupure permet aux polymérasés cellulaires à l'aide des fonctions hélicase virales et/ou endogènes de déplier et de recopier la séquence de l'ITR. (iv) Les ITR peuvent désormais se dénaturer (v) ce qui permet d'initier à nouveau la réplication du génome à partir des DM obtenus ou de fournir des génomes simple brin de polarité positive et négative prêts à être encapsidés. Adapté de [Gonçalves 2005](#).

En parallèle, les protéines de structure VP1, VP2 et VP3 sont produites à partir du promoteur p40 du gène *cap* qui est constitué d'un intron avec 2 accepteurs d'épissage et 2 codons d'initiation alternatifs. Un ARN messager long est produit à partir du premier site accepteur d'épissage puis est traduit en VP1. L'ARNm de VP2/VP3, plus court, est issu de l'épissage avec

le second site, puis les protéines VP2 et VP3 sont traduites à partir des 2 codons d'initiation présents dans ce messager (**Fig. 8**) ([Trempe 1988](#)). Les protéines VP s'assemblent seules ou à l'aide de chaperonnes pour former une capsidie icosaédrique composée de 60 sous unités avec pour l'AAV 2 un ratio VP1, VP2 et VP3 de 1:1:10 ([Trempe 1988](#)). Le lieu d'assemblage des capsides dans la cellule n'est pas complètement élucidé, mais la présence du signal de localisation nucléaire semble indispensable pour un assemblage complet des particules, ce qui suggère que l'assemblage final se déroule dans le noyau ([Hoque 1999](#)). Ces conclusions sont appuyées également par Wistuba *et al* qui montre par immunofluorescence (IF) que les capsides intègres sont détectées tout d'abord dans les nucléoles avant de se répartir dans le noyau puis le cytoplasme de la cellule ([Wistuba 1997](#)).

Les petites protéines Rep (Rep52/40) ne semblent pas jouer un rôle dans la transcription mais sont impliquées dans l'accumulation de l'ADN simple brin et son encapsidation ([Chejanovsky 1989](#)). Il a été montré que leur fonction hélicase est nécessaire à l'encapsidation du génome de l'AAV à partir d'une matrice simple brin ou double brin par les pores étroits des capsides préformées ([Bleker 2005](#), [King 2001](#), [Wistuba 1995](#)) (**Fig. 10**). Les génomes de polarité négative et positive sont retrouvés en quantité équivalente dans les capsides virales infectieuses ([Berns 1974](#)). Des mécanismes de terminaison de l'encapsidation et de maturation des particules virales sont envisagés, mais sont peu documentés pour le moment. Néanmoins, Gerlach *et al* montrent que l'encapsidation du génome dans les particules entraîne des changements de conformation de la capsidie qui pourrait être avoir un impact sur l'infectiosité ultérieure des particules ([Gerlach 2011](#)).



**Fig. 10) Modèle d'encapsidation des génomes AAV à l'aide de l'activité hélicase de Rep 52/40.**

Le génome de l'AAV serait intégré dans la capsidie en démarrant de l'extrémité 3' *via* l'activité hélicase des petites Rep qui agiraient comme un moteur moléculaire, (A) soit directement à partir d'une matrice simple brin (B) soit à partir de génomes double brins issus ou en cours de réplication. Tiré de [King 2001](#).

## **b. Phase latente**

En l'absence de stimulation par un facteur auxiliaire, la transcription des gènes de l'AAV est auto-réprimée par Rep78/68 ([Pereira 1997](#)) ce qui entraîne une entrée du génome viral en latence. Trois mécanismes de persistance sous forme latente ont été décrits, l'intégration dans le génome de la cellule infectée site-spécifique, l'intégration non site spécifique et le maintien sous formes extra-chromosomiques ou episomiques.

- **Intégration site-spécifique dans locus AAVS1**

Le site AAVS1 est localisé sur le chromosome 19 humain dans la région 5'UTR (untranslated regions) du gène *MBS85* ([Dutheil 2009](#)). Il porte une séquence *RBE* et un site de coupure *trs* espacés de 8 nucléotides, similaires à la séquence observée dans l'ITR de l'AAV 2 ([Wonderling 1997](#), [Linden 1996](#), [Henckaerts 2009](#)). Le phénomène d'intégration site-spécifique a été suggéré en 1989 par Kotin *et al*, et a été décrit par la suite par plusieurs équipes ([Kotin 1989](#), [Samulski 1991](#), [Linden 1996](#), [Henckaerts 2009](#)). Le mécanisme ferait intervenir une coupure au niveau du *trs* par Rep78/68 ([Young 2000](#)), l'initiation de la synthèse d'un nouveau brin d'ADN cellulaire par déplacement de brèche avec un saut de la polymérase sur le génome de l'AAV, puis un second saut sur le génome cellulaire ([Henckaerts 2009](#)). Il a également été proposé que l'intégration site spécifique fasse intervenir des protéines impliquées dans la recombinaison non homologue ([Daya 2009](#)). Les études supportant ce modèle ont été réalisées à partir de lignées cellulaires infectées et sélectionnées à l'aide de gènes de résistance, ce qui permet difficilement d'extrapoler les conclusions *in vivo*.

- **Intégration non site-spécifique**

Deux études récentes suggèrent que l'intégration de l'AAV 2 au niveau du site AAVS1 n'est pas un phénomène majoritaire et que l'intégration pourrait être en partie aléatoire ([Hüser 2007](#), [Drew 2010](#)). Dans des lignées cellulaires infectées par l'AAV 2 sans système de sélection, les 2 études décrivent des événements intégratifs disséminés dans le génome avec une préférence pour les sites *RBE/trs* like et les gènes actifs du génome humain. Le phénomène d'intégration préférentielle dans les sites *RBE/trs* like n'est plus observé en l'absence de l'expression de *rep* (i.e. comme c'est le cas pour les vecteurs AAVr). Il est donc probable que le mécanisme d'intégration tel que décrit au niveau du site l'AAVS1 se produise, mais avec une spécificité

considérablement réduite. En parallèle, il est envisageable que d'autres mécanismes permettent une intégration purement non spécifique, comme par exemple un mécanisme de recombinaison non homologue dans des cassures chromosomiques déjà existantes, comme cela a été évoqué pour les vecteurs AAV recombinant ([Miller 2002](#)).

- **Persistance extra-chromosomique (épisomale)**

La persistance du génome de l'AAV sauvage sous forme non intégrée est très peu documentée. Les techniques utilisées pour analyser les formes persistantes d'AAV ne permettent pas dans leur grande majorité de détecter les épisomes, soit parce qu'elles sont focalisées sur les événements d'intégration (Linear Amplification-Mediated ou Linker Mediated-PCR), soit parce que les épisomes sont probablement perdus lors de la division des cellules dans lesquelles l'AAV est en latence. La persistance extra chromosomique des vecteurs AAVr est par contre largement documentée et sera abordée en détail dans la section **I.2.2.4.b** ([Duan 1999](#), [Vincent-Lacaze 1999](#), [Penaud Budloo 2008](#)). En 2005, une étude n'a pu mettre en évidence qu'un seul événement intégratif dans le chromosome 1 à partir de différents tissus humains dans lequel le génome de l'AAV était en latence ([Schnepp 2005](#)). Les auteurs ont par contre détecté des formes circulaires extra-chromosomiques dans la totalité des prélèvements d'amygdales et de végétations. La généralisation des conclusions à tous les tissus humains est néanmoins difficile à faire quand on sait que ces tissus sont hyper inflammés au moment de leur retrait et qu'une interaction avec le cycle viral de l'AAV n'est pas exclue.

En conclusion, les génomes AAV latents coexistent probablement *in vivo* à la fois sous formes intégrées dans les sites *RBE/trs* like et épisomiques. Pour le moment, il est impossible de donner des proportions relatives de chacune des populations, d'autant plus que le sérotype d'AAV, le contexte cellulaire et tissulaire ainsi que le temps post infection ( $\pi$ ) compliquent très certainement l'équation.

L'AAV peut sortir de la phase lysogénique et entrer en phase répllicative suite à son activation par les facteurs auxiliaires énoncés précédemment. Cette transition est appelée « rescue » et consiste en l'activation et l'excision du génome viral. Le mécanisme n'est pas encore élucidé mais 2 hypothèses principales ont été avancées : (i) la renaturation des ITR au sein du double brin d'ADN en structure de Holliday puis leur résolution par Rep78/68 ou par des

protéines cellulaires, qui aboutit à l'excision physique de l'ADN viral ([Wang 1996](#)) ou (ii) la coupure au niveau d'un *trs* puis la réplication du génome de l'AAV par déplacement de brèche ([Ward 2003](#)). Les 2 mécanismes aboutissent à la génération d'un génome AAV « libre » qui peut initier sa réplication en masse comme détaillé précédemment.

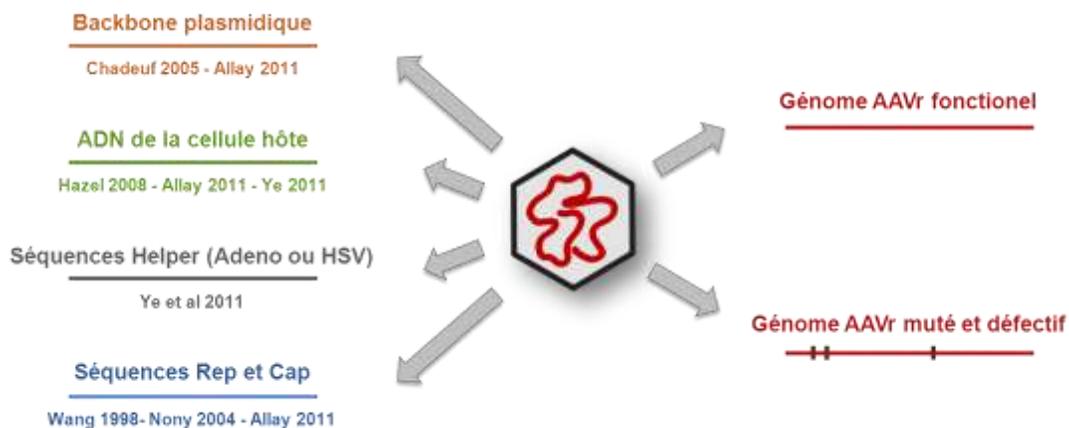
## **I.2.2. Les vecteurs AAV recombinants**

### **I.2.2.1. Production des vecteurs**

La première génération de vecteurs dérivés des virus adéno-associés recombinants (AAVr) a été décrite simultanément par 2 équipes en 1984 ([Hermonat 1984](#), [Tratschin 1984](#)). Un gène rapporteur (respectivement chloramphénicol acetyl-transférase et résistance à la néomycine) avait été inséré dans le génome de l'AAV préalablement cloné dans un plasmide. Il est intéressant de noter que le génome viral modifié contenait le transgène mais conservait une grande partie de son information (promoteurs p5, p19 et p40, gènes *rep* ou *cap*). Les auteurs ont tiré profit de la capacité d'excision du génome de l'AAV en présence de Rep 78/68 et d'un facteur auxiliaire pour induire la réplication du génome viral recombinant ([Wang 1996](#), [Ward 2003](#)). Dans les 2 études, pour produire les vecteurs recombinants des cellules de production ont été transfectées avec le plasmide portant le génome de l'AAVr et infectées par les virus sauvages AAV 2 et Adénovirus. Après une purification rudimentaire, la mixture virale a permis un transfert du transgène *in vitro* dans des cellules de mammifères. La preuve de concept était donnée ! Plus tard, il a été montré qu'il est possible de ne conserver que les extrémités ITR de l'AAV - indispensables pour la réplication et l'encapsidation dans la cellule d'emballage - et de remplacer l'intégralité du génome viral par une cassette d'expression ([Samulski 1989](#)). A l'heure actuelle la méthode de production des vecteurs AAVr la plus employée dans les laboratoires de recherche consiste à transfecter des cellules mammifères avec 2 ou 3 plasmides contenant les gènes *rep* et *cap*, les fonctions auxiliaires et la cassette d'expression du transgène flanquée des ITR ([Matsushita 1998](#), [Xiao 1998](#), [Salveti 1998](#)). Cette technique présente l'intérêt de ne faire intervenir aucun virus, mais elle permet difficilement d'augmenter l'échelle de production, prérequis indispensable pour une application clinique. Au fil des années, 3 autres systèmes de production ont été développés : (i) l'infection de cellules d'insectes SF9 par un ou plusieurs baculovirus recombinants portant les fonctions *rep/cap*, auxiliaires et le génome vecteur

([Urabe 2002](#)), (ii) l'infection de cellules de mammifères par un ou plusieurs virus HSV recombinants ([Kang 2009](#)) et (iii) l'utilisation de lignées de cellules de mammifère ayant intégrées un ou plusieurs éléments nécessaires à la production et éventuellement activés par infection avec un virus auxiliaire sauvage (HSV1 ou Ad5) ([Clark 1995](#), [Gao 1998](#), [Toublanc 2004](#)).

Au cours de la production, les capsides d'AAVr peuvent internaliser des fragments d'ADN contaminants ne correspondant pas au génome de l'AAV appelées séquences illégitimes (**Fig. 11**). On peut citer par exemple les gènes de résistance aux antibiotiques présents dans les plasmides utilisés pour la production des vecteurs qui sont retrouvés dans les virions purifiés et également *in situ* après transfert de gène chez le gros animal ([Chadeuf 2005](#), [Allay 2011](#)). Il est également possible de détecter des particules compétentes pour la réplication ayant intégré les gènes *rep* et *cap*, bien que ces derniers soient apportés sans ITR et en *trans* ([Wang 1998](#), [Nony 2004](#), [Lu 2011](#), [Allay 2011](#), [Ye 2011](#)). D'autre part, des fragments d'ADN cellulaire ([Hazel 2008](#), [Ye 2011](#), [Allay 2011](#)) et des séquences auxiliaires de l'adénovirus ou de l'HSV ([Ye 2011](#)) peuvent également être détectés par PCR (polymerase chain reaction) à l'intérieur ou associés à des particules d'AAVr. Les quantités relatives de chacun des contaminants et des particules ayant un génome intègre ne sont pas connues précisément, mais on estime par exemple que pour une production par transfection, les séquences procaryotes et les particules *rep/cap* positives représentent respectivement 1 à 10% et 0,001 à 0,1% des séquences totales ([Chadeuf 2005](#), [Allay 2011](#), [Ye 2011](#)). Du point de vue de l'ADN encapsidé, une production d'AAV est donc un produit relativement hétérogène, avec très certainement une grande variabilité entre les différents systèmes de production.



**Fig. 11)** Contaminants ADN observés et attendus dans des particules d'AAVr purifiées (cc).

### **I.2.2.2. Caractéristiques générales**

Historiquement, L'AAVr de sérotype 2 a été le premier vecteur dérivé de l'AAV étudié. L'identification de nouveaux sérotypes d'AAV ([Gao 2004](#)) et leur caractérisation a montré un tropisme tissulaire pouvant être très variable d'un sérotype à l'autre. Cette capacité de reconnaissance variée présente un réel intérêt en thérapie génique, puisqu'elle permet de cibler préférentiellement un tissu ou au contraire d'élargir la transduction à un maximum d'entre eux. Dans ce but, des vecteurs AAVr ont été générés à partir des variants sérologiques naturels ou artificiel de l'AAV. Le gène *cap* d'un sérotype X donné est transféré dans les cellules de production généralement accompagné du gène *rep* de l'AAV 2 pour produire des vecteurs recombinants « chimériques » AAV 2/X ([Rabinowitz 2002](#), [Hildinger 2011](#)) (Cf. **I.3.3.2.a**).

Les vecteurs AAVr présentent de nombreux avantages en tant que vecteur de transfert de gène *in vivo*. En comparaison avec les autres vecteurs viraux utilisés, leur potentiel inflammatoire est plus faible ([Zaiss 2002](#)). Ils sont capables de pénétrer dans le noyau des cellules quiescentes et de transduire efficacement un grand nombre de tissus dont les muscles squelettiques ([Qiao 2011](#)) et cardiaques ([Bish 2011](#)), le foie ([Sands 2011](#)), la rétine ([Stieger 2011](#)) et le système nerveux central (SNC) ([Bockstael 2011](#)). D'autre part, de nombreuses études ont montré qu'après une seule injection, les vecteurs AAVr peuvent aboutir à un bénéfice thérapeutique persistant à long terme (plusieurs années) chez la souris ([Mochizuki 2004](#), [Lebherz 2004](#)), le chien ([Le Meur 2007](#), [Sabatino 2011](#)) et le primate non humain ([Rivera 2005](#), [Stieger 2006](#), [Hadaczek 2010](#), [Nathwani 2011a](#)). Néanmoins, les vecteurs AAV recombinants possèdent comme tous les vecteurs de thérapie génique des inconvénients et des limites. Leur talon d'Achille est très certainement leur capacité d'encapsidation maximale d'environ 5kb qui borne leur utilisation au transfert de gènes de petites tailles. D'autre part, la ré-administration d'un même sérotype de d'AAVr *in vivo* est limitée dans la plupart des cas par l'apparition de facteurs neutralisants anti-capside ([Boutin 2010](#)). Il a été montré également que l'AAV recombinant est capable de s'intégrer à une faible fréquence dans le génome de la cellule hôte *in vivo* ([Li 2011](#), [Nowrouzi 2012](#)), ce qui soulève la question de la mutagenèse insertionnelle pour les fortes doses de vecteur. La caractérisation de l'interaction moléculaire entre l'hôte et le vecteur recombinant après administration *in vivo* est donc cruciale pour une utilisation raisonnée et efficace de ces vecteurs prometteurs.



## II) Internalisation par endocytose

- A) Manteau de clathrine
- B) Macropinocytose
- C) Transporteur CLIC/GEEC
- D) (Cavéosome)

## I) Fixation aux récepteurs membranaires

### Récepteurs primaires

HSPG : AAVr 2,3  
 Acide Sialique : AAVr 1,4,5,6  
 Galactoside : AAVr 9  
 Ganglioside : bAAV

### Co-récepteurs

FGFR1 : AAVr 2,3  
 HGFR : AAVr 2,3  
 EGFR : AAVr 6  
 PDGFR : AAVr 5  
 LamR : AAVr 2,3,8,9

## III) Trafic intracellulaire

- E) Endosome précoce pH = 6
- F) Endosome tardif pH = 5,5
- G) Endosome de recyclage périnucléaire pH = 6,5
- H) Appareil de Golgi = 6,5
- I) Lysosome < 4,8
- J) Protéasome

## IV) Entrée dans le noyau et decapsidation

- K) Entrée de la particule intégrée par les NPC et decapsidation
- K') Translocation des particules indépendante des NPC
- K'') Libération du génome sans désassemblage des particules
- L) Libération du génome pendant la translocation nucléaire
- M) Decapsidation extra nucléaire et transfert du génome dans le noyau

## V) Conversion du génome simple brin en double brin

- N) Hybridation des brins complémentaires
- O) Synthèse du second brin par les polymérase cellulaires

## VI) Formes de persistance du génome de l'AAV

- P) Monomères circulaires
- Q) Concatémères de haut poids moléculaire (x8 à x10)
- R) Génomes intégrés mono ou multimériques
- S) Association avec des histones cellulaires

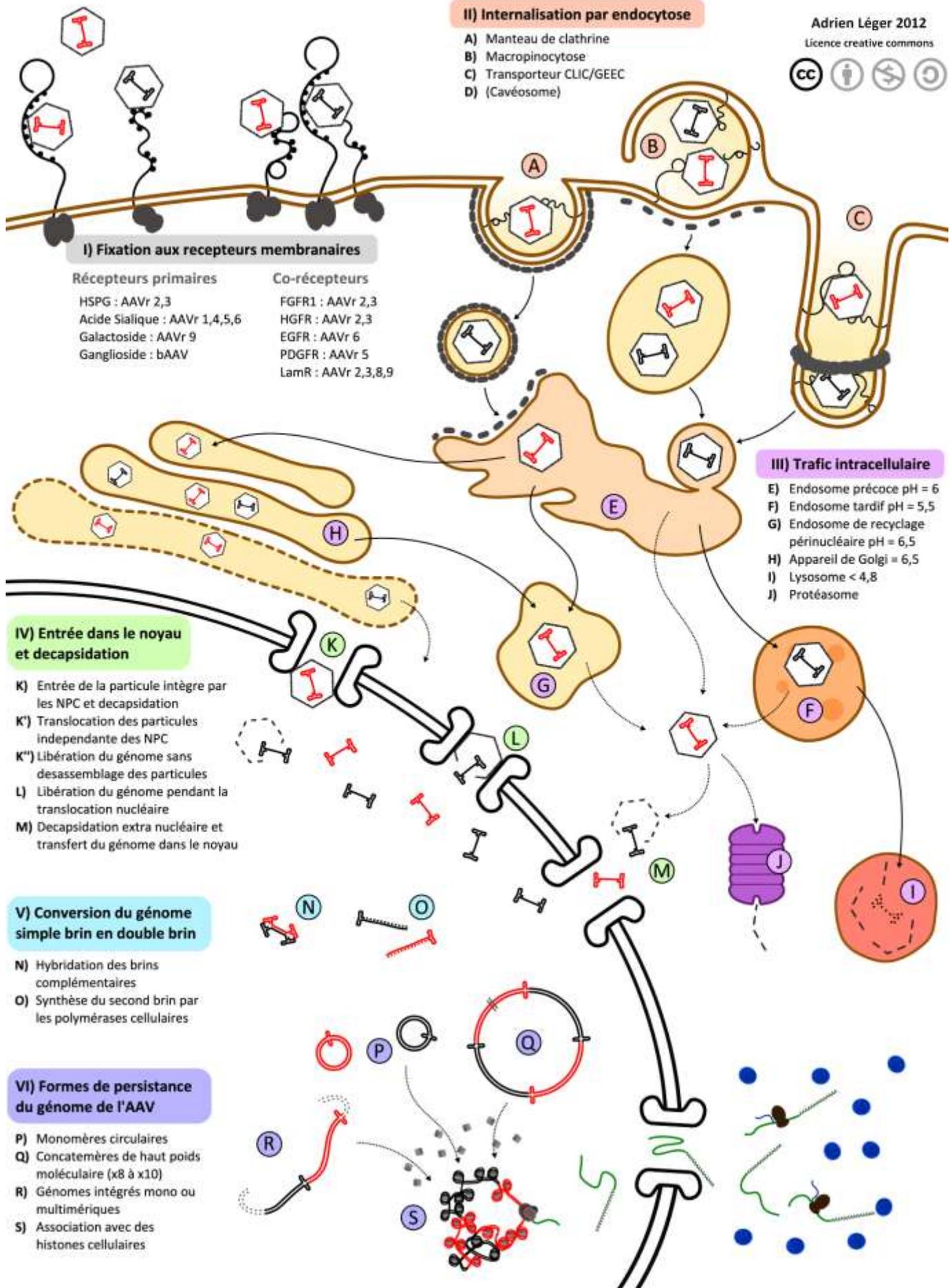


Fig. 12) Schéma récapitulatif des étapes de transduction par un vecteur AAVr (cc).

### **I.2.2.3. Devenir moléculaire des particules virales recombinantes**

Pour délivrer de façon efficace son génome dans le noyau de la cellule cible, le vecteur AAV doit (i) reconnaître ses cellules cibles et s'y fixer *via* des récepteurs de surface, (ii) être internalisé dans la cellule, (iii) s'échapper des endosomes et se diriger vers le noyau, (iv) franchir la membrane nucléaire ou au minimum libérer le génome en région périnucléaire. Ce chapitre propose de présenter l'état des connaissances concernant le devenir moléculaire des vecteurs AAV recombinants, en s'efforçant de mettre en avant les points encore obscurs.

#### **a. Fixation aux récepteurs membranaires**

Bien que les récepteurs cellulaires des différents AAV recombinants aient été largement documentés *in vitro* ou plus rarement *in vivo*, de nouveaux corécepteurs sont régulièrement découverts. Ainsi, il a été montré que les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) sont les récepteurs primaires des vecteurs AAV de sérotype 2 et 6, comme c'était déjà le cas pour les sérotypes sauvages ([Shi 2003](#), [Wu 2006-1](#)). Il a été montré que l'AAVr 3 reconnaît également les HSPG ([Blackburn 2006](#), [Lerch 2011](#)). Les récepteurs primaires des autres sérotypes d'AAV semblent également être des protéoglycanes conjugués avec différents sucres :  $\alpha$ 2,3 N-sialilé pour les AAVr 1, 5 et 6 ([Kaludov 2001](#), [Seiler 2005](#), [Wu 2006-2](#), [Ng 2010](#)),  $\alpha$ 2,3 O-sialilé pour l'AAVr 4 ([Kaludov 2001](#)),  $\beta$ 1,3 N-Galactosylé pour l'AAV 9 ([Shen 2011](#)) et le Ganglioside GM1 pour le bAAV ([Schmidt 2006](#)). Pour le moment aucun récepteur primaire n'est identifié pour les sérotypes 7 et 8. L'association avec un ou plusieurs co-récepteurs semble être indispensable pour initier l'internalisation de nombreux virus par endocytose. En ce qui concerne l'AAVr de nombreux co-récepteurs protéiques ont été décrits parmi lesquels : les récepteurs des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR) et des hépatocytes (HGFR) pour les sérotypes AAVr 2 et 3 ([Qing 1999](#), [Kashiwakura 2005](#), [Blackburn 2006](#), [Ling 2010](#)), le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) pour l'AAVr 5 ([Di Pasquale 2003](#)), les récepteurs des facteurs de croissance épidermique (EGFR) pour l'AAV 6 ([Weller 2010](#)), et le récepteur de la laminine (LamR) pour les sérotypes 2, 3, 8 et 9 ([Akache 2006](#)) (**Fig. 12**).

#### **b. Internalisation par endocytose**

L'internalisation par endocytose de l'AAVr 2 a été décrite comme étant rapide (< 1h) *in vitro* et a longtemps été considérée comme non limitante ([Bartlett 2000](#)). Une étude récente

réalisée *in vivo* dans le muscle squelettique de souris remet en cause cette affirmation. Les auteurs montrent une accumulation massive d'AAV 2 dans l'espace péri- et endomysiale pendant plus de 4 heures après administration par injection intramusculaire d'une dose raisonnable ( $2 \times 10^9$  vg) bien que les récepteurs et corécepteurs de l'AAV 2 soient présents à la surface des cellules musculaire ([Xiao 2012](#)).

Pour entrer dans les cellules, les virus exploitent certaines des nombreuses voies d'internalisation de composés extracellulaires telles que l'endocytose par manteau de clathrine (reovirus, poliovirus, adénovirus, parvovirus canin), la macropinocytose (virus de la vaccine, Adénovirus 3, HSV1), l'endocytose par la cavéoline (SV40, certains picornavirus) ou encore l'utilisation de la voie indépendante de la clathrine CLIC/GEEC (Clathrin independent carrier / Glycosyl-phosphatidyl-inositol enriched endocytosis compartment) récemment caractérisées (certains echovirus) ([Manjula 2009](#), [Mercer 2009](#)).

En ce qui concerne l'AAVr, il a été montré une dizaine d'année auparavant que la dynamine joue un rôle déterminant dans l'endocytose du vecteur de sérotype 2 ([Duan 1999](#), [Bartlett 2000](#)). De ce fait, les auteurs ont suggéré que l'endocytose par manteau de clathrine était certainement la voie d'entrée majoritaire du vecteur. Cette observation a été soutenue par le fait que d'autres parvovirus semblent également utiliser cette voie ([Parker 2000](#)). Cependant, on sait maintenant que la dynamine est également impliquée dans l'endocytose par la cavéoline et dans une moindre mesure dans la macropinocytose. L'AAVr 5 qui utilise des récepteurs différents de l'AAVr 2 semble être capable de pénétrer dans la cellule par la voie dépendante de la clathrine mais également par l'intermédiaire de cavéoles comme cela a été montré par microscopie électronique ([Bantel-Schaal 2008](#)). Une autre étude a montré que l'inhibition de Rac 1 par des agents pharmacologiques aboutit à un défaut d'internalisation des virions recombinants de sérotypes 2 ([Sanlioglu 2000](#)). Or, Rac 1 est un acteur de premier plan de la macropinocytose, ce qui laisse penser que ce mécanisme d'entrée serait une voie d'entrée importante de l'AAVr 2. Une étude publiée récemment prend à contrepied tous les précédents travaux en montrant des résultats convaincants et très complets qui indique que l'entrée des vecteurs AAVr 2 n'est dépendante, ni de l'endocytose par manteau de clathrine, ni de la cavéoline, ni de pinocytose ([Nonnenmacher 2011](#)). Leurs résultats suggèrent que les particules entrent de façon majoritaire par la voie d'entrée non conventionnelle CLIC/GEEC et que les autres voies présentent des alternatives moins efficaces, mais non exclues (**Fig. 12**). Très récemment, des travaux ont

également décrit une voie d'entrée indépendante de la clathrine (sans préciser laquelle) pour des sérotypes ne reconnaissant pas le récepteur HSPG, mais pas pour l'AAVr 2 ([Uhrig 2012](#)).

### c. Trafic intracellulaire

De nombreux travaux décrivent l'association des vecteurs AAV avec différents compartiments du système endosomal, parmi lesquels les endosomes précoces et tardifs ([Douar 2005](#), [Bartlett 2000](#), [Hansen 2001](#)), les endosomes de recyclage perinucléaires ([Ding 2006](#)), l'appareil de Golgi ([Johnson 2010](#)) et les lysosomes ([Hansen 2001](#)) ((**Fig. 12**). Le passage dans les différents compartiments endosomaux semble être indispensable pour la maturation des virions. En effet, après micro-injection de particules d'AAVr 2 directement dans le cytoplasme de cellules HeLa, les virions ne s'accumulent pas dans le noyau et la transduction est inefficace ([Ding 2005](#)). D'autre part, l'utilisation de molécules empêchant l'acidification des endosomes telle que le chlorure d'ammonium et la bafilomycine A<sub>1</sub>, aboutit à une diminution importante de l'efficacité de transduction ([Douar 2005](#)). De nombreux virus non enveloppés (adénovirus, parvovirus canin et HPV) subissent un changement de conformation à pH acide nécessaire pour l'échappement du système endosomal ([Kämper 2006](#), [Suikkanen 2003](#)). Dans le cas de l'AAVr l'acidification du milieu entraîne la libération à la surface de la capsid, du domaine phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) portée par l'extrémité N terminale de VP1 ainsi que des signaux de localisation nucléaire (NLS) portés par VP1 et VP2 ([Nam 2011](#), [Johnson 2010](#)). Stahnke *et al* ont montré qu'un AAV 2 recombinant produit à partir d'un gène *cap* mutant pour le domaine PLA<sub>2</sub> reste bloqué dans les endosomes ([Stahnke 2011](#)). Il semble donc que par homologie avec les parvovirus CPV (parvovirus canin) et MVM (virus minute murin) ([Farr 2005](#), [Suikkanen 2003](#)) le domaine PLA<sub>2</sub> de l'AAV permet la formation de pores dans la membrane de compartiments endosomaux et l'échappement dans le cytoplasme de la cellule. Un pH acide semble donc indispensable pour une activation des virions, ce qui serait en accord avec un échappement à partir des endosomes tardifs (pH 5,5) comme suggéré par Douar *et al* ([Douar 2005](#)). Cependant, la dose totale administrée, le sérotype d'AAV et le type cellulaire utilisé modifient très certainement quantitativement et qualitativement la voie endosomale utilisée. Par exemple, à faible dose, l'AAVr 2 est retrouvé de préférence dans les endosomes tardifs alors qu'à dose élevée, c'est dans les endosomes de recyclage que sont observés la majorité des particules ([Ding 2006](#)). D'autre part, dans les cellules 293, les virions co-fractionnent avec les endosomes précoces, tardifs et les lysosomes, alors que dans la lignée fibroblastique murine NIH-3T3 les

virions sont retrouvés en grande majorité dans les endosomes précoces ([Hansen 2001](#)). Les différentes possibilités de trafic intra et d'échappement endosomal sont récapitulées dans la **Fig. 12**.

Après échappement des endosomes, les virions s'accumulent en région perinucléaire en quelques heures, mais le moyen par lequel les particules sont acheminées vers le noyau n'est pas clairement élucidé. Certains groupes défendent un mécanisme de transport actif rétrograde le long du cytosquelette ([Zhao 2006](#)) mais ces observations sont contredites par d'autres travaux qui montrent que l'efficacité de transduction de l'AAVr 2 n'est affectée ni par la disruption complète des microtubules du cytosquelette, ni par l'inhibition de la dynéine ([Hirosue 2007](#)). D'autre part, les signaux NLS portés par VP1 et VP2 semblent jouer un rôle important dans l'adressage au noyau. L'introduction de mutations dans ces séquences entraîne une localisation plus diffuse dans le cytoplasme sans accumulation perinucléaire, ([Johnson 2010](#), [Grieger 2007](#)) ce qui plaide également en faveur d'un mécanisme de transport actif, bien que pas nécessairement en lien avec le cytosquelette. Enfin, il a été montré qu'au cours du trafic intra-cytoplasmique, les capsides des AAVr de sérotypes 2 et 5 peuvent être ubiquitinylés *in vivo* ([Yan 2002](#)) et que l'utilisation d'inhibiteur d'ubiquitine ligase entraîne une augmentation du niveau d'expression ([Duan 2000](#)). Il semble donc qu'une fraction significative de virions recombinants est adressée au protéasome par ubiquitinylation. En outre, cette observation est appuyée par un effet positif sur la transduction en présence d'inhibiteurs du protéasome avec les sérotypes 2, 5, 7 et 8 ([Duan 2000](#), [Yan 2002](#), [Denby 2005](#)).

#### **d. Translocation nucléaire et décapsidation**

Les particules qui parviennent à s'échapper des endosomes et à parvenir jusqu'en région perinucléaire sans être dégradées par le protéasome doivent encore traverser la membrane nucléaire et libérer leur génome (**Fig. 12**). L'ordre dans lequel se déroulent ces 2 étapes n'est pas encore bien défini, il est possible que les deux phénomènes se déroulent simultanément ou même que le génome du vecteur soit libéré sans désassemblage de la capsid.

Il semblerait que les vecteurs AAV du fait de leurs petites tailles soient en mesure d'entrer dans le noyau en passant par les pores nucléaire (NPC) soit par simple diffusion ([Whittaker 2000](#)), soit de façon active en s'associant avec des protéines cargo ([Johnson 2009](#)). Hansen *et al* ont montré dans un système très artificiel de noyaux purifiés que les particules d'AAV sont capables de pénétrer dans le noyau et que cette étape n'est pas limitante. Ils suggèrent également

un mécanisme d'entrée indépendant des NPC ([Hansen 2001](#)). Parallèlement, après infection avec le parvovirus MVM, les membranes nucléaires d'oocyte de Xénope présentent des invaginations et des perforations locales, dans les temps précoces post infection ([Cohen 2005](#), [Cohen 2006](#)). Les auteurs suggèrent que ces altérations de la membrane permettent l'entrée des MVM indépendamment des NPC. De façon intéressante, ce type d'invagination de la membrane en corrélation avec une forte charge virale a également été observé après administration d'un AAVr *in vitro* ([Lux 2005](#)) et dans le muscle squelettique de souris (données non publiées). Il est donc possible qu'un mécanisme similaire à celui observé pour les MVM permette l'entrée des particules dans le noyau. La présence de particules dans le noyau est néanmoins un sujet controversé, Lux *et al* décrivent une entrée inefficace des particules et défendent plutôt un modèle de relargage du génome avant ou pendant la translocation nucléaire ([Lux 2005](#)). Cependant, les données plus récentes tendent à indiquer que les particules recombinantes de sérotypes 1, 2 et 5 peuvent entrer efficacement dans le noyau ([Johnson 2009](#), [Keiser 2011](#)). Une excellente étude de Xiao *et al* a montré la présence de particules intactes et infectieuses d'AAVr 2 dans le noyau de cellule musculaire de souris ([Xiao 2012](#)). D'autre part, il semblerait que les particules se désassemblent dans le noyau ([Sonntag 2006](#), [Sipo 2007](#), [Xiao 2012](#)) mais il est possible que comme cela semble être le cas pour le CPV les génomes puissent être libérés indépendamment du désassemblage des capsides ([Ros 2006](#)). Pour finir, la cinétique et l'efficacité de décapsidation semblent être sérotypes et tissus spécifiques ([Thomas 2004](#), [Zhong 2004](#)).

#### **1.2.2.4. Devenir moléculaire des génomes recombinants**

Les génomes AAVr étant dépourvus de gènes viraux, leur devenir moléculaire est presque entièrement dépendant de l'environnement de la cellule hôte. Pour être transcrit efficacement, le génome simple brin doit être converti en double brin. Les génomes recombinants se stabilisent ensuite *in vivo* sous 2 formes extra-chromosomiques principales : les monomères circulaires et les multimères circulaires associant plusieurs génomes, aussi appelés concatémères ([Nakai 2001](#), [Schnepp 2003](#)). Contrairement aux virus AAV sauvages, l'intégration des génomes recombinants dans l'ADN de la cellule hôte semblent être un phénomène rare et quasi-aléatoire ([Li 2011](#), [Nowrouzi 2012](#)). Une étude menée au laboratoire a également mis en évidence l'association des génomes AAVr avec les histones cellulaires pour former une structure néo-chromatinienne

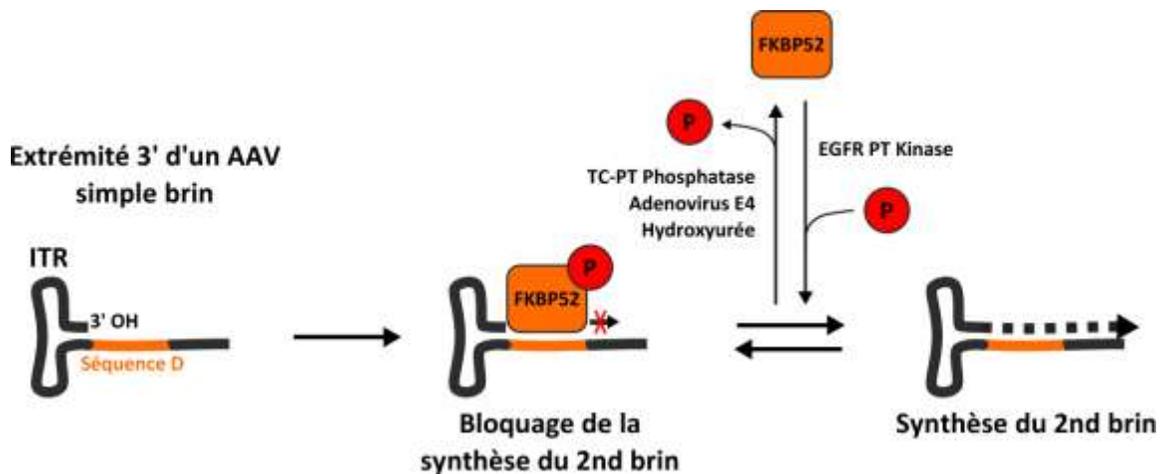
([Penaud Budloo 2008](#)) (**Fig. 12**).

### a. Conversion du génome simple brin en double brin

Il existe deux modèles qui permettent d'expliquer la conversion du simple brin en une forme double brin compatible avec la transcription : l'association de brins de polarité inverse et la synthèse *de novo* du brin complémentaire (**Fig. 12**). Quel que soit le mécanisme envisagé, cette étape est décrite comme étant limitante lors de l'infection par l'AAVr seul ([Ferrari 1996](#), [Fisher 1996](#)). Il est possible de générer des AAVr dont le génome est 2 fois plus court et auto-complémentaire (scAAV) ce qui permet de contourner la conversion double brin. Ces vecteurs permettent une cinétique d'expression plus rapide que les vecteurs simple brin conventionnels (ssAAV) ([McCarty 2003](#), [Wang 2003](#)).

L'hypothèse d'hybridation des brins de polarité inverse est basée sur le fait que les génomes AAVr de polarités négative et positive sont encapsidés avec la même efficacité lors de la production et que dans le noyau de la cellule transduite les simples brins complémentaires devraient former spontanément des duplex ADN double brin. Nakai *et al* apportent une preuve intéressante soutenant cette hypothèse *in vivo* dans le foie de souris à l'aide d'une technique de méthylation des sites Dam du génome viral ([Nakai 2000](#)). Cette observation implique qu'une seule copie de vecteur dans la cellule ne serait pas en mesure d'aboutir à l'expression de la protéine transgénique. A l'aide d'un modèle de fractions de vecteurs enrichies en brins positif ou négatif, Hauck *et al* montrent que les fractions sont capables de transduire des cellules séparément, mais qu'un mélange des fractions entraîne une transduction plus forte ([Hauck 2004](#)). Les auteurs, plus modérés dans leurs conclusions que Nakai *et al*, envisagent la possibilité d'une coexistence entre l'appariement de brin de polarité opposée et la synthèse du second brin. D'autres équipes n'ont pas été en mesure de reproduire cette observation en utilisant une autre technique de production des vecteurs de polarité unique ([Zhong 2004](#), [Zhong 2008](#), [Zhou 2008](#)). Leurs résultats suggèrent que les vecteurs de polarité unique sont capables d'une efficacité de transduction *in vitro* et *in vivo* comparable à celle de vecteurs normaux et que par conséquent, l'hybridation des brins complémentaire n'est pas requise pour la conversion en double brin du génome viral. Cependant, dans les 3 études, les modèles expérimentaux sont souvent particuliers (co-infection avec l'Adénovirus ou KO de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN) et certaines conclusions sont tirées de résultats non quantitatifs. Zhong *et al* n'écartent pas la possibilité qu'à MOI très forte (comme dans le travail Hauck *et al*) le phénomène d'hybridation

des brins secondaires puisse être impliqué dans la conversion double brin. Enfin plusieurs études indiquent que la synthèse du second brin est inhibée par la présence de la protéine cellulaire FKBP52 qui interagit sous sa forme phosphorylée avec la région D de l'ITR ([Qing 2001](#)) (**Fig. 13**). Le KO du gène codant de la protéine FKBP52 ou sa déphosphorylation par des facteurs tels que la protéine E4 de l'Ad5, l'hydroxyurée ou la T-cell protein tyrosine phosphatase aboutissent à une augmentation importante du niveau de transduction par un ss AAVr *in vitro* et *in vivo* ([Qing 2002](#), [Zhong 2007](#), [Zhong 2008](#)). Cependant, étant donné les effets pleiotropiques connus de la protéine il convient d'être prudent, d'autant plus que les conclusions semblent être également valables pour les vecteurs scAAV ([Jayandharan 2007](#), [Zhong 2007](#)).



**Fig. 13) Modèle de restriction de la synthèse du second brin d'ADN par la protéine FKBP52 (cc).**

Il semblerait que plusieurs facteurs soient responsables de la déphosphorylation de FKBP52 parmi lesquels la présence de la fonction E4 de l'adénovirus, l'hydroxyurée ou une surexpression de la TC-PT Phosphatase. Au contraire la surexpression de l'EGFR-PT kinase entraîne une phosphorylation de la protéine ([Qing 2002](#)).

## **b. Recombinaisons et formes de persistance**

Après conversion en double brin, le génome de l'AAVr semble subsister principalement sous formes extra-chromosomiques ([Duan 1998](#), [Nakai 2001](#), [Schnepp 2003](#)), linéaires ou circulaires, monomériques ou concatémériques ([Penaud Budloo 2008](#), [Sun 2010b](#)). Il a été également décrit une intégration non site-spécifique à faible fréquence dans le génome de la cellule hôte ([Li 2011](#), [Nowrouzi 2012](#)) (**Fig. 12**). La proportion relative des différentes formes de persistance des génomes AAVr est variable en fonction du tissu, de la dose administrée et de l'espèce concernée. Par exemple, il semble qu'à long terme après injection les formes moléculaires d'AAVr soient relativement simples chez la souris (monomères et concatémères

circulaires), alors qu'elles sont plus complexes chez le primate (formes linéaires et circulaires avec des réarrangements) ([Sun 2010b](#)). D'autres ont montré qu'à forte dose des formes concatémériques sont observées alors qu'à des doses plus faibles (environ 1 copie AAV/cellule) ce phénomène n'est pas constaté ([Li 2011](#)). Puisque les seules composantes d'origine virale des génomes recombinants AAV sont les extrémités ITR, la circularisation, la concatémérisation et l'intégration sont dépendants de la machinerie des cellules hôtes. De façon générale, il a été montré que de nombreux effecteurs protéiques impliqués dans différentes voies de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HR) ou non homologue (NHEJ) interagissent avec les génomes AAVr ([Choi 2006](#), [Zentilin 2001](#), [Nakai 2004](#)). Cette observation n'est pas étonnante sachant que les extrémités ADN libres sont reconnues par la cellule comme étant des sites de cassures double brin (DSB) et que la présence d'un nombre important de DSB non réparés entraîne la mort cellulaire par apoptose ([Smith 1999](#)). Il semble que les mécanismes de réparation de l'ADN affectent parfois positivement et parfois négativement l'efficacité de transduction de l'AAVr ([Zentilin 2001](#), [Cervelli 2007](#))

Enfin, bien que cela n'ait jamais été documenté, il est envisageable qu'une répllication du génome du vecteur à faible niveau participe à la stabilité à long terme. En effet, bien que le génome des vecteurs AAV soit en principe incapable de se répliquer *in vivo*, l'infection simultanée d'un individu ayant reçu un AAV recombinant par un AAV sauvage et d'un virus auxiliaire (adénovirus, HSV, HPV...) pourrait être responsable d'une répllication des génomes AAV recombinants. Ce type d'infection est courant dans la population humaine et le phénomène pourrait être également rendu possible par la présence de particules AAV ayant intégré de façon illégitime *rep*, *cap* et certaines fonctions auxiliaires, d'où la nécessité de produire des particules de qualité irréprochable.

- **Circularisation ou recombinaison intramoléculaire**

Chez les mammifères les structures ADN en épingle à cheveux sont une des cibles pour la DNA-dépendante protéine Kinase (DNA-PK) et l'endonucléase Artemis impliquées dans la réparation NHEJ ([Ma 2002](#)). Chez la souris déficiente en DNA-PK ou Artemis il est noté une accumulation de formes linéaires double brin dans plusieurs tissus, ce qui suggère un rôle important du NHEJ pour la circularisation des génomes AAV ([Song 2001](#), [Duan 2003](#), [Cataldi 2010](#)). Néanmoins, une autre voie moins efficace, mais indépendante des acteurs du NHEJ

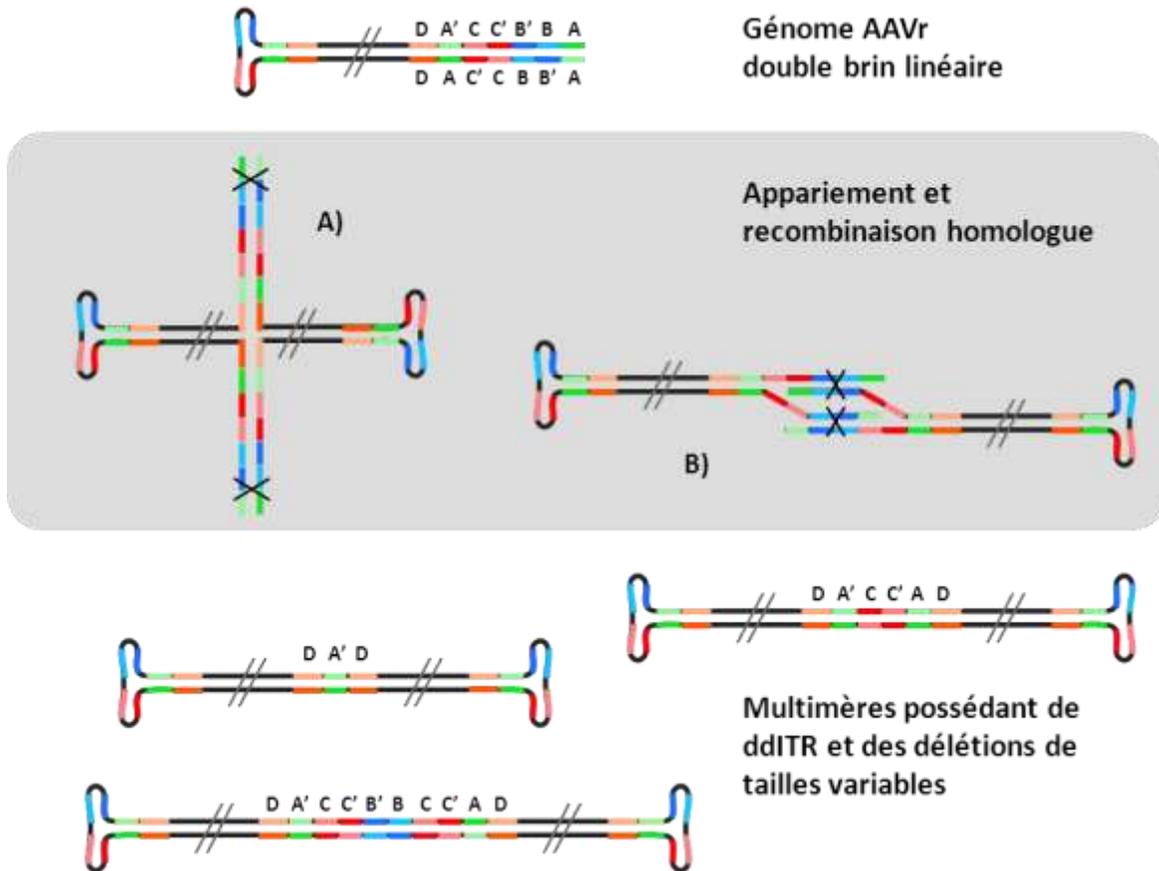
permet également la circularisation des génomes linéaires notamment dans le foie de souris ([Nakai 2004](#), [Inagaki 2007](#)). Il semblerait qu'une activité résolvasse similaire à celle responsable de la coupure double brin au niveau des jonctions de Holliday soit impliquée dans cette voie alternative de circularisation à débit plus faible ([Inagaki 2007](#)).

- **Concatémérisation ou recombinaison intermoléculaires**

Chez la souris et le primate injectés avec un vecteur AAVr, des génomes multimériques circulaires de hauts poids moléculaires apparaissent progressivement au détriment des formes linéaires et circulaires monomériques ([Duan 1998](#), [Vincent-Lacaze 1999](#), [Penaud Budloo 2008](#), [Sun 2010b](#)). Ces concatémères sont généralement constitués de 2 à 10 génomes AAVr en orientation tête à queue mais également pour proportion plus faible en tête à tête ([Penaud Budloo 2008](#)). Devant la prépondérance des formes tête à queue, Vincent-Lacaze *et al* ont suggéré un mécanisme de formation des concatémères par amplification en cercle roulant ([Vincent-Lacaze 1999](#)), comme cela a déjà été décrit pour HSV1 ([Boehmer 1997](#)). De nombreuses études ont montré par la suite que les concatémères sont plus vraisemblablement formés par recombinaison inter-moléculaire ([Yang 1999](#), [Choi 2005](#)) très certainement à partir de génomes AAVr linéaires double brin ([Nakai 2003](#), [Yue 2003](#)). Yang *et al* montrent en effet qu'en co-injectant 2 AAVr différents dans le muscle de souris, il est possible de retrouver les 2 génomes associés de façon covalente dans un même concatémère ([Yang 1999](#)). Cette stratégie de co-injection de 2 vecteurs AAVr portant chacun un morceau d'un ORF est désormais utilisée pour apporter des gènes trop longs pour être portés par un seul vecteur ([Duan 2001](#), [Mah 2003](#), [Lostal 2010](#), [Zhang 2012](#)).

Comme pour la circularisation, les ITR semblent jouer un rôle majeur dans le mécanisme de recombinaison intermoléculaire ([Yan 2005](#)). Cependant, chez le mutant murin pour DNA-PK alors que la circularisation est diminuée, la concatémérisation ne semble pas être affectée ([Duan 2003](#), [Nakai 2004](#)). Il semblerait qu'un mécanisme de HR non identifié soit responsable de l'assemblage des génomes sous forme de concatémères ([Yan 2007](#)). Des séquences de 165pb correspondant à un ITR flanqués de deux régions D (ddITR) ont été caractérisées par plusieurs équipes à partir d'épisomes AAVr circulaires ([Xiao 1996](#), [Duan 1999](#), [Inagaki 2007](#)). Ces structures particulières, les délétions fréquentes observées dans les ITR ([Duan 1999](#), [Penaud Budloo 2008](#)) et la dépendance vis-à-vis de structures linéaires sont en accord avec un mécanisme de recombinaison intermoléculaire par recombinaison homologue. Un modèle est

proposé ci-après (**Fig.15**).



**Fig. 14) Modèle de formation des multimères par recombinaison homologue (cc).**

A partir d'un génome d'AAV dont le second brin a été synthétisé, il est possible d'imaginer plusieurs modèles d'appariement des ITR double brin à extrémités libres, par exemple par ITR kiss (A) ou invasion de brin (B). Après intervention des mécanismes de réparation de l'ADN par HR différentes formes multimériques possédant des ddITR peuvent être produites, en fonction du site précis de recombinaison. Ce modèle permet générer les différentes configurations décrites par Duan *et al* ([Duan 1998](#))

- **Intégration dans le génome de la cellule hôte**

Il a été montré *in vitro* qu'en l'absence de Rep 78/68 les vecteurs AAVr présentent une fréquence d'intégration faible et quasi-aléatoire dans le génome de la cellule hôte ([Rutledge 1997](#), [Miller 2002](#), [Miller 2005](#), [Hüser 2007](#)). Plusieurs études ont également confirmé de rares événements intégratifs *in vivo* dans plusieurs tissus murins dont le foie (dans environ 0,05% des cellules) ([Nakai 1999](#), [Inagaki 2007](#), [Li 2011](#)), ainsi que le muscle squelettique et le cœur

([Inagaki 2007](#)). Très récemment une étude émanant du laboratoire a mis en évidence la présence d'évènements intégratifs dans le muscle squelettique et le foie de primate non humain en utilisant un système sans sélection préalable ([Nowrouzi 2012](#)). La fréquence estimée est d'environ  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  évènements intégratifs par génome diploïde soit environ  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  évènements intégratifs par génome de vecteur.

Plusieurs équipes ont mis en évidence le fait que les évènements intégratifs semblent avoir des préférences pour certaines régions du génome, comme par exemple, les régions chromosomiques instables ([Miller 2002](#)), la proximité de gènes actifs, les îlots riches en dinucléotide CG, les régions riches en GC et les répétitions rDNA codant pour les ARN ribosomiaux ([Miller 2005](#), [Nakai 2005](#), [Li 2011](#)). Inagaki *et al* ont en outre montrés que l'intégration est significativement plus fréquente à proximité des palindromes ADN d'environ 20pb ([Inagaki 2007](#)). Au contraire l'étude menée au laboratoire ayant conduit à l'analyse de plus de 300 jonctions AAVr/genome cellulaire issu de 9 primates non humains (NHP) différents montre une distribution aléatoire sans aucune préférence significative pour les régions décrites précédemment ([Nowrouzi 2012](#)).

Le mécanisme d'intégration de l'AAVr n'est pas encore clairement établi. L'implication des protéines DNA-PK et ATM dans l'intégration de vecteur ss et sc AAV mise en évidence *in vitro* par Cataldi *et al* conforte une éventuelle responsabilité du NHEJ ([Cataldi 2010](#)). Cependant, chez les souris SCID (DNA-PK  $-/-$ ), Inagaki *et al* suggèrent plutôt un mécanisme indépendant de DNA-PK ([Inagaki 2007](#)). En outre, il a été montré que l'induction des cassures double brin dans l'ADN de la cellule hôte par la nucléase ISce1 ou l'irradiation, entraîne une augmentation importante de la fréquence d'intégration ([Miller 2003](#), [Miller 2004](#), [Gellhaus 2010](#)). En conclusion, il semble donc que l'intégration du génome AAVr intervienne au niveau des cassures chromosomiques double brin « naturelles » par un mécanisme de recombinaison non homologue. A l'heure actuelle, aucune information n'indique que l'AAVr soit capable de s'intégrer de façon active en provoquant des DSB dans l'ADN cellulaire.

- **Association avec des histones cellulaires**

Jusqu'à présent, une seule étude a mis en évidence de manière directe l'association du génome de l'AAV avec des protéines histones cellulaires ([Penaud Budloo 2008](#)) (**Fig. 12**). Cette étude menée au sein du laboratoire a montré que les nucléosomes sont repartis régulièrement le

long du génome du vecteur pour former une structure chromatinienne semblable à celle observée pour le génome de la cellule hôte. Il est fort probable que la stabilisation sous forme de chromatine participe à la stabilité à long terme du génome AAVr. La modulation de l'expression par des modifications « épigénétiques » de la structure chromatinienne pourrait néanmoins affecter le niveau d'expression du transgène thérapeutique. Des éléments plus détaillés sont disponibles dans le chapitre **I.4.3**.

En conclusion de ce chapitre, la quasi-totalité des références de cette partie ont été publiées après 2000. Cela ne sous-entend pas que les travaux antérieurs ne revêtent pas d'intérêt pour la spécialité, mais reflète plutôt le fait que les études datant des années 1990 sont plus rares à s'intéresser au devenir moléculaire des vecteurs AAVr et de leur génome, notamment dans des modèles *in vivo*. Il faut cependant avouer l'existence d'un biais probable dans cette conclusion étant donnée la plus grande difficulté à se procurer des papiers plus anciens et ma plus grande facilité à comprendre des données issues des technologies banalisées dans les années 2000 (PCR quantitative, séquençage à haut débit et microscopie confocale). Néanmoins, il est intéressant de noter que ce regain d'intérêt (peut être biaisé) pour la pharmacologie moléculaire des vecteurs viraux et en particulier celle de l'AAV coïncide avec les premiers effets indésirables sévères survenus lors d'essais cliniques de thérapie génique ([Raper 2003](#), [Hacein-Bey 2003](#)).



## I.3. Application et amélioration des vecteurs

### AAVr pour la thérapie génique

#### I.3.1. Balance bénéfique/risque et complications

Jusqu'à maintenant, la **quasi-totalité** des essais cliniques de thérapie génique chez l'homme peuvent être considérés comme des échecs, dans le sens où ils ont rarement abouti à une amélioration franche et durable de l'état clinique des patients. A l'heure actuelle, un seul produit de thérapie génique dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) depuis 2005 seulement en Chine. Il s'agit de la Gendicine<sup>TM</sup>, un adénovirus recombinant codant pour la protéine p53 (Ad5 pRSV-p53) qui est indiqué pour le traitement pour les cancers tête et cou en combinaison avec un protocole de radiothérapie. A l'heure actuelle il semblerait que plus de 16 000 patients aient reçu le vecteur. Cependant les travaux publiés présentent un nombre restreint d'individus et ne fournissent aucune comparaison avec les autres protocoles de traitement, ce qui ne permet pas l'évaluation de l'efficacité thérapeutique par la communauté scientifique internationale ([Peng 2005](#), [Yang 2010](#)). Plusieurs autres candidats ont essuyé un revers en Europe auprès de l'EMA (European Medicines Agency) : Ark Therapeutics avec le Cerepro® (Ad5 CMV-TK) ([Düzgünes 2008](#)) et AMT biopharma avec le Glybera® (AAV CMV-LPL) ([Burnett 2009](#)). Dans les 2 cas, la raison principale invoquée par l'EMA pour refuser l'AMM a été que les données fournies par les essais cliniques ne présentent pas de preuve suffisante d'un bénéfice clinique en comparaison avec le risque potentiel ([Cerepro](#), [Glybera](#)).

Lors de certains essais cliniques de thérapie génique, des effets indésirables non anticipés ont été identifiés allant jusqu'à être directement responsables du décès de patients ([Raper 2003](#), [Hacein-Bey 2003](#)). Parce que la thérapie génique virale n'est pas une approche pharmacologique traditionnelle, elle fait face depuis plus de 20 ans à de nouveaux types de complications après administration *in vivo*. Ces complications peuvent être classées en 3 grandes catégories : l'immunotoxicité, la génotoxicité et le transfert à la lignée germinale. Les efforts déployés en termes d'étude de la biologie des vecteurs *in situ* ont abouti à des améliorations successives permettant de minimiser certains de ces événements qui entravent la sécurité et l'efficacité du transfert de gène.

## **a. Immunotoxicité**

La réponse immunitaire est l'un des obstacles majeurs rencontrés en thérapie génique *in vivo* à l'aide de vecteurs viraux. Ce problème est d'autant plus présent pour les vecteurs dérivés de virus non enveloppés tels que les adénovirus et les AAV qui présentent de nombreux antigènes à la surface de leurs capsides. Au cours d'un essai clinique mené à la fin des années 1990 pour le traitement de la déficience en Ornithine transcarbamylase (OCT) à l'aide d'un Ad5 recombinant, l'un des patients a développé un syndrome de réponse inflammatoire systémique ([Raper 2003](#)). Le jeune homme est décédé 98 h après le transfert de gène par détresse respiratoire aigüe. Sans atteindre la gravité de cet événement, lors d'un essai clinique utilisant un vecteur AAV 2 pour le traitement de l'hémophilie de type B les cellules hépatiques transduites par l'AAV ont été éliminées par le système immunitaire conjointement avec une absence de bénéfice thérapeutique ([Manno 2006](#)). Il est maintenant clair que l'administration de vecteurs AAV est responsable de l'activation d'une réponse immunitaire T anti-capside ([Mingozzi 2007](#), [Mays 2009](#), [Gao 2009](#)) mais le doute demeure en ce qui concerne l'association avec d'éventuels effets indésirables et l'impact sur l'efficacité de transduction. Les données obtenues par [Mingozzi et al](#) à partir d'échantillons humains suggèrent néanmoins que cette réponse est dose dépendante ([Mingozzi 2009](#)). La réponse immunitaire semble dépendre de nombreux paramètres dont l'immunité préexistante des patients, le sérotype utilisé, l'état inflammatoire du tissu cible, et la voie d'administration ce qui complique considérablement l'anticipation de la réponse immunitaire chez les patients ([Mendell 2010](#), [Toromanoff 2010](#)). L'immuno-monitoring au cours des futurs essais cliniques apparaît donc être indispensable pour permettre une meilleure compréhension de la réponse anti capsid.

## **b. Génotoxicité**

La génotoxicité résulte de l'intégration aléatoire du génome des vecteurs viraux dans le génome de la cellule hôte provoquant une mutagénèse insertionnelle. Les premiers cas sérieux de génotoxicité ont été observés au cours des essais cliniques de thérapie génique *ex vivo* à l'aide de  $\gamma$ -rétrovirus recombinants pour le traitement des SCID-X ([Hacein-Bey 2003](#)). 4 patients de l'essai français et 1 de l'essai anglais sur un total de 20 ont développé une prolifération clonale des cellules T allant jusqu'à provoquer le décès d'entre eux ([Hacein-Bey 2011](#), [Gaspar 2004](#)). Il a été montré que la leucémie a été certainement provoquée par la transactivation de proto-oncogènes

(LMO2 et CCDN2) par les séquences enhancer présentent dans l'ITR du vecteur viral ([Hacein-Bey 2008](#), [Howe 2008](#)). Depuis, d'autres cas de lympho-prolifération ont été mis en évidence au cours d'autres essais cliniques utilisant des vecteurs lenti/retroviraux recombinants pour le syndrome de Wiskott–Aldrich ([Avedillo Díez 2011](#)) et la granulomatose septique chronique ([Stein 2010](#)).

En ce qui concerne les vecteurs AAV recombinant, bien que leur fréquence d'intégration soit beaucoup plus faible que celle des vecteurs lenti/retroviraux, une intégration à faible niveau pourrait tout de même provoquer une mutagénèse insertionnelle. Pour le moment, aucune étude ne documente de génotoxicité pour ces vecteurs au cours d'essais cliniques chez l'homme. Cependant, Donsante *et al* ont mis en évidence un phénomène carcinogénèse hépatique chez la souris associé à la présence d'évènements insertionnels du génome AAVr à proximité de snoRNAs (small nucleolar RNA) et miRNA (microRNA) ([Donsante 2007](#)). Il faut cependant noter qu'une dose particulièrement élevée a été administrée à des souriceaux nouveaux nés (environ 1<sup>°</sup>14vg/kg). Après injection d'une dose similaire chez la souris adulte Li *et al* ont mis en évidence plus de 1000 sites d'intégration ([Li 2011](#)) mais pas d'hépatocarcinogénèse associée. En conclusion, même si le risque semble être limité avec les vecteurs AAVr dans les tissus sains quiescents, il convient d'être prudent notamment en ce qui concerne les doses fortes, chez les patients jeunes. D'autre part nous n'avons aucune idée de la génotoxicité dans ces mêmes vecteurs dans des tissus pathologiques aux seins desquels le génome des cellules hôtes peut être instable.

### **c. Transmission à la lignée germinale**

Le transfert de gène à l'échelle de l'organisme implique la possibilité de cibler involontairement les cellules de la lignée germinale des patients or cette transmission verticale n'est pas acceptable en terme d'éthique ([EMA Guidelines](#)). D'autre part, la transmission à la lignée germinale pose un problème de biosécurité dans la mesure où il est possible que cela entraîne une altération du développement embryonnaire des descendants en modifiant la régulation de gènes impliqués dans le développement. Bien que les barrières pour transduire les cellules germinales soient relativement perméables à l'âge adulte, l'enrôlement de jeunes patients maintenant fréquent dans les essais cliniques rend la question d'autant plus pertinente. Au regard de cette transmission verticale, les informations précliniques et cliniques disponibles sont parcellaires. L'approche *ex vivo* généralement utilisé pour les vecteurs lenti/retrovirus limite

considérablement le risque de transfert dans la lignée germinale ([Scaramuzza 2012](#)). Concernant les adénovirus recombinants, il semble qu'il soit possible de transduire les cellules souches spermatogoniales mais le transgène n'a pas pu être retrouvé dans la descendance ([Takehashi 2007](#)). Pour l'AAVr les informations disponibles sont plus détaillées. Lors d'un essai clinique, la présence de génome recombinant a été détectée dans le sperme des patients adultes jusqu'à 16 semaines après administration ([Manno 2006](#)). Plusieurs études ont mis en évidence chez le lapin que la contamination du sperme par des génomes recombinant apparaît dépendante de la dose ainsi que du sérotype d'AAVr et décroît au cours du temps (pendant 2 cycles de spermatogénèse au maximum) ([Schuettrumpf 2006](#), [Favaro 2009](#), [Favoro 2011](#)). Il n'y a pas de preuve que les spermatozoïdes eux même contiennent des génomes recombinants. En ce qui concerne les femelles, Mattar *et al* ont montré chez la présence d'ADN du vecteur dans le tissu ovarien, mais pas dans les ovocytes purifiés ([Mattar 2011](#)). Il semble donc que le risque de transfert verticale à l'aide d'un vecteur AAV soit faible tant chez le mâle que chez la femelle mais il convient d'être tout de même prudent en ce qui concerne les jeunes patients pour lesquels aucune donnée n'est disponible à l'heure actuelle.

### **I.3.2. Expression transitoire et infra-thérapeutique**

Les différentes complications précédemment évoquées ont un impact sur la sécurité du transfert de gène mais peuvent également jouer un rôle important dans la diminution chronique ou aiguë de l'efficacité de l'expression du transgène thérapeutique. D'autres paramètres agissent également sur cette efficacité générale, notamment le trafic des particules dans l'organisme, les tissus et les cellules ainsi que la stabilité des génomes recombinants dans le noyau.

Dans de nombreux essais cliniques pour le traitement des maladies génétiques utilisant l'AAVr, l'expression du transgène transitoire ou trop faible n'a pas permis de restauration à long terme du phénotype ([Kay 2000](#), [Manno 2006](#), [Moss 2007](#), [Stroes 2008](#), [Brantly 2009](#), [Flotte 2011](#)). Récemment des résultats particulièrement séduisants ont été obtenus en ce qui concerne le traitement de l'hémophilie B par un AAV recombinant exprimant le facteur IX (fIX) de coagulation ([Nathwani 2011b](#)). Cette réussite a été rendu possible par une série d'optimisation (immunosuppression transitoire, scAAV et usage optimisé des codons). Toutefois, il convient de noter que dans ce cas la difficulté technique est relativement faible étant donné le fait (i) qu'une correction supérieure à 2% de la quantité normale du fIX est suffisante pour corriger le déficit,

(ii) que le foie et un organe assez simple à cibler par injection intraveineuse et (iii) que le cDNA codant pour le facteur XI utilisé de petite taille (1600 pb). Il ne s'agit en rien de minimiser l'avancé thérapeutique majeure réalisée mais de confronter ce succès à de nombreuses autres maladies génétiques qui mettent la barre plus haute en terme de difficulté soit car de nombreux organes doivent être transduits ou que l'organe cible est difficile à atteindre, soit parce qu'un niveau de correction proche de 100% est requis pour obtenir un effet thérapeutique.

Les technologies actuelles de production/purification permettent de générer des particules plus concentrées et en quantité plus importante ([Smith 2009](#), [Yuan 2011](#), [Kotin 2011](#)), ce qui permet d'envisager l'administration des doses sans cesse supérieures. Néanmoins, il apparaît que les risques d'immunotoxicité, de génotoxicité et de transmission verticale sont très certainement des facteurs dose dépendants ([Mingozi 2009](#), [Donsante 2007](#), [Favaro 2009](#)). Dans ce contexte, l'augmentation des doses des vecteurs administrées apparaît comme étant non souhaitable et potentiellement risquée. La solution alternative consiste donc à optimiser les protocoles et les vecteurs de façon à permettre un transfert de gène plus efficace et plus sécurisé pour atteindre des niveaux de correction nécessaires. Pour ce faire, l'étude de l'interaction hôte/vecteur apparaît comme étant un prérequis indispensable et justifie les efforts de recherche allant dans ce sens qui sont particulièrement intenses depuis une dizaine d'année.

### **I.3.3. Amélioration de l'efficacité du transfert de gène à l'aide d'AAVr**

Sans parler de la qualité de la préparation de vecteurs recombinant (contaminant, % de particules pleines...), l'efficacité du transfert de gène peut être améliorée en agissant sur (i) la voie d'administration, (ii) les réactions immunitaires et métaboliques de l'hôte à l'aide de traitements pharmacologiques, (iii) la nature de la capsid virale et (iv) l'optimisation de la cassette d'expression du transgène.

#### **I.3.3.1. Optimisation des protocoles d'administration**

##### **a. Voies d'administration**

Toutes les maladies génétiques ne nécessitent pas d'apporter le gène recombinant dans tous les tissus du corps. Par exemple, dans le cas de la LCA le gène *RPE65* code une protéine

indispensable dans l'œil mais qui ne joue aucun rôle identifié dans le reste de l'organisme ([Moiseyev 2005](#)). Dans certains cas, il pourrait même être toxique de faire exprimer de façon ectopique certaines protéines ([Van der Eb 1998](#), [Toscano 2008](#)). La façon la plus évidente de ne cibler que quelques organes est l'administration locale directement dans l'organe à traiter. Par exemple par injection intracérébrale ou intramusculaire. Au contraire pour une maladie qui touche un grand nombre d'organes comme la DMD (muscle striés, lisse et cerveau), une approche systémique sera préférable. Les voies d'injection des vecteurs AAVr les plus courantes lors d'études clinique et/ou préclinique sont résumées dans le **Tableau 2**.

Voie d'administration	Organe(s) majoritairement transduit(s)	Avantages	Inconvénients	Références
<b>Intraveineuse (IV)</b>	Corps entier Foie	Geste simple, possibilité de transduction de presque tous les organes	Immunogène. Transduction hépatique élevée, peu efficace dans le SNC	<a href="#">Wang 2005</a> <a href="#">Yue 2009</a> <a href="#">Nathwani 2011b</a>
<b>Intramusculaire (IM)</b>	Muscle Foie	Geste simple, expression élevée dans le muscle injecté	Immunogène. Niveau de transduction inégal dans le membre injecté	<a href="#">Kay 2000</a> <a href="#">Ohshima 2009</a> <a href="#">Ni 2011</a>
<b>Infusion régionale de membre isolé (RI)</b>	Muscle Foie	Transduction du membre isolé homogène Réponse immunitaire plus faible qu'en IM	Mise en place plus complexe. Nécessite un appareillage spécifique	<a href="#">Su 2005</a> <a href="#">Haurigot 2010</a> <a href="#">Toromanoff 2010</a>
<b>Aérosolisation</b>	Voies respiratoires Poumons	Moyen le plus efficace pour cibler les voies respiratoires. Possibilité d'administrations répétées	Nécessite un appareillage spécifique. Expression souvent transitoire	<a href="#">Beck 2002</a> <a href="#">Fischer 2003</a> <a href="#">Moss 2007</a>
<b>Sous rétinienne (SR)</b>	Rétine	Moyen le plus efficace pour cibler la rétine. Diffusion dans le reste du corps faible	Risque d'endommagement de la rétine. Geste complexe. Nécessite un appareillage spécifique,	<a href="#">Weber 2003</a> <a href="#">Le Meur 2007</a> <a href="#">Bennett 2012</a>
<b>Intracérébrale (IC)</b>	Cerveau	Transduction localisée efficace. Possibilité de ne cibler qu'une structure cérébrale spécifique	Risque d'endommagement du cerveau, nécessité d'injections multiples pour transduire le cerveau entier	<a href="#">Worgall 2008</a> <a href="#">LeWitt 2011</a>
<b>Intrathécale (IT)</b>	Système nerveux central et périphérique (Foie)	Moins invasif que l'approche intracérébrale. Permet de cibler le système nerveux global	Risque d'endommagement de la moelle. Efficacité plus faible que par IC pour le cerveau	<a href="#">Watson 2003</a> <a href="#">Bevan 2011</a>

**Tableau 2) Caractéristiques des principales voies d'injection utilisées en thérapie génique *in vivo***

## **b. Co-administration d'agents pharmacologiques**

De nombreuses molécules pharmacologiques disposant déjà d'AMM ou en cours d'essais cliniques permettent d'influencer le système immunitaire, le métabolisme ou la régulation du génome. La disponibilité de ces agents est une véritable opportunité pour la thérapie génique *in vivo*, puisqu'ils permettent de modifier les voies endogènes qui dans certains cas limitent l'efficacité du transfert de gène. Quelques exemples non exhaustifs sont présentés ci-après : les immunosuppresseurs, les inhibiteurs du protéasome et les modificateurs chromatinien.

- **Immunosuppression**

Comme cela a été détaillé précédemment, les réponses immunitaires contre la capsid et le produit du transgène peuvent diminuer de façon drastique l'efficacité du transfert de gène à l'aide de vecteurs AAVr ([Mingozzi 2007](#), [Mays 2009](#), [Gao 2009](#)). Afin de limiter cette réponse, des protocoles d'immunosuppression ont été développés. Ces stratégies consistent à empêcher ou retarder la génération de cellules T et/ou B spécifiques et d'anticorps de type IgG (Immoglobuline de classe G) neutralisants grâce à l'administration d'agents pharmacologiques ayant des propriétés immunosuppressives. Il existe déjà de nombreux immunosuppresseurs (IS) disposant d'AMM qui ont été développés principalement pour limiter le rejet après transplantations d'organes et pour certaines maladies auto-immunes. Dans ces indications les IS doivent être généralement utilisés pendant plusieurs années et leur administration est souvent accompagnée d'effets secondaires indésirables ([Miao 2007](#), [Arruda 2009](#)). Les protocoles d'immunosuppression combinent souvent 2 ou 3 IS, car il a été montré que certaines molécules agissent de façon synergique, ce qui permet de réduire les doses administrées. Plusieurs IS ont déjà été utilisés avec succès en thérapie génique dans des modèles précliniques mais contrairement aux protocoles utilisés en transplantation d'organe il semble que l'administration transitoire d'IS suffise à obtenir un effet à long terme ([Miao 2007](#), [Arruda 2009](#)). Une étude chez le chien CXMDj (canine X-linked muscular dystrophy in Japan) a démontré qu'une réponse T anti-capsid et/ou transgène après injection en IM d'un AAVr 2/2 ou 2/6 h- $\mu$ Dys était associée à une perte rapide de la détection de la protéine thérapeutique ([Wang 2007](#)). Les auteurs ont ensuite mis en évidence que l'administration de Cyclosporine, et de Mycophenolate mofetyl pendant 18 semaines ainsi que d'un agent de déplétion des cellules T pendant 3 semaines permet une expression à long terme de la micro-Dystrophine après retrait de l'immunosuppression. Shin *et al*

ont montré par la suite un effet similaire avec un AAV 6 tyrosine mutant (Cf **I.3.3.2.a**) associant Cyclosporine et de Mycophenolate mofetyl pendant seulement 5 semaines. ([Shin 2012](#)). D'autre part, plusieurs études ont montré chez des chiens atteints d'hémophilie B que l'administration de Cyclophosphamide seule pendant 6 semaines permet l'expression à long terme du fIX après injection d'un AAV 2/1 ou 2/2 ([Field 2001](#), [Herzog 2001](#)). Enfin très récemment, Mingozi *et al* ont montré chez le NHP ayant reçu un AAV 2/6 phAAT-fIX qu'il est possible d'éradiquer efficacement une réponse humorale neutralisante anti-transgène (fIX) à l'aide d'une courte immunosuppression associant un anticorps monoclonal anti lymphocyte B (rituximab) et la Cyclosporine ([Mingozy 2012](#)).

- **Inhibition du protéasome**

Yan *et al* ont montré qu'au cours du trafic intra-cytoplasmique, les capsides des AAV 2 et 5 peuvent être ubiquitinylés *in vitro* ([Yan 2002](#)). L'ubiquitinylation des protéines cellulaires par les ubiquitine ligases est un signal général d'adressage au protéasome et un moyen pour la cellule de se débarrasser des protéines mal repliées ou partiellement dégradées ([Sorokin 2009](#)). Il a été également montré que cette voie est impliquée dans la défense intra-cellulaire contre l'HBV (Hépatite B virus) ([Qian 2012](#)). Dans le cas de l'AAVr, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome par différentes molécules dont le Bortezomib (AMM par la [FDA](#) et l'[EMEA](#)) permettent d'augmenter significativement le niveau d'expression du transgène chez la souris ([Duan 2000](#), [Denby 2005](#), [Nathwani 2009](#)) et également chez le chien ([Monahan 2010](#)). Finn *et al* mettent également en évidence *in vitro* que l'administration de Bortezomib limite la présentation des antigènes de capsides à la surface des cellules et empêche la réponse T cytotoxique contre les cellules transduites par l'AAV 2 ([Finn 2010](#), [Mingozi 2011](#)). Les auteurs suggèrent que l'inhibition du protéasome prévient la dégradation des capsides virales et la présentation des peptides ainsi générés à la surface des cellules transduites par le CMH de classe I.

- **Administration de modificateurs chromatiniens**

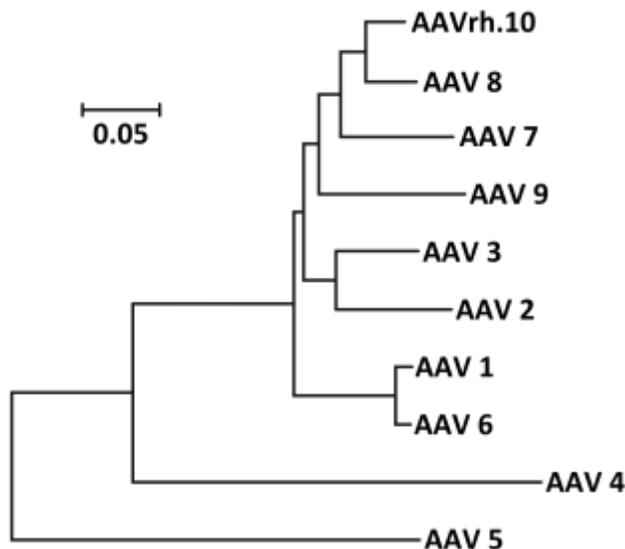
Les formes persistantes du génome de l'AAV sont associées *in vivo* avec des histones cellulaires et forment une structure chromatinienne ([Penaud Budloo 2008](#)). L'état de compaction de la chromatine peut-être contrôlé par des modifications post-transcriptionnelles, ce qui a pour conséquence de moduler le niveau d'expression des gènes incluant dans cette structure. Il est

donc possible que la structure chromatinienne de l'AAV soit la cible de certaines de ces modifications affectant l'expression du transgène. Quelques travaux ont montré *in vitro* dans des modèles particuliers que l'utilisation de modificateurs chromatinien permet une augmentation de l'efficacité de transduction (Cf. **I.4.1**) ([Chen 1997](#), [Chen 1999](#), [Okada 2006](#)). La caractérisation de l'efficacité de ces agents pharmacologiques dans ce cadre est donc très incomplète à l'heure actuelle et requiert une investigation plus approfondie, d'autant plus que de nouvelles molécules permettent de moduler de façon beaucoup plus spécifique la structure de la chromatine ([Szyf 2009](#), [Copeland 2009](#)). Ce travail, accompagné d'une étude préalable des modifications chromatinien associées au génome de l'AAV est un des buts du projet dans lequel s'insère ce travail de thèse.

### **I.3.3.2. Optimisation des vecteur viraux**

#### **a. Sérotypes et mutants synthétiques**

Les différents sérotypes d'un virus sont des variétés sérologiques ayant des propriétés antigéniques uniques qui sont reconnus différemment par le système immunitaire de l'hôte. Un peu plus d'une dizaine de sérotypes naturels de l'AAV ont été identifiés chez l'homme et le primate non humain. (**Fig. 15**)



**Fig. 15) Arbre phylogénétique des sérotypes naturels d'AAV (cc).**

L'arbre a été construit par la méthode du plus proche voisin basé sur l'homologie de la séquence VP1. Adapté de [Vandenberghe 2009](#).

Sérotypes	Origine	Tropisme décrit	Caractéristiques
AAV1	NHP	Muscle strié, SNC, Voies respiratoires, Foie	Séroprévalence élevée <a href="#">Boutin 2010</a>
AAV 2	Humain	Tropisme relativement large, Foie, Muscle strié	Séroprévalence élevée <a href="#">Boutin 2010</a>
AAV 3	Humain	Hépatocarcinome et Hépatoblastome	Efficacité générale de transduction relativement faible sauf dans les cellules cancéreuses hépatiques <a href="#">Ling 2011</a>
AAV 4	NHP	<b>Rétine</b>	Transduction spécifique des cellules de l'épithélium pigmenté rétinien <a href="#">Weber 2003</a>
AAV 5	Humain	SNC, Voies respiratoires, <b>Rétine</b>	Séroprévalence faible <a href="#">Boutin 2010</a> . Eloigné des autres sérotypes en terme de phylogénétique
AAV 6	Humain	Muscle strié, Voies respiratoires	
AAV 7	NHP	Foie, Muscle squelettique, Rétine	
AAV 8	NHP	Tropisme relativement large, <b>Foie, Muscle strié</b>	Séroprévalence relativement faible <a href="#">Boutin 2010</a> Cible le foie de façon importante.
AAV 9	Humain	<b>Muscle strié, SNC, Rétine</b>	Séroprévalence relativement faible <a href="#">Boutin 2010</a> Peut traverser la barrière hémato-méningée <a href="#">Foust 2009</a>
AAVrh 10	NHP	SNC	
AAV 2i8	Mutant	Muscle strié	Mutation dans le domaine de fixation à l'héparine de l'AAV 8 = Diminution de la séquestration hépatique et meilleure transduction ( <a href="#">Asokan 2010</a> )
AAV9.45	Mutant	Muscle strié	Généré par mutagenèse aléatoire à partir du sérotype AAV 9 = Diminution de la séquestration hépatique ( <a href="#">Pulicherla 2011</a> )
AAV 2.5	Mutant	Muscle squelettique	Hybride AAV 1 et AAV 2 gardant le tropisme de l'AAV 1 pour le muscle mais échappant aux anticorps neutralisant anti AAV 1 et 2 ( <a href="#">Bowles 2012</a> )
AAV 6.2	Mutant	Voies respiratoires	Hybride AAV 6 avec une mutation de la phospholipase A2 de l'AAV 1. Amélioration de l'efficacité de transduction par rapport à l'AAV 6 ( <a href="#">Song 2009</a> )
AAV 2 Y>F	Mutant	Foie, Rétine	Changement des Tyrosines de surface en Phénylalanine = Limite l'ubiquitinylation <i>in vivo</i> et diminue l'adressage au protéasome ( <a href="#">Zhong 2008</a> )

**Tableau 3) Tropisme des principaux sérotypes d'AAVr.**

Basé sur [Asokan 2012](#), [Qiao 2011](#), [Bish 2011](#), [Sands 2011](#), [Stieger 2011](#), [McCown 2011](#).

La majorité de la population humaine est séropositive pour le virus adéno-associé notamment pour les sérotypes humains AAV 1 et 2 ([Erles 1999](#), [Halbert 2005](#), [Boutin 2010](#)). L'AAV 8 et 5 ont une séroprévalence nettement plus faible dans la population et sont respectivement neutralisés par des facteurs présents dans 19%, et 3,2% des sérums testés. D'autre part étant donné leurs différences structurales (**Fig. 15**), chaque sérotype interagit différemment avec les récepteurs et corécepteurs à la surface des cellules (**Fig. 12**). En pratique, un sérotype est donc caractérisé par son tropisme c'est-à-dire sa capacité à reconnaître et à se lier de façon préférentielle à certains types cellulaires. L'intérêt pour la thérapie génique est évident, puisque l'utilisation d'un sérotype adapté permet de délivrer le transgène thérapeutique de façon préférentielle dans certains tissus (**Tableau 3**). Des vecteurs viraux « chimérique » AAV 2/X ont été générés à partir de plusieurs sérotypes en apportant le gène *cap* d'un sérotype X accompagné du gène *rep* de l'AAV 2 dans les cellules de production. ([Rabinowitz 2002](#), [Hildinger 2011](#)). Pour augmenter le panel de sérotypes disponibles et espérer améliorer certaines caractéristiques des vecteurs AAV (efficacité, spécificité ou stabilité) plusieurs équipes ont créé des mutants en modifiant la capsidie par modifications rationnelles ou par évolution dirigée. Les sérotypes naturels principaux et les quelques mutants prometteurs sont détaillés dans le **Tableau 3**.

### **b. Génome AAV auto complémentaire (scAAV)**

La conversion du génome AAVr simple brin en double brin *in vivo* est décrite comme étant une étape limitante qu'elle se fasse par synthèse du second brin ou par hybridation entre les brins complémentaires ([Ferrari 1996](#), [Fisher 1996](#), [Nakai 2000](#)). Afin d'améliorer l'efficacité et d'accélérer la cinétique d'expression, 2 équipes ont développé en parallèle une méthode permettant de générer des génomes AAV auto-complémentaires capables de s'auto hybrider de façon très efficace ([McCarty 2003](#), [Wang 2003](#)). Pour cela, le génome AAVr doit être réduit de moitié (environ 2500pb) de façon à ce que la forme dimérique n'excède pas la capacité d'encapsidation d'une particule d'AAV. Cette simple modification permet d'encapsider des brins des 2 polarités avec une efficacité de 3 à 50% ([McCarty 2008](#)), mais le rendement peut être augmenté significativement (>90% de double brin complémentaire) en supprimant le site *trs* dans l'un des 2 ITR de la cassette d'expression, ce qui empêche sa résolution ultérieure par Rep 78/68 pendant la répllication dans les cellules d'encapsidation ([McCarty 2003](#), [Wang 2003](#)) (**Fig. 16**).

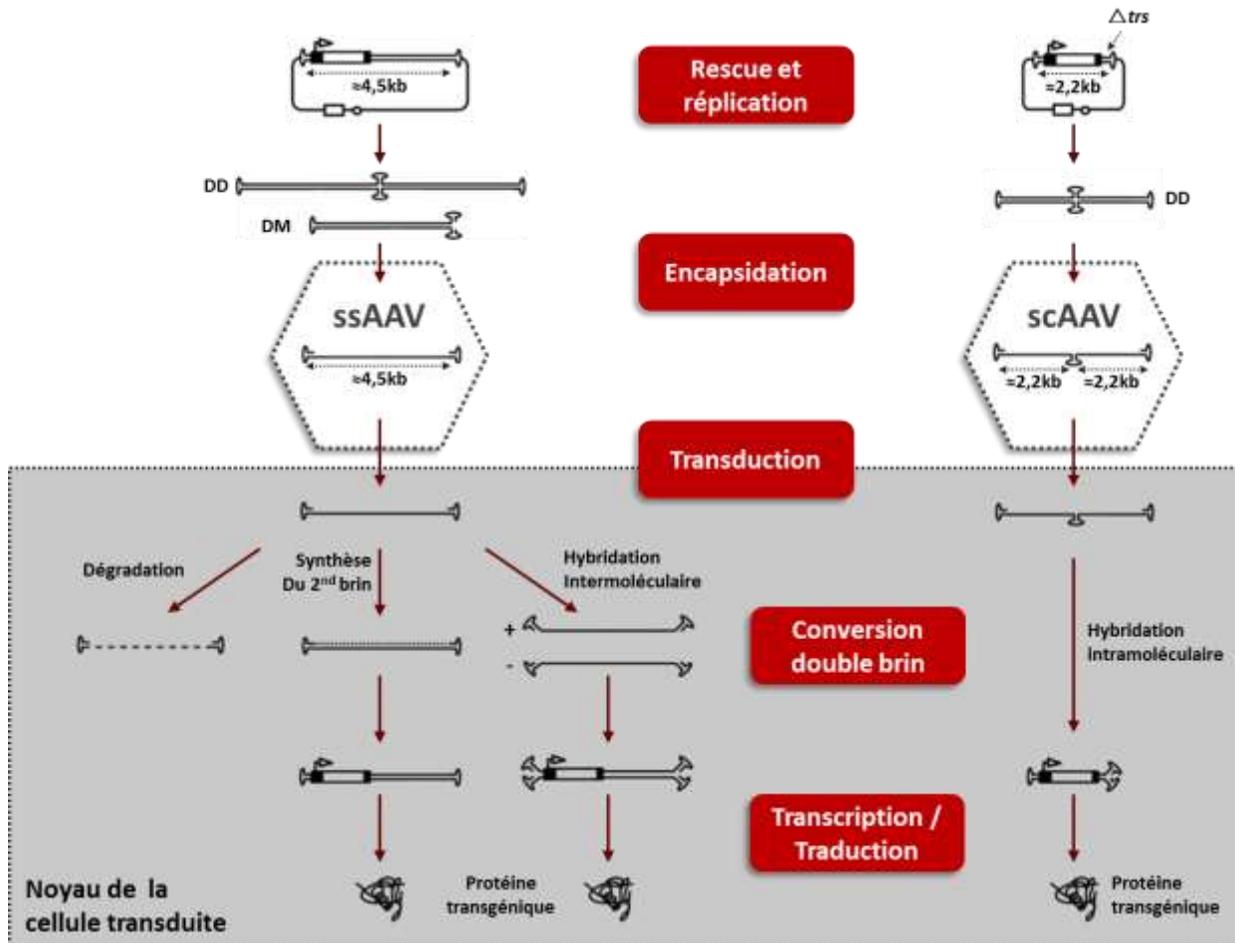


Fig. 16) Comparaison de la production et de la transduction à l'aide de vecteur ssAAV et scAAV (cc).

Adapté de [Gonçalves 2005](#).

Le principal inconvénient de ces vecteurs scAAV est la faible place disponible pour la cassette thérapeutique, ce qui limite l'application aux petites protéines et aux stratégies ARN. Dans le muscle, il a été montré qu'en comparaison avec un vecteur AAV simple brin (ssAAV), l'efficacité de transduction est comparable mais que les scAAV atteignent le maximum d'expression plus rapidement ([McCarty 2003](#), [Wang 2003](#), [Ren 2005](#) + résultats présentés dans ce manuscrit). Dans le foie, il semble en plus que l'efficacité de transduction à long terme soit 2 à 10 fois supérieure avec un vecteur scAAV ([Gao 2006](#), [Nathwani 2006](#), [Wu 2008](#)). L'utilisation d'un vecteur scAAV 2/8 dans le foie a montré récemment son efficacité lors de l'essai clinique pour le traitement de l'hémophilie B ([Nathwani 2011b](#)).

### c. Optimisation de la cassette d'expression

Jusqu'à récemment, la majorité des travaux de thérapie génique employait des cassettes d'expression contenant un promoteur viral ubiquitaire, un cDNA simple et quelques éléments génétiques minimaux. Il est devenu évident que pour permettre une expression efficace et persistante du transgène thérapeutique il convient d'adapter le promoteur, d'optimiser le cadre de lecture et d'inclure des séquences améliorant le traitement des messagers ARN par la machinerie cellulaire. Le domaine de la thérapie génique non virale est particulièrement confronté à ce genre de problème et a développé un arsenal d'améliorations qui pourrait également s'avérer bénéfique pour le transfert de gène à l'aide d'AAVr. Quelques-unes des améliorations utilisées ou prometteuses sont détaillées ci-après.

- **Efficacité et spécificité de la transcription**

Le promoteur est un élément critique de la cassette d'expression puisqu'il est directement responsable de l'initiation de la transcription du transgène. Les promoteurs viraux présentent l'intérêt d'être compacts, très efficaces et généralement exprimés dans un grand nombre de types cellulaires. Parmi les promoteurs viraux les plus utilisés on distingue le pCMV IE (Cytomegamovirus immediate early) ([Kay 2000](#)), le pSV40 (simian virus 40 early) ([Boyle 2004](#)), le pRSV (Rous sarcoma virus LTR) ([Gorman 1982](#), [Peng 2005](#)) et le pMoMLV (Moloney murine leukemia virus LTR) ([Hock 1989](#), [Muul 2003](#)). Néanmoins, ces promoteurs expriment souvent les transgènes à des niveaux non physiologiques et certains sont connus pour être progressivement éteints *in vivo* ([Paterna 2000](#), [Teschendorf 2004](#), [Magnusson 2011](#), [Gray 2011](#)). Pour outrepasser ces inconvénients, plusieurs promoteurs eucaryotes ont été incorporés dans des cassettes d'expression intégralement ou en partie. Certains de ces promoteurs sont également ubiquitaires tels que EF1 $\alpha$  (translation elongation factor 1- $\alpha$ ) ou CBA (chicken  $\beta$  actine) ([Teschendorf 2004](#), [Gray 2011](#)), alors que d'autres présentent l'avantage considérable d'être exprimés de façon préférentielle dans certains tissus comme LPL1 (Lipoprotein lipase 1) et AAT ( $\alpha$ 1 anti-trypsin) dans le foie ([Nathwani 2006](#), [Ishiwata 2009](#)) et desmine, MHCK ( $\alpha$ -myosin heavy-chain) et MCK (muscle creatine kinase) dans le muscle ([Salva 2007](#), [Wang 2008](#), [Rodino 2008](#)). L'intérêt de ces promoteurs « tissu spécifiques » est de conserver une régulation proche de celle des promoteurs endogènes et de limiter l'expression ectopique du transgène. Des promoteurs hybrides associant des éléments d'origine virale et eucaryote ont été générés et

certains possèdent les avantages de chacun de ses parents. C'est le cas par exemple des promoteurs ubiquitaires CAG et SCEP respectivement hybrides de CMV/CBA et CMV/EF1 $\alpha$  ([Magnusson 2011](#), [Gray 2011](#)) et de l'hybride muscle spécifique MCK/SV40 ([Takeshita 2007](#)).

- **Stabilité et processing des ARNm transgénique**

Chez les eucaryotes, les séquences UTR flanquant la partie codante des ARNm contiennent de nombreux éléments participant à l'efficacité des événements post-transcriptionnel dont l'épissage, le capping, l'export cytoplasmique et l'efficacité de la traduction ([Kozak 1994](#), [Derrigo 2000](#), [Mazumder 2003](#)). Ces régions peuvent notamment être reconnue par complémentarité de base par de petits ARN non codant (ncRNA) qui sont capables de modifier la stabilité ou de reprimer ou d'activer la traduction en protéine ([Fabian 2010](#)). Enfin, la présence d'une région 3'UTR « anormale » peut provoquer la reconnaissance par le NMD (non sense mediated decay), le mécanisme de contrôle qualité des ARNm eucaryotes qui élimine les ARNm aberrants ([Amrani 2004](#), [Yepiskoposyan 2011](#)). En ce qui concerne la thérapie génique, bien que de nombreux efforts aient été réalisés pour augmenter l'efficacité de transcription, l'optimisation des événements post-transcriptionnel est quant à elle généralement peu considérée. Les régions UTR sont rarement ajoutées dans les constructions utilisées, principalement à cause de leur taille qui peut être importante, par exemple pour le [facteur IX de coagulation](#) et la [dystrophine](#), les régions 3'UTR font respectivement 1400 et 10 000 pb. Il est néanmoins possible d'utiliser des séquences de stabilisation des ARNm d'origine virale plus courtes tel que le WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus post-transcriptional response element). Cette séquence non codante de 600pb semble augmenter en *cis* la stabilité et le transport de l'ARNm vers le cytoplasme ([Mastroiannopoulos 2005](#)). Il a été montré que l'insertion du WPRE ou/et de séquences UTR 5' dans la cassette d'expression d'un transgène permet une expression significativement plus élevée après transfert de plasmide nu ou à l'aide de vecteurs viraux ([Loeb 1999](#), [Miao 2000](#), [Brun 2003](#), [Hlavaty 2005](#), [Lee 2005](#), [Decressac 2012](#)).

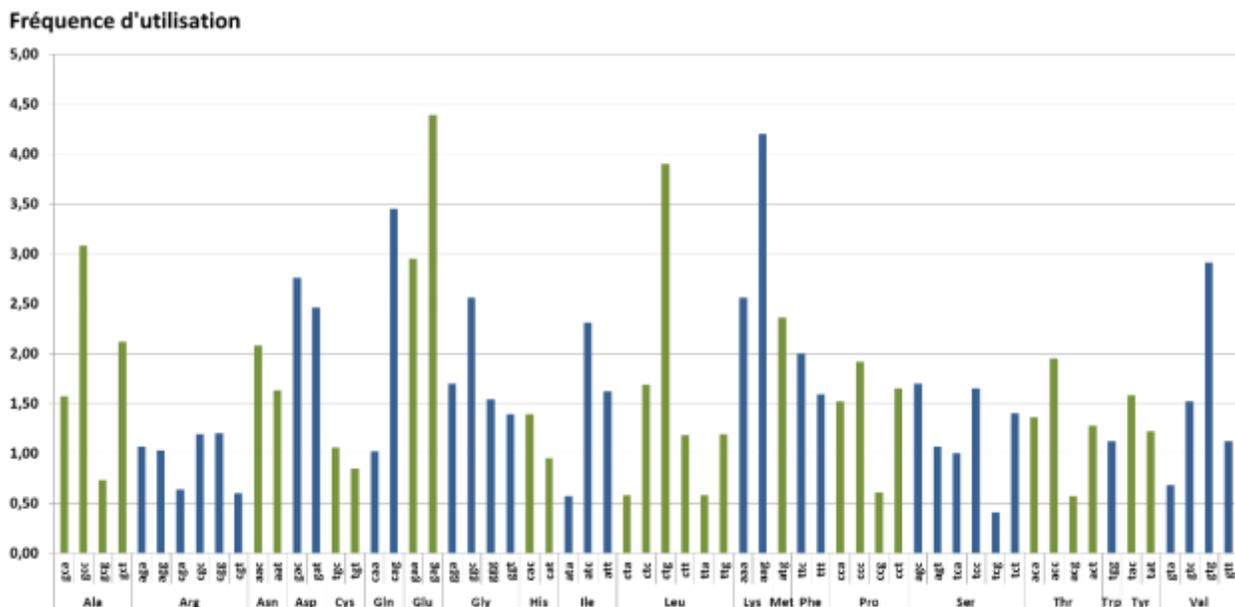
D'autre part, l'insertion d'un intron à l'intérieur ou avant le cDNA thérapeutique augmente considérablement l'efficacité de transduction à l'aide d'un AAVr ([Miao 2000](#), [Harding 2004](#), [Virella-Lowell 2005](#)). Le mécanisme n'est pas clair, mais il semblerait que la présence des séquences introniques *via* l'épissage facilite la maturation et/ou l'import cytoplasmique. L'insertion d'un intron synthétique est une amélioration assez courante des cassettes d'expression

parfois ajouté dans la cassette d'expression de vecteurs utilisés pour des essais cliniques ([Manno 2006](#), [Flotte 2004](#), [Jacobson 2006](#), [Nathwani 2011b](#)).

- **Optimisation de la traduction**

Les séquences flanquant le codon d'initiation de la traduction AUG d'un ARNm peuvent influencer la reconnaissance par les ribosomes eucaryote. Parmi ces motifs, il a été montré que la séquence consensus Kozak (gccRccATGG) est largement impliqué dans l'efficacité de la traduction des ARNm de mammifères ([Kozak 1987](#), [Louis 1988](#)). L'efficacité globale de la traduction d'un ARNm transgénique exprimé par un AAVr peut être améliorée *in vivo* grâce à l'optimisation de la séquence Kozack endogène ([Bennicelli 2008](#), [Wang 2011](#)).

L'efficacité de traduction est également influencée par le biais d'usage des codons, qui reflète le fait que tous les codons correspondants à un même à acide aminé (AA) ne sont pas représentés avec la même fréquence ([Tats 2008](#)). Les codons les plus fréquents sont généralement associés à une quantité plus importante d'ARN de transfert et sont enrichis dans les gènes hautement exprimés ([Comeron 2004](#), [Lavner 2005](#)) (**Fig. 17**).



**Fig. 17) Fréquence d'utilisation des codons chez l'homme dans les gènes hautement exprimés.**

D'après les données publiées par Lavner *et al* ([Lavner 2005](#))

Plusieurs équipes ont montrés que l'optimisation des codons du cDNA transgénique permet d'augmenter l'efficacité de traduction de l'ARNm ([Fattori 2005](#), [Nathwani 2006](#), [Wu 2008](#), [Foster 2008](#)). Dernièrement Binny *et al* montrent une augmentation de l'efficacité de la traduction de près de 30 fois après injection d'un AAV codant pour le facteur VII de coagulation dont les codons du cDNA ont été optimisés chez la souris ([Binny 2012](#)).

L'optimisation de la séquence Kozak et de l'usage des codons sont des modifications relativement simples à mettre en œuvre et qui ne requièrent pas de place supplémentaire dans la cassette d'expression mais sont pourtant encore rarement utilisées.

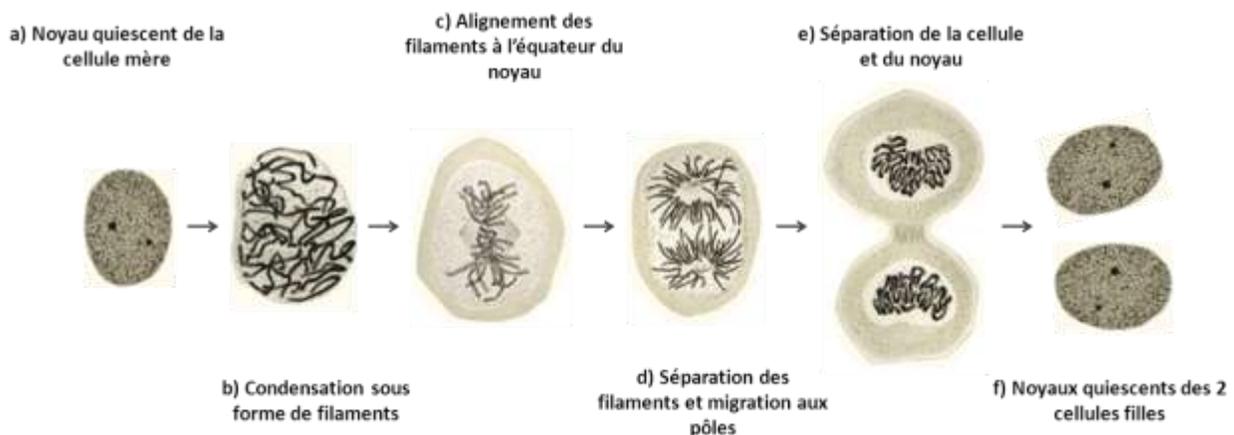
### **I.3.3.3. Combinaison des améliorations**

Les nombreuses optimisations développées ces dernières années permettent désormais d'atteindre une efficacité de transduction plus élevée sans augmentation des doses administrées. Il est parfaitement envisageable de créer un protocole sur mesure en combinant plusieurs d'entre elles pour augmenter encore l'efficacité du transfert et de l'expression du transgène. Par exemple pour cibler le muscle un protocole optimisé pourrait être le suivant : injection par voie intraveineuse régionale ([Toromanoff 2010](#)) d'un ssAAV mutant 2i8 ([Asokan 2010](#)) dont la cassette d'expression contient un promoteur dérivé du MHCK (770pb) ([Salva 2007](#)), un intron synthétique (150pb), une séquence Kozack optimisée (10pb), un cDNA dont les codons sont optimisés (environ 3000pb), une séquence WPRE (700pb) ([Loeb 1999](#)) et un polyA viral (200pb). Enfin un ou plusieurs traitements pharmacologiques pourraient être co-administrés tel que l'inhibiteur de protéase Bortezomib ([Nathwani 2009](#)). Cet exemple a seulement pour but de mettre en évidence la possibilité d'orienter de façon préférentielle le devenir des vecteurs AAVr *in vivo* en fonction de l'application ciblée. Ces différentes améliorations sont le fruit d'un travail préalable de dissection des interactions cellulaires et moléculaires des vecteurs AAVr après administration *in vivo*. Cependant, de nombreuses facettes de leur biologie demeurent encore obscures et recèlent certainement de nouvelles possibilités d'optimisation de l'efficacité de transduction, avec à la clef une diminution de la quantité de particules administrées et des potentiels effets indésirables associés. Parmi ces zones d'ombres, figurent l'impact des régulations épigénétiques endogènes sur la régulation du transgène thérapeutique ainsi que les perturbations induites par la présence du génome viral sur l'épigénome de la cellule hôte.

# I.4. Chromatine et régulation de la transcription

## I.4.1. Rôle structurel de la chromatine dans le noyau interphasique

La quasi-totalité de nos  $10^{14}$  cellules contiennent chacune environ  $3.10^9$  pb d'ADN soit près de 2 mètres linéaires. Pour entrer dans le noyau cellulaire eucaryote mesurant de 5 à 10  $\mu\text{m}$ , l'ADN génomique doit être associé à un système de compaction efficace. Bien avant de découvrir la structure de l'ADN en 1880 Walter Flemming observe en microscopie une substance nucléaire qu'il nomme chromatine (khroma = coloré) à l'aide d'un colorant basophile à base d'aniline ([Flemming 1882](#), [Paweletz 2001](#)). Il note également que lors de la mitose cette substance se compacte fortement pour se répartir dans les deux cellules filles (**Fig. 18**), mais ne fait pas le lien avec l'hérédité des caractères décrit par Mendel ([Mendel 1865](#)).

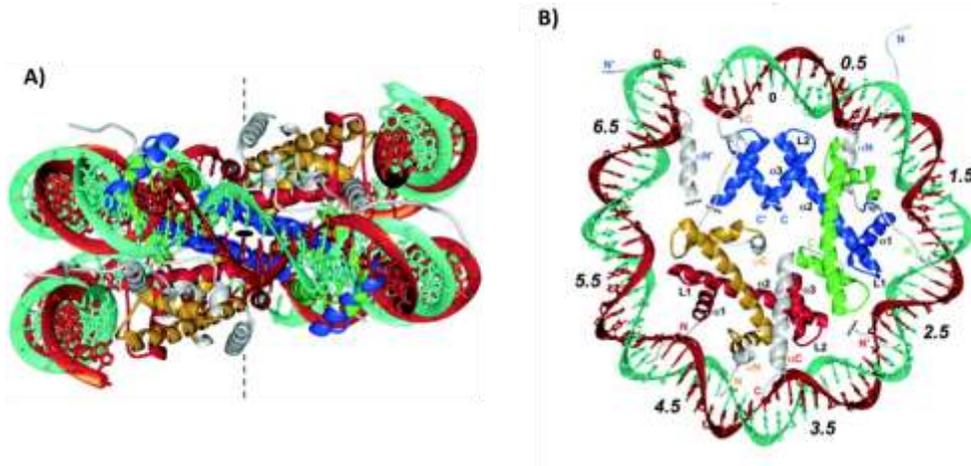


**Fig. 18) Illustration de la division cellulaire et de la condensation de la chromatine.**

Tiré des observations de Walter Flemming ([Flemming 1882](#))

La biologie moderne nous a appris que l'ADN est un polymère dont le squelette phosphate négativement chargé entraîne la répulsion électromagnétique des régions adjacentes, ce qui ne facilite pas son repliement en 3 dimensions. Le premier niveau de compaction de l'ADN s'accompagne de la neutralisation partielle des charges négatives par association avec des complexes protéiques basiques constitués principalement d'histones. L'unité fondamentale de la chromatine ou nucléosome est composée de 146 pb d'ADN enroulés 1,7 tour autour d'un

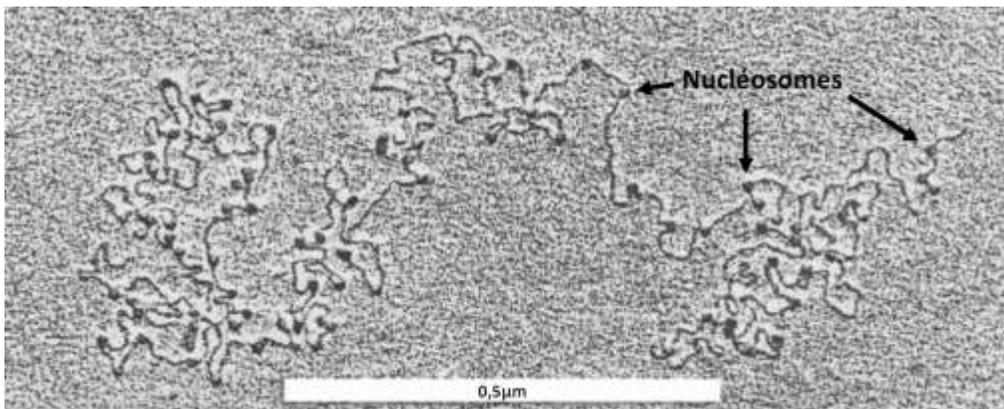
octamère protéique comprenant deux exemplaires de chacune des histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4 (**Fig. 19**) ([Kornberg 1999](#), [Ridgway 2001](#)). Les histones possèdent des queues terminales riches en acides aminés lysine et arginine chargés positivement qui neutralisent environ 60% des charges négatives portées par l'ADN du nucléosome ([Davey 2000](#)).



**Fig. 19) Structure d'un nucléosome obtenu par cristallographie à une résolution de 1,9Å.**

ADN = Double hélice verte/rouge. Histones = protéines centrales représenté en bleu, vert, rouge et jaunes. (a) vue du dessus, (b) vue de côté. Tiré de [Davey 2000](#).

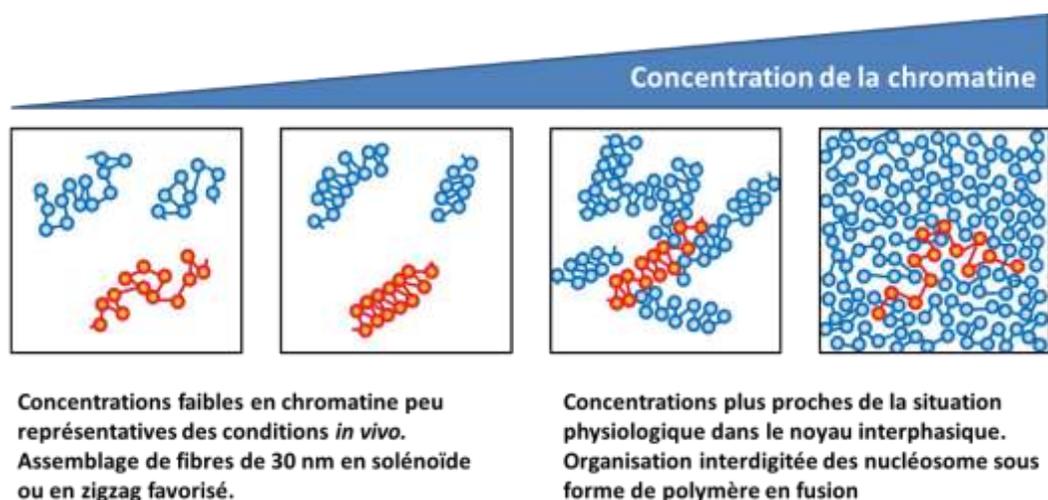
Les nucléosomes sont reliés entre eux par de l'ADN linker et leur répétition le long de l'ADN cellulaire forme une structure caractéristique en collier de perle observé pour la première fois par microscopie électronique en 1975 ([Oudet 1975](#)) (**Fig. 20**).



**Fig. 20) Observation en microscopie électronique de la structure en collier de perle de la chromatine.**

Association de l'ADN de l'Adénovirus 2 avec les histones H2A, H2B, H3 et H4 *in vitro*. D'après [Oudet 1975](#)

En plus des histones de l'octamère cœur, la protéine histone H1 est située à l'extérieur du nucléosome au niveau de la zone d'entrée et de sortie de l'ADN. Elle n'est pas indispensable à la formation de la structure en collier de perle, mais semble jouer avec l'aide des cations  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  un rôle important dans la neutralisation des charges restantes de l'ADN et la stabilisation des formes d'organisation supérieures de la chromatine ([Strick 2001](#), [Happel 2008](#), [Grigoryev 2009](#), [Caterino 2011](#)). La vision dogmatique de l'organisation de la chromatine dans le noyau décrit la formation spontanée d'une hélice en solénoïde ou en zigzag pour former une fibre d'environ 30nm par association avec les nucléosomes voisins (**Fig. 21**) ([Finch 1976](#), [Woodcock 1984](#), [Dorigo 2004](#), [Grigoryev 2009](#), [Kruithof 2009](#)). Cependant, ces dernières années ce modèle classique a été mis à mal par plusieurs travaux suggérant que la fibre de 30nm est artificiellement créée du fait des faibles concentrations en chromatine utilisées ou de divers artefacts de préparation ([Bouchet-Marquis 2005](#), [Eltsov 2008](#), [Maeshima 2011](#), [Nishino 2012](#)). Dans le noyau des cellules eucaryotes dans lequel la chromatine est particulièrement dense, l'organisation du noyau interphasique serait donc plus vraisemblablement celle d'un polymère en fusion, c'est-à-dire majoritairement une association inter-fibre avec des nucléosomes pouvant être distants (**Fig. 21**) ([Fussner 2010](#), [Maeshima 2010](#)). Néanmoins, l'association sous forme de fibre de 30nm n'est pas exclue dans des conditions particulières et de façon transitoire. Le modèle de polymère en fusion est corroboré par les analyses de modélisations bio-physiques ([Stehr 2008](#), [Fudenberg 2012](#)) et présente l'avantage de pouvoir expliquer plus simplement l'organisation nucléaire dynamique en régions fonctionnelles (voir section suivante).

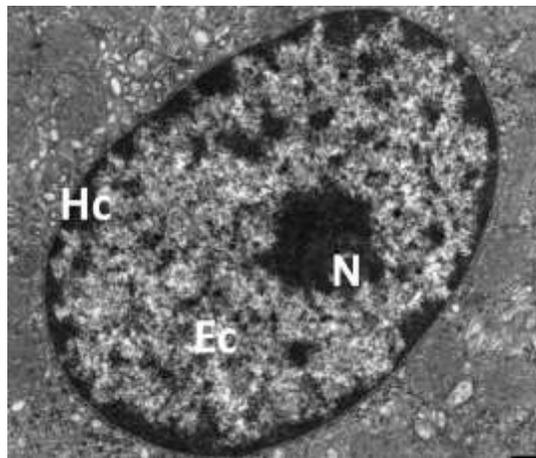


**Fig. 21) Organisation de la chromatine en fonction de la concentration.**

Adapté d'[Eltsov 2008](#)

## I.4.2. Organisation fonctionnelle du noyau interphasique

Malgré le degré élevé de compaction de la chromatine dans le noyau interphasique des cellules eucaryotes, l'ADN génomique doit rester accessible pour les facteurs intervenant dans la recombinaison, la réplication, la réparation et la transcription. En 1928, Emil Heitz découvre que la chromatine est marquée plus ou moins fortement en fonction de la localisation dans le noyau. Ce marquage différentiel correspond à des régions de chromatine condensées ou plus relâchées que Heitz dénommera respectivement hétérochromatine (HC) et euchromatine (EC) ([Heitz, 1928](#)). Depuis, cette observation a été confirmée de façon plus précise par plusieurs techniques, dont la microscopie électronique à transmission (**Fig. 22**).



**Fig. 22) Ultrastructure d'un noyau en microscopie électronique à transmission.**

L'hétérochromatine (HC) apparaît en noir le long de la membrane nucléaire, en périphérie du nucléole (N) et sous forme de foci de tailles variables à l'intérieur du noyau. L'euchromatine (EC) est constituée des régions plus claires. Noyau de cellule pariétale d'estomac de rat. Crédit [Atlas de microscopie électronique du Dr H. Jastrow](#)

En plus de son rôle structural, la chromatine est également largement responsable de la régulation de la transcription des gènes. De façon très caricaturale, les régions de chromatine peu compactées et compatibles avec la transcription correspondent à l'EC. Par opposition, l'hétérochromatine plus compacte est associée à une répression de la transcription ([Dillon 2004](#), [Huisinga 2006](#)). L'hétérochromatine est elle-même composée de 2 grands types de structures différentes. L'hétérochromatine constitutive (cHC) correspond aux régions hautement condensées du génome et comprend souvent des régions répétées. Les rares gènes contenus dans ces régions sont généralement éteints de façon constitutive ([Dimitri 2009](#)). L'hétérochromatine facultative

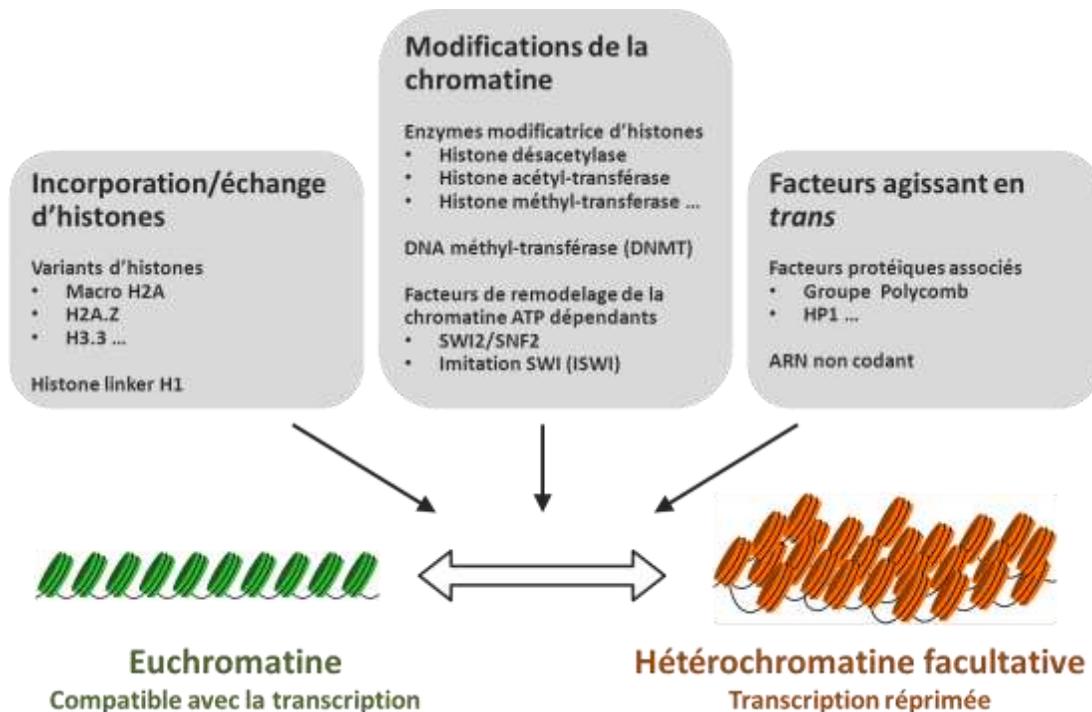
(fHC) décrit les régions de chromatine plus malléables, sujettes à une répression transcriptionnelle mais pouvant transiter vers une structure chromatinienne active ([Trojer 2007](#)). L'organisation fonctionnelle de la régulation de la transcription au sein du noyau est en fait beaucoup plus complexe d'un système binaire EC/HC. Le noyau interphasique est constitué d'un grand nombre de compartiments sub-nucléaires discrets associés à des activités spécifiques. La transcription des ARN ribosomiaux est localisée principalement au niveau des nucléoles ([Németh 2011](#)), la transcription des gènes codant pour les histones dans les histones locus bodies ([Nizami 2010](#)) et la biogénèse des petits ARN nucléaires dans les corps de Cajal ([Staněk 2008](#)). Plus récemment les RNAPII (ARN polymérase II) factories ont été décrits comme étant des foci persistants de transcription active ([Mitchell 2008](#)). Les régions centromériques et la proximité de la lamina sont généralement associées avec une répression de la transcription ([Shaklai 2007](#), [Kind 2010](#)).

### **I.4.3. Chromatine et modulation de l'expression des gènes**

L'étape initiale de l'expression d'un gène est la transcription de l'ADN en une copie ARN. L'accessibilité de la région promotrice du gène en question par les facteurs de transcription (TF) est capitale pour l'initiation de la transcription. La structure compacte de l'hétérochromatine associée à une densité plus forte en nucléosome défavorise très clairement la possibilité de recrutement des TF et de la RNAPII ([Trojer 2007](#), [Gibney 2010](#)). Cette structure peut être modulée dynamiquement par de nombreux facteurs qui sont capables de provoquer la transition locale entre fHC et EC. Les mécanismes qui contrôlent cette transition sont qualifiés d'épigénétiques car ils provoquent un changement de l'expression des gènes pouvant être éventuellement transmis au cours de la division cellulaire sans altération de la séquence d'ADN. Cette régulation épigénétique intervient lors du développement embryonnaire ([Feng 2010](#), [Jammes 2011](#)), de la différenciation/régénération cellulaire ([Brand-Saberi 1999](#), [Sartorelli 2011](#), [Katsuyama 2011](#)) et de la répression des éléments transposables du génome cellulaire ([Suzuki 2007](#), [Rosser 2010](#)) mais est également largement exploitée par de nombreux virus pour le contrôle de leur cycle viral ([Lieberman 2008](#), [Hoelzer 2008](#)) (Cf. **I.4.2**)

Les causes moléculaires de la modulation ou de la maintenance de la structure chromatinienne sont encore incomplètement comprises, mais il est largement accepté qu'elles sont le résultat de la combinaison de plusieurs facteurs (**Fig. 23**). Parmi ces facteurs, ce manuscrit

sera exclusivement focalisé sur les modifications de la chromatine, comprenant la méthylation des dinucléotides CG (CpG) de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones.



**Fig. 23) Facteurs participant à la transition de l'euchromatine en hétérochromatine (cc).**

Ces facteurs peuvent être classés en 3 grandes catégories: (i) l'incorporation d'histone H1 ou l'échange des protéines histones canoniques par des variants ([Talbert 2010](#)) (ii) l'influence de facteurs agissant en *trans* tels que certains ARN non codant, ou des protéines non histones associées à la chromatine ([Rajasekhar 2007](#)) et/ou (iii) les complexes de remodelage de la chromatine de la famille SWI ainsi que les modifications covalentes de l'ADN ou des protéines histones. Cette dernière catégorie comprend 2 types de modifications épigénétiques très largement documentées : la méthylation CpG de l'ADN au niveau des promoteurs (Cf. **I.4.3.1**) et les modifications post-traductionnelles (PTM) des histones par ajout de groupements chimiques variés (Cf. **I.4.3.2**).

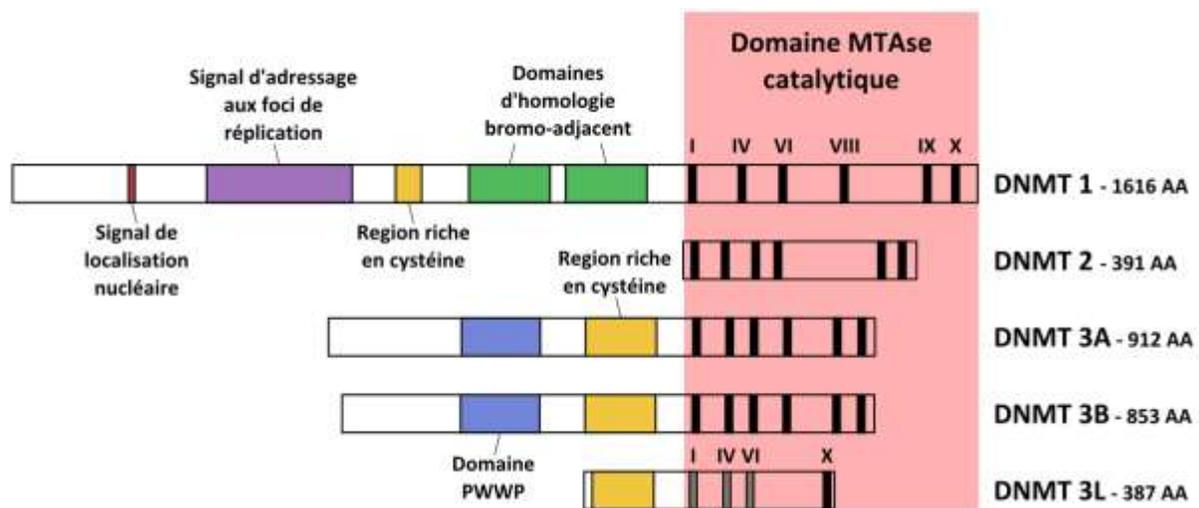
### **I.4.3.1. La méthylation de l'ADN**

L'hyper-méthylation des CpG de l'ADN au niveau des régions promotrices est une modification épigénétique fondamentale reconnue comme étant une marque de répression de la transcription à long terme associée à l'hétérochromatine chez les mammifères ([Miranda 2007](#)). Elle est généralement stable au cours des divisions cellulaires et impliquée dans le contrôle des éléments viraux endogènes ([Suzuki 2007](#), [Rosser 2010](#)), l'inactivation de l'X ([Sado 2004](#), [Sharp 2011](#)), l'empreinte parentale ([Lalande 1996](#), [LaSalle 2007](#)) et le développement embryonnaire

([Geiman 2010](#)).

### a. Enzymes impliquées dans la méthylation et la deméthylation de l'ADN

Les cellules eucaryotes ont à leur disposition un panel de mécanismes permettant de méthyler ou deméthyler l'ADN. Chez les mammifères, la réaction de méthylation des CpG est catalysée par des ADN méthyl-transférases (DNMT) qui ajoutent un groupement méthyle sur le carbone 5 d'une cytosine (**Fig. 25**). Plusieurs DNMT ayant des fonctions différentes ont été identifiés chez les mammifères : DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L (**Fig. 24**) ([Goll 2005](#)).



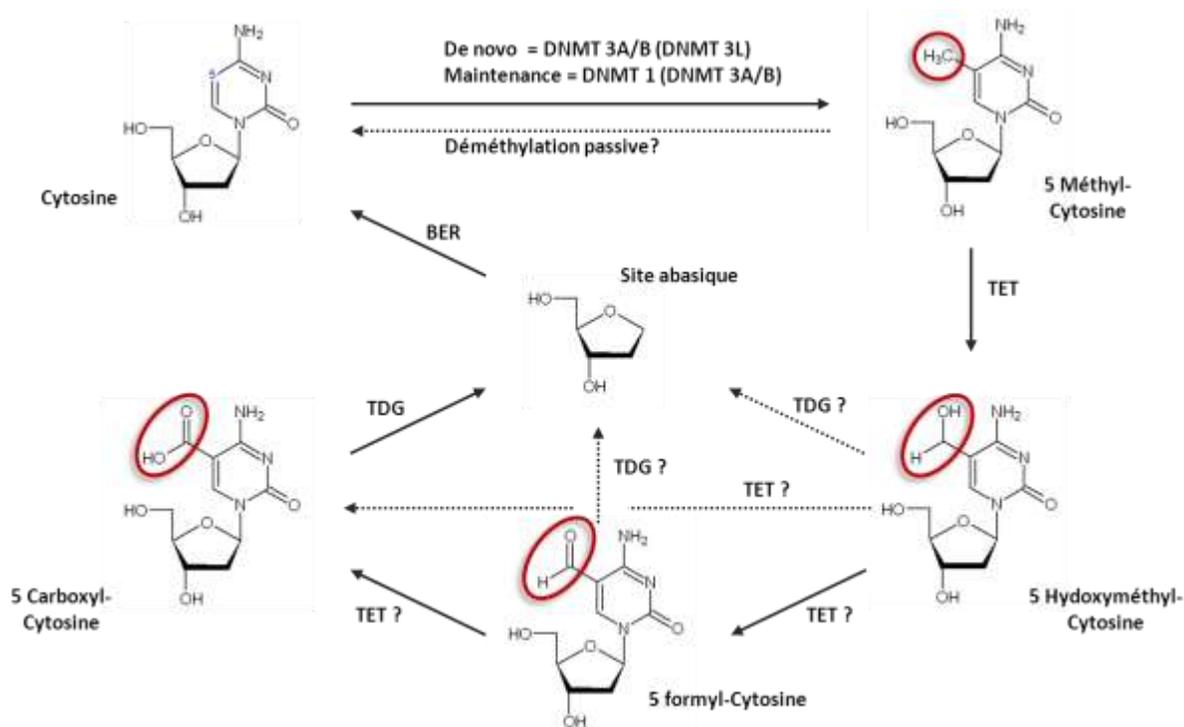
**Fig. 24) Représentation comparative des domaines fonctionnels des différentes DNMT des mammifères (cc).**

Adapté de [Cheng 2008](#) et [Goll 2005](#)

Parmi les 3 méthyl-transférases de la famille DNMT3, seules DNMT3A et DNMT3B (DNMT3A/B) possèdent un domaine catalytique MTase complet. Elles sont responsables de la maintenance *de novo* de l'ADN, c'est-à-dire de la mise en place de la méthylation sur les matrices ADN non méthylées. Ce rôle est particulièrement documenté lors des étapes précoces de l'embryogénèse au cours de la reprogrammation épigénétique et de la mise en place de l'empreinte parentale ([Kim 2008](#), [Geiman 2010](#)). DNMT3L est exprimée spécifiquement dans la lignée germinale et lors de l'embryogénèse. Malgré l'absence d'activité catalytique, elle participe également à la mise en place de la méthylation *de novo* en régulant l'activité des DNMT3A/B ([Chen 2005](#), [Suetake 2005](#)). Le patron de méthylation est ensuite maintenu au cours des divisions cellulaires principalement par DNMT1 qui recopie la méthylation sur le brin nouvellement

synthétisé au cours de la réplication. ([Song 2012](#)). DNMT3A/B sont également en partie responsables de la méthylation de maintenance ([Goll 2005](#)). Enfin DNMT2 qui est constituée uniquement du domaine MTase possède une activité faible *in vitro* et ne semble pas participer à la mise en place de la méthylation au cours de l'embryogénèse ([Okano 1998](#), [Hermann 2003](#)). En revanche, il semblerait qu'elle joue un rôle important dans la méthylation des cytosines des ARN de transfert ([Goll 2006](#), [Jurkowski 2008](#)). De façon intéressante, Robertson *et al* ont montré que les DNMT1, 3A et 3B sont exprimées en quantité comparable dans les tissus embryonnaires et les tissus quiescents adultes chez l'homme (dont le foie et le muscle) ([Robertson 1999](#)). D'autre part il a été décrit que DNMT3A/B sont localisés dans les noyaux des hépatocytes de foie de rats adultes et qu'elles présentent une activité de méthylation détectable sur matrice ADN hémiméthylé et non méthylé ([Majumder 2002](#)). Il semble donc que les fonctions de méthylation *de novo* soient présentes et active dans les noyaux des tissus quiescents.

Jusqu'à il y a peu de temps, aucun mécanisme actif de déméthylation n'avait été clairement identifié. Il était donc supposé que la méthylation de l'ADN était stable et que la réaction de déméthylation était probablement une réaction lente et passive ([Ooi 2008](#)). Récemment, plusieurs études ont mis en évidence l'implication de mécanismes enzymatiques actifs de déméthylation des CpG chez les mammifères ([Wu 2010](#), [Nabel 2011](#)). Bien que le tableau général soit encore flou, les mécanismes les plus convaincants chez les mammifères sembleraient faire intervenir soit le système de réparation par excision de base BER (base excision repair) ([He 2011](#)), soit une succession d'oxydation par des membres de la famille TET (Ten-Eleven Translocation) ([Ito 2011](#), [Williams 2011](#)). Une combinaison des 2 hypothèses est également envisageable ([Gong 2011](#)) (**Fig. 25**). Ces mécanismes de déméthylation enzymatique seraient responsables de la déméthylation massive lors de l'embryogénèse précoce ([Oswald 2000](#)). Plus récemment, Yamagata *et al* ont montré dans 2 modèles cellulaires musculaire et hépatique que contrairement au dogme établi, la méthylation ne serait pas une marque stable à long terme, mais serait soumis à un renouvellement continu par équilibre entre les réactions de méthylation et de déméthylation ([Yamagata 2012](#)). Même si ces résultats restent à confirmer *in vivo*, ce travail revêt un intérêt particulier pour le domaine de la thérapie génique car l'activité continue des enzymes impliquées dans la méthylation et la déméthylation de l'ADN pourrait avoir des conséquences sur le niveau d'expression du transgène thérapeutique dans le muscle et le foie.



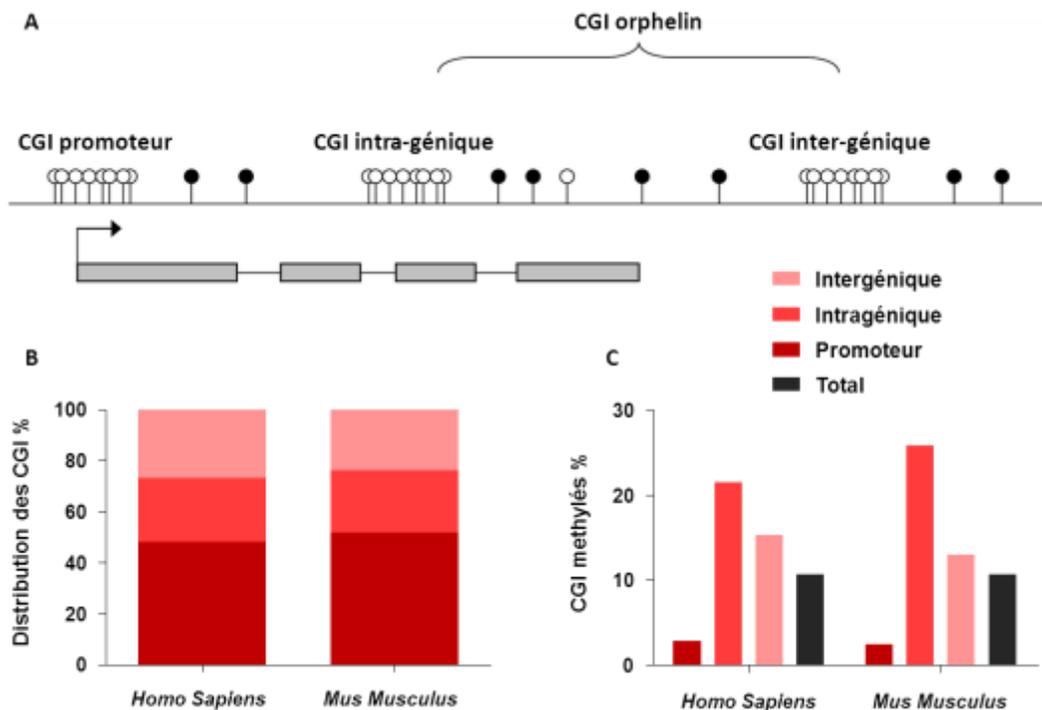
**Fig. 25) Mécanismes de méthylation et de déméthylation probables des cytosines chez les mammifères (cc).**

La méthylation des cytosines est une réaction bien caractérisée, catalysé par DNMT 3A/B aidées de DNMT 3L dans le cas de la méthylation *de novo*. La méthylation de maintenance est assurée par DNMT1 et dans une moindre mesure par DNMT3A/B. Le S-adenosyl-méthionine (SAM) est un cofacteur indispensable des DNMT. La réaction de deméthylation est nettement moins claire. Il n'est pas exclue qu'elle puisse en être partie passive. Un mécanisme convaincant récemment proposé est présenté dans cette figure. Il semblerait que les enzymes de la famille TET participent à une série d'hydroxylation aboutissant à la synthèse itérative de dérivés de la 5 Methyl-Cytosine de plus en plus oxydés > 5 Hydroxymethyl-Cytosine > 5 Formyl-Cytosine > 5 Carboxyl-Cytosine (Ito 2011). A partir de l'un de ces composés, la Thymine DNA glycosylase serait capable d'exciser la base modifiée aberrante pour aboutir à un site abasique corrigé par la suite par la voie de réparation de l'ADN BER (He 2011).

## b. Distribution de la méthylation de l'ADN dans le génome

En fonction des types cellulaires et des tissus, environ 70 à 90% des CpG présents dans le génome des mammifères sont méthylés. Néanmoins, la répartition des CpG et de leur statut de méthylation dans le génome n'est pas aléatoire (Takai 2002, Deaton 2011a). L'environnement génomique général est relativement pauvre en CpG par rapport à la fréquence théorique attendue et les CpG sont méthylés dans leur grande majorité. Au contraire, certaines régions du génome sont relativement denses en CpG et sont majoritairement non méthylées. Les régions de plus de 500pb contenant plus de 55% de CG et ayant un ratio CpG observés/attendus supérieur à 0,65 (Takai 2002 Takai 2003) sont appelées îlots CpG (CGI) (Fig. 26 A). De façon intéressante, 72%

des promoteurs annotés dans le génome humain sont riches en CpG avec un enrichissement notable à proximité immédiate des sites d'initiation de la transcription ([Saxonov 2006](#)). Si on se réfère à la définition de Takai *et al* donnée ci dessus, environ 50% des CGI sont localisés dans les promoteurs humains ou murins. Les 50% restants sont qualifiés de CGI orphelins et sont localisés pour moitié dans les gènes (CGI intragénique) et pour moitié dans les régions intergéniques (**Fig. 26 B**) ([Illingworth 2010](#), [Maunakea 2010](#)). Les auteurs montrent également que les CGI des promoteurs sont nettement moins prompts à être hyperméthylés que les CGI orphelins (environ 3% contre 20%) (**Fig. 26 C**). Parmi les 3% de CGI présents dans les promoteurs qui sont hyperméthylés figurent de nombreux gènes qui sont éteints au cours de la différenciation cellulaire ([Strichman 2002](#), [Shen 2007](#)). Les CGI orphelins intra-géniques sont quant à eux les plus enclins à être méthylés dans les cellules différenciées. Deux équipes ont montré récemment que la méthylation des CGI intra-géniques serait impliqué dans le contrôle des transcrits alternatifs en régulant de façon tissu spécifique les promoteurs intra-géniques ([Maunakea 2010](#), [Deaton 2011b](#)).



**Fig. 26) Distribution et fréquence de méthylation des CGI dans les génomes humain et murin.**

A) Schéma de la position des CGI présents au niveau des promoteurs, du corps des gènes ou en position intra génique (tiré de [Deaton 2011a](#)). B) Distribution des CGI dans les différentes régions précédemment explicitées et C) pourcentages respectifs de méthylation adapté des données publiées par Illingworth *et al* ([Illingworth 2010](#)).

### c. Implication de la méthylation de l'ADN dans le silencing de la transcription

La méthylation des CpG est corrélée depuis plus de 30 ans à la répression de la transcription ([McGhee 1979](#), [Van der Ploeg 1980](#), [Kruczek 1982](#)). Il a été montré à plusieurs reprises que l'utilisation d'inhibiteurs de DNMT est corrélée avec la réactivation de gènes éteints et qu'au contraire l'introduction d'agents méthylant est associée à l'inactivation de gènes actifs ([Xiang 2008](#), [Fujiki 2009](#), [Qiang 2010](#), [Fuso 2011](#)). Cependant son implication directe dans la répression site spécifique de la transcription est encore un sujet de polémique à l'heure actuelle. La méthylation des CpG au niveau des promoteurs est-elle responsable de l'initiation de silencing et/ou du maintien de l'état réprimé ou simplement une marque d'hétérochromatine sans conséquence sur son environnement ?

Raynal *et al* ont montré en utilisant de nombreux inhibiteurs de modifications répressives des histones qu'il est possible de réactiver la transcription au niveau de nombreux locus méthylés et éteints sans changement du niveau de méthylation dans des cellules humaines. Néanmoins, après arrêt du traitement les gènes retournent vers un état transcriptionnel inactif en quelques semaines ([Raynal 2012](#)). Cette observation est cohérente avec les travaux de Kass *et al* qui montrent qu'après micro-injection d'ADN méthylé dans le noyau d'ovocytes de Xenopus la transcription est efficace dans un premier temps, puis décroît en une douzaine d'heures ([Kass 1997](#)). Ces 2 études suggèrent que la méthylation seule n'est pas suffisante pour empêcher la transcription, mais qu'elle est responsable du recrutement de partenaires impliqués dans l'extinction de la transcription. Auparavant, McGarvey *et al* avait mis en évidence la possibilité de réactiver les gènes contrôlés par des promoteurs pauvres en CpG, mais pas ceux dont les promoteurs contiennent des CGI hyper-méthylés ([McGarvey 2007](#)). Au final, il semble que la méthylation de l'ADN ne soit peut être pas directement responsable du silencing transcriptionnel mais empêche sa réactivation à long terme en jouant un rôle de gardien ou de mémoire de l'état d'activation des gènes. Dans certains cas, il a néanmoins été montré que la méthylation des CpG empêche directement la fixation de TF notamment c-myc et CTCF ([Prendergast 1991](#), [Bell 2000](#)). Le phénomène semble être restreint à quelques TF et suggère que dans la majorité des cas d'autres mécanismes sont en jeu. Les CpG méthylés sont spécifiquement reconnus par les protéines de la famille MBD (Methyl-CpG Binding Domain) comprenant MBD1, MBD 2, MBD 3 et MBD 4 et MeCP2 ainsi que les protéines à doigt de zinc Kaiso, ZBTB4 et ZBTB38 ([Sansom 2007](#), [Prokhortchouk 2008](#)). De nombreuses études décrivent l'interaction des protéines MBD

avec des complexes intervenant dans la formation et la maintenance de l'hétérochromatine ([Sansom 2007](#)). MeCP2 peut recruter le complexe corépresseur Sim3 qui contient les histones déacétylases 1 et 2 qui introduisent des modifications répressives sur les histones ([Fuks 2003](#), [Suzuki 2003](#)). Il a été également décrit que Brahma, l'un des composants catalytiques du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF est associé *in vitro* avec MeCP2 au niveau de gènes réprimés ([Harikrishnan 2005](#)). L'histone méthyl-transférase Suv39h et HP1 (heterochromatin protein 1), 2 protéines classiquement retrouvées dans l'hétérochromatine sont quant à elles capables de se fixer sur MBD1 ([Fujita 2005](#)). Il semble donc que la méthylation des CpG attire à elle *via* les MBP de nombreux partenaires impliqués dans la formation et la maintenance de l'hétérochromatine tout en excluant les intervenants moléculaires participant à la mise en place de l'EC ([Okitsu 2007](#))

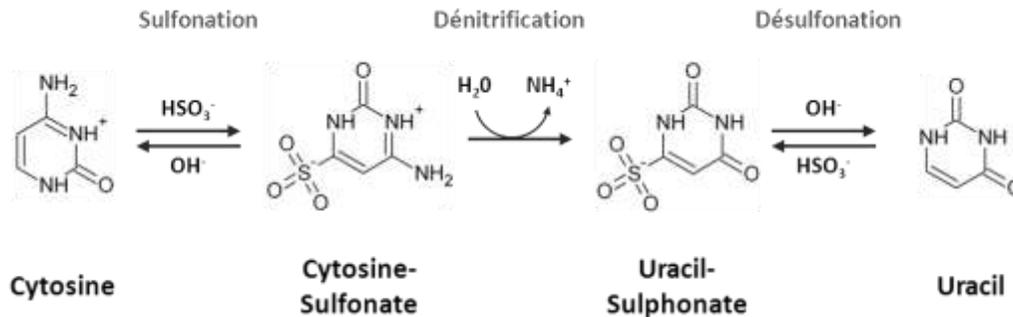
En ce qui concerne l'établissement de la méthylation *de novo*, elle a surtout été documentée lors de la re-méthylation au moment de l'embryogénèse et lors de la différenciation cellulaire. Il semblerait que plusieurs mécanismes puissent être responsables du ciblage de certaines régions génomiques.

- La première possibilité est l'attraction des DNMT 3A/B au niveau des zones de chromatine portant des caractéristiques de répression typique de l'hétérochromatine telle qu'HP1 et la présence conjointe de 2 modifications d'histone répressives H3K9me2/3 et H3K27me3.
- La seconde alternative est l'initiation puis la propagation de la méthylation à partir de séquences ADN spécifique. Le phénomène a déjà été décrit chez la souris et l'homme au niveau des transposons B1/Alu, B2 et LINE (Long INterspersed Elements) et ferait intervenir des petits ARN non codants ([Graff 1997](#), [Yates 1999](#), [Liang 2002](#)).

#### **d. Techniques d'analyse de la méthylation des CpG**

Différentes technologies permettent l'étude de la méthylation de l'ADN à l'échelle d'un locus particulier ou de génomes complets. Les méthodes de discrimination entre cytosines méthylées ou non méthylées sont variées : utilisation d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation, séparation par chromatographie, anticorps anti 5mC (Cytosine méthylé en 5') ou traitement chimique au bisulfite de sodium (Tableau 4). A l'issue de la conversion bisulfite, on obtient une information de type polymorphisme de séquence C/T qui est facilement accessible par de nombreuses techniques ([Wang 1980](#)), ce qui a considérablement amélioré la résolution et

la précision des analyses du profil de méthylation de l'ADN (**Fig. 27**).



**Fig. 27) Détail de la réaction chimique de conversion bisulfite (cc).**

Le principe repose sur une réactivité chimique différente entre Cytosine et 5mC en présence du bisulfite de sodium. Les cytosines non méthylées sont sulfonées beaucoup plus rapidement que les que les 5mC ([Wang 1980](#)). En tirant partie de cette cinétique différentielle, il est possible de changer les cytosines non méthylées en uracile sans modifier les cytosines méthylées. Après une PCR, les uraciles sont remplacés par des thymines.

Parmi le grand nombre de méthode d'analyses développées certaines sont quantitatives et d'autre non, certaines donnent une évaluation de la méthylation globale d'une région et d'autres pour chaque CpG (Tableau 4). Au cours de la dernière décennie sont apparue des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS = next-generation sequencing) dont le pyroséquençage fut la première. Ces technologies permettent de générer des centaines de millions de réactions de séquençages en parallèle avec à la clef la possibilité d'obtenir la séquence de chaque molécule d'ADN individuellement ([Metzker 2010](#), [Zang 2011](#)). En combinaison avec la conversion bisulfite, il est possible d'obtenir une méthode extrêmement précise d'analyse de la méthylation d'une région candidate ou de génomes complets combinant tous les avantages, si ce n'est pour le moment en coût encore plus élevé que les autre méthodes ([Gupta 2010](#)).

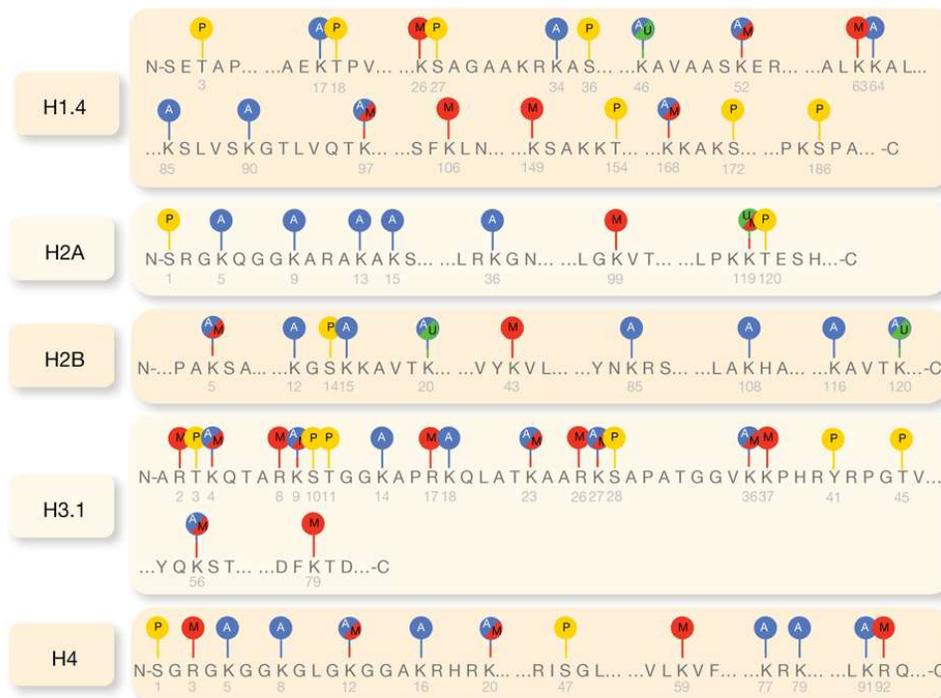
Technique d'analyse	Résolution	Cible	Discrimination	Détection	Quantification	Sensibilité	Remarque	Références
<b>ER sensibles à la méthylation</b>	CpG individuel	Quelques CpG par digestion au mieux	Enzymes de restriction sensibles à la méthylation	PCR ou Southern Blot	Semi quantitative	Faible à modérée	Uniquement pour les CpG dans un site de restriction. Faux positifs si digestion incomplète.	<a href="#">Cedar 1979</a> <a href="#">Kutueva 1996</a>
<b>MeDIP</b>	Globale	Génome entier	Anticorps anti 5mC	PCR ou séquençage NGS	Relative pour une région donnée	Faible	Sensibilité plus faible dans les régions pauvres en CpG ce qui entraîne un biais de couverture	<a href="#">Weber 2005</a> <a href="#">Maunakea 2010</a>
<b>COBRA</b>	CpG individuel	Quelques CpG par digestion au mieux	Conversion bisulfite	Enzyme de restriction	Semi quantitative	Faible à modérée	Uniquement pour les CpG dans un site de restriction. Faux positifs si digestion incomplète	<a href="#">Xiong 1997</a>
<b>MethyLight</b>	Globale	Quelques CpG compris dans les primers	Conversion bisulfite	QPCR	Non quantitative pour une région	Très élevée si optimisée. 0,001%	Mise au point des PCR chevauchant les CpG très complexe	<a href="#">Eads 2000</a> <a href="#">Campan 2009</a>
<b>Methylation sensitive HRM</b>	Globale	Région d'environ 100 pb	Conversion bisulfite	Courbe fusion à haute résolution	Relative pour une région	Elevée 0,1%	Assez simple à mettre en œuvre	<a href="#">Wojdacz 2007</a>
<b>Séquençage Bisulfite</b>	CpG individuel	Région jusqu'à 1kb	Conversion bisulfite	Séquençage Sanger	Absolute pour chaque position	Environ 10%	Biaisé si peu de clones séquencés. Sous clonage laborieux	<a href="#">Frommer 1992</a> <a href="#">Clark 1994</a>
<b>PyroMeth</b>	CpG individuel	Région jusqu'à 100pb	Conversion bisulfite	Pyroséquençage bas débit	Relative en % pour chaque position	Elevée = environ 2%	Plus précis et sensible que le séquençage classique. Pas de sous clonage nécessaire.	<a href="#">Tost 2007</a> <a href="#">Reed 2011</a>
<b>Séquençage NGS bisulfite</b>	CpG individuel	Région de max 500pb ou génome entier	Conversion bisulfite	Nombreuses méthodes de séquençage NGS	Absolute pour chaque position	Intégralité des molécules séquencées	Couteux. Les régions répétées posent souvent problème.	<a href="#">Potapova 2011</a> <a href="#">Gupta 2010</a>

**Tableau 4) Récapitulatif des principales techniques d'analyse de la méthylation des CpG.**

La sensibilité de détection correspond au pourcentage de séquences méthylées détectable parmi une population de séquence non méthylée.

### I.4.3.2. Modifications post traductionnelles des histones (HPTM)

Après la traduction, de nombreuses protéines subissent des modifications post-traductionnelles (PTM) qui viennent ajouter une couche de fonctionnalité supplémentaire en modifiant leurs capacités de réactivité, de catalyse ou de reconnaissance. Concrètement, les PTM sont des groupements chimiques greffés de façon covalente allant du simple groupe méthyle à des lipides ou des sucres complexes ([Walsh 2005](#)). Les histones sont en particuliers les cibles de multiples PTM au niveau des extrémités N-terminales non structurées qui pointent à l'extérieur du nucléosome. Dans une moindre mesure les autres régions accessibles des histones peuvent également être la cible de PTM. Les nombreuses PTM des histones (HPTM) identifiées à l'heure actuelle comprennent principalement la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la SUMOylation ([Tan 2011](#)). L'addition et le retrait de ces groupements chimiques sont catalysés par des enzymes spécifiques au niveau des résidus Lysine, Arginine, Sérine, Thréonine, Proline et Tyrosine ([Portela 2010](#)) (**Fig. 28**, voir aussi [HIstome The Histone Infobase](#))



**Fig. 28) Représentation de la localisation de HPTM courantes sur les 5 histones canoniques humaines.**

A = Acétyle, M = Méthyle, P= phosphate U = Ubiquityle. Tiré de [Portela 2010](#)

Les HPTM ont un rôle important non seulement dans la régulation de la transcription ([Bannister 2011](#)), mais aussi dans la réparation de l'ADN ([Huertas 2009](#)), la réplication de l'ADN et l'épissage alternatif ([Luco 2010](#)). En ce qui concerne la régulation de la transcription, certaines HPTM sont retrouvées de façon spécifique dans des régions d'hétérochromatine inactive transcriptionnellement telle que la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 et d'autres systématiquement dans des régions activement transcrites telle que l'acétylation de ce même résidu (**Tableau 5** et **Tableau 6**). La combinaison des différentes modifications serait finement régulée pour correspondre à des états bien spécifiques de la chromatine. Bien que l'hypothèse du "code histone" ait été proposée afin de rendre compte de cette combinatoire complexe ([Strahl 2000](#)), la communauté scientifique est divisée à ce sujet et certains mettent en doute l'existence d'un tel code au profit d'un simple modèle cumulatif ([Henikoff 2005](#), [Rando 2012](#)) qui sera abordé par la suite.

#### **a. Enzymes impliquées dans la mise en place des HPTM**

Les HPTM peuvent être ajoutées et retirées des histones de façon dynamique par un arsenal enzymatique spécialisé. L'acétylation est la modification la plus dynamique (Demi vie < 15 min), suivi de la phosphorylation (Demi vie < 3 h) et de la méthylation qui est nettement plus stable en comparaison aux autres HPTM (Demi vie = 12 h à 4 jours) ([Barth 2010](#)).

- **Acétylation des Lysines**

L'acétylation des lysines par les histones acétyl-transférase (HAT) a pour effet de neutraliser la charge positive portée par l'acide aminé (AA). En conséquence, l'affinité entre les histones acétylées et l'ADN diminue, ce qui aboutit à une structure chromatinienne plus ouverte au sein de laquelle la transcription est favorisée. L'acétylation est donc une marque généralement associée à l'EC ([Bannister 2011](#)). Une des caractéristiques des HAT est qu'elles sont assez peu spécifiques, ce qui se manifeste par la capacité de cibler différents résidus (**Tableau 5**). La réaction inverse de déacétylation est catalysée par les histones déacétylases (HDAC). Contrairement aux HAT, elles sont associées à la répression de la transcription. Leurs spécificités sont assez peu connues mais on estime qu'elles sont très peu résidu-spécifiques et peuvent même cibler des protéines non histones ([Dokmanovic 2007](#)). Il existe 18 protéines de la famille des HDAC regroupées en cinq classes (I, IIa, IIb, III, IV) selon leur homologie avec leurs orthologues de *Saccharomyces cerevisiae* (**Tableau 5**).

Acétylation	Histone acétyl-transférase	Histone déacétylase	Transcription
<b>H3K9</b>	SRC1	Classe I = <b>HDAC 1, 2, 3 et 8</b> Localisation nucléaire, ubiquitaire. Survie et la prolifération	Généralement associée à une transcription active quand les histones du promoteur sont hyper-acétylées
<b>H3K14</b>	SRC1 / <b>GCN5</b> / <b>CBP-p300</b> / <b>TAF1</b>		
<b>H3K18</b>	<b>GCN5</b> / <b>CBP-p300</b>	Classe IIa = <b>HDAC 4, 5, 7 et 9</b> Classe IIb = <b>HDAC 6 et 10</b>	
<b>H3K23</b>	<b>GCN5</b> / <b>CBP</b>	Localisation nucléaire et cytoplasmique. Tissu spécifique.	
<b>H3K36</b>	<b>GCN5</b>	Différenciation	
<b>H3K56</b>	Rtt109 / <b>GCN5</b>	Classe III = Sirtuines <b>SIRT 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7</b>	
<b>H4K5</b>	<b>ESA1</b> / <b>TIP60</b> / <b>HAT1</b> / <b>p300</b> / <b>HBO1</b>	Noyau, cytoplasme et mitochondrie Mécanisme d'action différent des HDAC classiques	
<b>H4K8</b>	<b>ESA1</b> / <b>TIP60</b> / <b>p300</b> / <b>HBO1</b>		
<b>H4K12</b>	<b>ESA1</b> / <b>TIP60</b> / <b>HAT1</b> / <b>p300</b> / <b>HBO1</b>	Classe IV = <b>HDAC 11</b> Noyau et cytoplasme.	
<b>H4K16</b>	<b>ESA1</b> / <b>SAS2</b> / <b>TIP60</b> / <b>MOF</b>	Caractéristiques des HDAC de classe I et II.	

**Tableau 5) Récapitulatif des enzymes impliquées dans l'acétylation des histones.**

Le nom des enzymes est indiqué en gras quand l'enzyme a été identifié chez l'homme. D'après [Bhaumik 2007](#), [Dokmanovic 2007](#), [Kim 2009](#) et [Bannister 2011](#).

- **Méthylation des Lysines et Arginines**

La méthylation des résidus Lysine et Arginine des histones n'altère pas la charge des acides aminés. Contrairement à l'acétylation, la méthylation peut être associée à différents états transcriptionnels en fonction du résidu modifié. Par exemple la méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me) est une marque généralement associée à la transcription active alors que la méthylation de la lysine 9 de la même histone (H3K9me) est présente dans les régions génomiques transcriptionnellement inactives ([Bhaumik 2007](#)). Un niveau de complexité supplémentaire est apporté par la possibilité de transférer plusieurs groupements méthyles (jusqu'à 3) sur chaque AA. Ainsi, la diméthylation de H3K4 (H3K4me2) est particulièrement enrichie dans les promoteurs actifs, alors que la triméthylation de ce même résidu est également présente dans les promoteurs prompts à être activé, mais temporairement réprimé (Cf. **Fig. 31**) ([Vicky 2011](#)). Les histones méthyl-transférases chargées de catalyser l'ajout d'un ou plusieurs groupes méthyles sur les Lysines (HKMT) contiennent presque toutes un domaine SET

(Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax). Seule Dot1 qui méthyle H3K79 est un peu particulière et ne possède pas ce domaine. Les HMT qui méthylent les Arginines (PRMT) appartiennent quant à elles à une autre famille structurale. De façon générale les HMT sont hautement résidu-spécifiques, voire même spécifiques de l'ajout d'un nombre de groupes méthyle définis (**Tableau 6**). La méthylation des histones est une marque relativement stable (demi-vie 12h à 4 jours) ([Barth 2010](#)), néanmoins elle peut être retirée par les histones déméthylases (HDM) qui comme les HMT sont souvent très spécifiques. Les HDM procèdent à la déméthylation soit par oxydation des amines comme LSD1, soit par hydroxylation comme les membres de la famille Jumonji (JmjC) ([Bannister 2011](#)) (**Tableau 6**).

Méthylation	Histone méthyl-transférase	Histone déméthylases	Transcription
<b>H3K4</b>	SET1 / <b>SET7/9</b> / MLL / SMYD3	LSD1 / JARID1A-1B-1C	Active ou susceptible
<b>H3K9</b>	SUV39H1/2 / G9 / Eu-HMTase1/ SETBD1-ESET ...	LSD1 / JHDM2 / JHDM3	Inactive
<b>H3K27</b>	E(z) / EZH2	UTX / JMJD3	Inactive ou susceptible
<b>H3K36</b>	SET2 / SETD2 / NSD1	JHDM1 / JHDM3	Active
<b>H3K79</b>	<b>DOT1</b>	?	Silencing télomères Gènes transcrits
<b>H4K20</b>	SET9 / Pr- SET7/9 / SUV4-20	?	Inactive
<b>H3R2</b>	<b>CARM1</b>	JMJD6	Active
<b>H3R17</b>	<b>CARM1</b>	?	Active
<b>H3R26</b>	RMT1 / PRMT1	?	Active
<b>H4R3</b>	<b>PRMT5 / PRMT4</b>	JMJD6	Active

**Tableau 6) Récapitulatif des enzymes impliquées dans la méthylation des histones.**

Le nom des enzymes est indiqué en gras quand l'enzyme a été identifié chez l'homme. L'état de transcription général donné dans la dernière colonne peut varier en fonction de la position (promoteur, enhancer, gène...). D'après [Bhaumik 2007](#), [Kim 2009](#) et [Bannister 2011](#).

- **Phosphorylation des Sérine et Thréonine**

La phosphorylation des Sérine et Thréonine semble également jouer un rôle important

dans la régulation de la transcription, mais est nettement moins bien documentée que la méthylation et l'acétylation. Comme dans le cas de l'acétylation, la phosphorylation entraîne la modification de la charge des AA cibles en ajoutant 2 charges négatives. En conséquence, cette HPTM est généralement associée aux régions de transcription active. Il semble également que certaines modifications soient en lien étroit avec les voies de réparation des cassures de l'ADN comme par exemple la phosphorylation de la Sérine 1 de l'histone 4 (H4S1) ou de la Sérine 149 du variant d'histone H2AX (H2AXS149) ([Banerjee 2011](#)). De façon intéressante, la phosphorylation des histones est catalysée majoritairement par plusieurs kinases de la voie MAPK (Mitogen activated protein kinase) susceptibles d'être activées par de nombreux stimuli tels que les cytokines pro inflammatoires, les signaux mitogènes et/ou le stress cellulaire ([Pearson 2001](#)) (**Tableau 7**). Les quelques phosphatases impliquées dans la réaction de déphosphorylation des histones identifiées sont généralement non spécifiques des histones ([Banerjee 2011](#)) (**Tableau 7**).

Phosphorylation	Kinase	Phosphatase	Transcription
<b>H3S10</b>	<b>MSK1 / IKK / AKT / RSK2 / Aurora B</b>	<b>PP1</b>	Active
<b>H3S28</b>	<b>MSK1 / Aurora B</b>	<b>PP1</b>	Active
<b>H4S1</b>	<b>SPS1 / CKII</b>	?	Réparation ADN
<b>H2AXS149</b>	<b>MSK1 / RSK2 / PI3 / ATM / DNA-PK</b>	<b>WIP1</b>	Réparation ADN

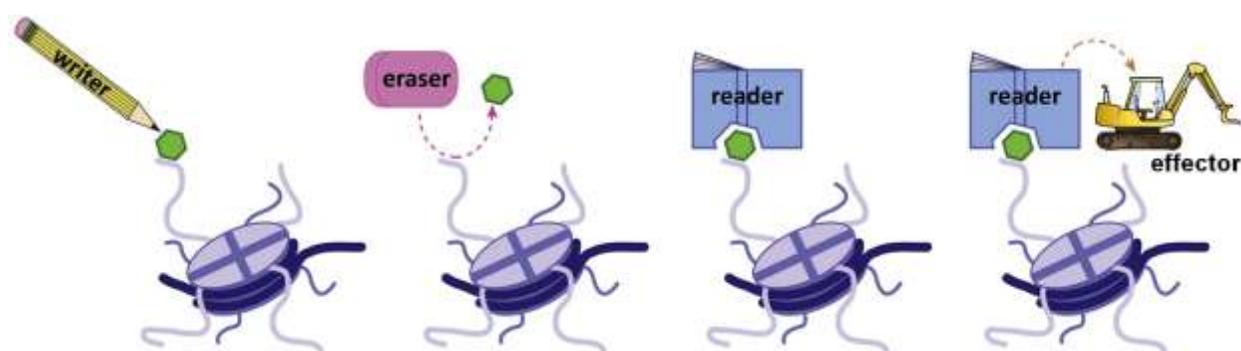
**Tableau 7) Récapitulatif des enzymes impliquées dans la phosphorylation des histones.**

Le nom des enzymes est indiqué en gras quand l'enzyme a été identifié chez l'homme. L'effet général sur la transcription est donné dans la dernière colonne mais peut varier en fonction de la position (promoteurs, enhanceurs, gènes...). D'après [Bhaumik 2007](#), [Kim 2009](#) et [Banerjee 2011](#).

### **b. Implication des HPTM dans la modulation de la transcription**

La première et plus ancienne hypothèse concernant le mécanisme de modulation de la transcription par l'intermédiaire des HPTM est que la simple modification des charges portées par les histones lors de l'ajout de groupements acétyle ou phosphate altère la stabilité de la liaison ADN/histone ([Norton 1990](#)). Il est vrai que l'hyperacétylation des histones est généralement associée aux promoteurs des gènes actifs et qu'elle pourrait être une étape nécessaire au

relâchement de la structure chromatinienne dans cette région afin de faciliter la reconnaissance par les TF ([Reinke 2003](#)). Par ailleurs, les HAT sont fréquemment associées à des complexes d'initiation de la transcription. Cette hypothèse purement « physique » est simpliste car elle ne rend pas compte du rôle de la méthylation des lysines qui ne modifie pas la charge des histones, et ne permet pas d'expliquer le rôle des interactions spécifiques des HPTM avec des protéines impliquées dans la structure de la chromatine. C'est le cas notamment de la protéine associée à l'hétérochromatine HP1 qui interagit spécifiquement avec H3K9me3 ([Bannister 2001](#)). A l'heure actuelle, il n'est pas exclu que l'altération des charges par l'acétylation et la phosphorylation des histones joue un rôle mais de nombreux travaux indiquent plutôt que les HPTM sont « lus » par des protéines ou complexes protéiques spécifiques qui interprètent et répercutent la signification biologique de chacune des modifications sur des effecteurs protéiques. Ces effecteurs seraient capables de repousser ou d'attirer certaines HPTM, de remodeler la chromatine environnante et/ou de recruter à leur tour d'autres effecteurs (**Fig. 29**).

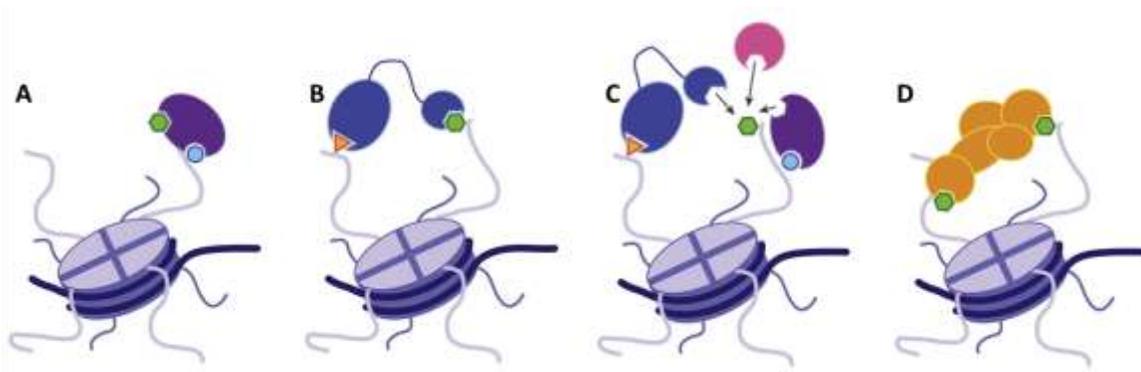


**Fig. 29) Modèle schématique de l'implication des HPTM dans la modulation de l'environnement chromatinien.**

« Writer » représente les enzymes impliquées dans l'ajout des HPTM (HAT, HMT, Kinase...), « Eraser » les enzymes qui catalysent le retrait (HDAC, HDM, Phosphatase...), « Reader » correspond aux domaines qui reconnaissent spécifiquement des HPTM, par exemple les domaines protéiques bromo- et chromo- reconnaissent respectivement l'acétylation et la méthylation des lysines ([Dhalluin 2000](#), [Kyoko 2011](#)). Enfin, ces modules de reconnaissance peuvent recruter d'autres effecteurs ou « writer » qui agiront sur la structure de la chromatine environnante. Adapté de [Gardner 2011](#).

De nombreux complexes de régulation de la chromatine sont capables de se fixer plus efficacement sur une combinaison de 2 HPTM présentes sur la même histone que sur l'une des 2 modifications seules. Par exemple, Chez *Arabidopsis Thaliana*, le chromodomaine CMT3 se fixe de façon préférentielle sur les histones présentant la double modification H3K9me3 et H3K27me3,

mais moins efficacement sur les histones portant seulement l'une des 2 marques ([Lidroth 2004](#)). Dans d'autres cas, il a été montré que la présence d'une HPTM peut empêcher la fixation d'un facteur se fixant sur une autre HPTM environnante. C'est le cas de la protéine HP1 dont la fixation sur H3K9me3 est inhibée par la phosphorylation de H3S10 ([Fischle 2005](#)). Cette combinatoire d'inclusion/exclusion suggère la possibilité d'un code élaboré dicté par des combinaisons de HPTM ([Strahl 2000](#), [Gardner 2011](#)). Etant donné le fait que près de 170 HPTM différentes ont été identifiées ([Tan 2011](#)) on peut envisager des milliards de combinaisons différentes, en poussant la complexité à l'extrême. Ces combinaisons seraient lues par des complexes protéiques modulables faisant correspondre à chacune un état particulier de la chromatine (**Fig. 30**).

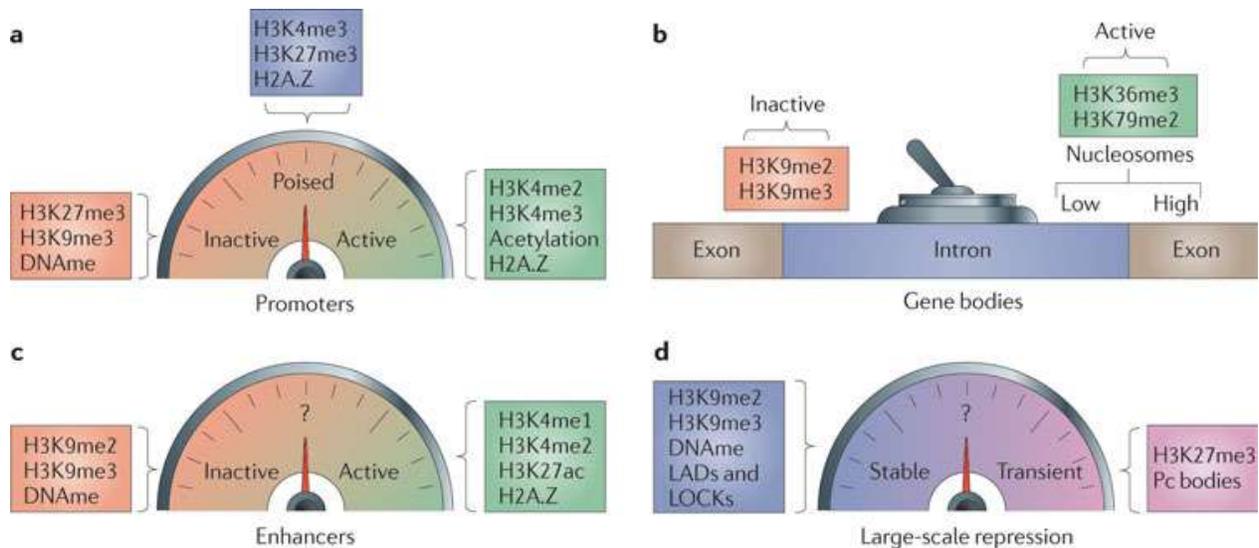


**Fig. 30) Différentes possibilités de lecture des HPTM selon un mode combinatoire.**

Reconnaissance par une seule protéine de PTM en série sur la même histone (**A**) ou en *trans* sur 2 histones différentes (**B**). Reconnaissance de PTM individuelles avec assemblage séquentiel d'un complexe macromoléculaire (**C**) ou directement par un complexe protéique (**D**). Tiré de [Gardner 2011](#).

Néanmoins, la différence d'affinité (souvent faible) pour une combinaison de modifications plutôt que pour une seule d'entre elles a généralement été décrites *in vitro*, mais pas *in vivo*, ce qui implique que ces différences ont probablement peu de signification biologique ([Rando 2012](#)). D'autre part, les études intégratives de données génomiques, transcriptomiques et épigénomiques (ChIPseq : voir section suivante) ont révélé que malgré les milliards de possibilités de combinaisons de HPTM, seules quelques-unes sont majoritairement représentées dans le génome. Par exemple, après analyse de plus de 50 composants et modifications de la chromatine chez *Drosophila Melanogaster*, *Fillion et al* décrivent 5 grands états de la chromatine qu'ils nomment « couleurs » ([Filion 2010](#)). Plus récemment, en se focalisant sur 19 HPTM,

Kharchenko *et al* étendent le nombre à 9 couleurs qui suffisent à regrouper 99% du génome de la drosophile ([Kharchenko 2011](#)). De la même façon, Ernst *et al* montrent que 9 HPTM dans 9 lignées cellulaires humaines d'origine très variée (muscle foie, poumon, cellules immunitaire...) permettent de classer la totalité des données obtenue dans 15 « couleurs » de la chromatine ([Ernst 2011](#)). Ces « couleurs » permettent d'identifier de façon relativement précise les régions fonctionnelles du génome : promoteurs actifs ou réprimés constitutivement ou temporairement, enhancers forts ou faibles, régions insultrices à haute ou faible activité de transcription, régions d'élongation de la transcription, zones de répression à grande échelle et domaine constitutivement inactif (**Fig. 31**) ([Ernst 2011](#)).



**Fig. 31) Représentation graphique de quelques « couleurs » de la chromatine.**

Les différentes combinaisons de marques systématiquement enrichies, indépendamment de l'espèce étudiée sont représentées quand elles ont été identifiées pour les promoteurs (A), le corps des gènes dont les exons et les introns (B), les enhancers (C) et les régions de répression à grande échelle (D). On note que la méthylation de l'ADN (DNAmé) est retrouvée en association avec les marques H3K9me2/3 dans les promoteurs et enhancers inactifs et régions réprimées du génome. Le variant d'histone H2A.Z est quant à lui présent dans les promoteurs et enhancers actifs avec H3K4me et l'hyperacétylation des lysines. La densité en nucléosomes portant les marques H3K36me3 et H3K79me2 dans les gènes actifs est généralement élevée dans les exons et faible dans les introns, ce qui serait en lien avec le rôle de la chromatine dans la reconnaissance des sites d'épissage ([Luco 2010](#)). Les régions soumises à une répression constitutive, sont généralement caractérisées par la méthylation de l'ADN, H3K9me2/3 et des éléments d'organisation à plus grande échelle (LAD lamina, LOCK large chromosomal modifications). La répression transitoire est associée à des marques bien différentes comprenant H3K27me3 et l'association avec les répresseurs du groupe Polycomb au sein de loci spécifiques dans le noyau. Tiré de [Vicky 2011](#)

Les « couleurs » de la chromatine ne constituent pas un code dans le sens cryptique et complexe du terme. Il faut plutôt les voir comme quelques combinaisons redondantes associées à certains états du génome, se situant quelque part entre la dichotomie naïve euchromatine / hétérochromatine et la complexité excessive du code histone ([Henikoff 2005](#), [Rando 2012](#)).

Les « couleurs » de la chromatine représentent des combinaisons caractéristiques associant HPTM, méthylation des CpG, facteurs protéiques non histone associés et localisation subnucléaire. Elles nous permettent de découvrir des éléments fonctionnels de l'ADN et leurs états d'activation transcriptionnelle *a priori*, de façon relativement précise.

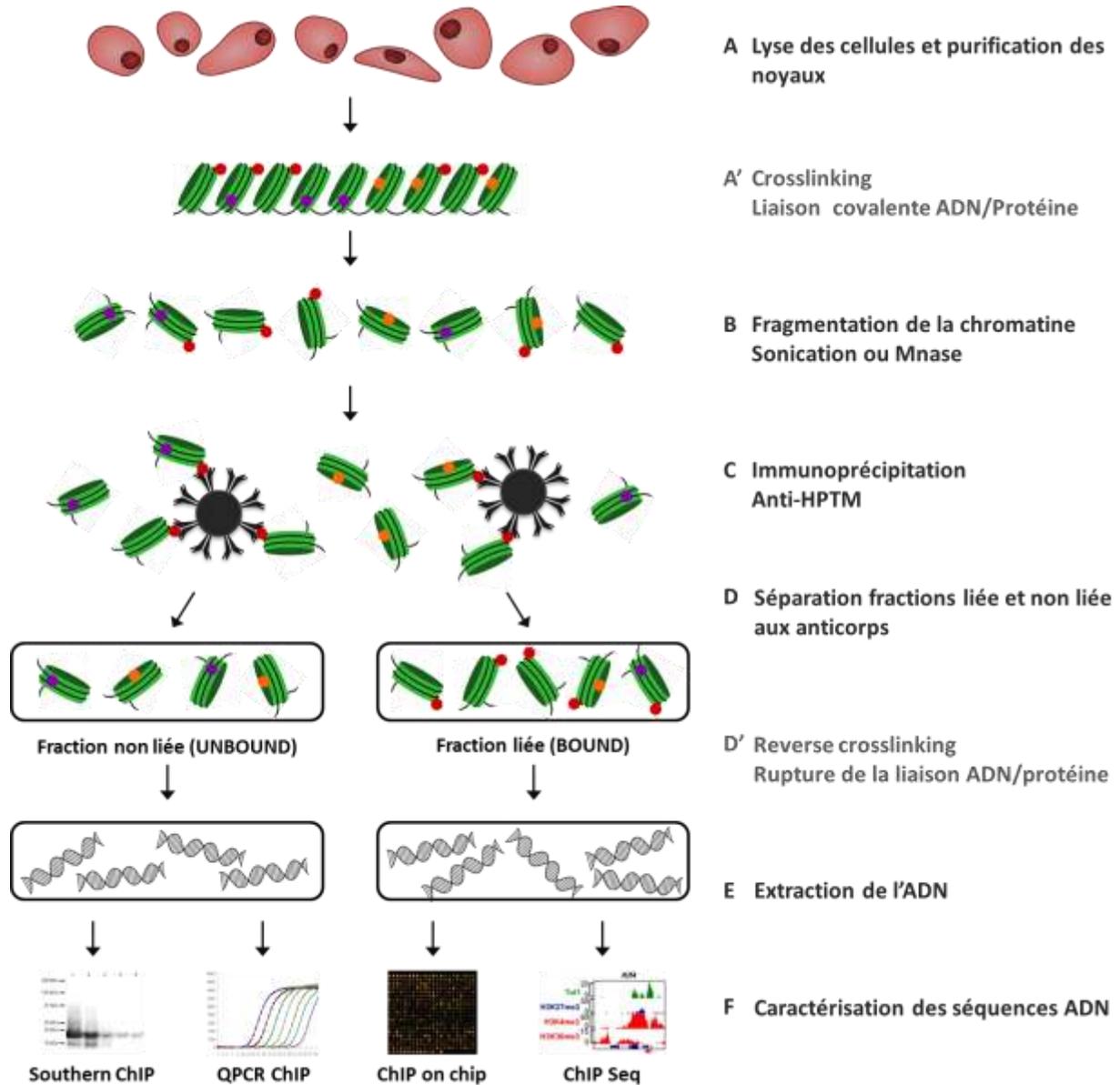
### **c. Techniques d'analyses des HPTM**

Contrairement à l'analyse de la méthylation de l'ADN, il existe relativement peu de techniques permettant d'analyser la localisation des HPTM au niveau de loci génomiques *in situ*. La plupart des méthodes sont basées sur une étape initiale de fixation chimique covalente de l'ADN avec les histones et à l'heure actuelle toutes font intervenir une étape d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) à l'aide d'anticorps spécifiques anti HPTM ([Massie 2008](#)). La caractérisation finale des séquences ADN associées peut être réalisée à l'échelle d'une région particulière par Southern Blot, PCR ou PCR quantitative (ChIP « classique ») ([Orlando 1997](#), [Umlauf 2004](#)), et à l'échelle de génomes complets par des techniques d'analyse à haut débit comprenant principalement les puces ADN (ChIP on Chip) ([Nègre 2006](#)) et plus récemment le séquençage NGS (ChIP Seq) ([Robertson 2007](#)) (**Fig. 32**).

Les techniques basées sur le ChIP présentent un certain nombre d'inconvénients tels que (i) la nécessité de disposer d'anticorps de qualité hautement spécifique, (ii) la quantité de matériel initial importante nécessaire malgré le développement de méthodes permettant de partir d'une faible quantité de cellules en culture ([Dahl 2008](#)), (iii) le crosslinking par le formaldéhyde qui peut créer des liaisons artificielles n'ayant pas de pertinence physiologique et (iv) la lourdeur du protocole comprenant de nombreuses étapes ce qui entraîne une variabilité et augmente la possibilité d'erreurs de manipulation. Pour essayer de contrôler ce dernier point, des contrôles sont conseillés parmi lesquels l'ajout d'une condition d'immunoprécipitation avec un anticorps aspécifique (irrelevant) et l'amplification d'une séquence contrôle endogène dont on connaît les HPTM associées, en cas de détection par PCR quantitative (QPCR) ([Colas 2009](#)).

Le ChIP est pour le moment la seule technique disponible pour ce type d'analyse depuis

plus de 20 ans. Massie *et al* ont proposé des méthodes alternatives basées sur l'isolation de séquence génomique à l'aide d'oligonucléotides et l'analyse des HPTM associées par spectrométrie de masse ([Massie 2008](#)), mais pour le moment une telle technique n'est toujours pas d'actualité.



**Fig. 32) Résumé de la méthodologie générale de ChIP (cc).**

La procédure comprend dans un premier temps (A) la lyse des cellules ou des tissus et éventuellement une étape de purification des noyaux. (A') Une étape éventuelle de liaison chimique covalente de l'ADN et des protéines associées à l'aide de formaldéhyde permet de fixer la structure de la chromatine à un temps donné. On parle de X-

ChIP dans le cas où la fixation est réalisée et de N-ChIP dans le cas contraire. **(B)** La chromatine est ensuite fragmentée par sonication ou à l'aide de l'enzyme MNase (micrococcal nuclease). Typiquement la taille des fragments générés oscille entre 200 et 1000pb. **(C)** Les histones portant les modifications recherchées sont ciblées par des anticorps spécifiques fixés sur des billes (magnétiques ou sépharose). **(D)** La fraction liée est précipitée et la fraction non liée peut être conservée pour normaliser les résultats obtenus. **(D')** Dans le cas du X-ChIP la liaison ADN/protéine est rompue par traitement physico-chimique. **(E)** Les fragments ADN issus des fractions liées et non liées sont extraits. **(F)** Les séquences co-précipitées avec la HPTM recherchée peuvent être quantifiées par Southern blot ou QPCR dans le cas de l'étude d'une région particulière ou caractérisées à l'échelle du génome à l'aide de puces à ADN (ChIP on chip) ou par séquençage NGS (ChIP seq).

### **I.4.1. Drogues modifiant la structure de la chromatine (CMD)**

Un nombre croissant de maladies sont associées à des modifications de la régulation des gènes par des phénomènes épigénétiques. Les exemples les plus étudiés sont les cancers pour lesquels des modifications profondes de l'épigénome sont systématiquement observées ([Gal-Yam 2008](#)). C'est également le cas de certaines maladies neuromusculaires dont la dystrophie musculaire de Duchenne ([Colussi 2009](#)), l'ataxie télangiectasie ([Li 2012](#)) et la dystrophie facio-scapulo-humérale ([Zeng 2009](#)), ainsi que des maladies métaboliques et auto-immunes. De nombreuses drogues modifiant la structure de la chromatine (CMD) ont été développées et permettent d'envisager la correction des altérations de l'épigénome dans le but de traiter certaines des maladies listées précédemment. Les CMD sont typiquement classés en 3 catégories en fonction du type d'enzyme qu'elles inhibent : les inhibiteurs de DNMT (DNMTi) qui bloquent la méthylation de l'ADN, les inhibiteurs de HDAC (HDACi) qui empêchent la désacétylation des histones et les inhibiteurs de HMT (HMTi) qui empêchent quant à eux leur méthylation ([Szyf 2008](#)). Certaines des molécules développées sont en cours d'essai clinique et 5 d'entre elles ont déjà obtenu une AMM (**Tableau 8**, **Tableau 9** et **Tableau 10**).

#### **a. Inhibiteurs de DNMT**

Plusieurs voies d'oncogenèse mènent à la surexpression de DNMT1 ce qui conduit à une méthylation aberrante de certains gènes (dont des gènes suppresseurs de tumeur) et à leur extinction transcriptionnelle ([Gal-Yam 2008](#)). L'administration de DNMTi permet de lever la répression sur ces gènes et de restaurer l'expression des facteurs suppresseurs de tumeurs. Les 3 molécules inhibitrices de DNMT les plus utilisées sont des analogues de la Cytosine : le 5-aza-Cytidine (Azacytidine), le 5-aza-Deoxycytidine (Decitabine) et la Zebularine (**Tableau 8**). Lors

de la réplication de l'ADN, ces analogues sont incorporés dans l'ADN. Après le passage de la fourche de réplication, DNMT1 reconnaît les CpG hemiméthylés et transfère un groupement méthyle sur les cytosines du brin néo-synthétisé. Quand DNMT1 se trouve au niveau d'un DNMTi incorporé dans l'ADN elle est séquestrée par liaison covalente. En conséquence, l'activité générale de DNMT1 diminue et la méthylation diminue progressivement au cours des divisions cellulaires ([Gravina 2010](#)).

Molécule	Nature chimique	Cibles	Phase de développement clinique
Azacitidine	Analogue ribonucléique	DNMT1	AMM FDA et EMEA pour les syndromes myélodysplasiques
Decitabine	Analogue desoxy-ribonucléique	DNMT1	AMM FDA et EMEA pour les syndromes myélodysplasiques
Zebularine	Analogue desoxy-ribonucléique	DNMT1	Préclinique

**Tableau 8) Caractéristiques des inhibiteurs de DNMT.**

D'après ([Szyf 2008](#), [Gravina 2010](#)).

## b. Inhibiteur de HDAC

Les HDACi sont les drogues épigénétiques utilisées depuis le plus longtemps ce qui explique que de nombreuses molécules aient été développées (**Tableau 9**). Ces molécules sont souvent de petits inhibiteurs qui viennent bloquer l'activité des HDAC en occupant leur site catalytique ce qui a pour conséquence de faire pencher la balance acétylation / déacétylation en faveur de l'acétylation ([Dokmanovic 2007](#)). On estime que l'administration de HDACi entraîne *in vitro* la réexpression de 2 à 10% des gènes réprimés ([Van Lint 1996](#)). Les premières générations développées ont un spectre d'action relativement large et sont qualifiées de pan-HDACi. Parmi ces molécules on retrouve la Trichostatine A (TSA) et l'acide subéroyl anilide hydroxamique (SAHA). Quelques rares molécules plus récentes sont spécifiques d'un nombre restreint de HDAC comme le MS-275 qui cible uniquement les HDAC1, 2 et 3 et la Romidepsine qui inhibe les HDAC de classe I (**Tableau 9**). La découverte d'autres HDACi spécifiques d'une seule isoforme représente un enjeu actuel du développement de cette classe de médicaments.

Molécule	Nature chimique	Cibles HDAC	Phase de développement clinique	Formule
<b>Vorinostat (SAHA)</b>	Acide hydroxamique	Classe I, II et IV	AMM pour le lymphome cutané primitif	
<b>TrichostatineA (TSA)</b>	Acide hydroxamique	Classe I, II et IV	Préclinique	
<b>Belinostat</b>	Acide hydroxamique	Classe I, II et IV	Phase II	
<b>Panobinostat</b>	Acide hydroxamique	Classe I, II et IV	Phase III	
<b>Entinostat (MS-275)</b>	Benzamide	HDAC 1, 2 et 3	Phase II	
<b>Mocetinostat</b>	Benzamide	Classe I et IV	Phase II	
<b>Romidepsine (FK 228)</b>	Tetrapeptide cyclique	Classe I	AMM pour le lymphome cutané primitif	
<b>Phényle Butyrate</b>	Chaîne aliphatique	Classe I et IIa	Phase II	
<b>Acide valproïque</b>	Chaîne aliphatique	Classe I et IIa	AMM depuis 1960 pour les troubles bipolaires	

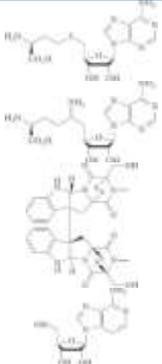
**Tableau 9) Caractéristiques des inhibiteurs de HDAC.**

D'après [Dokmanovic 2007](#), [Pécuchet 2010](#) et [Huang 2011](#).

### c. Inhibiteur de HMT

Le développement d'inhibiteur des Lysine et Arginine HMT est relativement récent et pour le moment aucun HMTi n'est en cours d'essai clinique. La majorité des HMT utilise le cofacteur S adenosylmethionine (SAM) en tant que donneur de groupement méthyle. L'utilisation d'analogues de SAM tel que le SAH ou la sinefungin permet d'inhiber de manière non spécifique toutes les HMT (**Tableau 10**) ([Copeland 2009](#)). En parallèle, La spécificité élevée des HMT se traduit par des structures uniques pour chaque enzyme. Cette caractéristique particulière et le fait que les structures de nombreuses HMT aient été cristallisées est une aubaine pour le design rationnel d'inhibiteurs spécifiques. Ces dernières années, plusieurs petites molécules inhibitrices hautement spécifiques de HMT particulières ont été publiées, telles que la Chaetocin et le DZNep qui inhibent respectivement préférentiellement SUV39H1 et EZH2 ([Greiner 2005](#), [Tan 2007](#)) (**Tableau 10**). Les deux composés ont été testés *in vivo* chez la souris

et sont bien tolérés à dose thérapeutique. En ce qui concerne la Chaetocin, elle permet la réactivation de gène portant la marque H3K9me2/3 ([Chaib 2011](#)). Il a été montré qu'elle permet la réexpression de gènes suppresseurs de tumeur dans un modèle d'hépatocarcinome murin et de lignée de cellules humaines leucémiques ([Lee 2011](#), [Chaib 2011](#)), ainsi que la sortie de latence de provirus recombinant HIV (Virus de l'immunodéficience humaine) ([Bernhard 2011](#)). Le DZNep permet quant à lui la réactivation de gènes soumis à une inactivation facultative, c'est-à-dire dont l'ADN n'est pas méthylé et porte la modification H3K27me2/3 ([Miranda 2009](#)). Plusieurs études ont mis en évidence un bénéfice clinique *in vivo* chez la souris, comme par exemple une diminution du rejet après une greffe allogénique ([He 2012](#)) et l'augmentation du taux de survie de certain cancers ([Fiskus 2009](#), [Kalushkova 2011](#)). D'autre part, l'administration de DZNep permet la réexpression de provirus latent EBV (Epstein-Barr virus) et KHSV (Kaposi's Herpes Sarcoma Virus) ([Toth 2010](#), [Murata 2012](#)).

Molécule	Nature chimique	Cibles HMT	Phase de développement clinique	Formule
<b>SAH</b>	Analogue du SAM	Non sélectif	Préclinique	
<b>Sinefungin</b>	Analogue du SAM	Non sélectif	Préclinique	
<b>Chaetocin</b>	Thiodioxopyperazine	Suv39H1 (H3K9me)	Préclinique	
<b>DZNep</b>	Analogue du SAM	EZH2 (H3K27me)	Préclinique	

**Tableau 10) Caractéristiques des inhibiteurs de HMT.**

D'après [Greiner 2005](#), [Tan 2007](#) et [Copeland 2009](#).

Le développement de ce type d'inhibiteurs spécifiques laisse envisager la possibilité de pouvoir rééquilibrer finement la régulation génique déstabilisée en contexte pathologique, tout en s'affranchissant des effets collatéraux régulièrement observés avec des modificateurs chromatinien à large spectre. D'autre part, les CMD commencent à être utilisés avec succès pour modifier positivement ou négativement l'expression de certains virus dans des études destinées à lutter contre ces infections virales chroniques ([Bernhard 2011](#), [Murata 2012](#)). L'intérêt des CMD pour en thérapie génique a été saisi assez rapidement pour les vecteurs retroviraux adénoviraux

et les plasmides vecteur pour lesquels il a été montré une repression parfois drastique de l'expression du transgène par des mécanismes épigénétiques. ([Hino 2004](#), [Fan 2005](#), [Riu 2007](#)). La section suivante détaille les interactions entre virus ou vecteurs de thérapie génique et mécanismes de régulation épigénétiques de l'expression des gènes de la cellule hôte.

## **I.4.2. Virus à ADN, chromatine et transcription**

Au cours de leur cycle cellulaire, de nombreux virus eucaryotes s'associent avec des histones cellulaires pour former une structure chromatinienne. Pour s'exprimer efficacement au sein du noyau de la cellule hôte, les virus ont acquis la capacité de manipuler leur propre structure chromatinienne. Dans le cas des virus latents tels que HBV, HSV1 et EBV le contrôle de la chromatine leur permet de s'auto réprimer et de devenir ainsi silencieux en attendant les conditions de réplication plus favorables ([Lieberman 2008](#), [Hoelzer 2008](#)). Les cas particulièrement bien documentés des virus à ADN double brins Adénovirus et Herpesvirus ainsi que les quelques informations disponibles pour les Parvovirus sont présentés dans la section suivante. En plus de profiter de la machinerie cellulaire de régulation de la transcription dans le but de persister ou de se répliquer dans la cellule hôte, certains virus dérèglent profondément ces mécanismes ce qui peut avoir des conséquences importantes sur la viabilité cellulaire ([Flanagan 2007](#), [Doerfler 2010](#)). Quelques-unes de ces perturbations seront décrites dans la section **I.4.2.2**

### **I.4.2.1. Régulations épigénétiques du cycle viral**

#### **a. Adénovirus**

Au sein des particules d'adénovirus, le génome viral n'est pas associé à des histones mais est condensé à l'aide de plusieurs protéines virales dont la protamine like VII ([Mirza 1982](#)). Bien que cette protéine reste associée tout au long du cycle viral le génome viral s'associe avec des histones cellulaires dont le variant interphasique H3.3, dès 1 heure après infection. Une fois dans la cellule, la majorité des sérotypes d'adénovirus persistent uniquement sous forme extra-chromosomique mais quelques-uns (dont l'Ad12) peuvent entrer en latence après intégration dans le génome de la cellule hôte ([Stabel 1980](#)). Au cours du cycle lytique, la protéine virale E1A recrute de nombreux partenaires dont les histones acétyl transférase p300, GCN5 et CBP

(CREB-Binding Protein) ([Caron 2003](#)). Cela se traduit par une augmentation progressive de l'acétylation des histones au niveau de tous les promoteurs du génome de l'adénovirus ([Komatsu 2011](#)). Il a été montré à plusieurs reprises que l'ADN viral est globalement non méthylé pendant la phase lytique mais est hyperméthylé *de novo* lors de l'entrée de l'Ad12 intégré en phase latente ([Kämmer 1995](#), [Hoelzer 2008](#)) Bien que le mécanisme ne soit pas complètement élucidé, il semble que la méthylation soit initiée au centre du génome viral avant de s'étendre de façon bilatérale à sa quasi-totalité aboutissant à la répression des gènes viraux impliqués dans la phase lytique ([Kruczek 1982](#), [Orend 1991](#)).

## **b. Hespervirus**

Comme les adénovirus, les herpesvirus ne sont pas associés à des histones dans leur capsidie néanmoins, il ne semble pas non plus qu'ils soient compactés par des protéines virales ([Booy 1991](#)). Après son entrée dans la cellule, HSV1 s'associe avec des nucléosomes cellulaires et persiste sous forme épisomale. Lors de la phase d'infection précoce, la protéine virale VP16 est connue pour recruter plusieurs enzymes impliquées dans la mise en place de HPTM, parmi lesquelles Set1 et MLL (H3K4me) et les HAT p300 et CBP (Acétylation des lysines). VP16 peut également se lier avec des TF et des facteurs de remodelage de la chromatine ([Kent 2004](#), [Knippe 2008](#)). VP16 favorise donc la mise en place d'une structure chromatiniennne active essentielle à l'expression des gènes viraux précoces. Pendant cette phase, la structure de la chromatine est décrite comme étant irrégulière et instable ([Lacasse 2009](#)). Bien que ne possédant pas VP16, les autres herpesvirus présentent également une structure chromatiniennne active ([Paulus 2010](#)). La protéine EBNA2 de l'EBV semble également capable de jouer un rôle similaire à VP16 ([Alazard 2003](#), [Caron 2003](#)). Lors de la phase de latence, la structure chromatiniennne des herpesvirus est plus régulière et porte des HPTM caractéristiques d'une répression transcriptionnelle ([Wang 2005](#)), à l'exception de la région promotrice du transcrit LAT de HSV1 qui est impliquée dans la transition de la phase latente vers la phase lytique ([Kubat 2004](#)). En outre, alors que le génome latent de HSV1 demeure principalement hypométhylé, les Gamma-herpesvirus EBV et KHSV deviennent globalement hyperméthylés au cours de la latence ([Wang 2005](#), [Szyf 1985](#)).

## **c. Parvoviridae**

La famille des parvoviridae comprend de nombreux virus parmi lesquels le MVM, le Parvovirus B19, le CPV et l'AAV.

En ce qui concerne le MVM, il a été montré en microscopie électronique que le génome viral s'associe *in vitro* avec des histones pour former une structure de chromatine compacte ([Ben-Asher 1982](#)). Néanmoins, quand elle est isolée à partir de noyaux de cellules murines en culture la structure chromatinienne du virus semble hétérogène, avec la présence de bulles simple brin ([Doerig 1986](#)). Plus récemment, Cotmore *et al* ont montré que le génome viral du MVM contient de nombreux sites de fixation de la protéine NS1 encodée par le virus lui-même. Les résultats obtenus suggèrent que cette association particulière limite l'association avec des histones cellulaires et soit en partie responsable de la structure atypique de la chromatine ([Cotmore 2007](#)). Les régulations épigénétiques de cette structure pseudo-chromatinienne n'ont pour le moment pas été documentées mais étant donné la nature atypique de cette structure, il est probable qu'elle soit différente de ce qui est généralement observée.

Une étude récente a mis en évidence l'implication de la méthylation des ITR du Parvovirus B19 dans la régulation du cycle viral à partir d'échantillons de patients humains. De la même façon que pour l'Ad12 et l'EBV, les auteurs ont mis en évidence une corrélation entre le taux de méthylation et le niveau d'expression et de réplication du génome viral ([Bonvicini 2012](#)).

En ce qui concerne les virus AAV sauvages, on ne connaît quasiment rien de leur éventuelle régulation épigénétique. On sait néanmoins, que le génome viral est associé à des histones cellulaires et forme une structure chromatinienne semblable à la chromatine cellulaire ([Marcus-Sekura 1983](#)). D'autre part, à l'aide d'une technique de TAP tagging, Nash *et al* ont identifié près de 70 protéines qui interagissent avec Rep78. De façon intéressante, parmi ces partenaires, plusieurs enzymes impliquées dans la régulation de la chromatine ont été identifiées : la protéine SNW1 appartenant à un complexe de remodelage de la chromatine, DMAP1 un régulateur de l'activité de la DNMT1 et HDAC2 ([Nash 2009](#)). Curieusement, ces facteurs sont plutôt associés à une répression de la transcription. Enfin, contrairement aux parvovirus autonomes dont les génomes sont pauvres en CpG, les AAV présentent une densité de CpG comparable au génome cellulaire ([Hoelzer 2008](#)). Les liens entre la structure du génome viral, les facteurs impliqués dans la régulation de la chromatine et l'état transcriptionnel du génome viral restent encore inexplorés à l'heure actuelle.

#### **I.4.2.2. Altération de l'épigénome cellulaire par les virus**

La présence de génomes viraux dans la cellule hôte peut dans certains cas induire des

modifications profondes de l'épigénome de la cellule causées par une méthylation *de novo* aberrante ou des altérations de l'organisation subnucléaire ([Doerfler 2010](#)). Les virus semblent par ce biais être en mesure de perturber la régulation de la transcription cellulaire en leur faveur de façon à neutraliser les mécanismes de défense antiviraux nucléaires et la réponse inflammatoire ou simplement à tirer parti d'un dérèglement métabolique pour se répliquer plus efficacement ([Paschos 2010](#)). Il a été montré que certains herpesvirus, adénovirus et polyomavirus sont capables d'activer ou d'augmenter la transcription des DNMT ([Hoelzer 2008](#)). De cette façon, de nombreux virus oncogéniques sont capables de provoquer l'extinction de gènes suppresseurs de tumeur ([Flanagan 2007](#)). Quelques travaux indiquent que les parvovirus sont également capables d'altérer la structure chromatinienne. Par exemple le CPV peut réorganiser profondément l'organisation nucléaire en étendant progressivement les foci au sein desquels il se réplique au détriment de la chromatine cellulaire environnante ([Ihalainen 2009](#)). Le parvovirus de rat UT induit quant à lui une hyper acétylation de H3K9 au niveau de certains gènes endogènes par un processus non identifié qui ferait intervenir la protéine virale NS ([Iseki 2005](#)).

L'altération de la régulation du génome de la cellule hôte par les virus au cours de l'infection semble faire partie du cycle viral et est souvent associée à la neutralisation ou la désorganisation des défenses cellulaires. Il est intéressant de se pencher sur le cas de vecteurs viraux qui contrairement aux virus sauvages sont généralement dépourvus des protéines virales qui pourraient participer à la création d'un environnement chromatinien favorable.

### **I.4.3. Vecteurs de transfert de gène, chromatine et transcription**

Alors que les virus sauvages peuvent avoir intérêt à être réprimés temporairement pour se dissimuler et ainsi déjouer les défenses de l'hôte, l'efficacité d'une approche de thérapie génique par transfert de gène repose généralement sur l'expression à long terme du transgène thérapeutique. L'altération de l'état transcriptionnel du transgène par des mécanismes épigénétiques est l'une des causes identifiées de la diminution progressive de la production de la protéine thérapeutique *in vivo* allant parfois jusqu'à une extinction définitive de son expression. Ce phénomène a été particulièrement bien documenté pour les vecteurs rétroviraux et les vecteurs non viraux, et des méthodes d'amélioration ont été mises au point pour limiter leurs effets. Curieusement, malgré leur popularité croissante, les vecteurs AAV ont fait l'objet de peu de

travaux tentant de déterminer l'impact des régulations épigénétiques sur l'efficacité de l'expression du transgène thérapeutique *in vivo*.

#### **a. Vecteurs $\gamma$ -rétroviraux et lentiviraux**

La répression transcriptionnelle est un sérieux problème avec les vecteurs intégratifs  $\gamma$ -rétroviraux et lentiviraux. Elle est souvent associée à une hyper-méthylation de l'ADN particulièrement bien caractérisée dans les cellules souches hématopoïétiques pour les vecteurs dérivés du MLV ( $\gamma$ -rétrovirus) ([Gram 1998](#), [Wang 1998](#)). Le phénomène a également été observé pour les vecteurs issus du HIV (lentivirus) dans des cellules souches embryonnaires, hématopoïétiques et neuronales ([Mok 2006](#)). L'extinction de la transcription semble être prépondérante lors de la différenciation des cellules ([Herbst 2012](#)). Pannell *et al* ont montré que des vecteurs  $\gamma$ -rétroviraux peuvent être éteints dans des cellules murines déficientes pour les DNA méthyl-transférase DNMT3A/B sans pour autant mettre en évidence l'absence de méthylation de l'ADN des génomes proviraux ([Pannell 2000](#)). En parallèle, une diminution de l'acétylation de l'histone H3 et un enrichissement en histone linker H1 associé aux génomes proviraux est noté. Les auteurs suggèrent que la méthylation de l'ADN est facultative pour la répression de la transcription et qu'une structure chromatiniennne réprimée est établie par l'intermédiaire de HPTM répressives. Néanmoins, une autre équipe a montré que l'administration d'Azacytidine seule ou en association avec un inhibiteur de HDAC permet une augmentation significative de l'expression du transgène, ce qui laisse supposer que la méthylation des CpG jouerait tout de même un rôle dans le silencing des vecteurs rétroviraux ([Hofmann 2006](#)). Ces différents résultats indiquent que ces vecteurs sont de façon générale éteints *in vitro* et *in vivo* par des mécanismes épigénétiques complexes faisant intervenir l'assemblage des provirus dans une structure de chromatine répressive ([Yao 2004](#)).

En outre, il a été décrit que l'utilisation de vecteurs SIN (self inactivating vector) améliore non seulement la biosécurité des vecteurs mais limite également la proportion de génomes soumis au silencing ce qui sous-entend que les LTR (Long terminal repeat) contiendraient un certain nombre d'éléments « silencer ». Afin d'améliorer encore la résistance à la répression épigénétique de la transcription, il est possible d'incorporer dans le génome des vecteurs des séquences insultrices ([Hino 2004](#), [Aker 2007](#)) ou UCOE (Ubiquitously acting chromatin opening elements) ([Zhang 2007](#)). En conclusion, l'amélioration progressive des vecteurs par élimination des séquences « silencer » et l'incorporation de différents éléments de résistance

protégeant de l'environnement chromatinien environnant a permis de développer des vecteurs plus surs et dont l'expression du transgène est plus stable à long terme ([Burns 2009](#), [Kim 2009](#)).

## **b. Vecteurs adénoviraux**

Peu de travaux abordent les éventuelles répressions de l'expression d'un transgène apporté à l'aide de vecteurs viraux dérivés de l'adénovirus. Il n'a été mis en évidence que récemment que les génomes des vecteurs s'assemblaient avec les histones cellulaires *in vivo* et que cette chromatinisation participait à leur expression optimale ([Ross 2011](#)). Dès 2000, Gaetano *et al* montrent que l'utilisation d'une drogue ciblant les HDAC peut agir sur le niveau d'expression du transgène après injection intramusculaire chez le rat d'un vecteur adénoviral de 1<sup>ère</sup> génération ( $\Delta$  E1). En effet, il est noté une augmentation de l'expression d'environ 3 fois après administration de TSA ce qui laisse penser que les HDAC sont probablement impliquées dans la mise en place d'un environnement chromatinien répressif au niveau du génome du vecteur adénoviral. Néanmoins, à 15 jours pi, avec ou sans administration de TSA, le niveau d'expression est quasi nul ([Gaetano 2000](#)). Les mécanismes de silencing n'ont malheureusement pas été approfondis dans cette étude et l'évolution du nombre de copies du génome viral dans le muscle injecté n'a pas non plus été suivie. Deux équipes ont montré par la suite *in vitro* et *in vivo* avec des vecteur adénovirus  $\Delta$  E1 ou helper-dépendant, à l'aide de technique et QPCR et de RT-QPCR (reverse transcription QPCR), que la diminution rapide du niveau d'expression était due à une plus faible capacité d'expression par génome de vecteur ([Brooks 2004](#), [Balamotis 2004](#)). La baisse de l'expression aurait aussi pu être attribuée à une réponse immunitaire contre les cellules exprimant les cellules exprimant le transgène comme il l'a souvent été décrit après utilisation de vecteurs Ad de 1<sup>ère</sup> génération, mais ceci n'a pas été exploré dans ces études. Ceci illustre bien la difficulté d'étudier les effets de la régulation épigénétique sur l'expression du transgène *in vivo*, indépendamment des autres mécanismes de défense de l'hôte. Brooks *et al* ont tout de même mis en évidence la mise en place d'une méthylation extensive de l'ADN au niveau du promoteur CMV contrôlant l'expression du transgène dès 1 jour après injection. Il semble donc que la diminution de l'expression du transgène régulièrement observée après transfert de gène à l'aide de vecteurs adénoviraux soit au moins en partie causée par la mise en place d'une structure chromatinienne répressive.

### c. Vecteur non viraux / Plasmides nus

La thérapie génique non virale est également régulièrement confrontée à d'importants problèmes de diminution progressive de l'expression du transgène. La perte physique du plasmide d'expression apparaît être l'une des causes principale, mais de nombreuses études alimentent aussi l'hypothèse de la répression transcriptionnelle. Il est désormais clair que la présence de séquences ADN d'origine bactérienne sur un plasmide injecté (origine de réplication, gènes de résistance aux antibiotique) entraîne une diminution significative du niveau et de la durée de l'expression du transgène, en comparaison à un plasmide dont ces séquences ont été préalablement éliminées ([Darquet 1999](#), [Chen 2003](#), [Chen 2004](#)). Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer la persistance accrue d'une nouvelle génération de plasmides dénués d'éléments d'origine procaryote appelés minicircles (MC). Parmi celles-ci, la plus crédible se base sur le fait que ces séquences contiennent une composition nucléotidique atypique pouvant signaler un élément exogène à la cellule. Il est possible que la concentration en CpG plus importante dans les séquences procaryotes que dans celle d'origine eucaryote soit responsable de l'initiation de la méthylation *de novo* de l'ADN et de sa propagation à tout le plasmide, aboutissant au final à une structure réprimée ([Chen 2004](#)). Cette hypothèse est soutenue par Hodges *et al* qui montrent que l'administration d'un plasmide dont les CpG ont été préalablement méthylé *in vitro* est associée à un niveau d'expression faible et transitoire. En outre, dans leurs mains, la diminution du nombre de CpG dans le plasmide augmente considérablement le niveau d'expression du transgène ([Hodges 2004](#)). Par la suite, une autre équipe a montré à 3 mois pi dans le foie de souris une méthylation *de novo* au niveau des CpG présents dans les promoteurs AAT ou CMV portés par un plasmide administré par injection hydrodynamique, avec en parallèle une diminution importante du niveau d'expression ([Argyros 2008](#)). Dans un modèle similaire, Schüttrumpf *et al* ont récemment présenté des résultats qui suggèrent qu'un plasmide classique est légèrement plus méthylé au niveau des CpG de la région de fixation des TF du promoteur AAT et que le transgène est moins exprimé que ce qui est observé pour un équivalent MC ([Schüttrumpf 2011](#)). Dans le foie de souris, l'équipe de Mark Kay a déterminé par des expériences de ChIP que la présence de séquences procaryotes est responsable de l'initiation et de la propagation d'une structure chromatinienne répressive enrichie en H3K9me2/3 et H2K20me2/3, au sein de laquelle la transcription est réprimée. Au contraire, les MC sont plutôt enrichies en histones portant des marques typiques d'une structure chromatinienne active (H3K3me2/3, H3K9ac et H3S10) et

s'expriment plus efficacement et à plus long terme ([Riu 2007](#)). La même équipe a complété les résultats l'année suivante en montrant de façon convaincante que dans ce modèle la méthylation de l'ADN n'interviendrait pas dans le silencing transcriptionnel du transgène ([Chen 2008](#)). Au final, bien que le rôle de la méthylation des CpG reste encore un peu incertain, il ressort tout de même que dans certains cas, les mécanismes de régulation épigénétiques de la transcription sont capables d'affecter de manière négative l'expression du transgène apporté par un plasmide nu.

#### **d. Vecteurs AAV recombinant**

Bien que le devenir moléculaire du génome de l'AAVr *in vivo* (conversion double brin, circularisation, concatémérisation et intégration) ait été l'objet de nombreux travaux (**I.2.2.4**) son assemblage sous forme chromatinienne et l'influence des mécanismes épigénétiques sur son expression sont au contraire très peu documentés. Cette section s'efforce de lister les différentes raisons qui justifient le fait de s'intéresser à l'impact éventuel de l'épigénétique sur l'expression d'un transgène apporté par un vecteur AAV recombinant.

Comme cela a été détaillé précédemment, la majorité des virus eucaryotes et les autres vecteurs de thérapie génique s'associent fréquemment avec les histones cellulaires et entretiennent des relations étroites avec les mécanismes de régulation épigénétique. Dans le cas des virus sauvages, l'arsenal protéique d'origine viral dont ils disposent leur permet de manipuler la chromatine cellulaire à leur avantage, mais aussi de lutter contre une éventuelle répression de leur transcription par l'hôte ([Flanagan 2007](#), [Lieberman 2008](#), [Hoelzer 2008](#), [Doerfler 2010](#)). Les vecteurs utilisés pour la thérapie génique ne disposent généralement pas de cet équipement. Il a été montré que l'expression d'un transgène apporté par les vecteurs rétroviraux, adénoviraux et non viraux peut être réprimé immédiatement ou progressivement dans la cellule hôte, parfois même après l'inclusion de séquences insultrices ([Yao 2004](#), [Brooks 2004](#), [Riu 2007](#)). Qu'en est-il de l'AAVr ?

La présence de séquences procaryotes dans les particules d'AAVr a déjà été documentée à plusieurs reprises, ainsi que leur jonction avec les ITR de l'AAV. Elles représenteraient 1 à 10% des séquences ADN encapsidés dans les particules ([Chadeuf 2005](#), [Allay 2011](#)). En outre, les génomes de l'AAVr peuvent s'associer par recombinaison ITR/ITR pour former de larges structures concatémériques *in vivo*. Bien que cela n'ait pas été encore décrit il est envisageable que ces structures puissent contenir un mélange de génome AAVr et de séquences procaryotes contaminantes. En mettant cette hypothèse en parallèle avec l'initiation d'un silencing par les

éléments d'origine bactérienne présents dans les plasmides nus administrés *in vivo* ([Chen 2004](#), [Riu 2007](#)), il semble possible que la présence de ces séquences indésirables puisse initier la formation d'une structure hétéro-chromatinienne sur d'éventuels concatémères contenant des séquences procaryotes et donc une perte partielle d'expression lors d'un transfert de gène avec un AAVr.

Après injection IM d'un vecteur AAVr chez le macaque, plusieurs laboratoires dont le nôtre ont observé un pic d'expression du transgène à environ 2-3 mois post injection (pi) puis une diminution inexplicée et plus lente au cours des 6-8 mois qui suivent ([Toromanoff 2008](#), [Penaud Budloo 2008](#), [Ni 2011](#)). Dans une moindre mesure, cette cinétique particulière a également déjà été documentée chez la souris ([Song 2001](#), [Lu 2006](#)). Les différentes explications envisageables sont : (i) une réponse immunitaire cytotoxique « partielle » contre les cellules exprimant le transgène, (ii) un réarrangement des génomes viraux au cours duquel certains sont tronqués et perdent leur capacité d'expression ([Sun 2010b](#)), (iii) une élimination physique de certains génomes AAVr (iv) ou un silencing progressif de la transcription en réponse à la surexpression de séquences exogènes. Pour le moment, aucune hypothèse ne semble être en mesure d'expliquer à elle seule cette perte d'expression.

Bien qu'aucune information ne soit disponible quant à l'éventuelle modulation épigénétique de l'expression du transgène *in vivo*, une étude menée au laboratoire a montré que les formes persistantes du génome AAVr sont associées à des histones cellulaires et forment une structure chromatinienne *in vivo* dans le muscle de primate ([Penaud Budloo 2008](#)). D'autre part, plusieurs équipes ont cherché à répondre indirectement à la question par des études réalisées *in vitro*. *Chen et al* montrent dans un modèle de lignée cellulaire dans lequel un génome AAVr CMV-LacZ est intégré de façon stable dans le génome cellulaire que seul 20% des clones expriment la protéine LacZ. L'administration de TSA ou de Sodium butyrate (pan-HDACi) entraîne une réactivation de LacZ avec en parallèle une hyper-acétylation probable des histones associées. Dès l'arrêt du traitement, le niveau d'expression du transgène chute à nouveau ([Chen 1997](#), [Chen 2000](#)). Ce modèle ne reflète néanmoins pas la persistance principalement épisomale de l'AAVr. *Okada et al* ont montré dans 4 lignées tumorales dans lesquelles l'expression de l'AAV 2 et 5 CMV-GFP est généralement assez faible que l'administration d'un HDACi spécifique des HDAC de classe I (Romidepsine) augmente significativement le niveau d'expression du transgène avec une hyper-acétylation des histones du promoteur CMV mis en

évidence par QPCR-ChIP ([Okada 2006](#)). Les auteurs notent une augmentation significative du niveau d'expression jusqu'à 6 jours post transduction quand le HDACi est administré en même temps que le vecteur AAVr. Cet effet n'est pas observé si l'inhibiteur est mis en contact des cellules avant ou après l'ajout du vecteur recombinant. Enfin, dans un modèle de cellules non tumorales (Hela et HEK293A), un effet similaire a été mis en évidence à 24h pi avec l'acide valproïque, un autre HDACi relativement spécifique ([Fan 2005](#)).

En conclusion, les différents points abordés laissent penser que l'efficacité du transfert de gène à l'aide des vecteurs AAVr peut probablement être affectée par certains mécanismes de régulation épigénétique de la transcription. Au cours de ma thèse, nous avons donc décidé de documenter l'implication de la méthylation de l'ADN et des HPTM associées au génome du vecteur recombinant *in situ*, après administration d'un AAVr chez la souris et le NHP. Nous nous sommes focalisés sur 2 tissus particulièrement pertinents dans le domaine de la thérapie génique : le muscle le foie.

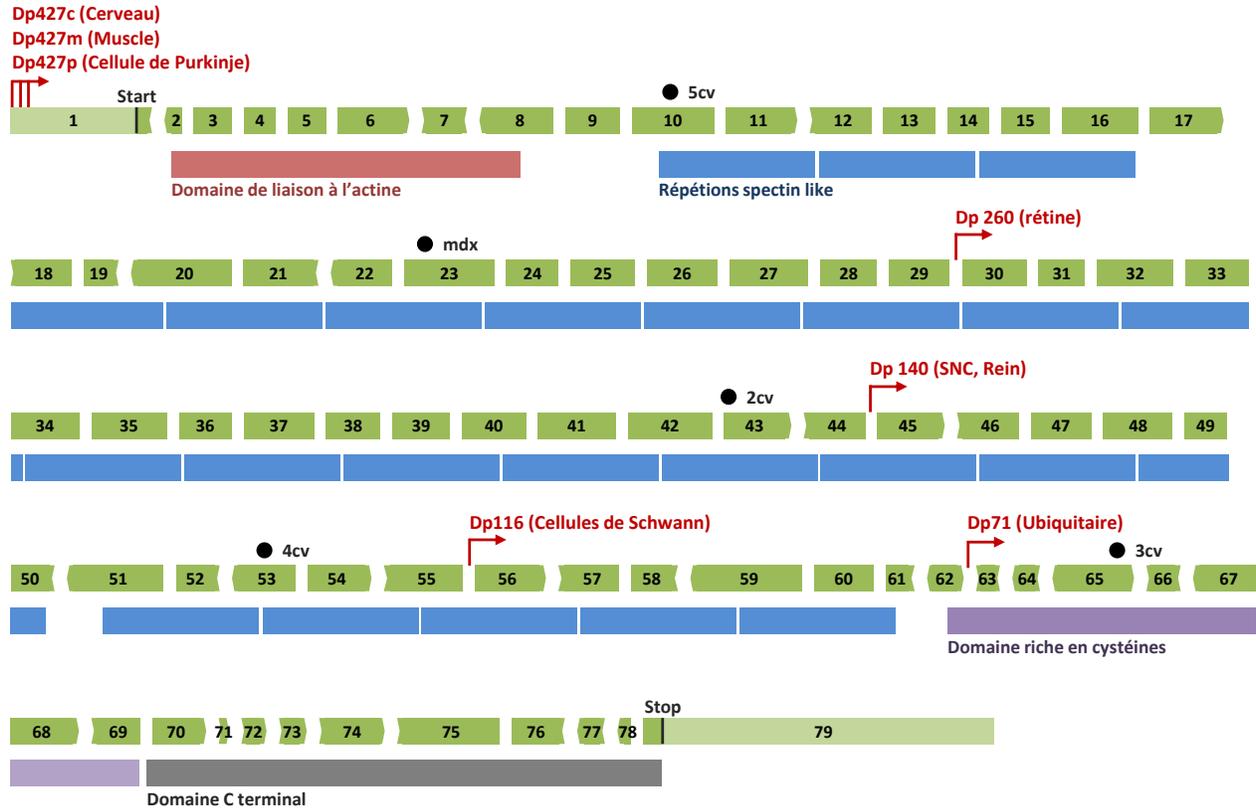
Enfin, plus récemment, nous nous sommes demandés si le contexte pathologique pouvait affecter les mécanismes épigénétiques généraux de la cellule et de ce fait avoir un impact sur l'efficacité du transfert de gène, différent de celui observé dans les tissus sains. Il s'avère que de récentes études ont mis en évidence une perturbation de la stabilité génomique et épigénomique dans les muscles des patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne ([Colussi 2008](#), [Acharyya 2010](#), [Schmidt 2011](#)). Cette maladie étant au centre de nombreux efforts de thérapie génique à l'aide de vecteurs AAV et notre propre laboratoire étant fortement impliqué dans un réseau national focalisé sur le traitement par thérapie génique via le saut d'exon de cette maladie, la question nous a semblé particulièrement importante. Le chapitre suivant présente une vue d'ensemble de la DMD, des mécanismes moléculaires de pathogénèse ainsi que des perturbations de la stabilité du génome et de l'épigénome dans cette maladie.

# I.5. La Dystrophie musculaire de Duchenne

## I.5.1. Généralités sur les myopathies

La dystrophie musculaire de Duchenne ([OMIM #310200](#)) (DMD) est une myopathie extrêmement invalidante entraînant une dégénérescence des muscles striés et lisses. Les patients atteints de cette maladie perdent leur capacité de locomotion avant 12 ans et décèdent prématurément entre 20 et 30 ans par insuffisance cardiaque et/ou respiratoire ([Emery 1991](#), [Nigro 1983](#)). Dans environ 30% des cas un retard mental pouvant être sévère (QI < 75) est aussi observé ([Bresolin 1994](#)). Il existe une variante moins sévère appelée dystrophie musculaire de Becker (BMD) ([OMIM #300376](#)) dont la progression est beaucoup plus lente ([Bushby 1991](#)). La DMD et la BMD sont dues à la présence d'une ou plusieurs mutations dans le gène DMD codant pour la dystrophine ([OMIM #300377](#)), aboutissant dans le premier cas à une protéine absente ou non fonctionnelle et dans le second à une dystrophine partiellement fonctionnelle. Le gène DMD porté par le chromosome X est le plus long identifié dans le génome humain (2,6 Mb). Il contient 79 exons dont certains peuvent subir un épissage alternatif et au moins 7 promoteurs alternatifs ([Pillers 1993](#), [D'Souza 1995](#), [Austin 1995](#), [Lidov 1997](#) voir aussi <http://www.dmd.nl/>). Parmi les nombreuses isoformes du transcrit DMD les 3 plus longs sont exprimés dans le cerveau ([B dystrophine](#)), le muscle ([M dystrophine](#)) et les cellules de Purkinje du cervelet ([P dystrophine](#)) (**Fig. 33**)

La base de données française [UMD-DMD](#) recense plus de 2000 mutations différentes identifiées chez les patients dystrophinopathes dont 67% de larges délétions, 10% de grandes duplications, et 22% de réarrangements à petite échelle (mutation ponctuelle ou petite inversion délétion ou duplication) ([Tuffery-Giraud 2009](#)). La transmission est gonosomale récessive ce qui implique que les filles ne peuvent pas être atteintes de la maladie à l'exception de cas particuliers d'inactivation de l'X déséquilibrée ([Yoshioka 1998](#)). En ce qui concerne les garçons, l'incidence globale de la DMD dans le monde est d'environ 1 pour 3500 naissances ([Emery 1991](#)), avec une majorité de formes familiales mais tout de même 24% de néo-mutations ([Tuffery-Giraud 2009](#)).



**Fig. 33) Représentation de l'ARN messager de la dystrophine (cc).**

Le gène est constitué de 79 exons (en vert) et contient 7 promoteurs Dp227c, m et p, Dp 260, Dp140 et Dp71 (flèches rouges). La protéine dystrophine issue des isoformes longs comprend un domaine de liaison à l'actine (en rouge), 24 répétitions spectin like (en bleu), un domaine riche en cystéine (en violet) et un domaine C-terminal (en gris). Les positions des mutation présentent dans les modèles murins de la DMD [mdx](#), [mdx<sup>2cv</sup>](#), [mdx<sup>3cv</sup>](#), [mdx<sup>4cv</sup>](#) et [mdx<sup>5cv</sup>](#) sont indiqués par des ronds noirs. Informations recueillies sur <http://www.dmd.nl/> et <http://jaxmice.jax.org>.

## I.5.2. Caractéristiques de la DMD humaine

Le muscle squelettique humain est un tissu qui possède une capacité de régénération remarquable en réponse aux lésions. Le mécanisme normal de régénération implique l'activation et la prolifération des cellules satellites qui se différencient par la suite et fusionnent soit avec leur fibre parentale pour les réparer, soit entre elles pour former de nouvelles fibres musculaires ([Péault 2007](#)). Dans les dystrophies musculaires telles que la DMD, le muscle est soumis à une agression interne continue caractérisée par une nécrose des fibres musculaires et aboutissant à une activation constante des mécanismes de régénération musculaire. Toutefois, contrairement à ce qui est observé dans le muscle normal, le nombre total de cellules satellites ainsi que leur

capacité de prolifération diminuent rapidement, ce qui entraîne une érosion de la capacité musculaire à contrer les dommages subis par la dégénération ([Luz 2002](#), [Jejurikar 2003](#), [Kuang 2007](#)). En conséquence, en fonction de l'évolution de la pathologie, le muscle dystrophinopathe est constitué d'une proportion variable de fibres musculaires vivantes, mortes, en cours de dégénération ou en régénération. On distingue classiquement 7 types des lésions dans le muscle déficient en dystrophine : fibres hyalines, nécrose, anisocytose, fibres à noyaux centraux, calcification, fibrose et infiltration adipeuse ([Cullen 1980](#), [Cumming 1981](#), [Swash 1991](#)). Quelques une de ces lésions et de leurs conséquences caractéristiques sont détaillées ci-dessous :

- **Fibres hyalines** : Ce sont des fibres hypertrophiées, arrondies hypercolorées en hémalum éosine particulièrement représentées dans la phase précoce de la maladie (1 à 5 ans) ([Boxler 1978](#)).
- **Foyers nécrotiques** : La présence de foyers de fibres nécrotiques est particulièrement marquée en phase précoce, mais est notée à tous les stades de la maladie ([Cornelio 1984](#)). On observe généralement la présence d'infiltrats inflammatoires et à cellules lymphocytaires CD4+ et CD8+ à proximité des fibres nécrotiques ([Desguerre 2009](#)).
- **Fibrose et adipeuse** : Le muscle des patients DMD est caractérisé par une colonisation progressive de l'endomysium et du périnysium par des tissus adipocytaires et fibrotiques qui remplacent à terme la quasi-totalité du tissu musculaire ([Zhou 2011](#), [Desguerre 2009](#)).
- **Fibres en régénération** : Les fibres lésées sont compensées par de nouvelles fibres musculaires au cours de la phase précoce. Ces fibres en régénération sont caractérisées par une petite taille, un noyau en position centrale et la réexpression de gènes embryonnaires dont l'isoforme développementale des chaînes lourdes de la myosine (MHCd) ([Marini 1991](#)). La quantité de fibre en régénération diminue progressivement jusqu'à ne plus compenser la nécrose en phase tardive (+ de 10 ans) ([Cullen 1980](#), [Swash 1991](#)).
- **Anisocytose** : La grande variété de fibres présentes dans le muscle dystrophinopathe aboutit à une hétérogénéité importante de la taille des fibres ([Wang 1999](#), [Briguet 2004](#)).
- **Fibres révertantes** : Certaines fibres présentent une réexpression de la dystrophine et une restauration du DAPC (Complexe protéique associé à la dystrophine) à la membrane. Le pourcentage est très variable d'un patient à un autre est serait serait causé par une mutation somatique secondaire restaurant un cadre de lecture et aboutissant à une dystrophine au moins

partiellement fonctionnelle ([Gold 1990](#), [Nicholson 1993](#)).

### I.5.3. Modèles murins de la DMD

Le modèle de DMD le mieux caractérisé et le plus utilisé est sans aucun doute la souris [mdx](#) (muscle dystrophy X linked). Ce mutant spontané de la dystrophine isolé en 1984 à partir d'une lignée C57Bl/10ScSn présente une mutation ponctuelle dans l'exon 23 ([Bulfield 1984](#)) (**Fig. 33**). Malgré une chronologie un peu différente et une atteinte musculaire modérée les principaux évènements pathologiques et signes de progression de la maladie sont reproduits ([Dangain 1984](#), [Tanabe 1986](#), [Cullen 1988](#), [Lucas 2004 thèse ENVN](#)). Dès la naissance des animaux, un niveau de créatine kinase élevé est détecté indiquant une perméabilité membranaire précoce. La dégénérescence du muscle squelettique commence entre 2 à 4 semaines et est accompagnée d'une régénération. Comme pour les patients humains DMD, la structure pathologique du muscle est caractérisée par une anisocytose élevée, une centro-nucléation sévère et la présence de fibres hyalines et nécrotiques. En revanche l'infiltration macrophagique et lymphocytaire ainsi que la fibrose sont plus modérées que chez l'Homme. La progression de la maladie est beaucoup plus lente, la force musculaire absolue et la durée de vie semblent diminuer seulement de façon modeste en comparaison avec des souris saines ([Lefaucheur 1995](#), [Chamberlain 2007](#)). Il semblerait que la souris mdx soit capable de compenser la dégénérescence des fibres musculaire par une régénération plus efficace et surtout plus durable que chez le patient humain DMD ([Lucas 2004 thèse ENVN](#)).

Pour tenter d'aggraver le phénotype des souris mdx, une série de mutagenèse à l'ENU a été réalisée entre 1989 et 1992 ([Chapman 1989](#), [Danko 1992](#), [Cox 1993](#), [Im 1996](#)). Les 4 lignées obtenues ([mdx<sup>2cv</sup>](#), [mdx<sup>3cv</sup>](#), [mdx<sup>4cv</sup>](#) et [mdx<sup>5cv</sup>](#)) présentent un phénotype assez comparable aux souris mdx (**Fig. 33**). Chez les mutants [mdx<sup>4cv</sup>](#) et [mdx<sup>5cv</sup>](#) on note cependant un nombre de fibres révertantes 10 fois plus faible que pour les autres lignées mdx ce qui entraîne une atteinte légèrement plus sévère, notamment dans les muscles diaphragmatique et cardiaque ([Chapman 1989](#), [Danko 1992](#), [Beastrom 2011](#)). Malgré une caractérisation moins poussée que la lignée mdx originelle, cette aggravation modérée de la pathologie fait des mutants [mdx<sup>4cv</sup>](#) et [mdx<sup>5cv</sup>](#) une alternative intéressante pour la recherche thérapeutique.

Plusieurs doubles mutants (dystrophine/utrophine, dystrophine/MyoD...) ont également été générés ([Deconinck 1997](#), [Grady 1997](#), [Megeny 1999](#)). Généralement ils présentent un phénotype beaucoup plus sévère se rapprochant de la DMD humaine et sont utilisés pour l'étude

des mécanismes de compensation chez la souris. Ils ont toutefois un intérêt plus restreint pour recherche thérapeutique du fait du double défaut génétique.

#### **I.5.4. De la recherche fondamentale à la recherche clinique**

À l'heure actuelle, bien qu'il n'existe aucun traitement curatif pour la DMD, il est possible d'améliorer la qualité de vie des malades et de retarder la progression de la maladie à l'aide d'anti-inflammatoires stéroïdiens et/ou d'immunosuppresseurs. Cependant, les bénéfices sont contrebalancés par des effets secondaires lourds limitant l'usage à long terme ([Moxley 2005](#), [Dubrovsky 1998](#), [Iannitti 2010](#)). Ces 25 dernières années ont concentré de nombreux efforts de recherche fondamentale qui ont abouti à une compréhension plus approfondie de la pathologie au niveau moléculaire. Ces avancées ont permis d'envisager un grand nombre d'approches thérapeutiques pharmacologiques, cellulaire et génique en utilisant notamment l'AAVr ([Pichavant 2011](#)). Plus récemment, il a été montré que l'environnement épigénétiques et la stabilité de génome de la cellule musculaire dystrophinopathe étaient considérablement altérés ([Colussi 2008](#), [Schmidt 2011](#)). Ces deux paramètres semblent jouer un rôle dans la progression de la pathologie mais pourraient également entraîner des effets secondaires indésirables sur l'expression et la stabilité d'un élément génétique exogène tels que l'ADN d'un vecteur viral. Un état des lieux des connaissances moléculaires concernant la DMD est fourni dans le chapitre suivant.

#### **I.5.5. Caractéristiques moléculaires de la DMD**

L'absence de la dystrophine entraîne la perte de l'assemblage de l'imposant complexe protéique associé à la dystrophine (DAPC) comprenant les dystroglycanes  $\alpha$  et  $\beta$ , les sarcoglycanes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , les syntrophines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  et le complexe syncoilin /  $\alpha$ -dystrobrevine ([Rando 2001](#), [Ehmsen 2002](#)) (**Fig. 34**). L'implication de la perte de ce complexe qui semble jouer un rôle capital dans la résistance mécanique de la fibre musculaire, l'homéostasie cellulaire et la régulation de nombreuses voies impliquées dans la survie et l'inflammation est discutée dans ce chapitre.

### I.5.5.1. Rôle mécanique du DAPC

La première fonction du DAPC qui a été identifiée est d'assurer le lien entre le cytosquelette d'actine *via* l'extrémité N terminal de la dystrophine et la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des dystroglycanes qui peuvent se fixer à la laminine (Fig. 34). La dystrophine est donc un acteur important de la transmission de la force musculaire du sarcomère et assure un rôle fondamental de protection du sarcolemme au cours des cycles de contraction/relaxation musculaire (Ervasti 1993, Rybakova 2000). La répétition du motif spectrin-like (x24) dans la dystrophine semble jouer un rôle d'amortisseur moléculaire (Winder 1995) (Fig. 33).

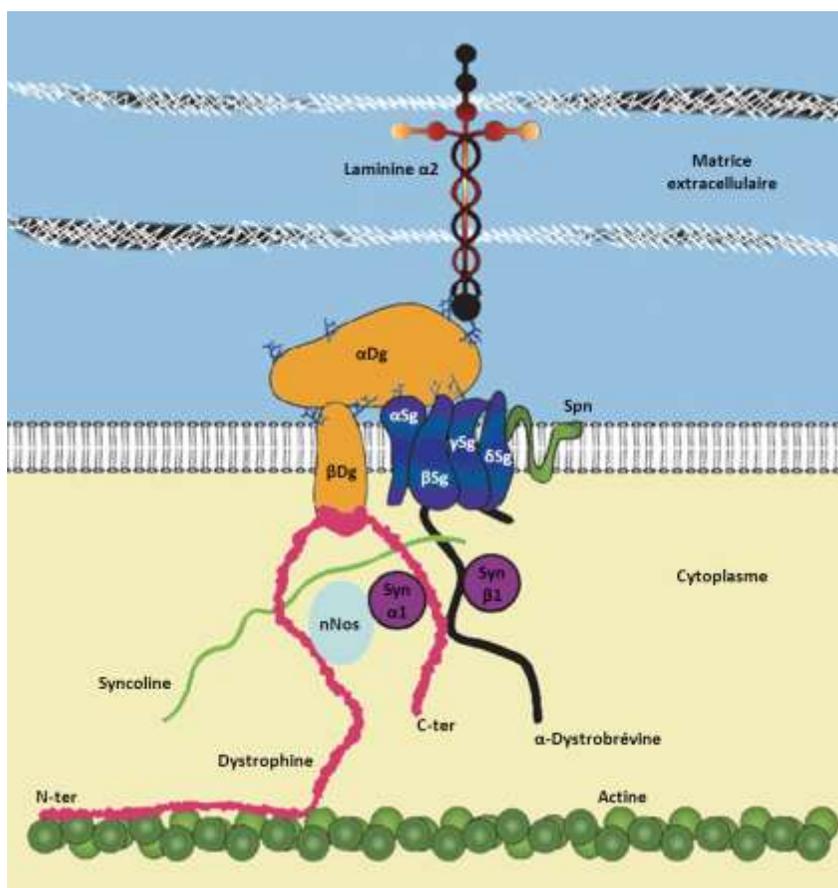


Fig. 34) Représentation du complexe associé à la dystrophine.

Le DAPC comprends de nombreux partenaires glycoprotéiques, parmi lesquels, l'isoforme musculaire de la dystrophine, les dystroglycanes  $\alpha$  et  $\beta$  ( $\alpha$ DG et  $\beta$ DG), les sarcoglycanes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  ( $\alpha$ SG,  $\beta$ SG,  $\gamma$ SG et  $\delta$ SG), Le sarcospan (spn), les syntrophines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  (Syn) qui peuvent recruter de nombreux partenaires secondaire dont la NO synthétase neuronale (nNOS), la dystrobrevine  $\alpha$  associée à la syncoline en liant avec le cytosquelette secondaire (non représentée sur ce schéma) et la laminine  $\alpha 2$  qui amarre le complexe sur la matrice extracellulaire. Adapté de [Ehmsen 2002](#).

Chez la souris mdx et le patient DMD la perméabilité de la membrane plasmique musculaire est sévèrement compromise, ce qui entraîne un efflux de molécules intracytoplasmiques telle que la créatine kinase et parallèlement une hausse de la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire ([Allen 2010](#)). L'hypothèse historique expliquant cette perméabilisation accrue du sarcolemme est que la dystrophine n'assure plus son rôle de protection de la fibre musculaire au cours des contractions, ce qui entraîne l'apparition de microlésions ([Mokri 1975](#), [Petrof 1993](#)). Dans le muscle dystrophinopathe, les conséquences mécaniques de l'absence de la dystrophine et donc du non assemblage du DAPC seraient un défaut de transmission de la force musculaire et des dommages provoqués à la membrane. Cependant, à l'heure actuelle l'hypothèse du « tout mécanique » est mise à mal. L'altération mécanique n'est de façon générale plus considérée comme une cause de la pathogénèse et semble être seulement un facteur secondaire impliqué dans l'évolution de la DMD ([Batchelor 2006](#), [Evans 2009](#), [Allen 2010](#)).

#### **I.5.5.2. Rôle du DAPC dans la signalisation et l'homéostasie cellulaire**

Il paraît maintenant évident que l'absence de la dystrophine provoque indirectement des perturbations des signaux intracellulaires qui semblent contribuer de façon significative à la pathogénèse de la DMD, avant toute altération mécanique. En effet, en plus de son rôle mécanique, le DAPC est une plateforme de recrutement à la membrane de facteurs impliqués dans la balance survie/apoptose, le contrôle de l'inflammation et le maintien de l'homéostasie cellulaire ([Allen 2010](#), [Rando 2001](#)). Les syntrophines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  sont des exemples de protéines du DAPC n'ayant pas de rôle mécanique mais recrutant avec de nombreux partenaires protéiques. Leurs domaines PDZ a été décrit comme interagissant avec NOS1 (nitric oxide synthétase) ([Miyagoe-Suzuki 2001](#)), les canaux calciques mécano-sensitifs TRCP1 ([Vandebrouck 2007](#)), la kinase p38gamma ([Hasegawa 1999](#)) et le complexe calmoduline/calmoduline kinase (CaMK). La sous-unité  $\beta$  du complexe dystroglycane interagit quant à elle *in vivo* avec la caveoline-1 ([Sharma 2010](#)) et Grb2 (Growth factor Receptor Bound protein 2) ([Yang 1995](#)), deux protéines impliquées dans la transduction des signaux intracellulaires. Dans le muscle dystrophinopathe, la perturbation de la régulation des partenaires protéiques du DAPC précédemment décrits a été largement documentée et semble être responsable de nombreux effets indésirables parmi lesquels une **perturbation de l'homéostasie calcique**, un **stress oxydatif sévère** et l'**activation des voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire**.

### **a. Perte de l'homéostasie calcique**

La maintenance de l'homéostasie calcique est capitale pour la cellule musculaire, dont la contraction/relaxation est liée aux fluctuations de la concentration en calcium. L'augmentation locale de la concentration calcique entraîne l'activation de protéase calcium dépendante ([Spencer 2002](#), [Gissel 2006](#)) et le dérèglement de nombreux signaux intracellulaires impliqués dans la survie et l'inflammation ([Alderton 2000](#)). Dans le muscle dystrophynopathe, l'altération de la régulation intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> semble venir à la fois des dommages du sarcolemme et de la dérégulation des canaux calciques. Comme indiqué précédemment, la membrane plasmique d'un muscle dystrophynopathe semble être sujette à des micro-ruptures induites par l'absence de protection mécanique normalement assurée par la dystrophine ([Mokri 1975](#), [Petrof 1993](#)). Ce phénomène semble être exacerbé par le stress oxydatif cellulaire qui rend la membrane lipidique plus « rigide » et donc plus susceptible d'être rompue localement ([Hunter 1986](#), [Catala 2011](#)). Yasuda *et al* ont montré dans un modèle de cardiomyocytes que l'administration d'un stabilisateur de membrane permet une diminution drastique de la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, attribué à un colmatage des fuites membranaires ([Yasuda 2005](#)). En contradiction avec ces résultats l'équipe de DG Allen propose que la fuite du calcium soit plutôt causée de façon prépondérante par une sur-activation des canaux calciques et notamment des canaux mécano-sensitifs (SAC). En utilisant des bloqueurs spécifiques des SAC, ils montrent une réduction significative de la concentration calcique ainsi qu'une amélioration de la perméabilité membranaire *in vivo* chez la souris mdx ([Whitehead 2006](#), [Yeung 2005](#)). L'activité anormalement élevée des canaux calciques dans le muscle dystrophynopathe peut être expliquée soit directement par une perte de l'association entre la  $\alpha$ -syntrophine et le canal TRCP1 ([Vandebrouck 2007](#), [Sabourin 2009](#)), soit par des dommages causés par le stress oxydatif entraînant une activation des canaux.

### **b. Diminution de la quantité d'oxyde nitrique et stress oxydatif**

Dans le muscle dystrophynopathe, une des conséquences de la perturbation de la signalisation intracellulaire est une diminution de la concentration en oxyde nitrique (NO). ([Gucuyener 2000](#), [Kasai 2004](#)). Le NO est un composé généré par les NO synthétase (NOS) qui joue un rôle fondamental dans la relaxation musculaire ([Kobzik 1994](#)) et dans la régulation de l'apoptose ([Kim 1999](#)). La cause de la carence en NO ainsi que sa responsabilité dans la

pathogénèse des dystrophies musculaires sont bien documentées, mais ne paraissent pas encore être complètement élucidés.

Dans le muscle de la souris mdx et le patient DMD humain, l'absence de la dystrophine est associée à un défaut d'assemblage du complexe DAPC dont la NOS neuronale (NOS1 ou nNOS) fait partie *via* son association avec la syntrophine  $\alpha$  ([Miyagoe-Suzuki 2001](#)). Plusieurs groupes ont décrit l'absence de NOS1 au niveau du sarcolemme dans le muscle dystrophynopathe ([Thomas 1998-2](#), [Crosbie 2001](#)). D'après ces mêmes équipes, la délocalisation de NOS1 entrainera une diminution de l'activité enzymatique due à une régulation aberrante et donc une carence en NO. Cependant des travaux plus récents n'indiquent pas de diminution de l'activité de NOS1 dans le muscle squelettique de patient DMD/BMD et suggèrent même une compensation par la surexpression des isoformes NOS2 et NOS3 ([Buchwalow 2006](#)). La présence de radicaux libres oxygénés (ROS = reactive oxygen species) pourrait également expliquer la diminution de la concentration en NO ([Frisbee 2005](#), [Buchwalow 2006](#)). Il a été montré que les muscles de souris mdx et de patients DMD sont soumis à un stress oxydatif cellulaire chronique et sévère ([Buchwalow 2006](#), [Dudley 2006](#), [Lawler 2011](#)), qui serait causé par une augmentation de l'activité de la NAD(P)H oxydase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). ([Williams 2007](#), [Whitehead 2010](#), [Spurney 2008](#)). Cette enzyme produit des ions superoxydes qui forment spontanément des ROS qui peuvent réagir avec le NO pour former un dérivé oxydant. Dans le muscle dystrophynopathe, le stress oxydatif élevé est certainement responsable au moins en partie de dégradation du NO. La carence en NO et le stress oxydatif semble avoir au moins 2 conséquences : une **ischémie musculaire due à un défaut de la vasodilatation** et de nombreux **dommages oxydatifs liés à la présence de radicaux oxygénés libres**. Il a été évoqué la possibilité que la pathogénèse de la DMD soit le résultat de la présence simultanée de ces 2 conséquences (2 hits hypothesis [Rando 2001](#)).

- **Ischémie musculaire due à un défaut de la vasodilatation**

Le NO joue un rôle particulièrement important dans la relaxation musculaire des muscles lisses de la tunique des vaisseaux sanguins au sein desquels il participe au contrôle du flux sanguin. Il a été montré chez le rat qu'une déplétion en NO entraîne une augmentation de l'amplitude de la réponse vasoconstrictrice ([Thomas 1998-1](#)) et une raréfaction des capillaires sanguins qui alimentent les muscles squelettiques ([Frisbee 2005](#)). Chez la souris mdx et les

patients humains DMD, plusieurs équipes ont mis en évidence une déficience de la vasodilatation au cours de l'effort musculaire ([Sander 2000](#), [Thomas 1998-2](#), [Crosbie 2001](#)). Il semblerait que ce flux sanguin inadéquat soit responsable d'une ischémie musculaire aiguë lors de l'effort ce qui fournit une explication cohérente de la fatigabilité accrue et la nécrose locale observées dans le muscle dystrophinopathe.

- **Dommages liés à la présence de radicaux oxygénés libres**

La NO et les ROS ont un rôle de régulation de nombreux phénomènes cellulaires. En présence d'un taux élevé d'ions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup>, le NO forme un oxydant très réactif associé à de nombreux effets indésirables : le peroxy-nitrite. Buchwalow *et al* ont montré un stress oxydatif élevé *via* une concentration élevée de peroxytyrosine dans les muscles de patients DMD et BMD ([Buchwalow 2006](#)). Cependant à aucun moment la présence de peroxy-nitrite n'est envisagée, or la peroxytyrosine est un produit dérivé indiquant la présence du peroxy-nitrite. Le lien entre la pathologie DMD et la présence de peroxy-nitrite n'a jamais été établi, pourtant l'implication de ce composé a déjà été évoqué dans la critical illness myopathy ([Margherita 2007](#)). En outre le peroxy-nitrite semble être directement responsable d'un grand nombre de dégâts observés dans la myopathie de Duchenne qui sont habituellement attribués au stress oxydatif de façon générale ([Pacher 2007](#)). La présence de peroxy-nitrite provoque une mort cellulaire par apoptose ou par nécrose de cellules neuronales ou cardiaques ([Loukili 2010](#), [Bonfoco 1995](#), [Kim 1999](#)), un phénomène couramment observé dans le muscle dystrophique. La peroxydation des lipides membranaires entraîne une altération de sa perméabilité ([Richter 1987](#)). Gervasio *et al* ont montré chez la souris mdx que les ROS sont capables d'activer la kinase Src qui à son tour augmente l'activité des canaux calciques mécano-sensitifs formés par le complexe Calveoline3/TCRP1 ([Gervásio 2008](#)). La peroxydation des membranes lipidiques et la dérégulation des canaux calciques indiquent que le stress oxydatif est très certainement un coupable majeur de l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. La liste des méfaits potentiels du peroxy-nitrite est encore longue. Etant capable d'oxyder les Cystéines, Méthionines, Histidine et Tryptophane et de nitrosyler les Tyrosines, il est connu pour modifier profondément de nombreuses voies de la signalisation cellulaire telles que les voies des MAPK ([Pesse 2005](#), [Rita 2004](#)) et NF-κB (nuclear transcription factor kappa B) ([Gloire 2006](#)). Le stress oxydatif par l'intermédiaire du peroxy-nitrite pourrait donc être à l'origine de la réponse

inflammatoire, l'altération des capacités de régénération et l'aggravation des dommages cellulaires ([Tidball, 2007](#), [Lawler 2011](#)). En outre, la diminution de la quantité de NO a de profonds effets sur la régulation épigénétique *via* le contrôle des HDAC de classe II. Le peroxy-nitrite quant à lui est connu pour induire des dommages aux acides nucléiques ([Pacher 2007](#)). L'implication du stress oxydatif sur la stabilité du génome et de l'épigénome est discutée en détail dans la section **I.5.6**

### **c. Activation des voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire et l'inflammation**

Les voies de signalisation intracellulaire MAPK et AKT jouent un rôle critique dans la balance survie/apoptose cellulaire et sont susceptibles d'être activées par de nombreux stimuli tels que les cytokines pro inflammatoires, les signaux mitogènes et/ou le stress cellulaire ([Pearson 2001](#)). Le DAPC semble être connecté à ces voies par l'intermédiaire de la  $\beta$  dystroglycane et de la syntrophine  $\alpha 1$ . De façon intéressante, il a été montré chez la souris mdx que lors d'un effort physique plusieurs voies MAPK (ERK, JNK et p38) sont anormalement suractivées en lien avec la dégénérescence musculaire ([Nakamura 2005](#)).

La  $\beta$  dystroglycane interagit *via* son domaine C terminal avec la protéine adaptatrice Grb2 ([Yang 1995](#)) grâce à laquelle elle est capable de recruter des partenaires impliqués dans les voies de signalisation MAPK ([Spence 2004](#)). Il semblerait également que Grb2 puisse interagir avec la phosphoinositide 3-kinase qui intervient dans la voie AKT. En provoquant la disruption de la  $\beta$  dystroglycane et de la laminine en culture primaire de myoblastes, la voie AKT est inhibée et les cellules entrent en apoptose. Dans une moindre mesure ce phénomène a également été observé pour des myoblastes issus de souris mdx ([Langenbach 2002](#)).

La kinase p38 $\gamma$  (ou MAPK12 ou ERK6 ou SAPK3) a été identifiée parmi les partenaires de la syntrophine  $\alpha 1$  ([Hasegawa 1999](#)). p38 $\gamma$  est décrit comme étant un facteur pro-apoptotique spécifique du muscle squelettique dans des cellules C2C12 ([Lechner 1996](#)). Chez la souris transgénique déficiente pour p38 $\gamma$ , une régénération musculaire marquée est observée ([Ruiz-Bonilla 2008](#)). En outre sachant que p38 $\gamma$  peut être activé par le stress oxydatif et/ou mécanique dans les muscles lisses et squelettiques ([Pesse 2005](#), [McClung 2009](#), [Kook 2008](#)), il est tentant de penser que dans le muscle dystrophinopathe, p38 $\gamma$  n'est plus régulé par le DAPC ce qui provoque une hausse de son activité qui semble être en partie responsable de la mort des cellules musculaires ([Nakamura 2005](#)).

NF- $\kappa$ B est une famille de facteurs de transcription qui régulent l'activité de nombreux

gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Dans le muscle déficient en dystrophine, l'activité de NF- $\kappa$ B est significativement plus élevée au repos et en exercice en comparaison à un témoin sain ([Acharyya 2007](#), [Kumar 2003](#), [Monici 2003](#)). La voie NF- $\kappa$ B semble pouvoir être activée par de nombreux *stimuli* retrouvés chez les souris mdx et les patients humains DMD : les cytokines inflammatoires dont TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha) qui est surexprimée ([Ladner 2003](#), [Kumar 2003](#)), le stress oxydatif *via* les ROS ([Gloire 2006](#)) et le stress mécanique ([Kumar 2003](#)). En réponse à ces stimuli, NF- $\kappa$ B provoque l'activation d'un large panel de gènes parmi lesquels des cytokines pro-inflammatoires et pro-apoptotiques (dont son propre activateur TNF $\alpha$ ) et des enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydatif dont la phospholipase A2 et de la NAD(P)H oxydase et NOS2 ([Kumar 2004](#)). L'activation aberrante de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans le muscle dystrophinopathe est très certainement l'une des causes de la présence d'infiltrats inflammatoires à cellules T et à macrophages et de foyers nécrotiques ([Spencer 2001](#)). Cette implication est confortée par les stratégies thérapeutiques qui visent à réduire l'activation de la voie NF- $\kappa$ B chez la souris mdx et qui montrent une nette diminution de l'inflammation et de la nécrose ainsi qu'un bénéfice musculaire fonctionnel ([Messina 2006](#), [Tang 2010](#), [Messina 2011](#), [Yang 2012](#)).

#### **d. Altération métaboliques multifactorielle autoamplifiée**

Avec la disparition du complexe DAPC, la cellule musculaire semble perdre sa capacité mécanique de résistance aux cycles de contraction/relaxation répétés ([Ervasti 1993](#), [Rybakova 2000](#)). Cependant en plus de son rôle mécanique, le DAPC sert de plateforme d'interaction sarcolemme/cytosol à de nombreux acteurs impliqués dans le maintien de l'homéostasie calcique de la survie cellulaire et de la régulation du stress oxydatif ([Allen 2010](#), [Rando 2001](#)). C'est l'altération de ces mécanismes qui semble véritablement être responsable de la DMD. Pour preuve, le simple fait de corriger même partiellement les niveaux endogènes de calcium, de ROS ou NF- $\kappa$ B permet une restauration souvent spectaculaire de la structure et de la force musculaire, sans réassemblage du DAPC ([Bhatnagar 2011](#), [Messina 2006](#), [Tidball 2004](#), [Bellinger 2009](#)). Dans le muscle dystrophinopathe, l'absence du DAPC se traduit donc par une série de dérèglements métaboliques en chaîne dont les conséquences sont sévères. Il est intéressant de noter que les différentes altérations semblent « collaborer entre elles » et s'auto entretenir dans un cercle vicieux. Par exemple, il a été montré que la présence de ROS entraîne une activation des canaux calciques et une fragilisation du sarcolemme ce qui serait en partie responsable de

l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire ([Richter 1987](#), [Gervásio 2008](#), [Martins 2008](#), [Shkryl 2009](#)). L'augmentation de la concentration calcique entrainerait quant à elle l'activation de la phospholipase A2 ([Nethery 2000](#), [Gissel 2006](#)) et de la NAD(P)H oxydase ([Martins 2008](#), [Shkryl 2009](#)), deux enzymes capables de produire des ROS. Le stress oxydatif a également été identifié comme étant un mécanisme d'activation de la voie des MAPK ([McClung 2009](#)) et NF-κB ([Gloire 2006](#)), qui en retour sont capables d'induire la production d'enzymes impliquées dans la génération de ROS ([Kumar 2004](#)). En bref, la DMD a des causes initiales mal identifiées mais probablement de nature majoritairement métabolique et une progression multifactorielle auto amplifiée aboutissant à la dégénérescence des muscles lisses et squelettiques.

### **I.5.6. Stabilité du génome et régulations épigénétiques du muscle déficient en dystrophine**

Les mécanismes moléculaires qui provoquent la pathologie DMD ont été très étudiés depuis près d'une trentaine d'années mais la complexité des interactions entre les différents acteurs protéiques rend l'image détaillée encore floue. Plus récemment, il a été montré que les profonds dérèglements métaboliques de la cellule musculaire dystrophinopathe ont un impact sur la stabilité du génome ([Schmidt 2011](#)) et modifient également le transcriptome *via* des signaux épigénétiques aberrants ([Colussi 2009](#)). Ces altérations génomiques et épigénomiques semblent faire partie intégrante de la physiopathologie moléculaire de la DMD et sont autant de cibles thérapeutiques ayant parfois déjà été exploitées avec succès avec des modèles animaux ([Minetti 2006](#), [Colussi 2008](#)).

#### **I.5.6.1. Altérations de la stabilité génomique**

Le stress oxydatif peut endommager l'ADN en introduisant des modifications oxydatives sur la base azotée et sur le squelette sucre-phosphate. Par exemple, les ROS peuvent oxyder ou nitrosyler la guanine qui est particulièrement réactive pour donner respectivement la 8-oxo-guanine (8oxoG) ou la 8-nitro-guanine ([Niles 2005](#), [Burney 1999](#)). *In vivo* les bases oxydées provoquent l'intervention du système BER de réparation de l'ADN qui induit le clivage de la base azotée (site abasique), une coupure simple brin et la réparation de la base par complémentarité ([Pascucci 2002](#)). Si le site abasique n'est pas réparé au moment de la réplication de l'ADN, la majorité des polymérases humaines introduisent de préférence un A en face de la

position vacante ([Eoff 2010](#)). En conséquence, si le système est débordé ou ne fonctionne pas correctement, les dommages s'accumulent et induisent une mutagenèse aléatoire. En outre, il a été montré que le peroxy-nitrite seul est capable d'induire des cassures ADN simple brin, probablement en attaquant le squelette sucre-phosphate ([Kennedy 1997](#)). De façon intéressante, dans les muscles squelettiques de patients DMD la quantité en 8oxoG est significativement plus élevée que chez des individus sains ([Nakae 2005](#)). D'autre part chez la souris mdx la présence de nombreuses cassures ADN simple brin a été rapportée par Coutlon *et al.* ([Coutlon 1992](#)). Ces 2 études laissent entrevoir un lien entre le stress oxydatif élevé et la présence de dommages non réparés sur l'ADN dans le muscle dystrophinopathe.

Une étude plus récente montre de façon convaincante que les génomes de souris atteintes de différentes dystrophies musculaires (dont mdx), sont sujets à une instabilité élevée caractérisée par des duplications chromosomiques, de larges délétions dans des gènes suppresseurs de tumeurs et une activation de la réponse aux cassures ADN double brin. L'activation anormalement élevée des mécanismes de réparation de l'ADN est également détectée avant apparition des symptômes chez de jeunes patients humains et même avant la naissance dans des fœtus DMD ([Schmidt 2011](#)). Les auteurs suggèrent que les dommages génomiques sont provoqués par le stress oxydatif et contribuent très certainement à la pathogénèse de la DMD *via* l'érosion de la capacité de régénération des cellules souches musculaires.

Enfin, il est intéressant de noter que la présence de dommages sévères de l'ADN provoque une suractivation de la Polymerase poly-ADP-Ribose dont l'activité de réparation entraîne une déplétion en NAD<sup>+</sup> ce qui a pour conséquence d'entraîner la mort cellulaire par nécrose ([Virág 1995](#)). Bien que cela n'ait jamais été évoqué, il est tout à fait envisageable que l'instabilité génomique associée à la DMD soit en partie responsable de la nécrose des fibres musculaires.

### **I.5.6.2. Altérations de la régulation épigénétique**

#### **a. Dérégulation de l'activité des HDAC**

Bien qu'elles soient ubiquitaires, les HDAC de classe I (HDAC1, 2, 3 et 8) sont des acteurs importants du contrôle de myogenèse, *via* leur activité de répression exercée sur les MRF (myogenic regulatory factors), dont en particulier MyoD ([Dokmanovic 2007](#), [Mal 2001](#)). Il a été montré dans des cellules neuronales qu'une concentration en NO intracellulaire élevée entraîne la

S-nitrosylation des cystéines des HDAC de classe I, ce qui provoque une diminution significative de leur activité ([Watson 2009](#), [Nott 2008](#)). Chez la souris mdx, le niveau d'expression et l'activité des HDAC de classe I semble être significativement augmentés notamment pour HDAC2 ([Colussi 2008](#)). Cette observation est cohérente avec la diminution de la quantité de NO dans le muscle dystrophynopathe et le fait que la restauration d'une quantité physiologique de NO aboutit à une diminution de l'activité des HDAC de classe I ([Colussi 2008](#)).

Les HDAC de classe II (HDAC 4, 5, 7 et 9) sont de façon générale largement représentées dans les muscles cardiaque et squelettique ([Dokmanovic 2007](#)). Elles sont impliquées dans la régulation de nombreux gènes contrôlant la prolifération et la différenciation musculaire dont MEF2 ([Lu 2000](#)) mais sont au contraire des HDAC de classe I inhibées par une diminution de la concentration en NO. La phosphorylation de leur signal d'export nucléaire (NES) entraîne une diminution de leur activité par transfert dans le cytoplasme. Le contrôle de la phosphorylation du NES est assuré par la calmoduline kinase calcium dépendante (CaMK) et la phosphatase 2 NO dépendante ([Sucharov 2006](#), [Illi 2008](#), [McKinsey 2001](#)). Dans le muscle dystrophynopathe, la concentration élevée en  $Ca^{2+}$  et la carence en NO doit donc logiquement entraîner une phosphorylation du NES et un export des HDAC de classe II à l'extérieur du noyau. C'est ce qui est observé chez la souris mdx et chez les patients DMD avec la diminution significative de l'activité des HDAC de classe II, une augmentation globale de l'acétylation des histones et un profil chromatinien général plus ouvert ([Colussi 2009](#)).

Il semble donc que dans le muscle dystrophynopathe, l'activité des HDAC de classe I et de classe II soit respectivement augmentée et inhibée ce qui entraîne une dérégulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation musculaire. L'administration d'HDACi non spécifique contre classes I et II chez la souris mdx permet une excellente restauration phénotypique et fonctionnelle ([Minetti 2006](#)). Cependant un effet thérapeutique similaire peut être également obtenu avec des inhibiteurs spécifiques des HDAC de classe I ou le silencing de HDAC 2, restreignant l'effet bénéfique à l'inhibition de cette seule HDAC ([Minetti 2006](#), [Colussi 2008](#)). Ces études suggèrent un rôle prépondérant de la répression épigénétique exercée par les HDAC de classe I dans la pathogenèse moléculaire. Il est probable que quelques gènes critiques pour la coordination de la myogenèse et de la différenciation musculaire (formation de myotubes notamment) soient réprimés par les HDAC de classe I, malgré un profil général de chromatinien plus ouvert dû à l'inhibition des HDAC de classe II.

Plusieurs études montrent la surexpression de la quasi-totalité des gènes impliqués dans la myogenèse chez le patient DMD jeune ([Haslett 2002](#), [Pescatori 2007](#), [Pallafacchina 2010](#)). L'évolution de ce profil avec l'âge en corrélation avec la progression de la pathologie est moins évidente, il semble que les gènes impliqués dans la myogenèse soient progressivement moins exprimés, mais la relation avec la régulation épigénétique n'a pas été explorée jusqu'à maintenant. Une étude mettant en corrélation des données de transcriptome et de ChIP Seq à plusieurs stades de DMD permettrait de cerner plus clairement l'implication de la dérégulation des mécanismes épigénétiques dans la progression de la pathologie et la diminution des capacités de régénération des cellules satellites.

## **b. Altération du méthylome**

En plus des modifications des histones, la méthylation de l'ADN semble être intimement corrélée à la myogenèse. En effet, il a été montré qu'une phase de deméthylation globale du génome précède la différenciation de myoblastes murins C2C12, suivie par reméthylation graduelle ([Jost 2001](#)). La myogénine, un facteur important de la différenciation myogénique, fait partie des gènes dont le promoteur est affecté par cette deméthylation ([Lucarelli 2001](#)). D'autre part, il a été montré dans un modèle de tumeurs murines que la présence de ROS entraîne la délocalisation d'un complexe de méthylation de l'ADN DNMT1, DNMT3B, SIRT1, EZH2 vers les promoteurs riches en CpG de gènes fortement exprimés ce qui provoque leur hyper méthylation ([O'Hagan 2011](#)). Les auteurs de cette étude suggèrent que le stress oxydatif est probablement responsable de la méthylation aberrante et de l'extinction transcriptionnelle couramment observées dans les cellules cancéreuses.

En ce qui concerne la DMD, étant donné la régénération musculaire marquée et la présence de ROS on peut s'attendre à une altération de la méthylation de l'ADN globale. Cependant, pour le moment aucune étude n'a exploré cette possibilité. A un niveau plus restreint, Acharyya *et al* ont montré chez la souris mdx que la sur-activation de NF- $\kappa$ B entraîne le silencing du gène *Notch-1* impliqué dans l'activation des cellules satellites musculaires. Cette extinction transcriptionnelle serait causée par une hyper méthylation du promoteur et associée à la diminution du potentiel régénératif du muscle de la souris mdx ([Acharyya 2010](#)). Bien que la méthylation de l'ADN joue probablement un rôle dans la progression de la pathologie DMD, les informations parcellaires disponibles ne permettent pas de conclure de façon claire. Une étude plus approfondie des altérations possibles du méthylome fait défaut et permettrait d'appréhender

l'implication de la méthylation de l'ADN et d'identifier d'éventuelles pistes thérapeutiques.

### **c. Implication pour le transfert de gène à l'aide d'AAVr**

Dans ce contexte particulier d'altération de la stabilité du génome et de l'épigénome, il est probable que le comportement d'un ADN exogène apporté dans les muscles des patients DMD soit différent de celui décrit dans les muscles sains.

Comme cela a été décrit en détail précédemment, l'instabilité génomique du muscle dystrophynopathe est caractérisée par l'activation massive des mécanismes de réparation des DSB et une surexpression de variant d'histone H2AX qui signale la présence de ces cassures ([Schmidt 2011](#)). De façon particulièrement intéressante, la circularisation, la concatémérisation et l'intégration des génomes AAVr fait également intervenir des acteurs cellulaires de la réparation DSB ([Choi 2006](#), [Cervelli 2007](#), [Cataldi 2010](#)). D'autre part, il a été montré que l'introduction artificielle de cassures aléatoires par irradiation- $\gamma$  ou ciblées à l'aide d'enzyme de restriction, entraîne une augmentation significative de la fréquence d'intégration du génome de l'AAVr *in vitro* ([Miller 2004](#), [Gellhaus 2010](#)). Dans le contexte des patients DMD, il semblerait cohérent que la fréquence d'intégration du génome des vecteurs recombinant dans le muscle soit donc supérieure à celle observée dans un tissu sain. D'autre part, il est également fort probable que l'altération de la régulation des HDAC et des DNMT dans les cellules musculaires dystrophynopathe ([Colussi 2008](#), [Acharyya 2010](#), [O'Hagan 2011](#)) ait un impact sur la régulation épigénétique de l'expression du transgène apporté par un AAV. En outre, les perturbations des mécanismes épigénétiques peuvent modifier l'expression de nombreux gènes cellulaires, comme cela a déjà été largement documenté dans les cancers ([Suzuki 2009](#), [Schäfer 2011](#)). Dans une cellule musculaire déficiente en dystrophine, il est possible que l'altération de ces mécanismes puisse affecter l'efficacité de transduction de l'AAVr, en modifiant les niveaux de protéines avec lesquelles le vecteur interagit au cours du cycle viral. Par exemple, la méthylation aberrante de l'ADN du promoteur de *Notch-1* entraîne l'extinction du gène correspondant ([Acharyya 2010](#)) or la présence de la protéine Notch1 augmente significativement l'efficacité au trafic intracellulaire de l'AAVr 2 ([Ren 2007](#)).

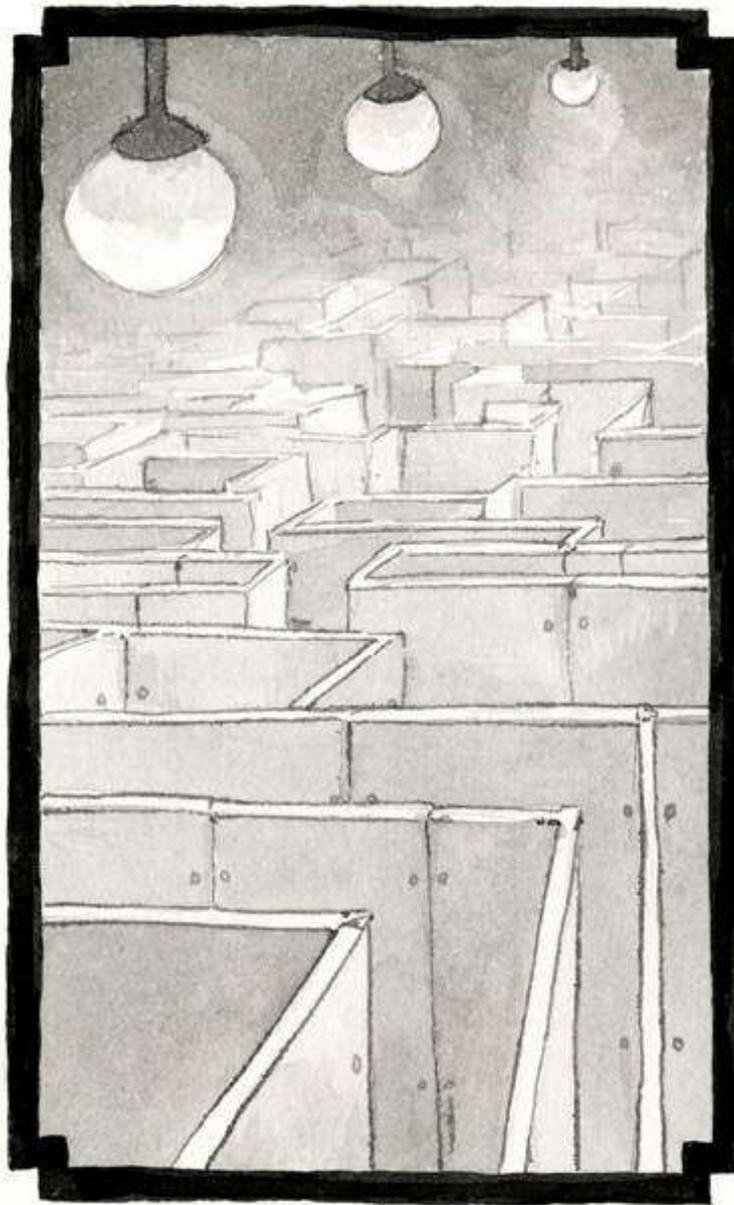
Si notre compréhension générale du devenir moléculaire des vecteurs AAVr et de leur génome a progressé depuis 2000, force est de constater que la grande majorité des études mécanistiques ont été réalisées dans des modèles animaux sains. A terme, les produits de thérapie

génique sont pourtant destinés à des patients humains porteurs de maladies souvent associées à des modifications importantes du métabolisme cellulaire. En ce qui concerne la DMD à l'heure actuelle, nous sommes incapables de définir l'impact de ces altérations génomiques et épigénétiques sur l'efficacité et le risque du transfert de gène à l'aide d'un AAVr chez les patients.

Au cours de mon travail de thèse, nous avons décidé dans un premier temps de caractériser l'implication des mécanismes épigénétiques de la cellule hôte (méthylation de l'ADN et HPTM) sur l'efficacité de transduction par un vecteur AAVr dans des modèles animaux sains. Dans notre modèle de primate et de souris, le promoteur contrôlant l'expression du transgène apporté par un AAVr n'est pas méthylé à court ou à long terme. Néanmoins, des résultats préliminaires obtenus chez la souris nous laissent penser que certaines HPTM caractéristiques de chromatine répressive sont associées au génome de l'AAVr. Dans un second temps, nous avons poursuivi l'étude dans un modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne. Cette seconde partie actuellement en cours, a pour vocation de documenter l'impact de la dérégulation des mécanismes épigénétiques sur l'efficacité de l'expression du transgène et la conséquence de l'instabilité génomique sur la fréquence d'intégration du génome de l'AAVr dans le génome de la cellule hôte. Nos résultats préliminaires suggèrent que l'efficacité de transduction est significativement plus faible dans le muscle murin déficient en dystrophine que dans le muscle sain et que cette différence est causée au moins partiellement par une répression de la transcription.

## II Présentation générale de l'étude

---



©2005 A. Telgemeier

## II.1.1. Description succincte du projet

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse seront présentés en 2 parties. La première d'entre elle première concerne l'évaluation du niveau de la méthylation des CpG du génome de l'AAVr, dans le muscle et le foie de primate non humain (NHP). Elle a donné lieu à un article publié l'année dernière est présenté dans ce manuscrit ([Léger 2011](#)). L'objectif de cette partie a été de déterminer une éventuelle répression de la transcription par la méthylation des CpG du promoteur. Nous avons mené une étude rétrospective sur 5 primates ayant précédemment reçu un vecteur AAV 2/1 simple brin (ss) contenant le transgène LEA29Y (betalacépt) sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous (pRSV) par voies IM ou IV. A partir de prélèvements de muscle et de foie à différents temps pi (1 à 37 moi), nous avons évalué d'une part l'efficacité d'expression relative du transgène par QPCR et RT-QPCR et d'autre part la méthylation de l'ADN au niveau du pRSV par PyroMeth et NGS bisulfite (**I.4.3.1.d**).

La seconde partie du projet est une exploration plus minutieuse des mécanismes épigénétiques et une transposition en contexte pathologique dans un modèle murin de dystrophie musculaire de Duchenne. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'impact de l'altération des mécanismes épigénétiques sur l'efficacité de transduction et d'expression et les conséquences de l'instabilité du génome sur la fréquence d'intégration avec un AAVr. Pour cela, nous avons administré un AAV 2/8 ss ou sc contenant le transgène GFP (Green fluorescent protein) sous contrôle du pRSV par injection IM à des souris « saines » C57B/6J ([B6](#)) et des souris dystrophynopathes C57BL/6Ros.Cg-Dmd<sup>mdx-4cv</sup> ([mdx<sup>4cv</sup>](#)). Muscles injectés et foies ont été prélevés à **2 semaines ou 2 mois pi**. L'efficacité d'expression a été évaluée de la même façon que pour les primates, mais des analyses histologiques supplémentaires en collaboration avec l'INRA/U703 ont également été prévues pour confirmer les résultats obtenus au niveau ARNm. L'analyse de quelques HPTM caractéristiques de structures chromatinienne actives, permissives et réprimées associées au génome du vecteur sont en cours de quantification par QPCR-ChIP (**I.4.3.2.c**) La méthylation du promoteur RSV sera déterminée soit par PyroMeth soit par NGS bisulfite. L'évaluation de la fréquence d'intégration sera réalisée par la technique de LAM-PCR, qui a déjà été utilisée au laboratoire pour une étude chez le primate ([Nowrouzi 2012](#)). Les résultats préliminaires obtenus sont présentés dans ce manuscrit.

## II.1.2. Justification des choix expérimentaux

### II.1.2.1. Modèles animaux et des tissus étudiés

Dans la première partie de l'étude le Macaque crabier (*Macaca Fascicularis*) a été utilisé pour les analyses de méthylation de l'ADN. Il est évident que dans un domaine de recherche translationnelle telle que la thérapie génique, l'utilisation de modèles de primates a une pertinence clinique. Notre décision a été également motivée par la disponibilité au sein du laboratoire d'une collection d'ADN et d'ARN provenant de différentes cohortes ayant reçu le même vecteur AAV à des doses similaires ( $5^E12$ vg/kg). Par manque de matériel biologique, il n'a pas été possible d'analyser les HPTM associées au génome de l'AAVr pour les échantillons de primates. En outre, la technique de ChIP est soumise à de grandes variabilités inter-échantillons et nécessite des cohortes d'animaux homogènes et de taille conséquente. Pour des raisons financières, logistiques et éthiques ce type d'analyse n'est pas envisageable dans un modèle de primate. Le fait que les mécanismes épigénétiques sont largement conservés chez les mammifères ainsi que les différentes limitations précédemment évoquées, ont motivé notre décision de poursuivre la seconde partie de l'étude chez la souris, simple à reproduire, peu coûteuse, homogène entre les individus et largement caractérisée du point de vue épigénétique. Parmi les très nombreuses lignées murines disponibles, nous avons décidé d'utiliser la lignée congénique [C57BL/6J](#) qui est très largement utilisée dans la communauté scientifique en tant que souris contrôle « saine ». Le fait que ce soit la première lignée dont le génome ait été séquencé reflète sa caractérisation générale particulièrement avancée. En outre, notre projet implique l'utilisation d'un modèle animal de la DMD. Bien qu'il existe des modèles de chiens (GRMD et CXMDj) qui reproduisent de façon relativement fidèle la pathogénèse et l'évolution de la DMD humaine ([Banks 2008](#)), pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment, nous ne pouvions nous permettre de démarrer l'étude sur le gros animal. Il existe plusieurs modèles murins de la DMD parmi lesquels la lignée mdx est la plus utilisée mais présente une atteinte musculaire modérée en comparaison à la maladie humaine ([Lucas 2004 thèse ENVN](#)). Nous avons décidé d'utiliser un modèle légèrement plus sévère que la lignée mdx mais qui garde un défaut génétique uniquement dans le gène *dmd* : la lignée [mdx<sup>4cv</sup>](#) ([Danko 1992](#)). Contrairement à la lignée mdx originelle, les souris mdx<sup>4cv</sup> ont un fond génétique majoritaire de C57BL/6J ce qui nous a semblé pertinent pour la comparaison avec la lignée saine. L'étude a été volontairement centrée entre l'âge de 6 semaines

à 2 mois qui correspond à la période d'atteinte musculaire la plus intense chez la souris mdx (Cf. **I.5.3**).

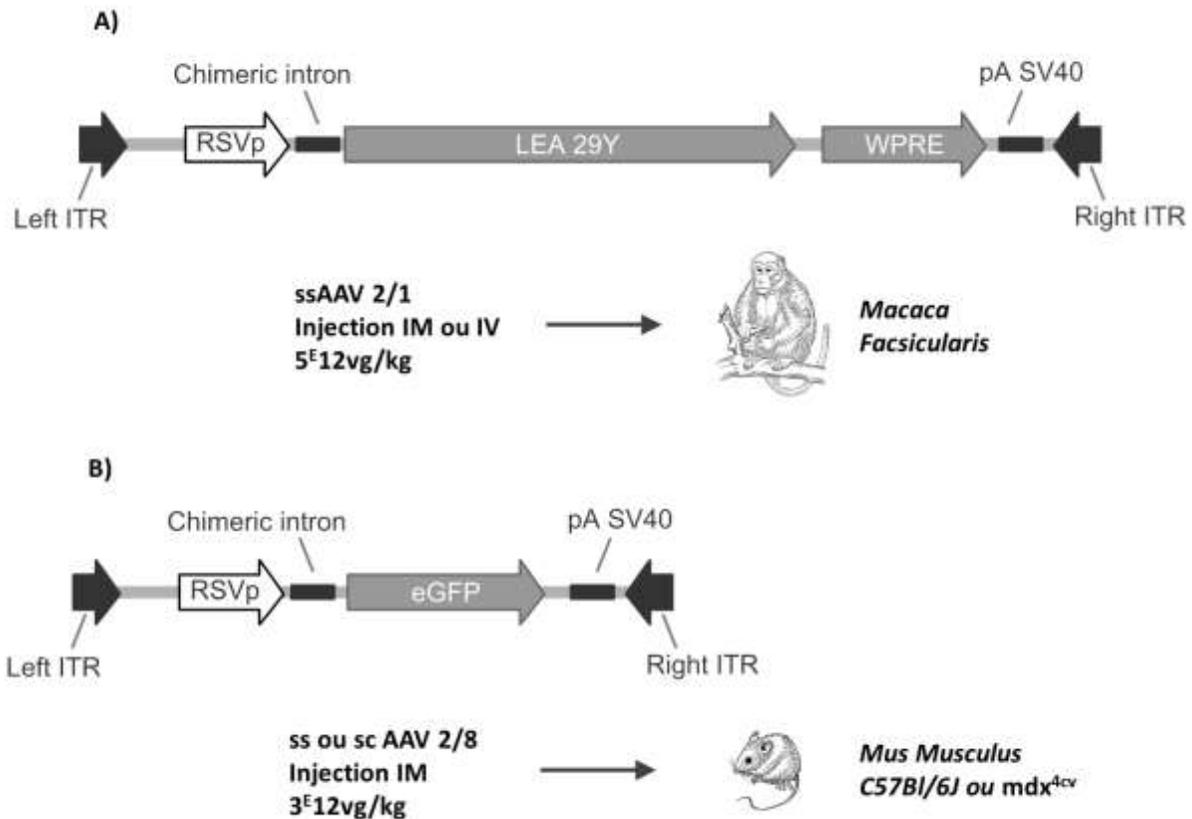
Le projet a été centré depuis son début sur 2 organes qui présentent un intérêt particulier pour la thérapie génique des maladies génétiques : le muscle et le foie. En effet, parmi les nombreuses maladies candidates, certaines sont déjà avancées jusqu'au stade des essais cliniques, telles que les sarcoglycanopathies ([Mendell 2010](#)) et la DMD ([Mendell 2011](#)) pour les atteintes musculaires et l'hémophilie B pour les atteintes hépatiques ([Nathwani 2011b](#)). Il nous semblait important de pouvoir apporter des informations alimentant de façon pertinente la spécialité en étudiant des organes largement utilisés lors d'essais cliniques. D'autre part, l'UMR 1089 est doté d'une expertise de longue date pour les analyses moléculaires de ces 2 tissus.

### **II.1.2.2. Vecteurs AAVr et des doses injectés**

Les primates ont reçu un vecteur ssAAV 2/1 contenant le pRSV et le transgène LEA29Y à une dose de  $5^{E12}$ vg/kg, alors que les souris ont été injectées avec soit un vecteur simple brin soit un vecteur double brin contenant le même promoteur mais le transgène GFP à un dose de  $3^{E12}$ vg/kg (**Fig. 35**) **Récapitulatif des vecteurs injectés et détails des cassettes d'expression** (cc).).

Les doses de vecteurs administrées au animaux,  $5^{E12}$ vg/kg pour les macaques et de  $3^{E12}$ vg/kg pour les souris, ont été choisies de façon à être pertinentes vis-à-vis de la majorité des essais cliniques en cours à l'heure actuelle ([Brantly 2009](#) :  $1^{E12}$ vg/kg, [Burnett 2009](#):  $5^{E13}$ vg/kg, [Flotte 2011](#) :  $6^{E12}$ vg/kg, [Mendell 2011](#) :  $1^{E11}$ vg/kg). De la même façon, les sérotypes ont également été déterminés par analogie avec les vecteurs courant utilisés pour transduire le muscle et le foie. Le sérotype 1 utilisé pour les primates est particulièrement efficace dans le muscle, mais souffre d'une séoprévalence élevée dans la population humaine (Cf. **I.3.3.2.a**). Plusieurs essais cliniques en cours utilisent ce sérotype ([Brantly 2009](#), [Burnett 2009](#), [Flotte 2011](#)). Les souris ont reçu un vecteur de sérotype 8 qui transduit efficacement le muscle et le foie et bénéficie d'une séoprévalence particulièrement faible chez l'homme (Cf. **I.3.3.2.a**). C'est un sérotype encore peu utilisé en essai clinique ([Nathwani 2011b](#)), mais largement utilisé en préclinique, ce qui promet une augmentation de son utilisation en clinique dans les années qui viennent. En outre, pour les souris saines, nous avons testé en parallèle les vecteurs simple et double brins (Cf. **I.3.3.2.b**), afin d'évaluer si la conversion double brin affecte la fréquence

d'intégration ou d'éventuelles régulations épigénétiques.



**Fig. 35) Récapitulatif des vecteurs injectés et détails des cassettes d'expression (cc).**

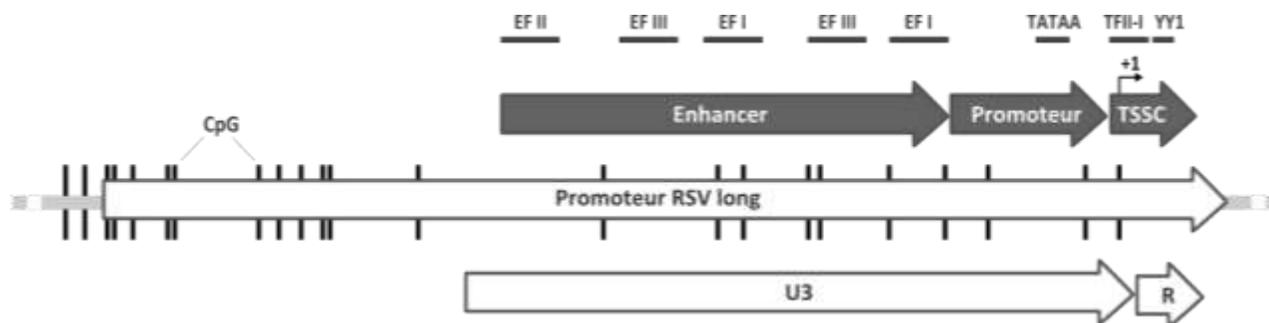
Les deux vecteurs ont été construits à partir du même plasmide et seul le transgène les différencie A) Le génome AAV 2/1 ss pRSV-LEA29Y contient également une séquence WPRE et fait au total 3930pb. B) Les souris ont reçu un AAV 2/8 ss ou sc pRSV GFP d'une taille total de 2220pb. La version sc possède une délétion du *trs* de l'ITR gauche.

Les génomes AAV administrés aux animaux ne contiennent pas le même transgène. Dans le cas des primates, le transgène utilisé code pour le LEA29Y (Betalacept) une protéine qui possède des propriétés immunosuppressives. Une étude précédente avait mis en évidence le fait que la protéine était bien produite, mais à un niveau trop faible pour immunosupprimer les primates ([Toromanoff 2010](#)). L'intérêt de cette protéine est qu'elle est sécrétée dans le sang, ce qui permet de doser facilement le niveau d'expression du transgène par ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Cela présente l'avantage de pouvoir évaluer la cinétique d'expression du transgène en étant peu invasif et sans avoir besoin de sacrifier un animal à chaque point de cinétique. En contrepartie, il est impossible de mesurer l'expression spécifique d'un tissu de cette

façon, mais seulement la moyenne de l'expression de tous les tissus transduits de l'organisme. Chez la souris, il est plus facilement envisageable de sacrifier plusieurs animaux par point de cinétique. Pour la seconde partie du projet chez la souris, nous avons donc choisi de ne plus utiliser le transgène LEA29Y dont les propriétés d'immunosuppression pourraient éventuellement influencer les mécanismes épigénétiques et qui nous fait perdre l'information d'expression locale de la protéine transgénique. Nous avons décidé d'utiliser un transgène codant pour la GFP qui est non sécrétée et facilement visualisable et quantifiable en microscopie confocale dans les tissus étudiés.

Enfin, dans le cadre de ce projet, le choix du promoteur revêt une importance particulière, puisque sa modulation par des marques épigénétiques peut être liée à une répression ou une activation de la transcription du transgène. Le pRSV (**Fig. 36**) nous a paru pertinent pour plusieurs raisons :

- Les techniques d'analyse épigénétique utilisées font intervenir une étape de PCR pour visualiser les modifications associées au promoteur, ce qui plaide en faveur de l'utilisation d'un promoteur viral facilement différenciable des séquences endogènes de l'animal.
- C'est un promoteur viral couramment utilisé en thérapie génique qui permet une expression stable et élevée d'un transgène chez le primate dans le contexte de l'AAVr après injection IM ([Rivera 2005](#), [Toromanoff 2008](#)). C'est par ailleurs le promoteur utilisé dans la Gendicine™ le seul produit de thérapie génique disposant d'une AMM ([Yang 2010](#)).
- Le pRSV possède une densité en CpG intermédiaire, c'est-à-dire proche, mais ne correspondant pas aux critères des îlots CpG ([Takai 2003](#)). *In vivo*, ce type de promoteur est plus couramment hyper-méthylé que les îlots CpG, mais contrairement aux promoteurs pauvres en CpG cette méthylation est fréquemment associée à une répression de la transcription. En outre les promoteurs à densité intermédiaire en CpG sont les plus prompts à être méthylés *de novo* ([Weber 2007](#)).
- L'extinction transcriptionnelle épigénétique de transgènes contrôlés par le pRSV a déjà été décrite dans des vecteurs non viraux à persistance extra-chromosomique ([Chen 2004](#), [Riu 2007](#)). Cela suggère que le promoteur n'est en lui-même pas résistant au silencing.
- Enfin, la disponibilité immédiate d'échantillons de primate a été également un critère de choix déterminant.



**Fig. 36) Détail du promoteur RSV utilisé dans cette étude (cc).**

La version du promoteur généralement insérée dans les vecteurs de thérapie génique est représentée par le promoteur RSV long ( $\approx 400$ pb) sur le schéma. Il contient une région riche en CpG du génome en amont des éléments U3 et R du LTR du virus du sarcome de Rous, mais ne comporte pas la région U5. Plusieurs éléments fonctionnels ont été caractérisés dans le promoteur : (i) une partie enhancer ( $\approx 160$ pb) contenant des motifs de liaisons des facteurs de transcription EF I, EF II et EF III, (ii) une région promotrice au sens strict ( $\approx 60$ pb) contenant une TATAA box canonique et (iii) une région TSSC cœur d'initiation de la transcription ( $\approx 30$ pb) comprenant les consensus des sites de fixation des facteurs TFII-I et YY1 ([Mobley 1998](#), [Mobley 2000](#)). Les CpG présents dans la séquence sont représentés par les barres verticales noires.

### II.1.2.3. Techniques d'analyses principales

En ce qui concerne l'évaluation du nombre de génome de vecteur par génome diploïde de la cellule hôte (vg/hdg), la technique la plus précise et la plus largement utilisée pour cette application est la PCR quantitative. En déterminant par Q-PCR d'une part le nombre de copies d'un gène endogène (E-Globine : macaque – Albumine : souris) et d'autre part, le nombre de copie du génome de vecteur (WPRE : macaque – GFP : souris) nous avons calculé un vg/hdg moyen pour chaque prélèvement. D'autre part, sachant que nous recherchons une éventuelle répression au niveau transcriptionnel, il nous a semblé indispensable de nous placer à un niveau ARNm pour **quantifier le niveau d'expression du transgène**. En effet, le niveau d'expression de la protéine peut être modulé à de nombreux niveaux (transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post traductionnel) alors que le niveau d'ARNm n'est le reflet que de régulation transcriptionnel et post-transcriptionnel. La méthode de choix pour cette évaluation est de toute évidence la RT-PCR quantitative. La difficulté consiste à trouver une référence ARNm endogène qui soit exprimée à des niveaux similaires dans les différentes conditions analysées (tissus, âge...). Par chance, chez le primate, ce travail avait déjà été publié chez *Macaca mulatta* ([Ahn 2008](#)), mais curieusement pas pour la souris. Nous avons donc criblé une douzaine d'endogènes

murins pour déterminer ceux qui varient le moins dans le muscle et le foie. Il est ainsi possible d'obtenir des valeurs de la quantité relative de l'ARNm transgénique (RQ) que nous pouvons comparer entre nos 2 tissus. Enfin à l'aide du nombre de génome de vecteur par génome diploïde et de la quantité relative de l'ARNm transgénique correspondant, il est possible de déterminer une donnée particulièrement pertinente pour notre projet qui représente **l'activité transcriptionnelle par copie de génome recombinant (RQ/vg)**. Cette mesure correspond à **l'activité spécifique**, une notion bien connue en pharmacologie mais qui n'est encore guère utilisée en thérapie génique.

En ce qui concerne **l'analyse de la méthylation des CpG du promoteur RSV**, il nous a semblé important d'avoir une vision précise CpG par CpG pour pouvoir mettre en corrélation la méthylation de sites de fixation de facteurs de transcription connus ou prédits du promoteur (**Fig. 36**). Il existe 3 techniques qui incluent toutes une étape de conversion bisulfite et une PCR pour atteindre cette résolution : le séquençage Sanger bisulfite, le PyroMeth et le NGS bisulfite (**I.4.3.1.d**). Le séquençage Sanger nécessite de sous cloner un grand nombre de produits de PCR bisulfite pour atteindre une reproductibilité satisfaisante. La technique est laborieuse et peu sensible, mais donne une information de continuité pour chaque fragment d'ADN dans la limite de 1kb. Notre zone d'analyse étant plus restreinte (300pb), nous avons dans un premier temps décidé d'utiliser plutôt le PyroMeth ([Reed 2011](#)). Cette technique qui repose sur l'utilisation d'un pyroséquenceur bas débit donne pour la totalité des molécules présentes dans un mélange et pour chaque CpG un pourcentage de méthylation, sans avoir besoin de sous cloner les produits de PCR, pour un coût raisonnable (environ 60€ par échantillons). L'avantage majeur du PyroMeth est qu'il ne nécessite aucune connaissance en bio-informatique pour analyser les résultats obtenus. Les premiers résultats obtenus avec le PyroMeth pour les primates nous ont encouragés à aller voir plus loin en utilisant le NGS bisulfite permettant en plus d'obtenir une information de continuité, tout en conservant la sensibilité et l'absence de sous clonage. La technique de séquençage 454 qui a été utilisée repose sur le même principe que celle qui se déroule au cours du PyroMeth, mais avec une étape préalable d'amplification clonale sur bille et l'acquisition avec un automate à haut débit permettant d'analyser plusieurs millions de séquences individuelles en parallèle ([Potapova 2011](#)). L'analyse des millions de séquences générée lors du run a nécessité l'intervention d'un bio-informaticien (équipe de Mickael Nickerson NIH, Frederik). Les résultats

obtenus ont confirmé l'absence de méthylation avec un bruit de fond 2 à 3 fois plus faible que le PyroMeth. Jusqu'à récemment, le coût de ce type d'analyse était par contre bien plus élevé (environ 10 000€/run), mais la diminution constante du coût du séquençage à haut débit, nous permet d'envisager à l'heure actuelle d'analyser les échantillons de souris B6 et mdx<sup>4cv</sup> par séquençage Ion Torrent ([Rothberg 2011](#)) pour un coût équivalent à celui du PyroMeth.

La seule technique disponible qui permet d'analyser les HPTM associées avec un locus particulier de l'ADN de façon quantitative est la QPCR-ChIP (Cf. **I.4.3.2.c**). Nous avons choisi de rechercher quelques HPTM qui sont caractéristiques de couleurs de la chromatine plutôt actives (H3K9me3 et H3K9ac) ou réprimées (H3K9me3 et H3K27me2) (Cf. **I.4.3.2.b**) ainsi que la protéine histone H3 non modifiées qui est généralement enrichie dans les régions de chromatine compactes et inactives. La technique de ChIP est relativement lourde à mettre en œuvre et comporte de nombreuses étapes qui augmentent la possibilité d'erreurs expérimentales. Les protocoles permettant de démarrer à partir de tissus sont rares et aucun n'était adapté à l'analyse de nos échantillons. Alors que le foie est relativement simple à analyser compte tenu de sa haute densité en noyau et une composition homogène, le muscle est quant à lui un tissu difficile car il est relativement pauvre en noyaux, il est plus résistant à la dilacération et contient des masses graisseuses qui peuvent gêner la sonication. Nous avons néanmoins réussi à mettre au point deux protocoles applicables au muscle et au foie de souris, l'un avec une étape de fixation au formaldéhyde (X-ChIP) et l'autre sans cette étape de fixation (N-ChIP). Les expériences préliminaires qui ont été réalisées nous ont conduits à choisir le X-ChIP pour lequel il a été possible d'obtenir un bruit de fond plus faible et davantage d'anticorps validés. Nous avons mis en place plusieurs contrôles et différents niveaux de normalisation pour limiter les variations expérimentales, qui seront détaillés dans le chapitre **IV**.



### III Evaluation du niveau de méthylation des CpG du promoteur RSV porté par le génome de l'AAVr dans le muscle et le foie de macaque.

---



Femelle *Macaca fascicularis* d'après une photographie de J. Hess-Haeser (1970).

# Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Transgene Expression Is Independent of DNA Methylation in Primate Liver and Skeletal Muscle

Adrien Léger<sup>1</sup>, Caroline Le Guiner<sup>1,2</sup>, Michael L. Nickerson<sup>3</sup>, Kate McGee Im<sup>3</sup>, Nicolas Ferry<sup>4</sup>, Philippe Moullier<sup>1,2,5</sup>, Richard O. Snyder<sup>1,5,6</sup>, Magalie Penaud-Budloo<sup>1\*</sup>

**1** INSERM UMR649, Nantes, France, **2** Génomique, Evry, France, **3** National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, Maryland, United States of America, **4** INSERM UMR948, Nantes, France, **5** Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, Florida, United States of America, **6** Center of Excellence for Regenerative Health Biotechnology, University of Florida, Alachua, Florida, United States of America

## Abstract

Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors can support long-term transgene expression in quiescent tissues. Intramuscular (IM) administration of a single-stranded AAV vector (ssAAV) in the nonhuman primate (NHP) results in a peak protein level at 2–3 months, followed by a decrease over several months before reaching a steady-state. To investigate transgene expression and vector genome persistence, we previously demonstrated that rAAV vector genomes associate with histones and form a chromatin structure in NHP skeletal muscle more than one year after injection. In the mammalian nucleus, chromatin remodeling *via* epigenetic modifications plays key role in transcriptional regulation. Among those, CpG hyper-methylation of promoters is a known hallmark of gene silencing. To assess the involvement of DNA methylation on the transgene expression, we injected NHP *via* the IM or the intravenous (IV) route with a recombinant ssAAV2/1 vector. The expression cassette contains the transgene under the transcriptional control of the constitutive Rous Sarcoma Virus promoter (RSVp). Total DNA isolated from NHP muscle and liver biopsies from 1 to 37 months post-injection was treated with sodium bisulfite and subsequently analyzed by pyrosequencing. No significant CpG methylation of the RSVp was found in rAAV virions or in vector DNA isolated from NHP transduced tissues. Direct *de novo* DNA methylation appears not to be involved in repressing transgene expression in NHP after gene transfer mediated by ssAAV vectors. The study presented here examines host/vector interactions and the impact on transgene expression in a clinically relevant model.

**Citation:** Léger A, Le Guiner C, Nickerson ML, McGee Im K, Ferry N, et al. (2011) Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Transgene Expression Is Independent of DNA Methylation in Primate Liver and Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 6(6): e20881. doi:10.1371/journal.pone.0020881

**Editor:** Jianming Qiu, University of Kansas Medical Center, United States of America

**Received:** April 21, 2011; **Accepted:** May 10, 2011; **Published:** June 8, 2011

This is an open-access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

**Funding:** Financial support was received from the INSERM, the University of Nantes and the Association Française contre les Myopathies (AFM). This research was also supported in part by the Intramural Research Program of the National Institutes of Health at the National Cancer Institute. No additional external funding was received for this study. This work was performed under a Cooperative Agreement between INSERM, AFM, l'Établissement Français du Sang (EFS) and the University of Florida Center of Excellence for Regenerative Health Biotechnology. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have read the journal's policy and have the following conflicts of interest: RS owns equity in a gene therapy company that is commercializing AAV for gene therapy applications (Applied Genetic Technologies Corporation Alachua, Florida). To the extent that the work in this manuscript increases the value of these commercial holdings, RS has a conflict of interest. None of the authors are employed by a commercial company. Génomique is a non-profit French research institute funded by Association française contre les Myopathies (AFM). There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all PLoS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: magalie.penaud-budloo@univ-nantes.fr

## Introduction

Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV)-mediated gene transfer can sustain long-term expression of a protein in large animal models after a single administration in skeletal muscle [1–4]. After intramuscular (IM) injection of single-stranded AAV (ssAAV) vectors in nonhuman primates (NHP), a rise in the level of vector-expressed secreted proteins is seen in the serum during the first 2–3 months (Phase 1), followed by a progressive decrease (Phase 2) [1–4]. The protein concentration reaches a steady-state (Phase 3) 6–8 months post-injection (pi) at half the maximum level. After IM injection of ssAAV vectors in mouse, the maximal protein expression is also attained in ≈10 weeks. Phase 2 reduction seems however less obvious [5–7]. Whereas rAAV trafficking and double-stranded conversion characterizing Phase 1 were extensively studied [8,9], the mechanism(s) underlying

decreasing protein level in Phase 2 in NHP has not been elucidated.

Recombinant AAV vector genomes persist mainly as circular episomes (monomers and high-molecular weight concatemers) in NHP muscle and liver [4,10,11]. These molecular structures seem to be more heterogeneous in macaque than in murine liver [10]. Similar to other non-integrating viruses [12,13], we recently demonstrated that the rAAV episomes assimilate, in NHP skeletal muscle, into a chromatin-like structure where nucleosomes are regularly assembled along the viral genome in a pattern similar to cellular chromatin [4]. Chromatinization may contribute to the stability of rAAV DNA in quiescent tissues, but could also lead to epigenetic-mediated modulation of transgene expression. Indeed, in mammals, chromatin structure accessibility is affected by two main epigenetic modifications: post-transcriptional modifications (PTM) of histones [14] and direct DNA methylation on cytosine of

the CG dinucleotides (CpG) [15,16]. These modifications act in cooperation to influence transcription levels in a positive or a negative manner [17].

In mammals, CpG hypermethylation of promoters is known to be associated with inactivation of gene expression [15,16]. With regards to gene therapy, CpG methylation has been identified as a mark of transgene silencing after MLV retroviral vector transduction [18,19]. DNA methylation was also considered as a potential cause of transcriptional repression after plasmid-mediated gene expression [20,21]. Nevertheless, it seems that histone modifications are more involved in this regulation than DNA methylation *per se* [22,23]. Concerning wild-type episomal viruses, the situation is variable. DNA methylation plays a crucial role in the Epstein Barr Virus (EBV) lifecycle for example, but is not involved in gene regulation of other herpes viruses [24]. We therefore investigated whether rAAV vector genomes are subject to DNA methylation and partially silenced after gene transfer in skeletal muscle and liver of a clinically relevant model, the NHP.

Next generation sequencing technologies were recently shown to be powerful and reproducible methods to quantify CpG methylation [25–28]. Thus, we performed pyrosequencing analyses after sodium bisulfite conversion of vector molecules that were isolated directly from rAAV-transduced NHP tissues. We quantified the methylation percentage on each CpG of the constitutive Rous Sarcoma Virus promoter (RSVp). The RSVp contains a CpG region of intermediate density [29,30], and this category of promoter has been reported as most sensitive to *de novo* DNA methylation [31]. Indeed, several studies have shown that even low levels of methylation in the RSV long terminal repeat (LTR) can be sufficient for its transcriptional inactivation [32–34]. In the present study, we established that the CpGs located in the RSVp are unmethylated in the rAAV vector virion stocks, and that rAAV genomes are not subject to *de novo* methylation in NHP skeletal muscle and liver at early (1 month) to late time points (up to 37 months). In order to directly correlate the local transgene expression with the lack of rAAV vector DNA methylation, a quantitative RT-PCR assay was validated and a dramatically higher transgenic RNA level was seen in the skeletal muscle compared to the liver from the same animals. Thus, the majority of rAAV-derived transgene protein is expressed from the transduced skeletal muscle. After analyzing the rAAV genome population and individual rAAV genomes isolated from transduced muscle, our data show that DNA methylation is not involved in the partial suppression of transgene expression after ssAAV vector administration in the NHP.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

Experiments were conducted on 3–5 kg captive-bred cynomolgus macaques purchased from BioPrim (Baziège, France). Macaques were housed in an enriched environment (toys, fresh fruits and vegetables) and were monitored daily for health and welfare. The Institutional Animal Care and Use Committee of the Pays de Loire (France) approved the protocol (permit number #2006.5). The research was conducted at the Boisbonne Centre (ONIRIS, Nantes) under the authorizations #5937C and #005608D delivered by the Departmental Direction of Veterinary Services (Loire-Atlantique, France) and in accordance with the recommendations of the Weatherall report: “The use of nonhuman primates in research”.

The experimental protocol was designed in a previous study [2]. In order to avoid any discomfort during and after the experiments, all procedures were carried out after animal sedation with

30 µg/kg of Medetomidine (Domitor<sup>®</sup>, Pfizer) and 7 mg/kg of Ketamine (Imalgene<sup>®</sup>, Merial). Intramuscular and intravenous injections of rAAV vectors were classified as mild severity procedures and skeletal muscle and liver biopsies as moderate level severity. Surgeries were performed under Isoflurane anesthesia, monitoring clinical parameters (temperature, blood pressure, heart rate, respiratory rate...). Pre-operative analgesia was obtained by intra-cutaneous injection of 0.1 mg/kg of Morphine and a treatment with a non-steroidal anti-inflammatory drug (0.1 mg/kg of Meloxicam, Metacam<sup>®</sup>) was orally administered after surgery for 3 days. Special attention was paid to the health and welfare of animals during the work, and blood samples were collected regularly to follow biochemical and hematological parameters.

Mouse experiments were conducted under the agreement #A44-124 delivered by the Departmental Direction of Veterinary Services (Loire-Atlantique, France) and in accordance with the French law concerning experimentations on vertebrate laboratory animals (Décret 87-848, 1987). All animals were handled in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### Recombinant AAV vector production and *in vivo* administration

The pZA-RSV-LEA29Y-WPRE-pA vector plasmid and the rAAV2/1 vector virions production were described previously by Toromanoff *et al.* [2]. The expression cassette is composed of the Rous Sarcoma Virus (RSV) promoter that drives the expression of the immunosuppressive LEA29Y (belatacept<sup>®</sup>) protein. Five cynomolgus macaques were injected IM in the tibialis anterior muscle (Mac 1, Mac 2, and Mac 9) [2] or IV in the right external saphenous vein (Mac 10 and Mac 11) with rAAV2/1 at a dose of  $5.10^{12}$  vector genomes (vg) per kg.

The pAAV-RSV-GFP-pA vector plasmid contains the green fluorescent protein (GFP) sequence between the RSVp and the SV40 polyA signal sequences. Ten week-old C57B/6J mice were injected in the two tibialis anterior muscles with a total dose of  $2.8.10^{12}$  vg/kg of single-stranded AAV2/8-RSV-GFP-pA vector. Animals were sacrificed at 7 days post-injection.

### Total DNA and viral DNA extraction

Total DNA was extracted by incubating minced NHP skeletal muscle or liver biopsies in urea buffer and proteinase K at 56°C and subsequently purified by a phenol-chloroform organic extraction. Recombinant AAV viral DNA was recovered using NucleoSpin<sup>®</sup> Blood Kit (Macherey Nagel) from  $2.10^{12}$  vg of rAAV2/1-RSV-LEA29Y-WPRE per column according to the manufacturer instructions.

### Quantitative PCR

Primers and TaqMan probes used for the amplification of vector-specific sequence (LEA29Y) and of endogenous macaque sequence (macaque  $\epsilon$ -globin gene), as well as Q-PCR conditions were previously described by Toromanoff *et al.* [2].

### RNA extraction and quantitative RT-PCR

RNA was isolated from NHP tissues by mechanical shredding followed by organic extraction using TRI Reagent<sup>®</sup> (Ambion). Residual DNA was removed from RNA preparations using the TURBO DNA-free<sup>™</sup> kit (Ambion). The reverse transcription was performed using the *M-MLV*-reverse transcriptase (Invitrogen). We quantified the transgene-derived mRNA by targeting the WPRE sequence using primers and Q-PCR conditions described

**Table 1.** PCR primers used for RSVp methylation analysis.

Primers	Primer sequence	Target	Amplicon size (bp)
pRSV F	5'-GTGTTGAGGTCGCTGAGTAGT	RSVp	749
pRSV R	5'-CAGACTGAGCAGCGTCTCT		
pRSV Pyro1F	5'-TGTATGAAGAATTTGTTAGGGTTAG	Pyro1 after bisulfite conversion	188
pRSV Pyro1R Biot	5'-[Biot]-ATAAACTACATTTCCCTCC		
pRSV Pyro2F	5'-TGTTTTATAAGGAGAGAAAAAGTAT	Pyro2 after bisulfite conversion	224
pRSV Pyro2R Biot	5'-[Biot]-TGTTTTATAAGGAGAGAAAAAGTAT		

doi:10.1371/journal.pone.0020881.t001

by Lizé *et al.* [35] for NHP samples and using the following primers for murine samples: GFP-A 5'-ACTACAAGCCCAACAGTCTATATCA and GFP-B 5'-GGCGGATCTTGAAGTTTACC. We also performed control Q-RT-PCR on the Myosin-4 (MYH4) target gene expressed in the muscle but not in the liver, and on the Albumin (ALB1) gene displaying the opposite pattern. The following primers and probes were used for the MYH4 mRNA quantification: forward primer 5'-GAGGTTGCTCATCGGTTT, reverse primer 5'-ATGGACTGCTGAAGATAC, probe 5'-FAM-GGCTTGGTGGTGGTTGCT-TAMRA and for the ALB1 mRNA quantification: forward primer 5'-GAGGTTGCTCATCGGTTT, reverse primer 5'-ATGGACTGCTGCTGAAGATAC, probe 5'-FAM-GGCTTGGTGGTGGTGGTGGT-TAMRA. All Q-RT-PCR were conducted using an ABI StepOne Plus machine (Applied Biosystems) with TaqMan chemistry, at the exception of GFP and mouse HPRT mRNA amplification that were performed using SYBR Green chemistry. The TaqMan PCR were done using the following program: initial denaturation at 95°C for 20 s followed by 45 cycles of 3 s at 95°C and 30 s at 62°C. The SYBR Green amplifications were performed as followed: initial denaturation at 95°C for 20 s followed by 40 cycles of 3 s at 95°C and 30 s at 60°C. Q-RT-PCR data were normalized to the stably expressed HPRT mRNA for NHP samples [36,37]. For murine samples, 11 potential reference genes were evaluated using the Mouse Endogenous Control Gene Panel kit (Tataa biocenter). The HPRT reference gene was determined after Genex standard software (Tataa biocenter) analysis as to be the most constantly expressed gene in mouse muscle and liver. Thus, for both species, the Ct results obtained for the transgene were normalized to the HPRT mRNA corresponding values using the equation  $RQ = 2^{-(Ct_{target} - Ct_{reference})}$ .

#### Generation of unmethylated and fully methylated controls

The unmethylated version of the RSVp sequence was generated by PCR amplification of the pZA-RSV-LEA29Y-WPRE-pA vector plasmid using the pRSV F/pRSV R primer set (Table 1). The fully methylated version of the RSVp was generated from the previous control by *in vitro* methylation using M.Sss1 CpG methyltransferase (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions for high density CpG DNA.

#### Sodium bisulfite conversion and low-throughput pyrosequencing (LTS)

The optimal amount of 500 ng of total DNA extracted from transduced NHP tissues was submitted to a sodium bisulfite treatment using the EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo research). In parallel, 10 ng of unmethylated or fully methylated control were mixed with 500 ng of total DNA extracted from

naïve NHP skeletal muscle or liver and submitted to the same treatment. The Pyro1 and Pyro2 CpG-rich regions of the RSVp were then amplified by PCR using the following program: 5 min at 95°C followed by 50 cycles of 20 s at 95°C, 30 s at 58°C (Pyro1) or 52°C (Pyro2) and 15 s at 72°C. Each reaction was performed in a final volume of 50 µl containing 10 ng of bisulfite converted DNA, 2.5 U of Amplitaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 5 µl of 10× Amplitaq buffer, 0.2 µM of the forward primer, 0.2 µM of the 5'biotinylated reverse primer (Table 1), 800 µM of dNTP mix and 4 mM (Pyro1) or 8 mM (Pyro2) of MgCl<sub>2</sub>. PCR products were purified with streptavidin coated Sepharose HP beads (Amersham Biosciences) and the Vacuum Prep Tool (Qiagen). Pyrosequencing was performed on the PSQ96MA instrument (Qiagen) using PyroMark Gold Q96 Reagents (Qiagen). Sequencing primers were designed on the upper strand of the rAAV and are listed in Table 2. Data were acquired and analyzed with PyroQ-CpG software 2.0 (Qiagen). Analysis was considered as "passed" if the non-CpG cytosines internal controls were completely converted in T.

#### 454 high-throughput sequencing (HTS)

Sodium bisulfite converted products were amplified by a two-step methylation-independent PCR reaction in order to introduce sample specific adapters used for the HTS workflow reaction (454/Roche, Branford, CT). The first PCR step included 30 cycles of amplification with the conventional primers (Table 1) that were used previously to amplify Pyro1 and Pyro2 regions after bisulfite conversion. The second step incorporated HTS primers (Table S1) to create Titanium amplicon libraries. The composite HTS primers contained the 454 primer A (forward) or B (reverse) sequence, a MID (multiplex identifier) bar code which allowed sample multiplexing, and the previously used LTS primer sequence (Table 1). The annealing temperature was increased after each cycle by +2°C until it reached the fusion primer Tm (66°C). PCR products were examined by agarose gel electrophoresis to ensure product amplification of the expected size with no

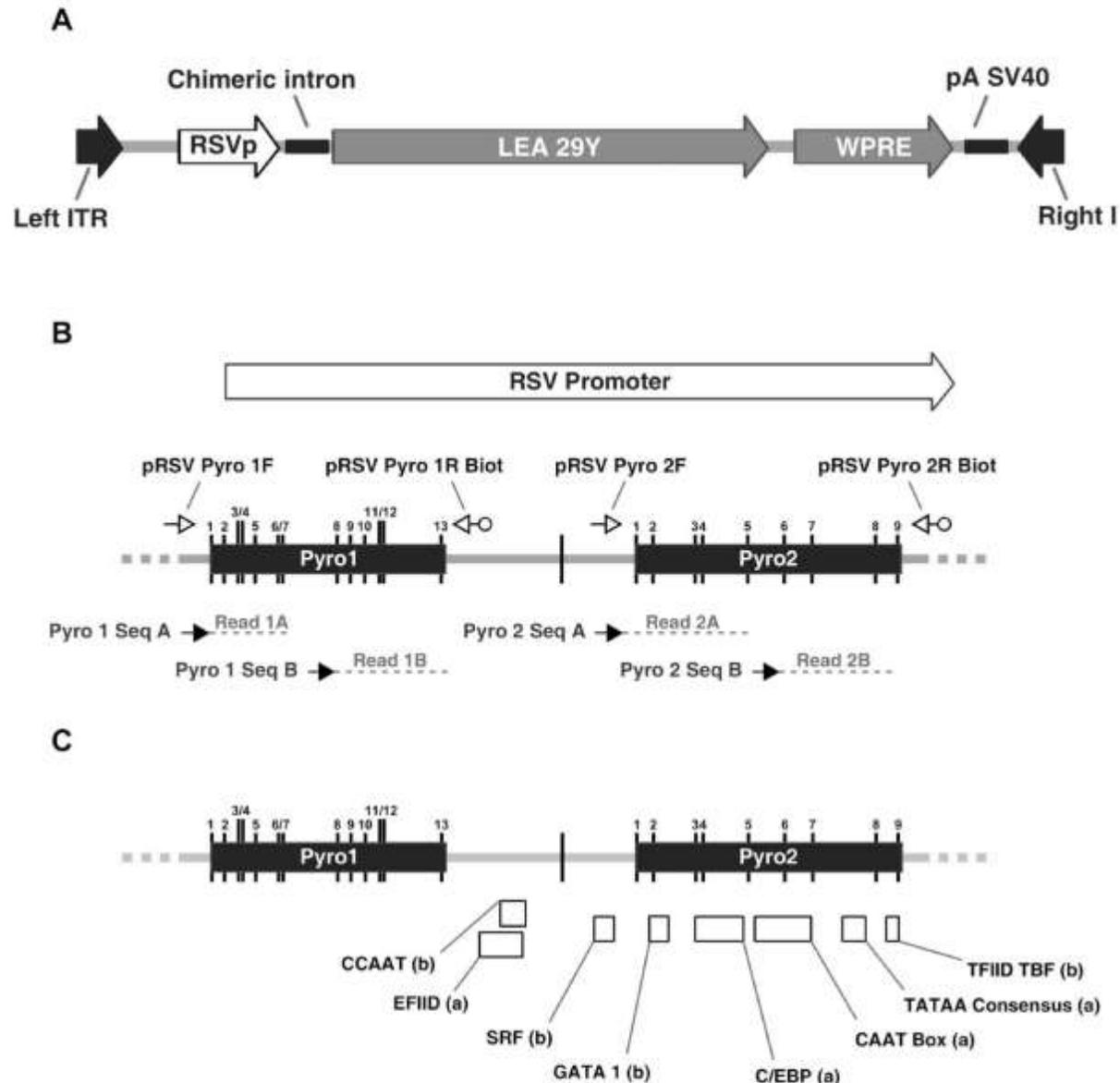
**Table 2.** Sequencing primers used for low-throughput sequencing.

Primers	Primer sequence	Target
Pyro1 Seq A	5'-GAAGAATTTGTTAGGGTT	Pyro1 after bisulfite conversion
Pyro1 Seq B	5'-GGGATTAGGGTGTG	
Pyro2 Seq A	5'-TTTTATAAGGAGAGAAAAAG	Pyro2 after bisulfite conversion
Pyro2 Seq B	5'-GGTTGATATGGATTGA	

doi:10.1371/journal.pone.0020881.t002

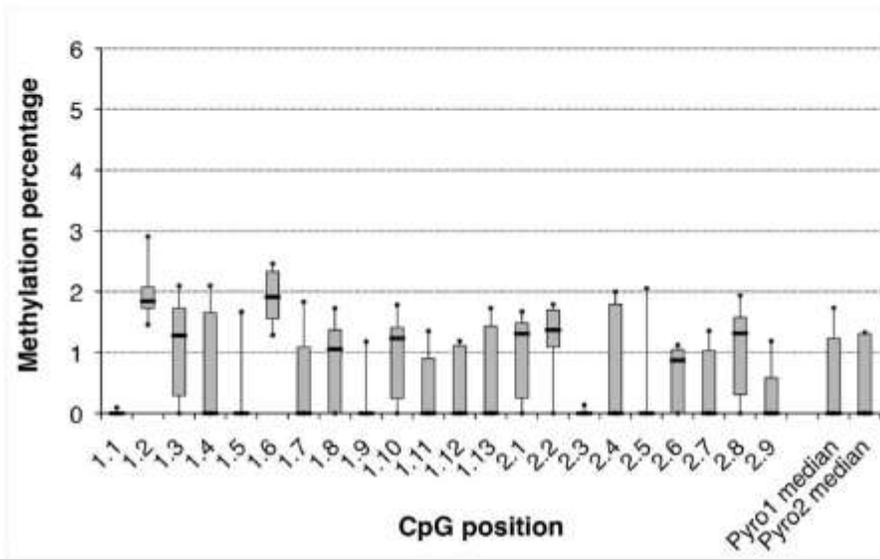
background and were quantitated using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Santa Clara, CA). Barcoded samples were pooled and run in duplicate in separate regions of a picotiter plate using Titanium reagents on a Genome Sequencer FLX system (Roche, Indianapolis, IN) according to standard procedures (Roche/454 Technical Bulletin TCB 005-2009). Sequencing reads containing

individual barcodes were identified and sorted using the Amplicon Variant Analyzer Software (454, Branford, CT). The Genome Sequencer Reference Mapper (*gsMapper*, Roche) program was used to align reads to the reference sequences and was run using default parameters except that all reads were treated individually. "High confidence" data were extracted using the following

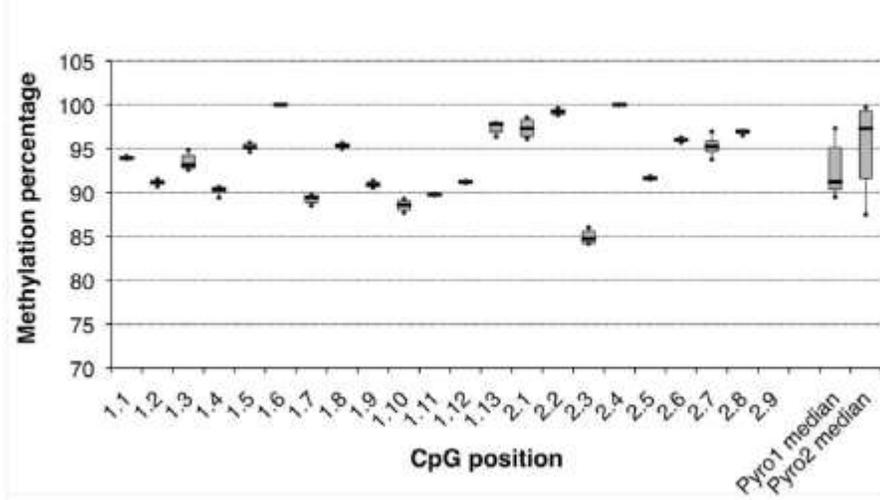


**Figure 1. Pyrosequencing assay for the Rous Sarcoma Virus promoter (RSVp) and transcription factor binding sites.** (A) Schematic representation of the rAAV-RSV-LEA29Y-WPRE-pA genome. The LEA29Y reporter gene sequence was cloned upstream of the Rous sarcoma virus (RSV) promoter and downstream of the Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE). (B) Two high-density CpGs plots were identified in the RSVp, named Pyro1 and Pyro2 (black boxes). CpG positions are marked by black vertical lines and numbered from 1 to 13 for the 1<sup>st</sup> CpG-rich region, Pyro1, and from 1 to 9 to the 2<sup>nd</sup> region, Pyro2. PCR primers used to specifically amplify bisulfite-converted rAAV vector DNA are represented as small open arrows. Reverse primers are 5'-biotinylated allowing specific capture and subsequent purification of the PCR product. Pyrosequencing allowed examination of 22 of 23 CpGs from the RSVp using the 4 sequencing primers represented as small black arrows. (C) Transcription factor binding sites positions along the RSVp. (a) TF binding sites described by Mobley *et al.* [53]. (b) TF binding sites predicted by *in silico* analysis using EMBOSS TFscan (<http://mobyle.pasteur.fr>). doi:10.1371/journal.pone.0020881.g001

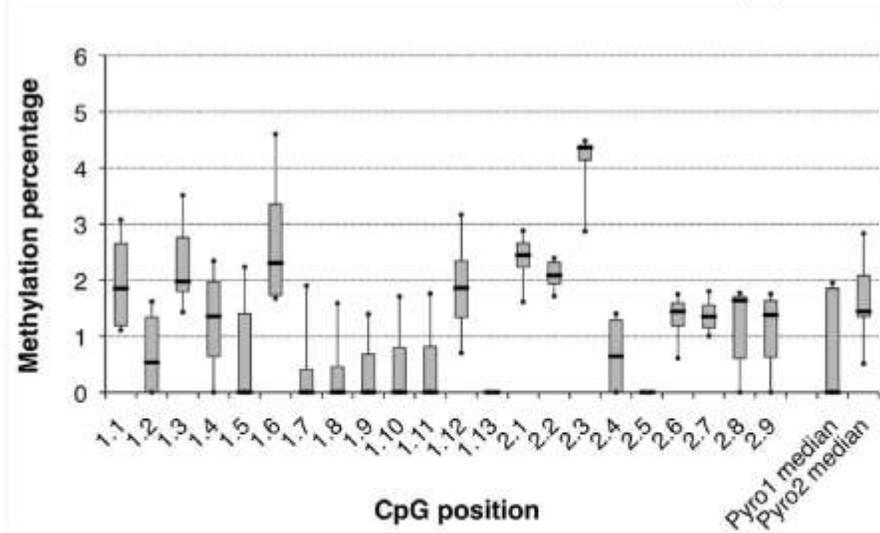
**A**



**B**



**C**



**Figure 2. Pyrosequencing assay sensitivity and methylation status of rAAV DNA in virions.** Samples were sequenced a minimum of 5 times by low-throughput sequencing and are represented on a box plot graph. CpG methylation percentages are displayed depending on the CpG position: 1.1 to 1.13 for Pyro1 region and 2.1 to 2.9 for Pyro2 region of the RSVp. Median values are represented by black horizontal lines. Grey boxes contain 50% of values and extreme values are delimited as error bars. (A) Unmethylated control generated by PCR amplification of the RSVp sequence from the pZA-RSV-LEA29Y-WPRE-pA plasmid. (B) Methylated control obtained by M.Sss1 *in vitro* methylation of the unmethylated RSVp amplicon. (C) Viral DNA in particles. Viral DNA was extracted from rAAV2/1-RSV-LEA29Y-WPRE particles.  
doi:10.1371/journal.pone.0020881.g002

criteria: the difference regarding the RSVp theoretical sequence was observed in forward and reverse reads and the read length was at least 135 and 160 bp for Pyro1 and 2, respectively. Finally, individual CpG were viewed in alignments of HTS reads using the Integrated Genomics Viewer (<http://www.broadinstitute.org/igv/>, Broad Institute, Cambridge, MA).

### Statistical analysis of pyrosequencing results (LTS and HTS)

Since we had to compare values on 22 CpGs, we used a non-parametric statistical hypothesis test: the Mann-Whitney U Test. We considered that methylation level was significant above the sensitivity threshold determined using unmethylated control, if p value is under 0.001. Analyses were performed using GraphPad PRISM 5.

## Results

### RSV promoter in the rAAV virions is not methylated

The rAAV vector expression cassette used here encodes the LEA29Y molecule under the control of the RSVp (Fig. 1a). We focused our investigation on the RSV promoter since CpG hypermethylation of promoters has been shown to be critical for repression of transcription [15]. DNA methylation analyses were conducted after sodium bisulfite treatment of DNA samples. The bisulfite treatment and the subsequent RSVp-targeting PCR step convert unmethylated C into T, whereas the methylated C remains unmodified. Finally, the methylation percentage on each CpG in the population was measured by low-throughput pyrosequencing (LTS) based on the C/T ratio quantification. Two CpG-rich regions named Pyro1 and Pyro2 were identified in the RSVp by EMBOSS CpG plot (Fig. 1b) and two primers sets were designed to analyze 22 of the 23 CpGs of these two regions (Fig. 1b).

The LTS assay was validated by generating an unmethylated RSVp amplicon by PCR and a fully methylated fragment by subsequent M.Sss1 *in vitro* methylation. Both controls were spiked into NHP gDNA and the bisulfite-treated products were amplified by PCR with the same efficiency, indicating that no amplification bias existed in favor of one of the two targets (data not shown). The CpG methylation median was determined by LTS for the unmethylated control and was equal to 0.00% ( $\Delta Q1-0.00$ ;  $\Delta Q3+1.21$ ) and 0.00% ( $\Delta Q1-0.00$ ;  $\Delta Q3+1.24$ ) for Pyro1 and Pyro2 plots, respectively (Fig. 2a). The sensitivity threshold of the assay is 1.87% since 90% of the values obtained for Pyro1 and Pyro2 were lower. The medians obtained for the fully methylated control were 91.23% ( $-0.85$ ;  $+3.87$ ) and 97.30% ( $-5.69$ ;  $+1.97$ ) for Pyro1 and Pyro2 regions (Fig. 2b).

In order to assess the potential *de novo* DNA methylation after vector administration, we measured the baseline methylation status of the RSVp in the purified rAAV vector virions produced in 293 cells [38]. Viral DNA was extracted from particles and treated with bisulfite prior to LTS. CpG methylation medians were equal to 0.00% ( $-0.00$ ;  $+1.85$ ) on Pyro1 and 1.44% ( $-0.09$ ;  $+0.64$ ) on Pyro2 (Fig. 2c). Since these values were below the pyrosequencing sensitivity threshold, we concluded that vector

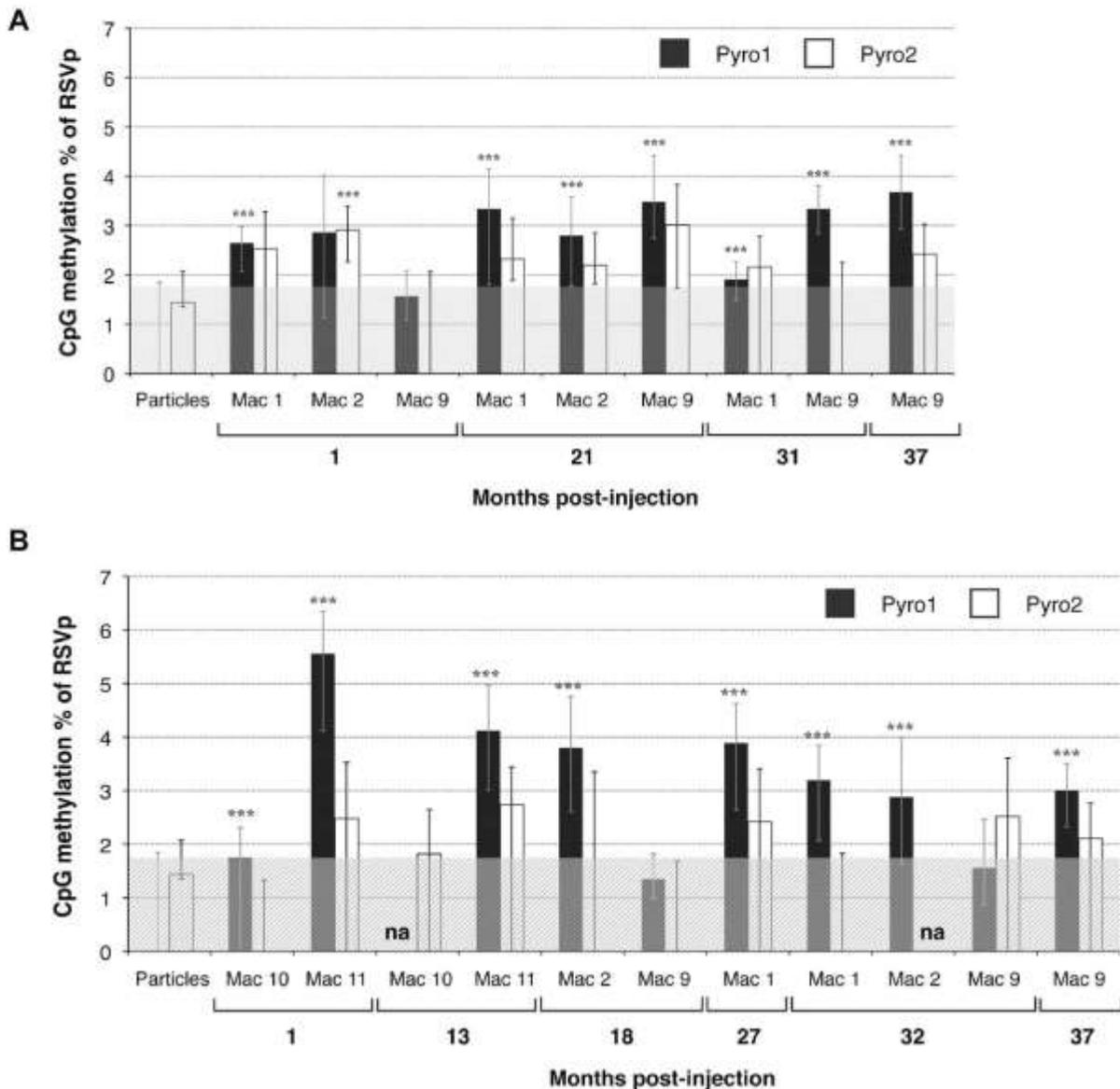
DNA present in the virions prior *in vivo* administration was unmethylated.

### The RSVp of rAAV genomes extracted from NHP skeletal muscle and liver remains essentially unmethylated

To investigate the methylation status of the rAAV genome *in vivo*, five NHP were injected intramuscularly (IM) (Mac 1, 2 and 9) or intravenously (IV) (Mac 10 and 11) with the ssAAV2/1-RSV-LEA29Y-WPRE-pA vector. Each animal received a dose of  $5.10^{12}$  vg/kg. The LEA29Y molecule was detected in the serum of the animals at different time points as previously published in Toromanoff *et al.* [2] for Mac 1 and Mac 2, and in Penaud-Budloo *et al.* [4] for Mac 9. These animals displayed a 1.5 to 2-fold reduction in protein level from  $\approx 3$  to 6 months pi, before expression reached steady state. The LEA29Y concentration in the serum of the IV-injected animals (Mac 10 and 11) was below the sensitivity threshold of the ELISA assay (data not shown).

In order to assess the potential involvement of *de novo* DNA methylation in repression of transgene expression, total DNA was extracted from skeletal muscle and liver biopsies taken 1 to 37 months post-injection (pi) and analyzed by bisulfite LTS [26]. Independent of the time or the vector delivery route, the RSVp remains unmethylated across the Pyro2 CpG-rich region both in the skeletal muscle (Fig. 3a) and in the liver (Fig. 3b). On the contrary, most of the samples exhibited a low (below 6%) but significant methylation level on the Pyro1 plot (Fig. 3). No particular CpG site in the Pyro1 sequence was observed as being preferentially methylated (data not shown).

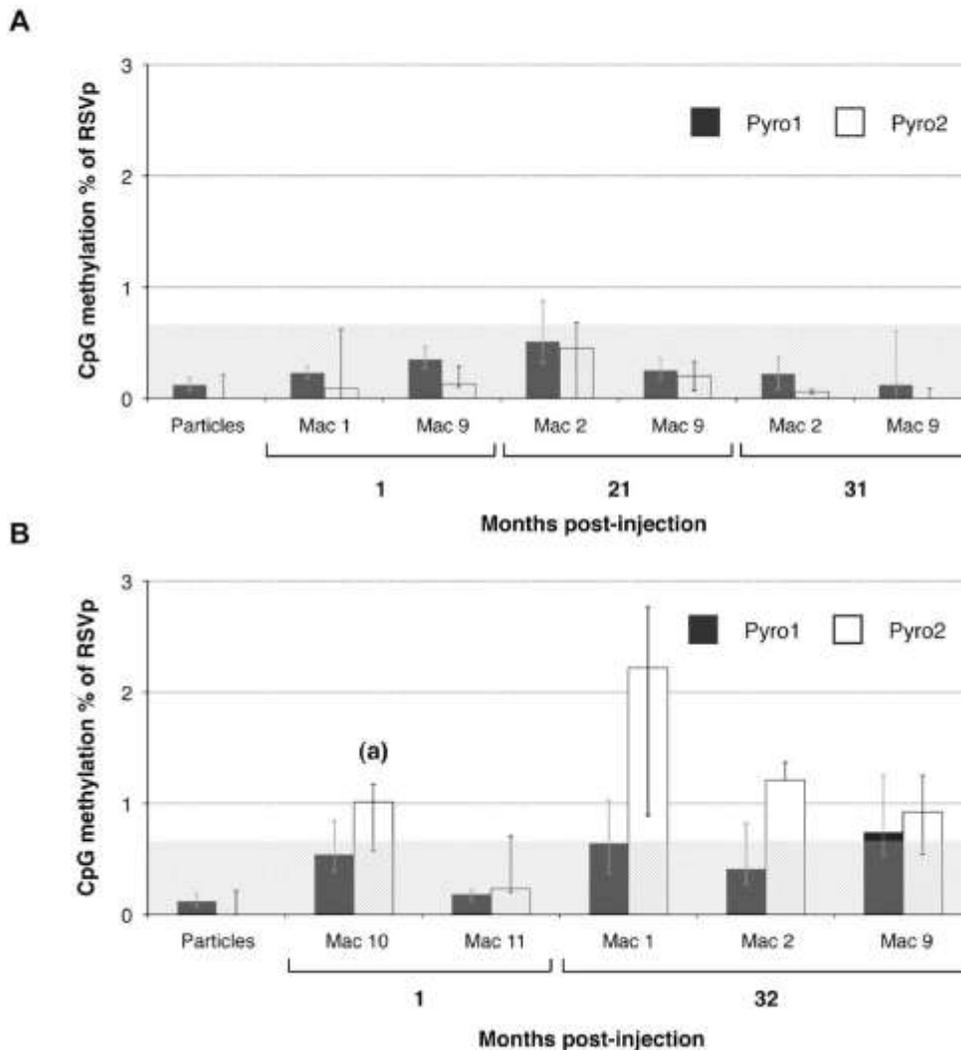
LTS technology provides a global assessment corresponding to the overall degree of methylation of the population of rAAV molecules. However, a small fraction of molecules could potentially be highly methylated but may remain undetectable when analyzing the population. In order to study individual rAAV genomic sequences, high-throughput sequencing (HTS) [39] that generated clonal sequences from individual rAAV molecules was performed on the same primate samples. PCR primers (Table S1) were designed to amplify the two main CpG-rich regions and were composed of a 454 sequencing primer, a unique barcode tag also called multiplex identifier (MID) which allowed sample multiplexing, and the pRSV Pyro1F, 1R, 2F or 2R primer sequence previously used in the LTS assay (Fig. 1b). This HTS approach created clonal sequencing reads that could be individually scored and counted. Analysis of the unmethylated control by HTS resulted in Pyro1 and Pyro2 methylation percentages of 0.37% ( $\Delta Q1-0.15$ ;  $\Delta Q3+0.08$ ) and 0.30% ( $\Delta Q1-0.05$ ;  $\Delta Q3+0.31$ ), respectively. 90% of the values were below 0.60% of methylation, hence, the HTS assay sensitivity threshold was lower than for the LTS. Results obtained for the fully methylated control were 93.31% ( $-3.74$ ;  $+2.54$ ) and 98.31% ( $-0.72$ ;  $+0.73$ ) for Pyro1 and Pyro2, respectively. Vector genomes extracted from rAAV particles gave a value of 0.12% ( $-0.05$ ;  $+0.07$ ) methylation for Pyro1 and 0.00% ( $-0.00$ ;  $+0.21$ ) for Pyro2 (Fig. 4) confirming the unmethylated nature of the RSVp in rAAV virions.



**Figure 3. CpG methylation percentage of the RSVp after rAAV administration in NHP determined by low-throughput sequencing.** NHP were injected IM (Mac 1, Mac 2, and Mac 9) or IV (Mac 10 and Mac 11) with the rAAV2/1-RSV-LEA29Y-WPRE-pA vector. Each animal received a dose of  $5.10^{12}$  vg/kg. Total DNA was extracted from transduced skeletal muscle (A) and liver (B) and subjected to sodium bisulfite conversion and subsequent PCR amplification. Each sample was read at least 4 times by PSQ96 pyrosequencing for the two CpG-rich plots Pyro1 and Pyro2. na: not analyzable. (\*\*\*) p value < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0020881.g003

Muscle and liver NHP samples were processed with an anticipated average of 2000 clonal sequencing reads per sample. The average yield obtained for Pyro1 and Pyro2 was 7720 reads (from 809 to 12414) and 1000 reads (from 221 to 3138), respectively. The yield variation observed between Pyro1 and Pyro2 could be explained, in part, by differences in the amplicon length [28] (Table 1). Despite the high depth of sequencing read coverage, no significant DNA methylation was detected by HTS at the 22 CpG positions of the RSVp either in the NHP skeletal muscle (Fig. 4a) or in the liver (Fig. 4b) at early or late time points. Compared to LTS, smaller standard deviations were

observed indicating a higher degree of reproducibility. Bioinformatic analyses of individual sequences confirmed that rAAV molecules were not methylated on the RSVp, except for Mac10 at 1 month pi in the liver (Fig. 4b) for which we detected 0.41% of reads (3130 depth of coverage) methylated on all the CpGs of the Pyro2 region. Such rare events could not be detected by LTS confirming the usefulness of the complementary HTS approach. In conclusion, we demonstrated that the RSVp was not subjected to *de novo* DNA methylation after rAAV transduction of NHP muscle and liver, up to 3 years following vector administration.

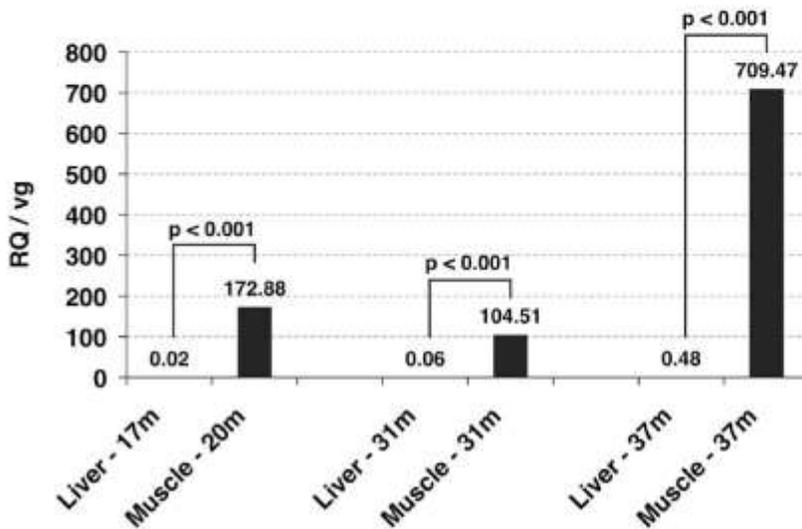


**Figure 4. CpG methylation percentage of the RSVp after rAAV administration in NHP determined by high-throughput sequencing.** NHP were injected IM (Mac 1, Mac 2, and Mac 9) or IV (Mac 10 and Mac 11) with the rAAV2/1-RSV-LEA29Y-WPRE-pA vector. Each animal received a dose of  $5.10^{12}$  vg/kg. Total DNA was extracted from transduced skeletal muscle (A) and liver (B) and subjected to a sodium bisulfite conversion and subsequent PCR amplification. 454 sequencing was performed to evaluate the Pyro1- and Pyro2-region methylation. (a) Bioinformatic analysis of this sample revealed some sequences for which all the CpGs were methylated. (\*\*\*) p value < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0020881.g004

#### Single-stranded rAAV-mediated gene expression is minor in the liver compared to NHP skeletal muscle

We have previously shown that the rAAV-mediated expression of the LEA29Y transgene under the RSVp transcriptional control was stable for more than 2 years in IM injected primates (Mac 1, 2, and 9) [4]. This is consistent with a vector copy number ranging from 9 to 11.8 vector genomes per diploid genome (vg/dgc) at 20 months pi at  $\approx 1$  cm from the injection site in the tibialis anterior muscle. However, these primates also had a substantial number of vector copies in the liver, from 0.2 to 3.4 vg/dgc at 31 months pi. Since LEA29Y is a secreted protein, we could not correlate the methylation status of rAAV genomes with the local transgene expression by assessing the protein level. Thus, we developed a quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR) assay to determine the vector

mRNA copy number in each transduced tissue (skeletal muscle and liver). Vector mRNA relative quantities (RQ) were determined by normalizing Ct values to the HPRT internal reference that is similarly expressed in different rhesus monkey tissues [36]. RQ was then reported as a ratio to the vector genome copy number (i.e. RQ/vg) for each sample. Total RNA was extracted from the 5 injected primates and Q-RT-PCR quantification gave values ranging from 0.02 to 1.98 RQ/vg in the liver and from 104.51 to 2355.48 RQ/vg in the muscle samples more than 1 year after injection. Results obtained for Mac 9 are represented on Figure 5 where the RQ/vg ratio was 1480 fold higher in the muscle than in the liver at the later time point (37 months pi). As controls, Q-RT-PCR analysis was performed on macaque Myosin-4 (MYH4) and Albumin (ALB1) mRNA samples obtained from Mac 9. We confirmed that these genes were specifically



**Figure 5. Differential transgene expression level in Mac 9 skeletal muscle and liver.** mRNA relative quantities (RQ) were determined at the indicated time points by quantitative RT-PCR using WPRE as target rAAV sequence and HPRT as endogenous macaque reference, and the equation relating these:  $RQ = 2^{-\Delta Ct} \frac{WPRE}{HPRT}$ . Data are expressed relative to the vector genome copy number (vg) determined by Q-PCR using LEA29Y as target and  $\epsilon$ -globin macaque gene as endogenous. doi:10.1371/journal.pone.0020881.g005

transcribed in skeletal muscle or liver, respectively, with the MYH4 mRNA undetectable in the liver and the RQ values ranged from 13.4 to 191.4 per copy of MYH4 gene in the muscle. Inversely, RQ per ALB1 copy was equal to  $0.23 \pm 0.38$  on average in Mac 9 muscle and ranged from 1293.3 to 1940.8 in the liver. In conclusion, the rAAV delivered RSVp was much more efficient for driving transgene expression in NHP muscle compared to the liver. Considering that most of the vector genomes were detected in the muscle and the liver after IM administration of rAAV vectors (Le Guiner *et al.*, unpublished data), the majority of the LEA29Y protein expression derives from the injected skeletal muscle.

Since no DNA methylation was found in the RSVp either in the skeletal muscle or in the liver, our data demonstrate that the partial decrease of transgene expression during Phase 2 is not due to DNA methylation and suggests the involvement of other regulatory mechanisms.

## Discussion

In the study presented here, we assessed the involvement of DNA methylation in the partial repression of transgene expression after rAAV vector administration in NHP skeletal muscle. In this clinically relevant model, low-throughput pyrosequencing (LTS) [26] and high-throughput 454 sequencing (HTS) [39] demonstrated that the RSVp is not subject to *de novo* CpG methylation at early or late time points in NHP muscle and liver. When the population or individual rAAV molecules are analyzed by pyrosequencing, no methylation was seen. Thus, the reduction in protein levels observed in Phase 2 is not due to the methylation of a portion of the rAAV genome population. Other mechanisms are likely involved such as the loss of some rAAV forms or deletions/rearrangements that are known to occur during rAAV genome circularization and concatemerization. Sun *et al.* recently suggested that recombination of ITR and adjacent regions after transduction of NHP liver may impact the integrity of the

transgene cassette, particularly in the promoter due to its close proximity to the ITR [10].

Pyrosequencing is a recent technology that enables the evaluation of the DNA methylation percentage for each CpG position in a population of molecules converted by sodium bisulfite and amplified using PCR [26,27]. It circumvents the poor sensitivity and the biases associated with classical sub-cloning and Sanger sequencing approaches [25]. In our assay, the *in vitro* methylated control appeared to be 96.25% methylated overall which was satisfactory considering the under-estimation of high levels of methylation using pyrosequencing technology [25], and incomplete enzymatic methylation by M.Sss1 methyltransferase [40]. We demonstrated that no methylation was detectable in the promoter region of the packaged rAAV genomes. Since CpGs of rAAV genomes are unmethylated in virions, this could increase the susceptibility to TLR9 recognition in the endosomes and promote AAV-targeted adaptive immune responses [24,41]. Indeed, Zhu *et al.* demonstrated that the TLR9-MyD88 pathway was involved in the activation of CD8<sup>+</sup> T cell responses to both the transgene product and the rAAV2 capsid, leading to loss of transgene expression [42].

In order to evaluate the potential *de novo* methylation *in vivo*, the percentage of DNA methylation was measured along the RSVp from 1 month to 37 months after rAAV2/1 administration in NHP. Some liver samples (indicated as "na" on Fig. 3b) could not be analyzed by LTS probably because mutations/rearrangements could have occurred in the RSVp sequence during circularization and concatemerization of rAAV genomes [10]. By providing resolution of individual CpG, LTS allowed visualization of methylation variation between CpG positions in the population. The Pyro1 region was found in the first instance slightly methylated for most of the samples, while Pyro2 remained unmethylated. Interestingly, most transcription factor (TF) binding sites are located in the Pyro2 region (Fig. 1c); and this region has been described as indispensable for RSVp-driven transcription [43]. In order to confirm these results, we chose to perform high-throughput

sequencing on these samples using 454 HTS since this approach allows the simultaneous analysis of 400,000 individual molecules on a single picotiter plate with a single-read sequence error of less than 0.5% [39,28]. Moreover, HTS provided additional information concerning the distribution of the CpG methylation in the population of rAAV genomes. Contrary to the LTS results, no significant DNA methylation of the RSVp was detected by HTS. Since HTS generates individual clonal sequence reads, incomplete bisulfite converted sequences that can cause rare false positives could be identified based upon assessment of non-CpG cytosines. These false positives sequence reads appeared to be shorter than the expected sequence and thus were removed using optimized cut-offs applied during bioinformatic analysis. This additional selective filter could explain the lower threshold observed in HTS compared to LTS (1.87% and 0.60%, respectively) as well as the higher reproducibility. Overall, the methylation levels obtained by LTS and HTS were similar considering the described technical variability, due in part to errors known to occur in homopolymeric nucleotides stretches [28].

One cannot exclude that the RSV promoter *per se* is responsible for the resistance of the rAAV DNA to methylation since it is known as a strong constitutive promoter [44]. However, several *in vitro* studies demonstrated that the partial or complete CpG methylation of the RSVp prior to transfection could severely alter the transgene transcription level [32,33,45,46]. The plasmid used in these studies contained an EBNA1/OriP sequence that conferred plasmid chromosome attachment and maintenance during cell division [12]. In fact, the RSVp was found to be susceptible to *de novo* methylation only when integrated, in clones generated by plasmid transfection with antibiotic selection [47]. Since rAAV vectors are maintained nearly exclusively as episomes in skeletal muscle [4,48] and liver [10,11], silencing due to integration into heterochromatin should not contribute significantly to repressing rAAV-mediated transgene expression. Thus, with the exception of a single sample (Mac 10 liver at 1 month pi), the rAAV integration frequency was likely too low in our primate samples to detect DNA methylation associated with such silencing. Indeed, we failed to detect any integration event by LAM-PCR (linear amplification-mediated PCR) in Mac 1, Mac 2 and Mac 9 injected muscles [4]. Furthermore, it has been recently demonstrated that the silencing of transgene expression in mouse liver by plasmid bacterial backbone DNA was consistent with the histone modifications profile but was independent of CpG methylation [22,23]. Similarly, naked plasmid was recently shown to be unmethylated along the hAAT promoter after hydrodynamic liver-directed delivery in mice, which was consistent with a stable FIX transgene expression for 3 months [49]. We hypothesized that, like plasmid DNA, the episomal status of rAAV could result in the absence of *de novo* DNA methylation in these quiescent tissues.

Finally, we demonstrated by Q-RT-PCR that the RSVp was highly active in NHP skeletal muscle but restricted in the liver after ssAAV2/1 vector administration. This was consistent with Salva *et al.* data obtained in mice after single-stranded AAV6 injection

[50]. They showed that the alkaline phosphatase (AP) reporter protein was poorly expressed in the liver while it was highly expressed in many other organs, including the skeletal muscle, 1 month after rAAV-RSV-AP IV injection. The constitutive CMV promoter was also shown to drive a 10-fold greater AP activity than the RSVp in the liver [50]. Similar, we observed a much higher RSV-driven transgene expression in the skeletal muscle of mice that were injected IM with a ssAAV2/8-RSV-GFP vector, compared to the liver (data not shown). In conclusion, the RSVp used in a context of ssAAV is a suitable promoter to drive expression in skeletal muscle, but a very weak promoter in NHP and murine liver.

Since this study was carried out in normal quiescent tissues, DNA methylation inheritance mechanisms that occur during DNA replication and involve the DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) are not expected to play a role. However, other DNA methyltransferases, Dnmt3a and 3b, also called *de novo* DNA methyltransferases, are expressed in the skeletal muscle and the liver and are capable of methylating single- or double-stranded unmethylated DNA [51]. Whereas global differential methylation is a well-described mechanism occurring during embryonic development [52], the extent and the role of *de novo* methylation in adult quiescent tissues remain unclear. Thus, it could be interesting to monitor DNA methylation and, more generally, additional epigenetic modifications in a regenerative cellular context such as dystrophic muscle, to correlate the potential impact on vector-derived transgene expression.

## Supporting Information

**Table S1 PCR primers used for high-throughput 454 sequencing analysis.** Underlined sequences correspond to 454-bead attachment sequence (A or B). Sequences in bold correspond to the tags or Multiplex identifier (MID) sequences and in normal font to the target-specific sequences. (TIF)

## Acknowledgments

The authors thank the Vector Core (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>) in Nantes for providing the rAAV2/1 stocks. We also thank the personnel at the Boissonne Centre (large animal facility, ONIRIS, Nantes), Alice Toromanoff for providing us primate samples as well as Jack-Yves Deschamps (National Veterinary School of Nantes) and Yan Chérel (UMR703 INRA/National Veterinary School of Nantes) for performing animal surgeries. We finally thank Meredith Yeager, Joe Boland, and Lisa Maslan for their assistance generating 454 sequences.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MPB AL RS PM. Performed the experiments: MPB AL. Analyzed the data: MPB AL MN KMI. Wrote the paper: MPB AL RS. Performed 454 sequencing at the Core Genotyping Facility (National Cancer Institute, Gaithersburg, Maryland): MN KMI. Performed animal experiments: CLG NF.

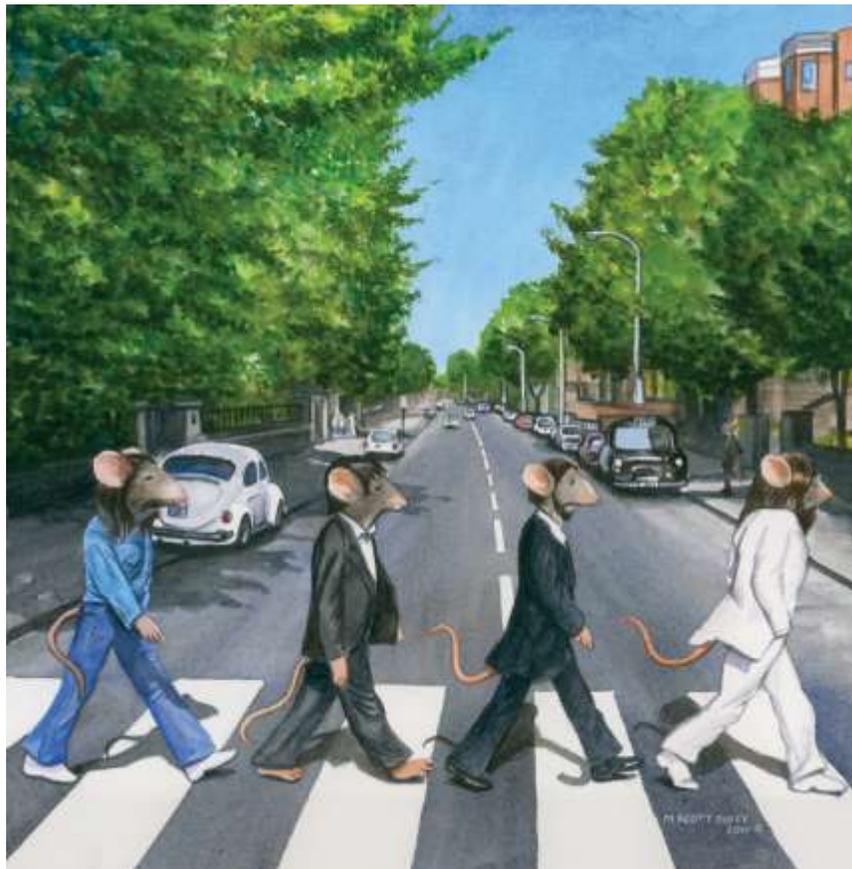
## References

1. Favre D, Blouin V, Provost N, Spisek R, Porrot F, 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.
2. Toromanoff A, Chérel Y, Guilbaud M, Penaud-Budloo M, Snyder RO, et al. (2008) Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther* 16: 1291–1299.
3. Rivera VM, Gao G, Grant RL, Schnell MA, Zolnick PW, et al. (2005) Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105: 1424–1430.
4. Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, Toromanoff A, Chérel Y, et al. (2008) Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol* 82: 7875–7885.
5. Lu Y, Choi Y, Campbell-Thompson M, Li C, Tang Q, et al. (2006) Therapeutic level of functional human alpha 1 antitrypsin (hAAT) secreted from murine muscle transduced by adeno-associated virus (rAAV1) vector. *J Gene Med* 8: 730–735.

6. Herzog RW, Hagstrom JN, Kung SH, Tai SJ, Wilson JM, et al. (1997) Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5804–5809.
7. Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, et al. (1997) Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 3: 306–312.
8. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ (1996) Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70: 3227–3234.
9. Ding W, Zhang L, Yan Z, Engelhardt JF (2005) Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 12: 873–880.
10. Sun X, Lu Y, Bish LT, Calcedo R, Wilson JM, et al. (2010) Molecular analysis of vector genome structures after liver transduction by conventional and self-complementary adeno-associated viral serotype vectors in murine and nonhuman primate models. *Hum Gene Ther* 21: 750–761.
11. McCarty DM, Young SM, Samulski RJ (2004) Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* 38: 819–845.
12. Lieberman PM (2006) Chromatin regulation of virus infection. *Trends Microbiol* 14: 132–140.
13. Paulus C, Nitzsche A, Nevels M (2010) Chromatinisation of herpesvirus genomes. *Rev Med Virol* 20: 34–50.
14. Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128: 707–719.
15. Miranda TB, Jones PA (2007) DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 213: 384–390.
16. Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31: 89–97.
17. Cedar H, Bergman Y (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10: 295–304.
18. Ellis J (2005) Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 16: 1241–1246.
19. Lorincz MC, Schübeler D, Goeke SC, Walters M, Groudine M, et al. (2000) Dynamic analysis of proviral induction and De Novo methylation: implications for a histone deacetylase-independent, methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 20: 842–850.
20. Hodges BI, Taylor KM, Joseph MF, Bourgeois SA, Schule RK (2004) Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol Ther* 10: 269–278.
21. Hong K, Sherley J, Lauffenburger DA (2001) Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector. *Biomol Eng* 18: 185–192.
22. Riu E, Chen Z, Xu H, He C, Kay MA (2007) Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression in vivo. *Mol Ther* 15: 1348–1355.
23. Chen Z, Riu E, He C, Xu H, Kay MA (2008) Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol Ther* 16: 548–556.
24. Hoelzer K, Shackleton LA, Parrish CR (2008) Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Res* 36: 2825–2837.
25. Reed K, Poulin ML, Yan L, Parissenti AM (2010) Comparison of bisulfite sequencing PCR with pyrosequencing for measuring differences in DNA methylation. *Anal Biochem* 397: 96–106.
26. Tost J, Gut IG (2007) DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2: 2265–2275.
27. Dupont J, Tost J, Jammes H, Gut IG (2004) De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem* 333: 119–127.
28. Potapova A, Albat C, Hasemeier B, Hauszler K, Lamprecht S, et al. (2011) Systematic cross-validation of 454 sequencing and pyrosequencing for the exact quantification of DNA methylation patterns with single CpG resolution. *BMC Biotechnol* 11: 6.
29. Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3740–3745.
30. Takai D, Jones PA (2003) The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol (Gedrukt)* 3: 235–240.
31. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, et al. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39: 457–466.
32. Hsieh CL (1997) Stability of patch methylation and its impact in regions of transcriptional initiation and elongation. *Mol Cell Biol* 17: 5897–5904.
33. Hejnar J, Hájková P, Plachy J, Elleder D, Stepanec V, et al. (2001) CpG island proteins Rous sarcoma virus-derived vectors integrated into nonpermissive cells from DNA methylation and transcriptional suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 565–569.
34. Katz RA, Mitsialis SA, Guntaka RV (1983) Studies on the methylation of avian sarcoma proviruses in permissive and non-permissive cells. *J Gen Virol* 64(Pt 2): 429–435.
35. Lizée G, Aerts JL, Gonzales MI, Chinnasamy N, Morgan RA, et al. (2003) Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression. *Hum Gene Ther* 14: 497–507.
36. Ahn K, Huh J, Park S, Kim D, Ha H, et al. (2008) Selection of internal reference genes for SYBR green qRT-PCR studies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) tissues. *BMC Mol Biol* 9: 78.
37. Nishimura M, Koeda A, Suganuma Y, Suzuki E, Shimizu T, et al. (2007) Comparison of inducibility of CYP1A and CYP3A mRNAs by prototypical inducers in primary cultures of human, cynomolgus monkey, and rat hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 22: 178–186.
38. Salvetti A, Oréve S, Chadeuf G, Favre D, Chérel Y, et al. (1998) Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 9: 695–706.
39. Droege M, Hill B (2008) The Genome Sequencer FLX System—longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J Biotechnol* 136: 3–10.
40. Ishida T, Hamano A, Koiwa T, Watanabe T (2006) 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. *Retrovirology* 3: 69.
41. Huang X, Yang Y (2009) Innate immune recognition of viruses and viral vectors. *Hum Gene Ther* 20: 293–301.
42. Zhu J, Huang X, Yang Y (2009) The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J Clin Invest* 119: 2388–2398.
43. Cullen BR, Raymond K, Ju G (1985) Functional analysis of the transcription control region located within the avian retroviral long terminal repeat. *Mol Cell Biol* 5: 438–447.
44. Gorman CM, Merlino GT, Willingham MC, Pastan I, Howard BH (1982) The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6777–6781.
45. Okitsu CY, Hsieh C (2007) DNA methylation dictates histone H3K4 methylation. *Mol Cell Biol* 27: 2746–2757.
46. Hsieh CL (1994) Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 14: 5487–5494.
47. Senigl F, Plachý J, Hejnar J (2008) The core element of a CpG island protects avian sarcoma and leukosis virus-derived vectors from transcriptional silencing. *J Virol* 82: 7818–7827.
48. Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson PR (2003) Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 77: 3495–3504.
49. Schüttrumpf J, Milanov P, Abriss D, Roth S, Tonn T, et al. (2011) Transgene Loss and Changes in the Promoter Methylation Status as Determinants for Expression Duration in Nonviral Gene Transfer for Factor IX. *Hum Gene Ther* 22: 101–106.
50. Salva MZ, Himeda CI, Tai PW, Nishiuchi E, Gregorevic P, et al. (2007) Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. *Mol Ther* 15: 320–329.
51. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, et al. (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 27: 2291–2298.
52. Meissner A (2010) Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* 28: 1079–1088.
53. Mobley CM, Sealy L (1998) Role of the transcription start site core region and transcription factor YY1 in Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter activity. *J Virol* 72: 6592–6601.

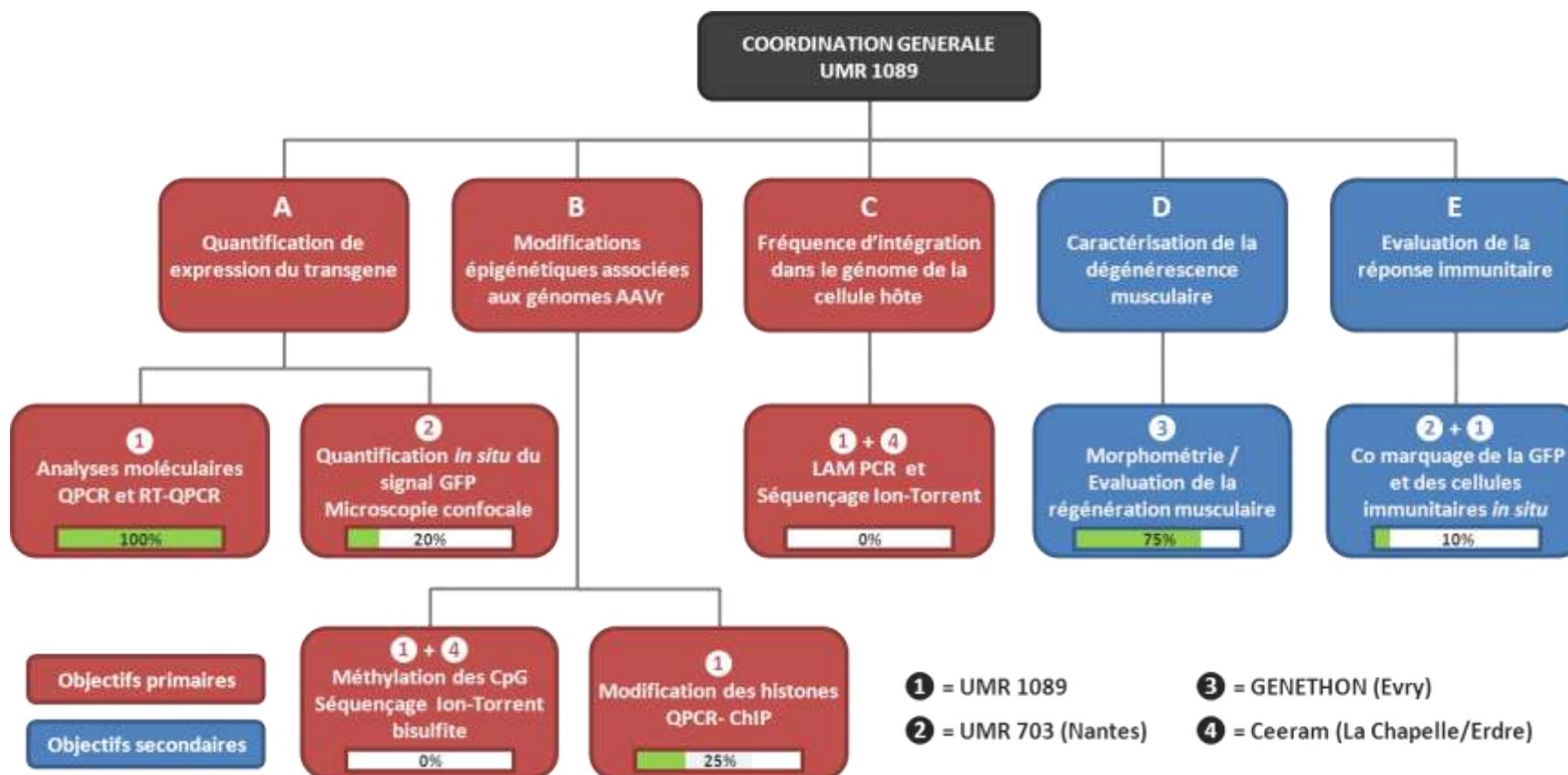
# IV Impacts de l'altération des mécanismes épigénétiques et de l'instabilité du génome sur la sécurité et l'efficacité de transduction par un AAVr dans le muscle murin déficient en dystrophine

---



## IV.1. Objectifs du projet

L'étude présentée précédemment a montré que dans notre modèle, le promoteur RSV responsable de l'expression du transgène n'est pas affecté par la méthylation de l'ADN *in situ*, dans le muscle et le foie de primate. Néanmoins, il reste plusieurs questions auxquelles nous n'avons pu répondre. (i) Il n'a pas été possible de déterminer l'activité transcriptionnelle spécifique du transgène de façon tissu spécifique et son évolution au cours du temps, étant donné le manque d'homogénéité entre les différents points de cinétique des primates qui ont été analysés et l'utilisation d'un transgène sécrété. (ii) D'autre part, nous n'avons pas été en mesure d'appliquer le protocole de ChIP pour rechercher les HPTM associées au génome de l'AAVr car la totalité des tissus des primates injectés a été utilisée pour différents protocoles. (iii) Enfin, il n'est pas possible de décrire l'impact de l'altération de stabilité du génome et des mécanismes épigénétiques sur la fréquence d'intégration et l'activité transcriptionnelle spécifique du transgène dans la DMD pour la simple raison qu'il n'existe pas de modèle de macaque de cette maladie. Afin de tenter de répondre à ces questions, nous avons conçu un protocole chez la souris à 2 temps pi (2 et 8 semaines) (**Fig. 38**) permettant de comparer chez la souris saine et la souris modèle de la DMD: **(A)** l'activité transcriptionnelle du transgène au niveau ARN et protéine, de façon tissu spécifique, **(B)** les modifications épigénétiques le long du génome de l'AAVr comprenant la méthylation de CpG du promoteur et les HPTM, **(C)** la fréquence d'intégration du génome de l'AAVr dans le génome de la cellule hôte, **(D)** l'évaluation histopathologique de la sévérité et de l'évolution de l'atteinte musculaire chez la souris mdx<sup>4cv</sup> et **(E)** la réponse immunitaire inflammatoire et cytotoxique contre les cellules qui expriment le transgène qui pourrait avoir un impact sur le niveau d'expression du transgène (**Fig. 37**).



**Fig. 37) Diagramme organisationnel des différentes taches du projet (cc).**

L'avancée approximative des différentes taches est indiquée par les barres de pourcentage.

Nous avons développé une première collaboration avec l'UMR 703 « Développement et pathologie du tissu musculaire » pour leur expertise en histologie du muscle et plus récemment avec les services bio-expérimentation et histologie de GENETHON pour les souris mdx<sup>4cv</sup> et une partie des analyses histopathologiques. Enfin, le séquençage à haut débit Ion torrent sera sous-traité à Ceeram, une société de contrôle qualité installée à proximité de Nantes avec qui nous collaborons déjà sur un autre projet.

## IV.2. Matériels et méthodes

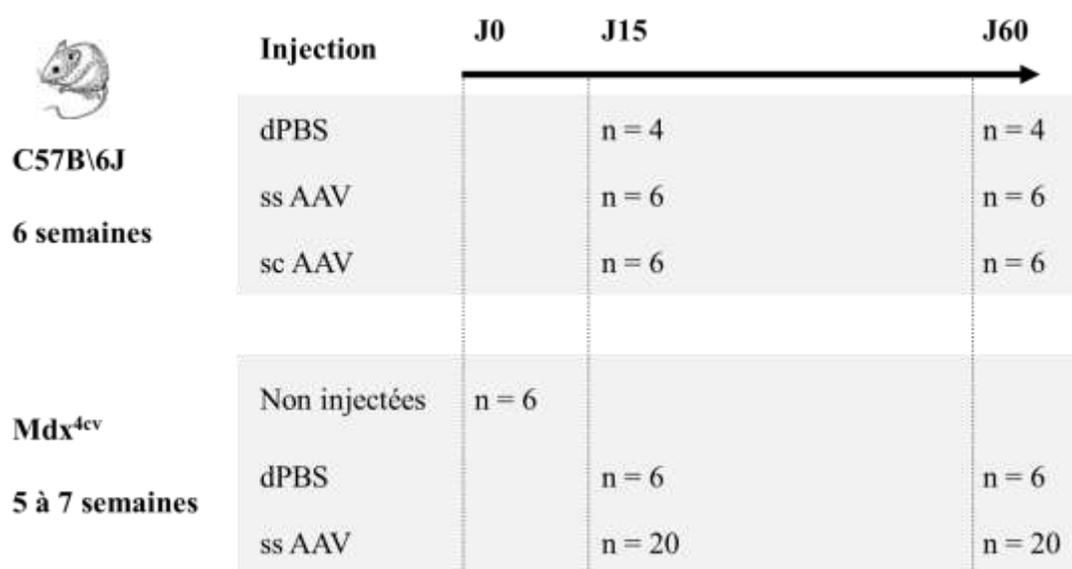
### a. Production des plasmides et des vecteurs AAVr

Les plasmides pssAAV-pRSV GFP et pscAAV-pRSV-GFP utilisés pour la production des AAVr ne diffèrent entre eux que par la présence d'une mutation dans le site trs de l'ITR gauche pour la version sc. Ils sont tous les 2 dérivés du plasmide pZA-pRSV-LEA29Y-WPRE, à partir duquel le fragment LEA29Y a été remplacé par le cDNA codant pour la GFP ([Toromanoff 2010](#)). Les vecteurs recombinants ont été produits en suivant une variante du protocole publié par Ayuso *et al* ([Ayuso 2010](#)). Brièvement, le plasmide vecteur et le plasmide helper pDP8 (portant rep2, cap8 et les fonctions adénovirales E2A, E4 et VA-RNA) sont cotransfectés en cellules HEK293. Les cellules sont récoltées à 2 ou 3 jours après transfection puis culotées par centrifugation. Le surnageant est prélevé, précipité au polyéthylène glycol (PEG), traité à la benzonase, purifié par ultracentrifugation à l'aide d'un double gradient de Chlorure de Césium, puis enfin dialysé contre une solution de dPBS (phosphate buffered saline). Les titres en génomes de vecteur totaux et en particules infectieuses obtenus par Dot Blot et ICA (Infectious Center Assay) sont les suivant :  $1,2^{e13}$  vg/ml et  $2,4^{e9}$  PI/ml pour le vecteur ssAAV et  $1,4^{e13}$  vg/ml et  $3,3^{e9}$  PI/ml pour le vecteur scAAV.

### b. Expérimentation animal

32 souris B6 mâles de statut sanitaire SPF (specific pathogen free) ont été commandées auprès de Charles River Laboratories *France*. A un âge de 6 semaines, les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale de Ketamine/Xylasine, puis ont reçu soit le vecteur ssAAV-pRSV-GFP, soit le vecteur scAAV-pRSV-GFP soit une solution de dPBS, par injection bilatérale dans les *tibialis anterior* d'un volume de 30µL à une dose totale de  $1E+11$  vg d'AAVr soit environ  $3^{E12}$ vg/kg. Le geste d'injection intramusculaire est classifié comme étant d'une sévérité légère engendrant une douleur probable mais faible en intensité et en durée, qui ne détériore pas le bien être de l'animal. Les animaux ont été sacrifiés en chambre d'anesthésie gazeuse par surdosage d'isoflurane à 2 ou 8 semaines pi. Le foie, les muscles injectés et plusieurs

muscles non injectés ont été prélevés puis congelés soit directement en azote liquide pour les prélèvements destinés aux analyses moléculaires soit en isopentane refroidi sur azote liquide dans une résine d'OCT (Sakura) pour les prélèvements destinés à l'histologie. Tous les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C. Un protocole similaire a été réalisé à GENETHON (département bio-expérimentation) pour 52 souris mâles mdx<sup>4cv</sup> issues d'un élevage interne, âgées de 5 à 7 semaines au moment de l'injection. Néanmoins contrairement aux souris B6, aucune n'a reçu de vecteur scAAV et un groupe supplémentaire a été euthanasié à J0 pour évaluer l'état pathologique initial du muscle. La moitié des prélèvements des souris mdx<sup>4cv</sup> sont destinée aux analyses histopathologiques du muscle ce qui explique le nombre d'animaux plus important que pour les souris B6 (**Fig. 38**).



**Fig. 38) Récapitulatif des points de cinétique en fonction de la lignée murine utilisée (cc).**

Les expériences ont été réalisées dans le respect des lois d'éthiques en vigueur en France (Décret 87-848, 1987) en veillant tant que possible au bien-être des animaux. Ce protocole est autorisé par le ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire français (N° A 44 124) et dispose d'un agrément d'utilisation confiné d'OGM de groupe II par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (N° 5833). Enfin le comité d'éthique pour l'expérimentation animale Pays de la Loire (N° 2011.18) et le comité d'éthique interne de GENETHON (N° 11-015) ont tous 2 émis un avis favorable.

### c. Extraction ADN et PCR quantitative

50 à 100 mg de tissu (foie ou muscle) sont dilacérés mécaniquement à l'aide du Tissu Lyser II (Qiagen) en présence de 300µl de cell lysis buffer (Gentra Puregene, Qiagen) et de 2 billes en inox (30Hz 30sec). L'ADN génomique est ensuite extrait et purifié à l'aide du kit Gentra Puregene en suivant les instructions du fabricant.

La quantité de transgène GFP est déterminée par PCR quantitative (QPCR) Taqman (Takara) et celle de l'endogène de référence *Alb1* murin par QPCR Sybr (Applied Biosystem). Les conditions de PCR et les séquences des primers sont données dans le **Tableau 12** et le **Tableau 13**. Le nombre de copies de génome de vecteur par génome diploïde de la cellule hôte est déterminé par QPCR à partir de 50ng d'ADNg par réaction en utilisant la formule suivante :  $vg/hdg = \text{Quantité transgène} \times 2 / \text{Quantité endogène}$ . La sensibilité en vg/hdg est déterminée pour chaque tissu en appliquant cette formule avec la valeur du point de gamme le plus bas détecté par la QPCR ciblant le transgène et la valeur moyenne de quantité d'endogène obtenue pour tous les échantillons.

### d. Extraction ARN et reverse transcription et PCR quantitative

50 à 100 mg de tissu sont dilacérés mécaniquement dans 1mL de Trizol (Life technologies) à l'aide du Tissu Lyser II (Qiagen) et de 2 billes en inox (30Hz 30sec, 1 run pour le foie, 2 run pour le muscle), puis le protocole du fournisseur du Trizol est suivi jusqu'à reprise du culot d'ARN dans 50µl à 300µl d'eau ultra pure. Les ARN sont ensuite traités par 2 incubations successives d'une heure chacune à la turbo DNase (Ambion), dosés par spectrophotométrie puis stockés à -80°C. La réaction de reverse transcription est assurée par la M-MLV reverse transcriptase (Life technologies) en présence de RNase OUT (Life technologies) à partir de 500 ng d'ARN après dénaturation 5 min à 65°C. Pour chaque échantillon, une réaction contrôle sans reverse transcriptase (-RT) est réalisée pour vérifier l'absence de contamination ADN avant traitement.

Pour déterminer un ARN endogène de référence dont la quantité varie le moins entre les différents tissus analysés nous avons utilisé le kit Reference Gene Panel Mouse (TATAA Biocenter) permettant de comparer 12 endogènes de référence murins. Les données obtenues ont ensuite été comparées par les algorithmes de normalisation NormFinder ([Andersen 2004](#)) et

GeNorm ([Vandesompele 2002](#)). L'endogène Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*) a été déterminé comme étant le meilleur candidat. Les quantités d'ARNm transgénique (*GFP*) et endogène (*HPRT1*) ont été évaluées par QPCR à partir de 2,5µl de produit de reverse transcription (réactions +RT et -RT) dilué au 1/10. Les conditions de PCR et les séquences des primers sont données dans le **Tableau 12** et le **Tableau 13**. La quantité relative d'ARN messenger transgénique est calculée par la formule suivante  $RQ = 2^{-(Ct\ cible - Ct\ référence)}$ . La sensibilité en RQ est déterminée pour chaque tissu en appliquant cette formule avec la valeur du point de gamme le plus bas détecté par la QPCR ciblant le transgène et la valeur moyenne de quantité d'endogène obtenu pour tous les échantillons. Une version normalisée de la quantité relative d'ARNm notée RQ/vg a également été calculée pour chaque souris en rapportant le RQ au nombre de vg/hdg.

#### **e. Immunoprécipitation de la chromatine**

- **Dilacération / Fixation / Sonication**

Une quantité totale d'environ 300µg de tissu stocké à -80°C est prélevée et pulvérisée dans un mortier en céramique dans de l'azote liquide sur lit de glace. La poudre obtenue est transférée dans un Falcon, remise en suspension dans un mélange PBS / Inhibiteur anti-protéase (IAP Roche #1 187 358 0001) / Sodium Butyrate 20mM (NaBut Sigma B5887), fixée avec du formaldéhyde 1% final (Sigma F8775) 8 minutes à température ambiante (TA), puis la réaction est stoppée par ajout de glycine 0.125M final (Sigma 50046). Après deux lavages du culot cellulaire en PBS/NaBut les cellules sont lysées à l'aide d'une solution de lyse cellulaire hyper osmotique et par action mécanique dans un dounce pendant 10 minutes à 4°C (pestle B ou D. Dutscher Potter-Elvehjem Teflon). Les noyaux sont culotés et repris dans une solution de lyse nucléaire contenant du SDS puis incubés 10 minutes à 4°C. La chromatine est fragmentée par sonication (Misonix Sonicator S4000 équipé d'une microsonde) en appliquant 10 impulsions de 20s pour une énergie totale d'environ 3200 Joule. Un aliquot est decrosslinké, purifié et l'ADN est dosé afin de déterminer la concentration de la chromatine et l'efficacité de la sonication (smire centré autour de 500pb). Le reste du volume est conservé à -80°C.

- **Immunoprécipitation et purification de l'ADN**

Le volume total de chromatine nécessaire pour toutes les immunoprécipitations (IP) est dilué dans un tampon contenant du triton. Pour éviter les liaisons aspécifique chromatine/protéine A, la chromatine est pré-purifiée avec des billes de ProteineA/Sépharose préalablement saturées par de la BSA et de l'ADN de sperme de saumon (GE Healthcare 17-0780-0) pendant 1h à 4°C. Le surnageant est ensuite distribué pour être immunoprécipité avec les différents anticorps (Ab) sélectionnés pendant une nuit à 4°C (**Tableau 11**). Le faible rendement obtenu pour le muscle nous oblige à diviser les quantités de chromatine et d'Ab correspondant par 2 et à se limiter à l'analyse de H3, H3K4me2, H3K9me3 un contrôle anti IgG.

Cible de l'Ab	H3	H1	H3K9ac	H3K4me2	H3K9me3	H3K27me3	IgG
Fournisseur	Abcam	Active Motif	Upstate	Upstate	Abcam	Active Motif	Rockland
Référence	ab1791	39708	07-352	07-030	ab8898	39155	603-4102
Type de l'Ab	Polyclonal	Polyclonal	Antisérum	Antisérum	Polyclonal	Polyclonal	Polyclonal
Quantité ou volume Ab	1 µg	10 µl	10 µl	10 µl	10 µg	5 µg	10µg
Quantité chromatine	5 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg

**Tableau 11) Caractéristiques des anticorps utilisés pour les expériences de ChIP.**

La quantité d'Ab par IP est indiquée en µg quand il a été titré par le fournisseur ou en volume quand ce titre est indisponible. Seule la référence indiquée a été utilisée et dans la mesure du possible le même lot de production.

Le lendemain de l'IP les complexes chromatine/Ab sont capturés par des billes de PA/Sépharose saturées, le surnageant non lié (UNBOUND) est conservé et la fraction liée (BOUND) est lavée par une série de tampons de force ionique croissante de façon à décrocher la chromatine liée de façon aspécifique. Après un dernier lavage au TE 10:1, les complexes encore accrochés sont élués avec une solution contenant du Bicarbonate de sodium préchauffée à 65°C. La liaison covalente entre l'ADN et les protéines des fractions UNBOUND et BOUND est ensuite rompue par réaction chimique, en présence d'une forte concentration de NaCl (500mM) à 65°C pendant une nuit. L'ADN est ensuite extrait par extraction organique au Phénol / Chloroforme / Alcool Isoamylique 25:24:1 (Sigma P2069). La phase aqueuse est réextraite avec du Phénol pH8 seul et la phase organique avec du TE. L'ADN présent dans les phases aqueuses

récupérées est précipité à éthanol absolu, en présence de Acétate de sodium et de glycogène, le culot est lavé à l'éthanol 70%, puis finalement repris dans un volume final de TE compris entre 50 et 200µL.

- **PCR quantitative**

L'ADN du vecteur immunoprécipité avec les différentes marques est recherché par QPCR, au niveau du pRSV et du transgène GFP. Nous avons également mis au point des contrôles endogènes permettant d'amplifier d'une part des gènes portant des HPTM « actives » Albumine pour le foie ou Myoglobine pour le muscle (Chr 15:76 845 919 - 76 881 100) et d'autre part le Sattelite5 murin (Su5) un élément LINE endogène portant des marques « répressives » (Chr 17:84 439 383 - 84 443 620). Pour chaque QPCR, 50ng de la fraction BOUND purifiée ou de la fraction UNBOUND purifiée sont analysés. Les conditions de PCR et les séquences des primers sont données dans le **Tableau 12** et le **Tableau 13**. La quantité obtenue est corrigée par un facteur tenant compte de la quantité initiale de chromatine, et des dilutions successives au cours du protocole. Les valeurs pour chaque marque sont normalisées par la formule suivante : Quantité normalisée = BOUND / (BOUND + UNBOUND). La sensibilité est calculée pour chaque QPCR en remplaçant la quantité de BOUND par le point de gamme le plus faible détecté et UNBOUND par la valeur moyenne de obtenu pour les différent échantillons.

Primer	Séquence	Primer	Séquence
GFP-A	5'- actacaacagccacaacgtctatca - 3'	Albm R	5'- agtgtctcatcctgcctaaa - 3'
GFP-B	5'- ggcggatcttgaagttcacc - 3'	MBm F	5'- ctgttaagactcacctgagac - 3'
GFP-P	5' - cccacaagcagaagaacggcatca- 3'	MBm R	5'- ggtgcaacctgcttctca - 3'
RSV v4 F	5'- gccgattggtggaagtaaggt - 3'	Su5m F	5'- ttggaagagacgccagat - 3'
RSV v4 R	5'- tgcggaatttagtggtcgtc - 3'	Su5m R	5'- ccaactgggatgcagttt - 3'
Albm F	5'- acatagcttgcttcagaacggt - 3'		

**Tableau 12) Liste des primers utilisés en PCR quantitative.**

La séquence des primer HPRTm R et HPRTm F n'est pas disponible car les deux primer sont de provenance commerciale. GFP-P est la sonde utilisée pour la QPCR taqman GFP, elle porte un groupe FAM (6 carboxy-fluorescéine) en 5' et un groupe TAMRA (6 carboxy-N,N,N',N'-tétraméthylrhodamine) en 3'.

	Cible	Primers et concentration finales en $\mu\text{M}$	Mix	Cycle
QPCR	<i>GFP</i>	GFP-A [0,2] / GFP-B [0,2] / GFP-P [0,1]	Taqman Takara	40 x (95°C 1s, 60°C 20s)
	<i>Alb1m</i>	Albm F [0,5] / Albm R [0,5]	Sybr ABI	45 x (95°C 3s, 60°C 30s) + MS
RT-QPCR	<i>GFP</i>	GFP-A [0,2] / GFP-B [0,2] / GFP-P [0,1]	Taqman Takara	50 x (95°C 1s, 60°C 20s)
	<i>HPRTm</i>	HPRTm F [?] + HPRTm R [?]	Sybr ABI	40 x (95°C 3s, 60°C 30s) + MS
QPCR-ChIP	<i>GFP</i>	GFP-A [0,2] / GFP-B [0,2]	Sybr ABI	45 x (95°C 3s, 60°C 30s) + MS
	<i>pRSV</i>	RSV v4 F [0,2] / RSV v4 R [0,2]	Sybr ABI	40 x (95°C 3s, 60°C 30s) + MS
	<i>Alb1m</i>	Albm F [0,5] / Albm R [0,5]	Sybr ABI	45 x (95°C 3s, 60°C 30s) + MS
	<i>MBm</i>	MBm F [0,2] / MBm R [0,2]	Sybr ABI	45 x (95°C 3s, 60°C 30s) + MS
	<i>Su5m</i>	Su5m F [0,2] / Su5m R [0,2]	Sybr ABI	45 x (95°C 3s, 62°C 30s) + MS

**Tableau 13) Liste des conditions de PCR quantitative.**

Les cycles de PCR Sybr sont systématiquement suivis d'une phase de fusion pour déterminer la spécificité de l'amplification (MS). Toutes les PCR ont été réalisées sur un thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystem) en duplicat et la valeur moyenne est calculée pour chaque échantillon.

## f. Histologie

- **Visualisation de la GFP *in situ* dans le muscle en microscopie confocale (INRA U703)**

Les tissus congelés à -80°C sont réchauffés à -20°C, découpés en tranches de 12 $\mu\text{m}$  d'épaisseur au cryostat à -20°C, puis les coupes sont étalées sur des lames Polysine (Menzel-Gläser J2800AMNZ). Les lames sont ensuite laissées 1 h à TA, lavées 5 min en PBS, fixées en PBS/PFA 4% final (EMS, 15710) 10 min à TA puis lavées 3 fois pendant 5 min en PBS. Des lamelles sont montées en Glycerol/Mowiol 4-88 (CALBIOCHM 475904). Après 30 min de séchage, les lames sont observées en microscopie confocale (Nikon C1). A terme, un système de quantification automatique de l'intensité du signal et du pourcentage de cellule transduite doit être utilisé, mais le protocole est encore en développement et pour le moment, les résultats sont simplement semi-quantitatifs.

- **Evaluation de l'anisocytose des cellules musculaires par immunomarquage anti-laminine (GENETHON – Département histologie)**

Les tissus congelés à -80°C sont réchauffés à -20°C, découpés en tranches de 8µm d'épaisseur au cryostat (Leica CM 3050 S) à -20°C, puis les coupes sont étalées sur des lames Superfrost Plus (Menzel-Gläser J1800AMNZ). Les lames sont incubées pendant 30 min à TA avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAKO S2023) pour inhiber les peroxydases endogènes, lavées 5 min à TA dans du PBS, puis incubées en PBS / Sérum de chèvre 10% (DAKO X0907) pendant 30 min à TA. L'Ab primaire anti-laminine de lapin dilué au 1/1000<sup>ème</sup> (DAKO Z0097) est déposé sur la coupe puis les lames sont incubées une nuit à 4°C en chambre humide. Le lendemain, elles sont rincées au PBS pendant 5 min 3 fois de suite, puis incubées avec l'Ab secondaire (Kit Envision HRP Rabbit K4006) en chambre humide pendant 30 min à TA, puis à nouveau lavées 3 fois 5 minutes en PBS. Le révélateur DAB dilué (DAKO K3466) est appliqué sur la coupe pendant maximum 5 min à TA en chambre humide. Les lames sont rincées à l'eau courante pendant 5 minutes, puis déshydratées par bain de concentrations croissantes en éthanol (70%, 95% et 100%) pendant 5 minutes par bain. Pour finir, après 2 bains de 5 minutes en Xylène (CARLO-ERBA 528251), des lamelles sont montées en milieu Eukkit (LABONORD 05347505), et séchées sous une hotte en fonctionnement pendant 20 min. Les lames sont observées par microscopie en champ clair (Nikon Eclipse E600 avec caméra numérique Sony XCD – U100 CR) sous forme de panorama balayant toute la coupe, à l'aide d'une platine motorisée (Marzhauser 100x100). Un protocole automatisé a été utilisé pour obtenir la mesure de l'anisocytose à partir des coupes marquées anti-laminine. Afin d'obtenir le diamètre moyen des fibres quel que soit l'angle de coupe, le périmètre de chaque fibre de la coupe est modélisé (minimum 2500 fibres /coupe) sous forme d'ellipses par le logiciel Ellix (Microvision, Evry). Le plus petit diamètre de l'ellipse (diamètre de Ferret) est mesuré, puis les fibres sont classées par catégories de 10µm en 10µm de diamètre. Le coefficient de variance est calculé pour chaque animal par la formule suivante : Coef de variance = (déviation standard du diamètre /Moyenne des diamètres) ×1000 ([Briguet 2004](#)).

#### **g. Statistiques et représentations graphiques**

Le logiciel de statistique PRISM (GraphPad) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques et les représentations graphiques présentées dans ce manuscrit. Les données de QPCR

et de RT QPCR sont représentées sous une forme peu courante, mais parfaitement adaptée aux échantillons statistiques de petites tailles (inférieur à 35 valeurs) : la boîte à moustache (**Fig. 39**).



**Fig. 39) Représentation graphique d'une série de donnée sous forme de boîte à moustache (cc).**

Le test statistique utilisé pour comparer les séries 2 à 2 est un t-test Mann-Whitney à deux extrémités avec un intervalle de confiance de 95%. L'hypothèse est retenue si  $p \leq 0,01$ . Ce test non paramétrique dédié à la comparaison 2 à 2 de données quantitatives pour des échantillons non appariés de taille inférieure à 35, est parfaitement adapté pour notre étude.

## IV.3. Résultats préliminaires

### a. Evaluation histopathologique de la sévérité de l'atteinte musculaire des souris mdx<sup>4cv</sup> pendant le protocole dans le muscle *tibialis anterior*.

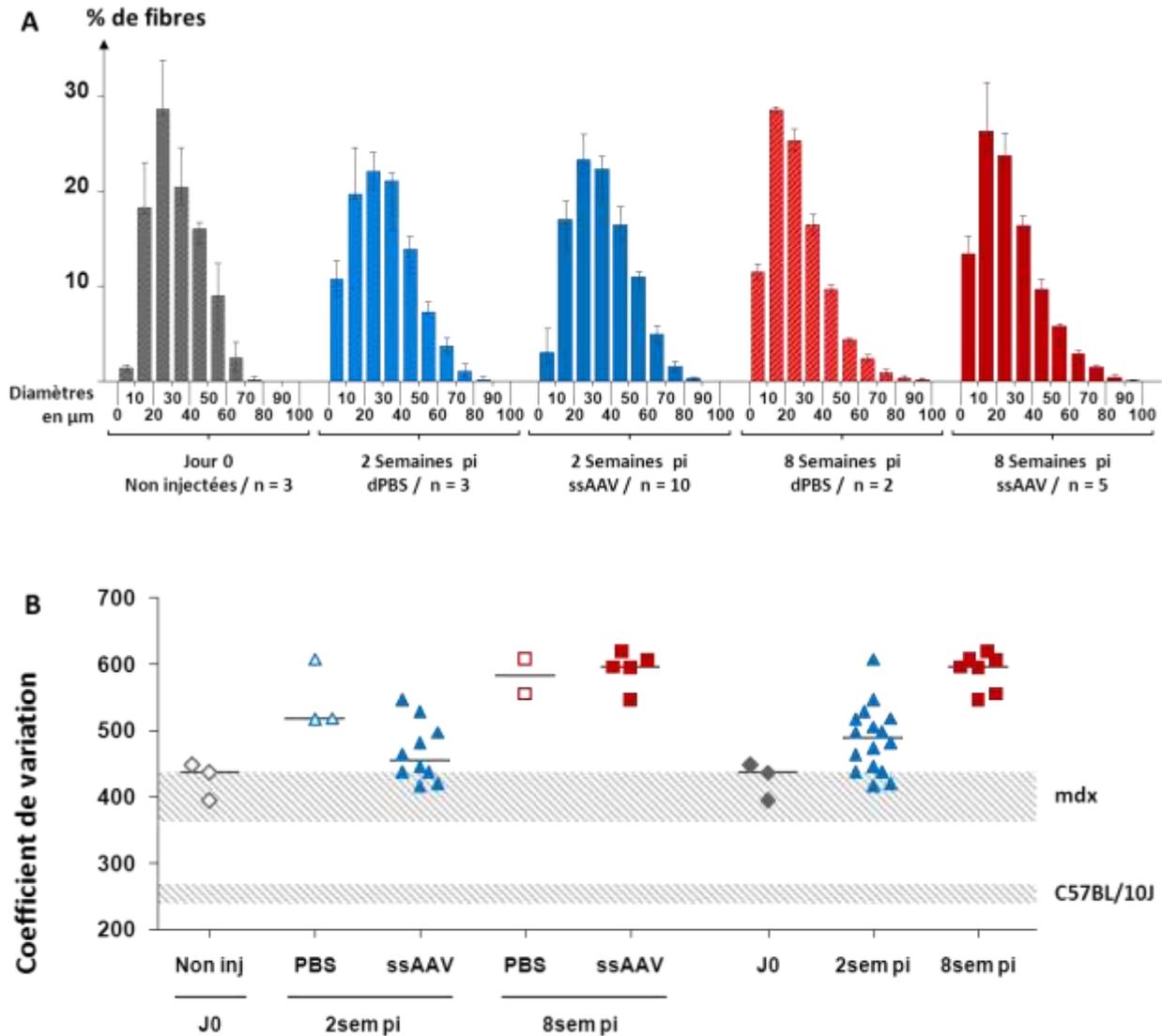
Les altérations de la stabilité du génome et des mécanismes épigénétiques ont été décrits dans les muscles déficients en dystrophine des souris mdx et des patients DMD ([Schmidt 2011](#), [Colussi 2008](#)). Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer l'état histopathologique du muscle des souris mdx<sup>4cv</sup> afin de : (i) vérifier si la période allant de l'injection au sacrifice des animaux correspondait effectivement la période de dégénération/régénération sévère du muscle décrite dans le modèle mdx ([Lucas 2004 thèse ENVN](#)), (ii) suivre la progression de la maladie aux différents points du protocole (J0, 2 semaines pi et 8 semaines pi), et (iii) déterminer si l'injection d'un AAV influence la sévérité de l'atteinte musculaire. Parmi les différents paramètres bien connus reflétant l'état pathologique du muscle (Cf. **I.5.2** et **I.5.3**), nous avons décidé de nous focaliser sur 2 d'entre eux qui sont robustes et quantifiables : l'évaluation de la variation de la taille des fibres musculaires (anisocytose) par immunomarquage des membranes cellulaires à la laminine et détermination du diamètre de Ferret des fibres ([Briguet 2004](#)) et la quantité de fibres musculaires en régénération par immunomarquage de l'isoforme développementale de la chaîne lourde de la myosine (MHCd) ([Marini 1991](#)). Pour le moment, seules les données concernant l'anisocytose sont disponibles (**Fig. 40**).

En microscopie, les fibres musculaires apparaissent de tailles très variables, ce qui confère une architecture irrégulière au muscle *tibialis anterior* avec notamment une perte de la régularité structurale des faisceaux. La **Fig. 40A** montre un décalage progressif de la taille moyenne des cellules vers les plus petits diamètres au cours du temps, particulièrement visible à 8 semaines pi. En effet, le diamètre moyen passe de 31  $\mu\text{m}$  au moment de l'injection à 27  $\mu\text{m}$  à 8 semaines pi. Ces fibres de petite taille peuvent être à la fois de nouvelles fibres musculaires en régénération, des fibres nécrotiques ou encore des cellules immunitaires infiltrées (Cf. **I.5.2**). En parallèle, on distingue l'apparition de fibres de taille importante de diamètre compris entre 70 et 90  $\mu\text{m}$ , qui peuvent être par exemple des fibres hyalines (Cf. **I.5.2**). En conséquence, on note une

augmentation progressive du coefficient de variabilité moyen (**Fig. 40 B**). Au moment de l'injection alors que les souris mdx<sup>4cv</sup> sont âgées de 5 à 7 semaines, ce coefficient est d'environ 435, soit légèrement supérieur à celui constaté par Briguet *et al* chez la souris mdx âgée de 7 semaines dans le même muscle (=399), et nettement plus élevé que celui mesuré pour la souris « saine » C56BL/10J (=254) ([Briguet 2004](#)). Chez nos souris, le coefficient de variation atteint 489 à 2 semaines pi (âge de 7 à 9 semaines), puis 595 à 8 semaine pi (âge de 12 à 14 semaines). L'anisocytose mesurée dans le muscle de nos souris mdx<sup>4cv</sup> nous indique clairement que nous sommes effectivement dans un tissu pathologique dont la sévérité de l'atteinte est légèrement supérieur à la souris mdx au début du protocole et progresse jusqu'à la fin du protocole. D'autre part, en se basant de nouveau sur l'anisocytose, il semble que l'administration d'un vecteur AAVr et l'expression consécutive du transgène GFP, n'exacerbent pas l'atteinte musculaire.

#### **En bref**

- **Anisocytose élevée dans le muscle des souris mdx<sup>4cv</sup>, légèrement plus importante que celle observée chez la souris mdx dans le même muscle et au même âge.**
- **Aggravation de l'atteinte musculaire globale pendant le protocole.**
- **Pas de différence significative de l'anisocytose entre les souris contrôles PBS et celles ayant reçu de l'AAV.**



**Fig. 40) Mesure de l'anisocytose dans le *tibialis anterior* des souris  $mdx^{4cv}$  (cc).**

**A)** Répartition des fibres musculaires des souris  $mdx^{4cv}$  en fonction de leurs diamètres. Les diamètres de Ferret en  $\mu\text{m}$  ont été mesurés à l'aide du logiciel Ellix (Microvision), puis les fibres ont été classées par catégories de 10 en 10  $\mu\text{m}$  de diamètre et représentées en pourcentage de fibres par catégories. Les barres d'erreurs correspondent aux 1<sup>er</sup> et 3<sup>me</sup> quartiles de chaque série. **B)** Coefficients de variation de la taille des fibres au sein d'une coupe de muscle de souris  $mdx^{4cv}$ . Le coefficient de variation a été calculé pour chaque animal individuellement à partir des diamètres de Ferret obtenus pour plus de 2500 fibres par coupe. Les barres noires horizontales correspondent aux médianes de chaque groupe. Les 3 séries situées sur la droite du graphique correspondent à la totalité des souris analysées à chaque temps, indifféremment de leur traitement. Les zones hachurées en gris comprennent les valeurs extrêmes observées par Briguet *et al* dans le *Tibialis anterior* de souris  $mdx$  (361 à 438) en C57BL/10J (238 à 268) âgées de 7 semaines (Briguet 2004).

**b. Nombre de copies de génome de vecteur AAV par génome diploïde de la cellule hôte dans les tissus transduits.**

La détermination de nombre de génome de vecteurs aux différents temps pi est capitale afin d'évaluer la stabilité du génome des vecteurs (vg) *in situ*. Cette valeur sera également utilisée par la suite pour normaliser le niveau d'expression du transgène par le nombre de vg. Nous avons donc évalué le nombre de vg en quantifiant la présence du transgène *GFP* par QPCR et en utilisant le gène murin *Alb1* en tant que normalisateur. Les résultats obtenus pour le muscle et le foie sont présentés sous forme numérique dans le **Tableau 14** et sous forme graphique dans la **Fig. 41** et la **Fig. 42**

vg	C57B/6J scAAV		C57B/6J ssAAV		mdx <sup>4cv</sup> ssAAV	
	2 semaines	8 semaines	2 semaines	8 semaines	2 semaines	8 semaines
Temps pi	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 10	n = 10
Foie	2,06 [-1,19; +0,48]	1,64 [-0,59; +0,33]	0,56 [-0,07; +0,08]	0,32 [-0,07; +0,16]	0,57 [-0,13; +0,06]	0,20 [-0,03; +0,04]
Muscle	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 10	n = 10
	7,46 [-1,65; +1,16]	1,88 [-0,18; +1,31]	3,44 [-0,30; +1,43]	1,46 [-0,76; +0,51]	1,66 [-0,57; +1,50]	0,19 [-0,09; +0,14]

**Tableau 14) Nombre de copie de génome de vecteur par génome diploïde de la cellule hôte dans le foie et le muscle *tibialis anterior* des souris injectées.**

Les valeurs données correspondent à la médiane de chaque série en vg/hdg suivie des quartiles inférieur et supérieur. Les sensibilités sont de  $4,01E^{-3}$  pour le foie et  $1,97E^{-3}$  pour le muscle.

Nous observons une diminution du nombre de copies de transgène entre 2 et 8 semaines pi dans toutes les conditions, particulièrement marquée dans le muscle. Sachant que les animaux ont reçu le vecteur par injection IM, il est possible qu'il reste encore des particules de vecteurs piégées dans l'endomysium et le pérимыsium à 2 semaines pi qui pourraient être détectées par QPCR. Une autre possibilité est que certains génomes instables présents dans le noyau des cellules transduites sont dégradés au cours du temps. D'autre part, à 2 semaines pi le nombre de copies de vg est 2 à 3 fois plus élevé dans le muscle que dans le foie. Etant donnée la baisse plus forte de vg/hdg dans le muscle entre 2 et 8 semaines pi, on remarque que les 2 tissus possèdent un

nombre de copies quasi-similaire à 8 semaines pi. Cette observation peut également être expliquée par un mécanisme de piégeage dans la matrice extracellulaire du muscle, mais il est aussi possible que les génomes AAVr soient plus instables dans les noyaux des cellules musculaires.

On observe également à 2 et à 8 semaines, qu'en comparaison avec les génomes ssAAV, les génomes scAAV sont en moyenne 4 fois plus nombreux dans le foie et 2 fois plus dans le muscle avec une variabilité plus importante entre les différentes souris. Il a été montré que la conversion du second brin des vecteurs ssAAV est un facteur limitant, et que dans certains tissus des facteurs protéiques semblent être responsables de la restriction de la synthèse de brin complémentaire ([Wang 2003](#)). Il est probable que les génomes « bloqués » sous forme simple brin soient dégradés, et c'est peut-être ce qui se passe dans le foie ([McCarty 2003](#)) et dans une moindre mesure dans le muscle. Du point de vue technique, il est également possible que le titre du vecteur scAAV purifié ait été sous-estimé comme cela a déjà été observé par titration en QPCR ([Fagone 2012](#)) et/ou que celui du vecteur ssAAV ait été surestimé. Cependant, nous avons limité le risque en titrant ensemble le nombre de vg des 2 vecteurs par la technique de Dot Blot et le nombre de particules infectieuses par ICA (Cf. **IV.2.a**).

Enfin l'observation qui dans le cadre de ce projet semble la plus importante est le fait que dans le muscle mdx<sup>4cv</sup>, on observe un nombre de copies légèrement plus faible 2 semaines pi mais nettement marquée à 8 semaines pi puisque ce nombre est de 1,46 vg/hdg pour les souris B6 et seulement de 0,19 vg/hdg pour les souris mdx<sup>4cv</sup>. Ce plus faible nombre de copie est également observé dans le foie à 8 semaines pi, mais avec une amplitude nettement plus faible (0,32 pour la souris B6 contre 0,20 pour la mdx<sup>4cv</sup>). L'explication la plus simple est que dans le muscle dystrophynopathe, la dégénérescence musculaire entraînerait une perte des cellules transduites et donc une diminution du nombre de copies. Il se pourrait également qu'à cause de l'inflammation du muscle dystrophynopathe l'efficacité de transduction soit limitée dès le début. Néanmoins, le fait que la diminution s'amplifie avec le temps suggère que la première hypothèse est au moins en partie responsable.

#### **En bref**

- **Baisse généralisée du vg/hdg entre 2 et 8 semaines particulièrement forte dans le muscle**
- **Vg/hdg plus élevé avec un vecteur scAAV qu'avec un vecteur ssAAV dans le foie**
- **Vg/hdg plus faible dans le muscle des souris mdx<sup>4cv</sup> que dans celui des souris B6**

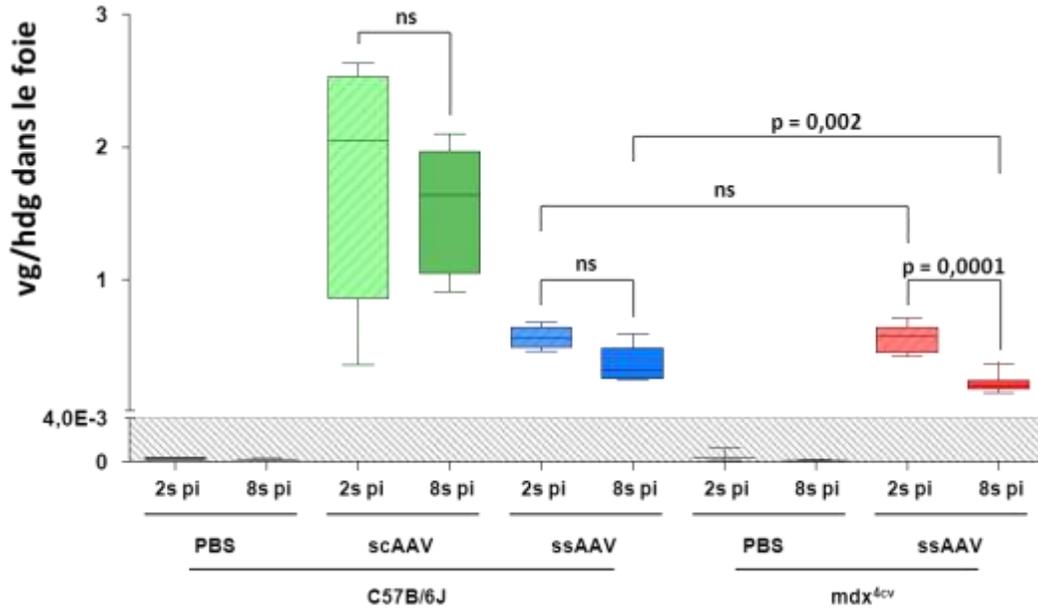


Fig. 41) Nombre de vg/hdg dans le foie des souris (cc).

Voir IV.2.g pour la représentation graphique et les tests statistiques utilisés. Sensibilité =  $4,01E^{-3}$  vg/hdg.

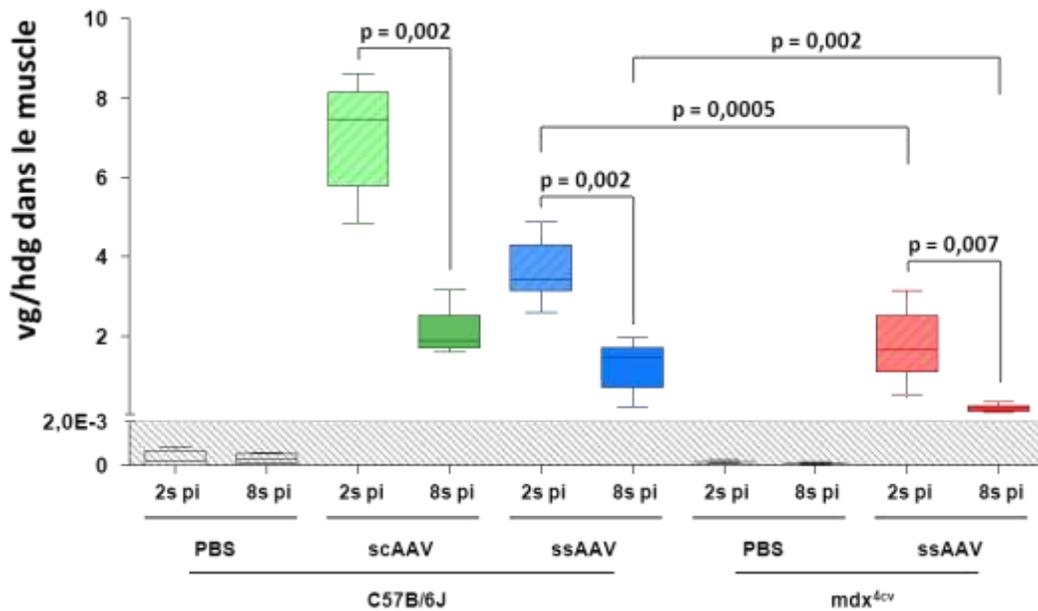
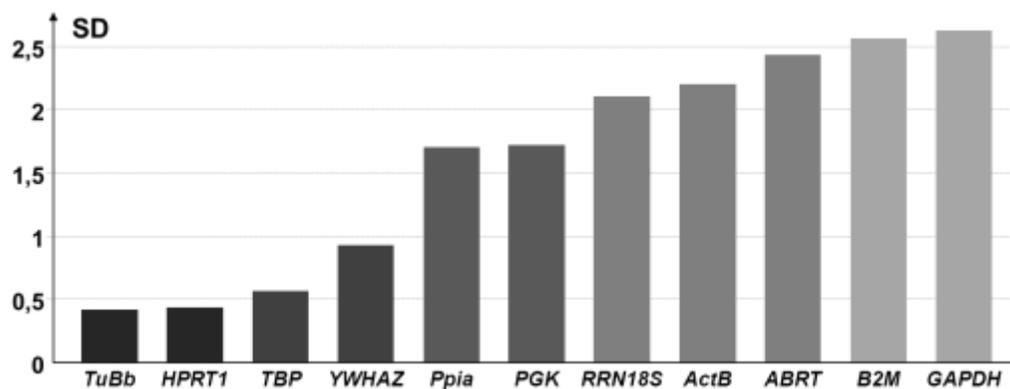


Fig. 42) Nombre de vg/hdg dans le muscle *tibialis anterior* des souris (cc).

Voir IV.2.g pour la représentation graphique et les tests statistiques utilisés. Sensibilité =  $1,97E^{-3}$  vg/hdg.

### c. Niveau d'expression de l'ARNm et de la protéine transgénique

Afin de pouvoir comparer le niveau d'expression du transgène dans le muscle et le foie au niveau ARNm, il est nécessaire de disposer d'une RT QPCR ciblant un ARNm endogène de référence qui soit exprimé à des niveaux similaires dans les 2 tissus analysés. Ce travail préalable est indispensable et doit être adapté pour chaque condition que l'on désire comparer, mais il est curieusement rarement réalisé. Nous avons comparé la variabilité obtenue en RT-QPCR entre 11 ARNm endogènes murins, *ACTB*, *ARBP*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *PGK*, *PPIA*, *RRN18S*, *TBP*, *TUBB* et *YWHAZ* à partir d'échantillons de muscle et de foie de souris. Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide des algorithmes NormFinder et GeNorm tous deux spécifiquement dédiés à ce type d'analyse. Normfinder suggère que les ARNm endogène qui varient le moins sont *HPRT1* et *TuBb* (**Fig. 43**), alors que GeNorm qui calcule légèrement différemment indique *HPRT1* et *TBP* (non présenté). Nous avons donc choisi *HPRT1* en tant que normalisateur.



**Fig. 43) Mesure de variabilité de l'expression des 11 gènes endogènes obtenus pour le muscle et le foie de souris à l'aide de l'algorithme NormFinder (cc).**

Le logiciel calcule une valeur d'écart type en groupant ensemble les réplicats d'un même échantillon.

A l'aide du normalisateur endogène *HPRT1m*, nous avons déterminé une valeur d'expression relative de l'ARNm transgénique dans le muscle et le foie des souris. Les résultats sont indiqués dans le **Tableau 15** et sous formes graphiques dans la **Fig. 45** et la **Fig. 46**.

La première observation est la différence flagrante du niveau d'expression entre le muscle et le foie des animaux, quel que soit le vecteur utilisé et le temps pi (2 à 3 log en faveur du muscle). Nous avons déjà observé le phénomène chez le primate lors de notre étude précédente

avec le même promoteur ([Léger 2011](#)). Salva *et al* avait également mis en évidence cette différence chez des souris injectées avec un AAV6 portant la phosphatase alcaline sous contrôle du pRSV et également dans une moindre mesure avec la même construction sous contrôle du pCMV ([Salva 2007](#)). La cause de cette différence n'est pas identifiée, mais étant donné le fait qu'à 60j le nombre de vg/hdg est comparable dans le foie et dans le muscle, il est possible que le promoteur soit réprimé dans le foie par un mécanisme qui pourrait être de nature épigénétique. Cette observation est assez étonnante, car le promoteur est généralement décrit comme étant ubiquitaire.

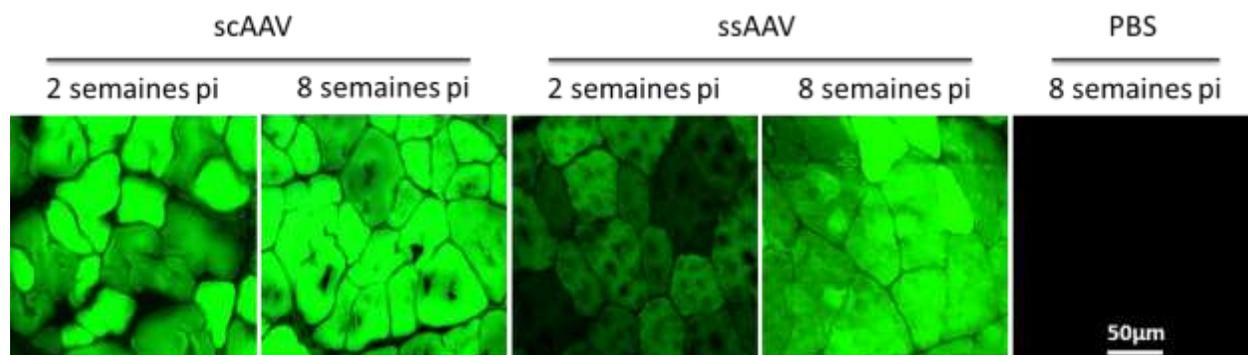
RQ	C57B/6J scAAV		C57B/6J ssAAV		mdx <sup>4cv</sup> ssAAV	
	2 semaines	8 semaines	2 semaines	Temps pi	2 semaines	8 semaines
Foie	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 5	n = 10
	2,10E-2 [-4,25E-03; +9,45E-03]	4,49E-02 [-1,16E-02; +2,18E-02]	3,09E-03 [-3,65E-04; +6,58E-04]	3,91E-03 [-5,52E-04; +4,85E-04]	9,82E-03 [-3,27E-03; +4,68E-03]	3,96E-03 [-1,43E-03; +1,15E-03]
Muscle	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 5	n = 10
	14,85 [-4,85; +8,93]	8,47 [-1,72; +0,97]	3,79 [-1,40; +4,03]	8,34 [-6,06; +4,84]	1,04 [-0,35; +0,63]	0,30 [-0,17; +0,18]

**Tableau 15) Quantité relative d'ARNm transgénique dans le foie et le muscle *tibialis anterior* des souris injectées.**

Les valeurs données correspondent à la médiane de chaque série en vg/hdg suivie des quartiles inférieur et supérieur. Les sensibilités sont de 2,4E<sup>-4</sup> RQ pour le foie et 1,0E<sup>-4</sup> RQ pour le muscle.

Deuxièmement, avec un vecteur scAAV on observe un niveau d'expression du transgène dans le foie près de 10 fois supérieur au niveau obtenu avec un vecteur ssAAV, qui persiste jusqu'à 8 semaines pi (p=0,002), bien que le niveau reste faible en comparaison au muscle. Dans une moindre mesure, le même phénomène est également observé dans le muscle à 2 semaines pi (p=0,009), mais le niveau est égalisé par le vecteur ssAAV à 8 semaines pi. Il semble donc que dans ce tissu les vecteurs scAAV permettent une cinétique d'expression plus rapide que les vecteur ssAAV mais avec *in fine* un niveau d'expression comparable. Les résultats préliminaires obtenus en visualisation directe de la GFP par microscopie confocale *in situ* suggèrent également que la cinétique d'expression des vecteurs ssAAV est plus lente que celle des vecteurs scAAV dans le muscle de souris (**Fig. 44**). Cette cinétique plus rapide des vecteurs scAAV dans le

muscle avait déjà été documentée chez la souris avec un AAV 2/2 CMV-GFP ([Wang 2003](#), [Ren 2005](#)). Wang *et al* avaient également mis en évidence une différence persistante de niveau d'expression en faveur du vecteur scAAV dans le foie de souris jusqu'à 6 mois pi. De façon intéressante, nous détectons des anticorps anti GFP par ELISA dans le sérum des souris B6 injectées avec un vecteur scAAV dès 2 semaines, alors que celles ayant reçu un vecteur ssAAV ne montre de réponse qu'à 8 semaines pi (non présenté).



**Fig. 44) Observation de la GFP dans les muscles injectés des souris C57B/6J (cc).**

Observation directe de la GFP en microscopie confocale à fluorescence sur des muscles *tibialis anterior* fixés à la PFA.

Avec le vecteur ssAAV, la quantité relative d'ARNm transgénique semble augmenter légèrement au cours du temps (non significatif) chez la souris B6, alors que la tendance inverse est observée chez la souris  $mdx^{4cv}$  ( $p = 0,007$ ). En outre, le RQ est significativement plus faible chez la souris  $mdx^{4cv}$  que chez la souris B6 à 2 semaines ( $p = 0,004$ ) et à 8 semaines ( $p = 0,0002$ ). Cette différence est à mettre en relation avec le nombre de copies de transgène, qui était déjà plus faible chez la souris  $mdx^{4cv}$ .

### En bref

- Niveau d'expression nettement plus faible dans le foie que dans le muscle
- Cinétique d'expression plus lente dans le muscle avec un vecteur ssAAV qu'avec un scAAV, mais niveau comparable à 8 semaines
- Baisse significative du niveau d'expression global au cours du temps chez la souris  $mdx^{4cv}$

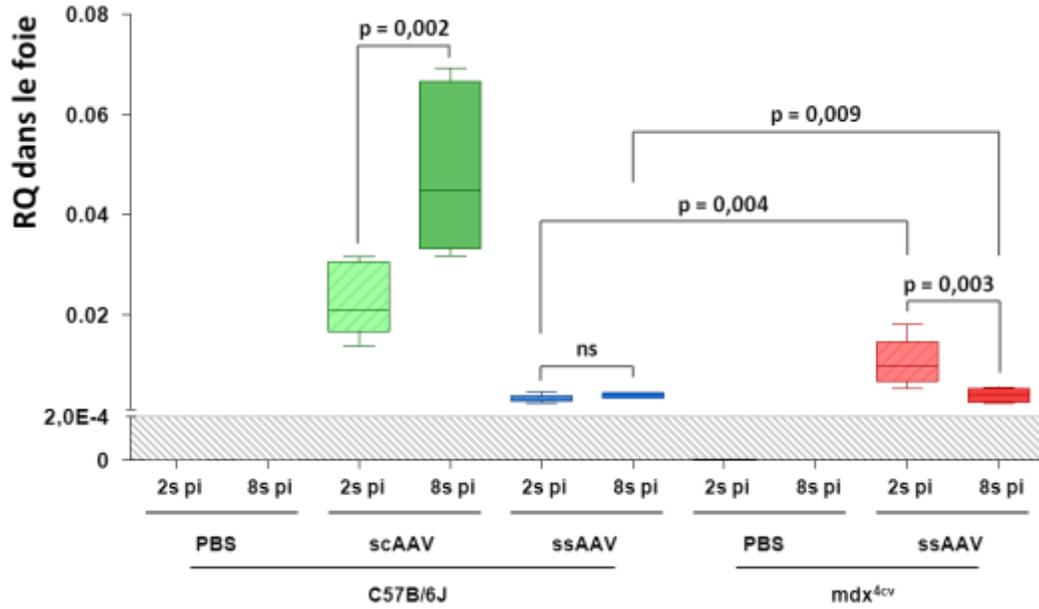


Fig. 45) Quantité relative d'ARNm transgénique dans le foie des souris (cc).

Voir IV.2.g pour la représentation graphique et les tests statistiques utilisés. Sensibilité =  $2,4E^{-4}$  RQ.

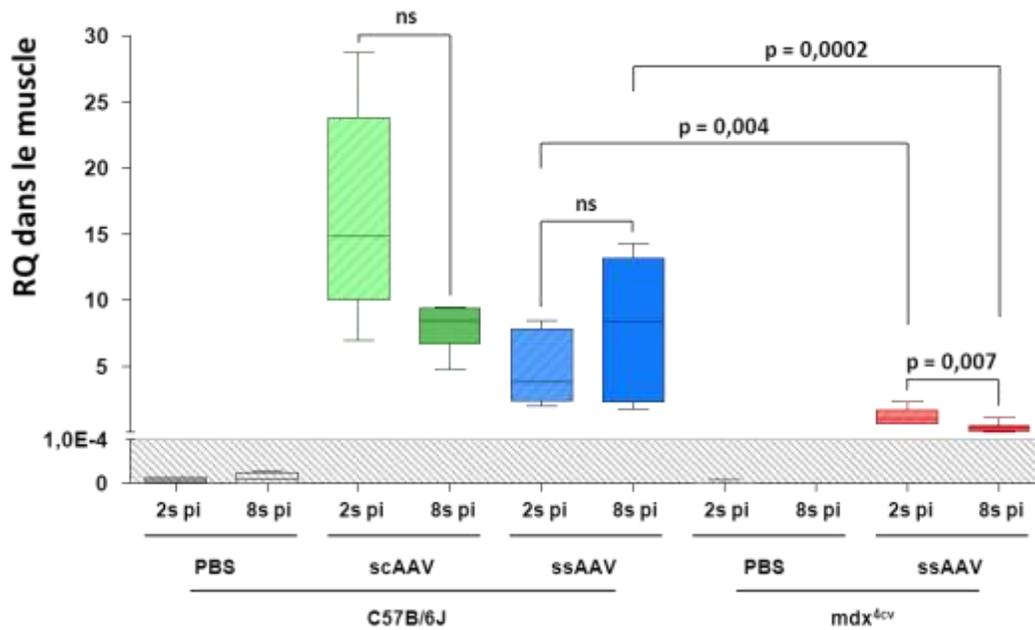


Fig. 46) Quantité relative d'ARNm transgénique dans le muscle *tibialis anterior* des souris (cc).

Voir IV.2.g pour la représentation graphique et les tests statistiques utilisés. Sensibilité =  $1,0E^{-4}$  RQ.

#### d. Activité transcriptionnelle normalisé par copie de transgène

Les résultats obtenus par la détermination du RQ apportent des informations intéressantes sur le niveau global du messenger de façon tissu spécifique, mais cette valeur est dépendante du nombre de copies du transgène dans le tissu en question. En conséquence, le RQ ne reflète pas exactement l'état d'activation des génomes AAVr qui est une donnée de première importance pour cette étude. Pour obtenir cette information, nous avons normalisé le niveau d'expression en RQ par le nombre de vg/hdg pour chaque animal individuellement. Le facteur que nous avons nommé RQ/vg indique donc une moyenne de production d'ARNm par copie de génome du vecteur, autrement dit l'activité transcriptionnelle spécifique. En outre, cette pondération permet de « lisser » la variabilité intra-groupe qui résulte de différences mineures en vg/hdg chez les différents animaux. Les résultats sont indiqués dans le **Tableau 16** et sous formes graphiques dans la **Fig. 47** et la **Fig. 48**.

RQ/vg	C57B/6J scAAV		C57B/6J ssAAV		mdx <sup>4cv</sup> ssAAV	
	2 semaines	8 semaines	2 semaines	8 semaines	2 semaines	8 semaines
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 5	n = 10
<b>Foie</b>	0,015 [-6,52E-03; +7,30E-03]	0,036 [-9,80E-03; +3,08E-03]	0,006 [-1,47E-03; +2,37E-03]	0,011 [-3,85E-03; +4,50E-03]	0,017 [-6,77E-03; +6,70E-03]	0,018 [-3,77E-03; +4,78E-03]
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 5	n = 10
<b>Muscle</b>	2,11 [-0,59; +0,89]	4,08 [-1,23; +0,99]	0,91 [-0,29; +1,57]	7,57 [-4,78; +1,34]	0,32 [-0,05; +0,62]	1,64 [-0,63; +0,69]

**Tableau 16) Quantité relative d'ARNm transgénique par copie de vecteur de génome dans le foie et le muscle *tibialis anterior* des souris injectées.**

Les valeurs données correspondent à la médiane de chaque série en RQ/vg suivie des quartiles inférieur et supérieur. Seuls les RQ/vg des échantillons positifs peuvent être calculés car les contrôles PBS sont tous inférieurs au seuil de sensibilité en RQ et en vg/hdg

En normalisant par le nombre de vg/hdg, il est encore plus évident que les copies de transgène dans le foie sont 100 à 1000 fois moins exprimées que dans le muscle ou/et que les ARNm transgéniques sont soumis à une forte instabilité aboutissant à une durée de vie beaucoup plus faible.

En utilisant cette représentation, on voit également que l'activité transcriptionnelle par copie de génomes scAAV est 3 à 4 fois plus élevé que celui de génomes ssAAV dans le foie ( $p = 0,009$  à 2 et à 8 semaines), mais pas dans le muscle. S'il est possible d'expliquer le retard d'expression dans le muscle par une conversion lente du simple brin en double brin, la différence persistante à 8 semaines dans le foie est plus complexe à justifier. Reste-t-il encore du génome simple brin non converti si tard après traduction dans le foie ? Des analyses par Southern blot dans le foie murin suggèrent plutôt que non ([Wang 2003](#), [Sun 2010b](#)). Il est possible que des facteurs de répression de la transduction soient recrutés au cours de la conversion double brin des génomes ssAAV, aboutissant à un des génomes AAV inertes. Au contraire, en gardant en mémoire le fait que le niveau d'expression dans le foie reste très faible, il est également envisageable que les génomes scAAV soient capables de recruter des facteurs d'activation de la transcription plus efficacement. Au final dans le foie, en admettant l'absence de biais de titration, on obtient à l'aide d'un vecteur scAAV non seulement plus de copie mais également une activité transcriptionnelle plus importante par copie, ce qui rend ces vecteurs clairement plus intéressants dans ce tissu mais pas dans le muscle, sauf si une expression rapide du transgène est nécessaire.

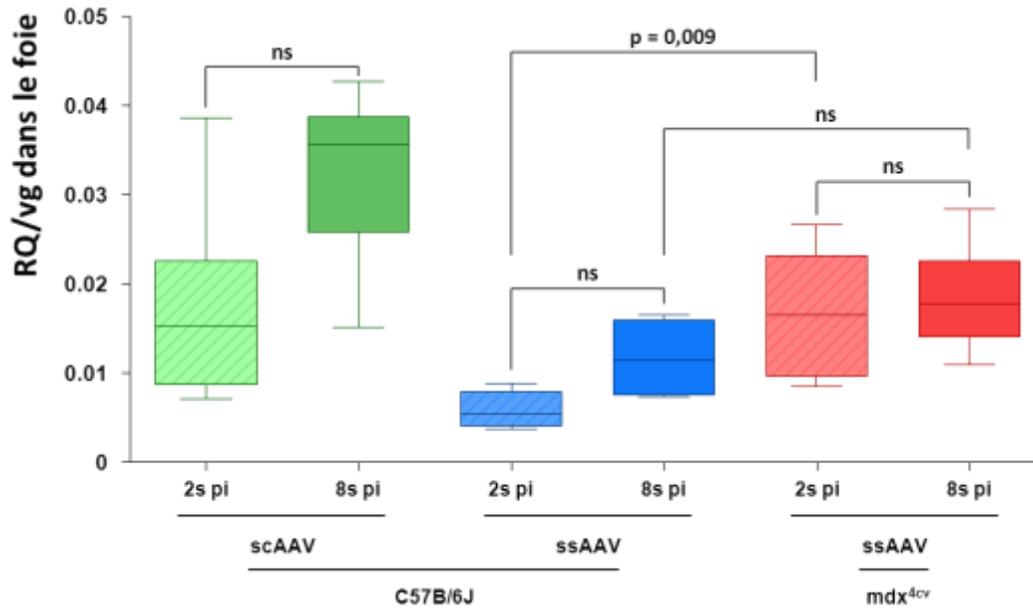
Dans le foie, l'activité transcriptionnelle par copie du transgène est relativement stable au cours du temps dans toutes les conditions. En parallèle, dans le muscle des souris B6 et  $mdx^{4cv}$  on note pour les vecteurs ss une augmentation faible, mais significative de l'activité transcriptionnelle spécifique entre 2 et 8 semaines pi. Il faut néanmoins remettre cette observation dans le contexte de la diminution importante du nombre de copies qui pourrait être causée soit par la présence de vecteur piégé dans la matrice extracellulaire à 2 semaines, soit par l'élimination physique de copies de génome recombinant inertes dans le noyau, bien qu'un tel mécanisme n'ait jamais été décrit. Enfin il est également possible que cette augmentation résulte directement d'une amélioration générale de l'activité transcriptionnelle.

Pour finir, dans le muscle de déficient en dystrophine, à partir de 8 semaines pi l'activité transcriptionnelle par copie de génome de ssAAV est significativement inférieure à celle observée dans le muscle sain ( $p = 0,001$ ). En conséquence, chez la souris  $mdx^{4cv}$  en plus de la diminution forte du nombre de génomes du vecteur entre 2 et 8 semaines pi, les copies restantes sont moins actives et/ou les ARNm sont plus instables. En mettant cette observation en parallèle avec le contexte d'altération des mécanismes de la régulation épigénétique dans le muscle dystrophinopathe, il est possible que le génome de l'AAVr soit partiellement éteint par des

modifications épigénétiques quantitativement et/ou qualitativement différentes de ce que nous avons observé dans le muscle sain. Etant donnée l'altération de la stabilité de l'ADN génomique par la présence d'un stress oxydatif élevé dans le muscle déficient en dystrophine (mutations ponctuelles, cassures double brin), une autre possibilité est que le génome de l'AAV pourrait être cassé, remanié ou muté. En conséquence, l'instabilité génomique pourrait également être responsable d'une diminution progressive de l'activité transcriptionnelle par copie de génome AAV.

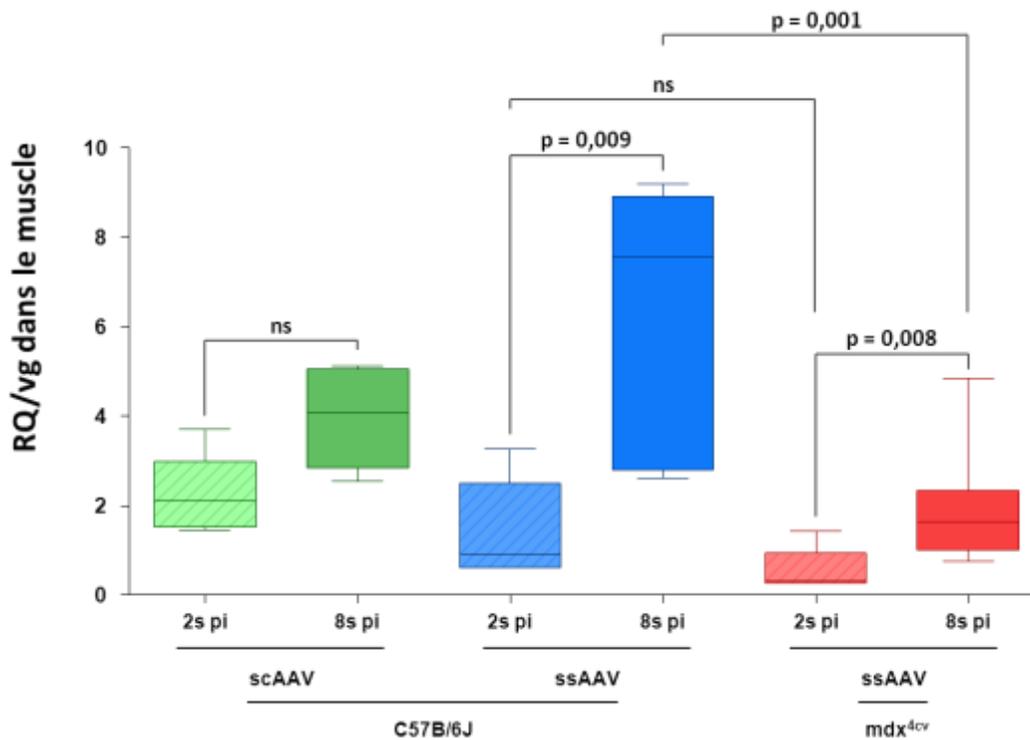
### **En bref**

- **Dans le foie, vg/hdg et activité transcriptionnelle spécifique plus élevé avec un scAAV, qu'avec un ssAAV à 2 et 8 semaines pi.**
- **Dans le muscle des souris B6 et mdx<sup>4cv</sup> augmentation de l'activité transcriptionnelle par copie entre 2 et 8 semaine pi avec un ssAAV.**
- **Dans le muscle des souris mdx<sup>4cv</sup>, vg/hdg plus faible et activité transcriptionnelle par copie 4 fois moindre que dans le muscle des souris B6.**



**Fig. 47)** Quantité relative d'ARNm transgénique par vg dans le foie des souris (cc).

Voir IV.2.g pour la représentation graphique et les tests statistiques utilisés.



**Fig. 48)** Quantité relative d'ARNm transgénique par vg dans le muscle *tibialis anterior* des souris (cc).

Voir IV.2.g pour la représentation graphique et les tests statistiques utilisés.

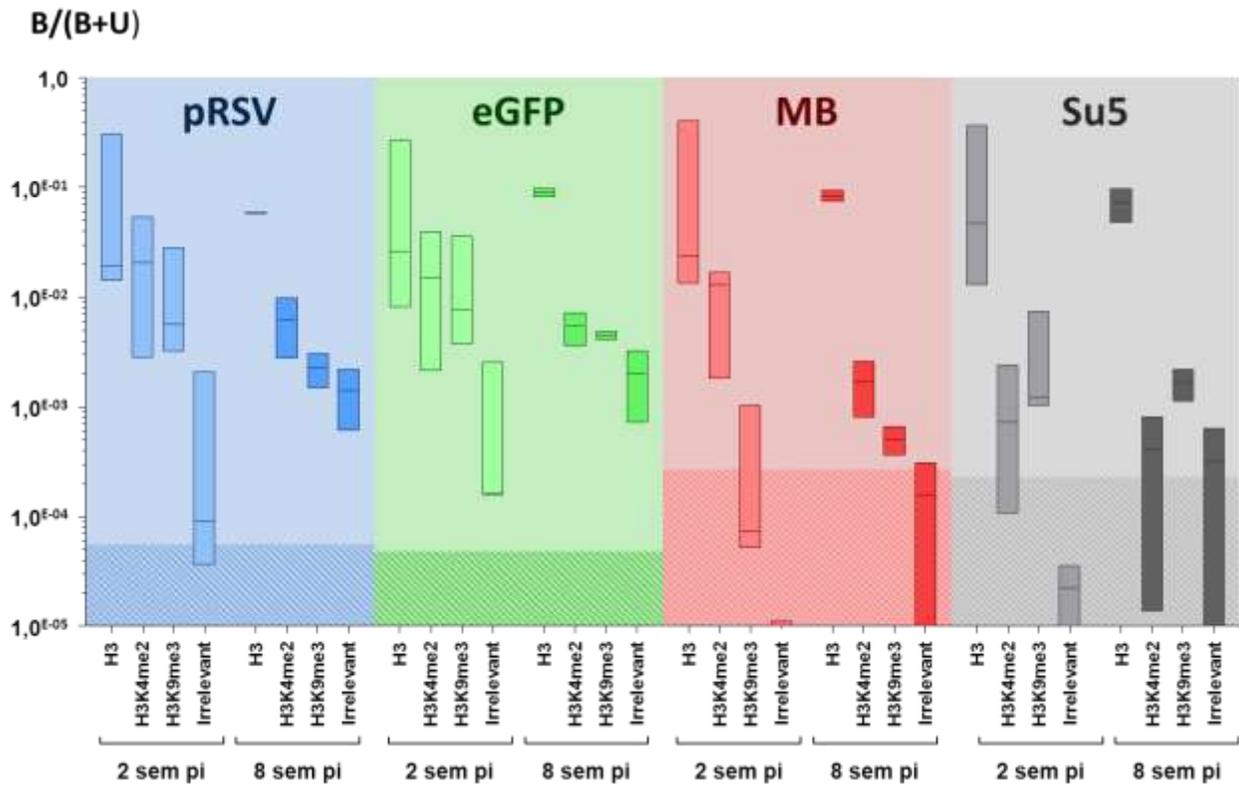
#### e. HPTM associées avec le génome de l'AAVr

Afin de déterminer si le génome l'AAV est soumis à une modulation de l'expression par des mécanismes épigénétiques dans le muscle sain et dans le muscle dystrophynopathe, il est nécessaire de quantifier la méthylation des CpG du promoteur et de caractériser les PTM des histones associées à l'AAV. Nous planifions de vérifier un éventuel rôle de la méthylation des CpG du promoteur en utilisant le NGS bisulfite ou le PyroMeth en suivant le même protocole que celui utilisé chez le primate dans l'étude précédemment décrite (Cf. **chapitre III**).

L'association de quelques HPTM robustes caractéristiques de régions de chromatine actives ou inactives avec le génome de l'AAV sont en cours d'analyse. Le muscle étant particulièrement pauvre en noyaux, nous avons été dans l'obligation de restreindre notre analyse CHIP à seulement 4 conditions :

- la HPTM **H3K4me2** qui est généralement enrichie à proximité des promoteurs et enhancers de **gènes activement transcrits**, ou prompts à être transcrits (Cf. **Fig. 31**).
- la HPTM **H3K9me3** qui est particulièrement présente dans les promoteurs, enhancers et gènes inactifs ainsi qu'au niveau des éléments viraux endogènes. C'est une marque généralement synonyme de **répression à long terme** parfois associée à la méthylation de l'ADN (Cf. **Fig. 31**). H3K9me3 est décrite comme étant une marque antagoniste de H3K4me2.
- La **densité générale en histone H3** canonique généralement plus importante dans les régions réprimées. Cette condition peut également être considérée comme un contrôle positif de manipulation adéquate de la chromatine.
- Un contrôle négatif avec un anticorps ciblant les IgG de poulet (anticorps irrelevant).

Nous avons recherché l'association de ces marques avec le pRSV et le transgène GFP présents dans le génome de l'AAVr dans le muscle injecté des animaux, ainsi que pour 2 régions contrôles du génome murin, activement transcrite dans le cas du gène Myoglobine (MB) et constitutivement réprimée dans le cas du Satellite5 (Su5) (**Fig. 49** et **Fig. 50**). Nos résultats préliminaires obtenus sur un nombre restreint d'animaux (n=3 à 2 semaines pi et n=2 à 8 semaines pi) ne permettent pas pour le moment de faire d'analyse statistique. Ainsi les conclusions qui suivent indiquent des tendances générales, mais doivent être interprétées avec prudence.



**Fig. 49) Quantité relative de différentes HPTM présentes sur le génome de l'AAVr et des gènes endogène murins de contrôle dans le *tibialis anterior* de souris C57B/6J (cc).**

L'échelle en ordonnée ( $B/B+U$ ) représente le rapport entre la quantité de cibles détectées par QPCR qui sont immunoprécipitées avec l'anticorps dirigé contre l'épitope indiqué (BOUND) et la quantité totale présente à la fois dans la fraction immunoprécipitée et la fraction non liée (UNBOUND). Les anticorps utilisés ciblent l'histone H3 indépendamment de ses éventuelles modifications, H3K4me2 et H3K9me3. L'anticorps irrelevant reconnaît en temps normal les IgG de poulet. Les données sont représentées par des boîtes flottantes comprenant les valeurs extrêmes et la médiane quand au moins 3 valeurs sont disponibles. Les sensibilités respectives du ratio ( $B/B+U$ ) pour chaque QPCR sont indiquées par les zones hachurées ( $pRSV = 4,32^{E-05}$ ,  $GFP = 3,76^{E-05}$ ,  $MB = 1,54^{E-04}$  et  $Su5 = 1,12^{E-04}$ ).

On remarque que dans le muscle des souris B6 le génome de l'AAV est associé avec l'histone H3 au niveau du pRSV et du transgène GFP selon une stœchiométrie proche de celle observée pour les régions contrôles endogènes. Ce résultat n'a rien d'étonnant dans le sens, où nous avons déjà montré que le génome de l'AAV est associé avec des histones cellulaires sous une forme similaire à la chromatine endogène ([Penaud Budloo 2008](#)). Néanmoins, c'est la première fois que l'association directe entre le génome de l'AAVr est une histone cellulaire est

mise en évidence *in vivo*. En outre, cette condition nous indique que le protocole préserve l'association du génome de l'AAV avec les histones.

Les résultats obtenus pour le pRSV et le transgène GFP suggèrent un enrichissement des HPTM H3K4me2 et H3K9me3 qui est systématiquement supérieur aux sensibilités respectives des QPCR et du contrôle IgG non spécifique pour chaque groupe d'animaux, malgré une variabilité inter échantillons qui peut être importante. En comparant, les groupes aux mêmes temps pi, la marque H3K4me2 est enrichie sur la GFP, le pRSV et le gène actif Myoglobine, mais pas sur le satellite5 murin pour lequel les valeurs obtenues sont proches de la limite de détection. L'enrichissement de la marque H3K9me3 est également noté pour le pRSV et la GFP, mais le phénomène inverse est observé pour les contrôles endogènes.

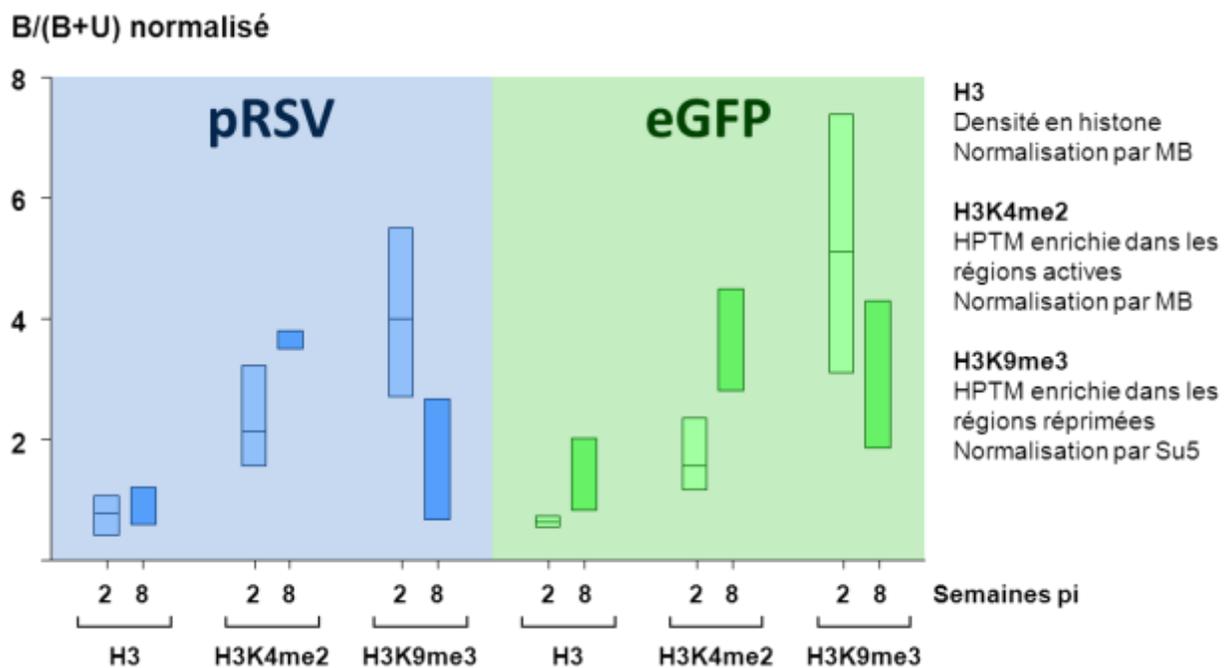
La représentation des données de la **Fig. 49** présente l'intérêt de mettre en évidence tous les contrôles effectués et de permettre le calcul d'un seuil de sensibilité. Cependant, au cours du protocole de ChIP la quantité initiale réelle de chromatine ajoutée ainsi que l'efficacité de l'immunoprécipitation et de la purification de l'ADN sont des éléments de variabilité inter-échantillons qui ne sont pas normalisés dans ce type de représentation. Il est donc difficile de comparer les différents échantillons entre eux sous ce format. Pour cela, les ratio B/(B+U) obtenus pour le pRSV et la GFP sont normalisés par le gène endogène porteur de la modification cible. Ainsi, H3K4me2 est normalisé par rapport au ratio obtenu pour la myoglobine et H3K9me3 par rapport au ratio obtenu pour le Satellite Su5. Etant donné les résultats similaires obtenus pour H3 avec MB et Su5, nous avons décidé de façon arbitraire de normaliser par rapport à MB. Sous cette forme, la représentation des contrôles négatifs n'a pas de sens et il n'est pas possible de calculer de seuil de sensibilité.

Les résultats normalisés sont représentés en **Fig. 50**. Cette représentation confirme le fait que la densité en histone H3 est comparable à la stœchiométrie observée sur le contrôle endogène MB (ratio  $\approx 1$ ) comme le laissait supposer la **Fig. 49**. Des résultats similaires ont été obtenus en normalisant avec Su5 (données non présentées).

D'autre part les larges variations inter-échantillons observées à l'intérieur d'un même groupe sur la représentation non normalisée sont nettement atténuées en normalisant par les endogènes. Par exemple pour H3, alors que des variations de plus d'un log étaient observées en **Fig. 49**, la normalisation permet de limiter l'hétérogénéité à un facteur 2 au maximum.

De façon générale, des résultats comparables sont observés pour le promoteur RSV et le

transgène GFP, pour lesquels on note un enrichissement en marque H3K9me3 et H3K4me2, qui est dans les 2 cas supérieur à ce qui est observé pour les contrôles endogènes (ratio supérieur à 1). Il semble que H3K9me3 (« chromatine inactive ») diminue légèrement entre 2 et 8 semaines alors qu'en parallèle H3K4me2 (« chromatine active ») augmente. Bien que ces résultats soient encore à l'état préliminaire et que seules 2 marques antagonistes aient été recherchées, il est tentant de penser que la proportion de génome portant des HPTM « répressives » diminue au cours du temps soit par élimination physique, soit par remplacement par des HPTM « actives » impliquant la mise en place d'un environnement épigénétique favorable à la transcription. Ces hypothèses sont cohérentes avec les résultats obtenus par RT-QPCR (**Fig. 48**) et par visualisation directe de la GFP (**Fig. 44**) qui indiquent une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle par copie de transgène entre 2 et 8 semaines dans le muscle de souris B6.



**Fig. 50) Quantité relative normalisée de différentes HPTM présentes sur le génome de l'AAVr dans le *tibialis anterior* de souris C57B/6J (cc).**

Les données sont représentées par des boîtes flottantes comprenant les valeurs extrêmes et la médiane quand au moins 3 valeurs sont disponibles.

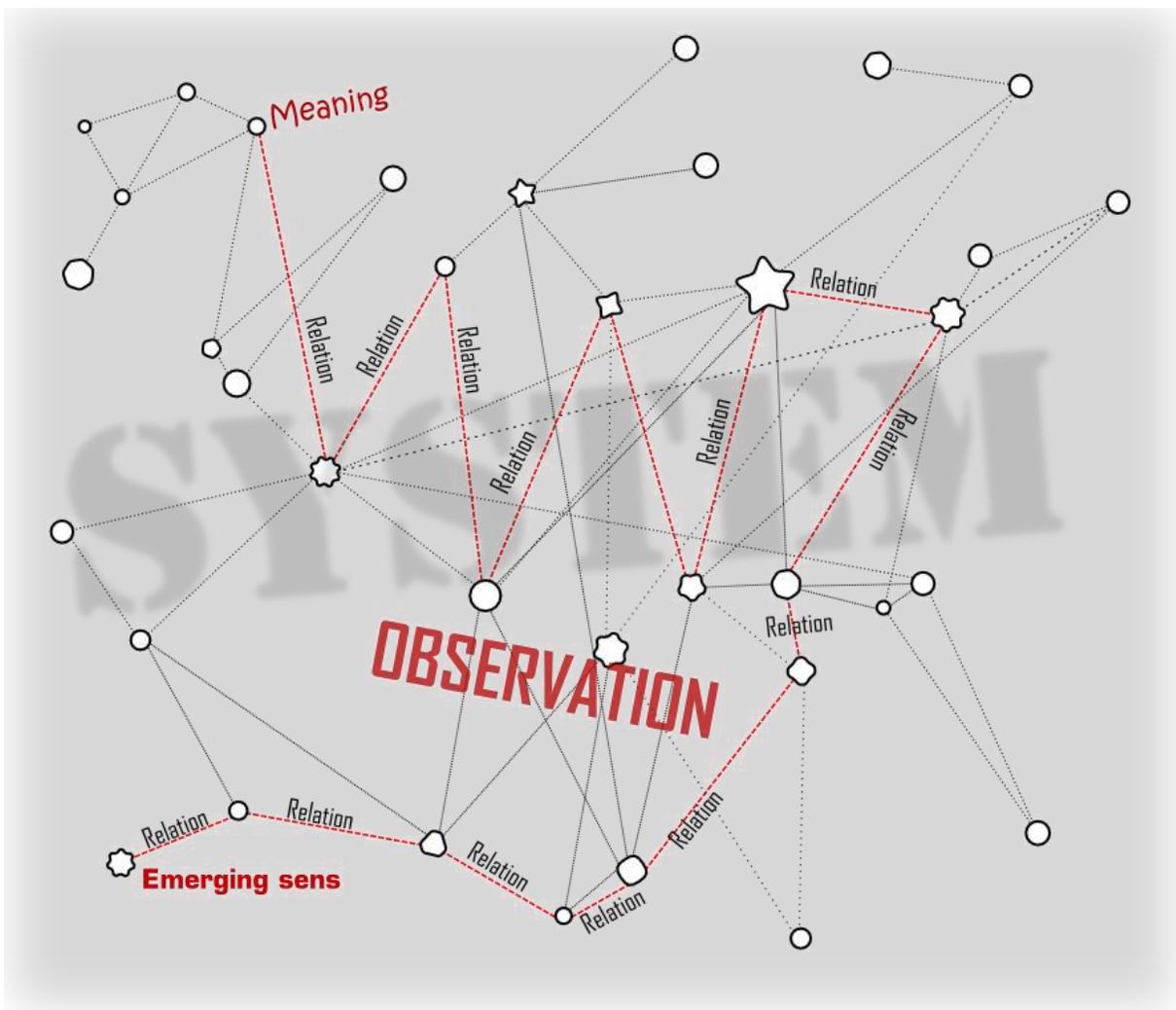
## **Conclusions préliminaires dans le muscle des souris B6 avec le vecteur ssAAV**

- **Densité en histone H3 comparable à celle observée sur les contrôles endogènes.**
- **Enrichissement sur le génome de l'AAVr des HPTM « active » H3K4me2 et « répressive » H3K9me3**
- **Evolution vers un profil chromatinien plus actif entre 2 et 8 semaines pi ?**



## V Discussion et perspectives

---



- **La régulation de l'expression des gènes par des mécanismes épigénétiques endogènes a-t-elle un impact négatif sur le niveau d'expression du génome de l'AAVr *in vivo*?**

Pour répondre à cette question, deux approches peuvent être envisagées. La première consiste à évaluer l'effet de différentes molécules inhibitrices des enzymes impliquées dans la mise en place de modifications épigénétiques (CMD) (Cf. **I.4.1**), tout en suivant en parallèle l'expression du transgène porté par un AAVr. Quelques études *in vitro* avaient commencé à explorer la question par cette approche et suggéraient une probable répression de la transcription du génome de l'AAVr par des mécanismes épigénétiques ([Chen 1999](#), [Okada 2006](#)). Cependant, des modèles bien particuliers ont été employés dans ces études ; Dans un cas, le génome recombinant est intégré de façon stable dans le génome cellulaire et dans l'autre les lignées cellulaires utilisées sont des modèles de tumeurs humaines. De plus, il faut garder à l'esprit que les CMD ont souvent des effets pléiotropiques et qu'une augmentation du niveau d'expression du transgène suite à l'administration de CMD ne serait pas nécessairement due uniquement à la levée d'une éventuelle répression imposée par des modifications épigénétiques.

En ce qui nous concerne, nous avons choisi une seconde approche consistant à caractériser les modifications épigénétiques portées par le génome de l'AAVr au niveau moléculaire *in vivo*. Pour cela, nous avons suivi la cinétique d'expression du transgène en corrélation avec la méthylation de l'ADN du promoteur et quelques HPTM caractéristiques de l'état transcriptionnel de la chromatine dans le muscle et le foie de NHP et de souris.

Nous avons tout d'abord déterminé **le statut épigénétique initial du génome de l'AAVr dans les particules** avant injection. Il s'avère que dans notre modèle, le promoteur contrôlant l'expression du transgène (pRSV) est exempt de méthylation des CpG dans des particules d'AAVr 2/1, 2/5 et 2/8 produites par transfection transitoire ([Léger 2011](#) et résultats non présentés). D'autre part, il paraît peu probable que des protéines histones soient associées à l'ADN du vecteur lors de l'encapsidation quand on sait qu'un nucléosome mesure environ 11nm et que le diamètre interne d'une particule d'AAVr est d'environ 14nm ([Gerlach 2011](#)). Bien que le génome de certains virus comme l'adénovirus soient compactés dans la capsidie à l'aide de protéines virales ([Mirza 1982](#)), aucun virus embarquant des histones à l'intérieur de la capsidie n'a été décrit. Même si l'hypothèse peu probable de la présence de protéines histones dans la

capside des AAVr reste à vérifier, il semble que le génome recombinant soit délivré dans le noyau des cellules hôtes dans un état épigénétique naïf, c'est-à-dire exempt de méthylation de l'ADN et d'histone associée.

Nous avons par la suite cherché à déterminer l'implication éventuelle de la **méthylation du promoteur contrôlant le transgène** sur le niveau d'expression du génome recombinant *in situ*. Dans le muscle et le foie de NHP après administration en IM ou en IV de vecteurs ssAAV 2/1 ou 2/8, les génomes recombinants ne sont pas méthylés *de novo* au niveau du promoteur à des temps pi allant de 1 à 37 mois. Nous avons reproduit l'observation de façon préliminaire dans le muscle et le foie de souris B6 sur un des 2 massifs riches en CpG du promoteur RSV à 7 jours après injection IM d'un ssAAV 2/8 ([Léger 2011](#)). L'analyse des échantillons des souris présentées dans le chapitre précédent de ce manuscrit doit toutefois être réalisée pour confirmer ces résultats dans le modèle murin.

Récemment, une équipe a montré que l'hyper-méthylation des CpG présent dans les ITR du parvovirus B19 corrèle avec la répression des gènes viraux et contribue à la persistance du virus *in vivo* ([Bonvicini 2012](#)). Tout comme le parvovirus B19 les ITR de l'AAV 2 sont particulièrement riches en CpG (32CpG sur 380 pb pour B19 et 16 CpG sur 145pb pour l'AAV). D'autre part, ils sont capables d'initier la transcription d'un transgène recombinant en l'absence de promoteur ([Flotte 1993](#)). Il n'est donc pas exclu qu'une éventuelle méthylation de ces régions puisse jouer un rôle dans le contrôle de l'expression d'un transgène porté par le génome de l'AAVr. Il se pourrait également que la richesse des ITR de l'AAV 2 en CpG leur confère une fonction d'insulator protégeant le génome viral d'une éventuelle propagation de la méthylation de l'ADN, comme c'est le cas par exemple de l'îlot CpG contenu dans l'insulateur 5'HS4 du gène de la  $\beta$ -Globine ([Chung 1996](#)). Au final, il semblerait intéressant de vérifier l'état de méthylation des ITR de l'AAVr qui joue peut être un rôle de tampon contre la répression de l'expression.

Plus récemment, nous avons obtenu des résultats prometteurs chez la souris B6 ayant reçu un vecteur ssAAV 2/8 par injection IM, indiquant : **(a)** une efficacité d'expression du transgène 2 à 3 log plus faible dans le foie que dans le muscle avec un nombre de copies de transgène équivalent (**Fig. 47** et **Fig. 48**), **(b)** une baisse significative du nombre de copies de génome de vecteur au cours du temps dans le muscle (**Fig. 42**), **(c)** mais en parallèle une augmentation

significative de l'activité transcriptionnelle par copie de vecteur (**Fig. 48**) et enfin (**d**) toujours dans le muscle, la détection par CHIP de HPTM associées au génome de l'AAVr caractéristiques de régions promotrices actives (H3K4me2) mais aussi d'une marque antagoniste associée à des régions réprimées de façon constitutive (H3K9me3) (**Fig. 50.**).

a) Nous avons déjà observé une **différence de niveau d'expression foie/muscle** du même ordre avec un ssAAV 2/1 pRSV LEA29Y chez le NHP ([Léger 2011](#)) et Salva *et al* avait également rapporté une effet similaire au niveau protéique chez la souris avec un ss AAV 2/6 portant le cDNA de la phosphatase alcaline sous contrôle du pRSV ([Salva 2007](#)). Très récemment, nous avons obtenu des résultats préliminaires de CHIP dans le foie de nos souris ayant reçu ssAAV 2/8 RSV GFP qui suggèrent la présence d'une quantité de la marque répressive H3K9me3 environ 5 fois plus élevée dans le foie que dans le muscle à 8 semaines pi (résultats non présentés). En nous basant sur nos données et celles obtenues par Salva *et al* nous constatons que dans le cadre de transfert de gène avec un AAVr le pRSV est un promoteur permettant un niveau d'expression similaire au pCMV dans de nombreux tissus dont les muscles squelettiques, lisses et cardiaque ainsi que la rate et les poumons. Néanmoins, il possède une activité nettement moindre (mais détectable) dans le foie au sein duquel il pourrait être soumis à une répression de nature épigénétique. C'est donc un promoteur à considérer sérieusement pour une expression à large spectre tout en évitant une expression hépatique.

b) En ce qui concerne la **diminution du nombre de copies de transgène entre 2 et 8 semaines pi dans les muscles injectés** (**Fig. 42**) et dans un moindre mesure dans le foie (**Fig. 41**) des souris B6, nous avons déjà observé une tendance similaire chez les primates ayant reçu le vecteur ss AAV 2/1 pRSV LEA29Y ([Toromanoff 2008](#) et résultats non présentés). Néanmoins, chez les NHP ce message était moins évident probablement car il est plus complexe de traiter un échantillon représentatif d'un muscle de primate, alors que dans le cas des souris la moitié du muscle injecté a été utilisée pour chaque extraction d'ADN.

Nous n'excluons pas la possibilité d'une surestimation de la quantité de génome de vecteur à 2 semaines pi. En effet, à ce temps précoce après injection, il est possible d'envisager la présence de particules virales (i) dans la cellule mais n'ayant pas atteint les noyaux des fibres musculaires, (ii) « piégées » dans la matrice extracellulaire endo-ou périnysiale ou (iii) circulant

dans le sang. Enfin, (iv) il est également possible que nous détectons des génomes recombinants ayant transduits des cellules sanguines PBMC présentes dans le muscle au moment du prélèvement. Les points (i) et (ii) sont assez difficiles à vérifier dans le muscle. Une étude menée au laboratoire chez le gros animal avait montré la présence de particules AAVr intactes dans les cellules photoréceptrices de la rétine 6 ans après injection sous rétinienne. Bien qu'une éventuelle persistance des particules dans la matrice intra ou extra-cellulaire du muscle n'a jamais été mise en évidence plus de quelques heures après injection IM ([Xiao 2012](#)), la possibilité d'un piégeage des particules dans ces structures ne peut être écartée. En ce qui concerne le point (iii) plusieurs études réalisées au laboratoire dont certaines ont été publiées ([Toromanoff 2008](#), [Ni 2011](#) et communications internes) indiquent chez le primate et le chien ayant reçu une dose similaire ( $=1^{E12}$  à  $6^{E12}$  vg/kg) d'AAV 2/1 ou 2/8 que la quantité de vecteur génome détecté dans le sérum des animaux est négligeable à partir de 2 semaines pi. Nous prévoyons tout de même une vérification par QPCR dans nos souris pour lesquelles des échantillons de sérum ont été prélevés. Enfin, pour le point (iv) bien qu'il soit difficile d'éliminer une potentielle contamination par des cellules sanguines transduites, il s'avère que malgré une persistance à long terme la quantité de vg/hdg est généralement faible dans ces cellules circulantes chez les primates et les chiens ayant reçu des doses de vecteurs équivalentes ( $<1$  vg/hdg) ([Favre 2001](#), [Manno 2006](#) et communications internes). Cela ne devrait pas participer à une éventuelle surévaluation du nombre de vg/hdg sachant que dans les muscles injectés de nos souris nous avons obtenu des valeurs comprises entre 2 à 8 vg/hdg (**Fig. 42**)

Si on estime que le biais induit par la possible détection de génome recombinant à l'extérieur du noyau est négligeable, il existe d'autres hypothèses pouvant également rendre compte de la diminution du nombre vg au cours du temps : une élimination physique de certains génomes au sein du noyau ou après export dans le cytoplasme ainsi que la possibilité évoquée par Sun *et al* chez le primate (mais pas chez la souris) d'un réarrangement progressif des génomes recombinants qui pourrait s'accompagner de la perte de la région de détection par QPCR ([Sun 2010b](#)). L'élimination de génome simple brin non converti aurait également pu être considérée, mais étant donné le fait que la diminution du nombre de copies est également observée dans les mêmes conditions avec un vecteur scAAV, cela ne semble pas être le cas (**Fig. 42**).

Enfin il est également possible qu'une réponse immunitaire cytotoxique contre les cellules exprimant le transgène puisse provoquer une destruction de ces dernières et en conséquence une

diminution du nombre de copies de génome de vecteur. Néanmoins, dans notre cas cette hypothèse semble assez peu probable pour 2 raisons : Premièrement, les résultats publiés par Toromanof *et al* suggèrent que chez le primate que dans le cas d'une réponse T cytotoxique, les fibres musculaires exprimant le plus fortement le transgène apporté par un AAVr sont marquées préférentiellement par un anticorps anti-MHCI ([Toromanoff 2010](#)). Or, dans notre cas on observe une augmentation globale du niveau d'expression malgré la perte de vg, ce qui serait difficilement possible si les cellules exprimant le plus fortement le transgène étaient éliminées par réponse T. Deuxièmement, sur quelques-unes de nos souris B6 les résultats préliminaires obtenus par nos collaborateurs de l'UMR703 par immunomarquage montrent la présence d'infiltrats inflammatoires à proximité des fibres qui expriment fortement la GFP. Ces infiltrats contiennent seulement de rares cellules CD8+, médiateurs de la réponse T cytotoxique. Toutes les souris de notre étude cinétique doivent être analysées par immuno-histologie pour vérifier ces conclusions préliminaires.

Les différentes hypothèses évoquées précédemment reflètent la complexité de tirer un message clair de l'évolution du nombre de copies de génome recombinant au cours du temps. S'il est possible de limiter l'implication de certaines possibilités (particules circulantes et réponse T), il n'en demeure pas moins que cette diminution est certainement multifactorielle et pourrait résulter à la fois d'une surestimation par des particules n'ayant pas transduit les noyaux musculaires et d'une probable élimination de formes génomiques instables d'AAVr au cours du temps.

**c) L'augmentation significative de l'activité transcriptionnelle spécifique du génome recombinant dans le muscle des souris ayant reçu un ssAAV entre 2 et 8 semaines pi** est une information de première importance pour ce projet, dans lequel il est question de corrélérer les différences d'activité transcriptionnelle du transgène avec son éventuelle modulation par des mécanismes épigénétiques. L'évaluation du niveau d'expression du transgène au niveau ARNm plutôt qu'au niveau protéique nous a permis de nous affranchir d'éventuelles régulations traductionnelles et post traductionnelles. Néanmoins, la quantité d'ARNm détecté en RT-QPCR n'est pas uniquement le reflet de la régulation transcriptionnelle, mais également de phénomènes post-transcriptionnels qui peuvent influencer la stabilité des messagers. La modulation de l'expression du transgène apporté par un vecteur viral au cours du temps par ce type de

mécanisme n'a toutefois jamais été mise en évidence. Nous avons choisi en connaissance de cause d'utiliser la RT-QPCR en faisant l'approximation que le niveau d'ARNm transgénique par copie de transgène dans un tissu transduit ne dépend que de l'activité transcriptionnelle du génome recombinant.

A un niveau global d'expression du transgène, une augmentation de la quantité relative d'ARNm transgénique est observée dans le muscle entre 2 et 8 semaines pi (**Fig. 46**). Il semble que ce soit également le cas pour le niveau d'expression de protéine GFP observée en microscopie à fluorescence (**Fig. 44**). Cette observation est en accord avec ce qui a déjà été rapporté par d'autres équipes dans le muscle murin avec un vecteur ssAAV ([Ren 2005](#)). En normalisant la quantité relative d'ARNm transgénique par le nombre de copies de transgène on obtient l'activité transcriptionnelle spécifique du génome recombinant (à l'approximation précédemment citée). Dans le muscle injecté, cette activité augmente de façon significative entre 2 et 8 semaines pi pour les souris ayant reçu un ssAAV 2/8 mais pas pour celle ayant reçu un vecteur scAAV. L'hypothèse qui paraît la plus évidente pour expliquer cette différence est le retard d'expression des vecteurs ss causé par une conversion lente du génome simple brin en double brin comme cela a déjà été montré auparavant ([Wang 2003](#), [Ren 2005](#)) Lacaze *et al* ont montré dans le muscle de souris injecté avec un ssAAV 2 qu'il est encore possible de détecter une faible quantité de génome simple brin jusqu'à 1 mois pi ([Vincent-Lacaze 1999](#)). De façon intéressante, les auteurs notent dans cette même période une diminution du nombre de vg/hdg et une augmentation de l'expression du transgène. Malgré l'utilisation de techniques maintenant obsolètes, car relativement peu sensibles et non tissu spécifiques, ces résultats corrélaient de façon remarquable avec les nôtres. Enfin, les auteurs de cette même étude suggèrent que l'assemblage progressif des génomes double brin monomériques en structures de haut poids moléculaire dans le muscle de souris pourrait être associé à une stabilisation des génomes recombinants sous une forme transcriptionnellement active. L'augmentation de l'activité spécifique des génomes recombinant observés entre 2 et 8 semaines pourrait donc résulter non seulement de la conversion des génomes simple brin en double brin, mais également de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle consécutive à la stabilisation des génomes AAVr sous formes monomériques circulaires et concatémériques. Bien que cela n'ait jamais été mis en évidence, il est possible que cette stabilisation soit associée à l'évolution lente depuis un environnement chromatinien initialement peu favorable vers un profil transcriptionnel plus permissif.

**d)** Il semble que **les génomes recombinants portent à la fois des HPTM associées typiquement à des régions réprimées.** Les résultats ont été obtenus par la technique de ChIP qui bien que présentant de nombreuses limitations reste la seule qui permette ce type d'analyse. Il est indispensable de disposer d'anticorps de spécificité élevée contre la protéine ou la modification d'histone recherchée. Il existe à l'heure actuelle de nombreux anticorps commercialisés de grade « ChIP » mais ils sont de qualité hétérogène. En ce qui nous concerne, nous avons choisi des anticorps ciblant des épitopes courants pour lesquelles les fournisseurs disposent généralement de plus de recul : (i) l'histone H3 canonique qui reflète la densité en histone généralement plus importante dans les régions réprimées, (ii) H3K4me2 qui est une HPTM caractéristique de régions promotrices transcrites ou permissives et (iii) H3K9me3 enrichies dans les régions réprimées de façon constitutive (**Fig. 31**). Nous n'avons pas vérifié la spécificité des anticorps en interne, mais nous nous sommes systématiquement renseignés auprès des fournisseurs pour vérifier les tests de spécificité et de réactivité croisée avec les autres HPTM ainsi que les études publiées ayant utilisé ces anticorps. D'après les données que nous avons recueillies, tous les anticorps qui ont été utilisés dans cette étude présentent un haut degré de spécificité. Il faut tout de même noter que l'anticorps anti-H3K9me3 interagit légèrement avec H3K27me3. Bien que H3K9me3 soit plutôt associé à la répression constitutive alors que H3K27me3 est plutôt une marque de répression transitoire, cette réactivité croisée n'est pas une réelle gêne car les 2 HPTM sont des marques enrichies dans les régions de chromatine réprimée. Nous utilisons également un anticorps irrelevant ciblant un IgG de poulet, qui est sensé indiquer le bruit de fond de l'immunoprécipitation. Comme cela est visible sur la **Fig. 49** le signal généré par cet anticorps est généralement supérieur au bruit de fond des QPCR ciblant le pRSV et le transgène GFP, ce qui indique une immunoprécipitation non spécifique par l'anticorps. Ce contrôle n'est évidemment pas idéal car il faudrait disposer d'un anticorps de contrôle de spécificité et d'efficacité équivalente aux autres anticorps utilisés pour le ChIP ce qui n'est pas vérifiable. La plupart du temps dans les travaux publiés ce contrôle n'est pas présenté, mais en ce qui nous concerne nous avons jugé qu'il était important de disposer d'une telle condition.

Nous avons tenté de limiter autant que possible les variations expérimentales en utilisant 2 niveaux de normalisation. Le premier niveau permet de s'affranchir du nombre de copies de la séquence cible dans le volume initial en normalisant par la quantité totale de cibles présentes. Il existe 2 possibilités pour calculer ce ratio, la plus utilisée est une normalisation par rapport à un

aliquot de référence qui ne subit par le protocole immunoprécipitation (% input). La seconde est une normalisation pour chaque condition d'immunoprécipitation par la quantité détectée dans la fraction non liée à l'anticorps. Nous avons choisi cette deuxième méthode, qui bien que plus laborieuse (elle demande 2 fois plus d'extraction d'ADN) tient compte de la variabilité inter-immunoprécipitations (Cf. calcul dans section **IV.2.e**). Le second niveau de normalisation est un ratio entre la région d'intérêt (pRSV ou GFP) et une région génique endogène portant la marque recherchée pour chaque échantillon individuellement. Pour H3K4me2, nous avons utilisé le gène de la myoglobine qui est actif dans le muscle. Pour H3K9me3 nous avons normalisé avec le satellite Su5 murin qui est un élément LINE réprimé. La quantité de H3 qui doit normalement être plus forte pour les régions réprimées est normalisée par Su5 également. La quantité du transgène et des contrôles endogènes sont réalisées sur le même échantillon immunoprécipité, ce qui permet de limiter les effets des variations expérimentales inter-échantillons telles que la quantité initiale de chromatine ainsi que l'efficacité de l'immunoprécipitation et de purification de l'ADN.

Malgré des variations entre échantillons assez importantes et le faible nombre d'animaux analysés pour le moment, nos résultats préliminaires obtenus pour les souris B6 ayant reçu un vecteur ssAAV montrent un même profil pour le promoteur et le transgène portés par le génome recombinant. Ce profil est caractérisé par une densité en histone canonique H3 similaire aux contrôles endogènes Su5 et MB sur le génome recombinant (ratio proche de 1). Ce premier point est cohérent avec les résultats d'une étude précédente menée au laboratoire qui indiquait un espacement des histones sur le génome recombinant équivalent à la chromatine endogène dans le muscle de primate ([Penaud Budloo 2008](#)). En plus d'être un indicateur de la qualité de la manipulation de la chromatine ce résultat représente la première preuve directe d'une association entre le génome de l'AAVr et une histone cellulaire *in vivo*.

Nous détectons également la présence simultanée des HPTM H3K9me3 et H3K4me3 à des taux supérieurs aux contrôles endogènes respectifs. Avant normalisation par les contrôles endogènes, pour chaque échantillon, les valeurs obtenues sont toujours supérieures à celles de l'anticorps irrelevant et au seuil de sensibilité de la QPCR (**Fig. 49**). En poussant un peu plus loin l'interprétation, il semble que la quantité relative de H3K9me3 diminue entre 2 et 8 semaines alors que celle de H3K4me2 augmente légèrement (**Fig. 50**). Nous sommes tentés d'y voir une évolution d'un profil chromatinien initialement plutôt défavorable à 2 semaines pi vers une

structure plus permissive à 8 semaines pi, ce qui serait en accord avec l'hypothèse évoquée précédemment dans la discussion. Le fait de détecter à la fois les HPTM H3K4me2 et H3K9me3 sur les histones associées au génome de l'AAVr peut paraître contradictoire car elles sont décrites comme étant antagonistes. Il existe des régions de chromatine bivalente dans les génomes des eucaryotes associant à la fois la marque « active » H3K4me2 et la marque « inactive » H3K27me3 qui sont généralement inactives mais promptes à être réactivées ([Bernstein 2006](#)). H3K9me3 est généralement absente de ces zones. Kharchenko *et al* indiquent l'existence d'une couleur de la chromatine (verte) légèrement enrichie à la fois en H3K9me3 et H3K4me2 chez la drosophile, mais le résultat est peu commenté et cet état semble particulièrement rare ([Kharchenko 2011](#)). L'explication la plus simple permettant de rendre compte de la coexistence probable des 2 marques sur le génome de l'AAVr est que les HPTM sont certainement portées par des génomes recombinants différents. Il est donc possible que des génomes rAAV actifs et réprimés coexistent au sein des mêmes tissus. Le muscle squelettique est constitué de plusieurs types cellulaires : fibres musculaires striées, cellules satellites, cellules musculaires lisses en endothéliale des vaisseaux sanguins, cellules nerveuses, cellules immunitaires... Il est possible que le génome adopte une conformation chromatinienne différente en fonction des types cellulaires transduits. Une autre possibilité expliquant la coexistence de génomes réprimés et actifs dans le même tissu est que la forme moléculaire du génome puisse avoir un impact sur son profil chromatinien. Chez la souris et le primate injectés avec un vecteur AAVr, des génomes concatémériques de hauts poids moléculaires apparaissent progressivement au détriment des formes linéaires et circulaires monomériques ([Duan 1998](#), [Vincent-Lacaze 1999](#), [Penaud Budloo 2008](#), [Sun 2010b](#)). A long terme après injection il semble que les formes concatémériques soient prédominantes et qu'elles soient les principales responsables de l'expression stable, bien que cela n'ait jamais été démontré de façon convaincante. Les concatémères seraient-ils enrichis en marques de chromatine active ? Si c'était le cas, cela fournirait une explication élégante à la transition progressive d'un environnement chromatinien répressif vers un état plus permissif que nous semblons observer chez nos souris.

Un autre point intéressant des résultats préliminaires de CHIP est la présence de H3K4me2 à la fois sur le promoteur et sur le cDNA à un ratio 2 à 7 fois supérieur au contrôle endogène. Cette HPTM est décrite comme étant une marque de promoteur actif mais elle n'est habituellement pas retrouvée dans le corps des gènes, qu'ils soient actifs ou non (Cf. **Fig. 31**). De

façon intéressante Riu *et al* avaient montré la présence de H3K4me2 et de H3K9me3 sur le promoteur RSV et sur le transgene hAAT dans le foie de souris 35 jours après administration systémique d'un plasmide nu sans pour autant indiquer le seuil de sensibilité et en l'absence de contrôle endogène ([Riu 2007](#)). Il est possible que dans le cadre de constructions très compactes telles que les cassettes d'expression utilisées en thérapie génique, les HPTM se mettent en place différemment de ce qui est observé sur les gènes endogènes qui s'étalent souvent sur plusieurs dizaines de kb et possèdent généralement des séquences introniques ainsi que de larges régions 5' et 3' UTR. En l'absence de région insulatrice, les HPTM sont capables de se propager sur plusieurs kb par l'intermédiaire de larges complexes protéiques. Par exemple, un complexe associant plusieurs HDAC, SUV39H1 et HP1 peut stabiliser et propager la méthylation de H3K9 aux nucléosomes adjacents, ce qui cause une extension de la région de chromatine réprimée ([Vaute 2002](#)). Etant donné l'absence d'insulator dans le génome de notre AAVr et dans le plasmide utilisé par Riu *et al*, il semble donc logique que la région de quelques kb contenant le promoteur et le transgène puisse porter les mêmes HPTM.

Si les modifications sont capables de se propager sur quelques kb il serait intéressant de savoir si les génomes faisant partie d'un même concatémère sont tous dans un même état épigénétique. Il est intéressant de noter qu'après administration *in vivo* de plasmide nu, la présence de séquences procaryotes peut initier la formation de structure réprimée et sa propagation à tout le plasmide ([Riu 2007](#), [Chen 2008](#)). En outre, 1 à 10% des particules d'AAV contiendraient des séquences contaminantes procaryotes provenant des plasmides de production ([Nony 2004](#), [Allay 2011](#)), ces séquences peuvent être détectées *in vivo* chez l'animal après injection d'AAVr ([Chadeuf 2005](#)). Si elles participent à l'assemblage sous forme concatémériques de telles séquences pourraient-elles entraîner la répression transcriptionnelle de concatémères entiers ? Pour répondre à cette question, il faudrait être capable de séparer les concatémères AAVr des autres formes du génome recombinant tout en préservant la structure particulièrement fragile de la chromatine, puis de réaliser un protocole de CHIP et un séquençage de tous les fragments obtenus pour vérifier la présence de séquences procaryotes... C'est envisageable en théorie, mais malheureusement difficilement réalisable en pratique pour des raisons techniques.

En conclusion, même si le message concernant l'évolution entre 2 et 8 reste à consolider, nos résultats suggèrent néanmoins que certains des génomes recombinants retrouvés dans le

muscle et le foie des souris B6 portent des marques de chromatine répressive jusqu'à au moins 8 semaines pi en quantité apparemment supérieure à ce qui est observé sur un contrôle endogène connu pour être réprimé. Certains génomes recombinants persistants sont-ils réprimés à long terme après injection ? Nous espérons répondre à cette question en continuant l'analyse des autres échantillons que nous avons à disposition.

- **Est-il possible d'extrapoler ces résultats dans d'autres modèles expérimentaux ?**

La question est évidemment fort complexe et dépend de nombreux paramètres tels que (a) l'espèce animale, (b) la nature du tissu transduit, (c) les éléments contenus dans le génome de l'AAVr... Nous disposons toutefois de quelques éléments de réponse détaillés ci-dessous.

a) La souris est un modèle animal présentant de nombreux avantages déjà mentionnés (Cf. **II.1.2.1**) mais on sait par exemple que la réponse immunitaire contre la capsid et le produit du transgène apporté par un AAVr est différente dans les modèles gros animaux. D'autre part, Sun *et al* avait indiqué que les formes moléculaires du génome de l'AAVr présentes dans le foie des NHP semblent plus complexes que celles observées dans le foie murin 3 mois après injection ([Sun 2010b](#)). Il est possible que ces deux paramètres (parmi d'autres) puissent avoir un impact sur la stabilité des génomes et sur le nombre de cellules exprimant le transgène. La cinétique d'expression du transgène après injection d'un AAVr dans le muscle typiquement observée chez la souris montre une augmentation pendant environ 1 mois puis un plateau légèrement décroissant ([Song 2001](#), [Lu 2006](#)), alors que chez le NHP on observe en plus une phase de décroissance marquée entre l'augmentation initiale et le plateau ([Toromanoff 2008](#), [Penaud Budloo 2008](#)). Cette différence dans la cinétique d'expression indique qu'il existe probablement d'avantage de paramètres dans l'équation chez le NHP que chez la souris. Néanmoins, en s'affranchissant des variations du nombre de génomes AAVr, nous avons noté une tendance à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle spécifique du génome recombinant au cours du temps ([Léger 2011](#) et résultats non présentés) comme ce que nous observons chez la souris. Cela est peut-être dû au fait que les mécanismes de régulation épigénétiques du génome sont très conservés parmi les mammifères. En réalité, le fait de disposer d'un modèle animal dans lequel un nombre plus restreint de paramètres influence l'efficacité de transduction en amont ou en aval

de la régulation de la transcription peut être considéré comme un avantage dans notre cas, car cela permet de réduire la complexité qui rendrait l'interprétation encore plus difficile chez les gros animaux.

**b)** Les différences importantes que nous avons observées entre le muscle et le foie chez la souris et le NHP en termes de quantité globale de d'ARNm recombinant, d'activité transcriptionnelle spécifique et peut être également de profil chromatinien chez la souris mettent en évidence le fait qu'il n'est pas possible de tirer un message commun entre ces deux tissus. Il paraît donc difficilement extrapolable à d'autres organes sans exploration préalable.

**c)** Sans parler en termes quantitatifs, nous avons déjà observé lors de la mise au point du protocole de CHIP la présence des mêmes HPTM dans le muscle et le foie de souris à 2, 4, 10 ou 15 jours après injection de différents vecteurs AAV 2/8, ss ou sc, portant les promoteurs RSV, PGK ou CMV. Cela demande évidemment à être confirmé de façon plus approfondie, mais il semblerait que le message qui concerne la présence des HPTM H3K9me3 et H3K4me2 sur le génome d'un ssAAV pRSV GFP ne soit pas restreint à ce seul promoteur. Toutefois, Riu *et al* avaient mis en évidence après administration d'un plasmide nu dans le foie de souris un enrichissement en HPTM répressives sur les constructions portant les promoteurs RSV ou EF1 à 35 jours post transfection, mais pas sur la construction portant le promoteur Ubiquitine C Humain ([Riu 2007](#)). D'autre part, l'insertion de séquences insultrices dans le génome de l'AAVr permet une augmentation significative du niveau d'expression *in vivo* dans le muscle de souris à 4 semaines pi avec les promoteurs EF1 et MCK mais pas avec le pCMV ([Mori-Uchino 2009](#)). Au final, la relation entre promoteurs et influence des mécanismes épigénétiques semble dépendre en partie de la force du promoteur. Le message obtenu dans notre cas avec le promoteur RSV est probablement généralisable à des promoteurs de puissance d'expression équivalente dans les tissus étudiés, par exemple le promoteur CMV, mais demande à être vérifié au préalable.

- **L'altération des mécanismes de régulation épigénétique endogènes dans le muscle dystrophynopathe a-t-elle un effet sur l'expression d'un transgène apporté par un AAVr ?**

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour la DMD mais plusieurs approches de

thérapie génique par complémentation, compensation et saut d'exon à l'aide de vecteurs AAVr sont en cours d'essais précliniques et cliniques ([Pichavant 2011](#)). Au niveau moléculaire de nombreuses perturbations métaboliques sont décrites dans ce muscle squelettique humain et murin déficient en dystrophine et nous savons depuis peu que la régulation des mécanismes épigénétiques endogènes est également sévèrement perturbée ([Colussi 2009](#), [Acharyya 2010](#)). Les études de transcriptome montrent en parallèle la modification de l'expression de nombreux gènes impliqués notamment dans la myogenèse, l'adhésion cellulaire et même de certaines protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine ([Haslett 2002](#), [Pescatori 2007](#), [Pallafacchina 2010](#)). De façon intéressante, une étude publiée par Snyder *et al* en 1997 a montré dans un modèle murin de régénération musculaire chimio-induit par le BaCl<sub>2</sub> que le nombre de fibres transduites et l'intensité d'expression du transgène sont considérablement réduits de 2 à 26 semaines après injection d'un ssAAV 2 CMV-LacZ en comparaison à ce qui est observé pour le contrôle sain ([Snyder 1997](#)). Bien que la nature de la lésion soit différente, le génome des muscles en régénération subit comme celui des muscles déficients en dystrophine de profonds remaniements épigénomiques ([Palacios 2010](#)). Si une régénération chimio-induite ponctuelle a un impact sur l'expression du génome recombinant, qu'en est-il du muscle déficient en dystrophine qui est en permanence en dégénérescence/régénération ?

Pour répondre à cette question nous avons monté une étude parallèle à celle réalisée avec les souris B6 dans un modèle murin de la DMD (mdx<sup>4cv</sup>) grâce à une collaboration avec les départements de bio-expérimentation et d'immunomarquage de GENETHON (Evry). (a) Premièrement, la mesure de l'anisocytose dans le muscle de nos souris mdx<sup>4cv</sup> nous indique qu'à l'échelle globale l'atteinte musculaire est installée au début du protocole et aggravée à la fin. En outre, la sévérité de l'atteinte ne semble pas être influencée par l'administration du vecteur AAVr en comparaison avec le groupe contrôle PBS (**Fig. 40A** et **Fig. 40B**). (b) Deuxièmement, nos analyses moléculaires indiquent qu'entre 2 et 8 semaines pi la quantité de génomes recombinants est significativement plus faible dans le muscle des souris mdx en comparaison à celui des souris B6 « saines » (**Fig. 42**) et (c) que malgré une augmentation modeste de l'activité transcriptionnelle par copie (**Fig. 48**), la quantité générale d'ARNm transgénique diminue de façon significative (**Fig. 46**). (d) Bien que les analyses épigénétiques n'aient pas encore été réalisées sur ces souris certains indices suggèrent une possible implication de l'altération des mécanismes épigénétiques endogènes dans cette diminution.

**a) L'anisocytose élevée dans le muscle de nos souris mdx<sup>4cv</sup>** indique une hétérogénéité générale de la taille des fibres musculaires similaire à celle mesurée dans le modèle mdx ([Briguet 2004](#)) et évoluant pendant la durée du protocole entre l'âge de 5-7 semaines et de 13-15 semaines comme cela a été documenté par Marie-Noëlle Lucas pour le modèle mdx ([Lucas 2004 thèse ENVN](#)) (**Fig. 40B**). L'anisocytose est une mesure de l'atteinte musculaire prenant en compte de nombreux paramètres : fibres en nécrose, en régénération et hypertrophiées, infiltration de cellules immunes, fibrose... Elle est donc un bon indicateur global de la pathologie musculaire, mais ne permet pas de distinguer avec précision une éventuelle exacerbation locale de la pathologie. Les résultats que nous obtiendrons avec le marquage MHCd devraient nous permettre de confirmer ou d'infirmer les observations obtenues par la mesure de l'anisocytose, tout en se focalisant uniquement sur les fibres en régénération. Il n'est néanmoins pas exclu que l'injection d'un AAVr ne puisse pas avoir un effet local difficile à évaluer avec ces 2 techniques, par exemple en provoquant une inflammation au niveau de fibres musculaires exprimant fortement le transgène. Afin de documenter précisément un éventuel effet de l'AAVr, la réaction inflammatoire et la réponse immunitaire seront également étudiée par immunomarquage des cellules immunes dans les muscles des souris mdx<sup>4cv</sup> et B6

**b) Le nombre de copies de vg est significativement plus faible dans le muscle des souris mdx<sup>4cv</sup> que dans celui des souris B6**, d'un facteur 2x à 2 semaines pi et d'environ 7x à 8 semaines pi (**Fig. 42**). Dans un souci de transparence, il est important de rappeler que les injections du vecteur ssAAV se sont déroulées sur 2 sites (B6 à Nantes et mdx<sup>4cv</sup> à GENETHON) et que cela pourrait avoir un effet sur les différences observées entre les 2 séries. Pour limiter au maximum l'introduction de variation à ce niveau, un protocole détaillé a été communiqué pour harmoniser les injections sur les 2 sites et les ambiguïtés éventuelles ont été largement discutées au préalable. Toutes les souris B6 et mdx<sup>4cv</sup> ont reçu un vecteur AAVr provenant d'une seule production et les aliquots décongelés pour être injectés aux animaux n'ont jamais été recongelés pour être ré-administrés par la suite. D'autre part, comme cela devrait être systématiquement considéré quand une lignée congénique est comparée à une autre il ne faut pas exclure un éventuel effet de la différence du fond génétique entre la lignée [C57B/6J](#) et la lignée [C57BL/6Ros.Cg-Dmd<sup>mdx-4cv</sup>](#).

En estimant que les 2 biais évoqués ont un effet négligeable sur les résultats il est encore possible d'expliquer la différence du nombre de copies d'au moins 2 façons mutuellement non exclusives : La première possibilité est que le muscle dystrophynopathe est moins permissif à la transduction par les particules d'AAV, par exemple à cause du contexte inflammatoire du muscle, de la présence de débris des fibres nécrotiques ou encore de l'altération du trafic intracellulaire des particules. Il est également possible que les fibres transduites dégèrent au cours du temps et sont remplacées par de nouvelles fibres ce qui pourrait provoquer une perte des copies des génomes recombinants AAV par dilution progressive visible dès 2 semaines pi.

En ce qui concerne la diminution significative du nombre de copies entre 2 et 8 semaines, les mêmes hypothèses que celles précédemment développées pour le muscle des souris B6 peuvent être évoquées. La perte est toutefois nettement plus forte pour les souris mdx ( $\approx 9x$ ) que pour les souris B6 ( $\approx 2,5x$ ). Des facteurs dépendants du contexte pathologique dans le muscle dystrophynopathe interviennent donc certainement dans cette perte de génomes recombinants au cours du temps. L'explication qui semble la plus logique est la possibilité précédemment évoquée d'une élimination progressive des vg par dégénérescence des fibres musculaires transduites. En conclusion, les différents résultats que nous avons obtenus nous amènent à penser que la stabilité du vecteur rAAV **non thérapeutique** (i.e. GFP) est significativement plus faible dans le muscle mdx que dans le muscle des souris B6.

**c) La quantité totale d'ARNm transgénique diminue de façon significative dans le muscle des souris mdx<sup>4cv</sup> entre 2 et 8 semaines** après injection d'un ssAAV (**Fig. 46**) alors qu'en parallèle on observe dans le groupe B6 une légère augmentation de la quantité d'ARNm malgré une hétérogénéité plus forte entre les animaux. De plus, la quantité relative de messenger recombinant dans le muscle des souris mdx<sup>4cv</sup> est en moyenne 4 fois plus faible à 2 semaines pi que dans le muscle sain et 36 fois plus faible à 8 semaines. Nous attendons avec impatience les résultats de quantification de la GFP par histologie des muscles des souris mdx<sup>4cv</sup> pour pouvoir confronter nos résultats de RT-QPCR. Même s'il est tentant de penser que le transgène s'exprime moins dans le muscle dystrophynopathe que dans le muscle B6, il faut mettre en parallèle le fait que la quantité de génomes viraux est également plus faible, particulièrement à 8 semaines pi. Pour s'affranchir de ce paramètre le RQ est normalisé par nombre de copies de génome recombinant pour chaque animal individuellement de la même façon que pour les souris B6 pour

obtenir l'activité transcriptionnelle spécifique des génomes recombinants (**Fig. 48**). Dans le muscle des souris B6 et mdx<sup>4cv</sup> une augmentation significative de cette valeur est observée entre 2 et 8 semaines pi. A 2 semaines pi aucune différence n'est visible entre le muscle sain et dystrophynopathe, par contre à 8 semaines pi l'activité transcriptionnelle spécifique est 4 fois plus faible pour les souris mdx. Pour résumer, non seulement la stabilité des génomes recombinants est plus faible dans le muscle murin déficient en dystrophine que dans le muscle sain mais en plus à 8 semaine pi les génomes restants sont moins exprimés.

L'augmentation de l'activité transcriptionnelle spécifique du génome recombinant entre 2 et 8 semaines chez la souris mdx<sup>4cv</sup> peut certainement être reliée à la conversion progressive du génome simple brin en double brin mais étant donné le fait qu'il n'atteint pas le niveau observé chez la souris B6, il est possible que cette synthèse du second brin soit plus lente voire même soumise à une restriction. En l'état actuel des connaissances, la cinétique de conversion du génome AAVr simple brin en double brin n'est pas connue dans le muscle déficient en dystrophine, mais il serait intéressant de l'évaluer par Southern Blot à partir de l'ADN extrait de nos souris. Toutefois, le faible nombre de copies de génome recombinant par cellule risque de rendre la détection difficile. Une autre solution serait d'injecter un vecteur scAAV à un nouveau groupe de souris mdx<sup>4cv</sup> ou d'ajouter un groupe injecté avec le vecteur ssAAV mais sacrifié à plus long terme pi.

Il est également possible que la conversion double brin ne soit pas affectée mais que les génomes soient dans des conformations moins promptes à être transcrites. Etant donnée la perturbation des mécanismes de réparation de l'ADN dans le muscle déficient en dystrophine ([Schmidt 2011](#)) et le fait que la circularisation, la concatémérisation et l'intégration du génome de l'AAV reposent largement sur ces mécanismes ([Choi 2006](#), [Cervelli 2007](#), [Cataldi 2010](#)), il est intéressant de se demander si le génome de l'AAVr persiste dans le muscle dystrophynopathe sous les mêmes formes moléculaires que celles observées dans le muscle sain. Cela ne serait pas le premier cas de déficience génétique ayant un impact sur la forme moléculaire du génome de l'AAVr. Par exemple chez les souris SCID il a été montré que le génome recombinant persistait principalement sous forme linéaire ([Song 2001](#)). Ce point plaide également en faveur d'une évaluation par Southern blot des formes moléculaires du génome de l'AAVr dans le muscle dystrophynopathe sur nos différents échantillons de souris.

**d)** Enfin, il est également possible que l'environnement épigénétique associé aux génomes recombinants soit différent et peut être moins favorable dans le muscle des souris mdx<sup>4cv</sup> en comparaison au muscle des souris B6. Bien que nous n'ayons pour le moment réalisé aucune analyse épigénétique, plusieurs indications nous orientent vers cette possibilité. Tout d'abord, nos résultats préliminaires obtenus chez la souris B6 suggèrent une corrélation entre l'évolution de l'activité transcriptionnelle spécifique et la signification des modifications des histones présentes sur le génome de l'AAVr. Deuxièmement, les mécanismes de régulation épigénétiques sont perturbés dans le muscle dystrophynopathe et de nombreux gènes se retrouvent sous- ou surexprimés ([Haslett 2002](#), [Pescatori 2007](#), [Pallafacchina 2010](#)). En théorie, cela pourrait avoir un impact sur l'expression du génome recombinant.

- **Les différents résultats obtenus chez la souris dystrophynopathe ont-ils un sens chez le patient humain DMD ?**

Sans parler des limitations inhérentes à l'extrapolation de résultats dans une autre espèce animale évoquées précédemment, la pathologie chez la souris dystrophynopathe est décrite comme étant moins sévère que celle du patient humain DMD, notamment en ce qui concerne l'inflammation et la perte progressive de fibres musculaires (Cf. **I.5.3**). La possibilité d'obtenir une efficacité de transduction plus élevée dans un muscle dont la dégénérescence, l'inflammation et les altérations métaboliques sont plus sévères semble improbable, mais ne doit tout de même pas être exclue. Néanmoins, en toute logique la limitation de l'efficacité de transduction par l'AAVr imputable à la maladie observée chez la souris mdx<sup>4cv</sup> devrait être au moins aussi importante, voire davantage chez les patients DMD. A terme, une des perspectives du projet est d'évaluer ces perturbations dans le modèle canin GRMD ([Banks 2008](#)), qui reproduit de façon plus fidèle la pathologie humaine. En ce qui concerne un éventuel impact de l'altération des mécanismes épigénétiques sur la diminution de l'activité transcriptionnelle spécifique du génome recombinant, la dérégulation de l'activité des HDAC dans le muscle dystrophynopathe a été mise en évidence à la fois chez la souris mdx mais également chez l'homme à partir de biopsie de patient DMD et BMD ([Colussi 2009](#)).

- **Comment contrecarrer un éventuel effet négatif des mécanismes épigénétiques cellulaires sur l'expression du génome recombinant ?**

La perturbation des mécanismes épigénétiques dans le muscle déficient en dystrophine a été caractérisée de façon détaillée en ce qui concerne l'activation des HDAC. Par exemple, nous savons que l'activité des HDAC de classe II diminue par export cytoplasmique ce qui entraîne une expression anormale et désynchronisée de nombreux gènes impliqués dans le programme myogénique ([Colussi 2009](#)). Au contraire l'activité des HDAC généralistes de classe I augmente considérablement. L'administration journalière de HDACi spécifiques des histones de classe I (Entinostat) chez la souris mdx est associée à une restauration structurale et fonctionnelle spectaculaire ce qui suggère que certains gènes sont probablement réprimés de façon aberrante dans le muscle dystrophynopathe par cette classe de HDAC ([Minetti 2006](#), [Colussi 2008](#)). En ce qui concerne le génome de l'AAVr, une étude *in vitro* avait montré que l'administration d'un HDACi de classe I disposant d'une AMM (Romidepsine) et d'un vecteur recombinant permet une augmentation importante du niveau d'expression du transgène dans des cellules tumorales ([Okada 2006](#)). Les cellules cancéreuses sont d'ordinaire plutôt réfractaires à la transduction par l'AAVr, le contexte est donc particulier et il semble difficile d'extrapoler ce travail *in vivo* dans des tissus non tumoral. Néanmoins il est intéressant de noter que dans le muscle déficient en dystrophine les HDAC de classe I sont suractivées et que cette même classe de HDAC peut dans des conditions particulières exercer un effet négatif sur l'efficacité d'expression d'un transgène porté par le génome de l'AAVr. Que se passerait-il si un HDACi de classe I était administré conjointement à un AAVr portant un transgène thérapeutique dans un muscle déficient en dystrophine ? Peut-on attendre un double effet bénéfique à la fois directement sur la pathologie musculaire et sur l'efficacité d'expression du transgène ?

De toute évidence, la réponse à ces questions dépendra des modifications épigénétiques portées par le génome recombinant *in vivo* dans le muscle. Notre premier objectif est donc de caractériser le profil épigénétique du génome AAVr dans le muscle dystrophynopathe. D'après les résultats préliminaires de CHIP obtenus dans le muscle sain et sachant que les génomes recombinants semblent moins activement transcrits, il est probable que nous trouvions également la présence de la marque répressive H3K9me sur le génome de l'AAVr dans le muscle dystrophynopathe. Nous souhaitons également vérifier la présence de méthylation de l'ADN, car

même s'il ne paraît pas y avoir de méthylation sur le promoteur RSV dans le muscle sain, dans ce contexte de perturbation épigénétique il semble également que l'activité des DNMT soit affectée ([Acharyya 2010](#), [O'Hagan 2011](#)).

En fonction des modifications épigénétiques qui seront détectées sur le génome de l'AAVr, la prochaine tâche du projet consistera à administrer un ou plusieurs CMD adaptés et spécifiques à de nouveaux groupes de souris saines ou dystrophynopathes de façon à : (i) augmenter l'expression du transgène porté par le génome recombinant par mise en place d'un environnement épigénétique plus permissif, (ii) « préparer » le muscle dystrophynopathe à recevoir un vecteur AAV dans des conditions plus favorables du point de vue histopathologique et surtout (iii) limiter autant que possible (« *Primum non nocere* ») les effets aspécifiques indésirables des CMD.

Si la présence de la marque H3K9me3 est confirmée, nous envisageons l'administration de la Chaetocin conjointement à l'injection de l'AAVr. Cet inhibiteur de HMT est spécifique de la lysine méthyl-transférase Suv39h qui est l'enzyme majoritaire impliquée dans la mise en place de cette HPTM (Cf. **I.4.1.c**). Bien que la Chaetocin ait été récemment développée et soit encore au stade préclinique il a été montré qu'elle permet la réexpression de gènes suppresseurs de tumeur *in vivo* chez la souris sans effet secondaire notable ([Lee 2011](#)) ainsi que la sortie de latence de provirus HIV recombinant *in vitro* ([Bernhard 2011](#)). Si nous détectons la présence de méthylation de l'ADN sur le promoteur porté par le génome de l'AAVr dans le muscle dystrophynopathe, il serait pertinent d'adjoindre un inhibiteur de DNMT comme par exemple l'Azacytidine ou la Decitabine disposant tous les deux d'une AMM (Cf. **I.4.1.a**). Enfin dans le muscle dystrophynopathe un traitement préalable avec un HDACi pendant un ou deux mois avec administration du vecteur recombinant pourrait permettre une restauration structurale et fonctionnelle temporaire, qui permettrait d'apporter un génome recombinant dans un contexte musculaire et épigénétique peut être plus favorable ([Minetti 2006](#), [Colussi 2008](#)) (Cf. **I.4.1.b**). Parmi les HDACi candidats qui semblerait être les plus adaptés nous envisageons l'utilisation de la Romidepsine qui dispose d'une AMM et/ou de l'Entinostat qui est seulement en phase II mais qui est plus spécifique.

- **L'instabilité des génomes décrits dans le muscle dystrophinopathe peut-elle augmenter la fréquence d'intégration de génome de l'AAVr dans le génome cellulaire ?**

La fréquence d'intégration du génome de l'AAVr dans le génome de la cellule hôte dans différents tissus de souris et de primate a déjà été documentée à plusieurs reprises (Cf. p - 35 -) ([Inagaki 2007](#), [Li 2011](#), [Nowrouzi 2012](#)). Elle est généralement décrite comme étant faible et associée à un risque de mutagenèse insertionnelle limité même à de fortes doses (Cf. **I.3.1.b**). Un possible lien entre mutagenèse insertionnelle et administration d'un AAVr *in vivo* chez la souris a été publié en 2007 ([Donsante 2007](#)) mais le vecteur a été administré en néonatal à très forte dose. Il est possible que le fait d'administrer le vecteur dans des organes encore en développement ait participé à la carcinogénèse. Il est intéressant de noter que les études visant à déterminer la fréquence d'intégration *in vivo* ont été menées uniquement dans des modèles animaux sains. A terme, les produits de thérapie génique sont pourtant destinés à des patients humains porteurs de maladies souvent associées à des modifications importantes du métabolisme cellulaire. Il n'est pas rare qu'une augmentation du stress oxydatif soit observée dans les cellules malades, comme c'est le cas par exemple dans la sclérose latérale amyotrophique, les maladies de Huntington, Parkinson et Alzheimer ainsi que la DMD ([Pacher 2007](#), [Colussi 2009](#)). Or, il a été montré qu'un stress oxydatif élevé peut provoquer une oxydation des bases azotées de l'ADN pouvant elles-mêmes être responsables d'une mutagenèse aléatoire et de cassures double et simple brin dans le génome cellulaire ([Kennedy 1997](#), [Burney 1999](#), [Niles 2005](#)) (Cf. **I.5.6.1**). Des marqueurs indiquent que ces phénomènes se déroulent effectivement dans les noyaux des cellules musculaires déficientes en dystrophine murine et humaine ([Coutlon 1992](#), [Nakae 2005](#), [Schmidt 2011](#)). Ce qui est particulièrement intéressant (ou inquiétant en fonction du point de vue) c'est que la fréquence d'intégration du génome d'un vecteur AAVr peut être significativement augmentée *in vitro* dans des cellules humaines en induisant artificiellement des cassures dans l'ADN de la cellule hôte ([Miller 2004](#), [Gellhaus 2010](#)). Tout laisse à supposer que dans le muscle dystrophinopathe la fréquence d'intégration pourrait être supérieure à celle décrite dans un contexte sain. A l'heure où les premiers essais cliniques de thérapie génique avec un vecteur AAV débutent, il semblerait particulièrement judicieux de réévaluer rapidement le risque de mutagenèse insertionnelle à différentes doses de vecteur dans le muscle déficient en dystrophine

afin d'être en mesure d'apporter des informations qui pourraient se révéler capitales pour les essais cliniques en cours et à venir. Nous nous proposons de répondre à cette question en évaluant la fréquence d'intégration dans le muscle de nos souris mdx<sup>4cv</sup> soit par LAM-PCR en collaboration avec l'équipe de Manfred Schmidt (Heidelberg) avec qui nous avons déjà travaillé ([Nowrouzi 2012](#)), soit par une méthode alternative qui pourrait être développée au laboratoire en collaboration avec la société Ceeram (La Chapelle / Erdre).

Pour résumer, nos résultats suggèrent que le niveau d'expression des vecteurs AAVr *in vivo* dans le muscle et le foie de souris « saines » pourrait être influencé par la présence de modifications d'histones sur le génome recombinant qui sont typiquement associées à des régions chromatinienne réprimées. Il est possible que des génomes recombinants actifs et réprimés puissent coexister 8 semaines après administration d'un vecteur AAVr. Dans le muscle murin déficient en dystrophine les génomes de l'AAVr semblent être moins stables au cours du temps et s'expriment moins efficacement que dans le muscle sain, ce qui laisse envisager une synthèse du second brin moins efficace et/ou une répression à un niveau épigénétique. Les modifications épigénétiques et les formes moléculaires des génomes recombinants dans le muscle des souris dystrophynopathes doivent être étudiées pour apporter une réponse à cette question. D'autre part, il nous semble également intéressant d'évaluer la fréquence d'intégration du génome de l'AAVr dans le génome de la cellule hôte, dans ce muscle au sein duquel la stabilité génomique est altérée. Enfin en fonction de la nature des modifications épigénétiques présentes sur les génomes de l'AAVr en contexte sain et pathologique, nous projetons d'utiliser des modificateurs chromatinien adaptés pour contrebalancer une éventuelle répression de la transcription et stabiliser la structure du muscle dystrophynopathe avant injection de l'AAVr. Dans l'idéal, nous espérons proposer à terme une méthode d'amélioration de l'activité spécifique des vecteurs AAVr tout en s'assurant de l'innocuité du produit applicable aux essais cliniques, notamment pour le traitement des dystrophies musculaires. Quelques soient les conclusions de l'étude, elle apportera dans tous les cas des informations critiques sur la pharmacologie moléculaire des vecteurs AAVr qui font aujourd'hui en partie défaut aux agences réglementaires (AFSSAPS, EMEA, FDA...).

## VI Bibliographie

---



Brute-ua

## A

- Acharyya, S. et al. TNF Inhibits Notch-1 in Skeletal Muscle Cells by Ezh2 and DNA Methylation Mediated Repression: Implications in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS ONE* 5, e12479 (2010).
- Acharyya, S. et al. Interplay of IKK/NF- $\kappa$ B signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Clinical Investigation* 117, 889–901 (2007).
- Adams, D. *The hitchhiker's guide to the galaxy*. (Ballantine Books: 1995).
- Akache, B. et al. The 37/67-Kilodalton Laminin Receptor Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of Virology* 80, 9831–9836 (2006).
- Aker, M. et al. Extended core sequences from the cHS4 insulator are necessary for protecting retroviral vectors from silencing position effects. *Hum. Gene Ther.* 18, 333–343 (2007).
- Alazard, N., Gruffat, H., Hiriart, E., Sergeant, A. & Manet, E. Differential Hyperacetylation of Histones H3 and H4 upon Promoter-Specific Recruitment of EBNA2 in Epstein-Barr Virus Chromatin. *Journal of Virology* 77, 8166–8172 (2003).
- Alazard-Dany, N. et al. Definition of Herpes Simplex Virus Type 1 Helper Activities for Adeno-Associated Virus Early Replication Events. *PLoS Pathogens* 5, e1000340 (2009).
- Alderton, J. M. & Steinhardt, R. A. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J. Biol. Chem.* 275, 9452–9460 (2000).
- Allay, J. A. et al. Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial. *Hum. Gene Ther.* 22, 595–604 (2011).
- Allen, D. G. & Whitehead, N. P. Duchenne muscular dystrophy--what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 290–294 (2011).
- Amrani, N. et al. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432, 112–118 (2004).
- Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250 (2004).
- André, F. M. et al. Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum. Gene Ther.* 19, 1261–1271 (2008).
- Arechavaleta-Velasco, F., Ma, Y., Zhang, J., McGrath, C. M. & Parry, S. Adeno-Associated Virus-2 (AAV-2) Causes Trophoblast Dysfunction, and Placental AAV-2 Infection Is Associated with Preeclampsia. *The American Journal of Pathology* 168, 1951–1959 (2006).
- Argyros, O. et al. Persistent episomal transgene expression in liver following delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector. *Gene Ther.* 15, 1593–1605 (2008).
- Arruda, V. R., Favaro, P. & Finn, J. D. Strategies to Modulate Immune Responses: A New Frontier for Gene Therapy. *Molecular Therapy* 17, 1492–1503 (2009).
- Asokan, A. et al. Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nature Biotechnology* 28, 79–82 (2009).
- Asokan, A., Schaffer, D. V. & Jude Samulski, R. The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads. *Mol. Ther.* 20, 699–708 (2012).
- Atchinson, R. W., Casto, B. C. & Hammon, W. M. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149, 754–756 (1965).
- Austin, R. C., Howard, P. L., D'Souza, V. N., Klamut, H. J. & Ray, P. N. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1475–1483 (1995).
- Avedillo Díez, I. et al. Development of novel efficient SIN vectors with improved safety features for

Wiskott-Aldrich syndrome stem cell based gene therapy. *Mol. Pharm.* 8, 1525–1537 (2011).

- Ayuso, E. et al. High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther.* 17, 503–510 (2010).
- Balamotis, M. A., Huang, K. & Mitani, K. Efficient delivery and stable gene expression in a hematopoietic cell line using a chimeric serotype 35 fiber pseudotyped helper-dependent adenoviral vector. *Virology* 324, 229–237 (2004).

## B

- Banerjee, T. & Chakravarti, D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 31, 4858–4873 (2011).
- Banks, G. B. & Chamberlain, J. S. The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. *Curr. Top. Dev. Biol.* 84, 431–453 (2008).
- Bannister, A. J. et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120–124 (2001).
- Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* 21, 381–395 (2011).
- Bantel-Schaal, U., Braspenning-Wesch, I. & Kartenbeck, J. Adeno-associated virus type 5 exploits two different entry pathways in human embryo fibroblasts. *J. Gen. Virol.* 90, 317–322 (2009).
- Bantel-Schaal, U., Hub, B. & Kartenbeck, J. Endocytosis of Adeno-Associated Virus Type 5 Leads to Accumulation of Virus Particles in the Golgi Compartment. *J. Virol.* 76, 2340–2349 (2002).
- Barth, T. K. & Imhof, A. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends Biochem. Sci.* 35, 618–626 (2010).
- Bartlett, J. S., Wilcher, R. & Samulski, R. J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 74, 2777–2785 (2000).
- Batchelor, C. L. & Winder, S. J. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* 16, 198–205 (2006).
- Beastro, N. et al. mdx(5cv) mice manifest more severe muscle dysfunction and diaphragm force deficits than do mdx Mice. *Am. J. Pathol.* 179, 2464–2474 (2011).
- Beck, S. E. et al. Deposition and expression of aerosolized rAAV vectors in the lungs of Rhesus macaques. *Mol. Ther.* 6, 546–554 (2002).
- Bell, A. C. & Felsenfeld, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405, 482–485 (2000).
- Bellinger, A. M. et al. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nature Medicine* 15, 325–330 (2009).
- Ben-Asher, E., Bratosin, S. & Aloni, Y. Intracellular DNA of the parvovirus minute virus of mice is organized in a minichromosome structure. *Journal of Virology* 41, 1044 (1982).
- Bennett, J. et al. AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci Transl Med* 4, 120ra15 (2012).
- Bencicelli, J. et al. Reversal of Blindness in Animal Models of Leber Congenital Amaurosis Using Optimized AAV2-mediated Gene Transfer. *Molecular Therapy* 16, 458–465 (2008).
- Bernhard, W. et al. The Suv39H1 methyltransferase inhibitor chaetocin causes induction of integrated HIV-1 without producing a T cell response. *FEBS Lett.* 585, 3549–3554 (2011).
- Berns, K. I. Parvovirus replication. *Microbiological Reviews* 54, 316 (1990).
- Berns, K. I. & Adler, S. Separation of Two Types of Adeno-Associated Virus Particles Containing Complementary Polynucleotide Chains. *Journal of Virology* 9, 394 (1972).
- Bernstein, B. E. et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326 (2006).

- Berto, E., Bozac, A. & Marconi, P. Development and application of replication-incompetent HSV-1-based vectors. *Gene Ther.* 12 Suppl 1, S98–102 (2005).
- Bessis, N., GarciaCozar, F. J. & Boissier, M.-C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* 11 Suppl 1, S10–17 (2004).
- Bevan, A. K. et al. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol. Ther.* 19, 1971–1980 (2011).
- Bhatnagar, S. & Kumar, A. Therapeutic targeting of signaling pathways in muscular dystrophy. *Journal of Molecular Medicine* 88, 155–166 (2009).
- Bhaumik, S. R., Smith, E. & Shilatifard, A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1008–1016 (2007).
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G. & Carroll, D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161, 1169 (2002).
- Binny, C. et al. AAV-mediated gene transfer in the perinatal period results in expression of FVII at levels that protect against fatal spontaneous hemorrhage. *Blood* 119, 957–966 (2012).
- Bish, L. T. et al. Long-term systemic myostatin inhibition via liver-targeted gene transfer in golden retriever muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 22, 1499–1509 (2011).
- Bish, L. T., Sweeney, H. L., Müller, O. J. & Bekeredjian, R. Adeno-associated virus vector delivery to the heart. *Methods Mol. Biol.* 807, 219–237 (2011).
- Blackburn, S. D., Steadman, R. A. & Johnson, F. B. Attachment of adeno-associated virus type 3H to fibroblast growth factor receptor 1. *Arch. Virol.* 151, 617–623 (2006).
- Blaese, M. & Anderson, F. The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum. Gene Ther.* 1, 327–362 (1990).
- Blaese, R. M. et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475–480 (1995).
- Bleker, S., Sonntag, F. & Kleinschmidt, J. A. 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. *Journal of Virology* 79, 2528–2540 (2005).
- Bockstael, O., Foust, K. D., Kaspar, B. & Tenenbaum, L. Recombinant AAV delivery to the central nervous system. *Methods Mol. Biol.* 807, 159–177 (2011).
- Boehmer, P. E. & Lehman, I. R. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 347–384 (1997).
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. & Lipton, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7162 (1995).
- Bonvicini, F., Manaresi, E., Di Furio, F., De Falco, L. & Gallinella, G. Parvovirus B19 DNA CpG Dinucleotide Methylation and Epigenetic Regulation of Viral Expression. *PLoS ONE* 7, e33316 (2012).
- Booy, F. P. et al. Liquid-crystalline, phage-like packing of encapsidated DNA in herpes simplex virus. *Cell* 64, 1007–1015 (1991).
- Bouard, D., Alazard-Dany, N. & Cosset, F.-L. Viral vectors: from virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology* 157, 153–165 (2009).
- Bouchet-Marquis, C., Dubochet, J. & Fakan, S. Cryoelectron microscopy of vitrified sections: a new challenge for the analysis of functional nuclear architecture. *Histochem. Cell Biol.* 125, 43–51 (2006).
- Boutin, S. et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum. Gene Ther.* 21, 704–712 (2010).
- Bowles, D. E. et al. Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational

optimized AAV vector. *Mol. Ther.* 20, 443–455 (2012).

- Boxler, K. & Jerusalem, F. Hyperreactive (hyaline, opaque, dark) muscle fibers in Duchenne dystrophy. A biopsy study of 16 dystrophy and 205 other neuronmuscular disease cases and controls. *J. Neurol.* 219, 63–72 (1978).
- Boyle, M. P. et al. Effect of adeno-associated virus-specific immunoglobulin G in human amniotic fluid on gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 14, 365–373 (2003).
- Brand-Saberi, B. & Christ, B. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. *Cell Tissue Res.* 296, 199–212 (1999).
- Brantly, M. L. et al. Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16363–16368 (2009).
- Braun, S. Naked plasmid DNA for the treatment of muscular dystrophy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 6, 499–505 (2004).
- Bresolin, N. et al. Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 4, 359–369 (1994).
- Briguët, A., Courdier-Fruh, I., Foster, M., Meier, T. & Magyar, J. P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul. Disord.* 14, 675–682 (2004).
- Brister, J. R. & Muzyczka, N. Mechanism of Rep-Mediated Adeno-Associated Virus Origin Nicking. *Journal of Virology* 74, 7762 (2000).
- Broberg, E. K. & Hukkanen, V. Immune response to herpes simplex virus and gamma134.5 deleted HSV vectors. *Curr Gene Ther* 5, 523–530 (2005).
- Brooks, A. R. et al. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6, 395–404 (2004).
- Brun, S., Faucon-Biguët, N. & Mallet, J. Optimization of transgene expression at the posttranscriptional level in neural cells: implications for gene therapy. *Mol. Ther.* 7, 782–789 (2003).
- Buchwalow, I. B. et al. Nitric oxide synthase in muscular dystrophies: a re-evaluation. *Acta Neuropathol.* 111, 579–588 (2006).
- Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. & Moore, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 1189 (1984).
- Buller, R. M. L., Janik, J. E., Sebring, E. D. & Rose, J. A. Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Completely Help Adenovirus-Associated Virus Replication. *Journal of Virology* 40, 241 (1981).
- Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S. & Hallek, M. Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *The Journal of Gene Medicine* 10, 717–733 (2008).
- Burguete, T. et al. Evidence for Infection of the Human Embryo with Adeno-Associated Virus in Pregnancy. *Hum. Reprod.* 14, 2396–2401 (1999).
- Burnett, J. R. & Hooper, A. J. Alipogene tiparvovec, an adeno-associated virus encoding the Ser(447)X variant of the human lipoprotein lipase gene for the treatment of patients with lipoprotein lipase deficiency. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11, 681–691 (2009).
- Burney, S., Caulfield, J. L., Niles, J. C., Wishnok, J. S. & Tannenbaum, S. R. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* 424, 37–49 (1999).
- Burns, W. R., Zheng, Z., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. Lack of specific  $\gamma$ -retroviral vector long terminal repeat promoter silencing in patients receiving genetically engineered lymphocytes and activation upon lymphocyte restimulation. *Blood* 114, 2888–2899 (2009).
- Bushby, K. M., Thambyayah, M. & Gardner-Medwin, D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 337, 1022–1024 (1991).

## C

- Campan, M., Weisenberger, D. J., Trinh, B. & Laird, P. W. MethyLight. *Methods Mol. Biol.* 507, 325–337 (2009).
- Campbell, T. L. Reflections on research and the future of medicine. *Science* 153, 442–449 (1966).
- Capasso, M. et al. Possible role for nitric oxide dysregulation in critical illness myopathy. *Muscle Nerve* 37, 196–202 (2008).
- Caron, C., Col, E. & Khochbin, S. The viral control of cellular acetylation signaling. *Bioessays* 25, 58–65 (2003).
- Cartier, N. et al. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818–823 (2009).
- Catalá, A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the ‘Fluid Mosaic Model’ to the ‘Lipid Whisker Model’. *Biochimie* 94, 101–109 (2012).
- Cataldi, M. P. & McCarty, D. M. Differential Effects of DNA Double-Strand Break Repair Pathways on Single-Strand and Self-Complementary Adeno-Associated Virus Vector Genomes. *Journal of Virology* 84, 8673–8682 (2010).
- Caterino, T. L. & Hayes, J. J. Structure of the H1 C-terminal domain and function in chromatin condensation. *Biochem. Cell Biol.* 89, 35–44 (2011).
- Cedar, H., Solage, A., Glaser, G. & Razin, A. Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI. *Nucleic Acids Research* 6, 2125 (1979).
- Cervelli, T. et al. Processing of recombinant AAV genomes occurs in specific nuclear structures that overlap with foci of DNA-damage-response proteins. *J. Cell. Sci.* 121, 349–357 (2008).
- Chadeuf, G., Ciron, C., Moullier, P. & Salvetti, A. Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adeno-associated virus production and their in vivo persistence after vector delivery. *Mol. Ther.* 12, 744–753 (2005).
- Chaib, H. et al. Anti-leukemia activity of chaetocin via death receptor-dependent apoptosis and dual modulation of the histone methyl-transferase SUV39H1. *Leukemia* 26, 662–674 (2012).
- Chamberlain, J. S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D. & Faulkner, J. A. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J.* 21, 2195–2204 (2007).
- Chapman, V. M., Miller, D. R., Armstrong, D. & Caskey, C. T. Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 1292 (1989).
- Chejanovsky, N. & Carter, B. J. Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication. *Virology* 173, 120–128 (1989).
- Chen, W. Y., Bailey, E. C., McCune, S. L., Dong, J.-Y. & Townes, T. M. Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5798 (1997).
- Chen, W. Y. & Townes, T. M. Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin condensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 377 (2000).
- Chen, Z. Y., He, C. Y., Meuse, L. & Kay, M. A. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther.* 11, 856–864 (2004).
- Chen, Z.-X., Mann, J. R., Hsieh, C.-L., Riggs, A. D. & Chédin, F. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J. Cell. Biochem.* 95, 902–917 (2005).
- Chen, Z.-Y., He, C.-Y., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result

- in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol. Ther.* 8, 495–500 (2003).
- Chen, Z.-Y., Riu, E., He, C.-Y., Xu, H. & Kay, M. A. Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol. Ther.* 16, 548–556 (2008).
  - Cheng, X. & Blumenthal, R. M. Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective. *Structure* 16, 341–350 (2008).
  - Choi, V. W., McCarty, D. M. & Samulski, R. J. Host Cell DNA Repair Pathways in Adeno-Associated Viral Genome Processing. *Journal of Virology* 80, 10346–10356 (2006).
  - Choi, V. W., Samulski, R. J. & McCarty, D. M. Effects of adeno-associated virus DNA hairpin structure on recombination. *J. Virol.* 79, 6801–6807 (2005).
  - Chung, J. H., Bell, A. C. & Felsenfeld, G. Characterization of the chicken  $\beta$ -globin insulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 575 (1997).
  - Clark, K. R., Voulgaropoulou, F., Fraley, D. M. & Johnson, P. R. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* 6, 1329–1341 (1995).
  - Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. & Frommer, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research* 22, 2990 (1994).
  - Cohen, S., Behzad, A. R., Carroll, J. B. & Panté, N. Parvoviral Nuclear Import: Bypassing the Host Nuclear-Transport Machinery. *J Gen Virol* 87, 3209–3213 (2006).
  - Cohen, S. & Panté, N. Pushing the Envelope: Microinjection of Minute Virus of Mice into Xenopus Oocytes Causes Damage to the Nuclear Envelope. *J Gen Virol* 86, 3243–3252 (2005).
  - Coker, A. L. et al. Adeno-Associated Virus Is Associated with a Lower Risk of High-Grade Cervical Neoplasia. *Experimental and Molecular Pathology* 70, 83–89 (2001).
  - Collas, P. The state-of-the-art of chromatin immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.* 567, 1–25 (2009).
  - Colussi, C. et al. HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 19183–19187 (2008).
  - Colussi, C. et al. Nitric oxide deficiency determines global chromatin changes in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J.* 23, 2131–2141 (2009).
  - Comeron, J. M. Selective and Mutational Patterns Associated With Gene Expression in Humans: Influences on Synonymous Composition and Intron Presence. *Genetics* 167, 1293–1304 (2004).
  - Copeland, R. A., Olhava, E. J. & Scott, M. P. Targeting epigenetic enzymes for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 14, 505–510 (2010).
  - Copeland, R. A., Solomon, M. E. & Richon, V. M. Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 8, 724–732 (2009).
  - Cornelio, F. & Dones, I. Muscle fiber degeneration and necrosis in muscular dystrophy and other muscle diseases: cytochemical and immunocytochemical data. *Ann. Neurol.* 16, 694–701 (1984).
  - Cornu, T. I. & Cathomen, T. Quantification of zinc finger nuclease-associated toxicity. *Methods Mol. Biol.* 649, 237–245 (2010).
  - Cotmore, S. F., Gottlieb, R. L. & Tattersall, P. Replication Initiator Protein NS1 of the Parvovirus Minute Virus of Mice Binds to Modular Divergent Sites Distributed throughout Duplex Viral DNA. *Journal of Virology* 81, 13015–13027 (2007).
  - Coulton, G. R., Rogers, B., Strutt, P., Skynner, M. J. & Watt, D. J. In situ localisation of single-stranded DNA breaks in nuclei of a subpopulation of cells within regenerating skeletal muscle of the dystrophic mdx mouse. *J. Cell. Sci.* 102 ( Pt 3), 653–662 (1992).
  - Cox, G. A., Phelps, S. F., Chapman, V. M. & Chamberlain, J. S. New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nat. Genet.* 4, 87–93 (1993).

- Crosbie, R. H. NO vascular control in Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* 7, 27–29 (2001).
- Cullen, B. R. Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Therapy* 13, 503–508 (2005).
- Cullen, M. J. & Jaros, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.* 77, 69–81 (1988).
- Cullen, M. J. & Mastaglia, F. L. Morphological changes in dystrophic muscle. *Br. Med. Bull.* 36, 145–122 (1980).
- Cumming, W. J. & Hudgson, P. Morphometric comparison of Duchenne’s muscular dystrophy and experimental bupivacaine myopathy. *Acta Neuropathol Suppl* 7, 305–307 (1981).
- Dahl, J. A. & Collas, P. A rapid micro chromatin immunoprecipitation assay (microChIP). *Nat Protoc* 3, 1032–1045 (2008).

## D

- Dangain, J. & Vrbova, G. Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve* 7, 700–704 (1984).
- Danko, I., Chapman, V. & Wolff, J. A. The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Res.* 32, 128–131 (1992).
- Darquet, A. M. et al. Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Ther.* 6, 209–218 (1999).
- Davey, C. A., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W. & Richmond, T. J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 319, 1097–1113 (2002).
- Daya, S., Cortez, N. & Berns, K. I. Adeno-Associated Virus Site-Specific Integration Is Mediated by Proteins of the Nonhomologous End-Joining Pathway. *Journal of Virology* 83, 11655–11664 (2009).
- Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development* 25, 1010–1022 (2011).
- Deaton, A. M. et al. Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Research* 21, 1074–1086 (2011).
- Deconinck, A. E. et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 717–727 (1997).
- Decressac, M., Mattsson, B., Lundblad, M., Weikop, P. & Björklund, A. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of  $\alpha$ -synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol. Dis.* 45, 939–953 (2012).
- Denby, L., Nicklin, S. A. & Baker, A. H. Adeno-associated virus (AAV)-7 and -8 poorly transduce vascular endothelial cells and are sensitive to proteasomal degradation. *Gene Ther.* 12, 1534–1538 (2005).
- Denti, M. A. et al. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum. Gene Ther.* 17, 565–574 (2006).
- Derrigo, M., Cestelli, A., Savettieri, G. & Di Liegro, I. RNA-protein interactions in the control of stability and localization of messenger RNA (review). *Int. J. Mol. Med.* 5, 111–123 (2000).
- Desguerre, I. et al. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 762–773 (2009).
- Desjarlais, J. R. & Berg, J. M. Use of a zinc-finger consensus sequence framework and specificity rules to design specific DNA binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 2256 (1993).
- Dhalluin, C. et al. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491–496 (1999).

- Di Pasquale, G. et al. Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat. Med.* 9, 1306–1312 (2003).
- Dillon, N. Heterochromatin structure and function. *Biol. Cell* 96, 631–637 (2004).
- Dimitri, P. et al. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118, 419–435 (2009).
- Ding, W., Zhang, L., Yan, Z. & Engelhardt, J. F. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther.* 12, 873–880 (2005).
- Ding, W., Zhang, L. N., Yeaman, C. & Engelhardt, J. F. rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion. *Mol. Ther.* 13, 671–682 (2006).
- Doerfler, W. Epigenetic consequences of foreign DNA insertions: de novo methylation and global alterations of methylation patterns in recipient genomes. *Rev. Med. Virol.* 21, 336–346 (2011).
- Doerig, C., McMaster, G., Sogo, J., Bruggmann, H. & Beard, P. Nucleoprotein complexes of minute virus of mice have a distinct structure different from that of chromatin. *Journal of Virology* 58, 817 (1986).
- Dokmanovic, M., Clarke, C. & Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol. Cancer Res.* 5, 981–989 (2007).
- Donsante, A. et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317, 477 (2007).
- Dorigo, B. et al. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 306, 1571–1573 (2004).
- Douar, A.-M., Poulard, K., Stockholm, D. & Danos, O. Intracellular Trafficking of Adeno-Associated Virus Vectors: Routing to the Late Endosomal Compartment and Proteasome Degradation. *Journal of Virology* 75, 1824–1833 (2001).
- Drew, H. R., Lockett, L. J. & Both, G. W. Increased Complexity of Wild-Type Adeno-Associated Virus–chromosomal Junctions as Determined by Analysis of Unselected Cellular Genomes. *J Gen Virol* 88, 1722–1732 (2007).
- Drouet, V. et al. Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann. Neurol.* 65, 276–285 (2009).
- D’Souza, V. N. et al. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* 4, 837–842 (1995).
- Duan, D., Yan, Z., Yue, Y. & Engelhardt, J. F. Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates. *Virology* 261, 8–14 (1999).
- Duan, D., Yue, Y. & Engelhardt, J. F. Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Mol. Ther.* 4, 383–391 (2001).
- Duan, D. et al. Dynamin Is Required for Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Infection. *Journal of Virology* 73, 10371 (1999).
- Duan, D. et al. Circular Intermediates of Recombinant Adeno-Associated Virus Have Defined Structural Characteristics Responsible for Long-Term Episomal Persistence in Muscle Tissue. *Journal of Virology* 72, 8568 (1998).
- Duan, D., Yue, Y. & Engelhardt, J. F. Consequences of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit deficiency on recombinant adeno-associated virus genome circularization and heterodimerization in muscle tissue. *J. Virol.* 77, 4751–4759 (2003).
- Duan, D., Yue, Y., Yan, Z., Yang, J. & Engelhardt, J. F. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *Journal of Clinical Investigation* 105, 1573–1587 (2000).
- Dubrovsky, A. L., Angelini, C., Bonifati, D. M., Pegoraro, E. & Mesa, L. Steroids in muscular dystrophy: where do we stand? *Neuromuscul. Disord.* 8, 380–384 (1998).

- Dudley, R. W. R. et al. Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (mdx) muscles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R704–710 (2006).
- Dutheil, N., Henckaerts, E., Kohlbrenner, E. & Linden, R. M. Transcriptional Analysis of the Adeno-Associated Virus Integration Site. *Journal of Virology* 83, 12512–12525 (2009).
- Düzgünes, N. Sitimagene ceradenovec, a gene therapeutic for the treatment of glioma. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10, 187–195 (2008).

## E

- Eads, C. A. et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 28, e32 (2000).
- Ehmsen, J., Poon, E. & Davies, K. The dystrophin-associated protein complex. *J. Cell. Sci.* 115, 2801–2803 (2002).
- Ehrhardt, A., Xu, H. & Kay, M. A. Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle in vivo. *J. Virol.* 77, 7689–7695 (2003).
- Ellis, B. L., Hirsch, M. L., Porter, S. N., Samulski, R. J. & Porteus, M. H. Zinc-finger nuclease-mediated gene correction using single AAV vector transduction and enhancement by Food and Drug Administration-approved drugs. *Gene Therapy* (2012).doi:10.1038/gt.2011.211
- Ellison, D. Biopsy pathology of muscle. 2nd ed. Michael Swash and Martin Schwartz. Chapman & Hall, London, 1991. No. of pages: 237. Price: £50. ISBN: 0 412 34880 2. *The Journal of Pathology* 166, 421–421 (2005).
- Eltsov, M., MacLellan, K. M., Maeshima, K., Frangakis, A. S. & Dubochet, J. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 19732–19737 (2008).
- Emery, A. E. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul. Disord.* 1, 19–29 (1991).
- Emery, A. E. H. The muscular dystrophies. *Lancet* 359, 687–695 (2002).
- Eoff, R. L., Choi, J.-Y. & Guengerich, F. P. Mechanistic Studies with DNA Polymerases Reveal Complex Outcomes following Bypass of DNA Damage. *Journal of Nucleic Acids* 2010, 1–12 (2010).
- Erles, K., Seböková, P. & Schlehofer, J. R. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J. Med. Virol.* 59, 406–411 (1999).
- Ernst, J. et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* 473, 43–49 (2011).
- Ervasti, J. M. & Campbell, K. P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122, 809–823 (1993).
- Escors, D. & Breckpot, K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 58, 107–119 (2010).
- Evans, N. P., Misyak, S. A., Robertson, J. L., Bassaganya-Riera, J. & Grange, R. W. Dysregulated intracellular signaling and inflammatory gene expression during initial disease onset in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil* 88, 502–522 (2009).

## F

- Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351–379 (2010).
- Fagone, P. et al. Systemic errors in quantitative polymerase chain reaction titration of self-complementary adeno-associated viral vectors and improved alternative methods. *Hum Gene Ther Methods* 23, 1–7 (2012).
- Fan, S. et al. Valproic acid enhances gene expression from viral gene transfer vectors. *J. Virol.*

Methods 125, 23–33 (2005).

- Farr, G. A. Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 17148–17153 (2005).
- Fattori, E. et al. Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. *J Gene Med* 7, 228–236 (2005).
- Favaro, P. et al. Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol. Ther.* 17, 1022–1030 (2009).
- Favaro, P. et al. Safety of liver gene transfer following peripheral intravascular delivery of adeno-associated virus (AAV)-5 and AAV-6 in a large animal model. *Hum. Gene Ther.* 22, 843–852 (2011).
- Favre, D. et al. Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol. Ther.* 4, 559–566 (2001).
- Feng, S., Jacobsen, S. E. & Reik, W. Epigenetic Reprogramming in Plant and Animal Development. *Science* 330, 622–627 (2010).
- Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T. & Samulski, R. J. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology* 70, 3227 (1996).
- Ferrer, A., Foster, H., Wells, K. E., Dickson, G. & Wells, D. J. Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins. *Gene Therapy* 11, 884–893 (2004).
- Fields, P. A. et al. Risk and prevention of anti-factor IX formation in AAV-mediated gene transfer in the context of a large deletion of F9. *Mol. Ther.* 4, 201–210 (2001).
- Fillion, G. J. et al. Systematic Protein Location Mapping Reveals Five Principal Chromatin Types in *Drosophila* Cells. *Cell* 143, 212–224 (2010).
- Finch, J. T. & Klug, A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1897 (1976).
- Finn, J. D. et al. Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction. *Mol. Ther.* 18, 135–142 (2010).
- Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811 (1998).
- Fischer, A. C. et al. Successful transgene expression with serial doses of aerosolized rAAV2 vectors in rhesus macaques. *Mol. Ther.* 8, 918–926 (2003).
- Fischle, W. et al. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116–1122 (2005).
- Fisher, K. J. et al. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *Journal of Virology* 70, 520 (1996).
- Fiskus, W. et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 114, 2733–2743 (2009).
- Flanagan, J. M. Host epigenetic modifications by oncogenic viruses. *British Journal of Cancer* 96, 183–188 (2006).
- Flotte, T. R. et al. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J. Biol. Chem.* 268, 3781–3790 (1993).
- Flotte, T. R. et al. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum. Gene Ther.* 15, 93–128 (2004).
- Flotte, T. R. et al. Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing  $\alpha$ 1-

antitrypsin: interim results. *Hum. Gene Ther.* 22, 1239–1247 (2011).

- Foster, H. et al. Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 gene transfer. *Mol. Ther.* 16, 1825–1832 (2008).
- Foust, K. D. et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotechnol.* 27, 59–65 (2009).
- Francois, A. et al. The Cellular TATA Binding Protein Is Required for Rep-Dependent Replication of a Minimal Adeno-Associated Virus Type 2 p5 Element. *Journal of Virology* 79, 11082–11094 (2005).
- Friedmann, T., Rabin, O. & Frankel, M. S. Ethics. Gene doping and sport. *Science* 327, 647–648 (2010).
- Frisbee, J. C. Reduced nitric oxide bioavailability contributes to skeletal muscle microvessel rarefaction in the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R307–R316 (2005).
- Frommer, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1827 (1992).
- Fudenberg, G. & Mirny, L. A. Higher-order chromatin structure: bridging physics and biology. *Current opinion in genetics & development* (2012). doi:10.1016/j.gde.2012.01.006
- Fujiki, K., Kano, F., Shiota, K. & Murata, M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biology* 7, 38 (2009).
- Fujita, N. et al. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 278, 24132–24138 (2003).
- Fuks, F. et al. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* 278, 4035–4040 (2003).
- Fuso, A. et al. Changes in Presenilin 1 gene methylation pattern in diet-induced B vitamin deficiency. *Neurobiol. Aging* 32, 187–199 (2011).
- Fussner, E., Ching, R. W. & Bazett-Jones, D. P. Living without 30nm chromatin fibers. *Trends Biochem. Sci.* 36, 1–6 (2011).

## G

- Gaetano, C. et al. Transcriptionally active drugs improve adenovirus vector performance in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 7, 1624–1630 (2000).
- Gal-Yam, E. N., Saito, Y., Egger, G. & Jones, P. A. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu. Rev. Med.* 59, 267–280 (2008).
- Gao, G. P. et al. High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus. *Hum. Gene Ther.* 9, 2353–2362 (1998).
- Gao, G. et al. Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *Journal of Virology* 78, 6381–6388 (2004).
- Gao, G.-P. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 11854–11859 (2002).
- Gao, G.-P. et al. High-Level Transgene Expression in Nonhuman Primate Liver with Novel Adeno-Associated Virus Serotypes Containing Self-Complementary Genomes. *Journal of Virology* 80, 6192–6194 (2006).
- Gao, G. et al. Adeno-associated virus-mediated gene transfer to nonhuman primate liver can elicit destructive transgene-specific T cell responses. *Hum. Gene Ther.* 20, 930–942 (2009).

- Gardner, K. E., Allis, C. D. & Strahl, B. D. Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *J. Mol. Biol.* 409, 36–46 (2011).
- Gaspar, H. B. et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364, 2181–2187 (2004).
- Geib, T. & Hertel, K. J. Restoration of Full-Length SMN Promoted by Adenoviral Vectors Expressing RNA Antisense Oligonucleotides Embedded in U7 snRNAs. *PLoS ONE* 4, e8204 (2009).
- Geiman, T. M. & Muegge, K. DNA methylation in early development. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 105–113 (2010).
- Gellhaus, K., Cornu, T. I., Heilbronn, R. & Cathomen, T. Fate of recombinant adeno-associated viral vector genomes during DNA double-strand break-induced gene targeting in human cells. *Hum. Gene Ther.* 21, 543–553 (2010).
- Gerlach, B., Kleinschmidt, J. A. & Böttcher, B. Conformational changes in adeno-associated virus type 1 induced by genome packaging. *J. Mol. Biol.* 409, 427–438 (2011).
- Gervásio, O. L., Whitehead, N. P., Yeung, E. W., Phillips, W. D. & Allen, D. G. TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. *J. Cell. Sci.* 121, 2246–2255 (2008).
- Gibney, E. R. & Nolan, C. M. Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)* 105, 4–13 (2010).
- Girod, A. et al. The VP1 Capsid Protein of Adeno-Associated Virus Type 2 Is Carrying a Phospholipase A2 Domain Required for Virus Infectivity. *J Gen Virol* 83, 973–978 (2002).
- Gissel, H. The role of Ca<sup>2+</sup> in muscle cell damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1066, 166–180 (2005).
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493–1505 (2006).
- Gold, R., Meurers, B., Reichmann, H., Kress, W. & Müller, C. R. Duchenne muscular dystrophy: evidence for somatic reversion of the mutation in man. *J. Neurol.* 237, 494–495 (1990).
- Goll, M. G. & Bestor, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481–514 (2005).
- Goll, M. G. et al. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311, 395–398 (2006).
- Gonçalves, M. A. F. V. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol. J.* 2, 43 (2005).
- Gong, Z. & Zhu, J.-K. Active DNA demethylation by oxidation and repair. *Cell Res.* 21, 1649–1651 (2011).
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I. & Howard, B. H. The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 6777 (1982).
- Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., Schümperli, D. & Kole, R. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4929 (1998).
- Goudy, K. S., Wang, B. & Tisch, R. Gene gun-mediated DNA vaccination enhances antigen-specific immunotherapy at a late preclinical stage of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Clin. Immunol.* 129, 49–57 (2008).
- Goyenvalle, A. et al. Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *Science* 306, 1796–1799 (2004).
- Grady, R. M. et al. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 729–738 (1997).
- Graff, J. R., Herman, J. G., Myöhänen, S., Baylin, S. B. & Vertino, P. M. Mapping patterns of CpG

island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J. Biol. Chem.* 272, 22322–22329 (1997).

- Gram, G. J., Nielsen, S. D. & Hansen, J. E. Spontaneous silencing of humanized green fluorescent protein (hGFP) gene expression from a retroviral vector by DNA methylation. *J. Hematother* 7, 333–341 (1998).
- Gray, S. J. et al. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum. Gene Ther.* 22, 1143–1153 (2011).
- Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E. & Imhof, A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat. Chem. Biol.* 1, 143–145 (2005).
- Grieger, J. C., Johnson, J. S., Gurda-Whitaker, B., Agbandje-McKenna, M. & Samulski, R. J. Surface-Exposed Adeno-Associated Virus Vp1-NLS Capsid Fusion Protein Rescues Infectivity of Noninfectious Wild-Type Vp2/Vp3 and Vp3-Only Capsids but Not That of Fivefold Pore Mutant Virions. *Journal of Virology* 81, 7833–7843 (2007).
- Grigoryev, S. A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C. L. & Schlick, T. Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 13317–13322 (2009).
- Gücüyener, K., Ergenekon, E., Erbas, D., Pinarli, G. & Serdaroğlu, A. The serum nitric oxide levels in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Brain Dev.* 22, 181–183 (2000).
- Guo, X. & Huang, L. Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Acc. Chem. Res.* (2011).doi:10.1021/ar200151m
- Gupta, R., Nagarajan, A. & Wajapeyee, N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *BioTechniques* 49, iii–xi (2010).

## H

- Hacein-Bey-Abina, S. et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *Journal of Clinical Investigation* 118, 3132–3142 (2008).
- Hacein-Bey-Abina, S. et al. Efficacy of Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *New England Journal of Medicine* 363, 355–364 (2010).
- Hacein-Bey-Abina, S. et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 348, 255–256 (2003).
- Hadaczek, P. et al. Eight years of clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV2-hAADC. *Mol. Ther.* 18, 1458–1461 (2010).
- Haidet, A. M. et al. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4318–4322 (2008).
- Halbert, C. L. et al. Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum. Gene Ther.* 17, 440–447 (2006).
- Hamer, D. H., Smith, K. D., Boyer, S. H. & Leder, P. SV40 recombinants carrying rabbit beta-globin gene coding sequences. *Cell* 17, 725–735 (1979).
- Han, L. et al. High prevalence of adeno-associated virus (AAV) type 2 rep DNA in cervical materials: AAV may be sexually transmitted. *Virus Genes* 12, 47–52 (1996).
- Händel, E.-M. et al. Versatile and efficient genome editing in human cells by combining zinc-finger nucleases with adeno-associated viral vectors. *Hum. Gene Ther.* 23, 321–329 (2012).
- Hansen, J., Qing, K. & Srivastava, A. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J. Virol.* 75, 4080–4090 (2001).

- Hansen, J., Qing, K. & Srivastava, A. Infection of Purified Nuclei by Adeno-associated Virus 2. *Molecular Therapy* 4, 289–296 (2001).
- Happel, N. & Doenecke, D. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431, 1–12 (2009).
- Harding, T. C. et al. Intravenous administration of an AAV-2 vector for the expression of factor IX in mice and a dog model of hemophilia B. *Gene Ther.* 11, 204–213 (2004).
- Harikrishnan, K. N. et al. Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat. Genet.* 37, 254–264 (2005).
- Hasegawa, M. et al. Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 274, 12626–12631 (1999).
- Haslett, J. N. Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 15000–15005 (2002).
- Hauck, B., Zhao, W., High, K. & Xiao, W. Intracellular Viral Processing, Not Single-Stranded DNA Accumulation, Is Crucial for Recombinant Adeno-Associated Virus Transduction. *Journal of Virology* 78, 13678–13686 (2004).
- Haurigot, V. et al. Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs. *Mol. Ther.* 18, 1318–1329 (2010).
- He, S. et al. Inhibition of histone methylation arrests ongoing graft-versus-host disease in mice by selectively inducing apoptosis of alloreactive effector T cells. *Blood* 119, 1274–1282 (2012).
- He, Y.-F. et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303–1307 (2011).
- Henckaerts, E. et al. Site-specific integration of adeno-associated virus involves partial duplication of the target locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 7571–7576 (2009).
- Henikoff, S. Histone modifications: Combinatorial complexity or cumulative simplicity? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 5308–5309 (2005).
- Herbst, F. et al. Extensive Methylation of Promoter Sequences Silences Lentiviral Transgene Expression During Stem Cell Differentiation In Vivo. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* (2012).doi:10.1038/mt.2012.46
- Hermann, A., Schmitt, S. & Jeltsch, A. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 278, 31717–31721 (2003).
- Hermonat, P. L. & Muzyczka, N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 6466 (1984).
- Herzog, R. W., Mount, J. D., Arruda, V. R., High, K. A. & Lothrop, C. D., Jr Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol. Ther.* 4, 192–200 (2001).
- Hildinger, M. et al. Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. *J. Virol.* 75, 6199–6203 (2001).
- Hino, S., Fan, J., Taguwa, S., Akasaka, K. & Matsuoka, M. Sea urchin insulator protects lentiviral vector from silencing by maintaining active chromatin structure. *Gene Ther.* 11, 819–828 (2004).
- Hirose, S. et al. Effect of inhibition of dynein function and microtubule-altering drugs on AAV2 transduction. *Virology* 367, 10–18 (2007).
- Hlavaty, J. et al. Effect of posttranscriptional regulatory elements on transgene expression and virus production in the context of retrovirus vectors. *Virology* 341, 1–11 (2005).
- Hock, R. A., Miller, A. D. & Osborne, W. R. Expression of human adenosine deaminase from various strong promoters after gene transfer into human hematopoietic cell lines. *Blood* 74, 876–881 (1989).

- Hodges, B. L., Taylor, K. M., Joseph, M. F., Bourgeois, S. A. & Scheule, R. K. Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol. Ther.* 10, 269–278 (2004).
- Hoelzer, K., Shackelton, L. A. & Parrish, C. R. Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Research* 36, 2825–2837 (2008).
- Hofmann, A. et al. Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol. Ther.* 13, 59–66 (2006).
- Hölscher, C., Kleinschmidt, J. A. & Bürkle, A. High-level expression of adeno-associated virus (AAV) Rep78 or Rep68 protein is sufficient for infectious-particle formation by a rep-negative AAV mutant. *Journal of Virology* 69, 6880 (1995).
- Hoque, M. et al. Nuclear Transport of the Major Capsid Protein Is Essential for Adeno-Associated Virus Capsid Formation. *Journal of Virology* 73, 7912 (1999).
- Howe, S. J. et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *Journal of Clinical Investigation* 118, 3143–3150 (2008).
- Huang, Y., Shaw, P. G. & Davidson, N. E. Inhibition of histone deacetylases. *Methods Mol. Biol.* 791, 297–311 (2011).
- Huertas, D., Sendra, R. & Muñoz, P. Chromatin dynamics coupled to DNA repair. *Epigenetics* 4, 31–42 (2009).
- Huisinga, K. L., Brower-Toland, B. & Elgin, S. C. R. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* 115, 110–122 (2006).
- Hunter, M. I. & Mohamed, J. B. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chim. Acta* 155, 123–131 (1986).
- Hüser, D. et al. Integration Preferences of Wildtype AAV-2 for Consensus Rep-Binding Sites at Numerous Loci in the Human Genome. *PLoS Pathogens* 6, e1000985 (2010).



- Iannitti, T., Capone, S., Feder, D. & Palmieri, B. Clinical use of immunosuppressants in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Neuromuscul Dis* 12, 1–21 (2010).
- Ihalainen, T. O. et al. Parvovirus Induced Alterations in Nuclear Architecture and Dynamics. *PLoS ONE* 4, e5948 (2009).
- Ikeda, Y. et al. Stable retinal gene expression in nonhuman primates via subretinal injection of SIVagm-based lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 20, 573–579 (2009).
- Illi, B. et al. Nitric oxide modulates chromatin folding in human endothelial cells via protein phosphatase 2A activation and class II histone deacetylases nuclear shuttling. *Circ. Res.* 102, 51–58 (2008).
- Illingworth, R. S. et al. Orphan CpG Islands Identify Numerous Conserved Promoters in the Mammalian Genome. *PLoS Genetics* 6, e1001134 (2010).
- Im, D. S. & Muzyczka, N. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61, 447–457 (1990).
- Im, W. B. et al. Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1149–1153 (1996).
- Inagaki, K. et al. DNA Palindromes with a Modest Arm Length of 20 Base Pairs Are a Significant Target for Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Integration in the Liver, Muscles, and Heart in Mice. *Journal of Virology* 81, 11290–11303 (2007).
- Inagaki, K., Ma, C., Storm, T. A., Kay, M. A. & Nakai, H. The Role of DNA-PKcs and Artemis in Opening Viral DNA Hairpin Termini in Various Tissues in Mice. *Journal of Virology* 81, 11304–11321 (2007).

- Iseki, H. et al. Parvovirus Nonstructural Proteins Induce an Epigenetic Modification through Histone Acetylation in Host Genes and Revert Tumor Malignancy to Benignancy. *Journal of Virology* 79, 8886–8893 (2005).
- Ishiwata, A. et al. Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. *J Gene Med* 11, 1020–1029 (2009).
- Ito, S. et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303 (2011).

## J

- Jacobson, S. G. et al. Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. *Mol. Ther.* 13, 1074–1084 (2006).
- Jammes, H., Junien, C. & Chavatte-Palmer, P. Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 64–74 (2011).
- Jayandharan, G. R., Zhong, L., Li, B., Kachniarz, B. & Srivastava, A. Strategies for improving the transduction efficiency of single-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 15, 1287–1293 (2008).
- Jejurikar, S. S. & Kuzon, W. M., Jr Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis* 8, 573–578 (2003).
- Jiao, S. et al. Direct Gene Transfer into Nonhuman Primate Myofibers In Vivo. *Human Gene Therapy* 3, 21–33 (1992).
- Johnson, J. S. et al. Mutagenesis of Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Protein VP1 Uncovers New Roles for Basic Amino Acids in Trafficking and Cell-Specific Transduction. *Journal of Virology* 84, 8888–8902 (2010).
- Johnson, J. S. & Samulski, R. J. Enhancement of Adeno-Associated Virus Infection by Mobilizing Capsids into and Out of the Nucleolus. *Journal of Virology* 83, 2632–2644 (2008).
- Jost, J.-P. et al. 5-Methylcytosine DNA glycosylase participates in the genome-wide loss of DNA methylation occurring during mouse myoblast differentiation. *Nucleic Acids Research* 29, 4452 (2001).
- Jurkowski, T. P. et al. Human DNMT2 methylates tRNA<sup>Asp</sup> molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA* 14, 1663–1670 (2008).

## K

- Kaludov, N., Brown, K. E., Walters, R. W., Zabner, J. & Chiorini, J. A. Adeno-Associated Virus Serotype 4 (AAV4) and AAV5 Both Require Sialic Acid Binding for Hemagglutination and Efficient Transduction but Differ in Sialic Acid Linkage Specificity. *Journal of Virology* 75, 6884–6893 (2001).
- Kämmer, C. & Doerfler, W. Genomic sequencing reveals absence of DNA methylation in the major late promoter of adenovirus type 2 DNA in the virion and in productively infected cells. *FEBS Lett.* 362, 301–305 (1995).
- Kamper, N. et al. A Membrane-Destabilizing Peptide in Capsid Protein L2 Is Required for Egress of Papillomavirus Genomes from Endosomes. *Journal of Virology* 80, 759–768 (2005).
- Kaneda, Y. Gene therapy: a battle against biological barriers. *Curr. Mol. Med.* 1, 493–499 (2001).
- Kang, W. et al. An efficient rHSV-based complementation system for the production of multiple rAAV vector serotypes. *Gene Ther.* 16, 229–239 (2009).
- Kasai, T. et al. Decreased total nitric oxide production in patients with duchenne muscular dystrophy. *J. Biomed. Sci.* 11, 534–537 (2004).
- Kashiwakura, Y. et al. Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Coreceptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Infection. *Journal of Virology* 79, 609–614 (2004).

- Kass, S. U., Landsberger, N. & Wolffe, A. P. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr. Biol.* 7, 157–165 (1997).
- Katsuyama, T. & Paro, R. Epigenetic reprogramming during tissue regeneration. *FEBS Lett.* 585, 1617–1624 (2011).
- Katzourakis, A. & Gifford, R. J. Endogenous Viral Elements in Animal Genomes. *PLoS Genetics* 6, e1001191 (2010).
- Kay, M. A. et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* 24, 257–261 (2000).
- Keiser, N. W., Yan, Z., Zhang, Y., Lei-Butters, D. C. M. & Engelhardt, J. F. Unique characteristics of AAV1, 2, and 5 viral entry, intracellular trafficking, and nuclear import define transduction efficiency in HeLa cells. *Hum. Gene Ther.* 22, 1433–1444 (2011).
- Kennedy, L. J., Moore, K., Jr, Caulfield, J. L., Tannenbaum, S. R. & Dedon, P. C. Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 386–392 (1997).
- Kent, J. R. et al. During Lytic Infection Herpes Simplex Virus Type 1 Is Associated with Histones Bearing Modifications That Correlate with Active Transcription. *Journal of Virology* 78, 10178–10186 (2004).
- Kharchenko, P. V. et al. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471, 480–485 (2010).
- Kiehl, K., Schlehofer, J. R., Schultz, R., Zugaib, M. & Armbruster-Moraes, E. Adeno-associated virus DNA in human gestational trophoblastic disease. *Placenta* 23, 410–415 (2002).
- Kim, J. K., Samaranayake, M. & Pradhan, S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 596–612 (2008).
- Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1156 (1996).
- Kim, Y. M., Bombeck, C. A. & Billiar, T. R. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ. Res.* 84, 253–256 (1999).
- Kim, Y.-J. et al. Sustained high-level polyclonal hematopoietic marking and transgene expression 4 years after autologous transplantation of rhesus macaques with SIV lentiviral vector-transduced CD34+ cells. *Blood* 113, 5434–5443 (2009).
- Kind, J. & van Steensel, B. Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 320–325 (2010).
- King, J. A., Dubielzig, R., Grimm, D. & Kleinschmidt, J. A. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *The EMBO Journal* 20, 3282–3291 (2001).
- Knipe, D. M. & Cliffe, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 211–221 (2008).
- Kobzik, L., Reid, M. B., Bredt, D. S. & Stamler, J. S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372, 546–548 (1994).
- Komatsu, T., Haruki, H. & Nagata, K. Cellular and viral chromatin proteins are positive factors in the regulation of adenovirus gene expression. *Nucleic Acids Research* 39, 889–901 (2010).
- Kook, S.-H. et al. Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of C2C12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK. *Mol. Cells* 25, 479–486 (2008).
- Kornberg, R. D. & Lorch, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285–294 (1999).
- Kotin, R. M. & Berns, K. I. Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 170, 460–467 (1989).

- Kotin, R. M. Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Mol. Genet.* 20, R2–6 (2011).
- Kozak, M. Features in the 5' non-coding sequences of rabbit alpha and beta-globin mRNAs that affect translational efficiency. *J. Mol. Biol.* 235, 95–110 (1994).
- Kozak, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research* 15, 8125 (1987).
- Kruczek, I. & Doerfler, W. The unmethylated state of the promoter/leader and 5'-regions of integrated adenovirus genes correlates with gene expression. *The EMBO Journal* 1, 409 (1982).
- Kruithof, M. et al. Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 534–540 (2009).
- Kuang, S. & Rudnicki, M. A. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med* 14, 82–91 (2008).
- Kubat, N. J., Amelio, A. L., Giordani, N. V. & Bloom, D. C. The Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript (LAT) Enhancer/rcr Is Hyperacetylated during Latency Independently of LAT Transcription. *Journal of Virology* 78, 12508–12518 (2004).
- Kumar, A. & Boriak, A. M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J.* 17, 386–396 (2003).
- Kumar, A., Takada, Y., Boriak, A. M. & Aggarwal, B. B. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J. Mol. Med.* 82, 434–448 (2004).
- Kutueva, L. I., Ashapkin, V. V. & Vanyushin, B. F. The methylation pattern of a cytosine DNA-methyltransferase gene in *Arabidopsis thaliana* plants. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40, 347–353 (1996).

## L

- Lacasse, J. J. & Schang, L. M. During Lytic Infections, Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Is in Complexes with the Properties of Unstable Nucleosomes. *Journal of Virology* 84, 1920–1933 (2009).
- Ladner, K. J., Caligiuri, M. A. & Guttridge, D. C. Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF-kappa B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *J. Biol. Chem.* 278, 2294–2303 (2003).
- Lalande, M. Parental imprinting and human disease. *Annu. Rev. Genet.* 30, 173–195 (1996).
- Langenbach, K. J. & Rando, T. A. Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle Nerve* 26, 644–653 (2002).
- LaSalle, J. M. The Odyssey of MeCP2 and parental imprinting. *Epigenetics* 2, 5–10 (2007).
- Lavner, Y. & Kotlar, D. Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome. *Gene* 345, 127–138 (2005).
- Lawler, J. M. Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 2161–2170 (2011).
- Le Meur, G. et al. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther.* 14, 292–303 (2007).
- Leberer, C. et al. Gene therapy with novel adeno-associated virus vectors substantially diminishes atherosclerosis in a murine model of familial hypercholesterolemia. *J Gene Med* 6, 663–672 (2004).
- Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Møller, N. P. & Ullrich, A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 4355 (1996).
- Lee, Y.-M., Lim, J.-H., Yoon, H., Chun, Y.-S. & Park, J.-W. Antihepatoma activity of chaetocin due to deregulated splicing of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  pre-mRNA in mice and in vitro. *Hepatology* 53, 171–180 (2011).
- Lee, Y.-B. et al. Increased utility in the CNS of a powerful neuron-specific tetracycline-regulatable

- adenoviral system developed using a post-transcriptional enhancer. *J Gene Med* 7, 576–583 (2005).
- Lefaucheur, J. P., Pastoret, C. & Sebille, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat. Rec.* 242, 70–76 (1995).
  - Léger, A. et al. Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Transgene Expression Is Independent of DNA Methylation in Primate Liver and Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 6, e20881 (2011).
  - Lerch, T. F. & Chapman, M. S. Identification of the heparin binding site on adeno-associated virus serotype 3B (AAV-3B). *Virology* 423, 6–13 (2012).
  - Levy, H. C. et al. Heparin binding induces conformational changes in Adeno-associated virus serotype 2. *Journal of Structural Biology* 165, 146–156 (2009).
  - LeWitt, P. A. et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol* 10, 309–319 (2011).
  - Li, H. et al. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475, 217–221 (2011).
  - Li, H. et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* 117, 3311–3319 (2011).
  - Li, J. et al. Nuclear accumulation of HDAC4 in ATM deficiency promotes neurodegeneration in ataxia telangiectasia. *Nature medicine* (2012).doi:10.1038/nm.2709
  - Li, Y. S., Davidson, E., Reid, C. N. & McHale, A. P. Optimising ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in vitro and prolonged expression of a transgene in vivo: potential applications for gene therapy of cancer. *Cancer Lett.* 273, 62–69 (2009).
  - Liang, G. et al. Cooperativity between DNA Methyltransferases in the Maintenance Methylation of Repetitive Elements. *Molecular and Cellular Biology* 22, 480–491 (2002).
  - Lidov, H. G. & Kunkel, L. M. Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney. *Genomics* 45, 132–139 (1997).
  - Lieberman, P. M. Chromatin organization and virus gene expression. *Journal of Cellular Physiology* 216, 295–302 (2008).
  - Linden, R. M., Winocour, E. & Berns, K. I. The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7966 (1996).
  - Lindroth, A. M. et al. Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *EMBO J.* 23, 4286–4296 (2004).
  - Ling, C. et al. High-efficiency transduction of liver cancer cells by recombinant adeno-associated virus serotype 3 vectors. *J Vis Exp* (2011).doi:10.3791/2538
  - Ling, C. et al. Human Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Cellular Coreceptor for Adeno-Associated Virus Serotype 3. *Human Gene Therapy* 21, 1741–1747 (2010).
  - Liu, F. & Tyagi, P. Naked DNA for liver gene transfer. *Adv. Genet.* 54, 43–64 (2005).
  - Loeb, J. E., Cordier, W. S., Harris, M. E., Weitzman, M. D. & Hope, T. J. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 10, 2295–2305 (1999).
  - Lombardo, A. et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat. Biotechnol.* 25, 1298–1306 (2007).
  - Lostal, W. et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1897–1907 (2010).
  - Louis, B. G. & Ganoza, M. C. Signals determining translational start-site recognition in eukaryotes and their role in prediction of genetic reading frames. *Mol. Biol. Rep.* 13, 103–115 (1988).
  - Loukili, N. et al. Peroxynitrite induces HMGB1 release by cardiac cells in vitro and HMGB1

upregulation in the infarcted myocardium in vivo. *Cardiovascular Research* 89, 586–594 (2010).

- Lu, J., McKinsey, T. A., Zhang, C. L. & Olson, E. N. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol. Cell* 6, 233–244 (2000).
- Lu, Y. et al. Therapeutic level of functional human alpha 1 antitrypsin (hAAT) secreted from murine muscle transduced by adeno-associated virus (rAAV1) vector. *J Gene Med* 8, 730–735 (2006).
- Lucarelli, M., Fuso, A., Strom, R. & Scarpa, S. The dynamics of myogenin site-specific demethylation is strongly correlated with its expression and with muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 7500–7506 (2001).
- Luco, R. F. et al. Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications. *Science* 327, 996–1000 (2010).
- Lukacs, G. L. et al. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* 275, 1625–1629 (2000).
- Lusby, E., Fife, K. H. & Berns, K. I. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *Journal of Virology* 34, 402 (1980).
- Lux, K. et al. Green Fluorescent Protein-Tagged Adeno-Associated Virus Particles Allow the Study of Cytosolic and Nuclear Trafficking. *J. Virol.* 79, 11776–11787 (2005).
- Luz, M. A. M., Marques, M. J. & Santo Neto, H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 691–695 (2002).

## M

- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. & Lieber, M. R. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794 (2002).
- Madocsai, C., Lim, S. R., Geib, T., Lam, B. J. & Hertel, K. J. Correction of SMN2 Pre-mRNA splicing by antisense U7 small nuclear RNAs. *Mol. Ther.* 12, 1013–1022 (2005).
- Maeshima, K., Hihara, S. & Takata, H. New insight into the mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibers without 30-nm chromatin structure. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75, 439–444 (2010).
- Maeshima, K., Hihara, S. & Eltsov, M. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 291–297 (2010).
- Magnusson, T., Haase, R., Schleaf, M., Wagner, E. & Ogris, M. Sustained, high transgene expression in liver with plasmid vectors using optimized promoter-enhancer combinations. *J Gene Med* 13, 382–391 (2011).
- Mah, C. et al. Dual vectors expressing murine factor VIII result in sustained correction of hemophilia A mice. *Hum. Gene Ther.* 14, 143–152 (2003).
- Majumder, S. Role of de Novo DNA Methyltransferases and Methyl CpG-binding Proteins in Gene Silencing in a Rat Hepatoma. *Journal of Biological Chemistry* 277, 16048–16058 (2002).
- Mal, A. A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *The EMBO Journal* 20, 1739–1753 (2001).
- Manno, C. S. et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12, 342–347 (2006).
- Manservigi, R., Argnani, R. & Marconi, P. HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy. *Open Virol J* 4, 123–156 (2010).
- Marcus-Sekura, C. J. & Carter, B. J. Chromatin-like structure of adeno-associated virus DNA in infected cells. *Journal of Virology* 48, 79 (1983).
- Marini, J. F. et al. Expression of myosin heavy chain isoforms in Duchenne muscular dystrophy patients and carriers. *Neuromuscul. Disord.* 1, 397–409 (1991).

- Martins, A. S., Shkryl, V. M., Nowycky, M. C. & Shirokova, N. Reactive oxygen species contribute to Ca<sup>2+</sup> signals produced by osmotic stress in mouse skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology* 586, 197–210 (2007).
- Massie, C. E. & Mills, I. G. ChIPping away at gene regulation. *EMBO reports* 9, 337–343 (2008).
- Mastroiannopoulos, N. P., Feldman, M. L., Uney, J. B., Mahadevan, M. S. & Phylactou, L. A. Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts. *EMBO reports* 6, 458–463 (2005).
- Matsushita, T. et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther.* 5, 938–945 (1998).
- Mattar, C. N. Z. et al. Stable human FIX expression after 0.9G intrauterine gene transfer of self-complementary adeno-associated viral vector 5 and 8 in macaques. *Mol. Ther.* 19, 1950–1960 (2011).
- Maunakea, A. K. et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466, 253–257 (2010).
- Mays, L. E. et al. Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins. *J. Immunol.* 182, 6051–6060 (2009).
- Mazumder, B., Seshadri, V. & Fox, P. L. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem. Sci.* 28, 91–98 (2003).
- McCarty, D. M. et al. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.* 10, 2112–2118 (2003).
- McCarty, D. M. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol. Ther.* 16, 1648–1656 (2008).
- McClung, J. M., Judge, A. R., Powers, S. K. & Yan, Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *AJP: Cell Physiology* 298, C542–C549 (2009).
- McCown, T. J. Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in the CNS. *Curr Gene Ther* 11, 181–188 (2011).
- McGarvey, K. M., Greene, E., Fahrner, J. A., Jenuwein, T. & Baylin, S. B. DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2. *Cancer Res.* 67, 5097–5102 (2007).
- McGhee, J. D. & Ginder, G. D. Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken beta-globin genes. *Nature* 280, 419–420 (1979).
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J. & Olson, E. N. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106–111 (2000).
- Megeney, L. A. et al. Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 220–225 (1999).
- Mendell, J. R. et al. Dystrophin Immunity in Duchenne's Muscular Dystrophy. *New England Journal of Medicine* 363, 1429–1437 (2010).
- Mendell, J. R. et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Annals of Neurology* 68, 629–638 (2010).
- Mercer, J. & Helenius, A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* 11, 510–520 (2009).
- Messina, S. et al. Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp. Neurol.* 198, 234–241 (2006).
- Messina, S. et al. The soy isoflavone genistein blunts nuclear factor kappa-B, MAPKs and TNF- $\alpha$  activation and ameliorates muscle function and morphology in mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* 21, 579–589 (2011).
- Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46 (2010).
- Miao, C. H. et al. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region

increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol. Ther.* 1, 522–532 (2000).

- Miao, C. H. Recent advances in immune modulation. *Curr Gene Ther* 7, 391–402 (2007).
- Miller, D. G., Petek, L. M. & Russell, D. W. Human Gene Targeting by Adeno-Associated Virus Vectors Is Enhanced by DNA Double-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology* 23, 3550–3557 (2003).
- Miller, D. G. et al. Large-Scale Analysis of Adeno-Associated Virus Vector Integration Sites in Normal Human Cells. *Journal of Virology* 79, 11434–11442 (2005).
- Miller, D. G., Petek, L. M. & Russell, D. W. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat. Genet.* 36, 767–773 (2004).
- Miller, D. G., Rutledge, E. A. & Russell, D. W. Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat. Genet.* 30, 147–148 (2002).
- Minetti, G. C. et al. Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat. Med.* 12, 1147–1150 (2006).
- Mingozi, F. & High, K. A. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther* 11, 321–330 (2011).
- Mingozi, F. et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* 13, 419–422 (2007).
- Mingozi, F. et al. AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 114, 2077–2086 (2009).
- Mingozi, F. et al. Pharmacological Modulation of Humoral Immunity in a Nonhuman Primate Model of AAV Gene Transfer for Hemophilia B. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* (2012).doi:10.1038/mt.2012.84
- Miranda, T. B. et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Molecular Cancer Therapeutics* 8, 1579–1588 (2009).
- Miranda, T. B. & Jones, P. A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J. Cell. Physiol.* 213, 384–390 (2007).
- Mirza, M. A. & Weber, J. Structure of adenovirus chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 696, 76–86 (1982).
- Mitchell, J. A. & Fraser, P. Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription. *Genes & Development* 22, 20–25 (2008).
- Miyagoe-Suzuki, Y. & Takeda, S. I. Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with alpha1-syntrophin at the sarcolemma. *Microsc. Res. Tech.* 55, 164–170 (2001).
- Mobley, C. M. & Sealy, L. Role of the Transcription Start Site Core Region and Transcription Factor YY1 in Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeat Promoter Activity. *Journal of Virology* 72, 6592 (1998).
- Mobley, C. M. & Sealy, L. The Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeat Promoter Is Regulated by TFII-I. *Journal of Virology* 74, 6511 (2000).
- Mochizuki, S. et al. Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice. *Gene Ther.* 11, 1081–1086 (2004).
- Moiseyev, G. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 12413–12418 (2005).
- Mok, H. P., Javed, S. & Lever, A. Stable gene expression occurs from a minority of integrated HIV-1-based vectors: transcriptional silencing is present in the majority. *Gene Ther.* 14, 741–751 (2007).
- Mokri, B. & Engel, A. G. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* 25, 1111–1120 (1975).
- Monahan, P. E. et al. Proteasome inhibitors enhance gene delivery by AAV virus vectors expressing large genomes in hemophilia mouse and dog models: a strategy for broad clinical application. *Mol.*

Ther. 18, 1907–1916 (2010).

- Monici, M. C., Aguenouz, M., Mazzeo, A., Messina, C. & Vita, G. Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 60, 993–997 (2003).
- Mori-Uchino, M. et al. Enhanced transgene expression in the mouse skeletal muscle infected by the adeno-associated viral vector with the human elongation factor 1alpha promoter and a human chromatin insulator. *J Gene Med* 11, 598–604 (2009).
- Moroziewicz, D. & Kaufman, H. L. Gene therapy with poxvirus vectors. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7, 317–325 (2005).
- Moss, R. B. et al. Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum. Gene Ther.* 18, 726–732 (2007).
- Moxley, R. T., 3rd et al. Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 64, 13–20 (2005).
- Mulligan, R. C., Howard, B. H. & Berg, P. Synthesis of rabbit beta-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 beta-globin recombinant genome. *Nature* 277, 108–114 (1979).
- Murata, T. et al. Epigenetic Histone Modification of Epstein-Barr Virus BZLF1 Promoter during Latency and Reactivation in Raji Cells. *J. Virol.* 86, 4752–4761 (2012).
- Muul, L. M. et al. Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* 101, 2563–2569 (2003).

## N

- Nabel, C. S. & Kohli, R. M. Molecular biology. Demystifying DNA demethylation. *Science* 333, 1229–1230 (2011).
- Nakae, Y., Stoward, P. J., Bespalov, I. A., Melamede, R. J. & Wallace, S. S. A new technique for the quantitative assessment of 8-oxoguanine in nuclear DNA as a marker of oxidative stress. Application to dystrophin-deficient DMD skeletal muscles. *Histochem. Cell Biol.* 124, 335–345 (2005).
- Nakai, H. et al. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J. Virol.* 75, 6969–6976 (2001).
- Nakai, H. et al. Large-Scale Molecular Characterization of Adeno-Associated Virus Vector Integration in Mouse Liver. *Journal of Virology* 79, 3606–3614 (2005).
- Nakai, H., Fuess, S., Storm, T. A., Meuse, L. A. & Kay, M. A. Free DNA ends are essential for concatemerization of synthetic double-stranded adeno-associated virus vector genomes transfected into mouse hepatocytes in vivo. *Mol. Ther.* 7, 112–121 (2003).
- Nakai, H., Iwaki, Y., Kay, M. A. & Couto, L. B. Isolation of Recombinant Adeno-Associated Virus Vector-Cellular DNA Junctions from Mouse Liver. *Journal of Virology* 73, 5438 (1999).
- Nakai, H., Storm, T. A., Fuess, S. & Kay, M. A. Pathways of removal of free DNA vector ends in normal and DNA-PKcs-deficient SCID mouse hepatocytes transduced with rAAV vectors. *Hum. Gene Ther.* 14, 871–881 (2003).
- Nakai, H., Storm, T. A. & Kay, M. A. Recruitment of Single-Stranded Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes and Intermolecular Recombination Are Responsible for Stable Transduction of Liver In Vivo. *Journal of Virology* 74, 9451 (2000).
- Nakamura, A., Yoshida, K., Ueda, H., Takeda, S. & Ikeda, S. Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 326–331 (2005).
- Nam, H.-J. et al. Structural studies of adeno-associated virus serotype 8 capsid transitions associated with endosomal trafficking. *J. Virol.* 85, 11791–11799 (2011).

- Nash, K., Chen, W., Salganik, M. & Muzyczka, N. Identification of Cellular Proteins That Interact with the Adeno-Associated Virus Rep Protein. *Journal of Virology* 83, 454–469 (2008).
- Nathwani, A. C. et al. Enhancing transduction of the liver by adeno-associated viral vectors. *Gene Ther.* 16, 60–69 (2009).
- Nathwani, A. C. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 107, 2653–2661 (2006).
- Nathwani, A. C. et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol. Ther.* 19, 876–885 (2011).
- Nathwani, A. C. et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365, 2357–2365 (2011).
- Nègre, N., Lavrov, S., Hennetin, J., Bellis, M. & Cavalli, G. Mapping the distribution of chromatin proteins by ChIP on chip. *Meth. Enzymol.* 410, 316–341 (2006).
- Németh, A. & Längst, G. Genome organization in and around the nucleolus. *Trends Genet.* 27, 149–156 (2011).
- Nethery, D. et al. PLA(2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Appl. Physiol.* 89, 72–80 (2000).
- Ng, R. et al. Structural characterization of the dual glycan binding adeno-associated virus serotype 6. *J. Virol.* 84, 12945–12957 (2010).
- Ni, W. et al. Longevity of rAAV vector and plasmid DNA in blood after intramuscular injection in nonhuman primates: implications for gene doping. *Gene Ther.* 18, 709–718 (2011).
- Nicholson, L. V., Johnson, M. A., Bushby, K. M. & Gardner-Medwin, D. Functional significance of dystrophin positive fibres in Duchenne muscular dystrophy. *Archives of Disease in Childhood* 68, 632 (1993).
- Nigro, G. et al. Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. *Muscle Nerve* 6, 253–262 (1983).
- Niles, J. C., Wishnok, J. S. & Tannenbaum, S. R. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide* 14, 109–121 (2006).
- Nishino, Y. et al. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 31, 1644–1653 (2012).
- Nizami, Z., Deryusheva, S. & Gall, J. G. The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000653 (2010).
- Nonnenmacher, M. & Weber, T. Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe* 10, 563–576 (2011).
- Nony, P., Chadeuf, G., Tessier, J., Moullier, P. & Salvetti, A. Evidence for packaging of rep-cap sequences into adeno-associated virus (AAV) type 2 capsids in the absence of inverted terminal repeats: a model for generation of rep-positive AAV particles. *J. Virol.* 77, 776–781 (2003).
- Norton, V. G., Marvin, K. W., Yau, P. & Bradbury, E. M. Nucleosome linking number change controlled by acetylation of histones H3 and H4. *J. Biol. Chem.* 265, 19848–19852 (1990).
- Nott, A., Watson, P. M., Robinson, J. D., Crepaldi, L. & Riccio, A. S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature* 455, 411–415 (2008).
- Nowrouzi, A. et al. Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* (2012).doi:10.1038/mt.2012.47

## O

- O'Donnell, J., Taylor, K. A. & Chapman, M. S. Adeno-associated virus-2 and its primary cellular receptor—Cryo-EM structure of a heparin complex. *Virology* 385, 434–443 (2009).
- O'Hagan, H. M. et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* 20, 606–619 (2011).
- Ohshima, S. et al. Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle. *Mol. Ther.* 17, 73–80 (2009).
- Okada, T. et al. A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol. Ther.* 13, 738–746 (2006).
- Okano, M., Xie, S. & Li, E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research* 26, 2536 (1998).
- Okitsu, C. Y. & Hsieh, C.-L. DNA Methylation Dictates Histone H3K4 Methylation. *Molecular and Cellular Biology* 27, 2746–2757 (2007).
- Oliveira, R. S., Collares, T. F., Smith, K. R., Collares, T. V. & Seixas, F. K. The use of genes for performance enhancement: doping or therapy? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44, 1194–1201 (2011).
- Ooi, S. K. T. & Bestor, T. H. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 133, 1145–1148 (2008).
- Orend, G., Kuhlmann, I. & Doerfler, W. Spreading of DNA methylation across integrated foreign (adenovirus type 12) genomes in mammalian cells. *Journal of Virology* 65, 4301 (1991).
- Orlando, V., Strutt, H. & Paro, R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* 11, 205–214 (1997).
- Oswald, J. et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol.* 10, 475–478 (2000).
- Oudet, P., Gross-Bellard, M. & Chambon, P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281–300 (1975).

## P

- Palacios, D. et al. TNF/p38 $\alpha$ /Polycomb Signaling to Pax7 Locus in Satellite Cells Links Inflammation to the Epigenetic Control of Muscle Regeneration. *Cell Stem Cell* 7, 455–469 (2010).
- Pallafacchina, G. et al. An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Res* 4, 77–91 (2010).
- Pannell, D. Retrovirus vector silencing is de novo methylase independent and marked by a repressive histone code. *The EMBO Journal* 19, 5884–5894 (2000).
- Parker, J. S. L. & Parrish, C. R. Cellular Uptake and Infection by Canine Parvovirus Involves Rapid Dynamin-Regulated Clathrin-Mediated Endocytosis, Followed by Slower Intracellular Trafficking. *Journal of Virology* 74, 1919 (2000).
- Paschos, K. & Allday, M. J. Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. *Trends in Microbiology* 18, 439–447 (2010).
- Pascucci, B. et al. Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins. *Nucleic Acids Research* 30, 2124 (2002).
- Paterna, J. C., Moccetti, T., Mura, A., Feldon, J. & Büeler, H. Influence of promoter and WHV post-transcriptional regulatory element on AAV-mediated transgene expression in the rat brain. *Gene Ther.* 7, 1304–1311 (2000).
- Pattanayak, V., Ramirez, C. L., Joung, J. K. & Liu, D. R. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat. Methods* 8, 765–770 (2011).
- Paulus, C., Nitzsche, A. & Nevels, M. Chromatinisation of herpesvirus genomes. *Rev. Med. Virol.* 20,

34–50 (2010).

- Paweletz, N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 72–75 (2001).
- Pearson, G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153–183 (2001).
- Péault, B. et al. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol. Ther.* 15, 867–877 (2007).
- Pécuchet, N., Cluzeau, T., Thibault, C., Mounier, N. & Vignot, S. [Histone deacetylase inhibitors: highlight on epigenetic regulation]. *Bull Cancer* 97, 917–935 (2010).
- Penaud-Budloo, M. et al. Adeno-Associated Virus Vector Genomes Persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle. *Journal of Virology* 82, 7875–7885 (2008).
- Peng, Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum. Gene Ther.* 16, 1016–1027 (2005).
- Pereira, D. J., McCarty, D. M. & Muzyczka, N. The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *Journal of Virology* 71, 1079 (1997).
- Perez, E. E. et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 26, 808–816 (2008).
- Pescatori, M. et al. Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *FASEB J.* 21, 1210–1226 (2007).
- Pesse, B. et al. Peroxynitrite activates ERK via Raf-1 and MEK, independently from EGF receptor and p21 in H9C2 cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38, 765–775 (2005).
- Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M. & Sweeney, H. L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3710 (1993).
- Pichavant, C. et al. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol. Ther.* 19, 830–840 (2011).
- Pichon, C., Billiet, L. & Midoux, P. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 640–645 (2010).
- Pillers, D. A. et al. Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat. Genet.* 4, 82–86 (1993).
- Portela, A. & Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 28, 1057–1068 (2010).
- Potapova, A. et al. Systematic cross-validation of 454 sequencing and pyrosequencing for the exact quantification of DNA methylation patterns with single CpG resolution. *BMC Biotechnology* 11, 6 (2011).
- Prendergast, G. C. & Ziff, E. B. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 251, 186–189 (1991).
- Prokhortchouk, E. & Defossez, P.-A. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 2167–2173 (2008).
- Pulicherla, N. et al. Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. *Mol. Ther.* 19, 1070–1078 (2011).

## Q

- Qian, G. et al. NIRF, a novel ubiquitin ligase, interacts with hepatitis B virus core protein and promotes its degradation. *Biotechnol. Lett.* 34, 29–36 (2012).

- Qiang, M. et al. The Site Specific Demethylation in the 5' -Regulatory Area of NMDA Receptor 2B Subunit Gene Associated with CIE-Induced Up-Regulation of Transcription. *PLoS ONE* 5, e8798 (2010).
- Qiao, C., Koo, T., Li, J., Xiao, X. & Dickson, J. G. Gene therapy in skeletal muscle mediated by adeno-associated virus vectors. *Methods Mol. Biol.* 807, 119–140 (2011).
- Qiao, C. et al. Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice. *Hum. Gene Ther.* 19, 241–254 (2008).
- Qing, K. et al. Adeno-Associated Virus Type 2-Mediated Gene Transfer: Role of Cellular T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase in Transgene Expression in Established Cell Lines In Vitro and Transgenic Mice In Vivo. *Journal of Virology* 77, 2741–2746 (2003).
- Qing, K. et al. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature Medicine* 5, 71–77 (1999).
- Qiu, J. & Brown, K. E. Integrin  $\alpha\beta 5$  Is Not Involved in Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Infection. *Virology* 264, 436–440 (1999).

## R

- Rabinowitz, J. E. et al. Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity. *Journal of Virology* 76, 791–801 (2002).
- Rajasekhar, V. K. & Begemann, M. Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells* 25, 2498–2510 (2007).
- Rando, O. J. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Current opinion in genetics & development* (2012).doi:10.1016/j.gde.2012.02.013
- Rando, T. A. Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a 'two hit' hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc. Res. Tech.* 55, 223–235 (2001).
- Rando, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24, 1575–1594 (2001).
- Raper, S. E. et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148–158 (2003).
- Raynal, N. J.-M. et al. DNA methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory. *Cancer Res.* 72, 1170–1181 (2012).
- Reed, K., Poulin, M. L., Yan, L. & Parissenti, A. M. Comparison of bisulfite sequencing PCR with pyrosequencing for measuring differences in DNA methylation. *Anal. Biochem.* 397, 96–106 (2010).
- Reinke, H. & Hörz, W. Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol. Cell* 11, 1599–1607 (2003).
- Ren, C., White, A. F. & Ponnazhagan, S. Notch1 Augments Intracellular Trafficking of Adeno-Associated Virus Type 2. *Journal of Virology* 81, 2069–2073 (2006).
- Ren, C., Kumar, S., Shaw, D. R. & Ponnazhagan, S. Genomic stability of self-complementary adeno-associated virus 2 during early stages of transduction in mouse muscle in vivo. *Hum. Gene Ther.* 16, 1047–1057 (2005).
- Richter, C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids* 44, 175–189 (1987).
- Ridgway, P. & Almouzni, G. Chromatin assembly and organization. *J. Cell. Sci.* 114, 2711–2712 (2001).
- Riu, E., Chen, Z.-Y., Xu, H., He, C.-Y. & Kay, M. A. Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression in vivo. *Mol. Ther.* 15, 1348–1355

(2007).

- Rivera, V. M. et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105, 1424–1430 (2005).
- Robertson, G. et al. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat. Methods* 4, 651–657 (2007).
- Robertson, K. D. et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Research* 27, 2291 (1999).
- Rodino-Klapac, L. R., Lee, J.-S., Mulligan, R. C., Clark, K. R. & Mendell, J. R. Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D. *Neurology* 71, 240–247 (2008).
- Rodino-Klapac, L. R. et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol. Ther.* 18, 109–117 (2010).
- Ros, C., Baltzer, C., Mani, B. & Kempf, C. Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology* 345, 137–147 (2006).
- Ross, P. J. et al. Assembly of Helper-Dependent Adenovirus DNA into Chromatin Promotes Efficient Gene Expression. *Journal of Virology* 85, 3950–3958 (2011).
- Rosser, J. M. & An, W. Repeat-induced gene silencing of L1 transgenes is correlated with differential promoter methylation. *Gene* 456, 15–23 (2010).
- Rothberg, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 348–352 (2011).
- Ruiz-Bonilla, V. et al. Efficient adult skeletal muscle regeneration in mice deficient in p38beta, p38gamma and p38delta MAP kinases. *Cell Cycle* 7, 2208–2214 (2008).
- Rutledge, E. A. & Russell, D. W. Adeno-associated virus vector integration junctions. *Journal of Virology* 71, 8429 (1997).
- Rybakova, I. N., Patel, J. R. & Ervasti, J. M. The Dystrophin Complex Forms a Mechanically Strong Link between the Sarcolemma and Costameric Actin. *The Journal of Cell Biology* 150, 1209 (2000).
- Sabatino, D. E. et al. Efficacy and Safety of Long-term Prophylaxis in Severe Hemophilia A Dogs Following Liver Gene Therapy Using AAV Vectors. *Molecular Therapy* 19, 442–449 (2010).

## S

- Sabourin, J. et al. Regulation of TRPC1 and TRPC4 Cation Channels Requires an 1-Syntrophin-dependent Complex in Skeletal Mouse Myotubes. *Journal of Biological Chemistry* 284, 36248–36261 (2009).
- Sado, T., Okano, M., Li, E. & Sasaki, H. De novo DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. *Development* 131, 975–982 (2004).
- Salva, M. Z. et al. Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. *Mol. Ther.* 15, 320–329 (2007).
- Samakoglu, S., Bohl, D. & Heard, J. M. Mechanisms leading to sustained reversion of beta-thalassemia in mice by doxycycline-controlled Epo delivery from muscles. *Mol. Ther.* 6, 793–803 (2002).
- Samulski, R. J., Chang, L. S. & Shenk, T. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *Journal of Virology* 63, 3822 (1989).
- Samulski, R. J. et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 10, 3941–3950 (1991).
- Sander, M. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97,

13818–13823 (2000).

- Sands, M. S. AAV-mediated liver-directed gene therapy. *Methods Mol. Biol.* 807, 141–157 (2011).
- Sanlioglu, S. et al. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J. Virol.* 74, 9184–9196 (2000).
- Sansom, O. J., Maddison, K. & Clarke, A. R. Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 305–315 (2007).
- Santiago, Y. et al. From the Cover: Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5809–5814 (2008).
- Sartorelli, V. & Juan, A. H. Sculpting Chromatin Beyond the Double Helix. *Current Topics in Developmental Biology* 96, 57–83 (2011).
- Saxonov, S. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 1412–1417 (2006).
- Schäfer, R. & Sers, C. RAS oncogene-mediated deregulation of the transcriptome: from molecular signature to function. *Adv. Enzyme Regul.* 51, 126–136 (2011).
- Schlehofer, J. R., Ehrbar, M. & zur Hausen, H. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* 152, 110–117 (1986).
- Schmidt, M. & Chiorini, J. A. Gangliosides Are Essential for Bovine Adeno-Associated Virus Entry. *J. Virol.* 80, 5516–5522 (2006).
- Schmidt, M., Katano, H., Bossis, I. & Chiorini, J. A. Cloning and characterization of a bovine adeno-associated virus. *J. Virol.* 78, 6509–6516 (2004).
- Schmidt, W. M. et al. DNA Damage, Somatic Aneuploidy, and Malignant Sarcoma Susceptibility in Muscular Dystrophies. *PLoS Genetics* 7, e1002042 (2011).
- Schnepf, B. C., Jensen, R. L., Chen, C.-L., Johnson, P. R. & Clark, K. R. Characterization of Adeno-Associated Virus Genomes Isolated from Human Tissues. *Journal of Virology* 79, 14793–14803 (2005).
- Schuettrumpf, J. et al. Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol. Ther.* 13, 1064–1073 (2006).
- Schüttrumpf, J. et al. Transgene loss and changes in the promoter methylation status as determinants for expression duration in nonviral gene transfer for factor IX. *Hum. Gene Ther.* 22, 101–106 (2011).
- Seiler, M. P., Miller, A. D., Zabner, J. & Halbert, C. L. Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry. *Hum. Gene Ther.* 17, 10–19 (2006).
- Seisenberger, G. et al. Real-Time Single-Molecule Imaging of the Infection Pathway of an Adeno-Associated Virus. *Science* 294, 1929–1932 (2001).
- Shalvai, S., Amariglio, N., Rechavi, G. & Simon, A. J. Gene silencing at the nuclear periphery. *FEBS J.* 274, 1383–1392 (2007).
- Sharma, P. et al. beta-Dystroglycan binds caveolin-1 in smooth muscle: a functional role in caveolae distribution and Ca<sup>2+</sup> release. *J. Cell. Sci.* 123, 3061–3070 (2010).
- Sharp, A. J. et al. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Res.* 21, 1592–1600 (2011).
- Shen, L. et al. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genetics* preprint, e181 (2005).
- Shi, W. & Bartlett, J. S. RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism. *Mol. Ther.* 7, 515–525 (2003).
- Shin, J.-H. et al. A simplified immune suppression scheme leads to persistent micro-dystrophin

- expression in duchenne muscular dystrophy dogs. *Hum. Gene Ther.* 23, 202–209 (2012).
- Shkryl, V. M. et al. Reciprocal amplification of ROS and Ca<sup>2+</sup> signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch.* 458, 915–928 (2009).
  - Sipo, I. et al. Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction. *Gene Therapy* 14, 1319–1329 (2007).
  - Slanina, H., Weger, S., Stow, N. D., Kuhrs, A. & Heilbronn, R. Role of the herpes simplex virus helicase-primase complex during adeno-associated virus DNA replication. *J. Virol.* 80, 5241–5250 (2006).
  - Smith, G. C. & Jackson, S. P. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13, 916–934 (1999).
  - Smith, R. H., Levy, J. R. & Kotin, R. M. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol. Ther.* 17, 1888–1896 (2009).
  - Snyder, R. O., Im, D. S. & Muzyczka, N. Evidence for covalent attachment of the adeno-associated virus (AAV) rep protein to the ends of the AAV genome. *Journal of Virology* 64, 6204 (1990).
  - Snyder, R. O. et al. Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum. Gene Ther.* 8, 1891–1900 (1997).
  - Solomon, L. M., Mordkoff, D. S. & Noll, R. C. Physical enhancement of human performance: is law keeping pace with science? *Genet Med* 6, 249–258 (2009).
  - Song, J., Teplova, M., Ishibe-Murakami, S. & Patel, D. J. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science* 335, 709–712 (2012).
  - Song, S., Laipis, P. J., Berns, K. I. & Flotte, T. R. Effect of DNA-dependent protein kinase on the molecular fate of the rAAV2 genome in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4084–4088 (2001).
  - Song, Y. et al. Functional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in cystic fibrosis airway epithelial cells by AAV6.2-mediated segmental trans-splicing. *Hum. Gene Ther.* 20, 267–281 (2009).
  - Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R. & Kleinschmidt, J. A. Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids with Externalized VP1/VP2 Trafficking Domains Are Generated prior to Passage through the Cytoplasm and Are Maintained until Uncoating Occurs in the Nucleus. *Journal of Virology* 80, 11040–11054 (2006).
  - Sorokin, A. V., Kim, E. R. & Ovchinnikov, L. P. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry Mosc.* 74, 1411–1442 (2009).
  - Spence, H. J., Dhillon, A. S., James, M. & Winder, S. J. Dystroglycan, a scaffold for the ERK–MAP kinase cascade. *EMBO reports* 5, 484–489 (2004).
  - Spencer, M. J., Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K. & Tidball, J. G. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin. Immunol.* 98, 235–243 (2001).
  - Spencer, M. J. & Mellgren, R. L. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2645–2655 (2002).
  - Spurney, C. F. et al. Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: Expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. *Neuromuscular Disorders* 18, 371–381 (2008).
  - Stabel, S., Doerfler, W. & Friis, R. R. Integration Sites of Adenovirus Type 12 DNA in Transformed Hamster Cells and Hamster Tumor Cells. *Journal of Virology* 36, 22 (1980).
  - Stahnke, S. et al. Intrinsic phospholipase A2 activity of adeno-associated virus is involved in endosomal escape of incoming particles. *Virology* 409, 77–83 (2011).

- Stanek, D. et al. Spliceosomal Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles Repeatedly Cycle through Cajal Bodies. *Molecular Biology of the Cell* 19, 2534–2543 (2008).
- Stehr, R., Kepper, N., Rippe, K. & Wedemann, G. The Effect of Internucleosomal Interaction on Folding of the Chromatin Fiber. *Biophysical Journal* 95, 3677–3691 (2008).
- Stein, S. et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat. Med.* 16, 198–204 (2010).
- Stieger, K., Cronin, T., Bennett, J. & Rolling, F. Adeno-associated virus mediated gene therapy for retinal degenerative diseases. *Methods Mol. Biol.* 807, 179–218 (2011).
- Stieger, K. et al. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol. Ther.* 13, 967–975 (2006).
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45 (2000).
- Strichman-Almashanu, L. Z. et al. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome Res.* 12, 543–554 (2002).
- Strick, R., Strissel, P. L., Gavrilov, K. & Levi-Setti, R. Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 155, 899–910 (2001).
- Stroes, E. S. et al. Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 2303–2304 (2008).
- Su, L. T. et al. Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector. *Circulation* 112, 1780–1788 (2005).
- Sucharov, C. C., Langer, S., Bristow, M. & Leinwand, L. Shuttling of HDAC5 in H9C2 cells regulates YY1 function through CaMKIV/PKD and PP2A. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 291, C1029–1037 (2006).
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H. & Tajima, S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J. Biol. Chem.* 279, 27816–27823 (2004).
- Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M. & Vuento, M. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* 316, 267–280 (2003).
- Summerford, C., Bartlett, J. S. & Samulski, R. J.  $\alpha 5$  integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature Medicine* 5, 78–82 (1999).
- Summerford, C. & Samulski, R. J. Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Virions. *Journal of Virology* 72, 1438 (1998).
- Sun, X. & Zhang, N. Cationic polymer optimization for efficient gene delivery. *Mini Rev Med Chem* 10, 108–125 (2010).
- Sun, X. et al. Molecular Analysis of Vector Genome Structures After Liver Transduction by Conventional and Self-Complementary Adeno-Associated Viral Serotype Vectors in Murine and Nonhuman Primate Models. *Human Gene Therapy* 21, 750–761 (2010).
- Suzuki, H., Toyota, M., Kondo, Y. & Shinomura, Y. Inflammation-related aberrant patterns of DNA methylation: detection and role in epigenetic deregulation of cancer cell transcriptome. *Methods Mol. Biol.* 512, 55–69 (2009).
- Suzuki, M., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T. & Oikawa, T. Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene* 22, 8688–8698 (2003).
- Suzuki, S. et al. Retrotransposon silencing by DNA methylation can drive mammalian genomic imprinting. *PLoS Genet.* 3, e55 (2007).
- Szyf, M., Eliasson, L., Mann, V., Klein, G. & Razin, A. Cellular and viral DNA hypomethylation associated with induction of Epstein-Barr virus lytic cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 8090 (1985).

- Szyf, M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 243–263 (2009).

## T

- Takai, D. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 3740–3745 (2002).
- Takai, D. & Jones, P. A. The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol. (Gedrukt)* 3, 235–240 (2003).
- Takeshita, F. et al. Muscle creatine kinase/SV40 hybrid promoter for muscle-targeted long-term transgene expression. *Int. J. Mol. Med.* 19, 309–315 (2007).
- Talbert, P. B. & Henikoff, S. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 264–275 (2010).
- Tam, L. C. S. et al. Therapeutic Benefit Derived from RNAi-Mediated Ablation of IMPDH1 Transcripts in a Murine Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (RP10). *Hum. Mol. Genet.* 17, 2084–2100 (2008).
- Tan, J. et al. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes & Development* 21, 1050–1063 (2007).
- Tan, M. et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016–1028 (2011).
- Tanabe, Y., Esaki, K. & Nomura, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol.* 69, 91–95 (1986).
- Tang, Y. et al. Inhibition of the IKK/NF- $\kappa$ B pathway by AAV gene transfer improves muscle regeneration in older mdx mice. *Gene Ther.* 17, 1476–1483 (2010).
- Tats, A., Tenson, T. & Remm, M. Preferred and avoided codon pairs in three domains of life. *BMC Genomics* 9, 463 (2008).
- Teschendorf, C., Warrington, K. H., Jr, Siemann, D. W. & Muzyczka, N. Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer Res.* 22, 3325–3330 (2002).
- Thomas, C. E., Storm, T. A., Huang, Z. & Kay, M. A. Rapid Uncoating of Vector Genomes Is the Key to Efficient Liver Transduction with Pseudotyped Adeno-Associated Virus Vectors. *Journal of Virology* 78, 3110–3122 (2004).
- Thomas, G. D. et al. Impaired metabolic modulation of  $\alpha$ -adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15090 (1998).
- Thomas, G. D. & Victor, R. G. Nitric oxide mediates contraction-induced attenuation of sympathetic vasoconstriction in rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 506, 817–826 (1998).
- Tidball, J. G. & Wehling-Henricks, M. Expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscle reduces muscle membrane damage without increasing the expression of membrane-associated cytoskeletal proteins. *Mol. Genet. Metab.* 82, 312–320 (2004).
- Tidball, J. G. & Wehling-Henricks, M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J. Appl. Physiol.* 102, 1677–1686 (2007).
- Toromanoff, A. et al. Lack of Immunotoxicity After Regional Intravenous (RI) Delivery of rAAV to Nonhuman Primate Skeletal Muscle. *Molecular Therapy* 18, 151–160 (2009).
- Toromanoff, A. et al. Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol. Ther.* 16, 1291–1299 (2008).
- Toscano, M. G. et al. Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to

ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Hum. Gene Ther.* 19, 179–197 (2008).

- Tost, J. & Gut, I. G. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2, 2265–2275 (2007).
- Toth, Z. et al. Epigenetic Analysis of KSHV Latent and Lytic Genomes. *PLoS Pathogens* 6, e1001013 (2010).
- Toubanc, E. et al. Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines. *J Gene Med* 6, 555–564 (2004).
- Tratschin, J. D., Miller, I. L. & Carter, B. J. Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *Journal of Virology* 51, 611 (1984).
- Tratschin, J. D., West, M. H., Sandbank, T. & Carter, B. J. A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Molecular and Cellular Biology* 4, 2072 (1984).
- Trempe, J. P. & Carter, B. J. Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *Journal of Virology* 62, 3356 (1988).
- Trojer, P. & Reinberg, D. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol. Cell* 28, 1–13 (2007).
- Tuffery-Giraud, S. et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* 30, 934–945 (2009).

## U

- Uhrig, S. et al. Successful target cell transduction of capsid-engineered rAAV vectors requires clathrin-dependent endocytosis. *Gene Ther.* 19, 210–218 (2012).
- Umlauf, D., Goto, Y. & Feil, R. Site-specific analysis of histone methylation and acetylation. *Methods Mol. Biol.* 287, 99–120 (2004).
- Upmács, R. K. et al. Involvement of the mitogen-activated protein kinase cascade in peroxynitrite-mediated arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 286, C1271–1280 (2004).
- Urabe, M., Ding, C. & Kotin, R. M. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum. Gene Ther.* 13, 1935–1943 (2002).
- Urnov, F. D. et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435, 646–651 (2005).

## V

- van der Eb, M. M. et al. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Ther.* 5, 451–458 (1998).
- van der Ploeg, L. H. & Flavell, R. A. DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell* 19, 947–958 (1980).
- van Deutekom, J. C. et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1547–1554 (2001).
- Van Lint, C., Emiliani, S. & Verdin, E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5, 245–253 (1996).
- Vandebrouck, A. et al. Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. *FASEB J.* 21, 608–617 (2007).
- Vandenberghe, L. H. et al. Naturally occurring singleton residues in AAV capsid impact vector

performance and illustrate structural constraints. *Gene Ther.* 16, 1416–1428 (2009).

- Vandesompele, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034 (2002).
- Vaute, O., Nicolas, E., Vandel, L. & Trouche, D. Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Research* 30, 475 (2002).
- Vetrini, F. & Ng, P. Gene Therapy with Helper-Dependent Adenoviral Vectors: Current Advances and Future Perspectives. *Viruses* 2, 1886–1917 (2010).
- Vincent-Lacaze, N. et al. Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle. *J. Virol.* 73, 1949–1955 (1999).
- Virág, L. et al. Requirement of intracellular calcium mobilization for peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose) synthetase activation and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 56, 824–833 (1999).
- Virella-Lowell, I. et al. Enhancing rAAV vector expression in the lung. *J Gene Med* 7, 842–850 (2005).

## W

- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S. & Gatto, G. J., Jr Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 7342–7372 (2005).
- Walz, C. et al. Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 6), 1441–1452 (1997).
- Wang, B. et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther.* 15, 1489–1499 (2008).
- Wang, B. From the Cover: Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13714–13719 (2000).
- Wang, J. F., Forst, J., Schröder, S. & Schröder, J. M. Correlation of muscle fiber type measurements with clinical and molecular genetic data in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 9, 150–158 (1999).
- Wang, L., Robbins, P. B., Carbonaro, D. A. & Kohn, D. B. High-resolution analysis of cytosine methylation in the 5′ long terminal repeat of retroviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 9, 2321–2330 (1998).
- Wang, L. et al. Sustained correction of OTC deficiency in spf(ash) mice using optimized self-complementary AAV2/8 vectors. *Gene Ther.* 19, 404–410 (2012).
- Wang, L., Dobrzynski, E., Schlachterman, A., Cao, O. & Herzog, R. W. Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response. *Blood* 105, 4226–4234 (2005).
- Wang, Q.-Y. Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 16055–16059 (2005).
- Wang, R. Y., Gehrke, C. W. & Ehrlich, M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Research* 8, 4777 (1980).
- Wang, X. S. et al. Characterization of wild-type adeno-associated virus type 2-like particles generated during recombinant viral vector production and strategies for their elimination. *J. Virol.* 72, 5472–5480 (1998).
- Wang, X. S., Ponnazhagan, S. & Srivastava, A. Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. *Journal of Virology* 70, 1668 (1996).
- Wang, Z. et al. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus

vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 10, 2105–2111 (2003).

- Wang, Z. et al. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol. Ther.* 15, 1160–1166 (2007).
- Ward, P., Elias, P. & Linden, R. M. Rescue of the Adeno-Associated Virus Genome from a Plasmid Vector: Evidence for Rescue by Replication. *Journal of Virology* 77, 11480–11490 (2003).
- Ward, P., Dean, F. B., O'Donnell, M. E. & Berns, K. I. Role of the Adenovirus DNA-Binding Protein in In Vitro Adeno-Associated Virus DNA Replication. *Journal of Virology* 72, 420 (1998).
- Watson, G. et al. Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPS I mice. *Gene Ther.* 13, 917–925 (2006).
- Watson, J. D. & Crick, F. H. The structure of DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 18, 123–131 (1953).
- Watson, P. M. D. & Riccio, A. Nitric oxide and histone deacetylases: A new relationship between old molecules. *Commun Integr Biol* 2, 11–13 (2009).
- Weber, M. et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* 37, 853–862 (2005).
- Weber, M. et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 457–466 (2007).
- Weber, M. 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.* 7, 774–781 (2003).
- Weller, M. L. et al. Epidermal growth factor receptor is a co-receptor for adeno-associated virus serotype 6. *Nat. Med.* 16, 662–664 (2010).
- Whitehead, N. P., Streamer, M., Lusambili, L. I., Sachs, F. & Allen, D. G. Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* 16, 845–854 (2006).
- Whitehead, N. P., Yeung, E. W., Froehner, S. C. & Allen, D. G. Skeletal Muscle NADPH Oxidase Is Increased and Triggers Stretch-Induced Damage in the mdx Mouse. *PLoS ONE* 5, e15354 (2010).
- Whittaker, G. R., Kann, M. & Helenius, A. Viral Entry into the Nucleus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16, 627–651 (2000).
- Williams, I. A. & Allen, D. G. The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H1969–1977 (2007).
- Williams, K., Christensen, J. & Helin, K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* 13, 28–35 (2012).
- Wilson, J. M. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum. Gene Ther.* 16, 1014–1015 (2005).
- Winder, S. J. The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 18, 617–629 (1997).
- Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. & Kleinschmidt, J. A. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *Journal of Virology* 71, 1341 (1997).
- Wistuba, A., Weger, S., Kern, A. & Kleinschmidt, J. A. Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *Journal of Virology* 69, 5311 (1995).
- Wojdacz, T. K. & Dobrovic, A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research* 35, e41–e41 (2007).
- Wonderling, R. S. & Owens, R. A. Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome. *Journal of Virology* 71, 2528 (1997).

- Woodcock, C. L., Frado, L. L. & Rattner, J. B. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J. Cell Biol.* 99, 42–52 (1984).
- Worgall, S. et al. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum. Gene Ther.* 19, 463–474 (2008).
- Wu, S. C. & Zhang, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 607–620 (2010).
- Wu, Z. et al. Single Amino Acid Changes Can Influence Titer, Heparin Binding, and Tissue Tropism in Different Adeno-Associated Virus Serotypes. *J. Virol.* 80, 11393–11397 (2006).
- Wu, Z., Miller, E., Agbandje-McKenna, M. & Samulski, R. J. A2,3 and A2,6 N-Linked Sialic Acids Facilitate Efficient Binding and Transduction by Adeno-Associated Virus Types 1 and 6. *J. Virol.* 80, 9093–9103 (2006).
- Wu, Z. et al. Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol. Ther.* 16, 280–289 (2008).

## X

- Xia, H. et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat. Med.* 10, 816–820 (2004).
- Xiang, N., Zhao, R., Song, G. & Zhong, W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 2175–2181 (2008).
- Xiao, P.-J., Li, C., Neumann, A. & Samulski, R. J. Quantitative 3D tracing of gene-delivery viral vectors in human cells and animal tissues. *Mol. Ther.* 20, 317–328 (2012).
- Xiao, W., Warrington, K. H., Hearing, P., Hughes, J. & Muzyczka, N. Adenovirus-Facilitated Nuclear Translocation of Adeno-Associated Virus Type 2. *J. Virol.* 76, 11505–11517 (2002).
- Xiao, X., Xiao, W., Li, J. & Samulski, R. J. A novel 165-base-pair terminal repeat sequence is the sole cis requirement for the adeno-associated virus life cycle. *Journal of Virology* 71, 941 (1997).
- Xiao, X., Li, J. & Samulski, R. J. Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus. *Journal of Virology* 72, 2224 (1998).
- Xie, Q. et al. The Atomic Structure of Adeno-Associated Virus (AAV-2), a Vector for Human Gene Therapy. *PNAS* 99, 10405–10410 (2002).
- Xie, Q., Lerch, T. F., Meyer, N. L. & Chapman, M. S. Structure–function analysis of receptor-binding in adeno-associated virus serotype 6 (AAV-6). *Virology* 420, 10–19 (2011).
- Xiong, Z. & Laird, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Research* 25, 2532 (1997).

## Y

- Yakobson, B., Hrynko, T. A., Peak, M. J. & Winocour, E. Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. *J. Virol.* 63, 1023–1030 (1989).
- Yalkinoglu, A. O., Heilbronn, R., Bürkle, A., Schlehofer, J. R. & zur Hausen, H. DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res.* 48, 3123–3129 (1988).
- Yamagata, Y. et al. Rapid turnover of DNA methylation in human cells. *Epigenetics* 7, 141–145 (2012).
- Yan, Z., Zak, R., Zhang, Y. & Engelhardt, J. F. Inverted Terminal Repeat Sequences Are Important for Intermolecular Recombination and Circularization of Adeno-Associated Virus Genomes. *Journal of Virology* 79, 364–379 (2004).
- Yan, Z., Lei-Butters, D. C. M., Zhang, Y., Zak, R. & Engelhardt, J. F. Hybrid Adeno-Associated Virus Bearing Nonhomologous Inverted Terminal Repeats Enhances Dual-Vector Reconstruction of Minigenes In Vivo. *Human Gene Therapy* 18, 81–87 (2007).

- Yan, Z. et al. Ubiquitination of both Adeno-Associated Virus Type 2 and 5 Capsid Proteins Affects the Transduction Efficiency of Recombinant Vectors. *Journal of Virology* 76, 2043 (2002).
- Yang, B. et al. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J. Biol. Chem.* 270, 11711–11714 (1995).
- Yang, J. et al. Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J. Virol.* 73, 9468–9477 (1999).
- Yang, Q. et al. AAV-based shRNA silencing of NF- $\kappa$ B ameliorates muscle pathologies in mdx mice. *Gene therapy* (2012).doi:10.1038/gt.2011.207
- Yang, Z. et al. Clinical study of recombinant adenovirus-p53 combined with fractionated stereotactic radiotherapy for hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 625–630 (2010).
- Yao, S. et al. Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol. Ther.* 10, 27–36 (2004).
- Yap, K. L. & Zhou, M.-M. Structure and Mechanisms of Lysine Methylation Recognition by the Chromodomain in Gene Transcription. *Biochemistry* 50, 1966–1980 (2011).
- Yasuda, S. et al. Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature* 436, 1025–1029 (2005).
- Yates, P. A., Burman, R. W., Mummaneni, P., Krussel, S. & Turker, M. S. Tandem B1 elements located in a mouse methylation center provide a target for de novo DNA methylation. *J. Biol. Chem.* 274, 36357–36361 (1999).
- Ye, G.-J. et al. Clearance and characterization of residual HSV DNA in recombinant adeno-associated virus produced by an HSV complementation system. *Gene Ther.* 18, 135–144 (2011).
- Yepiskoposyan, H., Aeschmann, F., Nilsson, D., Okoniewski, M. & Mühlemann, O. Autoregulation of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in human cells. *RNA* 17, 2108–2118 (2011).
- Yeung, E. W. Effects of stretch-activated channel blockers on  $[Ca^{2+}]_i$  and muscle damage in the mdx mouse. *The Journal of Physiology* 562, 367–380 (2004).
- Yew, N. S. & Scheule, R. K. Toxicity of Cationic Lipid-DNA Complexes. *Adv. Genet.* 53PA, 189–214 (2005).
- Yi, Y., Jong Noh, M. & Hee Lee, K. Current Advances in Retroviral Gene Therapy. *Current Gene Therapy* 11, 218–228 (2011).
- Yoshioka, M., Yorifuji, T. & Mituyoshi, I. Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Genet.* 53, 102–107 (1998).
- Young, S. M., Jr, McCarty, D. M., Degtyareva, N. & Samulski, R. J. Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J. Virol.* 74, 3953–3966 (2000).
- Yuan, Z., Qiao, C., Hu, P., Li, J. & Xiao, X. A versatile adeno-associated virus vector producer cell line method for scalable vector production of different serotypes. *Hum. Gene Ther.* 22, 613–624 (2011).
- Yue, Y. & Duan, D. Double strand interaction is the predominant pathway for intermolecular recombination of adeno-associated viral genomes. *Virology* 313, 1–7 (2003).
- Yue, Y. et al. A Single Intravenous Injection of Adeno-associated Virus Serotype-9 Leads to Whole Body Skeletal Muscle Transduction in Dogs. *Molecular Therapy* 16, 1944–1952 (2008).

## Z

- Zaiss, A.-K. et al. Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. *Journal of Virology* 76, 4580–4590 (2002).
- Zeltner, N., Kohlbrenner, E., Clément, N., Weber, T. & Linden, R. M. Near-perfect infectivity of wild-type AAV as benchmark for infectivity of recombinant AAV vectors. *Gene Therapy* 17, 872–879 (2010).
- Zeng, W. et al. Specific Loss of Histone H3 Lysine 9 Trimethylation and HP1 $\gamma$ /Cohesin Binding at D4Z4

Repeats Is Associated with Facioscapulohumeral Dystrophy (FSHD). *PLoS Genetics* 5, e1000559 (2009).

- Zentilin, L., Marcello, A. & Giacca, M. Involvement of Cellular Double-Stranded DNA Break Binding Proteins in Processing of the Recombinant Adeno-Associated Virus Genome. *Journal of Virology* 75, 12279–12287 (2001).
- Zhang, F. et al. Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells. *Blood* 110, 1448–1457 (2007).
- Zhang, G. et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther.* 11, 675–682 (2004).
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. & Zhang, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics* 38, 95–109 (2011).
- Zhang, X.-X., McIntosh, T. J. & Grinstaff, M. W. Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. *Biochimie* 94, 42–58 (2012).
- Zhang, Y. & Duan, D. Novel mini-dystrophin gene dual adeno-associated virus vectors restore neuronal nitric oxide synthase expression at the sarcolemma. *Hum. Gene Ther.* 23, 98–103 (2012).
- Zhao, W. Role of cellular FKBP52 protein in intracellular trafficking of recombinant adeno-associated virus 2 vectors. *Virology* 353, 283–293 (2006).
- Zhong, L. et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: Point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 7827–7832 (2008).
- Zhong, L. et al. Improved transduction of primary murine hepatocytes by recombinant adeno-associated virus 2 vectors in vivo. *Gene Therapy* 11, 1165–1169 (2004).
- Zhong, L. et al. Impaired nuclear transport and uncoating limit recombinant adeno-associated virus 2 vector-mediated transduction of primary murine hematopoietic cells. *Hum. Gene Ther.* 15, 1207–1218 (2004).
- Zhong, L. et al. A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis. *Mol. Ther.* 15, 1323–1330 (2007).
- Zhong, L. et al. Single-polarity recombinant adeno-associated virus 2 vector-mediated transgene expression in vitro and in vivo: mechanism of transduction. *Mol. Ther.* 16, 290–295 (2008).
- Zhou, L. & Lu, H. Targeting Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 69, 771–776 (2010).
- Zhou, V. W., Goren, A. & Bernstein, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* 12, 7–18 (2011).
- Zhou, X. et al. Adeno-associated virus of a single-polarity DNA genome is capable of transduction in vivo. *Mol. Ther.* 16, 494–499 (2008).

Les vecteurs AAVr jouissent d'une popularité croissante dans le domaine de la thérapie génique et promettent d'apporter un traitement pour de nombreuses maladies dont la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Bien qu'ils soient parmi les vecteurs les plus efficaces pour le transfert de gène *in vivo*, l'optimisation du niveau d'expression du transgène est un défi qu'il faudra relever dans les années à venir pour atteindre un niveau thérapeutique sans avoir à augmenter les doses administrées. Chez les mammifères, l'expression des gènes est contrôlée par des mécanismes épigénétiques dont la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones (HPTM). Dans les muscles des patients atteints de la DMD, une altération sévère de ces mécanismes a été décrite. Plusieurs vecteurs utilisés en thérapie génique peuvent être ciblés par des modifications épigénétiques répressives aboutissant à une diminution de l'efficacité thérapeutique, très peu d'informations sont disponibles en ce qui concerne les vecteurs AAVr. Nous avons décidé de caractériser l'implication des mécanismes épigénétiques sur l'efficacité d'expression d'un transgène apporté par un AAVr dans le muscle de primates et de souris. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'impact des perturbations de ces mécanismes sur l'efficacité du transfert de gène dans le muscle déficient en dystrophine d'un modèle murin de la DMD. Les résultats obtenus suggèrent que les HPTM entraînent probablement une restriction partielle de la transcription du transgène *in vivo* et que cet effet semble être exacerbé dans le muscle dystrophynopathe. A terme, nous projetons d'utiliser des modificateurs chromatiniens adaptés pour contrebalancer cette répression.

**Vecteur Adéno associés / Thérapie génique / Chromatine / Épigénétique / Dystrophie musculaire de Duchenne / Répression transcriptionnelle / Muscle squelettique / *in vivo***

Recombinant AAV vectors have become increasingly popular in the field of gene therapy and promise to provide a treatment to numerous diseases including the Duchenne muscular dystrophy (DMD). Although they are among the most efficient vectors for *in vivo* gene transfer, improving transgene expression level will be a challenge to be face to achieve a therapeutic level without increasing the administered doses. In mammals, gene expression is widely controlled by epigenetic mechanisms, including promoter DNA methylation and histones post-translational modifications (HPTM). Interestingly, severe perturbations of these 2 mechanisms were described in muscles of DMD patients. Though it was reported that a transgene carried by gene therapy vectors can be targeted by repressive epigenetic modifications leading eventually to a reduced therapeutic benefit, there is virtually no information regarding epigenetic regulations of rAAV genome. First, we decided to determine if the efficiency of rAAV mediated gene expression is negatively impacted by epigenetic mechanisms in the muscle of primate and mouse. Second, we investigated the potential involvement of these mechanisms in the dystrophin deficient muscle by comparing healthy and DMD mice model. We obtained results suggesting an involvement of repressive HPTM in a partial restriction of rAAV mediated gene expression *in vivo*. This effect seems to be exacerbated in the dystrophynopathic muscle. Ultimately, we plan to counteract this repression using suitable chromatin modifying drugs.

**Adeno-associated vectors / Gene therapy / Chromatin / Epigenetic / Duchenne muscular dystrophy / Transcriptional repression / Skeletal muscle / *in vivo***