

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année 2004

N°143

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Qualification en **OPHTALMOLOGIE**

Par

**Guylène Le Meur**

née le 25 avril 1974 à Quimper

---

Présentée et soutenue publiquement le 29 Octobre 2004

---

**OPHTALMOLOGIE ET THÉRAPIE GÉNIQUE**

---

Président : Monsieur le Professeur PÉCHEREAU

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur WEBER

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	page 3
<b>Chapitre I : Introduction au transfert de gènes</b> .....	page 5
I) Généralités sur le transfert de gènes .....	page 5
II) Les vecteurs .....	page 8
1.1) Les vecteurs dérivés de virus .....	page 8
1.1.1) Les vecteurs dérivés de Parvoviridae (rAAV) .....	page 8
1.1.2) Les vecteurs dérivés d'Adénoviridae (rAD) .....	page 10
1.1.3) Les vecteurs dérivés des Lentivirus .....	page 13
1.2) Les vecteurs non viraux .....	page 14
1.2.1) Les ADN nus ou les plasmides .....	page 14
1.2.2) Les liposomes .....	page 15
1.2.3) Les conjugués ADN-macromolécules .....	page 15
1.2.4) Avantages & inconvénients des vecteurs non viraux .....	page 15
III) La technique de SiRNA .....	page 17
IV) Le tropisme cellulaire des vecteurs viraux .....	page 18
V) La sécurité de l'utilisation des vecteurs viraux .....	page 20

## **Chapitre II : L'application clinique du transfert de gènes en ophtalmologie**

I) Atteintes cancéreuses ophtalmologiques .....	page 23
II) Pathologies cornéennes .....	page 28
III) Glaucome .....	page 35
IV) Pathologies néovasculaires ophtalmologiques .....	page 42
V) Pathologies rétiniennes .....	page 46
VI) Pathologies du nerf optique .....	page 69
<b>Conclusion</b> .....	page 72
<b>Références bibliographiques</b> .....	page 74

L'ophtalmologie est une spécialité en perfectionnement constant du fait de l'amélioration des modalités diagnostiques, médicales et chirurgicales en rapport avec l'apparition de techniques innovantes.

La thérapie génique est une de ces méthodes innovantes actuellement au banc des essais, qui pourrait prochainement s'appliquer à l'ophtalmologie.

La thérapie génique est l'introduction dans une cellule cible d'un gène d'intérêt thérapeutique dans le but de produire une protéine manquante (cellule déficiente) ou un signal qui conduira à la mort de la cellule (cellule cancéreuse) ou un signal qui allongera la survie cellulaire (cellule dégénérative). L'introduction du gène d'intérêt dans la cellule-cible se fait grâce à une structure dénommée vecteur. Ces vecteurs peuvent être dérivés des virus comme l'adénovirus, les lentivirus ou les parvovirus. Mais ils peuvent aussi provenir de structures non virales comme les liposomes.

Les premiers essais de transfert de gènes, à l'aide de vecteurs, dans des cellules d'origine humaine, ont été réalisés dans les années 70. La radioactivité marquant l'ADN hybride des pseudovirions de polyomes a été retrouvée dans le noyau de cellules embryonnaires humaines quelques heures après transfection (Pradman K. Qasba et al.1971). Le premier essai de transfert de fonction a été réalisé par le transfert de l'activité arginase dans une cellule déficiente de cette fonction, provenant d'un patient atteint d'arginémie. Ceci a été effectué en 1973 par Stanfield Rogers à l'aide du virus du papillome de Shope. Il faut attendre de nombreuses années pour que des cellules d'origine oculaire soient utilisées pour tester le transfert de gènes. En effet, le transfert de gènes dans les cellules post-mitotiques oculaires ne sera réalisé *in vivo* qu'à partir de 1994. Depuis cette date, le comportement des vecteurs au niveau des tissus oculaires a été analysé avec la définition du tropisme cellulaire et l'évaluation du transfert de gènes pour chaque vecteur.

Depuis, les domaines de l'ophtalmologie où la thérapie génique est testée sont nombreux. Le champ d'application de ce traitement est multiple allant de la cancérologie aux atteintes rétiniennes.

La compréhension des phénomènes immunologiques se produisant dans les cancers comme les mélanomes ou dans les rejets de greffes de cornée a permis la transposition de ces connaissances à un domaine comme la thérapie génique. De même, la découverte de

mutations génétiques et leurs connaissances plus précises dans les dégénérescences rétiniennes, dans les dystrophies cornéennes et dans les neuropathies optiques sont à l'origine de l'espoir de réalisation d'un traitement correctif de l'anomalie génétique par thérapie génique. Enfin, le cumul des connaissances biochimiques des mécanismes d'apoptose ou mort cellulaire programmée et des connaissances en thérapie génique ont entraîné l'apparition de projets dont l'objectif est de bloquer, de moduler ce mécanisme de mort comme dans le cadre du glaucome, des neuropathies optiques ou des atteintes rétiniennes dégénératives. Le transfert de gènes, quant à lui, pourrait être un moyen d'apporter aux cellules oculaires, des médicaments via des vecteurs.

Ce travail fait une synthèse des différentes applications possibles de la thérapie génique en ophtalmologie à l'aide des différents vecteurs existants avec comme perspective : le traitement prochain de pathologies ophtalmologiques par thérapie génique.

## I) Généralités sur le transfert de gènes

Il existe un arsenal de textes législatifs encadrant la thérapie génique. Les produits de thérapie génique sont considérés comme des « produits biologiques à effet thérapeutique visant à transférer du matériel génétique » (loi 96-452 du 28 mai 1996- décret 2001-909 du 1<sup>er</sup> octobre 2001). En France, c'est à l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS) que revient la mission de contrôle de la qualité des produits administrés au patient et de contrôle du bien-fondé des essais (Chenivresse et *al.*2003). La thérapie génique somatique est la seule autorisée chez l'homme. La loi de bioéthique de 1994 interdit la thérapie génique germinale.

Les paragraphes suivants sont des bases nécessaires à une meilleure compréhension de la suite du travail.

Tout d'abord, il existe deux modalités de transfert de gènes lors de l'application de la thérapie génique à un organisme vivant :

L'administration **Ex vivo** où des cellules sont prélevées chez l'individu à traiter. Ces cellules sont transfectées in vitro par le vecteur et les cellules transformées par génie génétique sont de nouveau injectées à l'individu.

L'administration **In vivo** où le vecteur est injecté directement à l'individu, soit dans le flux sanguin, soit in situ par délivrance du vecteur directement au niveau du tissu d'intérêt.

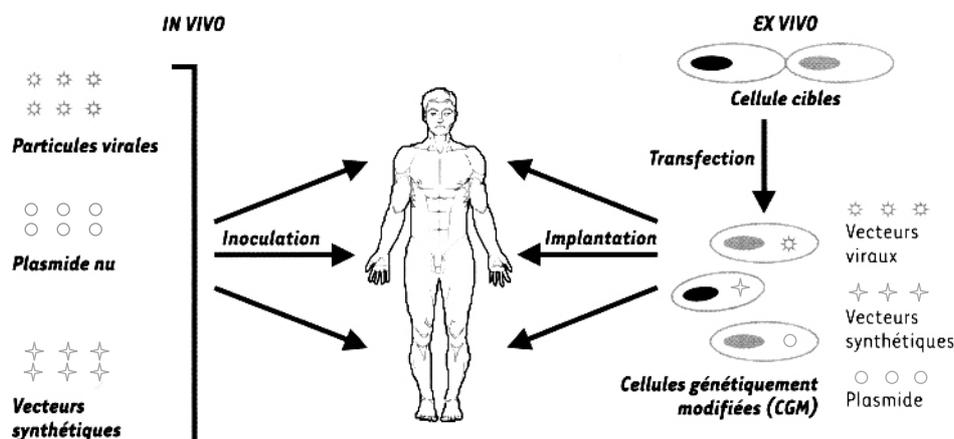


Figure 1: Différentes modalités d'administration des produits de thérapie génique. D'après Chenivresse et *al.*2003.

Ensuite, il existe plusieurs types de possibilités de transfert de gènes. Il est appelé de **substitution** lorsqu'il vise la réparation d'une mutation ponctuelle ou d'une délétion cellulaire afin d'en restaurer l'expression. Comme dans le cas de l'amaurose congénitale de Leber où c'est le gène *rpe65* qui est introduit dans la cellule déficiente (Acland et al.2001. Narfström et al.2003).

Il est appelé de **complémentation** lorsque le complexe transgène-promoteur est introduit dans une cellule pour assurer l'expression d'une protéine au sein ou à proximité d'une cellule.

Il existe une troisième modalité de thérapie génique. Celle-ci supprime l'expression d'une protéine pathologique soit par des ribozymes, soit par des SiRNA (small interfering RNA) soit par des oligonucléotides antisens.

Et enfin, l'ADN qui sera transféré dans une cellule-cible comprend toujours des éléments stables qui sont le gène et un système de contrôle de l'expression de ce gène : le promoteur. Il vient parfois s'ajouter un système régulable pour contrôler l'expression du gène transféré.

Le gène à transférer dans le noyau de la cellule-cible est appelé transgène. Ce transgène, une fois transféré dans une cellule, n'est pas sous le contrôle de la régulation physiologique intracellulaire mais sous le contrôle d'un promoteur qui est transféré de façon conjointe au transgène. Il existe différents types de promoteurs. On dit d'un promoteur qu'il est ubiquitaire s'il est actif dans tous les tissus. C'est le cas pour le promoteur CMV (cytomégalo virus) ou pour le promoteur  $c\beta A$  (chicken  $\beta$ actin). Les promoteurs-tissu spécifiques ne sont actifs que dans un tissu donné. Le promoteur PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) est spécifique des hépatocytes, le promoteur MCK (muscle creatine kinase) est spécifique du muscle squelettique. Il existe des promoteurs spécifiques des tissus oculaires comme le promoteur de la rhodopsine kinase ou le promoteur *rpe65* spécifiques de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) ou comme le promoteur opsin qui lui est spécifique des photorécepteurs (Flannery et al.1997).

Les gènes rapporteurs permettent de vérifier que le système d'expression promoteur-transgène, qui forme la cassette d'expression, fonctionne. En effet, une fois ce complexe internalisé dans une cellule, si le gène est fonctionnel, cela entraîne l'apparition de signaux facilement visualisables ou analysables. Il existe différents gènes rapporteurs. Le gène CAT qui code pour la chloramphenicol acétyl transférase. Cette enzyme transfère un groupe acétyl au chloramphenicol et ensuite la réaction de transfert est analysée par chromatographie. Le

gène *LacZ* est un gène bactérien utilisé pour déterminer l'efficacité de transfection d'un gène ainsi que sa localisation histologique après transfection dans des cellules. Ce gène code pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase qui catalyse l'hydrolyse d'un substrat X-gal, ce qui produit une couleur bleue qui est aisément visualisable au microscope. Le gène rapporteur *gfp* (green fluorescent protein) est un gène qui code pour la protéine GFP, qui est fluorescente lors d'une stimulation lumineuse de longueur d'onde bleue (Zolotukhin et al.1996). Le gène *gfp* est fréquemment utilisé lors des applications en ophtalmologie car il peut être visualisé directement sur l'animal *in vivo* du fait de la transparence oculaire et des systèmes angiographiques.

Pour certains transferts de gènes, notamment pour ceux qui codent pour les facteurs de survie cellulaire, un système d'expression régulable pour une application clinique serait préférable. En effet, cette approche par facteur de survie entraînerait la sécrétion continue d'une protéine, qui pourrait être délétère. Le contrôle de cette expression à l'aide d'un promoteur régulable permettrait de réguler les quantités de protéines produites afin de se positionner dans une fenêtre thérapeutique et d'éviter toute toxicité rétinienne. Plusieurs systèmes de régulation existent et ils ont tous un fonctionnement de base identique. Ils associent toujours une protéine transactivatrice dont l'action de stimulation sur la transcription dépend d'un inducteur et de sites de fixation pour cette protéine transactivatrice placés en amont du promoteur. Différents systèmes inductibles ont été utilisés, *in vivo* avec succès, via des vecteurs viraux : le système rapamycine (Riviera et al.1996., Auricchio et al.2002), le système tétracycline est celui qui est le plus étudié (Gossen et al.1992., Folliot et al.2003. McGee Sanftner et al.2001a). Il existe également des systèmes régulables basés sur la modulation de l'expression des ARNs par les ribozymes qui commencent à être évalués dans la rétine murine (Yen et al.2004).

## II) Les vecteurs

Différentes approches peuvent être envisagées pour vectoriser une séquence d'acide nucléique choisie, appelée transgène, jusqu'au noyau d'une cellule où le matériel génétique doit se traduire en l'expression d'une fonction. Selon la maladie à laquelle on s'adresse et le type cellulaire concerné, les systèmes de vectorisation du transgène, ou « vecteurs » n'obéiront pas aux mêmes contraintes. Les vecteurs existants sont de deux types : soit dérivés de virus, soit non viraux. Voici les différents types de vecteurs utilisés en ophtalmologie.

### 1.1) Les vecteurs dérivés de virus :

Ce qui caractérise le vecteur par rapport au virus dont il dérive est son incapacité à se répliquer après son entrée dans la cellule-cible.

#### 1.1.1) Les vecteurs dérivés de Parvoviridae (rAAV)

Ces Parvoviridae sont subdivisés en deux sous-familles : les parvovirinae (Parvovirus, Erythrovirus et Dependovirus) infectant les vertébrés et les Densovirinae (densovirus, Ictérovirus et Contravirus) infectant les insectes. Les Dependovirus, aussi connus sous le nom de virus adéno-associés ou Adéno-Associated Virus (AAV), sont uniques dans le monde animal car, ils nécessitent la co-infection d'un autre virus auxiliaire ou helper pour assurer leur cycle répliatif. Ceci les rend dépendants du virus helper pour leur prolifération. Ce rôle de virus helper peut être joué par l'adénovirus ou par l'herpès virus ou par le virus de la vaccine. Les AAV sont non pathogènes pour l'homme, une majorité d'individus (70 à 90 % selon les études), a été une fois infectée par l'AAV, sans conséquences pathologiques connues (Tobiasch et *al.* 1998). Huit sérotypes différents ont été isolés chez l'homme et chez différents mammifères (Gao et *al.* 2002). Les AAV sont capables d'infecter des cellules en division mais également des cellules post-mitotiques comme les cellules des tissus oculaires. Leurs particules virales sont non enveloppées, de structures icosaédriques. La capsid est formée par

3 protéines (VP1, VP2 et VP3). Leur génome est composé d'un ADN simple brin de 4680 paires de bases. Il comprend deux gènes codant l'un pour quatre protéines de régulation et de réplication (*rep*), l'autre pour trois protéines de la capsidie (*cap*). Les extrémités de cet ADN sont marquées par la présence d'une structure palindromique de 145 nucléotides, l'ITR (*Inverted Terminal Repeat*) formant une structure en « épingle à cheveux ». Cette structure palindromique est nécessaire à la réplication du virus et à son intégration dans l'ADN de la cellule hôte.

Pour réaliser la construction de vecteurs d'AAV recombinants, les seules structures virales retenues sont les ITR. En effet, le transgène est introduit entre les 2 ITR de l'AAV.

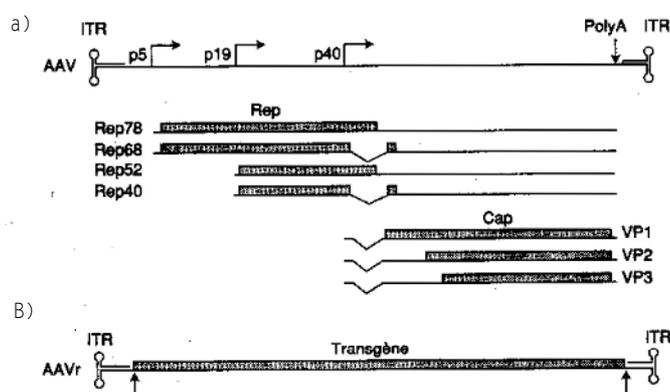


Figure 2: A) structure du génome de l'AAV. B) structure du vecteur recombinant. D'après A Salvetti. 2000.

Les premières méthodes de production de particules virales recombinantes reposaient sur la co-transfection de cellules avec un plasmide contenant les gènes *rep* et *cap* et un plasmide porteur de la cassette d'expression du transgène clonée entre les 2 ITR, secondairement infectées par l'adénovirus. Cette méthode de production entraînait la contamination des préparations par des structures adénovirales ainsi qu'un titre trop faible. Depuis la méthode a été modifiée par deux fois pour diminuer ces contaminants. Tout d'abord, en réalisant une tri-transfection où les fonctions adénovirales étaient fournies par un plasmide séparé (Salveti et al., 1998) puis en créant un plasmide (pDG) qui porte les fonctions adénovirales et les fonctions AAV (*rep* et *cap*) (Grimm et al., 1998). La purification de la préparation virale se

fait tout d'abord par une séparation des AAV recombinants d'intérêt sur gradient de Iodixanol (Zolotukhin et *al.*,1998) suivie d'une purification sur colonne d'héparine.

L'inconvénient majeur des AAV est leur faible capacité de clonage, il est impossible d'introduire un transgène d'une taille supérieure à 4,7 Kb. Les gènes doivent donc être de petite taille sous le contrôle de séquences promotrices également réduites.

La plupart des individus possèdent des immunoglobulines dirigées contre AAV2, cependant la plupart de ces anticorps ne sont pas neutralisants, et ne devraient pas perturber l'efficacité des vecteurs. Désormais des vecteurs ont été développés à partir de différents sérotypes d'AAV et devraient permettre de résoudre le problème de la réponse immunitaire par injection de différents sérotypes chez le patient.

### 1.1.2) Les vecteurs dérivés d'Adenoviridae (rAD)

Les adénovirus se classent en deux genres en fonction de leur origine: Aviadenovirus (aviaires) et Mastadenovirus (mammifères). Ils sont capables d'infecter les tissus lymphoïdes de manière latente puis d'être réactivés ultérieurement. Ce sont des virus non enveloppés de forme icosaédrique. La particule virale est formée par un core entouré d'une capsid. La capsid est composée de 252 capsomères: 240 hexons et 12 pentons au sommet de l'icosaèdre. Le core du virus est formé par l'association de protéines et du génome viral. Ce génome est constitué d'un ADN double brin linéaire de 36Kb, bordé par deux extrémités terminales inversées (ITR) qui sont les origines de réplication. Le cycle viral débute par l'entrée des adénovirus dans la cellule hôte. Cette entrée se fait par endocytose suite à l'attachement du virus à des récepteurs cellulaires par l'intermédiaire des pentons de la capsid. À la suite de l'entrée du virus dans la cellule, l'ADN viral atteint le noyau, ce qui permet aux phases d'expression protéique de débiter. Il existe deux phases d'expression protéique: l'une précoce (débutant environ 2 heures après l'infection) et l'autre tardive (débutant 12 heures après l'infection). Elles se produisent respectivement avant et après la réplication de l'ADN. Parmi les gènes à expression précoce (désignés par la lettre E pour early), le gène E1A, qui est un gène très précoce, contrôle en *trans* l'expression de tous les autres gènes précoces. E1B, en association avec E1A, permet l'entrée de la cellule infectée dans le cycle cellulaire et bloque l'apoptose. E2 code pour les protéines impliquées dans la

réplication de l'ADN. E3 code pour des protéines de modulation de la réponse cellulaire à l'infection. E4 participe à la réplication de l'ADN viral et favorise l'expression des gènes tardifs. La phase tardive aboutit à la formation de 1000 à 10000 virions dans le noyau de la cellule infectée et à la mort de la cellule 30 à 40 heures après le début de l'infection.

Il existe une cinquantaine de sérotypes différents, mais ce sont en particulier les sérotypes 2 et 5 qui ont servi de base à la génération de vecteurs de thérapie génique.

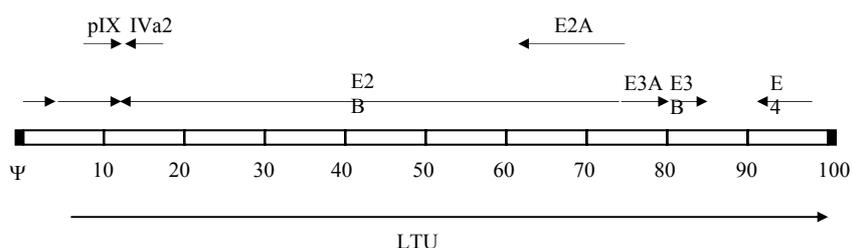


Figure 3: Organisation du génome adénoviral. Les flèches représentent les unités de transcription : trait fin pour les gènes précoces (E1, E2, E3, E4, pIX et IV2a), trait gras pour l'unité de transcription codant pour toutes les protéines tardives (LTU). Ψ représente le signal d'encapsidation et ■ les ITR (inverse terminal repeat) qui sont les origines de réplication. D'après Benihoud et *al.*2000.

Le développement des vecteurs non réplcatifs dérivés d'adénovirus repose sur la délétion d'un ou plusieurs gènes précoces notamment E1A. Plusieurs générations de vecteurs ont vu le jour. Dans le premier type de vecteurs, la région E1, qui contrôle le déclenchement de la transcription et de la réplication du cycle viral avait été déléetée. Les virus déléetés devaient alors être produit dans des lignées cellulaires complémentantes comme les 293, qui sont capables de fournir en *trans* l'activité E1. Il était également possible de déléeter la région E3 non nécessaire à la réplication virale afin d'augmenter la capacité de clonage qui était alors de 7,5kb. L'utilisation de vecteurs ΔE1 (déléetés en E1) ou ΔE1E3 (déléetés en E1 et en E3) est limitée car ils possèdent un risque biologique. En effet, il peut survenir un phénomène de recombinaison homologue entre le génome viral et le génome cellulaire de la lignée complémentante contenant l'activité E1. Cette recombinaison peut conduire à la réintégration

de la région E1 dans le génome adénoviral et par conséquent à l'obtention de particules virales capables de se répliquer chez l'homme. Ce risque a été contrôlé avec l'obtention de lignée de complémentation nouvelle ne contenant pas d'homologie avec le génome des adénovirus recombinants (Fallaux et *al.* 1998). De même, il existe un risque de complémentation, *in vivo* par un adénovirus sauvage pour tous les types de vecteurs adénoviraux créés. Conceptuellement, il est possible d'imaginer que les fonctions défectives virales puissent être complémentées lors de l'infection d'un individu traité par un virus sauvage. L'utilisation de vecteurs adénoviraux  $\Delta E1E3$  est également marquée par l'apparition de problèmes d'immunogénicité contre le vecteur car la région E3 est impliquée dans l'échappement du virus au système immunitaire. Afin d'augmenter la capacité de clonage, de contrôler l'expression des gènes viraux et la production de particules compétentes pour la répllication, des délétions supplémentaires des gènes viraux ont été réalisées. Tout en conservant E3, des adénovirus délétés pour E1 et E4 ont été produits grâce à l'obtention de lignées capables de transcomplémenter les activités E1 et E4. La région E4, indispensable au cycle viral, code pour des facteurs permettant une transactivation optimale de E2A et la maturation correcte du pré messager tardif qui spécifie la quasi-totalité des protéines de structure des virions. Ces vecteurs  $\Delta E1E4$  permettent un transfert de gènes plus durable avec une réduction de la réponse immunitaire, sans toutefois l'annuler totalement (Gao et *al.* 1996). La dernière génération de vecteurs d'adénovirus repose sur la délétion de tous les gènes viraux dans le but de réduire l'immunogénicité du vecteur en annulant complètement la synthèse de protéines virales par les cellules transduites, tout en augmentant ses capacités de clonage en l'amenant alors à 35 kb. Ils sont appelés vecteurs dépendant de virus auxiliaire ou « gutless » (Hillgenberg et *al.* 2001). Le système de production repose sur l'utilisation d'un virus auxiliaire qui apporte en *trans* toutes les fonctions nécessaires à la production et à l'amplification des vecteurs recombinants défectifs. La difficulté est l'élimination du virus auxiliaire des lots de vecteurs recombinants. La réponse inflammatoire observée après injection de ces vecteurs semble diminuée (schiedner et *al.*1998; Hsich et *al.*2002) sans toutefois être nulle. Les réponses inflammatoires peuvent être un facteur limitant d'utilisation de ces vecteurs malgré l'avantage de leur grande capacité de clonage.

### 1.1.3) Les vecteurs dérivés des lentivirus

Les lentivirus font partie de la famille complexe des rétrovirus. Ils sont identifiés comme responsables de maladies à évolution lente où l'infection évolue par étapes et s'accompagne d'une immunosuppression progressive. Ils sont retrouvés chez de nombreuses espèces : le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) chez le singe, le virus de l'immunodéficience bovine (BIV), le virus de l'anémie infectieuse chez le cheval (EIAV), le virus de l'immunodéficience féline (FIV) et bien entendu, les virus de l'immunodéficience acquise (VIH-1 et VIH-2) chez l'homme.

Ce sont des virus enveloppés à ARN simple brin positif. Lors du cycle d'infection, cet ARN simple brin est rétro-transcrit en ADN double brins, grâce à une ADN polymérase ARN dépendante. Cet ADN forme alors le génome proviral qui s'intègre dans le génome de la cellule-cible. Une fois intégré dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte, le génome proviral est transcrit comme n'importe quel gène de la cellule et les nouveaux virions, assemblés dans le cytoplasme, se libèrent par bourgeonnement à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ces rétrovirus ont une structure sphérique de 80 à 130 nm de diamètre. Ils sont enfermés dans une enveloppe constituée d'une membrane lipidique, issue du bourgeonnement de la membrane plasmique, hérissée de spicules (glycoprotéines virales) se projetant à l'extérieur. À l'intérieur de cette enveloppe se trouve le core. Celui-ci est constitué d'une capsidie protéique icosaédrique qui protège le génome constitué de deux ARN monocaténares positifs. Le génome comprend trois gènes majeurs retrouvés dans tous les rétrovirus et toujours alignés selon ordre : *gag-pol-env*. Le gène *gag* (pour *group-specific antigen*) code pour les protéines de la nucléocapsidie et pour des polypeptides internes. Le gène *pol* (pour *polymérase*) code pour les deux enzymes nécessaires au cycle de réplication du virus : RT (rétrotranscriptase) et IN (intégrase). Le gène *env* (pour *enveloppe*) code pour les protéines formant l'enveloppe du virion.

Les lentivirus présentent dans leur génome d'autres transcrits codant pour des protéines accessoires. Ces protéines accessoires, codées par le génome viral, permettent une régulation du cycle viral propre au type de lentivirus. Cette capacité de régulation intrinsèque des lentivirus serait essentielle au mode de vie de ce virus en permettant son association à long terme avec la cellule hôte et la génération d'infection chronique et active.

Les vecteurs recombinants dérivés des lentivirus sont produits après une co-transfection transitoire de 3 plasmides dans des cellules 293T, permettant d'apporter dans un même

environnement intracellulaire tous les éléments nécessaires à la production de vecteurs. Une des constructions plasmidiques assure les fonctions auxiliaires, excepté le gène de l'enveloppe. Un autre plasmide code pour l'enveloppe du vecteur lentiviral. Le troisième plasmide est porteur du transgène. Après transfection transitoire des trois plasmides, le surnageant est récolté puis concentré par ultracentrifugation.

Les rétrovirus demeurent à ce jour le seul vecteur capable d'assurer une modification génétique stable qui se transmet aux générations successives de cellules filles.

Le grand intérêt de ce groupe de virus pour un usage en transgénèse et thérapie génique réside dans leur capacité à intégrer leur matériel génétique dans le génome de cellules ne se divisant pas.

## **1.2) Les vecteurs non viraux**

Ce sont des systèmes non biologiques qui reposent pour la plupart sur la capacité de la cellule à internaliser par endocytose des macromolécules.

Il existe différentes méthodes. Je n'aborderais que ceux qui sont les plus utilisés notamment dans le domaine de recherche en ophtalmologie.

### 1.2.1) Les ADN nus ou les plasmides

Le gène d'intérêt sous le contrôle de son promoteur est directement mis au contact avec les cellules cibles, le plus souvent sous forme de plasmide, c'est-à-dire, sous forme d'ADN circulaire. Le gène est internalisé grâce au mécanisme d'endocytose. Un faible pourcentage d'ADN arrive à rejoindre le noyau cellulaire où la transcription peut alors débiter. Le gène transcrit puis traduit permet la libération des protéines d'intérêts dans le cytoplasme des cellules. L'efficacité d'un tel modèle est très faible et est surtout applicable *in vitro*.

### 1.2.2) Les liposomes

Les liposomes sont des sphères composées de lipides contenant le gène à transférer. L'ADN chargé négativement se lie aux liposomes chargés positivement. En faisant varier le pourcentage d'ADN et de lipides présents, les complexes ADN-liposomes sont soit anioniques ou soit cationiques. Cette modification de charge permet de modifier leur captation cellulaire et leur ciblage cellulaire. Ensuite, on peut réaliser un ciblage cellulaire encore plus précis en intégrant dans la membrane lipidique des molécules présentées vers l'extérieur du liposome. La reconnaissance de ces molécules rajoutée est précise car elle se fait par l'intermédiaire d'un récepteur présent à la surface de la cellule.

### 1.2.3) Les Conjugués ADN- macromolécules

Ce sont des complexes associant l'ADN à transférer, des macromolécules comme la polylysine (polypeptide basique) et parfois, un ligand récepteur spécifique. Ils sont également dénommés : polycations. Ils ne permettent qu'une expression transitoire du transgène.

### 1.2.4) Avantages & inconvénients des vecteurs non viraux

Avantages :

Peu de réactions immunitaires et de réactions inflammatoires sont induites contre de tels vecteurs. Il n'y a pas de limitation de taille du transgène. La construction de tels vecteurs est assez facile et accessible avec un coût de revient plus faible que pour des vecteurs viraux. Les lots cliniques sont faciles à caractériser.

Inconvénients :

Ces vecteurs ont une efficacité faible, surtout *in vivo*. Le gène doit pénétrer dans le noyau des cellules visées pour être efficace, ce qui est peu fréquent. Malgré l'emploi de protéines « d'adressage », ces techniques restent pour le moment peu spécifiques. L'expression du transgène est transitoire.

Voici un tableau comparatif des avantages, des inconvénients, des caractéristiques des différents vecteurs existants.

**Table 1. A comparison of vectors in use for clinical gene transfer (tab001jfo)**

Vector classification	Application for human use		Expression	Advantages	Disadvantages
	Ex vivo	In vivo			
<b>Viral</b>					
Recombinant Moloney murine leukaemia virus (MMLV; retrovirus)	+++	++	Stable	No immune response against the viral vector; integrates	Only low viral titres achieved; transduces only dividing cells
Recombinant lentivirus (retrovirus)	+	+	Stable	Transduces non-dividing cells; can target CD4 <sup>+</sup> T cells	Potential safety risk
Recombinant adenovirus	+++	++	Transient	High viral titre; wide host-cell range	Immunogenic; does not integrate; short-term transgene expression
Recombinant adeno-associated virus	+++	++	Stable	Little immunogenicity; integrates	Lower transduction efficiency than adenovirus
Recombinant herpes simplex virus (HSV)	++ (research)	++	Not known	Can target neuronal tissue	Safety concerns
Recombinant vaccinia virus	+/-	+++	Transient	Suitable for cancer gene therapy	Safety concerns
<b>Non viral</b>					
DNA–ligand conjugates	-	++	Transient	Cell-specific targeting	
Liposomes and virosomes	++	+++	Stable or transient	Cell-specific targeting; efficient transfection	
Direct DNA injection	-	++	Transient	Simple	Only short-term expression achieved
Ballistic delivery (gene gun)	++ (research)	+/-	Transient	Simple	Requires 'exposed' tissues or cells
Abbreviations used: '+++ = major application; '++ = some application; '+/-' = limited application; '-' = no application.					

Tableau 1 : Récapitulatif des caractères des différents vecteurs, de leurs avantages et de leurs des inconvénients. D'après <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>

### III) La technique de SiRNA (small interfering RNA ou interférence ARN) :

Il est impossible de ne pas évoquer les SiRNA. C'est une technique de plus en plus utilisée notamment dans le domaine de recherche en ophtalmologie.

Les siRNA sont des petits « bouts » d'ARN qui peuvent être utilisés tel quel ou en intégrant le gène codant pour eux dans un plasmide ou un vecteur.

L'interférence ARN est un processus post-transcriptionnel, déclenché par l'introduction d'ARN double brin homologue, qui mène à l'invalidation d'un gène de manière séquence-spécifique. Cette invalidation survient par un phénomène de destruction des mRNA homologues des siARN après leur appariement. Les fragments double brins d'une vingtaine de nucléotides (siRNA), une fois qu'ils ont été introduits dans la cellule, s'assemblent avec des enzymes pour former le complexe RISC. Celui-ci dissocie les siRNA en fragments simple brin et dirige l'opération de reconnaissance de l'ARN messager cible, qui est alors clivé. Par conséquent, l'ARN ne peut être transcrit et les protéines ne sont pas produites.

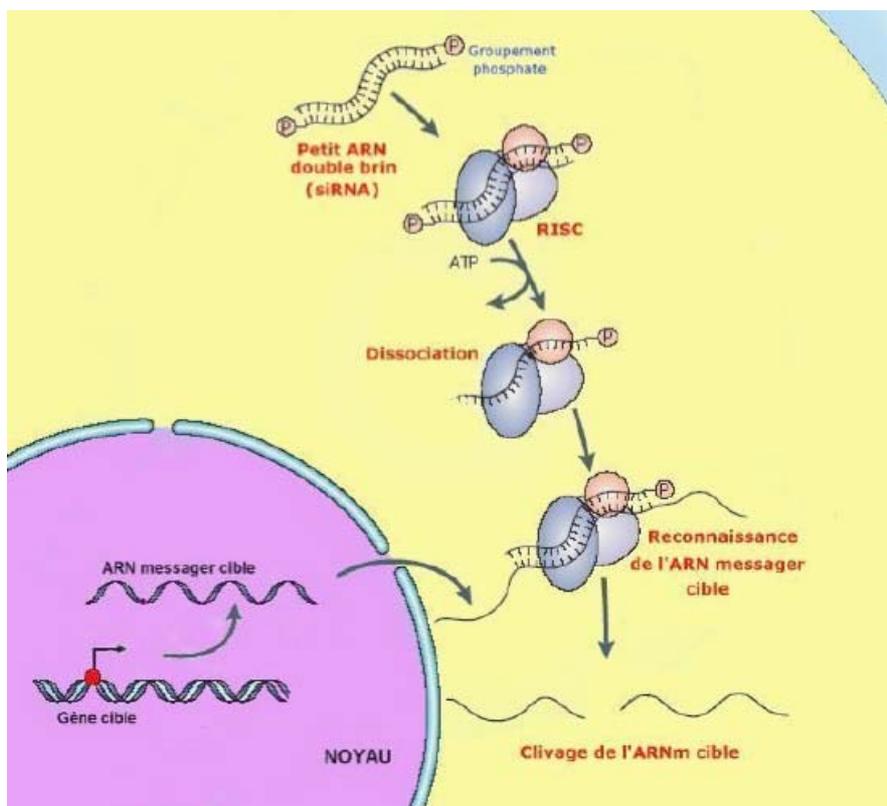


Figure 4: Mécanisme d'action des siRNA. D'après <http://www.vivantinfo.com>.

#### **IV) Le tropisme cellulaire des vecteurs viraux**

Les différents vecteurs ne transduisent pas aussi efficacement les différents types cellulaires oculaires. Cette facilité à atteindre plus ou moins un type cellulaire particulier est appelée tropisme cellulaire.

Les vecteurs adénoviraux peuvent infecter les cellules en division ou non. Ils permettaient une transduction efficace de nombreuses cellules oculaires. Toutes les structures de la cornée sont une cible potentielle (Tsubota et *al.*1998). Ce même vecteur transduit efficacement les cellules du trabéculum (Borrás et *al.*2001). Quant aux cellules rétiniennes, la majorité d'entre elles sont transduites par ce vecteur : les photorécepteurs (Anglade et *al.*1998), les cellules ganglionnaires (Bennett et *al.*1994), les cellules de Müller (Fukuhara et *al.*1998) et les cellules de l'EPR (Li et *al.*1994). Ce sont surtout les vecteurs dérivés de virus de sérotype 5 qui ont été testés au niveau des yeux. L'expression du transgène dans la rétine avec un tel vecteur n'est pas très stable dans le temps, mais elle survient assez rapidement car elle apparaît de 2 jours à une semaine après une injection sous rétinienne (Bennett et *al.*1998., Jomary et *al.*1994).

Les vecteurs dérivés de l'adéno-Associated virus les plus utilisés et les plus étudiés sont issus du sérotype 2. Les rAAV sont peu efficaces pour transduire le trabéculum (Borrás et *al.*2002) ainsi que la cornée excepté les kératinocytes stromaux qui le sont après kératotomie lamellaire (Mohan et *al.*2003). Au niveau de la rétine, de multiples types cellulaires peuvent être transduits par ce type de vecteur. Les cellules ganglionnaires le sont après une injection intravitréenne. Les photorécepteurs, l'EPR, quelques cellules bipolaires (cellules de Müller, cellules amacrines) ainsi que quelques cellules horizontales expriment le transgène après la réalisation d'une injection sous rétinienne (Ali et *al.*1996, Bainbridge et *al.*2003).

Au niveau de la rétine, il existe une expression stable d'un transgène rapporteur au niveau des photorécepteurs ou des cellules de l'EPR après injection sous rétinienne avec un minimum de réaction inflammatoire et de toxicité dans de nombreuses races animales comme les rongeurs, les chiens et les primates (Bennett et *al.*1999., Dudus et *al.*1999., Sarra et *al.*2002).

Outre le tropisme cellulaire existant en fonction des différents types d'injections de la solution virale, les rAAV présentent un tropisme cellulaire différent en fonction du sérotype de capsid utilisé pour fabriquer le vecteur. En effet, de même que les virus sauvages présentent des tropismes cellulaires différents, il a été montré que les sérotypes d'adéno-associated virus recombinants possèdent un tropisme cellulaire *in vitro* et *in vivo* particulier (Chiorini et al.1997., Chiorini et al.1999., Chao et al.2000). Ce tropisme cellulaire particulier en fonction de la capsid virale, a uniquement été testé pour le tissu rétinien. Après injection sous rétinienne du vecteur, le rAAV de sérotype 1 transduit les cellules de l'EPR, quelques photorécepteurs, les cellules de Müller alors que le rAAV de sérotype 5 transduit les photorécepteurs et l'EPR (Auricchio et al.2001., Rabinowitz et al.2002). Le rAAV de sérotype 6 transduit uniquement les cellules de l'EPR (Yang et al.2002), il en est de même pour le sérotype 4 du rAAV (Weber et al.2003).

Auricchio et al ont montré que le choix de la capsid virale influençait également le délai d'apparition de l'expression du transgène. Au niveau de la rétine, le sérotype 1 permet une expression rapide du transgène en 24/48 heures, elle apparaît peu après pour le sérotype 5 en trois jours et en deux semaines pour le sérotype 4 (Weber et al.2003).

Les vecteurs dérivés du virus HIV, qui font partis de la famille des lentivirus transduisent l'endothélium cornéen après injection intracaméculaire de façon efficace ainsi que les cellules du trabéculum (Bainbridge et al.2001). L'injection sous rétinienne de ce vecteur portant le transgène rapporteur *gfp* chez la souris retrouve des cellules fluorescentes dans les cellules de l'EPR et de façon moindre dans les photorécepteurs (Bainbridge et al.2001). Quand il est injecté directement dans le vitré, les cellules ganglionnaires et les cellules bipolaires deviennent GFP positives (Igarashi et al.2003).

## V) La sécurité de l'utilisation des vecteurs viraux

Des contrôles généraux des solutions virales sont réalisés. Ils portent sur la stérilité des produits avec une recherche de contaminants bactériologiques et fongiques. La détection de mycoplasmes et la recherche d'endotoxines sont également réalisées. Pour une application clinique, la vérification de l'intégrité du matériel génétique transféré se fera sur chaque lot clinique par séquençage, technique qui pourra garantir qu'aucun réarrangement n'est apparu au cours de la production (Chenivresse et *al.*2003).

La production des vecteurs viraux représente une des étapes cruciales, quant aux exigences de sécurité. La possibilité de produire des particules virales ayant des capacités répliquatives est un problème majeur. Le système de production actuel des AAV, avec l'absence d'utilisation d'adénovirus permet un système de production répondant à ces exigences. Pour les vecteurs dérivés des lentivirus le risque est minimal mais non exclu.

Lors de la production de virus recombinant, la solution finale contient un grand nombre de particules virales vides qui conditionnent la toxicité du lot viral par le biais d'une réponse immunitaire. La purification des solutions virales a pour but de diminuer voire d'effacer toute trace de particule virale vide sans que les produits purifiants utilisés ne soient toxiques.

Un autre problème de sécurité lié à l'utilisation des vecteurs viraux est la mutagenèse d'insertion. En effet, le propre des vecteurs lentiviraux est de s'intégrer dans l'ADN de la cellule hôte. Or cette intégration n'est pas dirigée, ce qui peut parfois avoir des conséquences dramatiques. C'est un problème de ce type qui s'est produit chez deux enfants atteints du déficit immunitaire sévère lié au chromosome X (SCID-X1) qui avaient été traités par thérapie génique. 8 patients atteints de ce déficit avaient été traités à l'hôpital de Necker de Paris par greffe de cellules souches génétiquement modifiées *ex vivo* par un vecteur dérivé des rétrovirus (MLV). Alors que, la guérison de ces patients avait été obtenue, une prolifération anormale de cellules de la lignée lymphoïde est apparue chez 2 des 8 enfants traités. L'origine de cette prolifération est la mise en évidence d'une mutagenèse insertionnelle dans un gène LOM2, gène qui contrôle la multiplication des lymphocytes durant la vie fœtale (Hacein-Bey-Abina S. et *al.*2003. McCormack et *al.*2003). L'intégration des AAV recombinants n'est pas évidente *in vivo*. Elle a juste été mise en évidence avec l'AAV sauvage *in vitro* avec une

intégration au niveau du chromosome 19 humain (Linden et *al.*1996). Au niveau des tissus oculaires, cette intégration du gène délivré par des AAV recombinants n'a pas été recherchée car pour le moment les moyens techniques nécessaires à cette recherche n'existent pas.

L'utilisation du virus VIH est redoutée dans les essais cliniques bien que les progrès dans la configuration des vecteurs lentiviraux les rendent plus sur, d'où le développement de lentivirus non humains comme outil de vectorologie. Toutefois, il a été montré que ces vecteurs dérivés des lentivirus non humains pouvaient être mobilisés et propagés par le VIH sauvage (Evans and Garcia.2000). Il n'y a pas d'essais cliniques chez l'homme utilisant des dérivés des lentiviraux.

De plus, il est nécessaire de réaliser des études complètes de toxicité des vecteurs chez des modèles animaux le plus proche de l'homme notamment chez le primate non humain. Il faut garder à l'esprit ce qui a marqué le monde de la thérapie génique l'année 1999 aux Etats-Unis. Cette année sera marquée par la mort d'un patient de 18 ans, porteur d'un déficit enzymatique (déficit en ornithine transcarbamylyase) qui était équilibré sous traitement; la dose d'adénovirus utilisée était la dose la plus importante utilisée chez l'homme ( $4.10^{13}$  particules/ml).

Pour certains tissus oculaires, des stratégies ont été définies pour mener les essais. Il a été défini quatre conditions spécifiques en vues des essais cliniques dans les dégénérescences rétiniennes héréditaires (Hauswirth et Beaufre.2000)

Ces 4 conditions définissent les conditions minimales qui doivent être remplies par le vecteur avant d'envisager une utilisation en clinique les vecteurs :

- 1) la structure anatomique présentant l'anomalie génétique doit pouvoir être ciblée par le vecteur. La cible peut être la cellule affectée ou les cellules de voisinage.
- 2) La transduction doit être efficace : le vecteur doit permettre de faire entrer dans la cellule un nombre de copies suffisant de gène. L'expression du transgène doit être suffisamment importante pour permettre l'obtention de taux thérapeutique suffisant de l'agent.
- 3) L'expression doit être stable dans le temps.

- 4) La toxicité intrinsèque du transfert de gène ne doit pas être dommageable pour les cellules cibles et les cellules avoisinantes.

Actuellement les vecteurs adénoviraux ne remplissent pas la troisième condition y compris la dernière version « gutless ». bien qu'il ait été montré que les AD de ce type pouvaient s'intégrer de façon aléatoire (Mitani and Kubo.2002) dans une faible proportion (<1%), le transgène reste épisomal avec une extinction progressive de l'expression.

## I) Atteintes cancéreuses ophtalmologiques

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

Plusieurs atteintes cancéreuses ophtalmologiques font actuellement l'objet de recherche dans le domaine du transfert de gène. Les vecteurs les plus utilisés pour ces études dans le domaine de la cancérologie sont des dérivés de l'adénovirus. La réponse immune que ces vecteurs engendrent peut faire partie de la lutte anti-tumorale.

Une des tumeurs cibles, étudiée pour un traitement par transfert de gènes est le rétinoblastome. Le rétinoblastome est la tumeur intraoculaire la plus fréquente chez l'enfant. De la naissance à l'âge de 4 ans, il représente 6,5% de tous les cancers (Zofragos et al.2002). Actuellement, 95% des enfants atteints de rétinoblastome sont sauvés. L'amélioration du taux de survie a été obtenue grâce à une prise en charge plus précoce et à une diversification des modalités de traitements. L'énucléation, la radiothérapie externe, la brachythérapie, la photocoagulation et la chimiothérapie sont les traitements classiques du rétinoblastome. Ces dernières années, des nouvelles stratégies thérapeutiques ont été développées comme la thermochimiothérapie, la thermothérapie, la chimioréduction ou chimiothérapie néoadjuvante permettant un traitement conservateur dans la majorité des atteintes cancéreuses de rétinoblastome. Le protocole de traitement des tumeurs massives (2/3 du volume oculaire avec plus au moins essaimage vitréen) comprend la chimioréduction ou la radiothérapie ou l'énucléation (Balmer et al.2002). Chacune des techniques utilisées pour le traitement de ces tumeurs massives est marquée par l'apparition de complications. L'énucléation, indiquée dans les cas où les chances de recouvrer une fonction visuelle utile sont nulles ou lors de risque réels de dissémination, est marquée par une complication majeure qui survient dans 1,6% à 28% cas ; à savoir l'exposition de l'implant (Lee et al.2000). La radiothérapie externe, longtemps la pierre angulaire du traitement conservateur du rétinoblastome présente des effets secondaires nombreux et parfois dramatiques. L'apparition d'une cataracte post-radique ne pose pas de problème car elle peut être traitée à distance du traitement anticancéreux. Mais l'apparition d'une rétinopathie radique, d'une neuropathie radique, d'un décollement de rétine, d'une hypoplasie du massif facial ou d'une seconde tumeur maligne non oculaire laisse les thérapeutes sans ressources. La mortalité secondaire par apparition d'une seconde tumeur

non oculaire chez l'enfant atteint d'un rétinoblastome bilatéral traité par radiothérapie externe est de 30% à 40 ans (Balmer et *al.* 2002). En effet, la particularité des patients atteints de rétinoblastome réside dans leur capacité à développer des tumeurs secondaires radioinduites voire chimioinduites. C'est cette particularité, la fréquence de cette tumeur et la recherche de l'amélioration du confort de vie des patients traités, qui ont amené différents chercheurs à considérer cette pathologie comme susceptible de bénéficier du transfert de gène. En effet, dans le domaine de la cancérologie, le transfert de gènes est considéré comme une thérapeutique d'avenir soit en introduisant dans la cellule tumorale un gène suicide, soit en stimulant la réponse immunitaire. Pour le rétinoblastome c'est la thérapie du gène suicide qui est utilisée. Un vecteur adénoviral non répliquatif délivre une thymidine kinase de l'herpès simplex (TK) à sa cellule cible tumorale. Les cellules transduites par ce gène sont exposées dans un second temps au substrat de l'enzyme virale : le ganciclovir (GCV) administré par voie intraveineuse. Ce substrat est métabolisé par la thymidine kinase de l'herpès virus puis par des enzymes cellulaires en analogues des purines. Ces analogues des purines vont s'incorporer dans les chaînes d'ADN au cours de la synthèse de l'ADN pour bloquer la réplication car les ADN polymérase ne peuvent répliquer l'ADN contenant cet analogue nucléosidique phosphorylé. Les mitoses sont interrompues et la cellule cancéreuse meurt. Les cellules eucaryotes sont incapables de métaboliser le ganciclovir et donc de produire des dérivés toxiques. Le métabolite toxique est capable de diffuser aux cellules voisines, élargissant l'effet thérapeutique aux cellules non transduites ou peu accessibles.

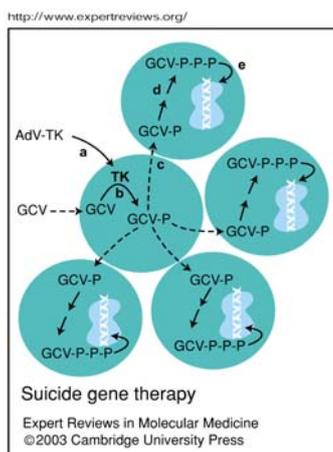


Figure 5 : Mécanisme de la thérapie du gène suicide. Thymidine kinase de l'herpès (TK), vecteur adénoviral codant pour TK (AdV-TK), ganciclovir (GCV), ganciclovir phosphorylé (GVC-P) ou (GVC-PPP). D'après <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>

Actuellement, un essai clinique de phase I, utilisant ce principe, est en cours au Etats-Unis. 8 jeunes patients porteurs d'un rétinoblastome avec un essaimage vitréen ont été inclus. L'administration du vecteur adénoviral de sérotype 5 porteur de la thymidine kinase de l'herpès simplex s'est fait par injection intracaméculaire avec secondairement l'administration de ganciclovir en intraveineux. Il y a eu de 1 à 5 traitements par patient avec un total de 22 injections. Les titres des préparations virales étaient différents ( $10^8$ ,  $10^9$  et  $10^{10}$  particules infectieuses/ml). Les effets secondaires observés ont été en fonction du titre de la solution virale. Plus le titre était élevé, plus une inflammation était notée. Les résultats obtenus ont été l'éclaircissement du vitré sans disparition de la tumeur. 2 des 8 patients ont du être énucléés car la tumeur avait augmenté de volume. L'inflammation retrouvée est expliquée par l'auteur comme provenant de la réaction de lyse des cellules tumorales suite au traitement et également comme provenant du vecteur adénoviral (Hurwitz R.L. et *al.*2004). En effet, les vecteurs dérivés des adénovirus sont à l'origine de réponses immunitaires après une administration intraoculaire (Reichel et *al.*1998).

Un autre type d'atteinte cancéreuse ophtalmologique a été étudiée : le mélanome uvéal. Le cancer ophtalmologique considéré comme le plus fréquent chez les adultes devant les métastases oculaires est également au centre des recherches et des stratégies thérapeutiques utilisant le transfert de gènes. Le mélanome uvéal a une incidence de 3 à 4 cas par 100 000 adultes par an (Zofragos et *al.*2002). Le taux de survie à 5 ans pour un patient atteint d'un mélanome uvéal est comparable à celui des mélanomes cutanés à savoir 75%. La particularité du mélanome uvéal est de métastaser de façon préférentielle au foie par voie hématogène. Dans la série de l'hôpital Jules Gonin à Lausanne, où les patients ont bénéficié d'un suivi prospectif régulier après le traitement de la tumeur primitive, 91,4% des 338 malades étudiés présentaient des métastases hépatiques, 16% des métastases pulmonaires et 11% des métastases osseuses (Zofragos et *al.*2002). C'est l'atteinte hépatique qui semble être le facteur limitant de la survie. En effet, pour les patients atteints d'une métastase hépatique seul 15% sont encore en vie 1 an après la découverte de cette atteinte alors que pour les rares cas où la métastase est autre que le foie 75% des patients sont en vie à 1 an. Ces données laissent supposer que si la métastatisation hépatique était contrôlée, la survie pourrait être améliorée et correspondre à celle de l'atteinte extra-hépatique. Les traitements actuels des métastases hépatiques des mélanomes uvéaux sont la chirurgie, la chimiothérapie et la chimio-embolisation. Chacune de ces modalités thérapeutiques reste d'une utilisation encore anecdotique. Pour la chirurgie, il n'y a pas d'étude prospective. Les résultats des études

montrent une amélioration de la survie mais il existe un biais de recrutement des patients qui sont minutieusement choisis avant de bénéficier d'une telle chirurgie. Pour la chimiothérapie, le protocole choisi est celui des mélanomes cutanés. Il utilise du DTIC (dacarbazine) associé ou non à d'autres molécules chimiothérapeutiques. Aucune des études ayant choisi ce protocole chimiothérapeutique n'a pu mettre en évidence une efficacité de ce traitement intraveineux (Albert et al.1996). La chimio-embolisation associant perfusion de cisplatine et de microparticules de polyvinyle injectés dans les vaisseaux hépatiques est la seule combinaison ayant montré une efficacité (Bedikian et al.1995). Différents éléments laissent supposer que le mélanome oculaire peut-être contrôlé en partie par des mécanismes immunitaires. L'observation clinique révèle l'apparition tardive de métastases tardives après traitement de la tumeur primaire. Cela suggère un certain contrôle immunologique. De même, la présence d'une infiltration des métastases par des cellules immunitaires suggère un mécanisme immunologique. Il est connu que l'immunité peut être modulée par différents facteurs. D'ailleurs, des agents modulateurs de l'immunité comme l'interféron $\beta$  sont utilisés associés au traitement chimiothérapeutique sans toutefois qu'une modification par rapport au traitement chimiothérapeutique seul n'ait été mise en évidence. L'absence d'effets bénéfiques est peut-être à rapporter à la demi-vie courte de l'interféron $\beta$  recombinant dans la circulation sanguine. Un espoir de traitement des métastases hépatiques, dont dépend la survie des patients atteints de mélanomes de l'uvée, est peut-être à voir dans les résultats de l'étude menée par Alizadeh et al. Ce groupe de chercheurs a fait sécréter de façon continue, par un transfert de gène, de l'interféron $\beta$  dans un modèle de mélanome uvéal. Ce modèle de mélanome uvéal a été créé chez une souris normale C57BL/6, en injectant par voie transclérale en arrière du corps ciliaire, des cellules murines d'une lignée B16LS9 de mélanome cutané. Deux groupes de souris ont été étudiés en fonction de la voie d'injection du vecteur (intratumorale ou intraveineuse). Puis pour chaque groupe, deux sous-groupes ont été réalisés en fonction du vecteur injecté (témoin ou non). C'est un vecteur adénoviral de sérotype 5 portant le gène de l'interféron $\beta$  sous le contrôle du promoteur ubiquitaire cytomégalovirus (CMV) AdCMVINF $\beta$  qui a été testé. Pour le vecteur témoin, le gène a été remplacé par un gène rapporteur de la  $\beta$ galactosidase AdCMVlacZ. Une analyse histologique du foie a permis de montrer que trois injections intraveineuses d'AdCMVINF $\beta$  réduisaient de 86% le nombre de foyers de métastases hépatiques et réduisaient de 61% le taux d'ASAT dans le sérum. Taux qui est le reflet de l'atteinte hépatique. Ces résultats sont encourageants, mais il faut garder en tête que le modèle étudié est un modèle murin, loin des modèles plus proches de l'homme, avec

une tolérance plus importante aux réactions immunes et inflammatoires secondaire à l'injection d'un vecteur adénoviral.

## II) Pathologies cornéennes

La cornée possède des caractéristiques intéressantes compatibles à celles nécessaires à un tissu cible du transfert de gènes. Ce tissu de structure histologique assez simple, est facilement accessible à l'examen et à la manipulation. Il peut être maintenu *ex vivo* en culture durant quelques semaines et il est relativement immunoprotégé de la chambre antérieure.

L'amélioration des connaissances que ce soit dans la génétique des dystrophies cornéennes ou que ce soit dans les mécanismes des rejets de cornée ont fait de la cornée une cible potentielle du transfert de gènes.

L'épithélium cornéen, du fait de son anatomie, est un tissu facilement accessible. On peut, toutefois, se demander l'intérêt d'essayer de cibler l'épithélium cornéen alors qu'il est accessible par un simple traitement topique. Les seuls essais de transfert de gènes qui ont ciblé ce tissu ont utilisé comme vecteur l'adénovirus. Un adénovirus de type 5 non répliquatif codant pour la  $\beta$  galactosidase a été utilisé par Tsubota et al pour transfecter des cellules épithéliales cornéennes en culture avec un taux de transduction de 100%. L'application du même vecteur *in vivo* sur des cellules épithéliales de rat n'a toutefois pas été aussi efficace (Tsubota et al). Ces résultats moins bons *in vivo* sont liés à l'apparition d'une inflammation associée à une surexpression des cytokines pro-inflammatoires interleukines 6 et 8 après l'infection par l'adénovirus 5. Cette surexpression de molécules pro-inflammatoires et cette inflammation peuvent être jugulées par l'administration conjointe à l'adénovirus de corticoïdes locaux. Donc, le ciblage de l'épithélium cornéen ne semble pas être un objectif approprié pour un traitement par thérapie génique car il présente une accessibilité à un traitement topique simple. Ou encore, c'est une structure facilement atteignable par des ADN nus sans engendrer, par ce mode de vectorisation, l'apparition d'une inflammation (Tanelian et al.1997).

L'endothélium cornéen semble être un tissu cible plus intéressant pour le transfert de gènes avec notamment une application clinique qui est le rejet de greffe de cornée. La cornée est le tissu le plus greffé avec plus de 40000 greffes de cornée par an réalisées aux États-Unis. La première cause d'échec de cette chirurgie est le rejet de greffe de cornée. Le taux de survenue

d'un rejet de greffe de cornée est situé entre 21% et 16,1%, suivant les études, avec une probabilité accrue de survenue du rejet la première année (Ing et *al.*1998., Shimazaki et *al.* 2002.). Le mode le plus sécuritaire pour un transfert de gène est le traitement *ex vivo* et la mise en organoculture des cornées des donneurs jusqu'à 4 semaines avant leur greffe chez le receveur, permet d'avoir une période durant laquelle une modification génétique peut avoir lieu *ex vivo*. Des conditions optimales pour cette thérapie sont donc présentes. L'endothélium cornéen est la cible privilégiée des attaques immunitaires lors de la survenue de ce phénomène et c'est l'attaque immunitaire du greffon qui est à l'origine du rejet. Comme pour la transplantation d'autres tissus, c'est un phénomène en rapport avec l'activation des lymphocytes T. L'activation de ces cellules T nécessite une interaction primaire des complexes l'alloantigène/complexe d'histocompatibilité présent à la surface des cellules présentatrice de l'antigène (CPA) avec le complexe récepteur lymphocyte T/CD3 présent sur la surface du lymphocyte T. L'activation des lymphocytes T nécessite des costimulations additionnelles entre des molécules provenant de la cellule présentatrice d'antigène et des lymphocytes. L'interaction entre CD28 du lymphocyte T et de CD80, CD86 de la cellule présentatrice d'antigène est un de ces signaux de costimulation. Une stratégie pour prolonger la survie des greffons cornéens est d'inhiber le signal de costimulation provenant de CD28 en utilisant un anticorps portant l'épitope CTLA4 dans un modèle de greffe de cornée chez le rat. La protéine CTLA4, également présente sur les lymphocytes T, est une protéine compétitrice inhibitrice de CD28 et par conséquent, inhibitrice de l'interaction CD28-CD80-CD86 (Walunas et *al.*1994).

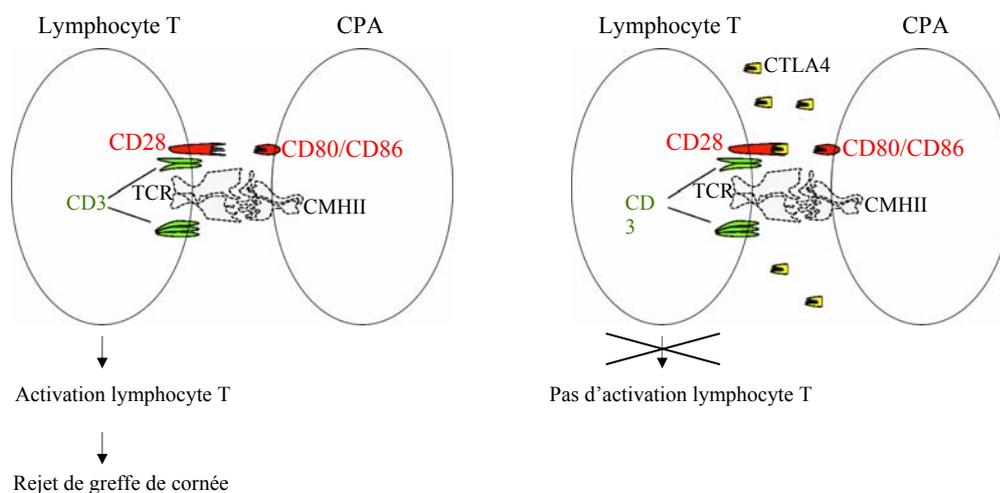


Figure 6 : Rôle de l'interaction CD28, CD80/CD86, CD3 dans l'activation des lymphocytes T.

Une protéine de fusion CTLA4-immunoglobuline a été produite et intégrée dans un vecteur adénoviral de type 5 délété pour E1. Pour cette construction, il a été incorporé au vecteur la séquence cDNA codant pour la structure externe de CTLA4 murine et les domaines CH2 et CH3 d'une IgG humaine sous le contrôle d'un promoteur RSV (Rous Sarcoma Virus). L'unique administration *ex vivo* de ce vecteur à un modèle de rejet de greffe de cornée chez le rat a montré de façon significative le prolongement de survie du greffon cornéen comparé aux sujets témoins ayant reçu un vecteur nu (Cormier et *al.* 2002). D'autres approches jouant sur les différentes interactions en jeu dans l'inflammation et l'immunité peuvent être régulées ou inhibées pour bloquer la survenue du rejet de greffe de cornée.

Une approche immunomodulatrice alternative pour prolonger la survie d'un greffon cornéen est l'interaction avec l'interleukine 10 (IL10). Cette cytokine inhibe les éléments du complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II, costimule l'expression de molécules sur les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques et inhibe la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Klebe et *al.*, en utilisant un modèle plus pertinent de rejet de greffe cornéenne, se sont intéressés à l'effet de cette molécule sur la survie du greffon. Le modèle de rejet cornéen a été créé en greffant après 28 jours d'organoculture, une cornée de mouton à une brebis. L'induction d'une inflammation localisée à l'origine de la réaction de rejet a été réalisée en appliquant un fil résorbable sur le greffon, quelques jours après la première chirurgie, sans adjoindre de traitement local de corticoïdes. Le rejet de greffe apparaît en 3 semaines. Plusieurs groupes ont été réalisés en fonction du vecteur administré *ex vivo* lors de l'organoculture. 3 types de vecteurs, tous dérivés d'un adénovirus 5 non répliquatif délété pour E1-E3, ont été utilisés. Un des vecteurs codait pour le gène LacZ (Ad-LacZ), un autre codait pour l'IL10 d'origine ovine (Ad-IL10) et le troisième vecteur était vide (Ad-mock). Tous ces gènes étaient sous le contrôle du promoteur CMV. Les cornées qui avaient été modifiées par l'insertion du gène de l'IL10 dans l'endothélium donneur ont survécu plus longtemps, de façon significative par rapport aux témoins non traité par un vecteur ou traité par Ad-mock. Il faut noter que l'inflammation locale post-chirurgicale a été plus courte et moins forte pour les cornées qui avaient reçu le gène de l'IL10 comparé aux groupes contrôle. Mais cet effet est limité dans le temps. Car l'inflammation locale réalisée plus tardivement chez deux brebis à 196 et 303 jours de la greffe a entraîné l'apparition d'un rejet de greffe (Klebe et *al.* 2001). Donc le transfert de gène IL10 par l'adénovirus Ad-IL10 n'est pas stable dans le temps et

n'évite pas l'apparition d'un rejet de greffe 196 et 303 jours après la réalisation de la greffe de cornée. Ce phénomène est à mettre en rapport avec l'expression transitoire d'un gène lors de l'utilisation de vecteurs dérivés des adénovirus. Les cornées des brebis traitées par AdIL10, Ad-LacZ et Ad-mock ont été examinées en histologie avant la création du rejet. Cet examen n'a pas mis en évidence de réactions inflammatoires suite au traitement par les vecteurs adénoviraux. Le caractère non inflammatoire du vecteur adénoviral dans le cadre de ce mode de transduction *ex vivo* est peut-être à mettre en relation avec la faible présence de protéines virales lors de la réalisation de la greffe de cornée. En effet, la transduction par le vecteur adénoviral du greffon se fait 48 heures avant la réalisation de la greffe de cornée (Fabre J.W. 2001).

Un autre domaine d'intérêt des segmentistes antérieurs est également au sein de recherches en génétique et en thérapie génique. En effet, la vision qu'un ophtalmologiste avait des dystrophies cornéennes a énormément évolué depuis la découverte d'une origine génétique à ces pathologies en 1994. Depuis la classification des dystrophies s'est faite non plus en fonction de la localisation de l'atteinte cornéenne mais en fonction des mutations génétiques retrouvées. Cette connaissance des gènes mutés, ainsi que le clonage des gènes rend envisageable une thérapie génique de remplacement pour pallier les défauts en rapport avec les anomalies génétiques responsables de ces pathologies. En effet, une fois le gène coupable cloné, on peut envisager de réaliser un traitement correctif de la pathologie en apportant à la cellule la fonction, la protéine qui lui fait défaut avec une amélioration des symptômes. Toutefois, la thérapie génique correctrice ne peut être réalisée que pour les maladies récessives où l'apport d'une copie du gène déficient permettra de pallier cette déficience.

Dans le tableau, ci-dessous, les différentes mutations retrouvées dans les dystrophies cornéennes héréditaires sont présentées. Seulement un petit nombre d'entre elles ont une transmission génétique de type récessive, configuration nécessaire à un transfert de gène correctif.

		Transmission	Localisation Chromosomique
Dystrophies épithéliales	Dystrophie de Meesmann	AD	17q12 et 12q13
	Dystrophie de Cogan	AD	Inconnue
Dystrophies stromales fréquentes liées au gène BIGH3 (5q31)	Dystrophie de Groenouw I classique	AD	R555W
	Dystrophie de Reis-Bückler	AD	R555Q
	Dystrophie grillagée de type I	AD	R124C
	Dystrophie d'Avellino	AD	R124H
	Dystrophie granulaire superficielle	AD	R124L
Dystrophies stromales granulaires rares liées au gène BIGH3 (5q31)	Dystrophie granulaire atypique	AD	R124S
	Dystrophie granulaire française	AD	R124L + D125 -126
Dystrophies stromales grillagées rares liées au gène BIGH3 (5q31)	Dystrophie grillagée japonaise	AD	P501T
	Dystrophie grillagée française	AD	A546T
	Dystrophie grillagée à dépôts profonds	AD	L527R
	Dystrophies grillagées à début tardif	AD	H626R et N622H
	Dystrophie grillagée de type I	AD	L518P
Dystrophies stromales amyloïdes non liées au gène BIGH3	Dystrophie grillagée de type II	AD	9q34
	Dystrophie grillagée de type III	AR	Inconnue
	Dystrophie gélatineuse	AD	1p
	Dystrophie maculaire de Groenouw II	AR	16q22
Autres dystrophies stromales non exceptionnelles	Dystrophie de Schnyder	AD	1p34.1-p36
	Dystrophie de François	AD	Inconnue
	Dystrophie de Vogt	AD	Inconnue
Dystrophies endothéliales	CHED type I	AD	20p
	CHED type II	AR	20
	DPP	AD	20q11

AD: autosomique dominante; AR: autosomique récessive; CHED: dystrophie endothéliale congénitale héréditaire; DPP: dystrophie postéri polymorphe.

Tableau 2: Mutations génétiques retrouvées dans les dystrophies de cornée. D'après Renard J.2002

Il existe, toutefois, dans le domaine de la recherche, une maladie génétique avec une symptomatologie cornéenne qui a vu ses symptômes s'améliorer après un traitement correctif par thérapie génique. Cette pathologie complexe est la mucopolysaccharidose de type VII (MPS VII). C'est une pathologie autosomique récessive, caractérisée par une déficience enzymatique de l'activité  $\beta$ -glucuronidase (GUSB), de localisation lysosomale. Les conséquences de cette déficience sont une accumulation progressive et systémique dans les lysosomes de glycosaminoglycans (GAGs) non dégradés dans divers tissus. Cette accumulation entraîne un développement anormal des muscles, une hépatosplénomégalie, un retard mental et une mortalité précoce. Ces atteintes systémiques peuvent être améliorées suite à un transfert du gène *gusb* au niveau hépatique dans des modèles animaux de MPS VII (Xu et al.2004., Sleeper et al.2004). Les manifestations ophtalmologiques sont liées à des changements histologiques en rapport avec cette accumulation lysosomale dans différentes structures. Dans la cornée, l'accumulation la rend opaque ; dans le trabéculum, elle entraîne

l'apparition d'un glaucome secondaire et dans la rétine, elle induit une dégénérescence rétinienne secondaire. La multiplicité des atteintes ophtalmologiques en font une piètre cible et un piètre modèle pour la thérapie génique corrective cornéenne isolée, mais c'est le seul cas connu, pour le moment, d'atteinte génétique cornéenne qui possède un modèle animal. Ce modèle animal est la souris B6/MPSVII. Elle présente les mêmes symptômes que pour la maladie humaine. Il a été montré que l'opacité cornéenne de ce modèle animal a pu être amélioré par un transfert du gène de la  $\beta$ -glucuronidase (GUSB). Pour cette expérience, deux voies d'administrations du vecteur ont été testées, l'injection intracaméculaire et l'injection intrastromale. Des premiers tests ont permis de vérifier l'efficacité de ces méthodes d'administration en utilisant le transgène rapporteur LacZ sous le contrôle d'un promoteur fort CAG sous la forme d'un vecteur adénoviral (AdCALacZ). L'injection en chambre antérieure de solution virale AdCALacZ a retrouvé une expression lacZ positive dans les cellules endothéliales cornéennes et dans les mailles trabéculaires. Les cellules stromales ont été transduites en utilisant une méthode peu fréquemment usitée en thérapie génique à savoir une mise en contact direct de la solution virale avec le stroma cornéen après réalisation d'une kératotomie lamellaire à l'aide d'un microkératome. Dans un second temps, les mêmes injections ont été réalisées chez des souris malades, en remplaçant le transgène rapporteur lacZ par le gène thérapeutique de la  $\beta$ -glucuronidase d'origine humaine au sein du même vecteur adénoviral (AdCAhGUS). L'injection intracaméculaire d'AdCAhGUS permet de diminuer le nombre d'accumulations lysosomales de GAGs présentes dans le stroma cornéen lors de l'examen histologique alors que le même vecteur injecté après une kératotomie lamellaire permet de faire disparaître ces mêmes accumulations de GAGs. Le recul de cette expérience avec une expression stable du gène n'est que de 30 jours. La chute de l'expression du gène transduit de la  $\beta$ -glucuronidase et de l'activité de cette enzyme au sein de la cornée est liée au caractère transitoire de l'expression des gènes induits par les vecteurs adénoviraux. Lors de l'injection intrastromale du vecteur adénoviral, il n'y a pas eu de production d'anticorps neutralisant pouvant faire espérer une seconde injection possible (Kamata et al. 2001). L'utilisation d'un vecteur dérivé d'Adéno-Associated virus peut surmonter ce problème d'extinction d'activité  $\beta$ -glucuronidase car il possède une expression du transgène plus stable. De plus l'AAV est un candidat attractif pour la thérapie génique humaine car il est non pathogène pour l'homme et il est capable d'infecter des cellules quiescentes sans induire d'inflammation. Mohan et al en utilisant un vecteur dérivé du virus adéno-associé de sérotype 2 ont montré que ce type de vecteur était capable de transduire efficacement les kératinocytes

du stroma cornéen. L'utilisation des transgènes rapporteurs chloramphénicol (CAT) et le  $\beta$ -galactosidase de l'*Escherichia coli* ( $\beta$ -gal) ou LacZ sous le contrôle du promoteur CMV a permis de retrouver une activité CAT ou  $\beta$ -gal dans le stroma cornéen, 3 jours après l'administration stromale du vecteur par la réalisation d'un volet lamellaire au microkératome. La présence d'activité CAT et  $\beta$ -gal est présente jusqu'à 10 jours (Mohan et al.2003). Malheureusement le suivi à long terme de l'expression du transgène dans ce modèle n'a pas été réalisé dans cette étude et aucune étude n'est actuellement publiée en utilisant un AAV porteur du gène thérapeutique  $\beta$ -glucuronidase administré par kératotomie lamellaire dans le modèle murin de MPSVII. Toutefois, un vecteur AAV portant le gène thérapeutique  $\beta$ -glucuronidase a permis la diminution, à long terme, de l'accumulation de GAGs dans les cellules quiescentes du système nerveux central après une administration intravitréenne ou intraventriculaire (Hennig et al.2003., Passini et al. 2003). On peut penser que l'administration d'un vecteur AAV recombinant porteur du gène codant pour GUBS pourrait permettre une expression plus persistante à long terme sur la cornée du modèle murin MPSVII. Mais des modifications structurelles du vecteur AAV devraient être réalisées pour augmenter son efficacité de transduction des cellules cornéennes.

Nous avons donc vu que deux domaines de pathologies cornéennes pouvaient être l'objet d'avancés et de recherches thérapeutiques en transfert de gènes, en utilisant surtout les vecteurs viraux.

### III) Glaucome

Le glaucome est une des causes majeures de cécité irréversible dans le monde développé ou en voie de développement. Il représente 15% de toutes les cécités avec environ 500 000 nouveaux cas chaque année (Quigley et *al.*1996). Le traitement direct de cette pathologie est axé sur la baisse de la pression intraoculaire, qui est le facteur étiopathogénique le plus connu (Sommer et *al.*1996). Le traitement médical est le traitement initial entrepris pour faire diminuer la pression intraoculaire, en agissant soit par diminution de la production de l'humeur aqueuse par le corps ciliaire, soit en augmentant le flux sortant d'humeur aqueuse. Si l'approche médicamenteuse échoue, les patients sont traités par du laser ou par une intervention chirurgicale. Des thérapies disponibles, la chirurgie a montré qu'elle était une de celle des plus efficaces sur la baisse pressionnelle et qu'elle permettait également une prévention importante de la perte du champ visuel (Advanced Glaucoma Intervention Study). La difficulté dans la réussite totale de cette chirurgie réside dans le contrôle de la cicatrisation. En effet, une cicatrisation excessive est la première cause du défaut de chute pressionnelle après une chirurgie filtrante. Le succès de la trabéculéctomie est jugé sur la diminution de la pression intraoculaire. L'utilisation de modulateurs de la cicatrisation comme les antimétabolites a permis une amélioration des résultats des chirurgies filtrantes anti-glaucomateuses. Mais leur utilisation est marquée par l'apparition tardive de complications au niveau de la bulle de filtration. Problèmes qui ont entraîné une diminution de leur utilisation (Stamper et *al.*1992). Les complications liées à l'utilisation de 5 fluorouracile ou encore plus à l'utilisation de la mitomycine sont marquées par l'apparition de défauts épithéliaux cornéens, d'endophtalmie ou de bulle de filtrations avasculaires fragiles qui peuvent se rompre. Ces deux dernières complications sont dramatiques (Perkins et *al.*1998). Ces problèmes ont amenés la communauté scientifique à rechercher des produits antiprolifératifs alternatifs notamment issus de la thérapie génique. Pour une telle application, l'expression du vecteur n'a pas besoin d'être stable à long terme. C'est dans le premier mois post-chirurgical qu'il est nécessaire de réguler l'inflammation et la cicatrisation dans la chirurgie filtrante du glaucome. Il a été montré chez le primate que les réponses prolifératives après une chirurgie se produisaient majoritairement dans les 2 semaines post-opératoires (Jampel et *al.*1998). La régulation d'un processus complexe de cicatrisation secondaire à une blessure chirurgicale passe par la régulation de l'expression de multiples facteurs de croissance, d'enzymes ou

d'inhibiteurs de cette cicatrisation. Un de ces acteurs est la protéine p21<sup>WAF-1/CIP-1</sup>. Cette protéine p21<sup>WAF-1/CIP-1</sup> régule négativement le cycle cellulaire en se couplant et en inactivant les kinases dépendantes des cyclines. Cette famille de protéines est nécessaire au passage de l'interphase G1 à la phase S du cycle cellulaire. L'inhibition de ces kinases dépendantes des cyclines entraîne un arrêt du cycle cellulaire à la jonction G1-S. Il a été montré que l'apport exogène de p21 pouvait inhiber la prolifération cellulaire (Erhardt et al.1998). L'utilisation de la thérapie génique transférant le gène p21 humain a été testé dans l'évaluation de la cicatrisation de la trabéculéctomie chez le lapin puis dans un modèle de glaucome chez le primate. C'est un adénovirus recombinant qui a été utilisé pour introduire le gène humain p21<sup>WAF-1/CIP-1</sup> (rAdp21) au niveau des fibroblastes de la tenon de lapins au moment d'une chirurgie du glaucome. L'expression de p21 dans le modèle lapin a persisté plus de 2 semaines et était aussi efficace que la mitomycine C, 4 semaines après l'intervention, sur le contrôle de la prolifération des fibroblastes et sur la diminution de la tension intraoculaire (Perkins et al.2002). L'administration du vecteur a été réalisée au moment de l'intervention par une mise en contact des fibroblastes, avant l'ouverture de la sclérotomie, avec une éponge imbibée de solution virale au niveau du site chirurgical. Ce vecteur dans un modèle primate de glaucome a également permis de diminuer la tension intraoculaire (Heatley et al.2004). Le succès d'une trabéculéctomie est basé sur sa capacité à faire diminuer la pression intraoculaire à un niveau acceptable. Heatley et ses collaborateurs ont comparé l'effet pressonnier d'un traitement par la mitomycine C ou par rAdp21 ou par un vecteur adénoviral de contrôle (rAdcontrol) avec l'injection de BSS (balanced saline solution) chez un primate non humain, modèle de glaucome. Le traitement peropératoire par rAdp21 permet une diminution de la pression intraoculaire légèrement moins importante qu'avec la mitomycine (-10,3 points contre -15,3 points) mais l'aspect post-chirurgical de la bulle évaluée par 4 observateurs est plus satisfaisant. Toutefois, l'analyse histologique réalisée 3 mois après la chirurgie, a mis en évidence la présence plus importante de zones d'inflammation chronique non granulomateuse au niveau de la zone opérée dans les yeux ayant reçu rAdp21 contrairement à ceux qui ont reçu de la mitomycine (Heatley et al.2004). L'utilisation d'un plasmide à la place d'un vecteur adénoviral pourrait empêcher l'apparition d'une inflammation tout en permettant une transduction efficace des fibroblastes. Angella et al, ont montré que l'application peropératoire d'une pièce de collagène contenant un plasmide porteur des gènes rapporteur CAT ou LacZ permettait une transduction efficace des fibroblastes de la zone autour de la bulle de filtration et uniquement dans cette zone (Angella et al.2000). L'utilisation d'un

plasmide pour la transfection pourrait permettre de pallier le problème d'inflammation liée aux adénovirus tout en étant efficace.

Une dernière approche visant à agir sur la cicatrisation a été envisagée après que Cordiero ait montré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal contre le TNF- $\beta$ 2 humain (Transforming Growth factor- $\beta$ 2) permettait de réduire la cicatrisation chez le lapin après trabéculéctomie (Cordiero et *al.*1999) et que cet anticorps était également bien supporté chez l'homme lors d'une chirurgie filtrante (Siriwardena et *al.*2002). Le TNF- $\beta$  est un facteur de croissance qui est un puissant stimulateur de la cicatrisation dans tout le corps (Levine et *al.*1993). Il existe trois isoformes au niveau de l'œil chez l'homme : TNF- $\beta$ 1, TNF- $\beta$ 2 et TNF- $\beta$ 3 mais l'isoforme TNF- $\beta$ 2 est celle qui est prédominante. Cette molécule est impliquée dans des phénomènes ophtalmologiques de cicatrisation pathologique comme la vitréorétinopathie proliférative, la formation de la cataracte secondaire ou la cicatrisation conjonctivale après chirurgie filtrante pour le glaucome. Pour obtenir de tels résultats chez le lapin, l'équipe de Cordiero a réalisé 5 injections en sous conjonctival au niveau de la bulle de filtration durant les 7 premiers jours postopératoires. Devant la lourdeur du traitement post-opératoire nécessaire, la même équipe a dernièrement mis au point un oligonucléotide antisens du TNF- $\beta$  permettant de ne faire qu'une injection peropératoire. Cette technologie des oligonucléotides antisens permet de faire diminuer l'expression des protéines par les cellules en empêchant l'assemblage des ribosomes, en clivant les ARN et en induisant des modifications prétraductionnelle d'épissage. Chez le lapin, l'injection peropératoire, au niveau de la trabéculéctomie, de l'oligonucléotide antisens TNF- $\beta$  (antisens TNF- $\beta$  OGN) permet une expression stable car il est retrouvé dans les fibroblastes de la tenon 7 jours après l'injection et uniquement autour du site d'injection. Le traitement antisens permet de réduire de façon significative ( $p < 0,05$ ) l'activité des fibroblastes comparé au traitement par un antisens contrôle et permet également de réduire la réponse inflammatoire avec un délai retardé dans l'apparition des cellules de l'inflammation, phénomène inhérent au processus de cicatrisation (Cordeiro et *al.*2003). On peut penser que les complications survenant lors de l'utilisation peropératoire d'antimétabolites non sélectifs ne seront pas visibles lors d'utilisations de moyens plus sélectifs comme les antisens TNF- $\beta$  OGN car ces produits ciblent uniquement les fibroblastes ténoniens mis en jeu dans la cicatrisation excessive qui survient lors de la chirurgie filtrante du glaucome.

La compliance au traitement est un des problèmes survenant dans le glaucome comme dans de nombreuses pathologies chroniques. De nombreux patients ne sont pas assez rigoureux dans l'instillation des collyres dont la fréquence d'instillation dégrade leur qualité de vie, négligence qui est une cause dans l'aggravation du champ visuel. Une partie des traitements antiglaucomeux agit au niveau du trabéculum, zone responsable du maintien de la pression intraoculaire physiologique. Des manipulations sur les cellules ou sur la matrice extracellulaire du trabéculum peuvent potentiellement moduler la résistance à l'écoulement de l'humeur aqueuse et donc agir sur la tension intraoculaire. Peu de traitements glaucomeux actuel agissent sur ce point, le transfert de gène peut, peut-être, suivre cette voie de modulation de résistance à l'écoulement de l'humeur aqueuse. L'avantage pour étudier le transfert de gène dans le trabéculum réside dans la possibilité d'une observation directe en utilisant un gène rapporteur GFP puis en visualisant l'expression du transgène par la réalisation d'une gonioscopie. Il a été montré que les vecteurs adénoviraux étaient efficaces pour transduire les cellules du trabéculum. Plusieurs transductions au niveau des cellules du trabéculum ont été rapportées après une injection intravitréenne, mais l'efficacité est plus importante après une injection intracaméculaire. Un transfert de gènes réussi a été rapporté dans diverses espèces animales comme la souris, les rats, les chiens et les primates (Andrawiss et al.2001., Borrás et al.1996., kee et al.2001). Même chez l'homme, un transfert de gènes rapporteurs à l'aide d'un vecteur adénoviral a été montré au niveau des cellules du trabéculum en utilisant des segments antérieurs provenant de donneurs post-mortem mis en culture, sans affecter l'écoulement d'humeur aqueuse (Borrás et al.1999). Avec un tel vecteur codant pour un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur CMV, l'expression du transgène se produit au niveau du trabéculum jusqu'à 4 semaines post-injection chez le primate avec l'apparition d'une inquiétante inflammation, qui est dépendante de la concentration de la solution virale (Borrás et al.2001). L'alternative aux adénovirus peut être l'utilisation de vecteurs lentiviraux car les cellules du trabéculum semblent également sensibles aux vecteurs dérivés des lentivirus. 82%  $\pm$  4% des cellules de trabéculum humain en culture sont eGFP positives après l'injection en chambre antérieure de vecteurs dérivés FIV (Feline immunodeficiency virus) (Lowen et al.2002). L'utilisation de vecteurs dérivés du HIV montre également une efficacité in vivo sur les cellules du trabéculum chez la souris (Bainbridge et al.2001). Alors que les vecteurs rAAV de sérotypes 2, 3 et 4 ne sont pas utilisables pour le segment antérieur car ils ne sont pas assez efficaces (Borrás et al.2002). Il reste donc à trouver des molécules ou des protéines qui pourront moduler la résistance à

l'écoulement d'humeur aqueuse du maillage trabéculaire afin d'envisager une thérapie génique susceptible de diminuer la pression intraoculaire.

La pression intraoculaire n'est probablement pas le seul facteur intervenant dans l'atteinte glaucomateuse du nerf optique car des altérations du nerf optique ont été mises en évidence chez des patients dont la tension intraoculaire avait toujours été bien contrôlée. Ces altérations du nerf optique sont liées à la mort des cellules ganglionnaires rétiniennes. La mort de ces cellules survient par apoptose, la démonstration a été réalisée dans des yeux humains glaucomateux et après section du nerf optique chez des primates non humains et chez des rats (Kerrigan et *al.*1997., Berkelaar et *al.*1994). L'apoptose dans des cellules neuronales peut être activée par plusieurs effecteurs. Ces effecteurs peuvent être la perte de l'apport d'un facteur neurotrophique ou une surexposition à un aminoacide excitateur comme le glutamate (Nickells et *al.*1999). Le Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) est un de ces facteurs neurotrophiques de survie des cellules ganglionnaires rétiniennes. Le BDNF est produit dans le colliculus supérieur ou dans le corps géniculé latéral chez les grands mammifères, il est porté par un récepteur trkB et est véhiculé par transport rétrograde des axones des cellules ganglionnaires jusqu'au corps cellulaire au sein de vésicules microsomiales. Il a été montré que lorsque la tension intraoculaire est augmentée chez des rats ou des primates, le transport rétrograde du complexe BDNF-trkB était bloqué au niveau de la tête du nerf optique (Pease et *al.*2000). Il est possible que la privation de BDNF joue un rôle dans la mort des cellules ganglionnaires survenant lors du glaucome car il a été montré que l'injection intravitréenne de BDNF exogène chez le rat retardait l'apparition de l'apoptose des cellules ganglionnaires après section du nerf optique (Paloma et *al.*1996). L'administration itérative intraoculaire d'un facteur neurotrophique n'est pas possible en raison des contraintes que cela impose au patient et en raison des risques chirurgicaux. La thérapie génique peut dispenser le facteur neurotrophique aux cellules ganglionnaires rétiniennes sans injections itératives.

La diffusion de gènes au niveau des cellules ganglionnaires par des vecteurs viraux est possible aux niveaux de ces cellules en réalisant une injection intravitréenne du vecteur. Le transfert de gènes dans les cellules ganglionnaires au moyen de vecteurs adénoviraux est limité sans que la raison soit connue (Di polo et *al.*1998). Les vecteurs dérivés AAV sont plus efficaces et plus spécifiques pour transduire les cellules ganglionnaires après une injection intravitréenne car ces cellules ont à leur surface des protéoglycans héparanes sulfates qui sont les récepteurs des rAAV (Borrás et *al.*2002). Martin et *al* retrouvent une efficacité de  $84,5\% \pm 13,8\%$  de transduction des cellules ganglionnaires par un rAAV portant le gène rapporteur de

la GFP après l'injection intravitreuse chez le rat (Martin et *al.*2003). Le même type de vecteur portant le gène BDNF a été testé chez un rat modèle de glaucome. Dans les yeux glaucomeux, l'injection de AAV-BDNF-WPRE entraîne une augmentation d'axones survivants comparé avec les yeux injectés avec AAV-GFP-WPRE ou avec du sérum salé. La perte d'axones dans le groupe AAV-BDNF-WPRE est de 34% alors qu'il est de 52% dans le groupe AAV-GFP-WPRE ou le groupe sérum salé (Martin et *al.*2003). WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus Regulatory Element) est un élément de régulation post-transcriptionnel, permettant d'augmenter la traduction de la protéine. Ici, il permet d'augmenter le BDNF délivré aux cellules ganglionnaires de façon bénéfique car sans cet élément, Martin et ses collaborateurs ne retrouvent pas l'effet bénéfique si marqué du BDNF dans un modèle de glaucome chez le rat (Martin et *al.*2003).

Une autre étude a rapporté un effet bénéfique du transfert de gène aux niveaux des cellules ganglionnaires fragilisées dans un modèle de glaucome. Cette étude s'est basée sur les travaux de McKinnon qui a montré, chez le rat, une activation des caspases au niveau des cellules ganglionnaires rétiniennes, après l'induction d'un glaucome expérimental avec notamment l'activation de la caspase 8, initiateur de l'apoptose et de son effecteur la caspase 3 (McKinnon et *al.*2002). Un inhibiteur des caspases au niveau de la rétine de la drosophile a été trouvé dans le gène p35 dont la surexpression permet de préserver les photorécepteurs dans un modèle de dégénérescence rétinienne (Davidson et *al.*1998). La recherche de gènes homologues chez les virus, les mammifères et chez les insectes a permis de trouver une famille de gènes bien conservés lors de l'évolution des espèces, qui sont dénommés les gènes IAP pour Inhibitor Apoptosis Protein. Il a été montré que la surexpression des IAPs *in vitro* supprimait l'apoptose induite par différents produits déclenchants. Un membre de la famille des IAPs provenant des mammifères (BIRC4) est un inhibiteur direct de 3 niveaux de la cascade apoptotique par inhibition des caspases 3, 7 et 9 (McKinnon et *al.*2002). L'inhibition de la voie des caspases est une approche possible pour la neuroprotection dans le glaucome. McKinnon et ses collaborateurs ont injecté un AAV codant pour le BIRC4 (baculoviral IAP repeat-containing protein 4) dans des yeux de rats ayant un glaucome. Le modèle de glaucome chez le rat a été créé en sclérosant le trabéculum empêchant alors l'écoulement d'humeur aqueuse. Dans les yeux ayant été injectés par le vecteur AAV-C $\beta$ A-BIRC4, le nombre de cellules survivantes dans les yeux glaucomeux est plus important que dans les yeux contrôles injectés par AAV-C $\beta$ A-GFP (McKinnon et *al.*2003). La protéine BIRC4 protège les cellules ganglionnaires probablement par inhibition d'événements apoptotiques qui sont à

l'origine de la perte et de la mort des cellules ganglionnaires dans la pathologie glaucomateuse.

Ces deux voies de recherche cherchent à prévenir la mort des cellules ganglionnaires. La stratégie de traitement d'une pathologie neuronale par la prévention de la mort des neurones s'appelle la neuroprotection. La neuroprotection des cellules ganglionnaires est capitale car ce sont des cellules post-mitotiques qui ne se divisent pas et qui ne peuvent être remplacées après leur mort. Cette voie représente un enjeu important pour la prise en charge thérapeutique future des glaucomes.

#### IV) Pathologies néovasculaires ophtalmologiques

Les pathologies néovasculaires de la rétine comprenant la rétinopathie diabétique, la dégénérescence liée à l'âge (DMLA) et la rétinopathie du prématuré sont des causes importantes de cécité dans le monde développé (Bressler et *al.*1995., Rahmani et *al.*1996., Steinkuller et *al.*1999). Les traitements conventionnels de ces pathologies comprennent le laser, la cryothérapie et depuis un peu plus de 2 ans, la photothérapie dynamique pour la DMLA. La photothérapie dynamique ne suffit pas à elle seule à maintenir l'acuité visuelle chez les patients présentant la forme exsudative de DMLA. C'est pourquoi de nouvelles stratégies de traitement sont en évaluation. L'emploi de médicaments bloquant le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est actuellement en plein essor car des phases III d'essais cliniques concernant ces futurs médicaments sont en cours. Ces futurs médicaments sont le Macugen® qui est un aptamère anti-VEGF, ou le Rhufab V2 (Lucentis®) qui est un anticorps soluble du VEGF. Ils ont été développés car le VEGF a été retrouvé dans des cellules de l'épithélium pigmentaire au niveau de membranes néovasculaires excisées provenant d'yeux atteints de DMLA (Lopez et *al.*1996) ainsi que dans le vitré de patients souffrant de rétinopathie diabétique proliférante (Aiello et *al.*1994). Le VEGF est un puissant facteur angiogénique. Il agit sur les cellules endothéliales via un récepteur spécifique : Flt1 ou Flt1-KDR, qui est un récepteur tyrosine kinase de haute affinité présent sur les cellules endothéliales. L'expression de VEGF conduit à la prolifération de cellules endothéliales, à la migration de ces cellules ainsi qu'à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ces phénomènes sont à la base de la néovascularisation qui est un processus de prolifération vasculaire anormal, présent dans des pathologies oculaires comme la DMLA ou la rétinopathie diabétique proliférante. Les médicaments comme le Macugen® ou le Rhufab V2 semblent permettre une diminution de la taille des membranes néovasculaires dans la DMLA, mais ils nécessitent l'injection intravitréenne fréquente du produit antiangiogénique. L'injection itérative du produit peut être à l'origine de complications ou de difficultés. C'est pourquoi une approche par transfert de gènes est à l'étude. Le seul inhibiteur connu spécifique de l'inhibition du VEGF est un récepteur tronqué au VEGF soluble :sFlt-1. Ce récepteur a d'ailleurs montré un potentiel clinique d'inhibition de l'angiogénèse pour une application clinique (Kendall et *al.*1993). C'est pourquoi, plusieurs essais de transfert d'un gène

exprimant le gène sFlt-1 ont été réalisés avec différents vecteurs. Honda et ses collaborateurs ont été les premiers en 2000, à injecter, à un modèle murin de néovascularisation, un vecteur codant pour le récepteur soluble sFlt-1. Mais le vecteur choisi pour vectoriser le récepteur soluble sFlt-1 était un vecteur adénoviral et l'administration de ce vecteur était faite par voie générale en intramusculaire. Or, l'injection systémique d'un tel produit inhibant l'angiogénèse peut avoir des effets secondaires importants comme l'infarctus du myocarde, les accidents ischémiques cérébraux ou périphériques, c'est pourquoi son administration locale est préférable. L'injection intravitréenne est une solution envisageable. Deux modèles de néovascularisation ont été mis au point chez la souris. Le premier est créé par un modèle de rétinopathie ischémique en exposant des souriceaux âgés de 7 jours (p7) à des hauts taux d'oxygène 75% durant 5 jours puis en les remettant ensuite à vivre à un taux normal d'oxygène 21%. Il se développe alors une néovascularisation pré-rétinienne dépendante de la sécrétion du VEGF chez tous les animaux. Le second modèle est créé par la réalisation d'un laser rétinien avec une forte intensité permettant de rompre la membrane de Bruch. Cette rupture est à l'origine de l'apparition d'une plaque néovasculaire dans la zone lasérisée. Bainbridge et *al* ont testé un vecteur dérivé de l'AAV de sérotype 2 dans le premier modèle de néovascularisation rétinienne. 7 jours après le retour des souriceaux en élevage à un taux d'oxygène normal, ils ont été injectés en intravitréen soit par un vecteur contrôle : l'AAV.CMV.GFP soit par un AAV.CMV.sFlt-1. L'analyse quantitative par comptage des noyaux des cellules endothéliales dans les zones néo-vascularisées a été choisie comme méthode de suivi de l'effet des traitements sur la néo-vascularisation. Le comptage par cette méthode a retrouvé une diminution significative de la néovascularisation dans les yeux injectés par le gène codant pour sFlt-1 avec une moyenne de 23,3 noyaux par zone comparé à celle des yeux injectés par le gène codant pour la GFP où la moyenne est de 52.1 noyaux par zone. L'analyse histologique des rétines retrouvait une rétine normale après transfert de gènes (Bainbridge et *al*.2002). Ce même vecteur a été également testé dans le modèle murin laser induit en permettant une diminution de la néovascularisation dans les yeux injectés par AAV.CMV.sFlt-1 (Lai et *al*.2002). L'expression du VEGF est augmentée par l'hypoxie *in vitro* (Shweiki et *al*.1992) et *in vivo* (Shima et *al*.1996). Une administration en continu d'un produit comme un anti-angiogénique n'est pas concevable car le VEGF permet également le maintien de fonctions basales pour la rétine mature et est un facteur de survie pour les cellules endothéliales (Alon et *al*.1995). C'est pourquoi, Bainbridge et ses collaborateurs ont montré une expression régulable par l'hypoxie grâce à un promoteur particulier : le promoteur HRE (hypoxia-responsive element). En effet, ce promoteur permet de réguler l'expression d'un

transgène GFP en fonction de l'hypoxie de la rétine. Le test d'efficacité de ce promoteur régulier s'est fait grâce à l'utilisation du transgène visualisable *gfp*. L'injection intravitréenne d'AAV2.CMV.GFP a été comparée à l'injection intravitréenne d'AAV2.HRE.GFP. Les injections ont été réalisées chez les deux modèles murins de néovascularisation. L'utilisation du transgène *gfp* a permis de suivre l'évolution de l'expression du transgène en fonction de l'hypoxie et du promoteur. Les souris injectées avec le promoteur HRE ont montré des zones GFP positives uniquement dans les zones soumises à l'hypoxie alors que les souris injectées avec le promoteur CMV présentent des cellules GFP positives réparties sur l'ensemble de la rétine (Bainbridge et *al.*2003). Ces résultats montrent que certains systèmes comme ce promoteur HRE, peuvent permettre de réaliser un contrôle et une expression du gène transféré dans les conditions le plus proche de la physiologie.

La diminution du taux de VEGF, à l'intérieur de l'œil, peut également être induite par l'injection d'un siRNA ciblant le VEGF (*Vegf.siRNA*). Ces siRNA vont aller éteindre spécifiquement l'expression de la protéine VEGF par un système de destruction des ARN messagers. Ce système d'extinction a été testé dans deux modèles animaux de néovascularisation chorio-rétinienne. Dans un modèle murin laser induit de néovascularisation rétinienne, les siRNA anti-VEGF, injectés en sous rétiniens permettent de diminuer le taux de protéine VEGF présente dans les rétines traitées par *Vegf.siRNA* comparés aux rétines traitées par *EGFP.siRNA* (un siRNA contrôle dirigé contre la GFP) (Reich et *al.*2003). Chez le primate non humain, l'injection de siRNA anti-VEGF en intravitréen, immédiatement après avoir réalisé un laser rétinien permet de diminuer la néovascularisation de la zone lasérisée. La diminution de taille de la lésion vasculaire, secondaire au traitement par laser, est visible à l'examen du fond d'œil, aux angiographies et à l'examen histologique de la rétine (Tolentino et *al.*2004). Cette thérapeutique vient d'obtenir l'accord de la FDA pour débiter un essai préclinique chez l'homme en utilisant des siRNA dirigés contre le VEGF dans le cas de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Le VEGF n'est pas le seul facteur intervenant dans la néogénèse vasculaire. La pathogénie de la néovascularisation est un phénomène complexe se déroulant en plusieurs étapes. Le processus débute par la rupture de la membrane basale puis par la migration des cellules endothéliales, puis par leur prolifération et se termine par la formation d'un tube capillaire. De nombreux facteurs comme l'angiostatine, l'endostatine, les métalloprotéases interviennent au cours des différentes étapes de ce processus de néovascularisation. L'expression intraoculaire

d'inhibiteurs de ces facteurs grâce à différents vecteurs permet d'inhiber la néovascularisation choroïdienne (Igarashi et al.2003., Mori et al.2001., Takahashi et al. 2000). Le PDEF (Pigment Epithelium-Derived Factor) est aussi un facteur inhibiteur de l'angiogenèse (Dawson et al.1999). Il a été montré que ce puissant facteur anti-angiogénique permettait de réduire le développement de la néovascularisation choroïdienne quand l'administration de ce facteur était faite avant le début de la stimulation angiogénique. Une injection intravitréenne ou sous rétinienne de AAV.C $\beta$ A.PEDF est réalisée 4 à 6 semaines avant l'exécution d'un laser rétinien chez une souris. Elle permet de réduire de façon significative la taille des zones néovascularisées qui apparaissent dans ce modèle murin secondairement à la rupture de la membrane de Bruch par le laser (Mori et al.2002). Cette même molécule est utilisée dans un essai préclinique. Campochiaro a présenté, dernièrement, les résultats préliminaires d'une étude clinique de phase I dont le but était d'évaluer la sécurité et la faisabilité des injections intravitréennes d'un vecteur adénoviral PEDF (AdPEDF) chez des patients atteints d'une néovascularisation dans le cadre d'une dégénérescence maculaire liée à l'âge. 8 titres différents de la solution virale dans un ordre croissant ont été injectés allant de  $10^6$  à  $10^{9,5}$  pu en augmentant 1/2 log à chaque fois. 27 patients ont été inclus, leur meilleure acuité visuelle était au maximum de 20/200 avec une néovascularisation rétrofovéolaire supérieure à 12 diamètres papillaires. Ils n'ont reçu chacun qu'une injection intravitréenne avec un suivi de 1 an post-injection. Les titres des solutions étaient différents en fonction des individus. L'injection intravitréenne d'AdPEDF a été bien tolérée ; 2 patients ayant reçu la dose  $10^{7,5}$  et 1 patient ayant reçu la dose  $10^{8,5}$  ont présenté une inflammation moyenne transitoire avec l'augmentation de 1 point de la tension intraoculaire. Aucun des patients n'a développé d'anticorps neutralisants contre le transgène ou le vecteur (Campochiaro et al.2004).

## V) Pathologies rétiniennes

Les principales pathologies ciblées pour bénéficier d'un traitement par transfert de gènes au niveau de la rétine sont les dégénérescences rétiniennes ou rétinopathies pigmentaires (RP).

Les dégénérescences rétiniennes sont des pathologies héréditaires dont l'origine génétique est parfois connue. Actuellement, 109 des 154 gènes connus comme à l'origine de pathologies rétiniennes héréditaires ont été clonés (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis.htm>). Ces pathologies suivent, dans la majorité des cas, le mode de transmission monogénique des maladies génétiques à savoir, une transmission de type dominant, récessif, lié à l'X ou mitochondriale.

Les pathologies à transmission autosomique dominante résultent d'une mutation survenant dans une seule copie du gène. De nombreux gènes sont responsables de RP autosomiques dominantes (RHO, RDS, CRX, RP1, ROM1, RP9...). La part respective de chacun de ces gènes dans les RP autosomiques dominantes reste à déterminer tout en sachant que trois gènes principaux (RHO, RDS et RP1) représentent 20 à 45% des patients génotypés suivant les séries. La plupart de ces gènes s'expriment de façon ubiquitaire dans l'organisme, mais une mutation dans leur structure entraîne uniquement une modification du phénotype rétinien sous la forme d'une rétinopathie pigmentaire.

Les pathologies autosomiques récessives résultent de mutations présentes sur les copies maternelles et paternelles du gène, d'où l'incidence élevée de ces pathologies dans les mariages consanguins. Les individus qui ont une copie normale et une copie anormale (hétérozygote) ne présentent pas la maladie. Il existe plus de 23 gènes responsables de RP autosomiques récessives, les principaux gènes de RP autosomiques récessives pour lesquelles une estimation de fréquence est disponible (USH2A, PDE6A, PDE6B, RPE 65, CNGA1) ne représentent pas plus de 25% de ces formes.

Les pathologies liées à l'X sont dues à une anomalie d'un gène se trouvant sur le chromosome X. Ces pathologies sont pour la plupart de type récessif, seuls les hommes sont touchés par cette maladie car ils ne portent qu'un seul chromosome X. Les femmes sont transmettrices de

ces pathologies car le chromosome X provient de leur patrimoine. Les mutations du gène RPGR sont responsables de 70% des RP liées à l'X.

Les maladies mitochondriales sont de transmission maternelle. En effet, l'ADN codant pour le fonctionnement des mitochondries est transmis quasi exclusivement par les ovules maternels. Un homme porteur d'une maladie mitochondriale ne transmettra pas cette pathologie à ses enfants. Le syndrome de Kearns-Sayre est transmis suivant ce mode.

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

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

L'atteinte oculaire peut être isolée ou peut survenir dans le cadre d'un syndrome associant une atteinte d'autres organes (syndrome de Usher, de Kearns-Sayre, de Bardet-biedl). La compréhension du lien entre d'éventuelles anomalies génétiques et le développement d'une dégénérescence rétinienne est parfois difficile.

Ci-dessous, deux tableaux récapitulatifs des différents gènes cartographiés et clonés en fonction des différents groupes phénotypiques d'atteintes rétiniennes.

<b>Number of Genes by Disease Category (One Disease per Gene)</b>		
<b>Disease Category</b>	<b>Total No. of Genes</b>	<b>No. of Cloned Genes</b>
Bardet-Biedl syndrome, autosomal recessive	8	7
Chorioretinal atrophy or degeneration, autosomal dominant	1	1
Cone or cone-rod dystrophy, autosomal dominant	6	4
Cone or cone-rod dystrophy, autosomal recessive	2	0
Cone or cone-rod dystrophy, X-linked	2	0
Congenital stationary night blindness, autosomal dominant	1	1
Congenital stationary night blindness, autosomal recessive	2	2
Congenital stationary night blindness, X-linked	2	2
Leber congenital amaurosis, autosomal recessive	8	5
Macular degeneration, autosomal dominant	12	6
Macular degeneration, autosomal recessive	1	1
Ocular-retinal developmental disease, autosomal dominant	1	0
Optic atrophy, autosomal dominant	2	1
Optic atrophy, autosomal recessive	1	0
Optic atrophy, X-linked	1	0
Retinitis pigmentosa, autosomal dominant	12	12
Retinitis pigmentosa, autosomal recessive	15	11
Retinitis pigmentosa, X-linked	5	2
Syndromic/systemic diseases with retinopathy, autosomal dominant	7	5
Syndromic/systemic diseases with retinopathy, autosomal recessive	14	11
Syndromic/systemic diseases with retinopathy, X-linked	2	1
Usher syndrome, autosomal recessive	11	8
Other retinopathy, autosomal dominant	8	4
Other retinopathy, autosomal recessive	15	12
Other retinopathy, mitochondrial	6	6
Other retinopathy, X-linked	9	7
<b>TOTALS</b>	<b>154</b>	<b>109</b>

Tableau 3 : nombre de gènes par classe phénotypique de dégénérescence rétinienne héréditaire. D'après Retnet (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/disease.htm>) dernière mise à jour le 13 septembre 2004.

<b>Gene Symbols by Disease Category (One or More Diseases per Gene)</b>		
<b>Disease Category</b>	<b>Mapped Genes (not Cloned)</b>	<b>Mapped and Cloned Genes</b>
Bardet-Biedl syndrome, autosomal recessive	<a href="#">BBS5</a>	<a href="#">ARL6</a> , <a href="#">BBS1</a> , <a href="#">BBS2</a> , <a href="#">BBS4</a> , <a href="#">BBS7</a> , <a href="#">MKKS</a> , <a href="#">TTC8</a>
Chorioretinal atrophy or degeneration, autosomal dominant	<a href="#">MCDR1</a>	<a href="#">RGR</a> , <a href="#">TEAD1</a>
Cone or cone-rod dystrophy, autosomal dominant	<a href="#">CORD4</a> , <a href="#">RCD1</a>	<a href="#">APL1</a> , <a href="#">CRX</a> , <a href="#">GUCA1A</a> , <a href="#">GUCY2D</a> , <a href="#">RIMS1</a> , <a href="#">UNC119</a>
Cone or cone-rod dystrophy, autosomal recessive	<a href="#">CORD8</a> , <a href="#">CORD9</a>	<a href="#">ABCA4</a> , <a href="#">RDH5</a>
Cone or cone-rod dystrophy, X-linked	<a href="#">COD2</a> , <a href="#">COD4</a>	<a href="#">RPGR</a>
Congenital stationary night blindness, autosomal dominant	none	<a href="#">GNAT1</a> , <a href="#">PDE6B</a> , <a href="#">RHO</a>
Congenital stationary night blindness, autosomal recessive	none	<a href="#">RDH5</a> , <a href="#">RHOK</a>
Congenital stationary night blindness, X-linked	none	<a href="#">CACNA1F</a> , <a href="#">NYX</a> , <a href="#">RPGR</a>
Deafness alone or syndromic, autosomal dominant	none	<a href="#">WFS1</a>
Deafness alone or syndromic, autosomal recessive	<a href="#">USH2B</a>	<a href="#">CDH23</a> , <a href="#">MYO7A</a> , <a href="#">PCDH15</a> , <a href="#">USH1C</a>
Leber congenital amaurosis, autosomal dominant	none	<a href="#">CRX</a>
Leber congenital amaurosis, autosomal recessive	<a href="#">LCA3</a> , <a href="#">LCA5</a> , <a href="#">LCA9</a>	<a href="#">APL1</a> , <a href="#">CRB1</a> , <a href="#">CRX</a> , <a href="#">GUCY2D</a> , <a href="#">RDH12</a> , <a href="#">RPE65</a> , <a href="#">RPGRI1</a> , <a href="#">TULP1</a>
Macular degeneration, autosomal dominant	<a href="#">BCMAD</a> , <a href="#">MCDR1</a> , <a href="#">MCDR2</a> , <a href="#">MCDR3</a> , <a href="#">MDDC</a> , <a href="#">STGD4</a>	<a href="#">ARMD1</a> , <a href="#">C10TNF5</a> , <a href="#">EFEMP1</a> , <a href="#">ELOVL4</a> , <a href="#">RDS</a> , <a href="#">TIMP3</a> , <a href="#">VMD2</a>
Macular degeneration, autosomal recessive	none	<a href="#">ABCA4</a>
Macular degeneration, X-linked	none	<a href="#">RPGR</a>
Ocular-retinal developmental disease, autosomal dominant	<a href="#">WGN1</a>	none
Optic atrophy, autosomal dominant	<a href="#">OPA4</a>	<a href="#">OPA1</a>
Optic atrophy, autosomal recessive	<a href="#">ROA1</a>	none
Optic atrophy, X-linked	<a href="#">OPA2</a>	<a href="#">TIMM8A</a>
Retinitis pigmentosa, autosomal dominant	none	<a href="#">CA4</a> , <a href="#">CRX</a> , <a href="#">FSCN2</a> , <a href="#">HPRP3</a> , <a href="#">IMPDH1</a> , <a href="#">NRL</a> , <a href="#">PRPF8</a> , <a href="#">PRPF31</a> , <a href="#">RDS</a> , <a href="#">RHO</a> , <a href="#">ROM1</a> , <a href="#">RP1</a> , <a href="#">RP9</a>
Retinitis pigmentosa, autosomal recessive	<a href="#">RP22</a> , <a href="#">RP25</a> , <a href="#">RP28</a> , <a href="#">RP29</a>	<a href="#">ABCA4</a> , <a href="#">CERKL</a> , <a href="#">CNGA1</a> , <a href="#">CNGB1</a> , <a href="#">CRB1</a> , <a href="#">LRAT</a> , <a href="#">MERTK</a> , <a href="#">NR2E3</a> , <a href="#">PDE6A</a> , <a href="#">PDE6B</a> , <a href="#">RGR</a> , <a href="#">RHO</a> , <a href="#">RLBP1</a> , <a href="#">RPE65</a> , <a href="#">SAG</a> , <a href="#">TULP1</a> , <a href="#">USH2A</a>
Retinitis pigmentosa, X-linked	<a href="#">RP6</a> , <a href="#">RP23</a> , <a href="#">RP24</a>	<a href="#">RP2</a> , <a href="#">RPGR</a>
Syndromic/systemic diseases with retinopathy, autosomal dominant	<a href="#">CORD1</a> , <a href="#">CRV</a>	<a href="#">ABCC6</a> , <a href="#">COL11A1</a> , <a href="#">COL2A1</a> , <a href="#">JAG1</a> , <a href="#">PAX2</a> , <a href="#">SCA7</a>
Syndromic/systemic diseases with retinopathy, autosomal recessive	<a href="#">AXPC1</a> , <a href="#">MRST</a> , <a href="#">WFS2</a>	<a href="#">ABCC6</a> , <a href="#">ALMS1</a> , <a href="#">CLN3</a> , <a href="#">LRP5</a> , <a href="#">MTP</a> , <a href="#">OPA3</a> , <a href="#">PEX1</a> , <a href="#">PEX7</a> , <a href="#">PHYH</a> , <a href="#">PXMP3</a> , <a href="#">TPA</a> , <a href="#">WFS1</a>
Syndromic/systemic diseases with retinopathy, X-linked	(- - -)	<a href="#">TIMM8A</a>
Usher syndrome, autosomal recessive	<a href="#">USH1A</a> , <a href="#">USH1E</a> , <a href="#">USH2B</a>	<a href="#">CDH23</a> , <a href="#">MASS1</a> , <a href="#">MYO7A</a> , <a href="#">PCDH15</a> , <a href="#">SANS</a> , <a href="#">USH1C</a> , <a href="#">USH2A</a> , <a href="#">USH3A</a>
Other retinopathy, autosomal dominant	<a href="#">CACD</a> , <a href="#">EVR3</a> , <a href="#">MCDR4</a> , <a href="#">VRNI</a>	<a href="#">FZD4</a> , <a href="#">LRP5</a> , <a href="#">OPN1SW</a> , <a href="#">RB1</a>
Other retinopathy, autosomal recessive	(- - -), <a href="#">ACHM1</a> , <a href="#">RNANC</a>	<a href="#">CDH3</a> , <a href="#">CNGA3</a> , <a href="#">CNGB3</a> , <a href="#">CYP4V2</a> , <a href="#">GNAT2</a> , <a href="#">NR2E3</a> , <a href="#">OAT</a> , <a href="#">PROM1</a> , <a href="#">R9AP</a> , <a href="#">RBP4</a> , <a href="#">RGS9</a> , <a href="#">RLBP1</a> , <a href="#">SAG</a>
Other retinopathy, mitochondrial	none	<a href="#">KSS</a> , <a href="#">LHON</a> , <a href="#">MTATP6</a> , <a href="#">MTH</a> , <a href="#">MTL1</a> , <a href="#">MTTS2</a>
Other retinopathy, X-linked	<a href="#">AIED</a> , <a href="#">PRD</a>	<a href="#">CHM</a> , <a href="#">DMD</a> , <a href="#">NDP</a> , <a href="#">OPN1LW</a> , <a href="#">OPN1MW</a> , <a href="#">PGK1</a> , <a href="#">RS1</a>

Tableau 4 : noms des gènes impliqués par classe phénotypique de dégénérescence rétinienne héréditaire. D'après Retnet (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/disease.htm>) dernière mise à jour le 13 septembre 2004.

Au plan moléculaire, les mutations des gènes retrouvés dans les rétinopathies pigmentaires concernent des gènes impliqués dans le cycle visuel ou dans la structure des photorécepteurs ou dans des facteurs de transcription ou dans des fonctions mitochondriales.

Le cycle visuel ou cascade visuelle comprend la phototransduction et le métabolisme du rétinol.

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

Cette étape se déroule au niveau de la partie photosensible des photorécepteurs : le segment externe. La rhodopsine, pigment photosensible des bâtonnets, est constituée de 2 éléments. Le premier élément: l'opsine forme un récepteur à 7 domaines transmembraires qui est couplé à une protéine G. Le second élément : le chromophore le 11-*cis*-retinal est lié de manière covalente à l'opsine. Lorsqu'un photon excite la rhodopsine cela induit une dissociation de l'opsine et du chromophore 11-*cis*-retinal qui s'isomérisent en all-*trans*-retinal. Ce changement de conformation au niveau de l'opsine expose des sites de liaisons à la transducine qui est une protéine G des photorécepteurs. La sous-unité  $\alpha$  de la transducine active alors l'enzyme phosphodiesterase (PDE), qui va hydrolyser l'acide guanylique cyclique (GMPc) en 5'GMP. La chute du GMPc cytosolique conduit à la fermeture des canaux GMPc dépendant, avec l'arrêt de l'entrée des ions sodium et calcium à l'intérieur du photorécepteur. Ces modifications ioniques induisent une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Celle-ci entraîne la libération d'un neurotransmetteur le glutamate qui va générer un message sensoriel dirigé vers le cerveau. L'arrêt de la réponse des photorécepteurs nécessite une stimulation des guanylate-cyclases et de l'arrestine.

Quelques exemples de gènes impliqués dans la phototransduction en rapport avec une RP:

- le gène de la rhodopsine (RHO) est à l'origine de RP dominantes, de RP récessives et de CNSB (congenital stationary night blindness). La mutation de ce gène correspond à 30-40% des mutations retrouvées dans les RP dominantes avec plus de 100 mutations différentes (Gregory-Evans and Bhattacharya.1998). Ce gène code pour la protéine

transmembranaire rhodopsine qui initie la cascade de phototransduction une fois qu'elle a été photoexcitée.

- Les gènes de la transducine. La transducine est une protéine G formée de 3 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Le gène GNAT1 code pour la sous-unité  $\alpha$  de cette protéine dont le rôle est le couplage de la rhodopsine et de la phosphodiésterase (qui hydrolyse le GMP cyclique) durant la phototransduction. La mutation du gène GNAT1 est à l'origine de formes dominantes du CNSB. Le gène GNAT2 code pour la sous-unité  $\alpha$  de la transducine au niveau des cônes. Sa mutation est retrouvée dans de rares cas d'achromatopsies.
- La phosphodiésterase. C'est une protéine formée de 2 sous-unités, elle permet l'hydrolyse du GMP cyclique, ce qui induit la formation de courants membranaires au niveau des bâtonnets. Le gène PDE6A code pour la sous-unité  $\alpha$  de la GMPc phosphodiésterase, sa mutation est à l'origine de 3 à 4 % de RP récessives.

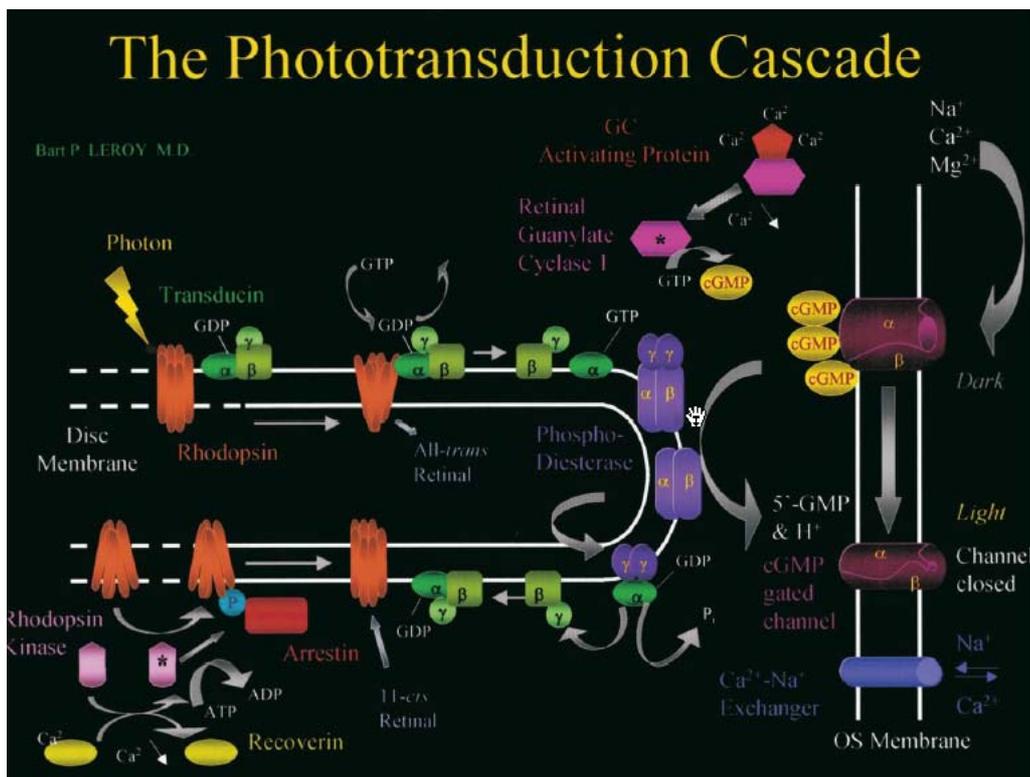


Figure 7: Diagramme schématique de la cascade de phototransduction au niveau de la membrane du disque et la membrane plasmatique du segment externe (OS membrane) du photorécepteur. D'après Koenekoop et *al.*2004

Des anomalies au niveau du métabolisme du rétinol sont également à l'origine de rétinopathies pigmentaires.

Le chromophore all-*trans*-rétinol, créé lors de la phototransduction, doit être régénéré en 11-*cis*-retinol pour que le cycle visuel puisse perdurer. Cette régénération a lieu lors d'un cycle qui se produit entre les photorécepteurs et les cellules de l'épithélium pigmentaire.

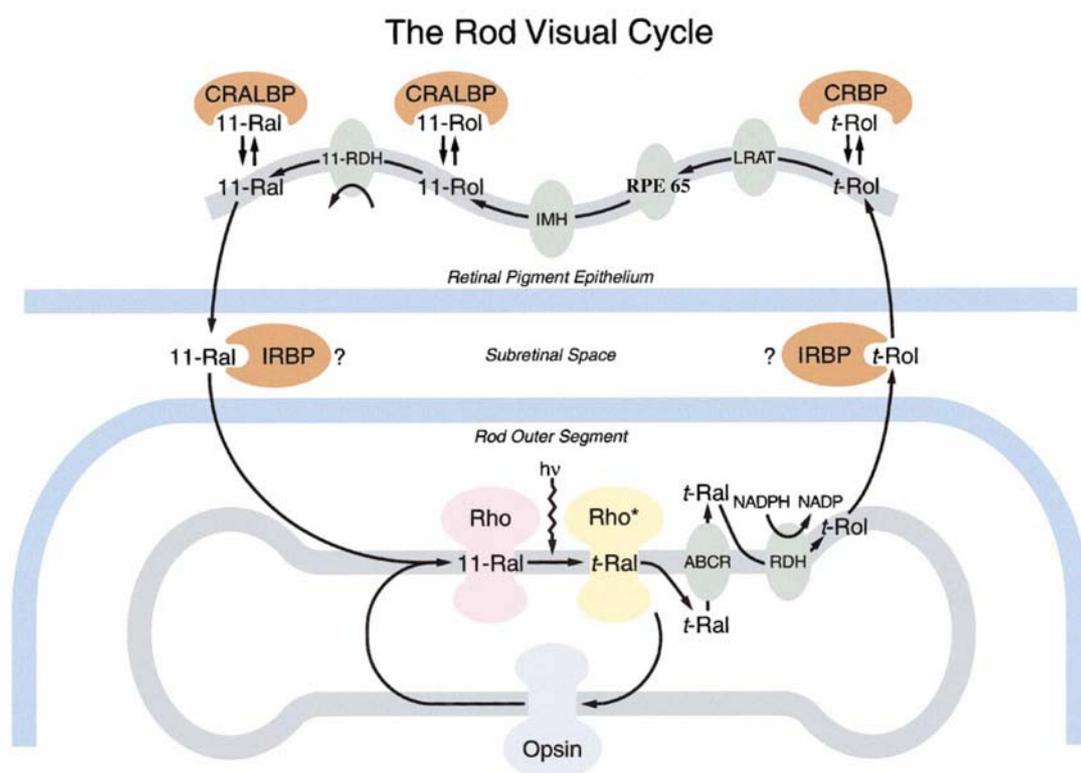


Figure 8: Représentation schématique du métabolisme du rétinol au niveau des bâtonnets. ABCR, ATP-binding cassette ; CRBP, cellular retinol-binding protein ; CRALBP, cellular retinaldehyde-binding protein ; IMH, isomerohydrolase ; IRBP, interphotoreceptor retinoid-binding protein ; LRAT, lecithin retinol acyltransferase ; RDH, all-*trans*-retinol dehydrogenase ; 11-RDH, 11 *cis*-retinol dehydrogenase ; RHO, rhodopsin, RHO\*,activated

rhodopsin ; 11-Ral, 11-*cis*-retinal ; 11-Rol, 11-*cis*-retinol ; at-Rat, all-*trans*-retinal ; at-Rot, all-*trans*-retinol ; at-RE, all-*trans*-retinylester. D'après Saari.2000.

Différents gènes codant pour des protéines du métabolisme du rétinol sont en rapport avec des RP :

- ABCR (ATP binding cassette retina) est une protéine associée à la membrane qui permet de transporter des molécules au travers de la membrane des photorécepteurs. La mutation du gène ABCA4 est retrouvée dans la maladie de Stargardt mais également dans les maculopathies héréditaires récessives, dans les RP récessives, dans les cone-rod dystrophies récessives ainsi que dans les fundus flavimaculatus.
- La 11-*cis*-retinol dehydrogenase est codé par le gène RDH5. Les mutations de ce gène sont à l'origine de fundus albipunctatus, de dystrophies récessives des cônes. L'altération de cette protéine induit un retard dans l'adaptation à l'obscurité de la rétine avec une difficulté de resensibilisation des cônes et des bâtonnets à la lumière, mais le rôle de cette protéine reste encore un peu flou.
- La protéine RPE 65 est présente au niveau des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. C'est une all-*trans*-retinylester isomérolase. Elle est codée par le gène du même nom rpe 65 dont les mutations sont à l'origine de 2% des RP récessives et de 6 à 16 % des ACL (Amaurose congénitale de Leber).
- La protéine LRAT (Lecithin retinol acyl transferase) est une protéine microsomale des cellules de l'EPR. C'est une enzyme qui catalyse l'estérification du all-*trans*-retinal en all-*trans* retinyl ester. La mutation du gène LRAT induit l'apparition de RP récessives ou de dégénérescences rétiniennes très précoces.

Des gènes codant pour des facteurs de transcription sont également impliqués dans des RP :

- Le gène CRX code pour une protéine qui est un facteur de transcription des photorécepteurs qui joue un rôle dans la différenciation des photorécepteurs. La

mutation de ce gène est à l'origine de dystrophies dominantes mixtes cônes-bâtonnets, de ACL et de RP dominantes.

- RP1 est une protéine codée par un gène du même nom dont l'expression est régulée par le niveau d'oxygène de la rétine. La mutation de ce gène est à l'origine de 5 à 10 % des RP dominantes.

De même, des gènes de structures des photorécepteurs sont impliqués dans des RP :

- ROM1 (retinal outer segment membrane protein 1) est un gène qui code pour une protéine présente au niveau des disques des photorécepteurs. C'est une protéine essentielle pour la stabilité de ces disques. Les anomalies de cette protéine sont à l'origine de RP dominantes et de RP digénique.

Et enfin, il existe des gènes mitochondriaux qui sont impliqués dans des RP :

Les mutations dans les gènes mitochondriaux peuvent engendrer des phénotypes de type rétinopathie pigmentaire. Ces pathologies comprennent le syndrome de kearns-Sayre notamment avec la mutation du gène KSS et l'atrophie gyrée qui est lié à un déficit en ornithine aminotransferase qui est une enzyme du métabolisme mitochondrial.

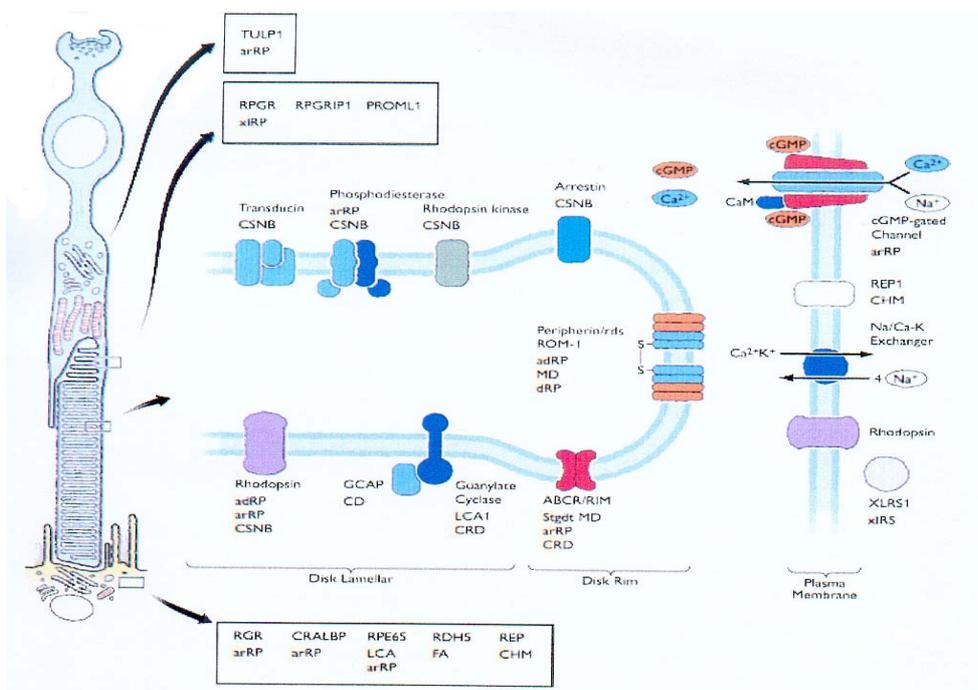


Figure 9: Protéines des photorécepteurs et des cellules de l'EPR impliquées dans des dégénérescences rétiniennes. adRP, autosomale dominant RP ; arRP, autosomale récessif RP ; CNSN, congenital stationary night blindness ; CD, cone dystrophy ; CRD, cone-rod dystrophy ; dRP, digenic RP ; FA, fundus albipunctatus ; LCA, Leber's congenital amaurosis ; MD, macular degeneration ; xIRP, X-linked RP. D'après Pierce.2001.

Devant la multiplicité des gènes impliqués dans les rétinopathies pigmentaires, le traitement correctif par transfert de gènes de ces pathologies ne pourra être envisagé suivant un schéma uniciste. Il conviendra de développer une stratégie spécifique de chaque maladie, quasi spécifique de chaque individu. L'élaboration du traitement devra inclure les données multiples de la pathologie.

La thérapie génique correctrice par remplacement d'une copie d'un gène défectueux par le même gène fonctionnel ne pourra être fait que pour les maladies récessives. Le même principe ne pourra être appliqué lors d'une RP autosomique. L'adjonction de gènes « normaux » dans la cellule ne pourra annuler l'effet de ce gène malade. La neuroprotection par des facteurs de survie sera, par contre, une approche possible pour tous les types de rétinopathies pigmentaires notamment les pathologies dominantes.

Pour ces deux approches, il est nécessaire de tester ces traitements sur des rétines atteintes. En effet, après avoir tester l'efficacité de transduction des différents vecteurs existants grâce à des gènes rapporteurs au niveau des rétines d'animaux sains, il a fallu tester ces vecteurs portant des gènes rapporteurs ou des gènes thérapeutiques au niveau de rétines de modèles animaux de maladies rétiniennes héréditaires. Pour cela, les chercheurs ont développé des animaux transgéniques qui présentent des mutations dans des gènes responsables de rétinopathies pigmentaires ou ils ont cherché des animaux présentant de façon spontanée des mutations dans les gènes intéressés. La drosophile et le poisson zebrafish sont utiles car ils présentent de nombreux mutants rétiniens et ils peuvent être obtenus en très grand nombre. Cela permet de réaliser des études à grande échelle sur les conséquences de l'expression d'une protéine chez un animal ne l'exprimant pas ou de réaliser des études de physiologie à propos de mécanismes rétiniens. Mais ces animaux ne peuvent être la base d'une étude pré-clinique sur l'évaluation du transfert de gènes au niveau de la rétine en raison de la trop grande barrière d'espèces existante.

Les résultats que nous évoquerons par la suite ont été obtenus chez des animaux dont la physiologie est plus proche de celle de l'homme, à savoir, les souris, les rats mais également les chiens. Le seul cas connu de maladie rétinienne héréditaire chez le primate non humain est l'albinisme qui a été retrouvé chez un animal d'un zoo (ding et al.2000).

L'espèce animale mettant à disposition de la communauté scientifique le plus grand nombre de modèles de dégénérescences rétiniennes est représentée par les modèles murins. La connaissance d'une mutation chez l'homme responsable d'une dégénérescence rétinienne permet de créer par transgénèse un animal reproduisant le phénotype de la pathologie. Certains modèles transgéniques ne miment pas une pathologie, mais présentent une modulation des gènes de l'apoptose ou des modulations de la physiologie des photorécepteurs ou encore une surexpression d'un gène. Ces modèles qui simulent la pathologie rétinienne ou qui expriment certaines fonctions rétiniennes, permettent de tester *in vivo* les effets de différents gènes thérapeutiques apportés par thérapie génique. Les mutations sont spontanées ou transgéniques. Les tableaux 5 et 6 présentent des modèles spontanés de dégénérescences rétiniennes qui permettent de tester l'efficacité, les effets secondaires du transfert de gènes. Il existe également des modèles transgéniques de dégénérescences rétiniennes qui ont créés (tableau 7).

La première approche qui est la thérapie corrective a été réalisée à différents modèles animaux de différentes rétinopathies pigmentaires.

Le modèle murin *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup>, également appelé rds pour retinal degeneration slow est un modèle de rétinopathie pigmentaire récessive, qui présente une mutation dans le gène de la périphérine 2. Cette protéine est nécessaire pour la formation des disques externes des photorécepteurs. Pour ce faire, la périphérine 2, qui est une glycoprotéine membranaire, forme un complexe avec la protéine ROM1 et ce complexe stabilise la membrane des segments externes des disques des photorécepteurs (Bascom et al.1992). Cette souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> présente un défaut de développement des articles externes des photorécepteurs, une diminution de la rhodopsine et une perte de photorécepteurs par apoptose. L'ERG de cette

souris présente également des amplitudes de l'onde a et de l'onde b très diminuées qui deviennent indétectables dès l'âge de 2 mois. L'injection sous rétinienne d'une solution virale d'AAV de sérotype 2 portant l'ADNc de *prph2* sous le contrôle du promoteur rhodopsine (AAV.rho.prph2) permet l'apparition de segments externes des photorécepteurs au niveau de la zone de rétine traitée chez la souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> (Ali et al.2000). Ces néo-segments externes sont visibles sur des coupes histologiques mais également lors de la réalisation de microscopie-----

**[Tableaux 5 – 6 – 7 disponibles sur la thèse papier :**

5 . Modèles murins spontanés de dégénérescences rétiniennes D'après Hafezi et al. 2000 et

<http://jaxmice.jax.org/jaxmicedb/html/sbmodel>

6 . Autre modèles spontanés de dégénérescences rétiniennes

7 . Animaux transgéniques]

---à transmission électronique qui permet de montrer que le traitement par AAV.rho.prph2 entraîne l'apparition de segments externes dont l'ultrastructure est comparable à celles de segments externes des photorécepteurs de rétine de souris normale. Le métabolisme des photorécepteurs traités est également amélioré car un taux représentant 15% du taux normal de rhodopsine est retrouvé au niveau des cellules traitées (Schlichtenbrede et al.2004). L'amélioration du métabolisme des photorécepteurs s'accompagne d'une amélioration des amplitudes des ERGs au niveau des yeux traités par injections sous rétiniennes de AAV.rho.prph2 comparé aux résultats obtenus chez des souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> non injectées âgées de 10 semaines. Pour répondre à la question du moment du traitement par rapport au degré de dégénération rétinienne, des injections de ce vecteur AAV.rho.prph2 ont été réalisées à différents âges de la souris représentant différents temps de l'état rétinien du stade non dégénéré jusqu'à une rétine non fonctionnelle. Sarra et al, ont montré qu'il y avait une différence significative sur le nombre et sur la qualité structurelle des segments externes des photorécepteurs apparus, en fonction de l'âge de la souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> au moment de l'administration du traitement correctif par AAV.rho.prph2. Quand la souris est traitée jeune avant le début de la dégénérescence apoptotique rétinienne, les segments externes créés sont plus nombreux et mieux formés que lorsque le traitement est réalisé chez une souris plus âgée présentant déjà une altération rétinienne (Sarra et al.2001). De telles informations sont capitales, car il faudra répondre à de telles interrogations quand il sera envisagé un essai

clinique pour le traitement d'une rétinopathie pigmentaire par thérapie génique. Le moment le plus adéquat pour la réalisation du traitement sera à définir pour chaque rétinopathie et pour chaque patient. Le traitement correctif par AAV.rho.prph2 chez la souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> permet une amélioration de l'ultrastructure rétinienne aux niveaux des photorécepteurs jusqu'à 9 mois après la réalisation de l'injection sous rétinienne (Sarra et al.2001). Toutefois, cette amélioration structurelle ne s'accompagne pas d'une diminution de la perte de photorécepteurs par apoptose. L'épaisseur de la couche nucléaire externe, formée des noyaux des photorécepteurs, ne présente pas de différence significative entre les yeux des souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> traités comparés aux yeux non traités chez des souris contrôles de même âge, quelque soit l'âge de la souris et donc le niveau de dégénérescence rétinienne au moment du traitement (Sarra et al.2001). Pour tester l'effet d'une surexpression de Prph2 sur la rétine, Sarra et ses collaborateurs ont réalisé l'injection sous rétinienne de AAV.rho.prph2 chez des souris normales. Dans la zone rétinienne injectée, ils ont retrouvé une perte de photorécepteurs liée à l'expression de prph2 car les yeux contrôles injectés par un AAV.CMV.GFP ne présentaient pas de perte de photorécepteurs. Le contrôle du niveau de l'expression du transgène lors de traitement de rétinopathie pigmentaire par thérapie génique corrective sera donc une nécessité absolue avant de réaliser ces traitements en clinique.

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

Chez d'autres rongeurs, modèles de RP, des traitements correctifs ont également été testés. Dans le modèle murin *rd*, l'injection d'un AAV exprimant la GMPc phosphodiesterase $\beta$  (PED- $\beta$ ), qui est la protéine déficiente dans ce modèle de rétinopathie, permet une amélioration histologique avec une augmentation du nombre de photorécepteurs présents au niveau de la rétine 6 semaines après l'injection sous rétinienne du vecteur (Jomary et *al.*1997). Vollrath et ses collaborateurs, ont obtenu des résultats moins marqués mais toutefois intéressants du fait des cellules mises en jeu dans la dégénérescence chez le rat RCS (Royal College of Surgeons). Ce modèle présente une mutation dans le gène du récepteur tyrosine kinase *Mertk*, qui induit une dégénérescence rapide des photorécepteurs rétiniens par incapacité des cellules de l'EPR à phagocytter les segments externes des photorécepteurs. Le traitement par un vecteur adénoviral codant pour le gène *Mertk* sous le contrôle d'un promoteur CMV a permis de diminuer la dégénérescence des photorécepteurs en modifiant un gène de l'EPR, montrant que l'amélioration d'une fonction des cellules de l'EPR avait un effet sur la dégénérescence des photorécepteurs adjacents (Vollrath et *al.*2001). Dans ce même modèle de rat RCS, l'équipe de Robin Ali a également montré une amélioration de l'électrorétinogramme suite à l'injection sous rétinienne d'un vecteur dérivé d'un AAV codant pour la protéine MERTK (Smith A.J. and *al.*2003).

Une autre pathologie a pour origine un défaut d'interaction entre ces 2 types cellulaires rétiniens : l'amaurose congénitale de Leber. L'amaurose congénitale de Leber (ACL) est une pathologie très ciblée en thérapie génique car elle possède un modèle canin spontané. Disposer d'un modèle canin en fait une maladie d'intérêt car cela permet aux chercheurs d'être dans une situation pré-clinique pour évaluer les bénéfices et les risques d'un traitement par transfert de gène thérapeutique. En effet, effectuer des essais chez des animaux plus grands est important pour l'étude de la toxicologie du vecteur mais également car ces animaux possèdent une immunologie se rapprochant plus de celle de l'homme, de plus, l'abord chirurgical pour délivrer la solution virale se rapproche de celle qui pourrait être utilisée chez l'homme. De surcroît, cette rétinopathie qu'est l'ACL est une pathologie récessive, condition nécessaire pour un transfert de gène correctif. L'amaurose congénitale de Leber est une rétinopathie pigmentaire particulière car elle survient précocement. Les sujets atteints présentent une altération majeure de la fonction visuelle dans la première année de vie. 8 gènes impliqués dans cette pathologie ont été retrouvés (RPE 65, GUCY2D, CRB1,

RPGRIP1, CRX, RDH12, TULP1 et AIPL1) avec un total de plus de 260 variants (Allikmets R.L et *al.*2004). Le gène RPE65 est retrouvé chez 10% à 15% des patients atteints de ACL en fonction des séries (Gu et *al.*1997., Marlhens et *al.*1997., Lorenz et *al.*2000., Galvin et *al.*2004). La protéine RPE65 est une protéine microsomale, exprimée exclusivement au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien. Elle est associée au réticulum endoplasmique et elle permet la régénération du chromophore 11-*cis* retinol à partir du tout all *trans*-retinyl esters au sein du cycle visuel. Une souris *rpe 65*<sup>-/-</sup>, knockout du gène *rpe 65*, a été créée, permettant de tester l'effet de l'administration d'un gène thérapeutique *rpe65* par transfert de gène. Ce modèle est marqué par une altération profonde de la fonction des cônes et des bâtonnets avec un enregistrement ERG très perturbé dès le premier mois de vie. L'histologie de la rétine des souris *rpe65*<sup>-/-</sup> retrouve une accumulation d'inclusions lipidiques dans les cellules de l'EPR liée à une accumulation de all-*trans* retinyl esters ainsi qu'une dégénérescence progressive des photorécepteurs survenant à l'âge de 4 à 10 mois. L'injection sous rétinienne d'un vecteur rAAV de sérotype 2 codant pour le gène *rpe 65* sous le contrôle d'un promoteur CMV (rAAV2.CMV.*rpe65*) chez cette souris *rpe*<sup>-/-</sup> âgée de 3 semaines permet une expression de la protéine RPE65 dans les cellules de l'EPR jusqu'à 18 mois après l'injection. L'amplitude des ERGs chez ces souris 1 à 2 mois après l'injection de rAAV2.CMV.*rpe65*, est améliorée ; l'amplitude maximum de l'onde b est augmentée de 76% en condition scotopique et de 59% en condition photopique comparée aux amplitudes retrouvées chez des souris non injectées du même âge. Mais, ce résultat électrorétinographique n'est pas stable dans le temps car 7 à 11 mois après le traitement, il n'existe plus de différences significatives entre les amplitudes maximales de l'onde b des ERGs des souris *rpe65*<sup>-/-</sup> injectées comparés aux non injectées. 3 mois après l'injection sous rétinienne chez les souris *rpe65*<sup>-/-</sup>, l'épaisseur de la couche des noyaux des photorécepteurs rétiens n'est pas modifiée par le traitement par rAAV2.CMV.*rpe65*. Mais 20 mois après l'injection, l'étude histologique montre une diminution du nombre de gouttelettes lipidiques présentes dans les cellules de l'EPR des rétines des souris *rpe65*<sup>-/-</sup> injectés par rAAV2.CMV.*rpe65* comparé aux non injectées du même âge. De plus, la présence d'opsine a été retrouvée de façon plus importante 8 mois après le traitement au niveau des cellules de la neurorétine des souris *rpe65*<sup>-/-</sup> traitées. Cette restauration d'un taux plus important d'opsine démontre la présence d'un cycle visuel actif dans la zone de rétine *rpe65*<sup>-/-</sup> traitée par rAAV2.CMV.*rpe65* (Lai et *al.*2004). Une équipe pense même que le traitement doit être précoce avant le développement d'altérations histologiques au niveau de la rétine. Pour cela, ils ont injecté en sous rétinien au quatorzième jour de gestation, un des deux yeux d'embryons

de souris *rpe65*<sup>-/-</sup> avec un vecteur AAV.CMV.*rpe65* de sérotype 1. La fonction, la biochimie et l'aspect histologique de la rétine ont été améliorés, mais le taux de perte de souriceaux lors de cette chirurgie est important rendant assez aberrant qu'une telle modalité d'administration du gène soit envisagée (Dejneka et al.2004).

Un second modèle murin naturel de l'ACL, la souris *rd12* a été traité par une injection d'AAV de sérotype 5 codant pour la protéine RPE65 avec comme promoteur le C $\beta$ A (Chicken  $\beta$  Actin). Le sérotype 5 comparé au sérotype 2 de l'AAV permet d'obtenir une expression plus forte au niveau de la rétine. 7 mois après le traitement, les amplitudes de l'onde b de l'ERG scotopique enregistré sont comprises entre 60% et 80% des amplitudes des ERGs de souris normales. De même, le taux de 11-cis retinal et de rhodopsine restaurés sont environ équivalents à 60% de la normale. Par contre, il est retrouvé chez les souris traitées de nombreuses vacuoles lipidiques persistantes dans les cellules de l'épithélium pigmentaire (Pang et al.2004). Les souris *rd12* voient également leurs tests comportementaux s'améliorer après traitement. En effet, les souris traitées sont capables de retrouver une plate-forme située sur l'eau en ambiance nocturne alors que les souris non traitées nagent désespérément sans jamais retrouver la plate-forme (Pang et al.2004).

C'est dans un modèle canin que le bénéfice d'un traitement correctif d'une maladie génétique ophtalmologique a été montré de façon la plus marquante. En effet en 2001, Acland et ses collaborateurs ont publié un article montrant la restauration de la vision d'un chien briard, modèle canin de l'amaurose congénitale de Leber, après traitement par un vecteur AAV de sérotype 2 portant le gène *rpe65* sous le contrôle du promoteur C $\beta$ A (Acland et al.2001). Les chiots, injectés en sous rétinien à l'âge de 4 mois, ont vu leurs amplitudes des enregistrements électrorétinographiques s'améliorer. L'ERG flicker, non enregistrable chez le chien *rpe65*<sup>-/-</sup>, le devient avec une amplitude correspondant à 16% de l'amplitude du flicker chez un chien briard normal. L'amplitude de l'ERG photopique en lumière blanche s'améliore également dans les mêmes proportions après traitement (Acland et al.2001). L'amélioration de la fonction visuelle ne se produit pas si l'administration du vecteur se fait par voie intravitréenne. Par contre, elle se produit quel que soit l'âge de l'animal au moment du traitement et perdure plus de 2 ans après la réalisation du traitement (Aguirre et al.2004).

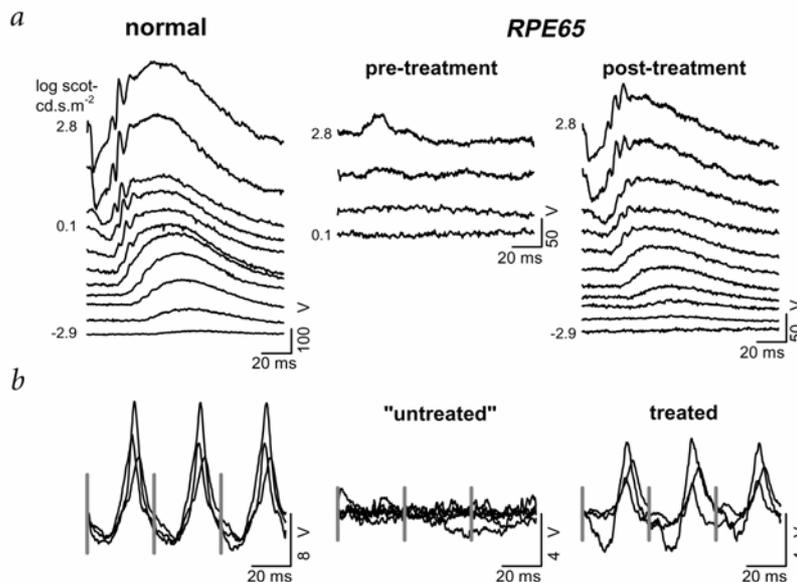


Figure 10: tracés électrorétinographiques chez les chiens *rpe65*<sup>-/-</sup> avant et après injection sous rétinienne de AAV2.C $\beta$ A.*rpe65* ainsi que chez les chiens contrôles; a) en lumière bleue en milieu scotopique, b) Flicker. D'après Acland et *al.*2001.

Il existe, aux Etats-Unis, une seconde colonie de chiens briards *rpe65*<sup>-/-</sup> qui présente également une délétion de 4 paires de base dans le gène *rpe65* entraînant l'apparition d'un codon stop avec la production d'une protéine non fonctionnelle. Ces chiens ont reçu un traitement légèrement différent car le promoteur utilisé était le CMV avec un titre de la solution virale plus élevé à  $2.10^{12}$  particules/ml alors qu'il était de  $2,3.10^{11}$  particules/ml pour l'autre expérience (Narfström et *al.*2003). De la même façon, les enregistrements ERG des chiens traités par injection sous rétinienne, uniquement, ont été améliorés dans un premier temps. Dernièrement les résultats à plus de 2 ans du traitement initial ont été communiqués. Ils mettent en évidence, une diminution des réponses scotopiques 2 ans après le traitement avec un ERG photopique stable (Narfström et *al.*2004). 10 semaines après l'injection sous rétinienne de AAV2.CMV.*rpe65*, le nystagmus présent avant chirurgie a disparu chez 10 des 11 chiens traités. L'accumulation de lipides dans les cellules de l'EPR a disparu chez un des 2 animaux examinés en histologie. Mais dans cette étude, un problème important est survenu rapidement en postopératoire avec l'apparition d'une uvéite pouvant atteindre le stade de chorioretinite. Cette inflammation jugulée par un traitement corticoïdes systémique ou topique est survenue dans 8 cas sur les 11 traités. Elle est également survenue chez les

animaux injectés par intravitréenne, mais pas au niveau des yeux injectés avec le vecteur contrôle AAV.CMV.GFP, produit pourtant suivant la même méthode. Aucun microorganisme n'a été détecté dans la solution virale. Une des hypothèses est que l'expression d'une protéine rpe65 non tronquée chez un animal exprimant habituellement de façon constitutive une protéine tronquée au niveau des cellules de l'EPR entraîne une réponse immune contre cette nouvelle forme de protéine rpe65. La recherche d'une réponse humorale contre la protéine RPE65 s'est avérée infructueuse, la mise en jeu d'une réponse immunitaire à l'origine de ces uvéites n'a pu être mise en évidence (Caro et *al.*2004). De plus, l'utilisation d'un promoteur fort CMV associé au sérotype 2 de l'AAV pourrait conduire à une surexpression de la protéine au niveau de l'EPR mais également au niveau de la neurorétine. Or comme la montré Sarra dans le modèle murin *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup>, la surexpression de la protéine « corrective » Prph2 pouvait être délétère pour la rétine (Sarra et *al.*2001).

La seconde approche possible pour le traitement des rétinopathies pigmentaires par transfert de gènes est l'administration de facteurs de survie.

Plusieurs facteurs neurotrophiques (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor ; FGF-2, fibroblast growth factor ; BDNF, brain-derived neurotrophic factor ; CNTF, ciliary neurotrophic factor) ont été identifiés comme susceptibles d'induire la survie des photorécepteurs dans une variété de modèles animaux de dégénérescence rétinienne (Frasson et *al.*1999. Lau et *al.*2000. McGee Sanftner et *al.*2001). Le CNTF est exprimé par la rétine en voie de développement et la rétine adulte chez le rat de façon prédominante au niveau des cellules de Müller (Kirsch et *al.*1997). Cette protéine CNTF possède un récepteur spécifique, la sous-unité  $\alpha$  du complexe récepteur au CNTF, localisée au niveau des cellules de Müller, des cellules horizontales, des cellules amacrines et des cellules ganglionnaires. Ce récepteur n'a pas été retrouvé au niveau des photorécepteurs (Walkin et *al.*2000). Une seule injection de la protéine recombinante de CNTF dans le vitré permet dans une grande variété de modèles murins de dégénérescence rétinienne de prolonger, à court terme (7 à 10 jours), la survie des photorécepteurs (LaVail et *al.*1998). Le CNTF a une demi-vie très courte (1,5 minute) ; ce qui nécessite la recherche de dispositifs qui permettent, comme le transfert de gène, de libérer de

façon prolongée ce facteur neurotrophique (Dittrich et *al.*1994). Cayouette et Gravel ont rapporté que la perte des photorécepteurs dans un modèle murin de dystrophie rétinienne avait été retardée de 18 jours suite à une injection intravitréenne d'un vecteur adénoviral codant pour le CNTF (Cayouette et *al.*1997). L'injection du même vecteur à une souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> âgée de 3 semaines a permis un retard de plus de 7 semaines dans la perte des photorécepteurs. Mais l'expression instable dans le temps d'un gène transféré par un vecteur adénoviral explique cet effet limité dans le temps. Après une injection intravitréenne d'un vecteur rAAV codant pour le CNTF, Liang et *al* ont montré une préservation des photorécepteurs 9 mois après le traitement de souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> et 8 mois après le traitement de deux modèles de dégénérescence rétinienne dominante chez des rats transgéniques porteurs d'une mutation dans le gène de la rhodopsine (rat P23H et rat S334ter). L'épaisseur de la couche nucléaire externe et le nombre de rangées de noyaux présents dans cette couche cellulaire, qui sont des données objectives qui permettent de suivre la dégénérescence de la rétine, ont été trouvés significativement plus importante dans les yeux injectés par un rAAV-

CNTF-GFP chez le modèle murin *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> et chez les deux modèles de rats P23H et S334ter comparés aux yeux contrôles injectés par le rAAV codant uniquement pour la GFP (Liang et *al.*2001). Malgré l'amélioration structurelle de la rétine suite à l'injection de rAAV-CNTF-GFP, des effets secondaires à l'administration du CNTF semblent exister. En effet, des différences d'amplitude de l'électrorétinogramme (ERG) de l'œil injecté par rAAV-CNTF-GFP comparés aux yeux contrôle sont retrouvées chez les souris et chez les rats injectés par cette équipe avec une différence en défaveur du vecteur codant pour le CNTF. Cette atteinte de la fonction rétinienne a également été retrouvée par d'autres équipes dans la souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> et dans la souris *rds*<sup>+/-P216L</sup> qui présente une mutation dominante dans le gène *Prph2*. Cette anomalie est marquée par la décroissance paradoxale de l'amplitude de l'onde a et b au niveau de l'ERG scotopique et de l'amplitude de l'onde b dans l'ERG photopique malgré la préservation morphologique chez la souris *rds*<sup>+/-P216L</sup> après injection sous rétinienne de rAAV.CMV.CNTF ou rAAV.CBA.CNTF (Bok et *al.*2002). Schlichtenbrede et ses collaborateurs ont mis en évidence cette altération de l'amplitude de l'ERG uniquement pour l'onde b chez la souris *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> traité par rAAV.CMV.CNTF. Ils ont également montré que l'injection de ce même vecteur chez une souris sauvage "normale" entraînait de la même façon une réduction de l'amplitude de l'onde b de l'ERG

(Schlichtenbrede et al.2003). Ce sont les neurones internes de la rétine et les cellules de Müller qui sont à l'origine de l'onde b de l'ERG. Walhin et al ont montré qu'après l'injection intraoculaire de CNTF recombinant, un message d'activation parvenait aux cellules de Müller, aux cellules amacrines et aux cellules ganglionnaires mais pas aux photorécepteurs (Walhin et al.2000). Ce message d'activation suite à l'injection de CNTF est retrouvé dans les rétines normales ou dégénératives (Walhin et al.2001). C'est peut-être l'absence de ce message d'activation au niveau des photorécepteurs qui est à l'origine de leur préservation et sa présence au niveau des cellules ganglionnaires et amacrines qui est à l'origine de l'effet sur l'onde b de l'ERG.

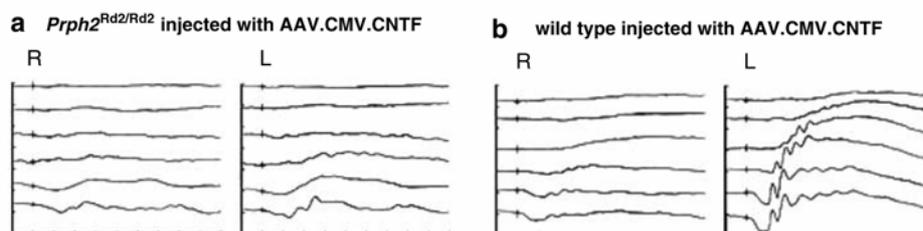


Figure 11: Tracés ERG montrant la diminution des amplitudes des ERGs après injection de l'œil droit en a) d'un vecteur AAV.CMV.CNTF chez une souris  $Prph2^{Rd2/Rd2}$ , en b) du même vecteur AAV.CMV.CNTF chez une souris normale. D'après Schlichtenbrede et al.2003.

Il est également rapporté un second effet lié à l'injection de CNTF. En effet, suite à l'administration sous rétinienne d'AAV codant pour le CNTF chez la souris transgénique  $rd\pm P216L$ , il se produit un changement morphologique au niveau du noyau des bâtonnets, avec un accroissement de taille du noyau et une augmentation de l'euchromatine, signes qui traduisent habituellement un changement dans l'expression génique d'une cellule (Bok et al.2002). Ces modifications nucléaires survenant au niveau des bâtonnets sont dose dépendantes du CNTF. Les liens entre les changements de configuration du noyau des

photorécepteurs, le chemin d'activation des cellules de la couche interne de la rétine et de la diminution de l'amplitude de l'ERG suite à l'administration du CNTF ne sont pas encore connus. Le rôle du CNTF et son mécanisme d'action ne sont pas encore complètement élucidés. Peut-être une fenêtre thérapeutique serait-elle nécessaire pour ne pas voir apparaître d'effets délétère au niveau de la rétine? Cette fenêtre pourrait être réalisée en utilisant des promoteurs régulables comme le système tétracycline.

## **VI) Pathologies du nerf optique**

Les atteintes du nerf optique peuvent être retardées par l'administration de facteurs de survie comme le BDNF (le Brain-derived Neurotrophic Factor). Cette thérapeutique évaluée dans le cadre de l'atteinte glaucomateuse du nerf optique a été décrite précédemment dans le chapitre concernant le glaucome. On peut toutefois imaginer que l'emploi des facteurs de survie pourrait être utilisé dans d'autres types d'atteintes du nerf optique comme les neuropathies optiques héréditaires où le dysfonctionnement du nerf optique est secondaire à la dégénérescence des cellules ganglionnaires du nerf optique et à leurs axones. On peut penser que les facteurs de survie pourraient retarder la mort des cellules ganglionnaires.

Une des plus fréquente de ces pathologies héréditaires est la neuropathie optique héréditaire de Leber. Elle résulte de mutations ponctuelles sur l'ADN mitochondrial. Dans plus de 95% des cas, il s'agit de trois mutations G3460A, G11778A ou T14484C, responsables de l'altération de gènes codant des sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il apparaît une dégénérescence isolée des cellules ganglionnaires dont les

mécanismes physiopathogéniques n'ont pas été clairement identifiés. Une équipe a publié des résultats de thérapie génique corrective concernant cette maladie. Cette équipe a créé des cellules ganglionnaires qui possèdent la mutation G11778A qui entraîne une diminution de la production d'ATP par dysfonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau de la sous-unité ND4. Les auteurs ont transféré le gène manquant au niveau du noyau en utilisant un vecteur dérivé d'un virus adéno-associé en adjoignant une séquence d'adressage FLAG permettant l'envoi de la protéine générée dans la mitochondrie. L'expression de la protéine ND4 a été retrouvée au niveau des mitochondries avec une restauration du fonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Guy et *al.*2002).

Le traitement des neuropathies optiques d'origine inflammatoires par thérapie génique a également été envisagé. En effet, il a été retrouvé dans un modèle induit de sclérose en plaque (SEP), l'encéphalomyélite allergique expérimentale, que des espèces réactives à l'oxygène (ROS) sont libérées par les cellules inflammatoires qui infiltrent les tissus et notamment le nerf optique lors des névrites optiques inflammatoires. La même constatation a été réalisée dans les pathologies humaines. Ces ROS sont des médiateurs de démyélinisation et d'atteinte de la barrière hémato-encéphalique. Or les agents détoxifiants les ROS sont présents à des taux faibles et inadaptés dans le nerf optique et dans le cerveau et ne peuvent protéger ces tissus des attaques radicalaires secondaires à la présence augmentée des ROS lors d'une crise inflammatoire. La catalase et la superoxyde dismutase sont des éléments détoxifiants les espèces réactives à l'oxygène ou encore appelés agents antiradicalaires. Dans ce modèle de sclérose en plaque induite de façon expérimentale, l'administration d'agents antiradicalaires a permis d'améliorer la clinique mais également de diminuer les signes histologiques présents lors de l'atteinte pathologique (Honegger et *al.*1989). Pour éviter des injections répétées, il a été testé dans l'œil plusieurs vecteurs viraux délivrant une catalase. Tout d'abord, l'injection d'un vecteur dérivé des adéno-associated virus codant pour le gène de la catalase sous le contrôle du promoteur CMV (AAV.CMV.CAT) a été injecté par voie intravitréenne dans un des yeux de souris présentant une encéphalomyélite allergique expérimentale. L'expression de la catalase a permis de diminuer la démyélinisation du nerf optique avec 38% de myéline en plus présente au niveau des yeux injectés par rapport aux yeux contrôles injectés par un AAV.CMV.gfp. De plus, l'œdème papillaire a diminué de façon significative au niveau des nerfs optiques traité par l'AAV.CMV.CAT. La barrière hémato-encéphalique a été préservée

chez les animaux traités par le vecteur AAV.CMV.CAT. Une diminution des espèces réactives à l'oxygène est visible au niveau des nerfs optiques des yeux injectés par le vecteur thérapeutique (Guy et *al.*1998). Donc la thérapie génique délivrant une catalase grâce à un vecteur adéno-associated virus permet de diminuer voire de supprimer les névrites optiques expérimentales. Toutefois, à cause d'une certaine lenteur dans l'expression d'une protéine suite à l'injection d'un tel vecteur AAV, la même équipe a testé la même construction dans un vecteur adénoviral déficient afin de pouvoir avoir une expression de la protéine plus rapide. Car une rapidité d'expression de la protéine serait nécessaire pour protéger le nerf optique en cas d'injection après le début de l'atteinte inflammatoire. L'injection intravitréenne d'un Ad.CMV.CAT chez le même modèle murin induit de SEP n'a pas entraîné, contrairement à ce qui était attendu, la présence de cellules inflammatoires plus nombreuses au niveau des yeux injectés comparés à des yeux non injectés. Les résultats sur la diminution de la démyélinisation, sur la diminution de l'œdème papillaire et sur la préservation de la barrière hémato-encéphalique ont été identiques avec ce vecteur qu'avec le vecteur adéno-associated virus (Guy et *al.*1999). Mais pour pouvoir utiliser cette thérapie dérivée d'un vecteur adénoviral, il faudrait tester la réaction inflammatoire engendrée par un tel vecteur chez des animaux dont la tolérance immunologique est plus faible et tester si une expression moins stable liée aux vecteurs adénoviraux est suffisante pour traiter les épisodes inflammatoires et les prévenir.

## CONCLUSION

Ce travail a permis de passer en revue les diverses applications possibles de la thérapie génique en ophtalmologie. Il est probable que d'ici quelques années, ce mode de traitement soit disponible pour une application clinique en ophtalmologie.

Comme nous l'avons vu, la thérapie génique est testée dans tous les domaines de l'ophtalmologie, avec des stades d'avancement des travaux de recherche différents en fonction des sous-spécialités ophtalmologiques envisagées.

En effet, ce traitement par thérapie génique est déjà à un stade d'évaluation préclinique chez l'homme pour deux applications que sont le traitement du rétinoblastome en ophtalmocancérologie et le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Le traitement par la méthode du gène suicide du rétinoblastome a obtenu des résultats qui semblent être controversés et l'essai de phase I du transfert du gène PEDF dans le cadre de la DMLA n'est, quant à lui, qu'à ses débuts.

Pour les autres essais qui sont à un stade préliminaire d'étude dans les modèles animaux, le travail le plus connu est, bien entendu, le transfert de gène dans la rétine avec des résultats impressionnants montrant une amélioration de la fonction visuelle chez le chien briard RPE65<sup>-/-</sup>, modèle canin de l'amaurose congénitale de Leber allant jusqu'à rendre célèbre le chien Lancelot.

Mais, d'autres applications ophtalmologiques possibles pour la thérapie génique sont également en évaluation. Leurs développements sont liés à l'amélioration constante des méthodes de diagnostic et de la connaissance de la génétique. L'ophtalmologie devrait bénéficier de ces avancées outre pour le diagnostic génétique de pathologies comme les dystrophies cornéennes ou les atteintes du nerf optique, mais également pour un traitement de l'anomalie génétique causale par un transfert de gène correctif. La neuroprotection des cellules ganglionnaires dans le glaucome ou des cellules photoréceptrices dans les dégénérescences rétiniennes devrait être facilitée par la délivrance par thérapie génique de molécules antiapoptotiques ou de facteurs de survie.

L'outil qu'est la thérapie génique est lui en perfectionnement constant, du fait des progrès incessants réalisés en vectorologie, qui est l'étude des vecteurs. Ces progrès sont visibles *in vivo* notamment pour les vecteurs viraux. Ces vecteurs sont rendus plus sûrs par des

modifications dans leurs configurations ainsi que par l'amélioration de leurs méthodes de production. Ce domaine de recherche technique est marqué par le développement de laboratoires qui peuvent réaliser des productions virales GMP (pour Good Manufacturing Practice) qui permettront d'obtenir, comme pour les autres médicaments, des préparations virales standardisées et sécurisées pour l'administration aux patients.

Pour les vecteurs non viraux, la difficulté pour un essor dans leur utilisation en ophtalmologie réside dans la nécessité d'amélioration de leur efficacité de transduction *in vivo* de tissus oculaires.

Le maître mot pour une application future de la thérapie génique en clinique devrait être la prudence avec la réalisation d'études précliniques et de toxicologie dans des modèles animaux, le plus proche de l'homme. Cette sagesse devrait permettre de se prémunir d'effets indésirables non évalués comme celui survenu en 1999 aux Etats-Unis. C'est à ce prix que les sujets réticents à la thérapie génique seront rassurés.

1. **Acland G.M., Aguirre G.D., Ray J., Zhang Q., Aleman T.S., Cideciyan A.V., Pearce-Kelling S.E., Anand V., Maguire A.M., Jacobson S.G., Hauswirth W.W. and Bennett J.** (2001) Gene therapy restores vision in canine model of childhood blindness. *nature genetics* **28**,92-95.
2. **Acland G.M., Ray K., Mellersh C.S., Langston A.A., Rine J., Ostrander E.A. and Aguirre G.D.** (1999) A novel retinal degeneration locus identified by linkage and comparative mapping of canine early retinal degeneration. *Genomics* **15**;59(2):134-42.
3. **Acland GM, Ray K, Mellersh CS, Gu W, Langston AA, Rine J, Ostrander EA, Aguirre GD.** (1998) Linkage analysis and comparative mapping of canine progressive rod-cone degeneration (prcd) establishes potential locus homology with retinitis pigmentosa (RP17) in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci U S A* **17**,95(6),3048-53.
4. **Acland G.M., Blanton S.H., Hershfield B. and Aguirre G.D.** (1994) XLPRA: a canine retinal degeneration inherited as an X-linked trait. *Am J Med Genet* **1**,52(1),27-33.
5. **Acland G.M. and Aguirre G.D.** (1987) Retinal degenerations in the dog: IV. Early retinal degeneration (erd) in Norwegian elkhounds. *Exp Eye Res* **44**,(4),491-521.
6. **The AGIS Investigators.** 2000. The advances glaucoma intervention study (AGIS):7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *Am.J.Ophthalmol.* **130**.490-491.
7. **Aguirre G.D., Jacobson S., Bennett J., Maguire A., Pearce-Kelling S., Palczewski K., Aleman T., Cideciyan A., Hauswirth W. and Acland G.M.** (2004) Long-term restoration of visual cell function and structure with AAV-mediated gene therapy in canine. Abstract ARVO#1170
8. **Aguirre G.D., Baldwin V., Weeks K.M., Acland G.M. and Ray K.** (1999) Frequency of the codon 807 mutation in the cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in Irish setters and other dog breeds with hereditary retinal degeneration. *J.Hered* **90**,(1),143-7.
9. **Aguirre G., Farber D., Lolley R., O'Brien P., Alligood J., Fletcher R.T. and Chader G.** (1982) Retinal degeneration in the dog. III. Abnormal cyclic nucleotide metabolism in rod-cone dysplasia. *Exp.Ey. Res* **35**,(6),625-42.
10. **Aguirre G.D. and Rubin L.F.** (1974) Pathology of hemeralopia in the Alaskan malamute dog. *Invest.Ophthalmol* **13**,(3),231-5.
11. **Akhmedov N.B., Baldwin V.J., Zangerl B., Kijas J.W., Hunter L., Minoofar K.D., Mellersh C., Ostrander E.A., Acland G.M.B. and Aguirre G.D.** (2002 ) Cloning and characterization of the canine photoreceptor specific cone-rod homeobox (CRX) gene and evaluation as a candidate for early onset photoreceptor diseases in the dog. *Mol.Vis* **22**,(8),79-84.
12. **Akhmedov N.B., Piriev N.I., Chang B., Rapoport A.L., Hawes N.L., Nishina P.M., Nusinowitz S., Heckenlively J.R., Roderick T.H., Kozak C.A., Danciger M., Davisson M.T. and Farber D.B.** (2000) A deletion in a photoreceptor-specific nuclear receptor mRNA causes retinal degeneration in the rd7 mouse. *P.N.A.S USA* **97**,5551-5556.
13. **Albert D.M., Ryan L.M. and Borden E.C.** (1996). Metastatic ocular and cutaneous melanoma: a comparison of patient characteristics and prognosis. *Arch.Ophthalmol.* **114**,107-108.
14. **Ali R.R., Sarra G.M., Stephens C., De Alwis M., Bainbridge J.W.B., Munro P.M., Fauser S., Reichell M.B., Kinnon C., Hunt D.M., Bhattacharya S.S. and Thrasher A.J.** (2000) Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat.Genet.* **25**.306-310.
15. **Ali R.R., Reichel M.B. Thrasher A.J., Levinsky R.J., Kinnon C., Kanuga N., Hunt D.M. and Bhattacharya S.** (1996) Gene transfer into the mouse retina mediated by ab adeno-associates viral vector. *Hum.Mol.Genet* **5**,5,591-594.

16. **Alizadeb H., Howard K., Mellon J., Mayhew E., Rusciano D. and Niederkorn J.Y.** (2003) Reduction of liver metastasis of ocular mélanoma by interferon- $\beta$  gene transfer. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci.* **44**,7,3042-3051
17. **Allikmets R.L., Zernant J., Perrault I., Den Hollander A., Dharmaraj S., Cremers F.P.M., Kaplan J., Koenekoop R.K. and Maumenee I.** (2004) Multiallelic inheritance and/or modifier alleles in leber congenital amaurosis : analysis with the LCA disease chip.abstract ARVO #2444.
18. **Alon T., Hemo I., Itin A., Pe'ter J., Stone J. And Keshet E.** (1995) Vascular endothelial growth factor acts as survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.* **1**.1024-1028.
19. **Al-Ubaidi M.R., Hollyfield J.G., Overbeek P.A. and Baehr W.** (1992) Photoreceptor degeneration induced by the expression of simian virus 40 large tumor antigen in the retina of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* **15**,89(4),1194-8.
20. **Andrawiss M., Maron A., Beltran W., Opolon P., Connault E., Griscelli F., Yeh P., Perricaudet M. and Devauchelle P.** (2001) Adenovirus-mediated gene transfer in canine eyes : a preclinical study for gene therapy of human uveal melanoma. *J. Gene. Med.* **3**.228-239.
21. **Angella G.J., Sherwood M.B., Balasubramanian L., Doyle J.W., Smith M.F., Van Setten G., Goldstein M. and Schultz G.S.** (2000) *Invest. Ophthalmol. vis. Sci.* **41**.13.4158-4162.
22. **Anglade E. and Csaky K.G.** (1998) Recombinant adenovirus-mediated gene transfer into the adult rat retina. *Curr. Eye. Res.* **17**.316-321.
23. **Aquirre G., Farber D., Lolley R., Fletcher R.T. and Chader G.J.** (1978) Rod-cone dysplasia in Irish setters : a defect in cyclic GMP metabolism in visual cells. *Science* **201**,1133-1134.
24. **Auricchio A., Riviera V., Clackson T., O'Connor E., Maguire A., Tolentino M., Bennett J. and Wilson J.** (2002) Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol. Ther.* **6**.238.
25. **Bainbridge J.W.B., Mistry A., Schlichtenbrede F.C., Smith A., Broderick C., De Alwis M., georgiadis A., Taylor P.M., Squires M., Sethi C., Charteris D., Thrasher A.J., Sargan D. and Ali R.R.** (2003) Stable rAAV-mediated transduction of rod and cone photoreceptors in the canine retina. *Gene. Ther.* **10**.1336-1344.
26. **Bainbridge J.W.B., Mistry A., De Alwis M., paleolog E., Baker A., Thrasher A.J. and Ali R.R.** (2002) Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene. Therapy.* **9**.320-326.
27. **Bainbridge J.W.B., Stephens C., Parsley K., Demaison C., Halfyard A., Thrasher A.J. and ALI R.R.** (2001) In vivo gene transfer to the mouse eye using an HIV-based lentiviral vector ; efficient long term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium. *Gene. Ther.* **8**.1665-1668.
28. **Balmer A., Munier F. and Zofragos L.** (2002) Nouvelles stratégies dans le traitement du rétinoblastome. *J. Fr. Ophthalmol.*, **25**,2,187-193.
29. **Barbehenn K.R.** (1961) Some effects of litter size on social behavior in laboratory rats. *Trans N.Y. Acad. Sci* **23**,443-6.
30. **Barnett K.C. and Curtis R.** (1985) Autosomal dominant progressive retinal atrophy in abyssinian cats. *J. Hered* **76**,168-170.
31. **Bascom, R.A., Manara S., Collins L., Molday R.S., Kalnins V.I. and McInnes R.R.** (1992) Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disk rim protein family implicated in human retinopathies. *Neuron* **8**,1171-1184.
32. **Bedikian A.Y., Legha S.S., Mavligit G., Carrasco C.H., Khorana S., Plager C., Papadopoulos N. and Benjamin R.S.** (1995). Treatment of uveal melanoma metastatic to the liver : a review of the MD Anderson Cancer Center experience and prognosis factors. *Cancer* **76**,1665-1670.

33. **Benihoud K., Yeh P. et Perricaudet M.** (2000) Vecteurs adénoviraux. La thérapie génique. Collection génie génétique. Éditions TEC 1 DOC-Paris. Page103.
34. **Bennett J., Zeng Y., Bajwa R., Klatt L., Li Y and Maguire A.M.** (1998) Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. *Gene.Ther* **5**,1156-1164.
35. **Bennett J., Wilson J., Sun D. and Forbes B. and Maguire A.** (1994) Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer into adult murine retina. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **35**,2535-2542.
36. **Berkelaar M., Clark D.B., Wang Y.C., Bray G.M. and AguayoA.J.** (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglions cells in adults rats. *J.Neurosci* **14**,4368-4374.
37. **Biel M., Seeliger M., Pfeifer A., Kohler K., Gerstner A., Ludwig A., Jaissle G., Fauser S., Zrenner E. and Hofmann F.** (1999) Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc.Natl.Acad.Sci U S A* **22**,96(13),7553-7.
38. **Borrás T., Brandt C.R., Nickells R. and Ritch R.** (2002) Gene therapy for glaucoma : treating a multifaceted, chronic disease. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **43**,2513-2518..
39. **Borrás T., Gabelt B.T., Klintworth G.K., Peterson J.C. and Kaufman.P.L.** (2001) Non-invasive observation of repeated adenoviral GFP gene delivery to the anterior segment of the monkey eye *in vivo*. *J.Gene.med* **3**,437-449
40. **Borrás T., Rowlette L.L., Erzurum S.C. and Epstein D.L.** (1999) Adenoviral reporter gene transfer to the human trabecular meshwork does not alter aqueous humor outflow. Relevance for potentiel gene therapy of glaucoma. *Gene.Ther* **6**,515-524.
41. **Borrás T., Tamm E.R. and Zigler Jr. J.S.** (1996) Ocular adenovirus genetransfer varies in efficiency and inflammatory response. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **37**,1282-1293.
42. **Bowes C., Li T., Danciger M., Baxter L.C., Applebury M.L. and Farber D.B.** (1990) Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* **347**,677-680.
43. **Bressler N.M. and Bressler S.B.** (1995) Preventive ophtalmology. Age related macular degeneration. *Ophthalmology*.**102**.1206-1211.
44. **Campochiaro P., Klein M., Holz E., Gupta A., Saperstein D., Bressler S., Wei L.L., Ray A., Frank R.N. and Stout T.** (2004) AdPEDF therapy for subfoveal choroidal neovascularization (CNV) : preliminary phase I results. ARVO#2361.
45. **Caro M.L., Tullis G., Estes D.M. and Narfstrom K.** (2004) Long-term expression of RPE65 in the canine model for LCA fails to elicit a hularal response to the transgene following gene therapy using rAAV.RPE65. Abstract ARVO#3693.
46. **Cashman S.M., Sadowski S.L., Morris D.J., Frederick J. and Kumar-Singh R.** (2002) Intercellular Trafficking of Adenovirus-Delivered HSV VP22 from the Retinal Pigment Epithelium to the Photoreceptors— Implications for Gene Therapy. *Mol.Ther* **6**,6.813-823.
47. **Cayouette M. and Gravel C.** (1997) Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in retinal degeneration (rd) mouse. *Hum.Gene.Ther* **8**,423-430.
48. **Chang B., Hawes N.L., Hurd R.E., Davisson M.T., Nusinowitz S. and Heckenlively J.R.** (2002) Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision.Res* **42**,517-525.
49. **Chang B., Heckenlively J.R., Hawes N.L. and Roderick T.H.** (1993a) New mouse primary retinal degenreation (rd-3). *Genomics*.**16**,45-49.

50. **Chang G.Q., Hao Y. and Wong F.** (1993b) Apoptosis : final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* **11**,595-605.
51. **Chen C.K., Burns M.E., Spencer M., Niemi G.A., Chen J., Hurley J.B., Baylor D.A. and Simon M.I.** (1999a) Abnormal photoresponses and light-induced apoptosis in rods lacking rhodopsin kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **96**,3718-3722.
52. **Chen J., Simon M.I., Matthes M.T., Yasumura D. and LaVail M.M.** (1999b) Increased susceptibility to light damage in an arrestin knockout mouse model of Oguchi disease (stationary night blindness). *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci* **40**,2978-2982.
53. **Chen J., Makino C.L., Peachey N.S., Baylor D.A. and Simon M.I.** (1995) Mechanisms of rhodopsin inactivation in vivo as revealed by a COOH-terminal truncation mutant. *Science* **267**,374-377.
54. **Chenivesse X., Ridoux V. and Tissier M.H.** (2003) Le contrôle de la qualité des produits de thérapie génique : approche de l'AFSSAPS. *M/S.4*.(19),481-488.
55. **Curtis R., Barnett K.C. and Leon A.** (1987) An early-onset retinal dystrophy with dominant inheritance in the abyssinian cat. Clinical and Pathological findings. *I.O.V.S* **28**,131-139.
56. **Davidorf F.H., Mendlovic D.B., Bowyer D.W., Gresak P.M., Foreman B.C., Werling K.T. and Chambers R.B.** (1991) Pathogenesis of retinal dystrophy in the royal college of surgeons rat. *Ann.Ophthalmol* **23**,87-94.
57. **Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., Crawford S.E., Xu H.J., Benedict W. and Bouck N.P.** (1999) Pigment epithelium-derived factor : a potent inhibitor of angiogenesis. *science*.**285**,245-248.
58. **D'Cruz P.M., Yasumura D., Weir J., Matthes M.T., Abderrahim H., LaVail M.M. and Vollrath D.** (2000) Mutation of the receptor tyrosin kinase gene MerTK in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum.Mol.Genet* **9**,645-651.
59. **DiLoreto D.Jr., Cox C., Grover D.A., Lazar E., del Cerro C. and del Cerro M.** (1994) The influences of age, topography, and gender on retinal degeneration in the fischer 344 rat. *Brain.Res* **647**,181-191.
60. **Ding B., Ryder O.A., Wang X., Bai S.C., Zhou S.Q. and Zhang Y.** (2000) Molecular basis of albinism in the rhesus monkey. *Mutat.Res.***3**,449.1-6.
61. **Dittrich F., Thoenen H. and Sendtner M.** (1994) Ciliary neurotrophic factor : pharmacokinetics and acute phase response. *Ann.Neurol.***35**,151-163.
62. **Dejneka N.S., Surace E.M., Aleman T.S., Cideciyan A.V., Lyubarsky A., Savchenko A., Redmond T.M., Tang W., Wei Z., Rex T.S., Glover E., Maguire A.M., Pugh E.N. Jr, Jacobson S.G. and Bennett J.** (2004) In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness. **9**(2),182-188.
63. **Erhardt J.A. and Pittman R.N.** (1998) p21WAF1 induces permanent growth arrest and enhances differentiation, but does not alter apoptosis in PC12 cells. *Oncogene*.**29**,443-451.
64. **Evans J.T. and Garcia V.** (2000) Lentivirus vector mobilization and spread by human immunodeficiency virus. *Hum.Gene.Ther.***11**,2331-2339.
65. **Farber D.B.** (1995) From mice to men : the cyclic GMP phosphodiesterase gene in vision and disease. The protector Lecture. *IOVS* **36**,263-275.
66. **Farber D.B., Danciger J.S. and Aguirre G.** (1992) The beta subunit of cyclic GMP phosphodiesterase mRNA is deficient in canine rod-cone dysplasia 1. *Neuron* **9**(2),349-56.
67. **Fabre J.W.** (2001) Prospects for genetic manipulation of donor organs and tissues. *Transplantation*. **15**,71(9),1207-1209.

68. **Fallaux F.J., Bout A., Van Der Velde I., Van den Wollenberg D.J., Hehir K.M., Keegan J., Auger C., Cramer S.J., Van Ormondt H., Van Der Eb A.J., Valerio D. and Hoeben R.C.** (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum.Gene.Ther.* **9**,1909-1917.
69. **Favor J., Sandulache R., Neuhauser-Klaus A., Pretsch W., Chatterjee B., Senft E., Wurst W., Blanquet V., Grimes P., Sporle R. and Schughart K.** (1996) The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci U S A* **26**,93(24),13870-5.
70. **Flannery J.G., Zolotukhin S., Vaquero M.I., La Vail M.M., Muzyczka N. and Hauswirth W.W.** (1997) Efficient photoreceptor-targeted gene expression *in vivo* by recombinant adeno-associated virus. *PNAS* **94**,6916-6921.
71. **Folliot S., Briot D., Conrath H., Provost N., Cherel Y., Moullier P. and Rolling F.** (2003) Sustained tetracycline-regulated transgene expression *in vivo* in rat ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *J.Gene.Med* **5**,493-501.
72. **Frasson, M., Picaud S., Leveillard T., Simonutti M., Mohand-Said S., Dreyfus H., Hicks D. and Sahel J.** (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 2724–2734.
73. **Furukawa T., Morrow E.M., Li T., Davis F.C. and Cepko C.L.** (1999) Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat.Genet* **23**,(4),466-70.
74. **Fukuhara M., Suzuki A., Fukuda Y. and Kosaka.** (1998) Adenovirus vector-mediated gene transfer into rat retinal neurons and Muller cells *in vitro* and *in vivo*. *Neurosci.Lett* **242**,93-96.
75. **Galvin J.A., Fishman G.A., Stone E.M., Secrist J.L., Roos B.R., Lopez I. and Koenekoop R.K.** (2004) Clinical phenotypes associated with specific genotypes in Leber congenital amaurosis.abstract ARVO #4063.
76. **Gao G.P., Alvira M.R., Wand L., Calcedo R., Johnstone J. and Wilson J.M.** (2002). Novel adeno-associated viruses from monkeys as vectors for human gene therapy. *P.N.A.S* **99**,(18), 11854-11859.
77. **Gao G.P., Yang Y. and Wilson J.M.** (1996). Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J.Virol* **70**,8934-8943.
78. **Gossen M. and Bujard H.** (1992) Tight control of gene expression in mammalian cell by tetracycline-responsive promoters. *PNAS* **89**,5547-5551.
79. **Gregory-Evans K. and Bhattacharya S.S.** (1998) Genetic blindness : current concept in the pathogenesis of human outer retinal dystrophies. *Trends.Genet* **14**,103-108.
80. **Grimm D., Kern A., Rittner K. and Kleinschmidt J.A.** (1998) Novel tools for production and purification of recombinant Adenoassociated Virus Vectors. *Hum.Gene.Ther* **10**,9(18),2745-2760.
81. **Gropp K.E., Szel A., Huang J.C., Acland G.M., Farber D.B. and Aguirre G.D.** (1996) Selective absence of cone outer segment beta 3-transducin immunoreactivity in hereditary cone degeneration (cd). *Exp.Eye.Res* **63**,(3),285-96.
82. **Gu S.M., Thompson D.A., Srikumari C.R., Lorenz B., Finckh U., Nicoletti A., Murthy K.R., Rathmann M., Kumaramanickavel G., Denton M.J. and Gal A.** (1997) Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat.Genet* **17**,194-197.
83. **Guy J., Qi X., Pallotti F., Schon E.A., Manfredi G., Carelli V., Martinuzzi A., Hauswirth W.W. and Lewin A.S.** (2002) Rescue of a mitochondrial deficiency causing leber hereditary optic neuropathy. *Ann.Neurol* **52**,534-542.
84. **Guy J., Xiaoping Q., Wang H. and Hauswirth W.W.** (1999) Adenoviral gene therapy with catalase suppresses experimental optic neuritis. *Arch.Ophthalmol* **117**,1533-1539.

85. **Guy J., Xiaoping Q. and Hauswirth W.W.** (1998) Adeno-associated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis. *P.N.A.S* **95**,13847-13852.
86. **Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M.; McCormack., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J.L., De Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross.F., Valenti F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L.E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T.H., Le Deist F., Fischer A. and Cavazzana-Calvo M.** (2003) LMO2-Associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**,415-419.
87. **Hafezi F., Grimm C., Simmen B.C., Wenzel A. and Reme C.E.** (2000) Molecular ophthalmology : an update on animal models for retinal degenerations and dystrophies. *Br.J.Ophthalmol* **84**,922-927.
88. **Hagstrom S.A., North M.A., Nishina P.L., Berson E.L. and Dryja T.P.** (1998) Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patient with retinitis pigmentosa. *Nat.Genet.* **18**,174-176.
89. **Hauswirth W.W. and Beaufriere L.** (2000) Ocular gene therapy : quo vadis ? *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **41**,2821-2826.
90. **Hawes N.L., Chang B., Hageman G.S., Nusinowitz S., Nishina P.M., Schneider B.S., Smith R.S., Roderick T.H., Davisson M.T. and Heckenlively J.R.** (2000) Retinal degeneration 6 (rd6) : a new mouse model for human retinitis punctata albescens. *I.O.V.S* **41**,3149-3157.
91. **Heatley G., Kiland J.A., Seeman J., Schlamp C.L., Dawson D.G., Maneval D., Kaufman P.L. and Nickells R.W.** (2004) Gene therapy using p21WAF-1/Cip-1 to modulate wound healing after glaucoma trabeculectomy surgery in a primate model of ocular hypertension. *Gene.Ther* **11**,949-955
92. **Heckenlively J.R., Chang B., Erway L.C., Peng C., Hawes N.L., Hageman G.S. and Roderick T.H.** (1995) Mouse model for usher syndrome : linkage mapping suggests homology to usher type 1 reported at human chromosome 11p15. *PNAS.USA.* **92**,11100-11104.
93. **Hennig A.K., Levy B., Volger C.A., Galvin N., Bassnet S. and Sands M.S.** (2003) Intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in specific areas of the CNS in mucopolysaccharidosis VII mice. *J Neurosci.* **15**.23(8).3302-3307.
94. **Hillenberg M., Schnieders F., Loser P. and Straus M.** (2001) System for efficient helper-dependant minimal adenovirus construction and rescue. *Hum.Gene.Ther* **12**,643-657.
95. **Hsich G., Sena-Esteves M. and Breakefield X.O.** (2002) Critical issues in gene therapy for neurologic disease. *Hum.Gene.Ther* **13**,579-604.
96. **Humphries M.M., Rancourt D., Farrar G.J., Kenna P., Hazel M., Bush R.A., Sieving P.A., Sheils D.M., McNally N., Creighton P., Erven A., Boros A., Gulya K., Capecchi M.R. and Humphries P.** (1997) Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat.Genet* **15**,(2),216-9.
97. **Huang P.C., Gaitan A.E., Hao Y., Petters R.M. and Wong F.** (1993) Cellular interactions implicated in the mechanism of photoreceptor degeneration in transgenic mice expressing a mutant rhodopsin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci U S A* **15**,90(18),8484-8.
98. **Hurwitz.R.L.** (2004) Gene therapy for retinoblastoma : outcome of combined thymidine kinase and ganciclovir therapy in children with vitreous seeds. ARVO. Abstract#1172
99. **Igarashi T., Miyake K., Kato K., Watanabe A., Ishizaki M., Ohara K. and Shimada T.** (2003) Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in murine proliferative retinopathy model. *Gene.Ther* **10**,219-226.
100. **Ing J.J., Ing H.N. and Nelson L.R.** (1998) Ten years prospective results of penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* **105**,1855-1865.

101. **Jampel H.D., McGuigan L.J., Dunkelberger G.R., L'Hernault N.L. and Quigley H.A.**(1998) Cellular proliferation after experimental glaucoma filtration surgery. *Arch.Ophthalmol* **106**,89-94.
102. **Jomary C., Vincent K.A., Grist J., Neal M.J. and Jones S.E.** (1997) Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration.*gene.Ther* **4**,683-690.
103. **Jomary C, Piper TA, Dickson G., Couture L.A., Smith A.E., Neal M.J. and Jones S.E.** (1994) Adenovirus-mediated gene transfer to murine retinal cells in vitro and in vivo. *FEBS Lett* **347**,117-22.
104. **Kamata Y., Okuyama T., Kosuga M., O'hira A., Kanaji A., Sasaki K., Yamada M. and Azuma N.** (2001). *Mol.Ther.***4**,307-312.
105. **Kedzierski W., Lloyd M., Birch D.G., Bok D. and Travis G.H.** (1997) Generation and analysis of transgenic mice expressing P216L-substituted rds/peripherin in rod photoreceptors.*Invest.Ophthalmol.Vis.Sci* **38**,(2),498-509.
106. **Kee C., Sohn S. and Hwang J.M.** (2001) Stromelysin gene transfer into cultured human trabecular cells and rat trabecular meshwork in vivo. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **42**,2856-2860.
107. **Kendall R.L. and Thomas K.A.** (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by endogenously encoded soluble receptor.*Proc.Natl.Acad.sci* **90**,10705-10709.
108. **Kerrigan L.A., Zack D.J., Quigley H.A., Smith S.D. and Pease M.E.** (1997) Tunnel-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma.*Arch.Ophthalmol* **115**,1031-1035.
109. **Kijas J.W., Cideciyan A.V., Aleman T.S., Pianta M.J., Pearce-Kelling S.E., Miller B.J., Jacobson SG, Aguirre G.D. and Acland G.M.** (2002) Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa.*Proc.Natl.Acad.Sci U S A* **30**,99(9),6328-33.
110. **Kirsch M., Lee M.Y., Meyer V., Wiese A. and Hoffman H.D.** (1997) Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development : expression of CNTF and its receptor and in vitro effects on target cells.*J.Neurochem* **68**,979-990.
111. **Klebe S., Sykes P.J., Coster D.J., Krishnan R. and Williams K.A.** (2001) Prolongation of sheep corneal allograft survival by ex vivo transfer of gene encoding interleukin-10. *Transplantation* **15**,71(9),1214-1220.
112. **Koenekoop R.K.** (2004) An overview of leber congenital amaurosis : a model to understand human retinal development.*Surv.Ophthalmol* **49**,(4),379-398.
113. **Kommonen B., Penn J.S., Kylma T., Karhunen U., Dawson W.W., Tolman B. and Ukkola T.** (1994) Early morphometry of a retinal dystrophy in Labrador retrievers. *Acta.Ophthalmol* **72**,(2),203-10.
114. **Lai C.M., Yu M.J.T., Brankov M., Barnett N.L., Zhou X., Redmond M.T., Narfstrm K. and Rakoczy E.P.** (2004) Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe 65-/- knockout mouse eyes results in limited rescue.*Genet.Vaccines.therapy.***2** (1) :3.
115. **Lai Y.L., Jacoby R.O. and Jonas A.M.** (1978) Age-related and light-associated retinal changes in fischer rats.*I.O.V.S* **17**,634-638.
116. **LaVail M.M., Yasumura D., Matthes M.T., Lau-Villacorta C., Unoki K., Sung C.H. and Steinberg R.H.** (1998) Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **39**,592-602.
117. **LaVail M.M., Blanks J.C. and Mullen R.J.** (1982) Retinal degeneration in the pcd cerebellar mutant mouse. Light microscopic and autoradiographic analysis. *J.Comp.Neurol* **212**,217-230.
118. **Lau, D., McGee L.H., Zhou S., Rendahl K.G., Manning W.C. Escobedo J.A. and Flannery J.G.** (2000) Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**,3622-3633.

119. **Lee V., Subak-Sharpe I., Hungerford J.L., Davies N.P. and Logani S.** (2000). Exposure of primary orbital implants in postenucleation retinoblastoma patients. *Ophthalmology* **107**, 940-945.
120. **Lem J., Krasnoperova N.V., Calvert P.D., Kosaras B., Cameron D.A., Nicolo M., Makino C.L. and Sidman R.L.** (1999) Morphological, physiological, and biochemical changes in rhodopsin knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci U S A* **19**,96(2),736-41.
121. **Lewin A.S., Drenser K.A., Hauswirth W.W., Nishikawa S., Yasumura D., Flannery J.G. and LaVail M.M.** (1998) Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat.Med* **4**, (8),967-71. Erratum in: *Nat Med* **4**, (9),1081.
122. **Liu C., Li Y., Peng M., Laties A.M. and Wen R.** (1999) Activation of caspase-3 in the retina of transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter during photoreceptor degeneration. *J Neurosci* **15**,19(12),4778-85.
123. **Liden R.M., Ward P., Giraud C., Winocour E. and Berns K.I.** (1996) Site specific integration by adeno-associated virus. *P.N.A.S* **93**,11288-11294.
124. **Li Z.Y., Wong F., Chang J.H., Possin D.E., Hao Y., Petters R.M. and Milam A.H.** (1998) Rhodopsin transgenic pigs as a model for human retinitis pigmentosa. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci* **39**, (5),808-19.
125. **Li T., Adamian M., Roof D.J., Berson E.L. Dryja T.P., Roessler B.J. and Davidson B.L.** (1994) In vivo transfer of a reporter gene to the retina mediated by an adenoviral vector. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **35**,2543-2549.
126. **Liou G.I., Fei Y., Peachey N.S., Matragoon S., Wei S., Blaner W.S., Wang Y., Liu C., Gottesman M.E. and Ripps H.** (1998) Early onset photoreceptor abnormalities induced by targeted disruption of the interphotoreceptor retinoid-binding protein gene. *J.Neurosci* **15**;18(12):4511-20.
127. **Lorenz B., Gyurus P., Preising M., Bremser D., Gu S., Andrassi M., Gerth C. and Gal A.** (2000) Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. *IOVS* **41**,2735-2742.
128. **Loewen N., Balher C., Teo W.L., Whitwam T., Peretz M., Xu R., Fautsch M.P., Johnson D.H and Poeschla E.M.** (2002) Preservation of outflow facility after second-generation FIV vector-mediated expression of marker genes in anterior segments of human eyes. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **43**,3686-3690.
129. **Marhlens F., Bareil C., Griffion J.M., Zrenner E., Amalric P., Eliaou C., Liu S.Y., Harris E., Redmond T.M., Arnaud B., Claustres M. and Hamel C.P.** (1997) Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat.Genet* **17**,139-141.
130. **McCall M.A., Gregg R.G., Merriman K., Goto Y., Peachey N.S. and Stanford L.R.** (1996) Morphological and physiological consequences of the selective elimination of rod photoreceptors in transgenic mice. *Exp.Eye.Res* **63**, (1),35-50.
131. **McCormack M.P., Foster A., Drynan L., Pannell R. and Rabbitts T.H.** (2003) The LMO2 T-cell oncogene is activated via chromosomal translocations or retroviral insertion during gene therapy but has no mandatory role in normal T-cell development. *Mol.Cell.Biol* **23**, (24),9003-9013.
132. **McGee Sanftner, Rendahl K.G., Quiroz D., Coyne M., Ladner M., Manning W.C. and Flannery J.G.** (2001a) Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol.Ther* **3**, (5),688-696.
133. **McGee Sanftner L.H., Abel H., Hauswirth W.W. and Flannery J.G.** (2001) Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol.Ther* **4**, (6),622-628.
134. **McKinnon S.J. Lehman D.M. Kerrigan-Baumrind L.A. Merges C.A., Pease M.E., Kerrigan D.F. Ransom N.L. Tahzib N.G. Reitsamer H.A. Levkovitch-verbin H. Quigley H.A. and Zack D.J.** (2002) Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **43**,1077-1087.

135. **Mitani K. and Kubo S.** (2002) Adenovirus as an intergrating vector. *Curr. Gene. Ther* **2**,135-144.
136. **Mohan R.R., Schultz G.S., Hong J.W., Mohan R.R. and Wilson S.E.** (2003) Gene transfer into rabbit keratocytes using AAV and lipid-mediated plasmid DNA vectors with a lamellar flap for stromal access. *Exp. Eye. Res* **76**,373-383.
137. **Mosinger Ogilvie J., Deckwerth T.L., Knudson C.M. and Korsmeyer S.J.** (1998) Suppression of developmental retinal cell death but not of photoreceptor degeneration in Bax-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* **39**,(9),1713-20. Erratum in: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* **39**,(12),2244.
138. **Mori K., Gehlbach P., Yamamoto S., dub E., Zack D.J., Li Q., Berns K.I., Raisler B.J., Hauswirth W.W. and Campochiaro P.A.** (2003) AAV-Mediated gene transfer of Pigment Epithelium-Derived Factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci* **43**,(6),1994-2000.
139. **Mori K., Ando A., Gehlbach P., Nesbitt D., Takahashi K., Goldstein D. Penn M., Chen C.T., Mori K., Melia M., Phipps S., Moffat D., Brazzell K., Liao G., Dixon K.H. and Campochiaro P.A.** (2001) Inhibition of choroidal neovascularisation by intravenous injection of adenoviral vectors expressing secreted endostatin. *Am. J. Pathol* **159**,313-320.
140. **Mullen R.J. and LaVail M.M.** (1976) inherited retinal dystrophy : primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science* **192**,799-801.
141. **Naash M.I., Hollyfield J.G., al-Ubaidi M.R. and Baehr W.** (1993) Simulation of human autosomal dominant retinitis pigmentosa in transgenic mice expressing a mutated murine opsin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* **15**,90(12),5499-503.
142. **Nandrot E., Dufour E.M., Provost A.C., Pequignot M.O., Bonnel S., Gogat K., Marchant D., Rouillac C., Sepulchre de conde B., Bihoreau M.T., Shaver C., Dufier J.L., Marsac C., Lathrop M., Menasche M. and Abitbol M.M.** (2000) Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in the RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiol. Dis* **7**,586-599.
143. **Narfström K., Katz M.L., Bragadottir R., Seeliger M., Boulanger A., Redmond T.M., Caro L., Lai C.M. and Rakoczy P.E.** (2003) Functional and structural recovery of retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci* **44**,(4),1663-1672.
144. **Narfstrom K., Wrigstad A. and Nilsson S.E.** (1989) The Briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness. *Br. J. Ophthalmol* **73**,(9),750-6.
145. **Ohlemiller K.K., Hughes R.M., Lett J.M., Ogilvie J.M., Speck J.D., Wright J.S. and Faddis B.T.** (1997) Progression of cochlear and retinal degeneration in tubby (rd5) mouse. *Audiol Neurootol* **2**,175-185.
146. **Ohlemiller K.K., Hughes R.M., Mosinger-Ogilvie J., Speck J.D., Groszof D.H. and Silverman M.S.** (1995) Cochlear and retinal degeneration in the tubby mouse. *Neuroreport* **6**,845-849.
147. **Olsson J.E., Gordon J.W., Pawlyk B.S., Roof D., Hayes A., Molday R.S., Mukai S., Cowley G.S., Berson E.L. and Dryja T.P.** (1992) Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neuron* **9**,(5),815-30.
148. **Otteson D.C., Sheldon E., Jones J.M., Kameoka J. and Hitchcock P.F.** (1998) Pax2 expression and retinal morphogenesis in the normal and Krd mouse. *Dev. Biol* **193**,209-224.
149. **Paloma P.R., Mercedes S. and Maria P.** (1996) Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3 and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci* **37**,489-500.
150. **Pang J., Chang B., Heckenlively J., Hawes N.L., Nusinowitz S., Noorwez S.M., McDowell J.H., Timmers A.M. and Hauswirth W.W.** (2004) Gene therapy restores vision in a natural model of RPE65 Leber congenital amaurosis : the rd12 mouse. Abstract ARVO#3486.

151. **Pardue M.T., McCall M.A., LaVail M.M., Gregg R.G. and Peachey N.S.** (1998) A Naturally occurring mouse model of X-linked congenital stationary night blindness. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **39**,2443-2449.
152. **Passini M.A., Watson D.J., Vite C.H., Landsburg D.J., Feigenbaum A.L. and Wolfe J.H.** (2003) Intravitreal brain injection of adeno-associated virus type 1 (AAV1) in neonatal mice results in complementary patterns of neuronal transduction to AAV2 and total long-term correction of storage lesions in the brains of beta-glucuronidase-deficient mice. *J.Virol.* **77**(12), 7034-7040.
153. **Pease M.E., Mc Kinnon S.J., Quigley H.A., Kerrigan-Baumrind L.A. and Zack D.J.** (2000) Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest.Ophthalmol.vis.Sci* **41**,764-774.
154. **Perkins T.W., Faha B., Kiland J.A., Poulsen G.L., Antelman D., Atencio I., Shinoda J., Sinha D., Brumback L., Maneval D., Kaufman P.L and Nickells R.W.** (2002) Adenovirus-mediated gene therapy using a human p21WAF-1/Cip-1 to prevent wound healing in a rabbit model of glaucoma filtration surgery. *Arch.Ophthalmol.* **120**,941-949.
155. **Perkins T.W., Gangnon R., Ladd W.,Kaufman P.L. and Heatley G.A.** (1998) Trabeculectomy with mitomycin C :intermediate-term results. *J. Glaucoma* **7**,230-236.
156. **Petersen-Jones S.M., Entz D.D., Sargan D.R.** (1999) cGMP phosphodiesterase-alpha mutation causes progressive retinal atrophy in the Cardigan Welsh corgi dog. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci* **40**, (8),1637-44.
157. **Petters R.M., Alexander C.A., Wells K.D., Collins E.B., Sommer J.R., Blanton M.R., Rojas G., Hao Y., Flowers W.L., Banin E., Cideciyan A.V., Jacobson S.G. and Wong F.** (1997) Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat.Biotechnol* **15**, (10),965-70.
158. **Pierce E.A.** (2001) Pathways to photoreceptor cell death in inherited retinal degenerations. *Bioessays* **23**,605-618.
159. **Portera-Cailliau C., Sung C.H., Nathans J. and Adler R.** (1994) Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc.Natl.Acad.Sci U S A.* **1**,91(3),974-8.
160. **Pradman K. Qasba and vasken Aposhian H.** (1971). DNA and gene therapy : transfer of mouse DNA to human and mouse embryonic cells by polyoma pseudovirions. *Proc.Nat.Acad.Sci* **68**, (10), 2345-2349.
161. **Quigley H.A.** (1996) Number of people with glaucoma worldwide. *Br.J.Ophthalmol* **80**,389-393.
162. **Rahmani B., Tielsch J.M., Katz J., Quigley H., Javitt J. and Sommer A.** (1996) The cause-specific prevalence of visual impairment in an urban population. The Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* **103**,1721-1726.
163. **Redmond T.M., Yu S., Lee E., Bok D., Hamasaki D., Chen N., Goletz P., Ma J.X., Crouch R.K. and Pfeifer K.** (1998) Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat.Genet* **20**, (4),344-51.
164. **Reichel M.B., Ali R.R., Thrasher A.J., Hunt D.M., Bhattacharya S.S. and Baker D.** (1998) Immune responses limit adenovirally mediated gene expression in adult mouse eye. *Gene.Ther* **5**,1038-1046.
165. **Reich S.J., Fosnot J., Kuroki A., Tang W., Yang X., Maguire A.M., Bennett J. and Tolentino M.J.** (2003) Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in mouse model. *Mol. Vis* **9**,210-216.
166. **Renard G., Dighiero P., Ellies P., Trong T.T.** La cornée. EMC. Éditions scientifiques et médicales, Elsevier SAS-page 54.
167. **Riviera V.M., Clackson T., Natesan S., Pollock R., Amara J.F., Keenan T., Magari S.R., Phillips T., Courage N.L., Cesaroli F.J., Holt D.A. and Gilman M.** (1996) A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat.Med* **2**,1028-1032.

168. **Roderick T.H., Chang B., Hawes N.L. and Heckenlively J.R.** (1997) A new dominant retinal degeneration (rd4) associated with chromosomal inversion in the mouse. *Genomics* **42**,393-396.
169. **Roof D.J., Adamian M. and Hayes A.** (1994) Rhodopsin accumulation at abnormal sites in retinas of mice with a human P23H rhodopsin transgene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* **35**,(12),4049-62.
170. **Rogers S., Lowenthal A., Terheggen H.G. and Columbo J.P.** (1973) Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. *J. Exp. Med* **137**,1091-1096.
171. **Saari J.C.** (2000) Biochemistry of Visual Pigment Regeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**,337-348.
172. **Salveti A. et Nony P.** (2000) Assemblage de vecteurs recombinants. La thérapie génique. Collection génie génétique. Éditions TEC 1 DOC-Paris. page156.
173. **Salveti A., Oreve S., Chadeuf G., Favre D., Champion-Arnaud P., David-Ameline J. and Moullier P.** (1998) Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Gene. Ther* **20**:9(5).695-706.
174. **Sanyal S., De Rutter A. and Hawskins R.K.** (1980) Development and degeneration of retina in rds mutant mice :light microscopy. *J. Comp. Neurol.* **194**.193-207.
175. **Sarra G.M., Stephens C., De Alwis M., Bainbridge J.W.B., Smith A.J., Thrasher A.J. Ali R.R.** (2001) Gene replacement therapy in the retinal degeneration slow (rds) mouse : the effect on retinal degeneration following partial transduction of the retina. *Hum. Mol. Ther.* **10**.(21),2353-2361.
176. **Schlichtenbrede F.C., Smith A.J., Bainbridge J.W.B., Thrasher A.J., Salt T.E. and Ali R.R.** (2004) Improvement of neuronal visual responses in the superior colliculus in *Prph2*<sup>Rd2/Rd2</sup> mice following gene therapy. *Mol. Cell. Neurosci* **25**,103-110.
177. **Schiedner G., Morral N., Parks R.J., Wu Y., Koopmans S.C., Langston C., Graham F.L, Beaudet A.L. and Kochanek S.** (1998) Genomic DNA transfer with a high capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet* **18**,180-183.
178. **Semple-Rowland S.L., Lee N.R., Van Hooser J.P., Palczewski K., Baehr W.** (1998) A null mutation in the photoreceptor guanylate cyclase gene causes the retinal degeneration chicken phenotype. *Pro. Natl. Acad. Sci U S A* **3**,95(3),1271-6.
179. **Shima D.T., Gougos A., Miller J.W., Tolentino M., Robinson G., Adamis A.P. and D'Amore P.A.** (1996) cloning and mRNA expression of vascular endothelial growth factor in ischemic retinas of Macaca fascicularis. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci* **37**,1334-1340.
180. **Shimazaki J., Shinozaki N. Shimmura S., Holland E.J. and Tsubota K.** (2004) Efficacy and safety of international donor sharing : a single-center, case-controlled study on corneal transplantation. *Transplantation* **78**.(2),216-220.
181. **Shweiki D., Itin A., Soffer D. and Keshet E.** (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**,843-845.
182. **Sidjanin D.J., Lowe J.K., McElwee J.L., Milne B.S., Phippen T.M., Sargan D.R., Aguirre G.D., Acland G.M. and Ostrander E.A.** (2002) Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3. *Hum. Mol. Genet* **1**;11(16),1823-33.
183. **Sleeper M.M., Fornasari B., Ellinwood N.M., Weil M.A., Melniczek J., O'Malley T.M., Sammarco C.D., Xu L., Ponder K.P. and Haskins M.E.** (2004) Gene therapy ameliorates cardiovascular disease in dogs with mucopolysaccharidosis VII. *Circulation* **110**.(7),815-820.
184. **Sommer A.** (1996) Glaucoma : facts and figures. *Eye* **10**,295-301.
185. **Smith A.J., Schlichtenbrede F.C., Tschernutter M., Bainbridge J.W., Thrasher A.J. and Ali R.R.** (2003) AAV-mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. **8**.(2).188-195.

186. **Smith S.B.** (1992) C57BL/6J-vit/vit mouse model of retinal degeneration : light microscopic analysis and evaluation of rhodopsin levels.*Exp.Eye.Res* **55**,903-910.
187. **Stamper R.L., McMenemy M.G. and Lieberman M.F.** (1992) Hypotonus maculopathy after trabeculectomy with subconjunctival 5-fluorouracil. *Am.J.Ophthalmol* **114**,544-553.
189. **Steinkuller P.G., Du L., Gilbert C., Foster A., Collins M.L. and Coats D.K.** (1999) Childhood blindness.*J.AAPOS* **3**,26-32.
190. **Suber M.L., Pittler S.J., Qin N., Wright G.C., Holcombe V., Lee R.H., Craft C.M., Lolley R.N., Baehr W. and Hurwitz R.L.** (1993) Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene. *Proc.Nat. Acad.Sci U S A* **1**,90(9),3968-72.
191. **Sung C.H., Makino C., Baylor D. and Nathans J.** (1994) A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment.*J.Neurosci* **14**, (10),5818-33.
192. **Tanelian D.L. Barry M.A. Johnston S.A. Le T. and Smith G.** (1997) Controlled gene gun delivery and expression of DNA within the cornea.*Biotechniques* **23**,484-488.
193. **Takahashi T., Nakamura T., Hayashi A., Kamei M., Nakabayashi M., Okada A., Tomita N., Kaneda Y. and Tano.Y.** (2000) Inhibition of experimental choroidal neovascularization by overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in retinal pigment epithelium cells. *Am.J.Ophthalmol* **130**, (6),774-781.
194. **Tobiasch E., Burguete T., Klein B.P., Heilbroonn R., and Schlehofer J.R.** (1998) Discrimination between different types of human adeno-associated viruses in clinical samples by PCR. *J.Virol.Methods* **71**,17-25.
195. **Tolentino M.J., Alexander J., Brucker J., Fosnot J., Ying G.I. and Reich S.** (2004) Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization.*Retina* **24**, (1),132-138.
196. **Travis G.H., Brennan M.B., Danieslon P.E., Kozak C.A. and Sutcliffe J.G.** (1989) Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (rds).*Nature* **338**,70-73.
197. **Tsang S.H., Gouras P., Yamashita C.K., Kjeldbye H., Fisher J., Farber D.B. and Goff S.P.** (1996) Retinal degeneration in mice lacking the gamma subunit of the rod cGMP phosphodiesterase.*Science* **17**,272(5264),1026-9.
198. **Tso M.O., Li W.W., Zhang C., Lam T.T., Hao Y., Petters R.M. and Wong F.** (1997) A pathologic study of degeneration of the rod and cone populations of the rhodopsin Pro347Leu transgenic pigs. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc* **95**,467-79; discussion 479-83.
199. **Tsubota K., Inoue H., Ando K., Ono M., Yoshino K. and Saito I.** (1998) Adenovirus-mediated gene transfer to the ocular surface epithelium.*Exp.Eye.Res* **67**,531-538.
200. **Ulshafer R.J. and Allen C.B.** (1985) Hereditary retinal degeneration in the Rhode Island Red chicken: ultrastructural analysis. *Exp Eye Res* **40**, (6),865-77.
201. **Veske A., Nilsson S.E., Narfstrom K., Gal A.** (1999) Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65.*Genomics* **1**,57(1),57-61.
202. **Voaden M.J., Curtis R., Barnett K.C., Leon A., Doshi M. and Hussain A.A.** (1987) Dominant rod-cone dysplasia in the abyssinian cat.*Prog.Clin.Biol.Res* **247**,369-380.

203. **Vollrath D., Feng W., Duncan J.L. Yasumura D., D’Cruz P.M., Chappelow A., Matthes M.T., Kay M.A. and LaVail M.M.** (2001) Correction of retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *PNAS* **98**,(22),12584-12589.
204. **Wang W., Acland G.M., Ray K. and Aguirre G.D.** (1999) Evaluation of cGMP-phosphodiesterase (PDE) subunits for causal association with rod-cone dysplasia 2 (rcd2), a canine model of abnormal retinal cGMP metabolism. *Exp. Eye. Res* **69**,(4),445-53.
205. **Walkin K., Adler R., Zack D. and Campochiaro P.** (2001) Neurotrophic signaling in normal and degenerating rodent retinas. *Exp. Eye. Res* **73**,693-701.
206. **Walkin K., Campochiaro P., Zack D. and Adler R.** (2000) Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and others cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci* **41**,927-936.
207. **Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M. Thompson C.B. and Bluestone J.A.** (1994) CTLA4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**,(5),405-413.
208. **Weber M., Rabinowitz J., Provost N., Conrath H., Folliot S., Briot D., Cherel Y., Chenuaud P., Samulski J., Moullier P. and Rolling F.** (2003) Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol. Ther* **7**,(6),774-781.
209. **Weng J., Mata N.L., Azarian S.M., Tzekov R.T., Birch D.G. and Travis G.H.** (1999) Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* **9**,98(1),13-23.
210. **Wrigstad A., Narfstrom K. and Nilsson S.E.** (1994) Slowly progressive changes of the retina and retinal pigment epithelium in Briard dogs with hereditary retinal dystrophy. A morphological study. *Doc. Ophthalmol* **87**,(4),337-54.
211. **Xu L., Mango R.L., Sands M.S., Haskins M.E., Ellinwood N.M. and Ponder K.P.** (2004) Evaluation of pathological manifestations of disease in mucopolysaccharidosis VII mice after neonatal hepatic gene therapy. *Mol. Ther* **6**,(6),745-758.
212. **Yang R.B., Robinson S.W., Xiong W.H., Yau K.W., Birch D.G. and Garbers D.L.** (1999) Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behavior. *J. Neurosci* **19**,5889-5897.
213. **Yen L., Svendsen J., Lee J.S., Gray J.T., Magnier M., Baba T., D’Amato R.J. and Mulligan R.C.** (2004) Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* **431**,471-475.
214. **Zangerl B., Zhang Q., Pearce-Kelling S.E. and Aguirre G.D.** (2002) Molecular cloning, characterization and mapping of the canine glucocorticoid receptor DNA binding factor 1 (GRLF1). *Gene* **10**,294(1-2),167-76.
215. **Zhang Q., Baldwin V.J., Acland G.M., Parshall C.J., Haskel J., Aguirre G.D. and Ray K.** (1999) Photoreceptor dysplasia (pd) in miniature schnauzer dogs: evaluation of candidate genes by molecular genetic analysis. *J. Hered* **90**,(1),57-61.
216. **Zofragos L.** Tumeurs intraoculaires. Rapport SFO 2002. Masson Paris. 463-616.
217. **Zolotukhin S., Byrne B.J., Mason E., Zolotukhin I., Potter M., Chesnut K., Summerford C., Samulski R.J. and Muzyczka N.** (1999) Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene. Ther* **6**,973-985.
218. **Zolotukhin S., Potter M., Hauswirth W.W., Guy J. and Muzyczka N.** (1996) A « humanized » green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J. Virol* **70**,(7),4646-4654.

NOM : **Le Meur**

PRENOM : **Guyène**

**Titre de Thèse** : OPHTALMOLOGIE ET THÉRAPIE GÉNIQUE

---

## RÉSUMÉ

L'ophtalmologie est une des spécialités où la thérapie génique est testée. Cette thérapie est encore du domaine de la recherche. Le transfert de gènes ou thérapie génique est l'introduction d'un gène thérapeutique dans une cellule-cible. Ce transfert se réalise grâce à un vecteur, soit non viral, soit dérivé d'un virus. Actuellement les domaines de l'ophtalmologie où la thérapie génique est expérimentée sont nombreux. En effet, ces essais s'intéressent aux pathologies cancéreuses comme aux pathologies cornéennes mais également aux pathologies du nerf optique et à la pathologie glaucomateuse. Au niveau rétinien, ce sont les rétinopathies pigmentaires et la dégénérescence maculaire liée à l'âge qui sont ciblées. Ce travail expose les bases théoriques des différentes méthodes de transfert de gènes puis les différentes applications ophtalmologiques envisagées.

---

## MOTS-CLÉS

Œil-Transfert de gènes- Vecteurs viraux-Vecteurs non viraux-Thérapie génique