

UNIVERSITÉ DE NANTES

UFR MEDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Année 2014

N° 23

**Thérapie génique *in vivo* des hépatopathies
héréditaires cirrhogènes par des lentivirus
recombinants à immunogénicité atténuée et
dans une approche chirurgicale : application à
la maladie de Wilson**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, santé

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Présentée

et soutenue publiquement par

Françoise Schmitt

Le 18 décembre 2014, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs: Pr Philippe Labrune
Dr Anne Dubart-Kupperschmitt
Examineurs: Pr Sophie Branchereau
Pr Paul Calès
Pr Jean-Charles Duclos-Vallée
Co-encadrant de thèse: Dr Tuan Huy Nguyen

Directeur de thèse : Professeur Guillaume Podevin

REMERCIEMENTS

Toute ma gratitude et tous mes remerciements vont à:

Mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Guillaume Podevin qui, après ma thèse d'exercice, a accepté pour la seconde fois de me diriger au cours de ces quatre années de travail scientifique. Merci pour cette confiance et cette liberté accordées dans toutes mes actions. J'espère que nous aurons l'occasion de réaliser encore ensemble de nombreux travaux médicaux et scientifiques au cours des années à venir!

Monsieur le Docteur Nicolas Ferry, qui m'a accueillie royalement dans son équipe INSERM et m'a fait bénéficier sans compter de ses connaissances en génétique, biologie moléculaire et vectorologie. Dommage que tu sois parti trop tôt, nos discussions fréquentes, plutôt animées mais dont je retirais beaucoup, m'ont énormément manqué!

Monsieur le Docteur Ignacio Anegon, pour avoir sympathiquement recueilli la transfuge que j'ai été dans l'univers de l'immunologie et de la transplantation rénale.

Monsieur le Docteur Tuan Huy Nguyen, pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse. J'ai beaucoup appris à ton contact sur certains us et coutumes des "scientifiques". Grâce à toi, je suis aujourd'hui autonome dans de nombreux domaines, comme la rédaction des appels d'offre, la gestion des financements ou le management d'un projet de recherche.

Monsieur le professeur Paul Cales, qui depuis le départ m'a soutenue dans mon projet de recherche, en mettant en particulier à ma disposition les ressources et l'expertise de son équipe dans le diagnostic de la fibrose hépatique, et qui me permet aujourd'hui de développer de nouvelles thématiques au sein de son laboratoire angevin.

Monsieur le Professeur Jean-Charles Duclos-Vallée, qui s'est toujours montré intéressé par ce projet de recherche et l'a activement soutenu au cours des comités de thèse dont il avait accepté d'être membre actif.

Madame le Professeur Sophie Branchereau, qui a accepté avec enthousiasme la mission de membre du jury de thèse.

Madame le Docteur Anne Dubart-Kupperschmitt, qui suit depuis des années les recherches du laboratoire dans le domaine de la thérapie génique du foie et m'a activement soutenue lors de la mise en place de ce projet. Merci d'avoir accepté d'en être le rapporteur.

Monsieur le Professeur Philippe Labrune, qui collabore depuis de nombreuses années avec notre équipe sur la thématique de la thérapie génique de la maladie de CriglerNajjar de type 1 et a accepté sans réserves de devenir l'un de mes rapporteurs.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail :

Aux personnes de l'Université d'Angers et du laboratoire HIFIH d'Angers qui m'ont gracieusement fait don de leur temps et de leur expertise dans le domaine de la fibrose hépatique:

Madame le Professeur Marie-Christine Rousselet-Chapeau qui a effectué la lecture histologique des biopsies hépatiques que je lui ai régulièrement fournies en quantité, et ce malgré un emploi du temps surchargé. Merci pour votre accueil toujours chaleureux et toutes vos explications très claires sur la fibrose hépatique.

Messieurs Lionel Fizanne, Julien Chaigneau et Jean-Luc Grandpierre, pour leur accueil toujours très sympathique, leurs coups de main au quotidien dans le travail à l'animalerie et sur l'analyse numérisée des lames en picosirius... ainsi que leur fastidieuse préparation! Je suis ravie de pouvoir continuer à collaborer avec vous tous!

A mon collègue et ami Sébastien Boni, vectorologiste de choc. Merci d'avoir été toujours présent pour moi avec ton enthousiasme et ta rigueur, tes coups de gueule et ton envie de mettre toujours tes compétences au service des malades, tes bons conseils et tes blagues à deux balles... Je garde un excellent souvenir de notre cohabitation dans le bureau du fond, malgré le hard rock et la déco spacemarinienne...J'espère que nous ferons encore longtemps du bon boulot ensemble, officiellement comme en sous-marin!

A Jérôme Roux et Pierre Legras, animaliers d'exception du SCAHU, grâce à qui les rats LEC ont crû et se sont multiplié (autant que faire se peut)! Merci pour votre disponibilité toujours acquise et vos bons conseils passés et à venir!

Au Docteur Souleiman El Balkhi, "découvreur" du REC et qui a d'emblée et sans restriction partagé mon enthousiasme dans la mise au point du diagnostic non invasif de la maladie de Wilson chez le rat LEC. Merci pour tout ce travail effectué dans les dosages du cuivre, et bonne chance dans ta nouvelle installation!

Au Docteur Jean-Marc Trocello et à l'équipe du Centre de référence de la maladie de Wilson de l'hôpital Lariboisière, pour m'avoir encouragée dans mon travail et apporté toute l'expertise médicale dont j'ai pu avoir besoin sur la maladie de Wilson.

Au Docteur Karin Thevissen et à son équipe de la Katholieke Universiteit Leuven, avec qui j'ai pu développer plusieurs projets de recherche annexes. Merci pour la confiance accordée; espérons que nous pourrons maintenir ces fructueuses collaborations encore longtemps.

A mes collègues de laboratoire, à mes co-thésard(e)s, à mes étudiants de Master 1, Master 2 et licence professionnelle :

A Cécilia, autre "double-doc", qui a commencé en même temps mais fini bien avant moi ce marathon scientifique... Merci pour tous ces bons moments partagés dans l'adversité, surtout avant 8h et après 19h... Bonne chance pour ta nouvelle vie (et n'oublie pas de rentrer parfois chez toi!)

A Jessica, dite "Bibi 3", garde ton enthousiasme, tes coups de gueule et ta franchise: ça fait du bien d'entendre dire tout haut ce que l'on pense souvent tout bas!

A Boris, Vanessa, Laure-Hélène, Virginie, Alison et Jean-Paul, autres thésard et travailleurs de l'ex-U948; merci pour votre aide au quotidien et tous ces moments de détente et de travail partagés... Vous allez me manquer!

A Liliane, secrétaire de choc toujours souriante et disponible pour me guider dans le labyrinthe des procédures de commandes et de paiements de matériel, et aussi pour partager les derniers potins du coin!

A Flora, Séverine 1, 2 et 3, Claire, Anne, Angélique, Véronique, Laurent, Reynald, Frédéric, et à tous ceux croisés au détour d'une manip de clonage ou d'un coin de cryostat, merci pour ces moments partagés et ces petits coups de pouce gratuits, mais qui font souvent la différence...

A Dorothee et François, mes Master 2 de chic et de choc, merci pour tout ce bon boulot qui m'a permis de voir la recherche avancer pendant que je m'occupais de hernies et autres appendicites... Bon retour parmi nous au pays des Bisounours!

A Morwenn et Corentin, Master 1 - médecins mais enthousiastes malgré tout face à la recherche expérimentale. Bonne continuation, quelle que soit votre voie future!

A Emilie, Aurore, Emilie et Tiphanie, dont l'aide au cours des stages de licence-pro m'a été précieuse...

A tous ceux que j'ai oubliés ici mais qui se reconnaîtront quand même...

A mes collègues du service de chirurgie viscérale pédiatrique du CHU d'Angers, passés et présents :

Marc, Emilie, Khadidja, Pauline et Christian, merci pour votre présence et votre patience envers moi et mes absences pour cause de "petits rats". Merci de m'écouter patiemment vous parler de tout ceci à longueur de temps et de me donner le temps de m'échapper autant qu'il faut pour faire avancer la science!

A mes amis et ma famille :

A mes amis, qui me comprennent et me pardonnent mes nombreuses absences pour cause professionnelle... Merci de bien vouloir continuer malgré tout à me fréquenter!

A mon grand-père, qui trouve que ses gènes le gênent...

A mes parents, qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans la voie que j'ai choisie, même s'ils savaient qu'elle n'était pas, et de loin, la plus facile;

A mes deux oncles, Denis l'autre "chercheur" de la famille, et Clément, né trop tôt pour pouvoir un jour bénéficier des avancées de la thérapie génique;

A ma petite sœur, merci pour tous ces dimanches angevins passés ensemble depuis 4 ans!

A Armand et Timothée, les deux hommes de ma vie, qui savent faire contre mauvaise fortune bon coeur quand "Maman" a besoin de travailler le week-end! A "Mini-nous 2", dont l'aventure a commencé pendant la réaction de ce mémoire mais pour qui tout reste encore à écrire...

SOMMAIRE

Remerciements	2
Sommaire	6
Liste des abréviations	8
Table des illustrations.....	10
Table des tableaux.....	12
Introduction	14
I.1 - La thérapie génique.....	14
I.1.1 - Définition et état des lieux en 2014	14
I.1.2 - Modalités de transfert de gène.....	15
I.1.3 - Thérapie génique des maladies héréditaires du foie	22
I.2 - la maladie de Wilson.....	30
I.2.1 - La maladie de Wilson humaine	30
I.2.2 - Modèles animaux de la maladie de Wilson	40
I.2.3 - Etat des lieux de la thérapie génique de la maladie de Wilson dans les modèles animaux.....	43
I.3 - Objectifs de ce travail de thèse	45
Résultats:.....	46
II.1 - Mise au point des outils nécessaires à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la thérapie génique dans la maladie de Wilson	46
II.1.1 - Evaluation de la fibrose chez le rat LEC et score de fibrose	46
II.1.2 - Evaluation du cuivre échangeable relatif et de l'activité oxydase de la céruléoplasmine comme tests diagnostics de la Maladie de Wilson.....	50
II.1.3 - Evaluation des marqueurs biologiques d'hépatite aiguë chez le rat Long-Evans Cinnamon.....	55
II.2 - Thérapie génique <i>in vivo</i>	62
II.2.1 - Etablissement d'une courbe dose-réponse par injection systémique de vecteur lentiviral	62
II.2.2 - Améliorations de la technique chirurgicale d'injection du vecteur lentiviral en hyperpression dans un foie isolé	66
II.3 - Thérapie génique <i>in vivo</i> chez le rat Long-Evans Cinnamon	85
II.3.1 - Administration d'un vecteur lentiviral codant pour le peptide OSIP108.....	85
II.3.2 - Administration d'un vecteur lentiviral codant pour le cDNA du gène ATP7B.....	87
Discussion	94
III.1 - Marqueurs biologiques de suivi chez le rat Long-Evans Cinnamon	94
III.2 - La technique d'injection en foie isolé en hyperpression, essais et erreurs.....	96
III.3 - Thérapie génique <i>in vivo</i> de la maladie de Wilson	98
Conclusion.....	103
Matériel et méthodes.....	105
IV.1 - Biologie moléculaire, clonage et vectorologie.....	105
IV.1.1 - Design des séquences, primers, obtention des séquences - pFS1 et pFS2.....	105

IV.1.2 - Production, purification et titration des vecteurs lentiviraux	108
IV.2 - Expérimentation animale.....	110
IV.2.1 - Le rat Long-Evans Cinnamon, provenance et élevage	110
IV.2.2 - Techniques d'injection du vecteur.....	111
IV.2.3 - Autres gestes de routine	114
IV.3 - Expérimentations <i>in vitro</i>	116
IV.3.1 - cultures cellulaires	116
IV.3.2 - Test de survie cellulaire	117
IV.3.3 - Infection de cellules Huh7 par du lentivirus dans un milieu avec Ficoll® 70 PM ...	118
IV.3.4 - Test de neutralisation <i>in vitro</i> du vecteur lentiviral par des anticorps anti-VSVg..	119
IV.4 - Analyses sériques.....	119
IV.4.1 - Dosages sanguins usuels.....	119
IV.4.2 - Activité oxydase de la céruléoplasmine.....	119
IV.4.3 - Dosages sériques du cuivre	120
IV.4.4 - Recherche d'anticorps sériques par ELISA anti-VSVg et anti-GFP	120
IV.5 - Analyses tissulaires	121
IV.5.1 - Préparation des biopsies	121
IV.5.2 - Histologie standard.....	121
IV.5.3 - Immuno-histochimie GFP.....	122
IV.5.4 - Immunofluorescence indirecte anti-ATP7B	122
IV.5.5 - Analyse de la fibrose hépatique	123
IV.5.6 - Détection de la protéine ATP7B dans les cellules et le foie en ELISA	124
IV.5.7 - Recherche d'ADN vectoriel dans les tissus animaux.....	125
IV.5.8 - Dosage du cuivre dans les tissus	126
IV.6 - Analyse statistique.....	126
Annexes.....	127
Références bibliographiques.....	165
RESUMÉS et MOTS CLÉ	175

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV: adeno-associated virus
ADN: acide désoxyribonucléique
ALAT: alanine amino-transférase
ALF: acute liver failure
ARFI: Acoustic Radiation Force Impulse
ARN: acide ribonucléique
ARNm: acide ribonucléique messenger
ASAT: aspartate amino-transférase
ATP7B: gène humain codant pour la protéine homonyme
AUC: area under the curve (aire sous la courbe)

BDL: Bile Duct Ligation
BSA: bovine serum albumine
B-UGT1A1: UDP-glucuronosyltransférase de type 1

CAG: CMV enhancer chicken beta-actin promoter
CCl₄: tétrachlorure de calcium
CDTA: Service de contrôle sanitaire (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal)
CHU: Centre Hospitalo-Universitaire
CN1: maladie de Crigler-Najjar de type 1
COA: activité oxydase de la céruléoplasmine
cPPT/CTS: central polypurine tract/ central terminaison sequence
CSE: cellule souche embryonnaire
Cu: cuivre
Cu Exc: cuivre échangeable
CuT: cuivre sérique total
cv/gr: copies de vecteur par génome haploïde

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA: desoxyribonucleic acid
DO: densité optique
DOI: 2,5-diméthoxy-4- iodoamphetamine

EDTA: EthyleneDiamineTetraaceticAcid
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting, cytométrie de flux
FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations

GFP: green fluorescent protein
GR: globule rouge
GSH: glutathion

HA: hépatite aiguë
Hd-AD: helper-dependant adenoviral vector
HDL: high Density lipoprotein
HF: high fidelity

IAR: Institute for Animal Reproduction
ICP-MS: Inductively-Coupled Plasma - Mass Spectrometry
IDLV: integrative deficient lentiviral vector
IGF1: insulin growth factor 1
IHC: immuno-histochimie

INSERM: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
iPSC: induced pluripotent Stem Cells
ITR: inverted terminal repeat

LDL: Low Density Lipoprotein
LE: rat Long Evans
LEC: rat Long-Evans Cinnamon
LIL: Lentivirus in Isolated Liver
LTR: long terminal repeat

miR: micro ARN
MOI: Multiplicity of Infection
MT: métallothionéine
MTT: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
mTTR: promoteur hépato-spécifique de la transthyréine murine
MW: maladie de Wilson

NAC: N-acétylcystéine

ODD: *o*-dianisidine dihydrochloride
OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man
ORF: open reading frame
OSIP108: décapeptide végétal, issu d'*Arabidopsis thaliana*

PBS: phosphate buffered saline
PGK: phosphoglycérol kinase
pi: particules infectieuses

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

REC: cuivre échangeable relatif
RISC: RNA-induced silencing complex
ROC: receiving operating curve
RVN: rapport de vraisemblance négatif
RVP: rapport de vraisemblance positif

SCAHU: Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire d'Angers
SE: sensibilité
SIN: Self-INactivated
SOD: superoxyde dismutase
SP: spécificité
SVF: sérum de veau foetal
SV40: Simian Virus 40

TU/g: titre unitaire par gramme (= particule infectieuse)

UV: ultra-violets

VL: vecteur lentiviral
VCI: veine cave inférieure
VGD: veine gastro-duodénale
VP: veine porte
VQ: veine de la queue
VSVg: glycoprotéine g du Virus de la Stomatite Vésiculeuse
WPRE: Woodchuck Post-transcriptional Regulatory Element

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Indications des essais cliniques par thérapie génique et des classes de gènes transférés lors de ces essais.....	p.14
Figure 2: Schéma descriptif du mode d'action du miR142-3p endogène.....	p.25
Figure 3: Le métabolisme du cuivre dans l'organisme.....	p.32
Figure 4: Modèle topologique de la protéine ATP7B.....	p.32
Figure 5: Anomalies métaboliques impliquées dans la pathogénèse de la maladie de Wilson.....	p.33
Figure 6: Atteintes oculaires dans la Maladie de Wilson.....	p.36
Figure 7: Arbre décisionnel des examens complémentaires pour le diagnostic de la maladie de Wilson.....	p.38
Figure 8: Le rat Long-Evans Cinnamon, histoire clinique et corrélation avec les lésions histologiques du foie sous-jacentes.....	p.42
Figure 9: Photographies de lames histologiques de foie représentatives de l'évolution des lésions de fibrose chez le rat Long-Evans Cinnamon.	p.48
Figure 10: Evolution de la fibrose hépatique chez les rats LEC avec ou sans aliment déplété en cuivre (C1041).....	p.49
Figure 11: Analyse de la fibrose hépatique chez le rat LEC par imagerie numérisée et quantification semi-automatique.....	p.49
Figure 12: Courbes de survie et de survie sans hépatite aiguë (score ALF \geq 2) à 30 semaines de vie chez les rats LEC en alimentation normale ou déplétée en cuivre, et les rats Long-Evans (LE).....	p.52
Figure 13: Evolution du cuivre échangeable relatif (REC) et de l'activité oxydase de la céruloplasmine (COA) chez les rats LEC.....	p.53
Figure 14: Evolution des marqueurs sériques en fonction du grade de sévérité de l'hépatite aiguë.....	p.56
Figure 15: Chronogramme du protocole d'étude des traitements médicamenteux de la maladie de Wilson chez le rat LEC.....	p.57
Figure 16: Evolution clinique des différents groupes de rats sous traitements médicamenteux de la maladie de Wilson.....	p.60
Figure 17: Teneur en cuivre du foie, du rein et du cerveau des rats LEC au sacrifice, après traitement par trientine ou acétate de zinc, comparés au groupe contrôle.....	p.60
Figure 18: Médianes des aires de fibrose au sacrifice à 6 mois de vie des rats LEC traités par D-pénicillamine, trientine ou acétate de zinc, comparées au groupe contrôle et aux valeurs retrouvées chez des rats LEC du même âge.....	p.60
Figure 19: Evolution des valeurs médianes des marqueurs biologiques d'hépatite aiguë des différents groupes de rats sous traitements de la maladie de Wilson après arrêt de l'aliment Altromin® C1041.....	p.60
Figure 20: Evolution des valeurs médianes des marqueurs sériques diagnostics de maladie de Wilson chez les rats LEC, sans ou avec traitements médicamenteux, comparés à des rats Long-Evans normaux.....	p.61
Figure 21: Protocole expérimental de la réalisation d'une courbe dose-réponse après injection systémique d'un vecteur lentiviral (VL) codant pour la GFP chez le rat Long-Evans.....	p.62
Figure 22: Tolérance clinico-biologique à l'injection de doses croissantes de vecteur lentiviral codant pour la GFP par la veine de la queue.....	p.63

Figure 23: Recherche d'anticorps anti-GFP dans le sérum des rats à un mois post-injection par technique ELISA.....	p.64
Figure 24: Efficacité initiale de transduction hépatocytaire après injection systémique d'un vecteur lentiviral codant pour la GFP à doses croissantes à dix jours et deux mois de l'injection.....	p.66
Figure 25: Chronogramme de l'injection de vecteur lentiviral codant pour la GFP (VL-GFP) après immunisation préalable contre la protéine d'enveloppe VSVg.....	p.68
Figure 26: Vérification de l'immunisation des rats contre la protéine d'enveloppe VSVg après injection systémique d'une faible dose de vecteur lentiviral.....	p.69
Figure 27: Efficacité de transduction hépatocytaire à J7 en immuno-histochimie anti-GFP, chez les rats pré-immunisés contre la VSVg (I+) ou non (I-).....	p.69
Figure 28: Virémies à 5 minutes en analyse FACS. L'injection du vecteur était faite soit par la veine porte (PV), soit en hyperpression dans le foie sans lavage (LIL) ou avec lavages (LIL-W), chez des rats pré-immunisés (I+) ou non (I-) contre l'enveloppe VSVg du vecteur lentiviral.....	p.71
Figure 29: Présence de génome lentiviral dans les organes extra-hépatiques en qPCR au sacrifice.....	p.71
Figure 30: Efficacité de transduction et sur la prévention de la dissémination extra-hépatique du lavage hépatique lors de l'injection en LIL de vecteur lentiviral codant pour la GFP.....	p.74
Figure 31: Evaluation de l'efficacité de transduction hépatocytaire après augmentation de la viscosité du milieu d'injection par ajout de globules rouges autologues ou de Ficoll 70 PM, ou augmentation du nombre de fenestrations endothéliales par agoniste sérotoninergique (DOI).....	p.77
Figure 32: Efficacité de transduction <i>in vivo</i> de cellules Huh7 infectées pendant 20 minutes avec un vecteur lentiviral codant pour la GFP, sans ou en présence de 25% de Ficoll® 70 PM et d'une étape de spinoculation.....	p.76
Figure 33: Chronogramme de l'injection de vecteur lentiviral codant pour la GFP à des rats LEC présentant une fibrose hépatique.....	p.81
Figure 34: Analyse histologique de l'évolution des lésions d'hépatite chronique chez les rats LEC avec ou sans traitement anti-fibrotique.....	p.84
Figure 35: Evolution des marqueurs de cytolysé hépatique entre 6 et 18 semaines d'âge chez les rats LEC injectés avec le vecteur lentiviral codant pour le peptide OSIP108, comparé à des rats MEC contrôles.....	p.86
Figure 36 : Courbes de survie globale et de survie sans signes cliniques d'hépatite aiguë des rats LEC traités par injection de vecteur lentiviral codant pour le peptide OSIP108, et rats LEC contrôles.....	p.87
Figure 37: Recherche de l'efficacité de transduction hépatique après injection avec du vecteur lentiviral codant pour l'ATP7B.....	p.89
Figure 38: Courbes de survie et de survie sans hépatite aiguë clinique des différents groupes de rats LEC injectés avec du vecteur lentiviral codant pour l'ATP7B.....	p.91
Figure 39: Evolution des valeurs médianes des marqueurs sériques d'hépatite aiguë dans les différents groupes de rats Long-Evans Cinnamon traités par du vecteur lentiviral codant pour l'ATP7B.....	p.92
Figure 40: Carte de restriction de l'insert OSIP108 obtenu par synthèse d'oligonucléotides.....	p.105
Figure 41: Schéma du vecteur lentiviral codant pour la séquence hATP7B codon-optimized, sous contrôle du promoteur mTTR et comportant les 4 séquences-cible en tandem du miR142-3p.....	p.109
Figure 42: Schéma anatomique de l'injection de vecteur dans un foie isolé de la circulation sanguine et en hyperpression.....	p.114

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I: Maladies héréditaires du foie sans atteinte parenchymateuse associée.....	p.27
Tableau II: Maladies héréditaires du foie avec atteinte parenchymateuse associée.....	p.29
Tableau III: Manifestations cliniques retrouvées dans la maladie de Wilson.....	p.35
Tableau IV: Valeurs de référence des dosages biologiques utiles au diagnostic de maladie de Wilson.....	p.37
Tableau V: Traitements médicamenteux de la maladie de Wilson disponibles en France.....	p.39
Tableau VI: Comparaisons entre la maladie de Wilson humaine et le rat LEC.....	p.42
Tableau VII: Critères cliniques d'évaluation de la survenue d'une hépatite aiguë et de sa sévérité chez le rat LEC.....	p.52
Tableau VIII: Analyses par courbes ROC de marqueurs sériques de la maladie de Wilson.....	p.54
Tableau IX: Résultats des analyses par courbes ROC des marqueurs biologiques d'hépatite aiguë chez le rat Long-Evans Cinnamon.....	p.55
Tableau X: Descriptif des groupes de rats injectés avec un vecteur lentiviral codant pour la GFP en veine porte ou en LIL avec lavages hépatiques pré- ou post-infection.....	p.72
Tableau XI: Descriptif des groupes de rats LEC constitués et nombre de survivants aux différents points du suivi.....	p.82
Tableau XII: Récapitulatif des principaux résultats obtenus chez les rats Long-Evans Cinnamon traités avec le vecteur lentiviral codant pour l'ATP7B, comparés à leurs contrôles.....	p.93
Tableau XIII: Tableau récapitulatif des essais précliniques de thérapie génique et cellulaire chez le rat LEC.....	p.104

*ON DISAIT A DELON, MEDECIN MESMERISTE: «EH BIEN!
M. DE B... EST MORT, MALGRE LA PROMESSE QUE VOUS
AVIEZ FAITE DE LE GUERIR. - VOUS AVEZ, DIT-IL, ETE
ABSENT, VOUS N'AVEZ PAS SUIVI LES PROGRES DE LA
CURE: IL EST MORT GUERI.»*

MAXIMES ET PENSEES, CARACTERES ET ANECDOTES (1795), 1119
SEBASTIEN ROCH, DIT NICOLAS DE CHAMFORT

INTRODUCTION

I.1 - LA THERAPIE GENIQUE

I.1.1 - DEFINITION ET ETAT DES LIEUX EN 2014

La thérapie génique ou gènothérapie est une approche thérapeutique qui consiste à apporter dans des cellules ou un tissu malade un gène étranger, soit en remplacement d'un allèle muté défectueux, c'est la thérapie génique dans son sens strict, soit un "gène-médicament", et il s'agit alors d'une thérapie par les gènes. Si le concept a pu être évoqué dès la fin des années 1960 (Lederberg, 1966), il faudra attendre une vingtaine d'années pour que, avec l'amélioration progressive des connaissances scientifiques et des techniques, un premier essai clinique dans lequel des cellules immunitaires, préalablement modifiées par l'introduction d'un gène rapporteur grâce à un vecteur viral, soient injectées à des patients atteints de mélanome (Kasid, Morecki et al. 1990; Rosenberg, Aebersold et al. 1990). Depuis lors, plus de 1800 essais cliniques ont été ou sont en cours de réalisation dans monde (Ginn, Alexander et al. 2013), à raison d'une centaine d'essais ouverts chaque année. Environ 60% d'entre eux sont des essais de phase I, et presque les deux-tiers de ces essais concernent le traitement de cancers (Figure 1A), suivis de loin par les maladies héréditaires monogéniques (8,7%) et les pathologies cardiovasculaires (8,4%) ou infectieuses (8,0%). Ces résultats sont étroitement corrélés au type de gène transféré: 55,3% de ceux-ci codent pour des antigènes ou des cytokines, ou sont des gènes suppresseurs de tumeur ou des gènes suicides, alors que 8% sont des ADNc de gènes déficients et 7,5% codent pour des facteurs de croissance (Figure 1B).

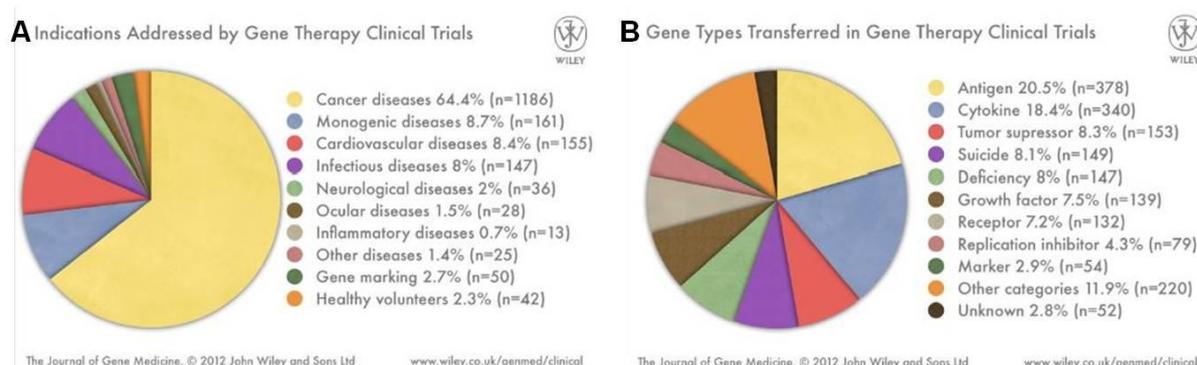


Figure 1: Indications des essais cliniques par thérapie génique et des classes de gènes transférés lors de ces essais. **1A:** Répartition des essais cliniques en fonction du type de pathologie visée. **1B:** Principales classes de gènes utilisées dans ces essais. D'après Ginn et al., *J Gene Med* 2013 (Ginn, Alexander et al. 2013).

La thérapie génique a d'abord été pensée pour le traitement des maladies héréditaires rares, avec pour but de restaurer de façon stable dans le temps la fonction déficiente due au gène muté. Pour cela, il s'agit de remplacer la fonction du gène muté directement dans les organes ou tissus où il intervient, comme dans la myopathie de Duchenne (OMIM#310200) (Foster, Popplewell et al., 2012) ou l'amaurose congénitale de Leber (OMIM#180069) (Acland, Aguirre et al. 2005; Hauswirth, Aleman et al. 2008). En cas d'anomalie fonctionnelle, il est possible de faire synthétiser la molécule déficiente soit dans son tissu originel, soit par un autre type cellulaire. Ainsi, dans le traitement de l'hémophilie B (OMIM#306900), il a été récemment possible de faire exprimer le facteur IX dans le foie, son lieu de synthèse habituel, après injection systémique d'un vecteur viral ((Nathwani, Tuddenham et al. 2011), mais également dans le muscle, après injections *in situ* (Herzog, Hagstrom et al. 1997).

1.1.2 - MODALITES DE TRANSFERT DE GENE

1.1.2.2 - Modification de l'information génétique

La technique la plus traditionnelle est la thérapie génique d'addition, qui consiste à apporter un acide nucléique, ADN ou ARN messager (ARNm), dans l'organisme. Ainsi, l'un des premiers succès de la thérapie génique a été la correction par addition de gène du Déficit Immun Combiné Sévère lié à l'X (SCID-X1, OMIM#300400) en 1999 (Fischer, Hacein-Bey-Abina et al. 2011). Elle est également largement développée dans des approches de traitement du cancer, par addition de gènes suppresseurs de tumeurs (Tazawa, Kagawa et al. 2013) ou de "gènes suicides" conduisant à l'apoptose des cellules transduites (Zarogoulidis, Darwiche et al. 2013).

Une deuxième stratégie possible consiste à modifier l'expression des gènes au moment de leur transcription, en modulant leur expression, par fixation d'oligonucléotides (Triplex Forming Oligonucleotides, TFO) ou protéines telles que les acétyl-transférases ou différents facteurs de transcription (Helene 1991; Abarrategui-Pontes 2014). Plus récemment, la découverte des micro-ARNs (miR) et de leurs corolaires, petits ARN interférants (siRNA, small interfering RNA) et petits ARN en épingle à cheveu (shRNA, small hairpin RNA), qui modulent l'expression post-transcriptionnelle des gènes, a ouvert la voie à de nouvelles cibles pour la thérapie génique des cancers (Li, Qian et al. 2013; Liu, Ge et al. 2014), ou pour

permettre le maintien à long terme de l'expression d'un transgène autre par répression de son expression au sein des cellules immunitaires (Brown, Venneri et al. 2006; Schmitt, Remy et al. 2010).

Enfin, l'élaboration au cours des dix dernières années de nucléases artificielles, Zinc Finger Nucleases (ZFN), Transcription Activator-Like Effectors Nucleases (TALEN), puis du système Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Associated Cas9 (CRISPR/Cas9), a permis des approches de thérapie génique ciblée par inactivation, réparation d'un gène *in situ* ou expression ciblée de celui-ci (Abarrategui-Pontes 2014).

I.1.2.1 - Approches *in vivo* ou *ex vivo*

Deux types d'approches coexistent pour délivrer l'information génétique dans un organisme.

La stratégie *ex vivo* consiste à greffer dans l'organisme des cellules normales issues d'un donneur, ou des cellules "normalisées", prélevées directement chez le patient, mises en culture, modifiées génétiquement puis transplantées au patient. Ce type de stratégie a été utilisé avec succès chez l'homme dans le traitement de maladies impliquant des cellules hématopoïétiques, comme le SCID-X1 ou le Déficit Immun Combiné Sévère lié à l'adénosine déaminase (ADA-SCID) (Aiuti, Cattaneo et al. 2009; Gaspar, Cooray et al. 2011; Cavazzana-Calvo, Fischer et al. 2012). Il est aussi possible d'appliquer cette stratégie dans d'autres organes comme le foie, où des essais chez l'animal ont montré la capacité des cellules transplantées à se greffer dans l'organe et à y restaurer une expression détectable du transgène (Goulinet-Mainot, Tranchart et al. 2012; Gupta 2014).

Deux types cellulaires semblent en particulier très prometteurs: les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC, induced Pluripotent Stem Cells). Les premières, dérivées de cellules embryonnaires cultivées et modifiées, ont la capacité de proliférer et de se différencier en un nombre plus ou moins large de types cellulaires. On distingue ainsi les CSE totipotentes, ayant tout potentiel de différenciation, les cellules pluripotentes, capables de générer n'importe quel type cellulaire sauf des annexes embryonnaires, les cellules multipotentes, spécifiques d'un lignage cellulaire et les cellules unipotentes, ciblées sur un type cellulaire unique. Ces cellules offrent de grands espoirs dans le traitement de nombreuses maladies liées à des destructions cellulaires, et en particulier des atteintes neurologiques comme la maladie de Parkinson (Sundberg and Isacson 2014) ou de Huntington (OMIM#143100) (Nicoleau, Viegas et al. 2011). Les iPSC ont été découvertes en

2006 par Shinya Yamanaka (Takahashi and Yamanaka 2006). Il s'agit de cellules matures reprogrammées et dédifférenciées génétiquement qui peuvent ensuite être différenciées dans le type cellulaire souhaité. S'il se pose des problèmes liés à leur potentielle différenciation en cellules oncogéniques, elles permettent de s'affranchir de tous les problèmes éthiques et judiciaires liés à l'utilisation de CSE et à la destruction associée d'embryons, et offrent de grandes perspectives d'utilisation en thérapie cellulaire régénérative et en thérapie génique, puisqu'elles permettent d'utiliser des fibroblastes d'un patient (Takahashi, Tanabe et al. 2007) pour les reprogrammer en un type cellulaire voulu après correction de l'anomalie génétique dont il souffre (Zhang, Chen et al. 2011), et de réaliser ensuite une greffe autologue chez le même patient.

A contrario, la thérapie génique *in vivo* consiste à aller porter directement l'information génétique dans un organe ou un tissu donné de l'organisme, sans insertion préalable dans des cellules en culture. Ceci peut être réalisé par une injection systémique du vecteur porteur de l'information génétique, ou par administration plus directe dans un organe comme le foie (Schmitt, Pastore et al. 2010), les reins (Heikkila, Parpala et al. 1996), les poumons par aérosols (Alton, Baker et al. 2013), l'oeil (Hauswirth, Aleman et al. 2008), le coeur (Jessup, Greenberg et al. 2011), le muscle (Foster, Popplewell et al. 2012) ou le système nerveux central (Assi, Candolfi et al. 2012). Chaque pathologie ciblée nécessite l'utilisation d'une technique appropriée d'injection du vecteur, mais quasiment toutes exposent à un risque de dissémination de celui-ci en dehors de l'organe-cible, et donc à la survenue d'effets secondaires.

I.1.2.3 - Choix du vecteur

Le vecteur est le véhicule chargé de délivrer l'information génétique dans une cellule ou un organisme. Son choix est un paramètre essentiel dans la mise en place d'une stratégie de thérapie génique et dépend de multiples facteurs. En effet, l'ADN nu peut permettre l'infection de cellules mais nécessite de très fortes doses et requiert donc souvent des artifices techniques, comme l'injection hydrodynamique dans le foie ou le muscle squelettique (Zhang, 2002; Herweijer and Wolff 2007). C'est pourquoi des vecteurs, dont il existe deux principales classes, vont être préférentiellement utilisés: les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux.

1.1.2.3.1 - Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non viraux sont des polymères synthétiques ou des lipides cationiques (liposomes) qui forment respectivement avec l'acide nucléique des polyplexes et lipoplexes (Pichon, Billiet et al. 2010). Ils ont la capacité d'interagir par effet électrostatique avec les phosphates anioniques de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et peuvent ainsi le compacter et le protéger d'une dégradation prématurée au cours de son transport jusqu'au noyau cellulaire. Ils ont une taille allant de 10 nm à 1 µm, sont faiblement toxiques et peuvent transporter de grandes quantités d'ADN, mais offrent spontanément une faible efficacité de transfection, des problèmes d'adressage spécifique et ne permettent pas une intégration du transgène dans le génome de la cellule transfectée et donc une expression durable du transgène.

1.1.2.3.2 - Les vecteurs viraux

Les virus constituent des vecteurs "naturels" de transfert de gène, dans la mesure où ils possèdent la capacité de transférer leur propre patrimoine génétique aux cellules qu'ils infectent pour pouvoir y survivre ou s'y répliquer. Les vecteurs viraux recombinants, dont plusieurs générations successives ont été conçues, doivent conserver du virus natif ses propriétés de tropisme cellulaire et sa capacité à faire persister son génome dans la cellule infectée ou transduite. Par contre, il est nécessaire d'en éliminer toute pathogénicité, et en particulier toute propriété de répllication (virus défectifs), d'en réduire l'immunogénicité lorsqu'elle existe, et de remplacer les gènes viraux par le transgène désiré (Bouard, Alazard-Dany et al. 2009).

Il existe deux grandes classes de vecteurs viraux, les vecteurs non intégratifs dont le génome viral reste sous forme épisomique dans le cytoplasme ou dans le noyau de la cellule, et les vecteurs intégratifs dont le génome viral s'intègre dans celui de la cellule-hôte. Les principales familles de vecteurs non intégratifs utilisées sont les adénovirus et les virus adéno-associés (AAV, adeno-associated virus).

Les adénovirus recombinants sont issus de virus de la famille des *Adenoviridae*, des virus à ADN double brin linéaire de 26-40 kb, possédant à leurs extrémités des régions répétées inversées (ITR, Inverted Terminal Repeat) qui en permettent la circularisation. Ce sont des particules de 60 à 90 nm, encapsidées et non enveloppées (Campos and Barry 2007),

et ils ont été parmi les premiers vecteurs viraux à être utilisés en thérapie génique. Ils permettent en effet d'obtenir une bonne efficacité de transduction dans un grand nombre de tissus mitotiques ou quiescents ainsi que l'expression de transgènes de taille importante (~8kb), et peuvent être produits avec de hauts titres dans des cellules 293T. Néanmoins, ces virus ne sont pas intégratifs, de sorte que l'expression de leur transgène se dilue au cours des divisions cellulaires, et leur efficacité demeure limitée par le développement d'une réaction immunitaire cytotoxique, dirigée à la fois contre les protéines adénovirales et contre le produit du transgène, qui résulte en l'élimination des cellules transduites (Tripathy, Black et al. 1996; Yang, Haecker et al. 1996; Volpers and Kochanek 2004). Des adénovirus recombinants « helper-dépendant » (HD-Ad) ou "gutless", dénués de toute séquence codant pour les protéines virales, ont donc été développés. Ils nécessitent l'utilisation de virus "helpers" pour être produits (Amalfitano 1999) mais ont une capacité d'emballage de 35 kb environ. Ils sont utilisés actuellement dans environ un quart des essais de thérapie génique (Ginn, Alexander et al. 2013), permettent d'obtenir une correction durable du phénotype (Brunetti-Pierri, Ng et al. 2013), mais il persiste une toxicité aiguë à fortes doses d'adénovirus qui rend la fenêtre thérapeutique d'utilisation de ces vecteurs très étroite (Raper, Chirmule et al. 2003).

Les AAV sont des virus à ADN simple brin de la famille des *Parvoviridae* et appartiennent au genre *Dependovirus*. Ils ne sont pas enveloppés mais dotés d'une simple capsid et mesurent 22 nm de diamètre. Leur forme sauvage nécessite la co-infection avec une autre espèce virale, adénovirus (Blacklow, Hoggan et al. 1967), herpèsvirus, papillomavirus ou virus de la vaccine (Alazard-Dany, Nicolas et al. 2009) pour pouvoir effectuer leur cycle lytique. Leur génome mesure 4,7 kb et se décompose en deux cadres ouverts de lecture (ORF, Open Reading Frame) codant essentiellement en 5' pour les gènes servant à la réplication et en 3' pour les gènes des protéines de capsides; les ORFs sont flanquées de part et d'autre de deux ITR, grâce auxquelles les AAV peuvent former des concatémères qui stabilisent la forme épisomale dans le cytoplasme, ou s'intégrer plus rarement dans le génome cellulaire (Lamartina, Sporeno et al. 2000). Les AAV recombinants (AAVr) conservent leurs ITR en *cis*, alors que les gènes des ORFs sont remplacés par le ou les transgènes désirés et apportés en *trans* avec les séquences adénovirales essentielles à la production des AAVr. La première génération d'AAVr comportait toujours une molécule d'ADN simple brin, mais actuellement ce sont des scAAV, comportant une molécule d'ADN double brin (sc, self complementary), qui sont utilisés (Léger, 2012) car ils montrent une meilleure capacité de transduction et une meilleure persistance dans la cellule (McCarty, Fu et al. 2003); cependant leur capacité

d'encapsidation n'est que de 2,2 kb. Il existe différents sérotypes d'AAV, permettant un ciblage de types cellulaires spécifiques et des pseudotypages permettant de renforcer ces propriétés. Les avantages de ces vecteurs sont leur grande capacité d'infection de certains types cellulaires, leur très faible toxicité et l'absence de phénomènes de tumorigénèse démontrée (Gauttier, Pichard et al. 2013) malgré la possibilité de mutagénèse insertionnelle en cas d'intégration (Donsante, Miller et al. 2007; Cunningham, Dane et al. 2008). Ils ont l'inconvénient de ne pouvoir intégrer qu'une information de petite taille, qui ne permet pas une correction phénotypique durable dans les cellules en division (Flageul, Aubert et al. 2009).

Les vecteurs viraux intégratifs ont besoin d'insérer leur génome dans celui de la cellule cible afin de se répliquer, permettant la transmission d'un transgène aux cellules filles au cours des divisions cellulaires successives. Parmi cette catégorie de vecteur, on trouve les oncorétrovirus murins, membre de la famille des *Retroviridae*, virus dont le génome est une molécule simple brin d'acide ribonucléique (ARN). Celui-ci présente plusieurs ORFs dont Gag, qui code pour les protéines de la capsid, Pol qui contient les séquences codantes de plusieurs enzymes dont la rétrotranscriptase et une ADN polymérase ARN dépendante, et Env qui code pour les protéines d'enveloppe (Verma and Weitzman 2005). Ils ont été utilisés les premiers en essais cliniques chez l'homme dans les années 2000 (Hacein-Bey-Abina, Hauer et al. 2010), mais en raison de leur insertion aléatoire dans le génome au niveau de régions transcriptionnellement actives et en particulier de proto-oncogènes, qui a engendré la survenue de syndromes myéloprolifératifs (Fischer, Hacein-Bey-Abina et al. 2011; Cavazzana-Calvo, Fischer et al. 2012), et dans une moindre mesure, de leur incapacité à infecter des cellules quiescentes, leur usage a été abandonné au profit des vecteurs lentiviraux.

Les lentivirus appartiennent également à la famille des *Retroviridae*, genre *Lentivirinae*. Ce sont des virus enveloppés d'une taille de 100 nm environ, qui possèdent un génome diploïde composé de deux molécules d'ARN positif. Les vecteurs lentiviraux sont dérivés de virus sauvages de différentes espèces virales comme les virus de l'immunodéficience féline (Loewen, Leske et al. 2004), bovine (Matukonis, Li et al. 2002), simienne (Negre, Mangeot et al. 2000), et pour la majorité des projets actuels de thérapie génique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Ces vecteurs lentiviraux recombinants (VL) conservent de leur virus originel les séquences nécessaires à la construction de la particule lentivirale et à son cycle d'infection, c'est à dire les gènes permettant l'entrée dans la cellule-cible et le noyau, la rétrotranscription et l'intégration de

l'ADN double brin ainsi obtenu dans le génome de la cellule-hôte; celle-ci se fait, contrairement aux oncorétrovirus, dans les régions silencieuses de la chromatine. Par contre, tous les gènes responsables de la réplication virale ont été retirés. Les transgènes sont exprimés en utilisant la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte. Les VL actuellement utilisés, dits de 3ème génération ou SIN pour Self-INactivated ou Δ U3 (Zufferey, Dull et al. 1998), ont perdu toute capacité transcriptionnelle de leur LTR (Long Terminal Repeat) viral dans la cellule hôte par délétion de la région promoteur/enhancer du LTR 3', ce qui permet de diminuer les risques de mutagénèse insertionnelle (Bokhoven, Stephen et al. 2009). Ces vecteurs contiennent en amont du promoteur la séquence cPPT/CTS (central polypurine tract/central terminaison sequence) améliorant la translocation nucléaire des complexes de pré-intégration (Follenzi, Ailles et al. 2000; Zennou, Petit et al. 2000), ainsi qu'un élément de régulation post-transcriptionnelle, le WPRE (Woodchuck Post-transcriptional Regulatory Element), placé en aval du transgène pour augmenter son niveau d'expression (Zufferey, Donello et al. 1999).

L'utilisation des VL offre de nombreux avantages théoriques, car ils peuvent : (i) cibler des tissus aussi bien mitotiques que quiescents (Naldini, Blomer et al. 1996; Kafri, Blomer et al. 1997); (ii) exprimer de façon stable dans le temps et sans pression de sélection un gène d'intérêt (Schmitt, Remy et al. 2010); (iii) cibler spécifiquement un type cellulaire donné, soit par l'emploi, en amont du transgène, d'un promoteur dont l'activité est restreinte spécifiquement au type cellulaire visé, comme le promoteur de la transthyréline murine (mTTR) pour le foie ((Nguyen, Bellodi-Privato et al. 2005), soit par pseudotypage de l'enveloppe avec une protéine dont le ligand est exclusivement présent à la surface de la membrane des cellules cibles. Ainsi, la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSVg) est largement utilisée du fait de son large tropisme cellulaire et de la stabilité conférée aux virions (Burns, Friedmann et al. 1993), le virus de la rougeole permet la transduction de lymphocytes quiescents (Bischof and Cornetta 2010) et cellules dérivées de monocytes (Humbert, Frecha et al. 2012) ou le pseudotypage avec des protéines de l'hépatite C cible spécifiquement les hépatocytes (Bartosch and Cosset 2009). En raison de la délétion de la plus grande partie du génome viral conduisant à l'absence de l'expression des protéines virales, ces vecteurs ne sont pas constitutivement immunogènes (iv), contrairement aux vecteurs adénoviraux (Walther and Stein 2000). (v) Ils permettent l'intégration dans leur génome d'inserts de grande taille, jusqu'à 10 kb, (vi) n'ont pas de potentiel oncogénique reconnu actuellement du fait de leur intégration (Woods, Bottero et al. 2006) mais (vii) confèrent ainsi un maintien de l'expression du transgène même en cas de divisions cellulaire.

Pour limiter les risques de mutagénèse insertionnelle, des lentivirus déficients pour l'intégration (integration deficient lentiviral vectors, IDLVs) ont été récemment mis au point (Wanisch and Yanez-Munoz 2009). Cependant, s'ils permettent d'augmenter la biosécurité des vecteurs, les titres obtenus et l'efficacité de transduction sont généralement inférieurs à ceux des LV intégratifs ((Matrai, Cantore et al. 2011), et l'expression de leur transgène se perd au cours du temps en cas de divisions cellulaires. Ils ont néanmoins été utilisés avec succès dans des tissus quiescents comme la rétine, le système nerveux central ou le muscles (Loewen, Leske et al. 2004; Philippe, Sarkis et al. 2006; Apolonia, Waddington et al. 2007).

I.1.3 - THERAPIE GENIQUE DES MALADIES HEREDITAIRES DU FOIE

Le foie est un organe central qui assure des fonctions métaboliques nombreuses, concernant à la fois la nutrition (synthèse et modification des composés lipidiques et glucidiques), la synthèse de protéines plasmatiques comme les facteurs de coagulation, l'albumine ou la céruléoplasmine, la dégradation de substances toxiques pour l'organisme, endogènes comme l'ammoniac ou la bilirubine non conjuguée ou exogènes comme les composés médicamenteux, et le stockage et la régulation de multiples composés comme les vitamines ou les oligoéléments minéraux. De la sorte, il peut être impliqué dans de nombreuses maladies héréditaires du métabolisme. La plupart de ces maladies n'ont actuellement aucun traitement curatif à l'exception de la transplantation hépatique, dont la pénurie de donneurs et les phénomènes immunitaires de rejet de greffe obligeant à une immunosuppression médicamenteuse à vie restent des obstacles au développement. En ce sens, la thérapie génique se pose en alternative thérapeutique potentielle pour les maladies héréditaires monogéniques du foie, proposant un traitement définitif du déficit enzymatique sous-jacent tout en évitant les inconvénients inhérents à la transplantation hépatique (Nguyen and Ferry 2007).

Parmi l'ensemble de ces hépatopathies, un groupe de maladies plus volontiers candidates à la thérapie génique peut être sélectionné sur la base de plusieurs critères expérimentaux ou cliniques parmi lesquels : (i) l'architecture du foie est normale, (ii) l'expression du gène à visée thérapeutique est non toxique, (iii) une restauration partielle de la protéine thérapeutique ($\geq 10\%$ de la normale) suffit à obtenir un bénéfice thérapeutique et (iv)

les hépatocytes sains ont un avantage sélectif sur les hépatocytes malades. Néanmoins, aucune pathologie connue n'offre à ce jour toutes les caractéristiques sus-citées, et il faut différencier dans le principe deux classes de maladies hépatiques héréditaires, celles qui induisent une altération du parenchyme hépatique, conduisant des phénomènes de régénération hépatocytaire et dans lesquelles on peut espérer que se crée un avantage sélectif des hépatocytes sains ou corrigés, et celles où l'architecture du foie n'est pas atteinte et où l'expression d'un transgène ne va pas obligatoirement requérir son intégration dans le génome de la cellule-hôte.

Dans ces deux classes de pathologies hépatiques, un certain nombre de questions se posent en amont de tout essai thérapeutique préclinique et vont intervenir en particulier dans le choix du vecteur et de sa voie d'administration, parmi lesquelles:

- le niveau de transduction hépatocytaire nécessaire à l'obtention d'une efficacité thérapeutique;
- la dose de vecteur à administrer qui peut être limitée par la toxicité inhérente à celui-ci (vecteurs adénoviraux), ou *a contrario* être inhibée par l'existence d'une immunité pré-existante contre le vecteur (AAV, vecteurs lentiviraux);
- la possibilité pour le vecteur d'atteindre sa cible *in vivo*, en particulier en ce qui concerne des cellules quiescentes;
- la nécessité de préserver une expression du transgène à vie, ce qui passe par la suppression de toute réponse immunitaire développée contre le produit du transgène qui induirait l'élimination des hépatocytes corrigés.

Pour tenter d'augmenter le taux de transduction initial tout en diminuant la dose de vecteur utilisée et en minimisant son contact avec la circulation sanguine systémique, un certain nombre de techniques d'administration *in situ* de vecteurs a été développé, parmi lesquelles on peut citer l'administration guidée par échographie (Pastore, Nusco et al.2013), la perfusion du vecteur dans un foie isolé de la circulation sanguine (Podevin, Pichard et al. 2002), ou encore l'injection en foie isolé et en hyperpression proposée en alternative à l'injection hydrodynamique. Cette dernière consiste à injecter chez l'animal un vecteur dans un grand volume par la veine de la queue, créant une hyperpression vasculaire qui favorise le transfert de gène dans les hépatocytes (Suda and Liu 2007) mais semble éthiquement difficilement applicable chez l'humain en dehors de voies plus locales (Khorsandi, Bachellier et al. 2008). Notre équipe travaille depuis de nombreuses années sur la thérapie génique de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 (CN1, OMIM#218800), une hépatopathie métabolique non régénérative liée au déficit en B-UGT1A1 (UDP-glucuronosyltransférase de type 1),

l'enzyme responsable de la glycuronoconjugaison de la bilirubine dans le foie. Ce déficit entraîne la survenue d'un ictère néo-natal potentiellement fatal par atteinte encéphalopathique (kernicterus), et le seul traitement actuellement connu est l'utilisation intensive de la photothérapie (12 heures par jour), dont l'efficacité décroît cependant avec l'âge (Gourley 1997). La mise au point d'une technique chirurgicale d'injection de VL dans le foie isolé en ischémie-hyperpression (LIL pour Lentivirus in Isolated Liver approach) a ainsi permis d'obtenir une amélioration de la transduction hépatocytaire d'un facteur 10 chez des rats adultes pour une dose de vecteur donnée (Dariel, Nguyen et al. 2009) et de dépasser le seuil théorique de 10% de transduction (Follenzi, Sabatino et al. 2002), ce qui serait suffisant pour traiter la plupart des hépatopathies héréditaires. Cette efficacité serait due à l'affranchissement de deux obstacles potentiels à la transduction lentivirale des hépatocytes: (i) La taille des virus, environ 100 nm, proche de celle des fenestrations endothéliales hépatiques (Wisse, Jacobs et al. 2008); (ii) L'absence d'infection par les lentivirus des cellules au stade G0 du cycle cellulaire. Or le foie chez l'adulte est formé d'hépatocytes majoritairement en phase G0. L'injection en hyperpression faciliterait le passage endothélial du vecteur par augmentation de la poussée d'amont et du diamètre des fenestrations, et l'ischémie hépatique stimulerait les hépatocytes quiescents à passer en phase non quiescente du cycle cellulaire par une ischémie transitoire chaude (Schmitt F., 2008). En application préclinique chez le rat Gunn, animal modèle de la CN1, nous avons ainsi obtenu une guérison sub-thérapeutique avec une faible dose de VL correspondant à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,2 (Schmitt, Flageul et al. 2010). L'utilisation de la même technique avec des vecteurs adénoviraux gutless a retrouvé des résultats similaires (Schmitt, Pastore et al. 2014), avec une correction phénotypique à long terme des rats Gunn à une dose de vecteur HD-Ad de 1.10^{11} particules infectieuses par kilogramme de rat (pi/kg), qui n'induit en temps normal qu'un taux à peine détectable de transduction (Tao, Gao et al. 2001) mais est non toxique sur le plan clinique, alors qu'une dose supérieure peut être létale (Raper, Chirmule et al. 2003). Les résultats détaillés de cette étude sont présentés sous forme d'article en Annexe 2.

Le deuxième problème rencontré concerne le maintien de l'effet thérapeutique à long terme, qui passe par la prévention du développement d'une réaction immunitaire contre le produit du transgène éliminant les hépatocytes transduits (Aubert, Menoret et al. 2002; Nguyen, Aubert et al. 2007). La perfusion du vecteur dans un foie isolé de la circulation sanguine a permis une réduction de cette réaction immunitaire, mais de manière seulement partielle (Podevin, Otta et al. 2004). Une autre approche a consisté à injecter du VL à des rats

nouveau-nés qui ne possèdent pas de système immunitaire mature et sont donc des animaux "tolérants" face à divers antigènes; cette technique a permis d'obtenir la guérison de rats Gunn nouveau-nés (Nguyen, Bellodi-Privato et al. 2005), mais reste difficilement transposable en clinique où la maladie n'est pas forcément diagnostiquée dès la naissance ou accessible à un diagnostic prénatal.

Suite aux travaux de Brown *et al.* chez la souris (Brown, Sitia et al. 2007), notre équipe a mis au point un VL codant le gène B-UGT1A1 et intégrant 4 séquences complémentaires d'un microARN, le miR142-3p, sélectivement exprimé dans les cellules de la lignée hématopoïétique. Ceci conduit à une dégradation post-transcriptionnelle des ARN messagers codant la protéine thérapeutique uniquement dans les cellules du système immunitaire et donc dans les cellules présentatrices d'antigènes (Figure 2). Par contre, dans les hépatocytes (miR142-3p négatifs) la protéine thérapeutique peut être exprimée. Cette stratégie a induit une tolérance pour le facteur IX et permis une correction à long terme de l'hémophilie B chez la souris (Brown, Sitia et al. 2007; Annoni, Brown et al. 2009). Chez le rat Gunn, nous avons obtenu une normalisation complète et à long terme de la bilirubinémie en injectant une forte dose d'un vecteur codant la séquence UGT1A1 et portant les séquences-cibles du miR142-3p (Schmitt, Remy et al. 2010).

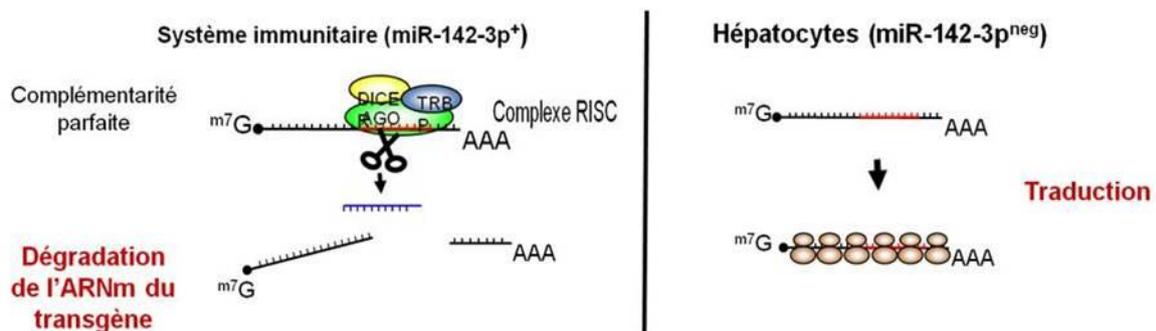


Figure 2: Schéma descriptif du mode d'action du miR142-3p endogène. Dans les cellules du système immunitaire (à gauche), les séquences-cibles intégrées à l'ARNm transgénique sont reconnues par le miR142-3p qui s'y fixe, recrute le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) intracellulaire et induit ainsi la dégradation de l'ARNm transgénique. Dans les hépatocytes (à droite) où le miR142-3p n'est pas constitutivement exprimé, les séquences-cibles dans l'ARNm transgénique ne sont pas reconnues et il n'y a pas de dégradation de l'ARN, la traduction et l'expression de la protéine transgénique est donc possible.

I.1.3.1 - Maladies hépatiques sans atteinte parenchymateuse

Les vecteurs adénoviraux possèdent une grande capacité de transduction des hépatocytes et constituent donc des vecteurs attractifs dans ces atteintes hépatiques sans régénération qui permettent le maintien de l'expression d'un transgène sans intégration préalable dans le génome cellulaire. Néanmoins, un certain nombre de paramètres a limité leur utilisation en clinique, le premier étant le développement d'une réponse toxique immédiate à l'injection par voie systémique, chez les humains et les primates non humains, de doses d'HD-Ad permettant d'obtenir une efficacité thérapeutique. Cette toxicité est indépendante du transgène utilisé et serait pour part due à une réaction aux protéines de capsid (Brunetti-Pierri, Palmer et al. 2004), comme cela a été le cas dans l'essai clinique mené par Raper *et al.* dans le déficit en ornithine transcarbamylase (Raper, Chirmule et al. 2003). De plus, même si les dernières générations de vecteurs HD-Ad ont diminué la toxicité chronique de ceux-ci (Palmer and Ng 2005), il persistait une diminution progressive de l'expression du transgène à long terme (Brunetti-Pierri, Ng et al. 2013).

Les vecteurs adéno-associés recombinants (rAAV) constituent un autre vecteur de thérapie génique très prometteur dans le foie, du fait de leur grande efficacité de transduction dans le foie adulte, de leur absence de toxicité aiguë ou chronique et de leur innocuité clinique (Brunetti-Pierri and Lee 2005). Ces vecteurs sont expérimentés ou ont déjà été utilisés avec succès dans des protocoles cliniques de thérapie génique de l'hémophilie B (Nathwani, Tuddenham et al. 2011) et de l'hyperlipoprotéïnémie de type 1 dans laquelle l'alipogène tiparvovec (Glybera®), dérivé d'un AAV1 injecté en intramusculaire, a obtenu récemment l'autorisation de mise sur le marché européenne (Salmon, Grosios et al. 2014). Ils semblent donc bien adaptés à la thérapie génique des hépatopathies non cirrhogènes telles que le CN-1 (Seppen, Bakker et al. 2006) ou l'hypercholestérolémie familiale homozygote (Somanathan, Jacobs et al. 2014) car ces vecteurs transduisent des cellules en phase G0.

Les différentes hépatopathies héréditaires non régénératives sont listées dans le tableau I, ainsi que les expérimentations précliniques et les essais cliniques leur correspondant.

Tableau I: Maladies héréditaires du foie sans atteinte parenchymateuse associée.

Maladie	OMIM	Essais précliniques	Essais cliniques
Afibrinogénémie	#202400	VL <i>in vitro</i> sur hépatocytes en culture (Stroka, Keogh et al. 2014)	/
Analbuminémie	#616000	ADN nu chez le rat (Wu, Wilson et al. 1991)	/
Crigler-Najjar de type 1	#218800	AAV, HD-Ad, VL chez le rats Gunn (Montenegro-Miranda, Pichard et al. 2014 ; Schmitt, Remy et al. 2010; Schmitt, Pastore et al. 2014)	- Thérapie cellulaire, Phase I-II - HEP001 (Promethera® HepaStem); NCT01765283
Galactosémie	#230400		/
Hémophilie A	#306700	Animal: modèles murins Vecteurs: AAV, HD-Ad, Rétrovirus, VL, non viraux (Brunetti-Pierri and Lee 2005)	- Vecteur non viral (Roth, Tawa et al. 2001) - Rétrovirus (Powell, Ragni et al. 2003)
Hémophilie B	#306900	Animal: modèles murins, simiens Vecteurs: AAV, HD-Ad, Rétrovirus, VL, non viraux (Brunetti-Pierri and Lee 2005)	- AAV (Nathwani, Tuddenham et al. 2011) - 3 essais ouverts AAV8: NCT00979238; NCT01620801; NCT01687608
Hypercholestérolémie familiale homozygote	#143890	- AAV chez la souris (Somanathan, Jacobs et al. 2014), - HD-Ad chez le singe rhesus (Oka, Mullins et al. 2014)	Ex vivo avec rétrovirus (Grossman, Rader et al. 1995)
Hyperlipoprotéïnémie de type 1	#238600	- AAV chez la souris (Rip, Nierman et al. 2005)	- Phase I-II avec AAV1 (alipogene tiparvovec (Glybera®), (Salmon, Grosios et al.2014)
Déficit en ornithine transcarbamylyase	#311250	Chez la souris - Rétrovirus (Podevin, Ferry et al. 1996) - HD-Ad (Raper, Wilson et al. 1998) - AAV8 (Wang, Morizono et al.) Mol Genet 2012	HD-Ad, (Raper, Chirmule et al. 2003) - Thérapie cellulaire SELICA II, Phase II; NCT00718627 - Thérapie cellulaire, phase I-II HEP001 (Promethera® HepaStem); NCT01765283
Phénylcétonurie	#261600	- Adénovirus chez la souris (Fang, Eisensmith et al. 1994; Nagasaki, Matsubara et al. 1999) - AAV chez la souris (Mochizuki, Mizukami et al. 2004) - ADN nu chez la souris (Viecelli, Harbottle et al. 2014)	/
Porphyrie aiguë intermittente	#176000	- Adénovirus chez la souris (Johansson, Nowak et al. 2004) - AAV5 chez le macaque (Paneda, Lopez-Franco et al. 2013)	/

Tableau récapitulatif des essais de thérapie génique menés chez les animaux et l'homme, *d'après des données Orpha.net et ClinicalTrials.gov*. ADN: acide désoxyribonucléique; AAV: adeno-associated virus; HD-Ad: helper-dependant adenovirus, VL: vecteur lentiviral.

I.1.3.2 - Maladies hépatiques avec altération parenchymateuse

Dans ces pathologies, listées dans le tableau II, l'existence de phénomènes de régénération hépatocytaire semble préjudiciable à l'emploi de vecteurs non viraux ou de vecteurs viraux non intégratifs. Il y a une perte progressive de l'expression du transgène attendue au cours des divisions cellulaires, sauf à obtenir 100% de transduction hépatocytaire initiale, et ils ne préviennent pas obligatoirement l'évolution de la fibrose vers le carcinome hépatocellulaire (CHC). Ainsi, dans le traitement chez la souris de la thyrosinémie de type 1 (OMIM#276700), l'utilisation de vecteurs adénoviraux a permis une amélioration des taux de transaminases hépatiques, mais n'a pas empêché la survenue de CHC dans 9 sur 13 cas, provenant d'hépatocytes non transduits (Overturf, al-Dhalimy et al. 1997). Un essai similaire avec des rAAV a montré une repopulation du foie par des hépatocytes ayant apparemment intégré dans leur génome un provirus, sans développement de CHC (Chen, Tazelaar et al. 2000). De même dans la glycoséose de type 1 (OMIM#232200), l'utilisation d'AAV a permis d'obtenir une amélioration transitoire du phénotype (Yiu, Lee et al. 2010), dégressive mais persistante jusqu'à 24 semaines chez la souris. Dans le déficit en alpha-1-antitrypsine (OMIM#613490), l'utilisation d'adénovirus ou d'AAV n'a pas permis d'améliorer le pronostic hépatique (Brunetti-Pierrri and Lee 2005) et la plupart des essais en cours portent sur le pronostic pulmonaire (Carlon, Vidovic et al. 2014). Cependant, une observation récente rapporte la possibilité pour les AAV de transduire efficacement un foie cirrhotique (Sobrevals, Enguita et al. 2012), ce qui n'a pas été forcément démontré pour des vecteurs viraux de taille supérieure et qui peuvent être limités de façon plus importante par la pseudocapillarisation des sinusoides hépatiques présente en cas de fibrose (Furrer, Rickenbacher et al. 2011).

C'est donc dans ces pathologies métaboliques induisant une régénération hépatocytaire que les stratégies de thérapie cellulaire et l'utilisation de vecteurs intégratifs, et en particulier les VL, peuvent trouver un domaine d'application privilégié comparés aux autres types de vecteurs non intégratifs (AAV, adénovirus, ADN nu). De façon intuitive, si l'on peut espérer l'existence d'un avantage sélectif des cellules corrigées par rapport aux hépatocytes natifs, il paraît nécessaire d'obtenir un taux initial de cellules corrigées important pour éviter une altération trop importante du parenchyme restant, et le développement d'une hépatite chronique active menant à terme à la cirrhose et au CHC. Ainsi, toutes ces contraintes supplémentaires ont fait que le développement d'essais cliniques de thérapie cellulaire ou

génique de phase I/II est actuellement beaucoup moins avancé que dans les maladies sans atteinte hépatique, portant essentiellement sur le traitement pulmonaire du déficit en alpha-1-antitrypsine (Tableau II).

Tableau II: Maladies héréditaires du foie avec atteinte parenchymateuse associée.

Maladie	OMIM	Essais précliniques	Essais cliniques
Déficit en alpha-1-antitrypsine	#613490	- AAV chez la souris (Carlson, Vidovic et al. 2014) et le chien (Halbert, Madtes et al. 2010) - rétrovirus chez le chien (Kay, Baley et al. 1992)	- Phase I/II avec AAV2 et 1; NCT00377416 et NCT00430768 (Kotterman and Schaffer 2014; Flotte, Trapnell et al. 2011) - Phase I, liposomes cationiques (Brigham, Lane et al. 2000)
Cholestase intrahépatique familiale de type I, II et IV		/	/
Désordre de synthèse des acides biliaires		/	/
Fructosémie congénitale	#229600	/	/
Glycogénose de type I (déficit en glucose-6-phosphatase)	#232200	- Adénovirus et AAV combinés chez la souris (Sun, Pan et al. 2002) - AAV chez le chien (Beaty, Jackson et al. 2002) - AAV chez la souris (Yiu, Lee et al. 2010)	/
Hémochromatose	#235200	- AAV sur entérocytes <i>in vitro</i> (Ezquer, Nunez et al. 2005)	/
Mucopolysaccharidose de type 7 (maladie de Sly)	#253220	- LV chez la souris (Derrick-Roberts, Pyragius et al. 2014) - HD-Ad chez la souris (Ariza, Gimenez-Llort et al. 2014) - rétrovirus chez le chien (Bigg, Sleeper et al. 2013; Xing, Knox et al. 2013)	/
Tyrosinémie de type 1	#276700	- Rétrovirus chez la souris (Grompe, Overturf et al. 1998) - Adénovirus chez la souris (Overturf, al-Dhalimy et al. 1997) - AAV chez la souris (Chen, Tazelaar et al. 2000; Paulk, Wurstthorn et al. 2010) - CRISPR/Cas9 genome editing chez la souris (Yin, Xue et al. 2014)	/
Maladie de Wilson	#277900	- Thérapie cellulaire chez le rat LEC (Malhi, Joseph et al. 2008; Sauer, Siaj et al. 2011) - Adénovirus chez le rat LEC (Terada, Nakako et al. 1998; Ha-Hao, Merle et al. 2002) - VL chez le rat LEC (Merle, Encke et al. 2006)	/

Tableau récapitulatif des essais de thérapie génique menés chez les animaux et l'homme, *d'après des données Orpha.net et ClinicalTrials.gov*. ADN: acide désoxyribonucléique; AAV: adeno-associated virus; HD-Ad: helper-dependant adenovirus; VL: vecteur lentiviral; LEC: rat Long-Evans Cinnamon.

I.2 - LA MALADIE DE WILSON

I.2.1 - LA MALADIE DE WILSON HUMAINE

I.2.1.1 - Epidémiologie et génétique

La maladie de Wilson (MW, OMIM#277900) ou dégénérescence hépato-lenticulaire est une maladie héréditaire rare de transmission autosomique récessive. Son incidence en France est de 1/30 000 à 1/100 000 nouveaux cas par an, soit une prévalence estimée à 1/25 000 cas (Duclos-Vallee, Ichai et al. 2006). Elle a été décrite en 1912 par Samuel Alexander Kinnier Wilson (1878-1937), un neurologue britannique, comme une maladie neurologique de ségrégation familiale associant une dégénérescence lenticulaire et une cirrhose hépatique (Wilson, 1912).

Son mode de transmission a été déterminé en 1953, mais ce n'est qu'en 1993 que le gène responsable de cette maladie a été identifié sur le locus 13q14.3 (Dalvi and Padmanaban 2014). Le produit de ce gène ATP7B est une protéine ATPase de type P intracellulaire, responsable de l'homéostasie cellulaire et en particulier hépatocytaire du cuivre (Bull, Thomas et al. 1993). A l'heure actuelle, plus de 640 mutations ont été décrites, dont 508 pathogènes (Luoma, Deeb et al. 2010). La moitié environ seraient des mutations faux sens (<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp>), avec un âge de début plus tardif et des répercussions cliniques potentiellement moins graves que les mutations non sens ou avec décalage du cadre de lecture (Merle, Weiss et al. 2010; Li, Lu et al. 2011). Néanmoins, il n'existe pas de corrélation génotype-phénotype stricte (Merle, Weiss et al. 2010).

I.2.1.2 - Physiopathologie

I.2.1.2.1 - Homéostasie du cuivre

Le cuivre (Cu), troisième élément minéral présent dans l'organisme après le zinc et le fer, est essentiel à la quasi totalité des grandes fonctions de l'organisme et à la bonne qualité de nombreux tissus comme le tissu cérébral, le tissu vasculaire ou le cartilage, à la synthèse et la stabilité de différentes cuproenzymes et à des phénomènes de détoxification (Lalioi, Muruais et al. 2009). Il est apporté par l'alimentation, à des doses moyennes de 1 à 2,5 mg/ jour pour un adulte (Dameron and Harrison 1998), et est principalement contenu dans le foie, la viande rouge, le chocolat, les coquillages et les fruits secs.

L'absorption intestinale du cuivre se fait majoritairement au niveau du duodénum en milieu alcalin (Wapnir 1998). La protéine Ctr1, dont la concentration est régulée en fonction de la cuprémie, permet l'internalisation du Cu^+ au niveau de la membrane apicale des entérocytes, après réduction en Cu^{++} . Il est alors pris en charge par différentes molécules de transport intracellulaire, dont la protéine Atox1 qui va pouvoir le mener jusqu'à la protéine ATP7A au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 3). C'est également une ATPase de type P qui assure un rôle central dans la régulation de la concentration intracellulaire en cuivre. Elle existe dans de nombreux types cellulaires et est préférentiellement exprimée dans les entérocytes ou la glande surrénale (Trocello, Chappuis et al. 2010). La protéine ATP7A permet l'efflux du cuivre au niveau basal de l'entérocyte et son passage dans la circulation portale. Un défaut de fonction de la protéine ATP7A entraîne une carence en cuivre ou maladie de Menkès (OMIM#309400).

Dans le sang, le cuivre est alors majoritairement lié à l'albumine et à la transcupréine, ainsi qu'à quelques acides aminés comme l'histidine (Bligh, Boyle et al. 1992) et est transporté par le système porte jusqu'au foie. Cet organe constitue le lieu de stockage et de distribution principal du cuivre dans l'organisme. La protéine Ctr1 permet à nouveau l'entrée du cuivre réduit dans l'hépatocyte, où il est pris en charge dans le cytosol par différentes protéines chaperonnes (glutathion - GSH- et métallothionéine - MT-, puis Atox1 et Cox17 en particulier) qui le distribuent ensuite à différents compartiments cellulaires et cuproenzymes effectrices, comme la superoxyde dismutase (SOD) qui joue un rôle primordial dans la prévention du stress oxydatif, et la protéine ATP7B (Laloti, Muruais et al. 2009; Trocello, Chappuis et al. 2010).

La protéine ATP7B est une protéine transmembranaire localisée au niveau de l'appareil de Golgi (Schaefer, Roelofsen et al. 1999). Elle est composée de 1465 acides aminés (GenBank : U03464.1) et comporte plusieurs domaines distincts hautement conservés (Figure 4):

- 8 domaines transmembranaires, dont une séquence CPC très conservée dans le 6^{ème}, et une boucle contenant le domaine phosphatase (TGEA) entre les domaines 4 et 5; ils forment un canal de transport actif du Cu à travers la membrane de l'appareil de Golgi;
- des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques. En N-terminal se placent les sites de fixation à la protéine Atox1, à raison de 1 à 6 copies présentes selon les espèces (MXCXXC). En C-terminal se trouvent:

- la séquence SEHPL, proximale au site de fixation de l'ATP, H étant le siège de la plupart des mutations dans la MW, et qui est essentiel à la fonction de la protéine.
- le site de fixation de l'ATP (GDGVND)
- un site pour le transport ionique (DKTGT)

La protéine ATP7B assure ainsi le passage du cuivre dans l'appareil de Golgi, où il va être incorporé à l'apocéruléoplasmine à raison de 6 atomes par protéine, la transformant en holocéruléoplasmine, forme stable et fonctionnellement active qui va ensuite être excrétée dans le sang (Lalioi, Muruais et al. 2009) où elle assure un rôle essentiel dans l'oxydation du fer et son incorporation à la transferrine (Figure 3). En cas d'augmentation importante de la concentration cytoplasmique en cuivre, la protéine ATP7B va migrer vers le réticulum endoplasmique où elle va pouvoir assurer la formation de vésicules d'exocytose contenant du cuivre, qui va être libéré au niveau des canalicules biliaires (Polishchuk, Concilli et al. 2014). L'excrétion biliaire de l'excès de cuivre est ainsi le mécanisme de régulation de l'homéostasie du cuivre le plus important dans l'organisme (Lalioi, Muruais et al. 2009).

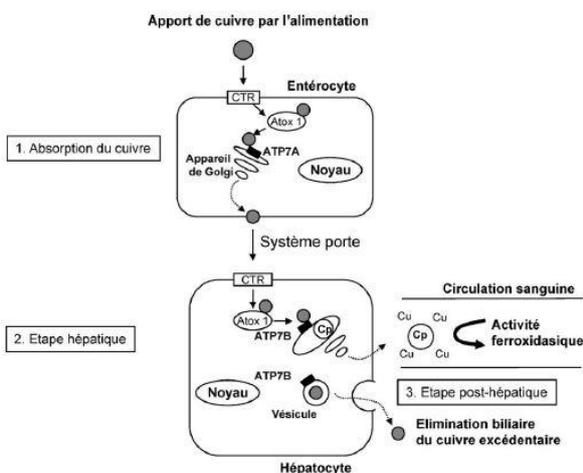


Figure 3: Le métabolisme du cuivre dans l'organisme. Les différentes étapes d'absorption intestinale et de transport dans l'entérocyte, puis de passage par la circulation portale jusqu'au foie où le cuivre est stocké, incorporé dans la céruléoplasmine et excrété dans la bile sont détaillées. CTR, ATP7A et ATP7B: protéines transporteurs transmembranaires du cuivre; Atox1: protéine chaperonne; Cp: céruléoplasmine. D'après Trocello JM et al. (2010), *Anomalies du métabolisme du cuivre, la Revue de médecine interne* (Trocello, Chappuis et al. 2010).

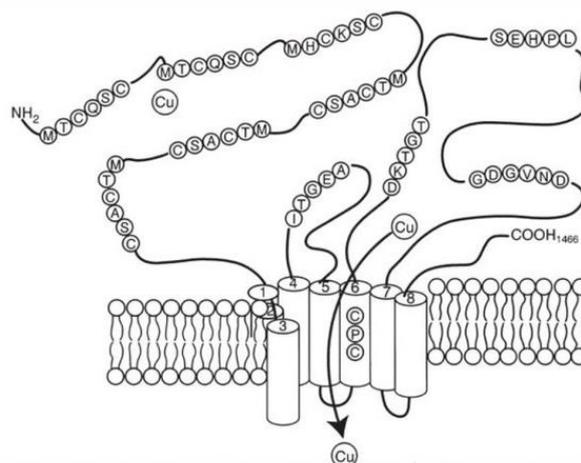


Figure 4: Modèle topologique de la protéine ATP7B. Les sites hautement conservés sont représentés sous forme de motifs d'acides aminés. D'après Loudianos, G. and Gitlin, J. (2000): *Wilson disease, Seminar in liver disease* (Loudianos G 2000).

I.2.1.2.2 - Dérégulation du métabolisme du cuivre dans la maladie de Wilson

La MW est liée à un défaut de fonctionnalité de la protéine ATP7B. L'absorption intestinale du cuivre et son passage jusque dans le cytoplasme des hépatocytes ne sont donc pas modifiés. Par contre, le cuivre ne peut plus être normalement internalisé dans l'appareil de Golgi et n'est donc pas incorporé à l'apocéruleoplasmine. Cette protéine passe alors sous forme instable dans le sang où elle est rapidement dégradée (demi-vie de 4-5 heures) et non fonctionnelle (Harris and Gitlin 1996). L'accumulation progressive du cuivre dans le cytoplasme des hépatocytes n'entraîne pas de migration de la protéine ATP7B vers les lysosomes et son excrétion par la bile n'est plus possible (Figure 5). L'excès intracellulaire en cuivre induit alors des altérations mitochondriales et un stress oxydatif avec formation de radicaux libres, qui mènent à la destruction des hépatocytes et au relargage du cuivre toxique sous forme non liée dans le sang et les autres organes où il s'accumule progressivement (Aggarwal and Bhatt 2013).

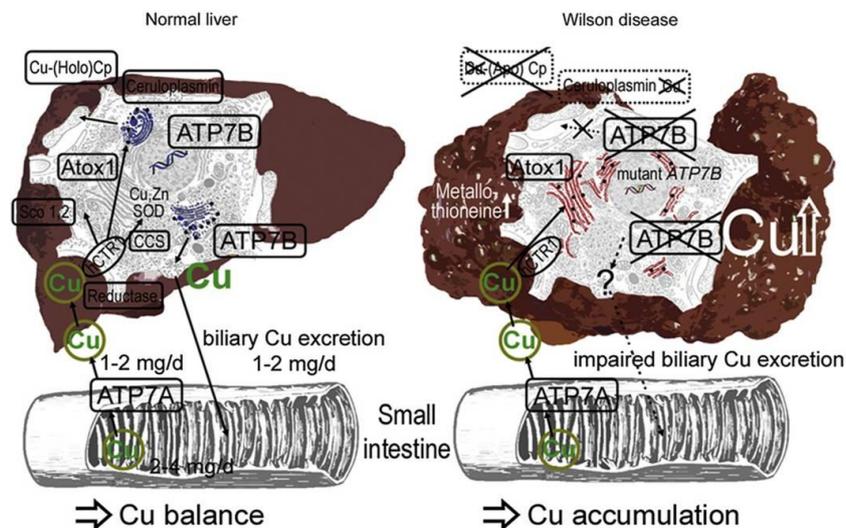


Figure 5: Anomalies métaboliques impliquées dans la pathogénèse de la maladie de Wilson. Le métabolisme hépatocyttaire normal est représenté à gauche, et les effets liés à l'absence de protéine ATP7B fonctionnelle à droite. Cp: céruléoplasmine; SOD: superoxyde dismutase, HCTR et CCS: protéines chaperonnes. *D'après Huster, D. (2010) Best practice and Research Clinical Gastroenterology (Huster 2010).*

I.2.1.3 - Signes cliniques et évolution naturelle de la maladie

Les signes cliniques présents de la MW sont très variables, avec un mode de présentation plutôt hépatique ou neurologique, en fonction de l'âge. Ce diagnostic devrait être

évoqué devant tout patient avec des signes d'atteinte hépatique ou des mouvements anormaux dont l'étiologie est imprécise et de présentation précoce (Dalvi and Padmanaban 2014).

1.2.1.3.1 - Atteintes hépatiques

Elles sont très polymorphes, allant d'un patient asymptomatique avec une anomalie modérée des transaminases hépatique (20% des cas) à l'hépatite fulminante, en passant par tous les stades d'hépatite aiguë ou chronique avec cirrhose (Shah 2014). Un mode de présentation hépatique, associant le plus fréquemment ictère, hépatomégalie et/ou douleurs abdominales, concerne globalement 40-50% des patients, souvent dans la première décennie, avec un âge moyen de 11 à 13 ans (Loudianos G 2000; Trocello, Chappuis et al. 2010), et des extrêmes allant de 3 à 58 ans (Ferenci, Czlonkowska et al. 2007; Shah 2014). Malgré leur jeune âge, l'existence d'une cirrhose sous-jacente semble avérée au diagnostic chez presque 50% des patients (Bem, Muzzillo et al. 2011) et apparaît au cours de la maladie non traitée dans 100% des cas. Deux critères majeurs pour porter le diagnostic de MW en cas d'atteinte hépatique sont la présence d'un anneau cornéen de Kayser-Fleischer, retrouvé dans 48-52% des cas et souvent absent chez les plus jeunes enfants (Sanchez-Albisua, Garde et al. 1999; Merle, Schaefer et al. 2007), et d'une céruléoplasminémie abaissée, présente dans 65% des cas (Steindl, Ferenci et al. 1997).

1.2.1.3.2 - Atteintes neurologiques

Elles surviennent typiquement chez des adultes jeunes, âgés d'une dizaine d'année de plus qu'en cas de présentation hépatique, soit typiquement entre 20 et 30 ans. Trois modes de présentation principaux, corrélés aux lésions cérébrales retrouvées en imagerie par résonance magnétique (IRM), ont été décrits. Ils s'associent souvent diversement entre eux et évoluent en fonction de la progression de la maladie (Trocello, Chappuis et al. 2010; Dalvi 2014):

- un syndrome akinéto-rigide ou pseudo-parkinsonien, associant une rigidité souvent axiale, une bradykinésie et un déficit cognitif, associé à une dilatation du 3ème ventricule;
- un syndrome choréique et dystonique, associant des mouvements choréiques à une dystonie focale, de fonction ou généralisée, dans lequel on peut retrouver en IRM des lésions focales des noyaux gris centraux (putamen et globus pallidus);
- un syndrome pseudosclérotique, avec tremblement de repos ou d'attitude, ataxie et réduction des capacités fonctionnelles, en relation avec des lésions thalamiques focales.

Le symptôme le plus fréquemment observé est la dysarthrie (90% des cas) et l'évolution progressive, mais des formes sévères d'emblée avec hémiparésie, encéphalopathie ou crises convulsives peuvent exister (Dalvi 2014). Dans le cas des formes neurologiques, la présence d'un anneau de Kayser-Fleischer est retrouvée dans 90% des cas environ et la céruléoplasminémie est également plus fréquemment abaissée (Steindl, Ferenci et al. 1997).

Un tiers des patients va présenter une atteinte psychiatrique, dont l'évolution va de paire avec celle des signes neurologiques (Dalvi 2014). Les signes les plus fréquents incluent changements de la personnalité, irritabilité (22%), dépression (25%), anxiété, baisse des fonctions cognitives (28%), et plus rarement impulsivité, désinhibition ou catatonie.

1.2.1.3.3 - Autres atteintes

Outre le dépôt péri-cornéen de cuivre formant l'anneau de Kayser-Fleischer visible à la lampe à fente, il peut exister au niveau de l'œil une cataracte en fleur de tournesol, par dépôts cupriques orangés et radiants dans la chambre antérieure (Figure 6). Il peut enfin exister différentes anomalies rénales, cardiaques, gynéco-obstétricales ou rhumatologiques, listées dans le tableau III (Trocello, Chappuis et al. 2009; Dalvi and Padmanaban 2014; Shah 2014).

Tableau III: Manifestations cliniques retrouvées dans la maladie de Wilson

Atteintes hépatiques	Atteintes neuro-psychiatriques	Autres atteintes
Hépatomégalie asymptomatique	Dysarthrie	<i>Oculaires:</i> anneau de Kayser-Fleischer, cataracte en fleur de tournesol
Splénomégalie isolée	Dystonie	<i>Rénales:</i> lithiase, aminoacidurie, insuffisance rénale
Elévation persistante des transaminases	Mouvements anormaux (tremblement, chorée)	<i>Cardiaques:</i> Cardiomyopathie, arythmie
Stéatose hépatique	Paralysie pseudo-bulbaire	<i>Endocriniennes:</i> pancréatite, hypoparathyroïdie
Hépatite aiguë	Epilepsie, convulsions	
Hépatite fulminante	Migraine	<i>Gynéco-obstétricales:</i> aménorrhée, fausses couches à répétition
Pseudo hépatite auto-immune		<i>Hématologiques:</i> Anémie hémolytique Coombs négative
Cirrhose (compensée ou décompensée)	Dépression, changement de la personnalité Névroses, psychoses	<i>Rhumatologiques:</i> Ostéoporose, ostéomalacie

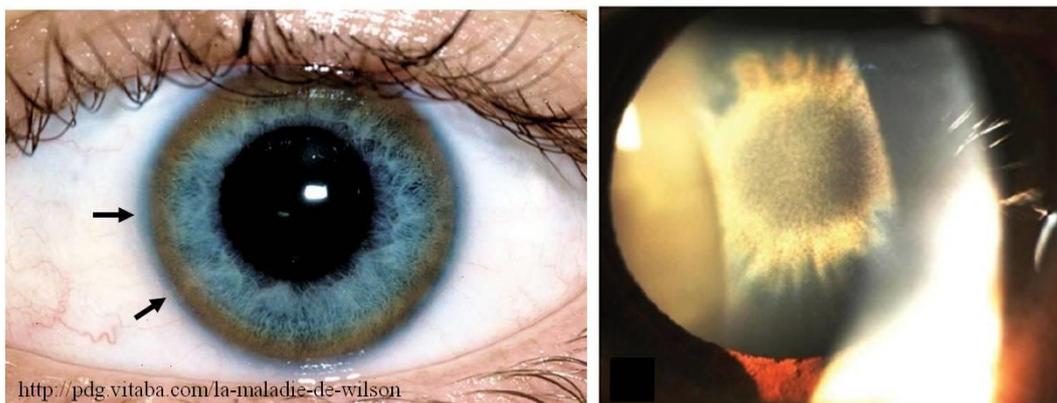


Figure 6: Atteintes oculaires dans la Maladie de Wilson. A gauche la photographie d'un anneau de Kayser-Fleischer, par dépôt péri cornéen de cuivre; à droite la vision à la lampe à fente d'une cataracte en fleur de tournesol (Naha and Prabhu 2011).

I.2.1.4 - Moyens diagnostiques

Le diagnostic de MW repose sur le recueil des données cliniques, et en particulier sur la présence de l'anneau de Kayser-Fleischer lorsqu'il existe, l'existence de lésions cérébrales évocatrices en IRM en cas d'atteinte neurologique, et les données des dosages sanguins et/ou de la biopsie hépatique (Figure 7).

Les transaminases hépatiques sont souvent anormales dans la MW mais n'affirment pas le diagnostic étiologique et leur taux n'est pas un reflet exact de la sévérité de l'atteinte hépatique (Roberts and Schilsky 2003; Ala, Walker et al. 2007). Les tests sanguins les plus utiles au diagnostic sont la cuprurie sur les urines de 24h, la céruléoplasminémie et le dosage du cuivre sérique libre (Dalvi and Padmanaban 2014). En particulier, l'association d'une augmentation du cuivre urinaire à des taux de cuivre sérique et de céruléoplasmine (méthode néphéléométrique ou dosage enzymatique de l'activité ferroxidase) diminués rend le diagnostic de MW très probable. Les valeurs normales et celles retrouvées dans la MW sont répertoriées dans le tableau IV. Néanmoins, il existe de nombreux paramètres susceptibles de modifier ces valeurs, comme par exemple l'existence d'une hépatite aiguë, au cours de laquelle les taux sanguins de cuivre et de céruléoplasmine sont modifiés, de sorte que leur spécificité diminue de plus de 10% (Korman, Volenberg et al. 2008; Merle, Eisenbach et al. 2009); dans ces cas-là, les rapports phosphatases alcalines / bilirubine et des transaminases hépatiques ASAT / ALAT seraient plus discriminants. Récemment, un nouveau marqueur diagnostique a été décrit, le cuivre échangeable relatif (REC), qui pour une valeur seuil de 18,5% avait une sensibilité et une spécificité de 100% dans une petite série de patients atteints de MW et non préalablement traités (El Balkhi, Trocello et al. 2011).

L'analyse génétique du gène ATP7B reste le gold standard pour faire le diagnostic de certitude de MW, mais l'existence de plus de 600 mutations, le coût et les délais de l'analyse n'en font pas un test de routine; elle reste très intéressante pour le dépistage familial des patients pré-symptomatiques et des porteurs hétérozygotes quand la mutation du cas index est connue (Huster 2010; Dalvi and Padmanaban 2014). Elle est négative dans 15 % des cas (Merle, Schaefer et al. 2007).

La réalisation d'une biopsie hépatique montre une augmentation franche de la teneur en cuivre, à plus de 5 fois la normale (<50 µg/g de foie sec) chez 80% des patients environ (Dalvi and Padmanaban 2014). Néanmoins, elle peut être faussement normale en cas de présentation neuropsychiatrique exclusive de la maladie. L'analyse histologique retrouve souvent des lésions de stéatose, de nécrose hépatocytaire focale et des corps de Mallory, ainsi que des lésions de fibrose et de cirrhose (Duclos-Vallee, Ichai et al. 2006). Cependant, aucun de ces signes histologiques n'est pathognomonique de la MW, et le caractère invasif de la technique associé à la possibilité d'obtenir une évaluation fiable de la fibrose et de la cirrhose hépatiques par FibroScan et ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) dans la MW (Karlus, Hempel et al. 2012) font désormais réserver la réalisation d'une biopsie hépatique aux cas diagnostiques incertains.

Tableau IV: Valeurs de référence des dosages biologiques utiles au diagnostic de maladie de Wilson

	Sujet normal	Sujet ayant la maladie de Wilson
Céruleoplasmine (g/L)	0,2 - 0,4	< 0,1
Activité oxydase de la céruléoplasmine (U/L)	> 20	< 20
Cuivre sérique total (µmol/L)	14 - 21	< 10
Cuivre sérique libre (µmol/L)	< 2,1	> 3,0
Cuivre échangeable relatif (%)	< 18,5	> 18,5
Cuprurie des 24 heures (µmol/24h)	< 0,8	> 2,0
Cuivre hépatique (µg/g)	< 50	> 250
Ratio PAL/ Bili *	> 4	< 4
Ratio ASAT/ALAT *	< 2,2	> 2,2

Valeurs des tests biologiques retrouvés chez les sujets sains et atteints de la maladie de Wilson. Les rapports phosphatase alcaline/ bilirubine (PAL/Bili) et aspartate aminotransférase sur alanine aminotransférase (ASAT/ALAT) sont utilisés en cas d'hépatite aiguë. (Duclos-Vallee, Ichai et al. 2006; Korman, Volenberg et al. 2008; El Balkhi, Trocetto et al. 2011).

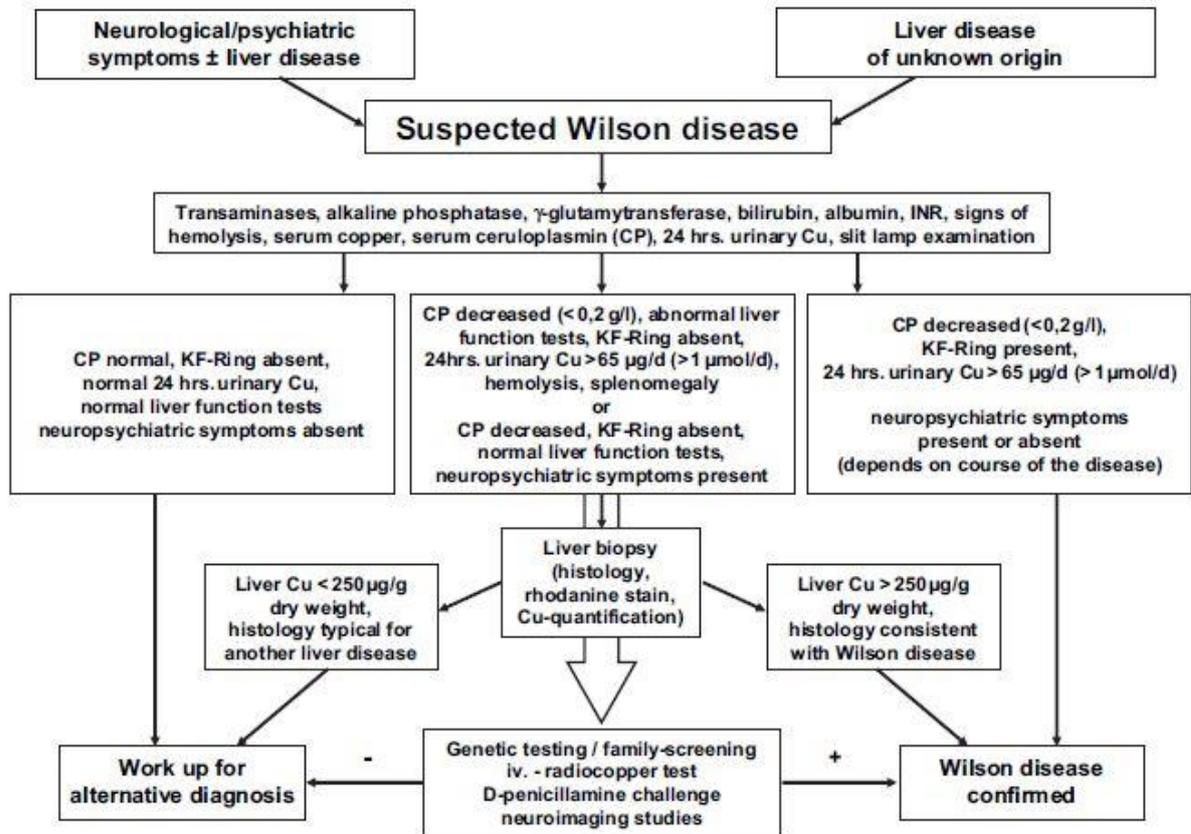


Figure 7: Arbre décisionnel des examens complémentaires pour le diagnostic de la maladie de Wilson. INR: international normalized ratio; Cu: cuivre; KF ring: anneau de Kayser-Fleischer. D'après Huster D.(2010), *Best Practice and Clinical Research Gastroenterology* (Huster 2010).

I.2.1.5 - Traitements actuels

Tous les patients, dont les patients pré-symptomatiques dépistés par diagnostic familial, doivent être traités durant toute leur vie en association à un régime alimentaire appauvri en cuivre (Huster 2010). Les traitements médicamenteux disponibles incluent les chélateurs du cuivre - D-pénicillamine (Trolovol®) et triéthylènetétramine (Trientine®) - et les sels de zinc (Wilzinc®). Les chélateurs du cuivre agissent en séquestrant le cuivre intrahépatique et intraentérocytaire (Duclos-Vallee, Ichai et al. 2006) par induction de métallothionéines, et en augmentant son excrétion urinaire (Dalvi and Padmanaban 2014). La D-pénicillamine est le traitement de référence depuis plus de 30 ans et reste donnée en première intention. Elle doit être prescrite à des doses progressivement croissantes car elle peut faire décompenser une atteinte neurologique ou hépatique dans 10 à 50% des cas (Roberts and Schilsky 2003), puis son dosage peut être réduit de moitié une fois les lésions stabilisées, en général après 6 à 12 mois, et ce traitement nécessite une supplémentation en

pyridoxine pour prévenir les troubles cutanés (HAS, 2008, (Dalvi and Padmanaban 2014). La D-pénicillamine est efficace et permet l'amélioration ou la stabilisation des lésions dans plus de 3/4 des cas, mais elle induit de nombreux effets secondaires (Linn, Houwen et al. 2009) (Tableau V), affectant jusqu'à 74% des patients (Merle, Schaefer et al. 2007) et rendant l'arrêt de ce traitement nécessaire chez 20 à 30% d'entre eux (Roberts and Schilsky 2003). Le triéthylènetétramine, sous autorisation temporaire d'utilisation, est proposé en cas d'échec, d'intolérance ou de contre-indication à la D-pénicillamine (HAS, 2008). Il chélate le cuivre au niveau intestinal et présente moins d'effets secondaires que la D-pénicillamine; il serait de plus en plus proposé également en première intention (Ala, Walker et al. 2007). L'acétate de zinc est utilisé en première intention chez les patients présymptomatiques et en traitement d'entretien, seul ou en association avec un chélateur du cuivre dans certains cas résistant au traitement initial (Roberts and Schilsky 2003; Huster 2010). Il agit par induction des métallothionéines au niveau entérocytaire, mais aussi hépatique, permettant la détoxification du foie et inhibant l'absorption intestinale du cuivre. Il présente très peu d'effets secondaires, mais serait moins efficace que les chélateurs en traitement initial (Weiss, Gotthardt et al. 2011).

Tableau V: Traitements médicamenteux de la maladie de Wilson disponibles en France.

Médicament	Dose quotidienne	Mécanisme d'action	Détérioration neurologique	Effets secondaires	Commentaires
D-pénicillamine (TROLOVOL®)	Cp: 300 mg Induction: 250-500 mg/j Entretien: 1200-1800 mg/j, puis réduction à demi-dose après stabilisation	Chélateur du cuivre (groupes sulfhydriles), induit une cuprurie	10-50% durant la phase initiale	Fièvre, rash cutané, protéinurie, syndrome néphrotique, lupus, anémie, leucopénie, thrombocytémie, hépatotoxicité, rétinite, hypersensibilité, lésions cutanées	Risque de décompensation fulminante à l'arrêt du traitement Echappement: 30% Non compliance: 50% Efficace en 3 mois
Triéthylène tétramine (TRIENTINE®)	Cp: 300 mg Dose: 1500 mg/j	Chélateur du cuivre (groupes nitrogènes), induit une cuprurie	Possible à l'initiation du traitement	Gastrite, anémies aplasiques ou sidéroblastiques plus rares	Mieux toléré mais potentiellement mêmes complications possibles
Acétate de zinc (WILZINC®)	Cp: 50 mg à distance des repas Induction: 150 mg/j Entretien: 50-150 mg/j	Induction des métallothionéines, bloque l'entrée du cuivre	Possible à l'initiation du traitement	Gastrite, pancréatite biologique, céphalées, accumulation de zinc, trouble des fonctions immunitaire	En 2 ^{de} intention; chez les très jeunes enfants et femmes enceintes; en association à la trientine

(Roberts and Schilsky 2003; HAS, 2008; Huster 2010; Dalvi and Padmanaban 2014).

La transplantation hépatique est le traitement ultime et seul définitivement curateur de la MW, en permettant une normalisation des taux de cuivre. Elle est nécessaire en cas d'hépatite fulminante, en cas d'échec du traitement dans les formes hépatiques, en particulier les cirrhoses décompensées (Macedo, Maia et al. 2000; Shah 2014), et est en évaluation dans les formes neurologiques où elle serait moins efficace (Medici, Mirante et al. 2005; Catana and Medici 2012). La médiane de survie à un an est d'environ 79% (Schilsky, Scheinberg et al. 1994), meilleure dans les transplantations pédiatriques et adultes pour hépatite chronique (100% et 90% respectivement à 5 ans) que fulminantes (87,5% à 5 ans) (Arnon, Annunziato et al. 2011). Elle reste néanmoins associée à une morbidité lourde et à un traitement immunosuppresseur à vie, et est limitée par la pénurie d'organes, surtout dans les formes fulminantes.

1.2.2 - MODELES ANIMAUX DE LA MALADIE DE WILSON

Il existe trois modèles animaux de la MW. Le premier est un modèle de souris, mutant spontané, la « toxic milk mouse », qui présente une délétion ponctuelle (M1356V) induisant une perte de fonction de la protéine ATP7B par perte du 8^{ème} domaine transmembranaire de celle-ci (Theophilos, Cox et al. 1996). Le phénotype de ces animaux est caractérisé par une carence en cuivre importante chez un grand nombre de nouveau-nés, liée à l'absence de cuivre dans le lait maternel, résultant en une mauvaise prise de poids, des anomalies de pigmentation des phanères, des troubles neurologiques et un décès vers 14 jours de vie; les survivants présentent ensuite une accumulation importante de cuivre dans le foie dès la 3^{ème} semaine de vie, induisant des lésions de fibrose et cirrhose. Les concentrations plasmatiques en cuivre et en céruléoplasmine sont très basses tout au long de la vie (Rauch 1983).

Le second animal-modèle de la maladie est une souris transgénique *atp7b* *-/-*, créée en 1999 par knock-out (Buiakova, Xu et al. 1999), qui porte une mutation ponctuelle dans le gène, ce qui entraîne la présence d'une protéine de taille tronquée. Cette mutation induit l'apparition d'une élévation de la concentration hépatique en cuivre dès 2 mois de vie, et l'apparition après 7 mois d'altérations du parenchyme hépatique avec fibrose et nodules de régénération chez un certain nombre d'animaux. Des lésions de cholangiofibrose apparaissent après l'âge de 20 semaines (Vonk, Wijmenga et al. 2008). Certains descendants à partir de la 2^{ème} génération présentent également des signes d'atteinte neurologique (ataxie, tremor,

anomalies motrices), et un retard de croissance, avec certains décès prématurés liés au syndrome infantile décrit ci-dessus, mais de façon moins importante que chez la souris "toxic milk".

Le rat Long-Evans Cinnamon (LEC) est une souche découverte au début des années 1980 à l'université d'Okkaido (Japon) et entretenue depuis par consanguinité, qui doit son nom à la couleur cannelle de son pelage (Figure 8). Il est porteur d'une mutation spontanée du gène *atp7b*, orthologue de celui de la MW (Masuda, Yoshida et al. 1988), dont il présente une délétion de plus de 1300 paires de bases en 3', dont 900 pb environ de la région codante (Wu, Forbes et al. 1994). Le mode de transmission de l'affection est autosomique récessif, comme pour la MW ou chez la souris "toxic milk". Sur le plan clinique et biologique il présente, outre une accumulation intra-hépatique de cuivre et une diminution de la céruléoplasminémie (Yamada, Agui et al. 1993), des épisodes d'insuffisance hépatique aiguë voire fulminante (Kasai, Osanai et al. 1990). De plus, les survivants (60-70%) de ces épisodes aigus développent dans les mois qui suivent une cirrhose, avec nodules de régénération multiples, suivie de l'apparition de nodules de carcinome hépato-cellulaire après l'âge de 1 an et qui concernent 100% des rats après 18 mois (Masuda, Yoshida et al. 1988; Sawaki, Hattori et al. 1998) (Figure 8). Outre les lésions de fibrose hépatique classique, il s'y associerait des anomalies structurelles au niveau des ductules biliaires et des lésions de cholangiofibrose (Betto, Kaneda et al. 1996; Schilsky, Quintana et al. 1998). Le rat LEC a également en commun avec la MW humaine une grande sensibilité à la teneur en cuivre de son alimentation, ainsi qu'une bonne réponse thérapeutique aux chélateurs du cuivre et au traitement par sels de zinc (Sone, Maeda et al. 1996; Domingo, Gomez et al. 1998; Medici, Sturniolo et al. 2005; Siaj, Sauer et al. 2013). Les principaux points de comparaison clinico-biologiques entre les rats LEC et la maladie de Wilson humaine sont récapitulés dans le tableau VI. Parmi les trois espèces d'animaux présentant des signes cliniques similaires à la MW chez les humains, le rat LEC a été le plus utilisé, à la fois comme modèle d'exploration de la fibrose hépatique et du CHC, mais aussi de l'homéostasie du cuivre et pour la thérapie génique de la MW (Merle, Stremmel et al. 2007).

Tableau VI: Comparaisons entre la maladie de Wilson humaine et le rat LEC

		Maladie de Wilson	Rat LEC
Clinique	Hépatite aiguë/chronique	+++	+++
	Carcinome hépatocellulaire	+/-	++
	Anomalies neurologiques	+++	+/-
	Anneau de Kayser-Fleischer	+	-
Génétique	Transmission	Autosomique récessive	Autosomique récessive
	Gène défectif	ATP7B	Atp7b
Biologie	Cuivre hépatique	↑	↑
	Cuprurie	↑	↑
	Cuprémie	↓/N	↓/N
	Céruleoplasminémie	↓↓	↓↓
Traitement	Chélateur de cuivre	+++	+++
	Sels de zinc	++	++

N: normal; ↑: augmenté; ↓: diminué.

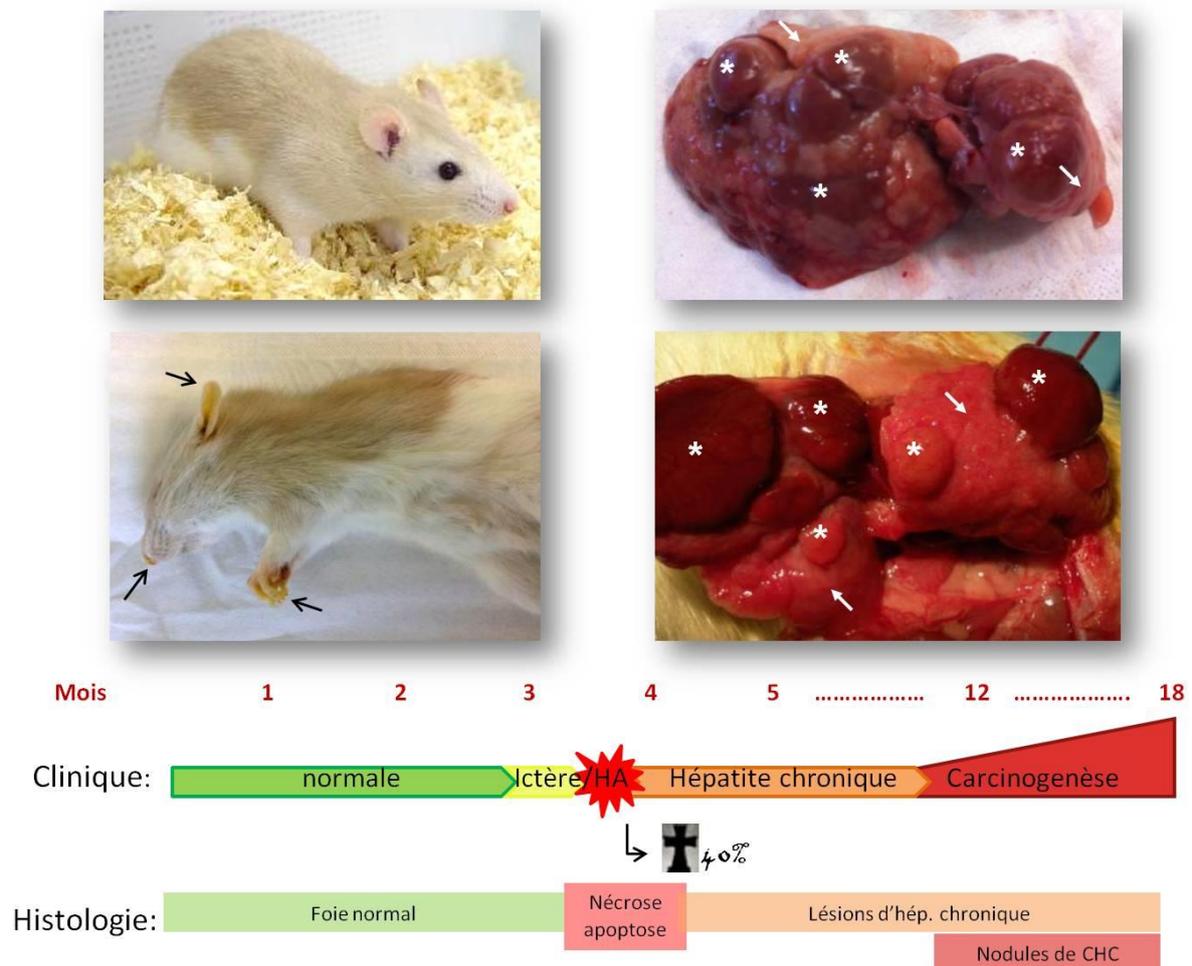


Figure 8: Le rat Long-Evans Cinnamon, histoire clinique et corrélation avec les lésions histologiques du foie sous-jacentes. Photographies: rat LEC jeune (en haut à gauche) et rat décédé d'hépatite fulminante (en bas à gauche), avec ictère cutanéomuqueux marqué des oreilles, des naseaux et des pattes (flèche noire); à droite, aspect du foie de rats avec cirrhose évoluée (flèche blanche) et nodules de régénération (étoiles blanches). HA: hépatite aiguë; CHC: carcinome hépatocellulaire. Chronologie lésionnelle d'après Suzuki *et al.* (Suzuki, Kanno *et al.* 1995).

I.2.3 - ETAT DES LIEUX DE LA THERAPIE GENIQUE DE LA MALADIE DE WILSON DANS LES MODELES ANIMAUX

L'absence de traitement curateur de la maladie de Wilson en dehors de la transplantation hépatique, des traitements médicamenteux contraignants, non dénués d'effets secondaires et nécessitant une compliance parfaite à vie et l'existence d'une proportion non négligeable de patients non répondeurs et de phénomènes d'échappement thérapeutique rendent la recherche d'alternatives thérapeutiques innovantes indispensable (Ala, Walker et al. 2007; Merle, Stremmel et al. 2007; Schilsky 2009). Le développement au cours des années 1990 des outils nécessaires à la thérapie génique et cellulaire a permis de poser la preuve de principe de son application potentielle à la maladie de Wilson.

En 2004, l'équipe de Meng *et al.* a démontré qu'il était possible de créer des rats LEC transgéniques exprimant le cDNA humain du gène ATP7B, et que ceux-ci présentaient une excrétion biliaire de cuivre, des taux sériques normaux de céruléoplasmine et une très nette diminution des lésions hépatiques (Meng, Miyoshi et al. 2004). Des essais de thérapie cellulaire visant à intégrer des hépatocytes sains dans le foie de rats LEC ont été menés. En 1996, Yoshida et al. a publié une première étude d'injection intra-portale d'hépatocytes de rats Long-Evans nouveau-nés chez des rats LEC jeunes après hépatectomie partielle, ce qui a permis de faire baisser le taux de mortalité à 30 semaines de 50% à 7,4% et d'améliorer l'histologie hépatique et le contenu du foie en cuivre au sacrifice (Yoshida, Tokusashi et al. 1996). Une seconde équipe a expérimenté cette voie thérapeutique, avec une guérison partielle d'animaux jeunes (injections à moins de 15 jours de vie), mais avec de grandes disparités interindividuelles et des délais d'apparition d'un effet thérapeutique longs (20 mois). De manière notable, les hépatocytes sains ont repeuplé le foie malade, ce qui a amplifié la masse thérapeutique initialement faible. Ce repeuplement sélectif a pu être accentué en bloquant la capacité de régénération des hépatocytes endogènes et en induisant une régénération hépatique par un pré-conditionnement du foie par irradiation suivie d'une étape d'ischémie-reperfusion chez des animaux (Malhi, Joseph et al. 2008).

En parallèle, différents essais de thérapie génique par vecteurs viraux ont été menés. Terada *et al* et Ha-ao *et al* ont obtenu une guérison de rats LEC après injection systémique d'un vecteur adénoviral, avec une expression transitoire de la protéine ATP7B dans le foie et de l'holocéruléoplasmine dans le sérum, mais avec une efficacité limitée à quelques jours à cause d'une réaction immune cellulaire dirigée contre les cellules transduites (Terada, Nakako et al. 1998; Terada, Aiba et al. 1999; Ha-Hao, Merle et al. 2002). L'injection systémique à des

rats LEC d'un vecteur lentiviral contenant le cDNA du gène ATP7B sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire a plus récemment permis d'obtenir une diminution de la fibrose septale à 24 semaines, associée à une diminution du cuivre dans le foie et à une amélioration partielle de l'activité oxydase de la céruléoplasmine. Cependant, il a été retrouvé une perte d'efficacité partielle à long terme, potentiellement due au promoteur faible utilisé (celui de la phosphoglycérate kinase) et au développement d'une réaction immunitaire (Merle, Encke et al. 2006). Un dernier essai de thérapie génique par vecteurs lentiviraux, injectés par voie intracardiaque à des fœtus de souris *atp7b*^{-/-}, a permis d'obtenir la restauration d'holocéruléoplasmine, une baisse du cuivre intra-hépatique et une histologie hépatique normale à 20 semaines post-injection (Roybal, Endo et al. 2011). Il n'y a actuellement aucun essai rapporté *in vivo* avec des HD-Ad ou des AAV dans la MW.

I.3 - OBJECTIFS DE CE TRAVAIL DE THESE

Ces premiers essais dans la MW ont posé la preuve de concept de l'efficacité de la thérapie génique chez l'animal, mais ont mis en évidence un certain nombre de limites, en particulier la nécessité d'un taux de transduction initial suffisant pour prévenir la détérioration du foie, la question du repeuplement du foie par les hépatocytes corrigés au cours de l'hépatite chronique et celle du maintien à long terme de l'expression du transgène, mais aussi la possibilité d'intervenir sur un foie présentant déjà des lésions de fibrose comme c'est le cas pour la majorité des patients au diagnostic.

Le but de ce travail a donc été de proposer un modèle préclinique de thérapie génique de la MW par vecteurs lentiviraux intégratifs et à immunogénicité atténuée chez le rat LEC en développant particulièrement trois axes de recherche:

- 1) Etablir des normes fiables et reproductibles de différents marqueurs cliniques, biologiques ou histologiques permettant d'assurer un suivi optimal au long cours et le moins invasif possible des rats LEC, en transposant à cette espèce certaines techniques innovantes comme le dosage du cuivre échangeable relatif et l'analyse semi-automatique de la fibrose hépatique;

- 2) Améliorer la technique d'injection du VL dans le foie en ischémie-hyperpression (LIL) afin (i) d'augmenter le taux de transduction hépatocytaire initial, (ii) d'essayer de la développer dans un foie déjà fibrotique et (iii) d'en déterminer l'impact sur l'immunité non spécifique contre les VL;

- 3) Evaluer précisément le taux de transduction hépatocytaire attendu pour une dose de vecteur donnée et injecter un VL codant pour le gène ATP7B à des doses suffisantes pour obtenir une efficacité thérapeutique à court et long terme chez des rats LEC jeunes.

RESULTATS:

II.1 - MISE AU POINT DES OUTILS NECESSAIRES A L'EVALUATION DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE DE LA THERAPIE GENIQUE DANS LA MALADIE DE WILSON

II.1.1 - EVALUATION DE LA FIBROSE CHEZ LE RAT LEC ET SCORE DE FIBROSE

Il a été nécessaire d'évaluer l'extension de la fibrose hépatique chez les rats LEC. Les données de la littérature font part de l'apparition de fibrose hépatique après la phase initiale d'HA, avec un continuum entre fibrose/cholangiofibrose, cirrhose, nodules hyperplasiques et apparition inéluctable de carcinome hépatocellulaire après 12 mois de vie (Masuda, Yoshida et al. 1988; Schilsky, Quintana et al. 1998). Cependant, aucune donnée n'existe entre la progression de la fibrose hépatique chez les rats LEC et celle des humains, et en particulier l'utilisation de scores de gradation de la fibrose hépatique comme le score METAVIR (Bedossa and Poynard 1996) ou le score Ishak (Ishak, Baptista et al. 1995) n'a jamais été proposé chez les rats LEC. La mise au point récente de différents outils quantitatifs d'évaluation de la fibrose, invasifs (Goodman, Becker et al. 2007; Sandrini, Boursier et al. 2014) et non invasifs comme le Fibromètre® basé sur des données biologiques sanguines (Cales, Boursier et al. 2009; Cales, de Ledinghen et al. 2013) ou l'utilisation du fibroscan ou de l'élastométrie en mode ARFI (Cales, Boursier et al. 2014), pourrait permettre une évaluation plus fiable et reproductible de l'évolution de la fibrose hépatique chez un même individu ou dans une espèce donnée. Par exemple, l'analyse morphométrique de l'aire de fibrose a déjà été utilisée avec succès dans deux modèles induits classiques de fibrose hépatique chez le rat: bile duct ligation (BDL) et tétrachlorure de calcium (CCl₄) (Moal, Chappard et al. 2002). Le but de ce protocole était donc d'évaluer la progression de la fibrose hépatique chez le rat LEC par analyse histologique classique et morphométrie numérisée, et de corrélérer les données obtenues avec les résultats des analyses sanguines, afin de pouvoir dans un second temps proposer un Fibromètre non invasif adapté au rat LEC.

II.1.1.1 - Protocole expérimental

Des rats LEC en alimentation normale ou en alimentation sans cuivre Altromin® C1041 ont été sacrifiés à des âges allant de 6 semaines à 18 mois, afin d'étudier l'extension des lésions de fibrose hépatique, à la fois avec une caractérisation histologique réalisée par un

anatomo-pathologiste confirmé, et par analyse numérisée morphométrique semi-automatique de l'aire de fibrose totale. Une à trois coupes histologiques par rat, prises aléatoirement au niveau des lobes droit, médian et gauche, ont été réalisées, et la moyenne des lames par rat a été prise en compte dans les analyses d'aire de fibrose. Au moment du prélèvement hépatique, il a été réalisé une prise de sang afin de pouvoir dans un second temps corrélérer ces résultats avec un panel de dosages sanguins (ASAT, ALAT, bilirubine, cholestérol total, HDL et LDL, triglycérides, acide hyaluronique, urée et créatinine) et étalonner ainsi un Fibromètre spécifique au rat LEC. Soixante-quatre rats, sous alimentation normale (n=33) ou sans cuivre (n=31), ont ainsi été inclus dans le protocole, et sacrifiés à 6 semaines (n=11), 9 semaines (n=4), 3 mois (n=13), 6 mois (n=3), 9 mois (n=11), 12 mois (n=11), 15 mois (n=4) et 18 mois (n=9). Afin de préciser l'évolution de la fibrose entre 3 et 9 mois, les données des biopsies réalisées dans les groupes de rats contrôles d'autres expérimentations (voir chap. II.1.2 et II.2.2.3) ont été également utilisées.

II.1.1.2 - Données histologiques

La lecture anatomo-pathologique des lames a retrouvé des lésions d'hépatite aiguë avec inflammation importante, ainsi que diverses lésions d'hépatite chronique se développant peu à peu et progressant jusqu'au stade de cirrhose évoluée (Figure 9). Les lésions de fibrose les plus discrètes étaient constituées d'une fibrose septale, diffuse au sein des travées hépatocytaires, puis de plus en plus présente et s'associant à une fibrose péri-portale et péri-sinusoïdale. Au sein de ce parenchyme homogène, il apparaissait peu à peu des micronodules de fibrose, qui prenait souvent un aspect assez particulier avec une intense prolifération ductulaire, appelée antérieurement "cholangiofibrose" (Betto, Kaneda et al. 1996; Schilsky, Quintana et al. 1998). A un stade plus évolué, il se développait des plages de fibrose et de cholangiofibrose de plus en plus grandes, avec apparition en leur sein de nodules de régénération formés de grands hépatocytes. Enfin, une fibrose mutilante constituait la majeure partie du foie, avec un état pré-cirrotique ou une cirrhose macro-nodulaire avérée.

Il a été proposé une gradation qualitative de la fibrose hépatique en 4 stades de gravité croissante:

- stade F0 : absence de fibrose
- stade F1 : fibrose septale discrète ;
- stade F2: fibrose péri-sinusoïdale et périportale, avec micronodules de cholangiofibrose et/ou de régénération

- stade F3: fibrose intense, souvent sous-capsulaire, nodules de régénération au sein du parenchyme
- stade F4 : fibrose mutilante, avec énormes nodules de régénération développés à son contact.

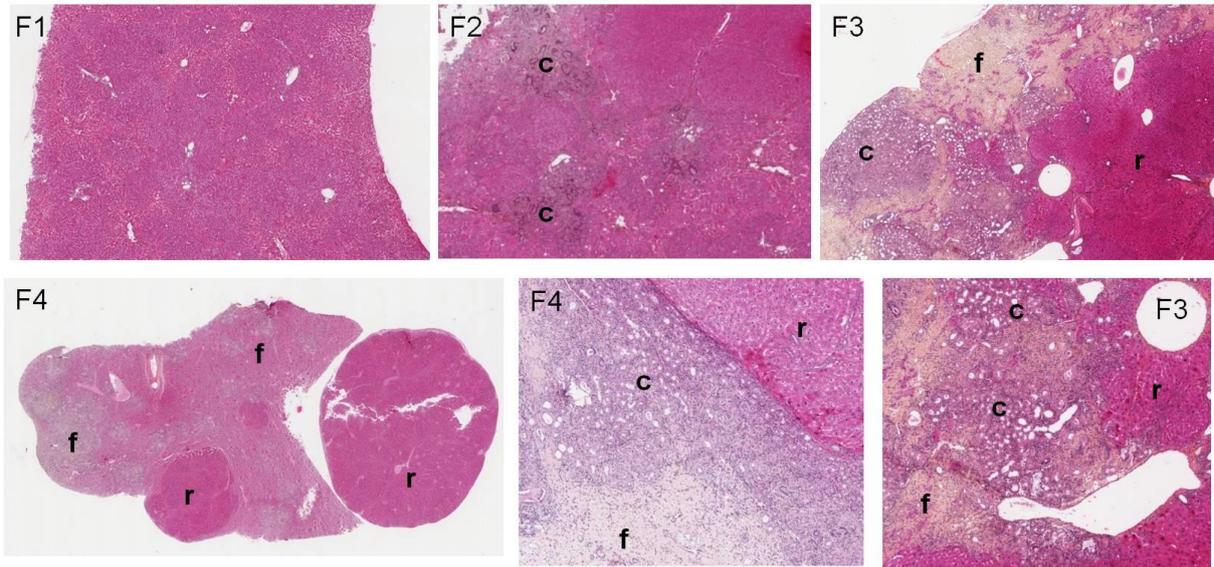


Figure 9: Photographies de lames histologiques de foie représentatives de l'évolution des lésions de fibrose chez le rat Long-Evans Cinnamon. Les stades F1 (fibrose septale discrète) à F4 (fibrose mutilante) sont représentés. Descriptif des lésions: c: cholangiofibrose, *i.e.* prolifération ductulaire intense; f: fibrose "classique"; r: nodule ou micronodule de régénération.

II.1.1.3 - Résultats des analyses morphométriques numérisées de la fibrose hépatique

Dans les deux groupes de rats, le pourcentage de fibrose hépatique à six semaines était normal et inférieur à 2%. Il n'y a pas eu de progression significative de celle-ci au cours du suivi des animaux recevant une nourriture sans cuivre jusqu'à 12 mois, puis une légère augmentation constatée à 15 mois mais non retrouvée au sacrifice à 18 mois, les valeurs médianes respectives étant de 1,37% [1,13 - 1,51] à 6 semaines, 1,48% [1,21 - 2,19] à un an et 3,35% [1,46 - 4,5] à 15 mois (Figure 10). Dans le groupe de rats LEC en alimentation normale, le taux de fibrose hépatique est passé de 1,21% [0,88 - 1,39] à six semaines à 2,12% [1,82 - 4,67] dès l'âge de trois mois ($p=0,008$). Après une courte phase en plateau, la fibrose a ensuite suivi une progression régulière très rapide entre 5 et 7 mois de vie, passant de 3,34% [1,97 - 6,54] à 18,45% [4,5 - 49,17] de valeurs médianes ($p<0,01$), avant de se stabiliser entre 18 et 20% jusqu'au sacrifice à 18 mois.

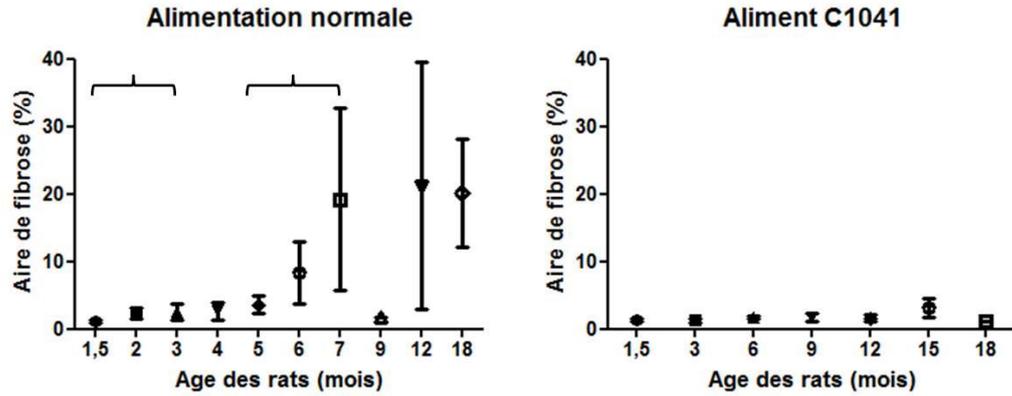


Figure 10: Evolution de la fibrose hépatique chez les rats LEC avec ou sans aliment déplété en cuivre (C1041). Les accolades représentent les zones de progression significative de la fibrose.

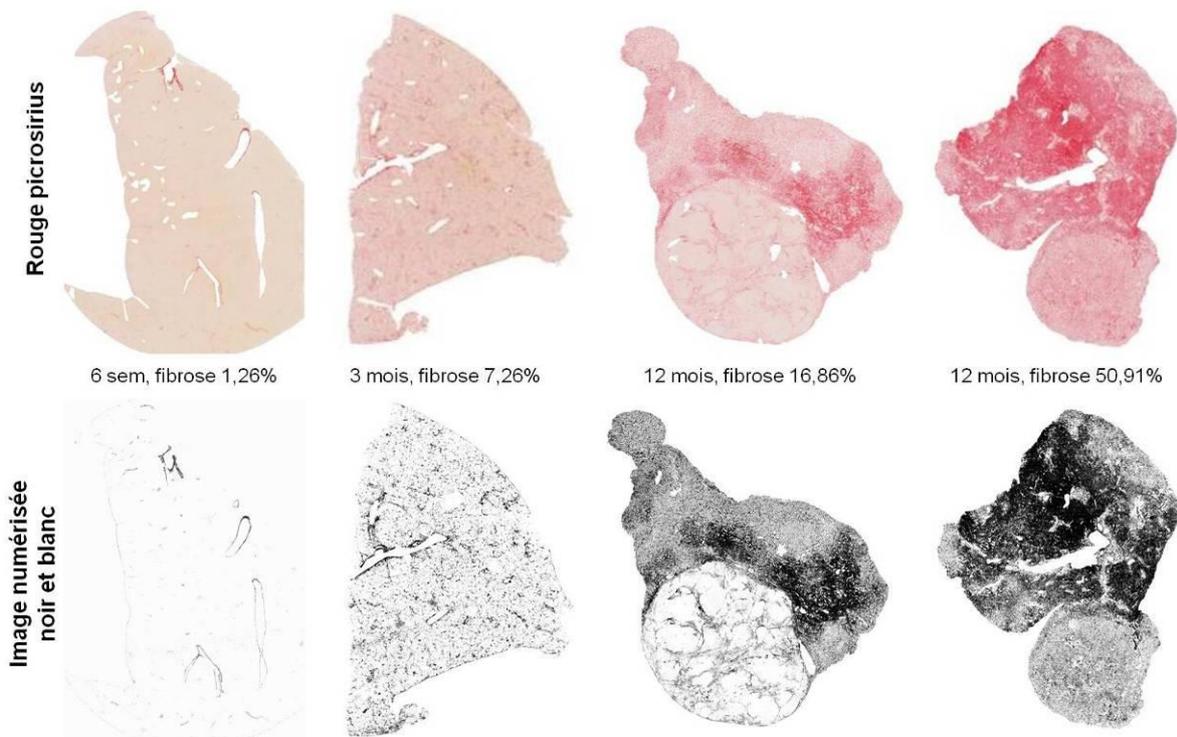


Figure 11: Analyse de la fibrose hépatique chez le rat LEC par imagerie numérisée et quantification semi-automatique. Les lames colorées au rouge picrosirius sont numérisées puis traitées pour donner une image en noir et blanc dont les artefacts sont éliminés manuellement. L'aire de fibrose est calculée par le rapport surface noire sur surface totale. Des images de rats LEC de différents âges sont représentées, avec le degré de fibrose calculé associé. Il existe une grande hétérogénéité dans la distribution des lésions dans les différents lobes hépatiques.

II.1.1.4 - Conclusions

Chez les rats non traités, la fibrose est apparue de façon relativement précoce, dès le 2^{ème} mois de vie et avant la survenue des premiers signes cliniques d'hépatite aiguë; les rats survivants ont développé ensuite très rapidement une fibrose extensive qui a fini par se

stabiliser autour de 18-20% durant tout le reste du suivi. L'existence d'une grande variabilité interindividuelle, ainsi que des lésions histologiques se répartissant de façon très hétérogène dans le foie (Figure 11), avec de grandes plages de fibrose sur lesquelles poussent des nodules de régénération rendent néanmoins ces analyses difficiles et le taux de fibrose reste estimé de façon assez globale. Les rats recevant une alimentation sans cuivre ont par contre maintenu un taux de fibrose constant et inférieur à 2% jusqu'à un an, et une élévation très légère au-delà mais restant inférieure à 4%. Les taux de fibrose retrouvés chez ces rats étaient identiques à ceux des rats en alimentation normale à 6 semaines, mais significativement moins élevés dès l'âge de 3 mois et jusqu'à la fin du suivi ($p \leq 0,01$). Ceci renforce les constatations faites précédemment sur l'efficacité de la déplétion en cuivre et l'importance du régime alimentaire dans la prévention de l'hépatite, non seulement aiguë mais aussi chronique, chez les rats LEC.

II.1.2 - EVALUATION DU CUIVRE ECHANGEABLE RELATIF ET DE L'ACTIVITE OXYDASE DE LA CERULEOPLASMINE COMME TESTS DIAGNOSTICS DE LA MALADIE DE WILSON

Afin de pouvoir effectuer un suivi au long cours des rats LEC traités par thérapie génique, il a été nécessaire de déterminer auparavant un certain nombre de marqueurs biologiques diagnostiques de la maladie de Wilson, fiables, non invasifs, reproductibles et facilement paramétrables. Le meilleur marqueur chez l'homme reste le dosage du cuivre hépatique sur biopsie hépatique, mais n'est en pratique pas réalisable de façon répétée chez le rat. Nous avons donc testé deux marqueurs sanguins, l'activité oxydase de la céruléoplasmine (COA) et le cuivre échangeable relatif (REC). La première est le reflet direct de la présence d'une holocéruléoplasmine fonctionnelle et stable dans le sérum, ayant incorporé des atomes de cuivre dans sa structure par l'action de la protéine ATP7B dans le foie (Laloti, Muruais et al. 2009); un taux effondré de COA est ainsi hautement prédictif de MW (Merle, Eisenbach et al. 2009). Le second, ratio du cuivre échangeable (non lié à la céruléoplasmine) sur le cuivre sérique total, est supposé être d'autant plus élevé que la proportion du CuExc au sein du cuivre total est grande, c'est à dire quand le cuivre n'est pas lié normalement à la céruléoplasmine, par déficit de fonctionnalité de la protéine ATP7B (El Balkhi, Trocello et al. 2011). Il a aussi été évalué l'intérêt du dosage du cuivre sérique total et du CuExc comme marqueurs pronostiques de MW.

II.1.2.1 - Protocole expérimental

Nous avons donc suivi durant plus de six mois trois groupes de rats, par observation clinique et prise de sang mensuelle, afin de rechercher d'éventuelles variations des marqueurs biologiques liées au sexe, à l'âge ou au poids des rats, ainsi qu'à l'état clinique de ceux-ci (pré-per- et post-hépatite aiguë).

- le groupe de rats LEC comprenait 15 rats des deux sexes, sans traitement ou régime alimentaire particulier.
- le groupe LEC+C1041 était composé de 9 rats LEC alimentés avec un régime déplété en cuivre, Altromin® C1041 (Genestil®, Royaucourt, France), contenant moins de 1 ppm de cuivre (versus 13 ppm pour un aliment standard). Cet aliment mime l'effet des sels de zinc qui préviennent l'absorption digestive du cuivre et sont utilisés comme traitement de la MW. Les valeurs trouvées dans ce groupe permettaient de bien faire la distinction entre les marqueurs dépendant du type de rat et ceux dépendant du métabolisme du cuivre ou de la survenue d'une cytolysé hépatique, puisqu'ils empêchent l'apparition de lésions d'hépatite aiguë chez les rats LEC.
- le groupe LE, composé de 6 rats Long-Evans, souche non mutée sur le gène ATP7B, qui servait de groupe contrôle.

II.1.2.2 - Suivi clinique des animaux

Le suivi clinique de ces animaux nous a tout d'abord permis d'observer l'histoire naturelle des rats LEC et d'établir un score de gravité clinique de l'hépatite aiguë (score ALF). Ainsi, deux paramètres reconnus des scores de souffrance animale, la réaction à l'intrus et l'évolution pondérale ont été gradés de zéro à 3 et 2 respectivement, et l'extension de l'ictère cutanéomuqueux de zéro à trois. L'addition de ces trois paramètres permettait ensuite de grader l'hépatite aiguë (HA) en légère, modérée ou sévère (Tableau VII). L'analyse de la survie sans HA (score ALF \geq 2) a mis en évidence la survenue d'une HA chez tous les rats du groupe LEC avant 22 semaines de vie (Figure 12), avec une médiane de survie de 13,4 semaines, et un score ALF moyen de 2,8 +/- 2,4. Aucune HA n'a été décelée dans les groupes LEC+C1041 et LE. Les courbes de survie globale, prenant en compte les décès spécifiquement liés à la survenue d'une HA, ont retrouvé un taux de survie de 70% à 30 semaines dans le groupe des LEC, et de 100% dans les deux autres groupes. Deux rats du

groupe LEC et un rat du groupe LE sont décédés de cause inconnue au cours de la même période.

Tableau VII: Critères cliniques d'évaluation de la survenue d'une hépatite aiguë et de sa sévérité chez le rat LEC.

	Aspect cutanéomuqueux	Comportement	Poids
0	rose	hyperactif	Augmentation
1	Oreilles/queue jaunes	calme	stable
2	Idem + museau	réactif aux stimuli	Diminution
3	Idem + pattes	moribond	

Score à:
 0: pas d'hépatite
 1-2: hépatite légère
 3-5: hépatite modérée
 6-8: hépatite sévère (fulminante)

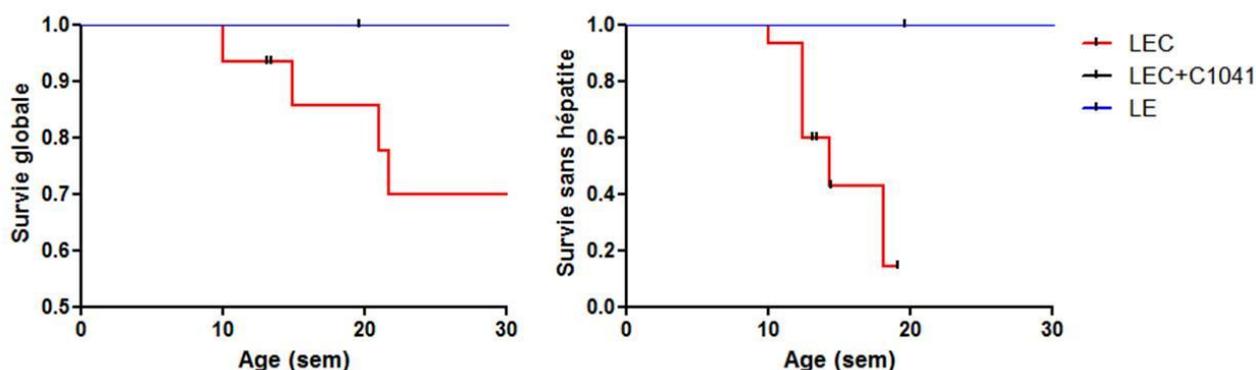


Figure 12: Courbes de survie et de survie sans hépatite aiguë (score ALF ≥ 2) à 30 semaines de vie chez les rats LEC en alimentation normale ou déplétée en cuivre, et les rats Long-Evans (LE).

II.1.2.3 - Evaluation du REC et de la COA

Tout au long du suivi, les taux de REC sont restés constants et significativement plus élevés dans les groupes de rats LEC et LEC+C1041 que dans le groupe de rats LE ($p < 0,01$). La valeur moyenne du REC était de 49,5% +/- 16,6% dans le groupe LEC et de 36,5% +/- 3,8% dans le groupe LEC+C1041, contre 8,9% +/- 1,2% dans le groupe LE. Le REC était discriminant entre les rats LEC et LE à une valeur-seuil de 19,0%, avec une sensibilité de 97,3% et une spécificité de 100% (Figure 13 et tableau VIII). Les taux de REC étaient

indépendants du sexe, du poids, de l'aliment donné aux rats LEC et du degré d'HA sous-jacente, et variaient avec l'âge, permettant d'affiner encore le diagnostic par établissement de valeurs-seuil intermédiaires avant et après 10 semaines d'âge (Schmitt, Podevin et al. 2013).

La COA a montré le même profil tout au long du suivi des animaux, avec des valeurs moyennes significativement moins élevées ($p < 0,001$) chez les rats LEC ($6,3 \pm 3,7$ U/l) et LEC+C1041 ($6,0 \pm 3,9$ U/l) que chez les rats LE ($68,7 \pm 16,6$ U/l), mais de plus grandes disparités inter- et intra-individuelles, sans lien avec sexe, poids, HA sous-jacente ou régime alimentaire. La valeur-seuil discriminant rats LEC et LE était de 27 U/l, avec une sensibilité de 96,5% et une spécificité de 90,9%. Comparés au CuT, ces deux tests présentaient une meilleure sensibilité et spécificité dans le diagnostic de MW (tableau VIII).

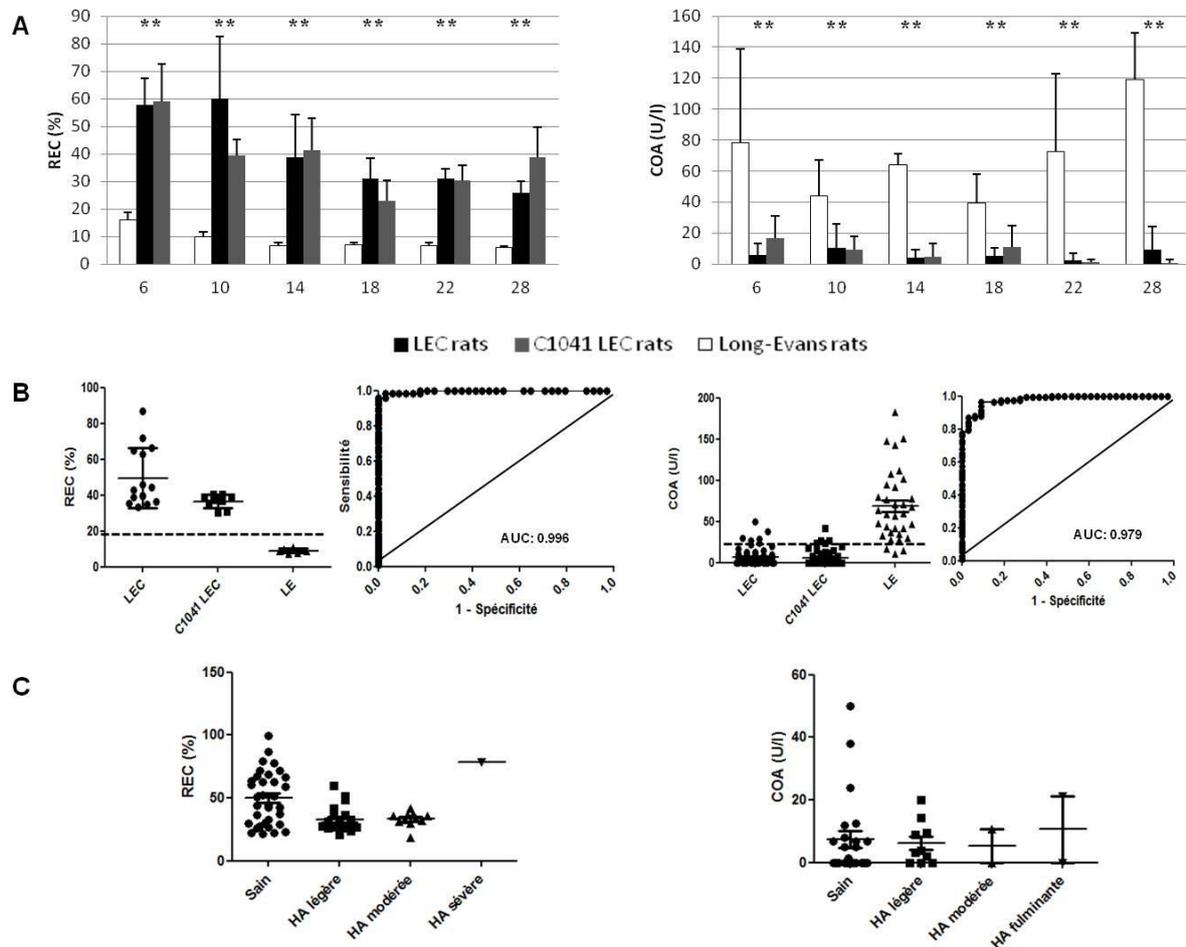


Figure 13: Evolution du cuivre échangeable relatif (REC) et de l'activité oxydase de la céruléoplasmine (COA) chez les rats LEC. **A:** Evolution au cours du temps; les valeurs sont données sous forme de moyennes et d'écart-type. La double étoile (**) indique une différence entre le groupe de LE et les groupes LEC et LEC+C1041. **B:** Moyenne des valeurs du REC et de la COA obtenues pour chaque groupe, et courbes ROC de discrimination entre rats LEC et rats LE, avec les aires sous la courbe (AUC) respectives. La valeur-seuil est indiquée par la ligne horizontale en pointillés. **C:** Evolution du REC et de la COA en fonction du degré de gravité clinique (score ALF) de l'hépatite aiguë chez les rats LEC.

Tableau VIII: Analyses par courbes ROC de marqueurs sériques de la maladie de Wilson.

Marqueur biologique	Valeur-seuil de diagnostic de MW	SE (%)	SP (%)	RVP	RVN	AUC (IC 95%)
Activité oxydase de la céruléoplasmine (COA)	< 27.2 U/l	96.6	90.6	10.3	0.04	0.979 (0.959-0.998)
Cuivre sérique total (CuT)	< 10.5 µmol/l	76.6	97.1	2.6	0.24	0.947 (0.911-0.983)
Cuivre Echangeable Relatif (REC)	> 19.0%	97.3	100	/	0.03	0.998 (0.994-1.002)

Les valeurs-seuil de chaque test sont données, ainsi que la sensibilité (SE), la spécificité (SP), les rapports de vraisemblance positif (RVP) et négatif (RVN) et l'aire sous la courbe (AUC) avec son intervalle de confiance à 95% (IC 95%).

II.1.2.4 - Conclusions

Cette première expérimentation nous a permis d'appréhender l'évolution clinique naturelle de l'HA liée à la toxicose cuprique chez le rat LEC, avec apparition de signes cliniques à un âge médian de 13,4 semaines, et un taux de mortalité de 30% dans les suites de cette première hépatite aiguë, totalement concordant avec les données publiées (Sasaki *et al.*, 1985, (Yoshida, Masuda *et al.* 1987; Masuda, Yoshida *et al.* 1988). Par rapport à ces dernières, nous avons cherché à établir un score qualitatif permettant d'évaluer la gravité de l'atteinte hépatique et d'effectuer un suivi clinique simple et reproductible des animaux (Tableau VII) (Schmitt, Podevin *et al.* 2013). Le suivi biologique de ces animaux comparés à des rats LE nous a également permis d'authentifier deux marqueurs de diagnostic de la MW chez les rats LEC, le REC et la COA, qui ont tous deux une sensibilité et une spécificité supérieures à 90%. Le premier a été mis en évidence en 2011 par El Balkhi *et al.* chez des patients atteints de la MW, et il constitue, avec une spécificité et une sensibilité de 100%, un marqueur diagnostic supérieur à ceux utilisés actuellement (El Balkhi, Trocello *et al.* 2011). La seconde n'est pas utilisée actuellement en clinique, mais il a été démontré qu'elle possédait une sensibilité et surtout une spécificité diagnostique supérieure au dosage sérique de la céruléoplasmine (Merle 2009), en particulier en cas de pathologie hépatique sous-jacente. Nos données confirment tout l'intérêt de ces deux dosages chez le rat LEC également, et ont permis de définir des valeurs-seuil stables pour le REC (19%) et la COA (27 U/l), quels que soient l'âge, le sexe, le poids ou l'existence de lésions hépatiques sous-jacentes. Ces résultats ont été publiés en 2013 dans un article de PloS One, présenté en Annexe 1 (Schmitt, Podevin *et al.* 2013).

II.1.3 - EVALUATION DES MARQUEURS BIOLOGIQUES D'HEPATITE AIGUË CHEZ LE RAT LONG-EVANS CINNAMON

II.1.3.1 - Evaluation au cours de l'hépatite aiguë naturelle du rat LEC

Pour le diagnostic biologique d'hépatite aiguë, les transaminases hépatiques, la bilirubine, les lactate déshydrogénases (LDH) et les taux de cuivre dans le sang ont été évalués chez les rats LEC en alimentation normale avant, pendant et après la survenue de signes cliniques d'hépatite aiguë tels que caractérisés dans le tableau IX. Les taux d'ASAT et d'ALAT s'élevaient à 2-3 fois la normale en cas d'hépatite aiguë (10,97 +/- 3,45 μ kat/l vs 4,18 +/- 2,75 μ kat/l, $p < 0.001$ et 9,12 +/- 3,05 μ kat/l vs 4,08 +/- 3,90 μ kat/l, $p < 0.001$, respectivement), mais il n'y avait pas de différence entre les grades léger et modéré d'hépatite aiguë. La bilirubinémie s'est avérée plus discriminante, avec une augmentation progressive des valeurs corrélée au grade clinique de sévérité de l'hépatite (valeurs moyennes à 2.7, 18.9, 51.3 and 608 μ mol/l respectivement pour les 4 grades de sévérité décrits, $p < 0.001$). Le cuivre sérique total et surtout le CuExc montraient la même évolution que la bilirubinémie (Figure 14). Nous avons cherché à évaluer le CuExc comme marqueur pronostic d'atteinte hépatique sévère, mais les taux de CuExc juste avant le début des signes cliniques n'étaient pas différents de ceux retrouvés hors atteinte hépatique (1.63 +/- 1.62 μ mol/l versus 2.28 +/- 1.03 μ mol/l, $p = 0.22$). Par contre, les LDH n'ont pas montré d'intérêt chez le rat LEC pour la surveillance de l'hépatite aiguë, contrairement à ce qui avait été antérieurement décrit (Suzuki, Kanno et al. 1995). Des valeurs-seuil de diagnostic d'hépatite aiguë ont pu être déterminées par analyses en courbes ROC; les sensibilités, spécificités et aires sous la courbe respectives sont récapitulées dans le tableau IX.

Tableau IX: Résultats des analyses par courbes ROC des marqueurs biologiques d'hépatite aiguë chez le rat Long-Evans Cinnamon.

Marqueur biologique	Valeur-seuil de diagnostic d'hépatite aiguë	SE (%)	SP (%)	RVP	RVN	AUC (IC95%)
ASAT	> 8.5 μ kat/l	69.2	96.8	21.63	0.32	0.906 (0.831-0.981)
ALAT	> 5.3 μ kat/l	81.3	71	2.80	0.26	0.881 (0.702-0.919)
Bilirubinémie	> 8.5 μ mol/l	75	100	/	0.25	0.938 (0.882-0.994)
Cuivre Echangeable (CuExc)	> 2.8 μ mol/l	84.4	70.6	2.87	0.22	0.837 (0.740-0.934)

Les valeurs-seuil de chaque test sont données, ainsi que la sensibilité (SE), la spécificité (SP), les rapports de vraisemblance positive (RVP) et négative (RVN) et l'aire sous la courbe (AUC) avec son intervalle de confiance à 95% (IC 95%).

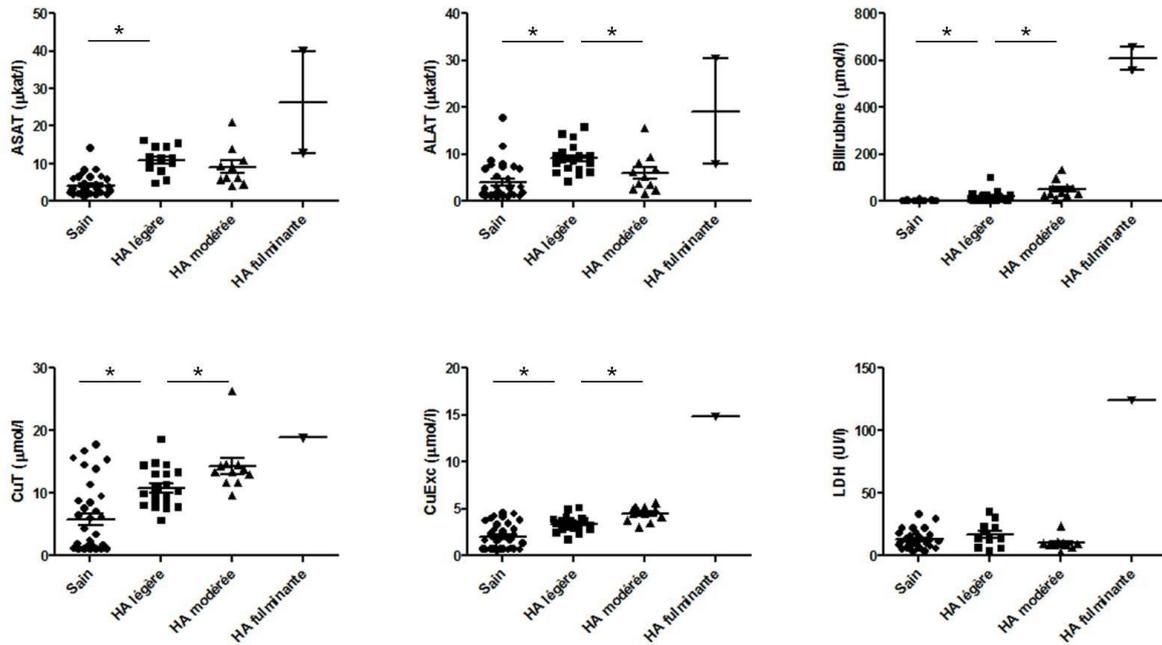


Figure 14: Evolution des marqueurs sériques en fonction du grade de sévérité de l'hépatite aiguë. Les valeurs sont rapportées, de même que la moyenne du groupe et les écart-type. L'étoile (*) représente une augmentation statistiquement significative ($p < 0,05$) du taux du marqueur sérique entre deux grades de sévérité d'hépatite.

II.1.3.2 - Hépatite aiguë chez le rat Long-Evans Cinnamon et traitements médicamenteux de la maladie de Wilson

Afin de pouvoir par la suite utiliser comme rats témoins d'efficacité thérapeutique des rats LEC sous traitements médicamenteux de la MW (gold standard actuel en pathologie humaine) et pour valider définitivement les marqueurs biologiques utilisés, nous avons formé des groupes de rats des deux sexes que nous avons soumis à un traitement quotidien par acétate de zinc ou chélateurs du cuivre (D-pénicillamine et trientine). Tous les rats ont débuté le traitement avant l'apparition des premiers signes cliniques d'hépatite aiguë. Une première phase de deux mois nous a permis d'évaluer la tolérance des rats au médicament, et d'ajuster éventuellement leurs posologies, déterminées d'après les données actuelles de la littérature:

- D-pénicillamine: 100 mg/Kg/j en gavage (Roy, Sen et al. 2010; Domingo, Gomez et al. 1998)
- Trientine dihydrochloride: 1500 mg/l/j, dilué dans l'eau de boisson (Sone, Maeda et al. 1996)
- Acétate de zinc: 50 mg/j en gavage (Medici, Sturniolo et al. 2005)

Au cours de cette première phase et pour éviter toute confusion clinique avec la survenue d'une hépatite toxique liée à la MW, les rats ont reçu l'aliment sans cuivre Altromin® C1041. La seconde phase du protocole servait à étudier l'efficacité des traitements sur la survenue d'hépatite aiguë et les lésions de fibrose au sacrifice. Pour cela, tous les rats ont été placés cette fois sous alimentation normale (Figure 15). Comme précédemment, les transaminases hépatiques, la bilirubine, la COA, le REC et le CuEXC ont été régulièrement dosés, et les traitements ont été arrêtés après deux mois chez la moitié des rats survivants de chaque groupe afin d'étudier l'influence des traitements médicamenteux sur la variabilité de ces marqueurs. Ceci afin de valider le REC et la COA comme marqueurs de MW même chez des personnes déjà sous traitement, et d'évaluer l'intérêt du CuExc comme marqueur précoce de bonne ou mauvaise observance au traitement.

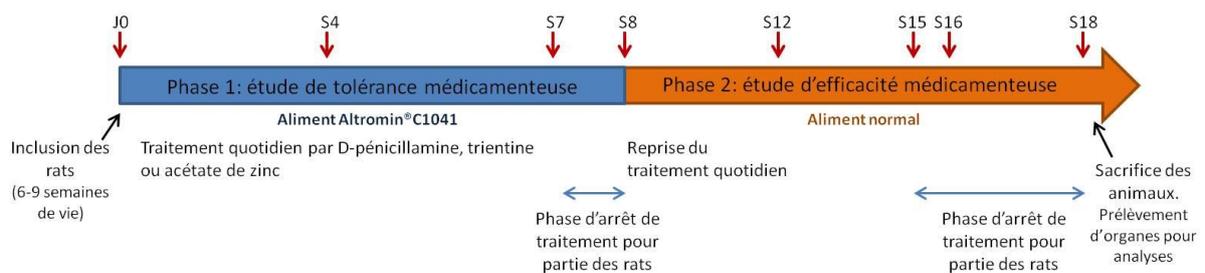


Figure 15: Chronogramme du protocole d'étude des traitements médicamenteux de la maladie de Wilson chez le rat LEC. Les flèches rouges représentent les prises de sang avec la date exprimée en jours du protocole (J) puis en semaines (S).

Au cours de la phase 1 de tolérance, l'acétate de zinc et la trientine ont été bien supportés à la dose administrée, alors que les rats sous D-pénicillamine ont présenté dès la 2ème semaine de traitement des saignements diffus des muqueuses qui nous ont obligé à réaliser une fenêtre thérapeutique d'une semaine avec de reprendre le traitement à demi-dose. Ceci est probablement lié à une thrombopénie médicamenteuse, effet secondaire décrit avec la D-pénicillamine, mais n'a pas pu être vérifié par un dosage des plaquettes, une prise de sang étant potentiellement fatale aux animaux en raison de l'absence de coagulation correcte. Dans les trois groupes la prise de poids, témoin de bonne santé, a été constante et identique à celle du groupe témoin recevant le même aliment mais aucun traitement médicamenteux.

Au cours de la deuxième phase de l'expérimentation, l'alimentation des rats a été normalement dosée en cuivre. Sous ce régime les rats, âgés de plus de 16 semaines, développent une hépatite aiguë dans le mois qui suit l'arrêt de l'aliment sans cuivre, permettant d'apprécier l'efficacité thérapeutique des médicaments administrés. Les rats sous D-pénicillamine à demi-dose initiale (n=5) sont tous décédés d'hépatite aiguë en moins de 4 semaines, et ceux sous acétate de zinc (n=9) ont présenté des signes d'hépatite aiguë et un taux de mortalité de 50%, comparables à celui des rats témoins (n=3) quoique significativement retardés dans le temps de 3 semaines environ (p=0,002). Seuls les rats sous trientine (n=10) n'ont pas présenté d'effet secondaire au traitement et ont pu aller jusqu'au bout du protocole défini (Figure 16), avec une médiane de survie sans hépatite aiguë ($ALF \geq 3$) de 83% et de survie globale de 90% en fin d'expérimentation, significativement supérieures aux autres groupes (p<0,001 et p=0,012 respectivement).

Au sacrifice ou à l'autopsie, le foie, le rein et le cerveau des rats ont été prélevés pour analyser leur teneur en cuivre. Il a été retrouvé des taux inférieurs de cuivre dans le foie et le rein des rats traités par trientine comparés aux groupes contrôle et acétate de zinc (Figure 17), mais les taux de cuivre dans le cerveau étaient très faibles (environ 0,20 $\mu\text{mol/g}$) et équivalents dans les trois groupes. Ainsi, la valeur médiane du cuivre hépatique était de 6,04 $\mu\text{mol/g}$ [3,34 - 9,07 $\mu\text{mol/g}$] dans le groupe trientine, contre 9,5 [5,9 - 12,7 $\mu\text{mol/g}$] et 9,3 [5,9 - 14,1 $\mu\text{mol/g}$] respectivement dans les groupes acétate de zinc et contrôle (p = 0,026), et celle du cuivre rénal après trientine de 2,42 $\mu\text{mol/g}$ [0,92 - 7,87 $\mu\text{mol/g}$] versus 4,3 $\mu\text{mol/g}$ [1,6 - 19,9 $\mu\text{mol/g}$] et 7,84 $\mu\text{mol/g}$ [3,76 - 14,97 $\mu\text{mol/g}$], témoin d'une plus grande filtration rénale de ce minéral dans les groupes acétate de zinc et contrôle (p = 0,028).

Sur les biopsies hépatiques réalisées, au sacrifice ou au décès spontané, le degré de fibrose hépatique du foie des rats a été analysé par quantification semi-automatique (Figure 18). Il a été retrouvé un taux médian de fibrose de 2,04% [1,36 - 3,29] dans le groupe trientine, significativement moins élevé que dans le groupe contrôle (3,55% [2,69 - 8,42], p = 0,02) et que celui attendu pour des rats du même âge (7,02% [3,8 - 17,3], p = 0,0002, voir ci-dessous, chap. II.1.3). De même, le taux médian de fibrose du groupe acétate de zinc était de 2,01% [1,41 - 2,44], significativement inférieur à celui attendu en cas d'inefficacité du traitement (p=0,0004) et à celui du groupe contrôle (p = 0,016). Dans le groupe D-pénicillamine, le taux de fibrose de 2,52% [2,0 - 3,0] n'était différent ni du groupe contrôle,

ni des deux autres groupes traités, mais les rats étaient plus jeunes d'un ou deux mois au moment du décès par HA.

Pour quantifier la sévérité de l'hépatite aiguë, les transaminases hépatiques (ASAT et ALAT), la bilirubine et le CuExc ont été régulièrement dosés (Figure 19). Toutes ces valeurs étaient normales au moment du passage sous alimentation normale (M2), et se sont franchement élevées dès le premier mois (M3) dans le groupe témoin, passant au-dessus des seuils pathologiques. A ce terme, aucun marqueur d'hépatite n'était élevé dans les groupes trientine et acétate de zinc, et seules les ALAT étaient augmentées dans le groupe d-penicillamine (valeur médiane: 10,32 $\mu\text{kat/l}$). A plus long terme (M4), seules les ASAT présentaient une valeur pathologique (6,5 $\mu\text{kat/l}$) dans le groupe trientine, alors que les transaminases étaient plus généralement élevées dans le groupe acétate de zinc (ASAT: 11,1 $\mu\text{kat/l}$, ALAT: 10,7 $\mu\text{kat/l}$) et que les 4 marqueurs étaient tous élevés dans le groupe contrôle.

L'évolution des valeurs du CuExc lors de l'arrêt du traitement n'a pu être testée que dans le groupe trientine du fait de la mortalité présente dans les autres groupes de rats. La moitié des rats a continué à recevoir la même dose de trientine, alors que l'autre moitié n'a plus reçu de traitement. Les valeurs médianes de CuExc étaient comparable à l'arrêt du traitement, et ont augmenté de façon précoce (dès 7 jours) dans le groupe sans traitement pour atteindre 2,71 $\mu\text{mol/l}$ et rester au niveau du seuil pathologique de 2,85 $\mu\text{mol/l}$ à un mois. Au contraire, les valeurs médianes du CuExc dans le groupe qui a continué à recevoir la trientine sont passées de 2,02 $\mu\text{mol/l}$ à 2,11 $\mu\text{mol/l}$ après 7 jours et 1,72 $\mu\text{mol/l}$ après un mois. Néanmoins, la différence entre ces deux groupes n'était significative à aucun de ces deux points de suivi et n'a pas permis de conclure à l'utilité du CuExc comme marqueur précoce de mauvaise compliance au traitement.

Enfin, le REC et la COA ont été quantifiés au cours du suivi des animaux, pour rechercher l'existence d'un impact potentiel des traitements médicamenteux pris sur leur efficacité en tant que marqueurs diagnostiques de la maladie de Wilson. Les valeurs obtenues dans les groupes de rats traités ont été comparées à celles des rats Long-Evans appariés pour l'âge (Figure 20). A tous les points du suivi, le REC et la COA sont restés dans des valeurs pathologiques dans tous les groupes de rats LEC traités ou non, alors que ces deux marqueurs avaient des valeurs normales chez les rats Long-Evans.

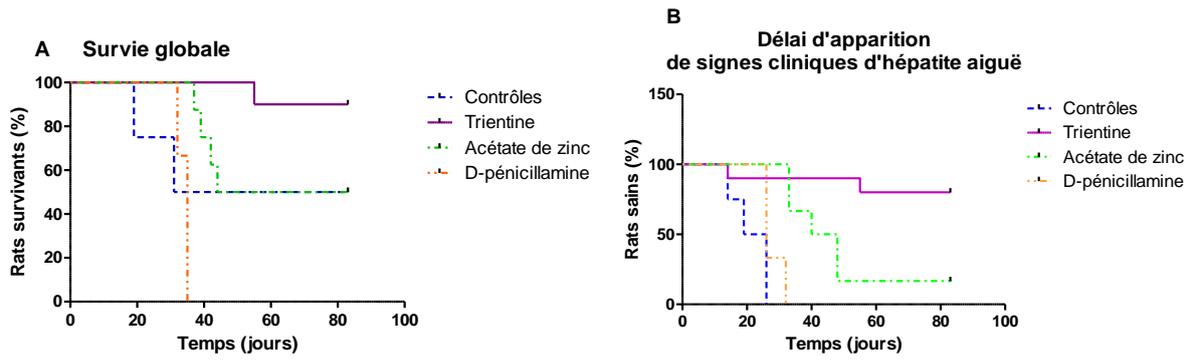


Figure 16: Evolution clinique des différents groupes de rats sous traitements médicamenteux de la maladie de Wilson. 4A: survie globale à l'arrêt de l'aliment Altromin® C1041 sans cuivre; 4B: délai d'apparition des signes cliniques d'hépatite aiguë après arrêt de l'aliment C1041 pour un score ALF \geq 3 (Schmitt, Podevin et al. 2013).

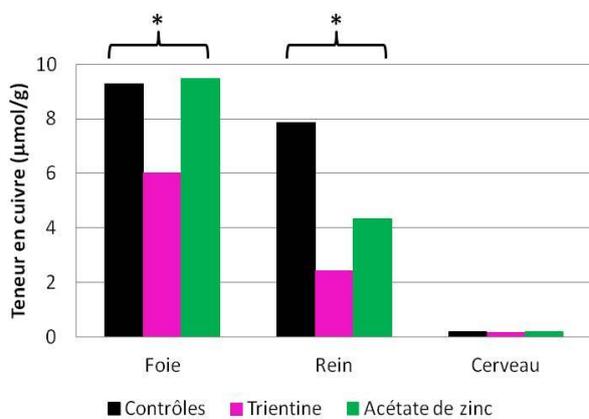


Figure 17: Teneur en cuivre du foie, du rein et du cerveau des rats LEC au sacrifice, après traitement par trientine ou acétate de zinc, comparés au groupe contrôle. * = différence significative entre les trois groupes.

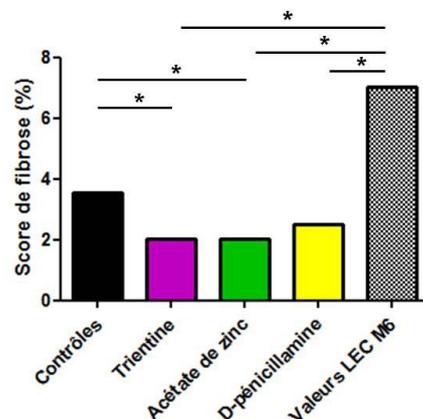


Figure 18: Médianes des aires de fibrose au sacrifice à 6 mois de vie des rats LEC traités par D-pénicillamine, trientine ou acétate de zinc, comparées au groupe contrôle et aux valeurs retrouvées chez des rats LEC du même âge. * = différence statistiquement significative.

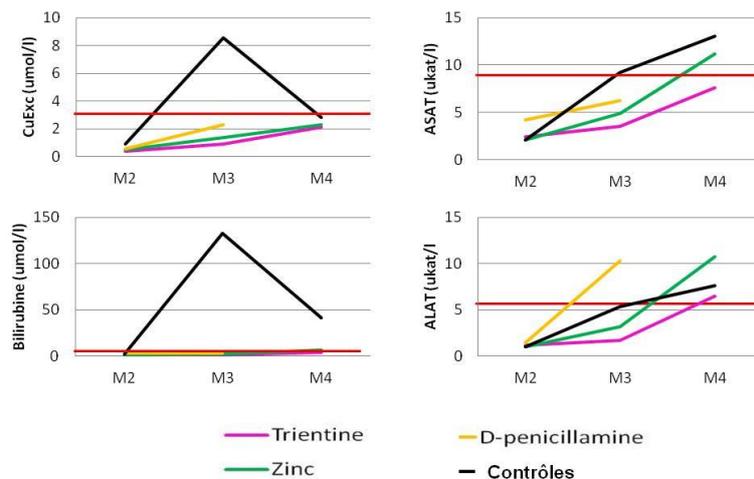


Figure 19: Evolution des valeurs médianes des marqueurs biologiques d'hépatite aiguë des différents groupes de rats sous traitements de la maladie de Wilson après arrêt de l'aliment Altromin® C1041. La barre rouge représente la valeur seuil de pathologie.

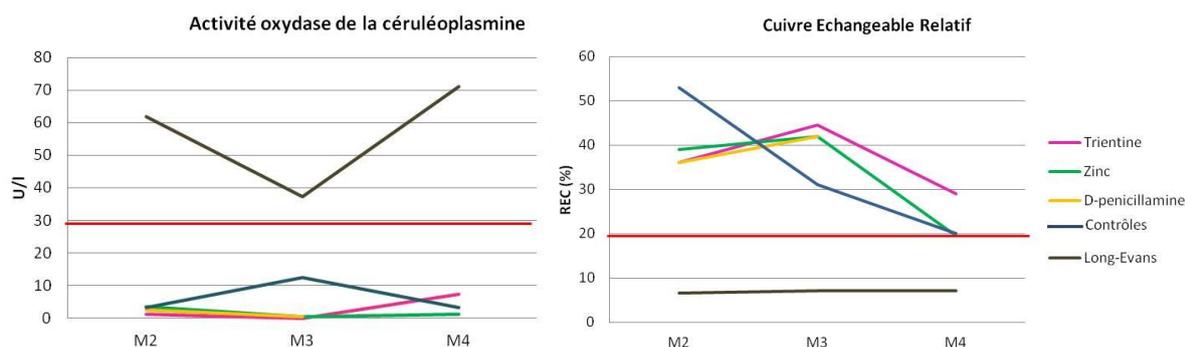


Figure 20: Evolution des valeurs médianes des marqueurs sériques diagnostiques de maladie de Wilson chez les rats LEC, sans ou avec traitements médicamenteux, comparés à des rats Long-Evans normaux. Les valeurs seuil entre rats LEC et rats LE ont été représentées par une ligne rouge pour la COA (27U/l) et le REC (19%).

II.1.3.3 - Conclusions

Comme pour les marqueurs sériques diagnostiques de MW, le suivi à moyen terme de rats LEC en alimentation normale ou déplétée en cuivre (Altromin® C1041) nous a permis d'établir des valeurs de référence pour le diagnostic biologique d'hépatite aiguë, en prenant en compte les transaminases hépatiques, la bilirubine et le CuExc, et de proposer une échelle de valeurs de ces paramètres en fonction de l'intensité de l'HA sous-jacente.

Afin de vérifier la solidité de ces résultats, nous avons testées ensuite chez des rats LEC l'efficacité thérapeutique des trois médicaments connus dans la MW, à des doses ayant été précédemment utilisées avec succès dans la littérature (Sone, Maeda et al. 1996; Medici, Sturniolo et al. 2005; Roy, Sen et al. 2010). Ceci nous a permis de démontrer l'intérêt du traitement par trientine chez les rats LEC, qui a été à la fois le traitement le plus efficace et le mieux toléré au long cours. Dans ces groupes de rats, la bonne corrélation entre la survie et la survie sans HA et l'élévation des marqueurs sanguins d'HA (transaminases, bilirubine et CuExc) a pu être établie, de même qu'avec la concentration en cuivre dans le foie et l'extension de la fibrose hépatique au sacrifice. Cette expérimentation a aussi confirmé la possibilité d'utiliser le REC et la COA comme tests diagnostics simples et fiables de la MW même chez des animaux déjà sous traitements médicamenteux, mais la possibilité de l'utilisation du CuExc comme marqueur précoce de mauvaise compliance au traitement de la MW n'a pas pu être confirmée.

II.2 - THERAPIE GENIQUE IN VIVO

II.2.1 - ÉTABLISSEMENT D'UNE COURBE DOSE-REPONSE PAR INJECTION SYSTEMIQUE DE VECTEUR LENTIVIRAL

Afin de pouvoir évaluer rapidement la dose optimale de VL à administrer chez le rat, il a été nécessaire d'établir une courbe de corrélation entre la dose de VL injectée par voie systémique et la réponse obtenue en terme de transduction hépatocytaire.

II.2.1.1 - Protocole expérimental

Sept groupes de 6 rats Long Evans âgés de 4 semaines ont été injectés par la veine de la queue avec une solution de VL codant pour la GFP (CCLsin.PPT.Enh1mTTR.eGFP.Wpre.142-3pT). Les doses de VL allaient de zéro particules infectieuses par gramme de rat ((pi/g), groupe contrôle injecté avec du PBS seul) à 2.10^8 pi/g. Le protocole expérimental et le détail des groupes de rats sont présentés dans la figure 21. L'efficacité de transduction hépatique a été évaluée à 10 jours et deux mois de l'injection du VL par qPCR et immuno-histochimie anti-GFP sur le tissu hépatique. La tolérance à la procédure a été évaluée par dosage des transaminases hépatiques à 24 heures et surveillance clinique de la prise de poids, et l'immunisation contre la GFP par recherche d'anticorps anti-GFP dans le sérum des rats par technique ELISA à un mois.

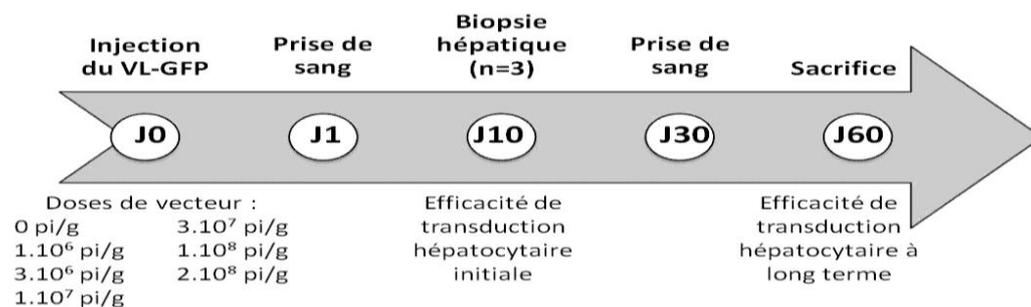


Figure 21: Protocole expérimental de la réalisation d'une courbe dose-réponse après injection systémique d'un vecteur lentiviral (VL) codant pour la GFP chez le rat Long-Evans. L'efficacité de transduction hépatique a été évaluée à 10 jours et deux mois par qPCR et immuno-histochimie anti-GFP sur le tissu hépatique. La tolérance à la procédure a été évaluée par dosage des transaminases hépatiques à 24 heures, et l'immunisation contre la GFP par recherche d'anticorps anti-GFP dans le sérum des rats par technique ELISA à un mois.

II.2.1.2 - Tolérance à la procédure et au vecteur

Il n'y a eu aucun décès post-injection ni au cours du suivi des rats. Aucun signe de souffrance clinique n'a été mis en évidence et la croissance pondérale des animaux ayant reçu le VL a été équivalente à celle du groupe contrôle (Figure 22A). Les valeurs basales moyennes des transaminases à J0 étaient comprises entre 2,7 et 3,2 $\mu\text{kat/l}$ pour les ASAT et 1,2 - 1,6 $\mu\text{kat/l}$ pour les ALAT (Figure 22B). Il n'a pas été constaté d'élévation significative et supérieure au seuil de pathologie des transaminases à J1 dans tous les groupes ayant reçu du VL, avec une valeur moyenne maximale des ASAT de 5,4 \pm 2,9 $\mu\text{kat/l}$ et des ALAT de 1,7 \pm 0,5 $\mu\text{kat/l}$ pour le groupe avec la dose de 2.10^8 pi/g, comparable aux valeurs du groupe contrôle (ASAT = 3,9 \pm 1,6 $\mu\text{kat/l}$ et ALAT = 1,7 \pm 0,4 $\mu\text{kat/l}$, NS).

Comme attendu, il n'a été retrouvé aucun anticorps anti-GFP dans le sérum des rats contrôle injectés avec du PBS sans VL. Tous les groupes de rats ayant reçu du VL-GFP ont développé des anticorps anti-GFP, à des taux corrélés positivement avec la dose de VL injectée (Figure 23). Les taux d'anticorps anti-GFP retrouvés étaient significativement supérieurs aux valeurs du groupe contrôle pour les groupes de rats ayant eu une dose supérieure ou égale à 1.10^7 pi/g aux dilution $1/50^{\text{ème}}$ et $1/1000^{\text{ème}}$ ($p < 001$), avec un effet de saturation pour les doses supérieures à 3.10^7 pi/g.

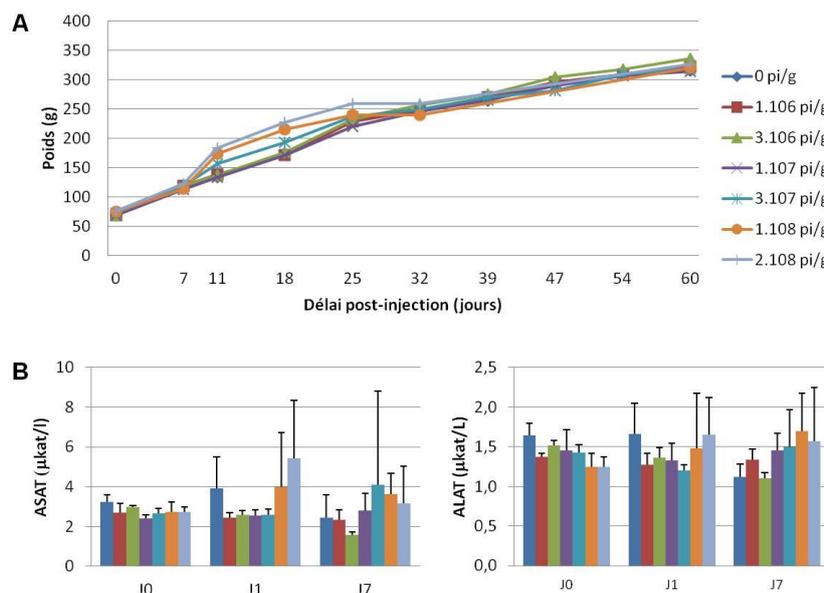


Figure 22: Tolérance clinico-biologique à l'injection de doses croissantes de vecteur lentiviral codant pour la GFP par la veine de la queue. A: évolution du poids des différents groupes de rats. B: Valeur moyenne des transaminases hépatiques avant, le lendemain et une semaine après injection du vecteur lentiviral.

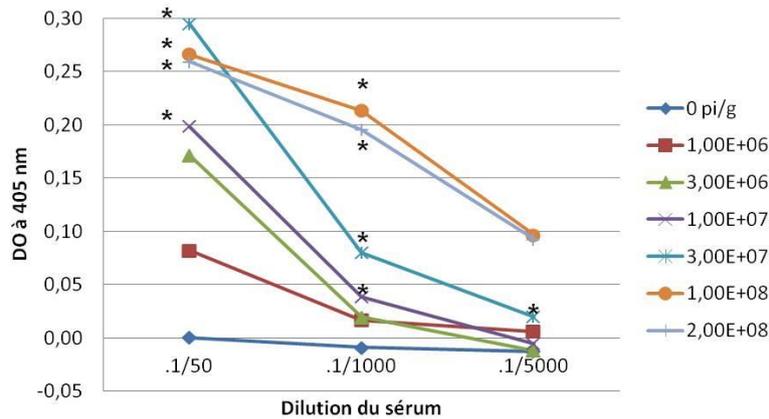


Figure 23: Recherche d'anticorps anti-GFP dans le sérum des rats à un mois post-injection par technique ELISA. Les étoiles (*) représentent les valeurs significativement plus élevées que dans le groupe contrôle.

II.2.1.3 - Efficacité de transduction hépatocytaire

A dix jours post-injection, 3 rats par groupe ont eu une biopsie hépatique pour pouvoir quantifié le nombre de copies du VL présentes en qPCR ainsi que le taux d'hépatocytes transduits exprimant la protéine GFP en immuno-histochimie. Le nombre moyen de copies de vecteur par génome haploïde (cv/gh) a été très faible quoique croissant avec les doses de VL de 1.10^6 pi/g à 1.10^7 pi/g, restant constamment inférieur à 0,001 cv/gh (Figure 24A). Pour les doses de 3.10^7 pi/g à 2.10^8 pi/g, la quantité de vecteur a été plus forte, avec une croissance exponentielle des valeurs moyennes obtenues (respectivement $0,20 \pm 0,31$ cv/gh; $1,99 \pm 3,2$ cv/gh et $0,61 \pm 0,22$ cv/gh), mais avec de très grandes disparités inter-individuelles. Seul le groupe des rats injectés à la dose de 3.10^7 pi/g avait un nombre de copies de vecteur significativement supérieur à celui du groupe contrôle ($p = 0,027$). Les résultats ont été similaires en analyse de l'expression hépatocytaire de la protéine GFP (Figure 24B), avec un taux quasiment nul et constant de cellules GFP-positives pour les doses de 1.10^6 pi/g à 1.10^7 pi/g (valeurs moyennes respectives $0,22 \pm 0,23\%$; $0,30 \pm 0,27\%$ et $0,25 \pm 0,21\%$). Pour les doses supérieures ou égales à 3.10^7 pi/g, le taux de transduction s'est élevé à respectivement $15,8 \pm 20,0\%$, $27,0 \pm 37,5\%$ et $41,9 \pm 18,0\%$, avec là encore de très grandes disparités entre les animaux. Ces résultats n'étaient pas significativement différents entre eux ou avec le groupe contrôle au seuil statistique α de 0,05. Il a cependant été retrouvé une relation polynomiale de degré 2 entre la dose de VL administrée et le taux de transduction hépatocytaire.

II.2.1.4 - Maintien de l'expression de la GFP à long terme

Au sacrifice à deux mois, le nombre de cv/gh était resté globalement stable dans les groupes ayant reçu une dose de vecteur $< 1.10^8$ pi/g, ainsi que pour le groupe à 2.10^8 pi/g (0,52 +/- 0,20 cv/gh versus 0,61 +/- 0,22 cv/gh). Il y avait une diminution de 66% de la valeur moyenne du nombre de cv/gh dans le groupe injecté à 1.10^8 pi/g (0,93 +/- 1,11 cv/gh) mais cette baisse n'était pas statistiquement significative (Figure 24C). L'analyse immunohistochimique sur coupe en paraffine de l'expression protéique de la GFP a retrouvé des valeurs stables autour de 0,25% de cellules positives (Figure 24D). Il a par contre été constaté une diminution très importante de l'expression de la GFP à la dose de vecteur de 3.10^7 pi/g, qui est passée de 15,82 +/- 20,1% à 2,12 +/- 4,56% (NS). Il n'a pas été retrouvé de cellule positive sur l'ensemble des coupes de foie des deux doses de vecteurs supérieures.

II.2.1.5 - Conclusions

Ces résultats ont mis en évidence l'existence d'une relation non linéaire entre la dose de vecteur administrée par voie systémique et le taux d'expression de la protéine GFP dans le foie. Ils ont prouvé la nécessité d'utiliser de fortes doses de vecteurs pour obtenir un taux de transduction initial satisfaisant par cette voie d'injection, exposant par là-même les animaux à un risque de toxicité directe du fait des forts volumes de solution lentivirale administrées, qui contiennent des débris cellulaires et protéiques pouvant induire une réponse immunitaire non spécifique directe (Podevin, Otta et al. 2004). Cependant, aux doses employées au cours de cette expérimentation, il n'a pas été mis en évidence de réaction adverse à l'injection (signes de souffrance animale, décès par choc toxique, élévation des transaminases hépatiques). Il n'a pas été retrouvé de corrélation entre les résultats obtenus en qPCR et en immunohistochimie à J10; ceci pourrait s'expliquer en partie par le faible nombre de prélèvements de foie effectués à cette date, rendant les résultats plus difficiles à exploiter du fait de grandes disparités interindividuelles, mais aussi parce qu'il peut persister dans les cellules des copies de VL non intégrées dans l'ADN-hôte. Cette relation n'a pas été retrouvée à moyen terme non plus où, malgré la persistance d'un nombre quasiment constant de cv/gh, il n'a plus été observé d'expression de la protéine GFP en immunohistochimie aux fortes doses de vecteur administrées. Il ne semble pas que cette perte d'expression soit due à une réaction spécifique dirigée contre le transgène, surtout dans la mesure où le plasmide d'expression intègre des séquences-cible du miR142-3p inhibant l'expression de la GFP dans les cellules de Küpfer

(Brown, Cantore et al. 2007), et où les taux d'anticorps retrouvés dans le sérum à un mois restent faibles, mais ceci pourrait potentiellement être lié à une extinction du promoteur mTTR.

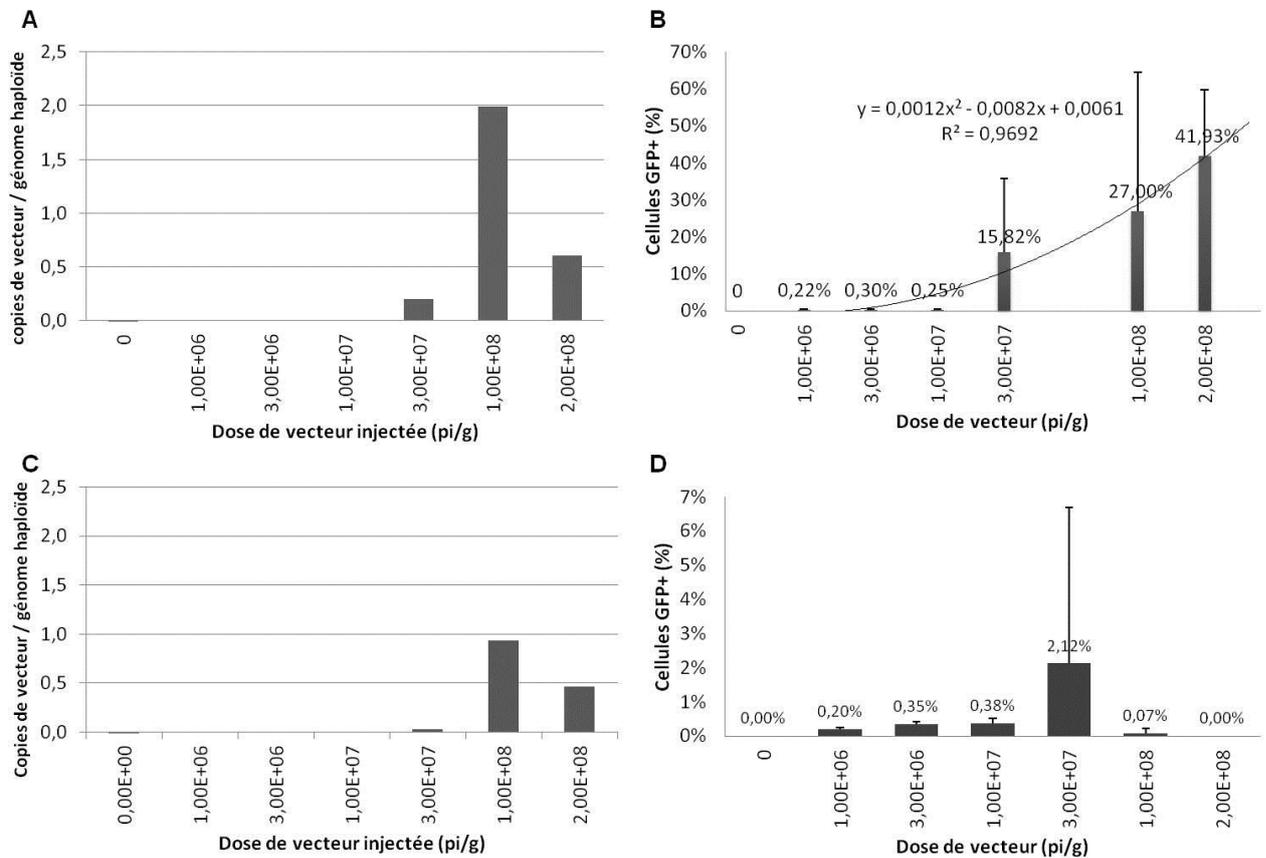


Figure 24: Efficacité initiale de transduction hépatocytaire après injection systémique d'un vecteur lentiviral codant pour la GFP à doses croissantes à dix jours et deux mois de l'injection. **A:** Evaluation du nombre de copies de vecteur présentes dans le foie en qPCR à J10. **B:** Expression de la protéine GFP par les hépatocytes en immunohistochimie sur biopsie hépatique à J10. **C:** Evaluation du nombre de copies de vecteur présentes dans le foie en qPCR à 2 mois. **D:** Expression de la protéine GFP par les hépatocytes en immunohistochimie sur biopsie hépatique à 2 mois.

II.2.2 - AMELIORATIONS DE LA TECHNIQUE CHIRURGICALE D'INJECTION DU VECTEUR LENTIVIRAL EN HYPERPRESSION DANS UN FOIE ISOLE

II.2.2.1 - Lavages hépatiques et immunisation contre la protéine d'enveloppe du vecteur lentiviral

La technique chirurgicale LIL d'injection du vecteur lentiviral en hyperpression dans un foie isolé de la circulation sanguine (Dariel, Nguyen et al. 2009; Schmitt, Flageul et al.

2010) a pour but d'améliorer l'efficacité de transduction des hépatocytes en forçant l'ouverture des fenestrations endothéliales des sinusoides hépatiques de manière mécanique et de limiter l'effet de dissémination extra-hépatique en concentrant la solution lentivirale dans l'organe-cible. Un moyen additionnel de prévenir et limiter le relargage du vecteur dans la circulation systémique après le déclampage du foie pourrait être de laver le foie avec un soluté de type sérum physiologique avant de rétablir le flux sanguin. Par ailleurs, il existe chez les primates, et donc chez les humains, une immunité innée contre la protéine d'enveloppe du vecteur lentiviral utilisé, la protéine du Virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSVg) (Sandrin, Boson et al. 2002). Cette réaction, qui serait médiée au moins pour part par le système du complément (DePolo, Reed et al. 2000), inhiberait l'efficacité de transduction du vecteur lentiviral dès qu'il entre en contact avec le sérum. Pour contrer ce phénomène, le LIL pourrait avoir deux avantages: celui de 1) diminuer la quantité de sérum entrant en contact avec la solution virale par l'injection dans un système clos restreint, et 2) permettre par un lavage du foie préalable à l'injection du vecteur de diluer au maximum le sérum présent dans cet organe.

II.2.2.1.1 - Protocole expérimental

Un modèle de rat pré-immunisé contre le vecteur lentiviral a donc été créé, par une première injection intra-veineuse d'un VL codant pour un transgène différent de la GFP (n=10). Après vérification de l'existence d'anticorps neutralisants dirigés contre la VSVg, ces rats ont été injectés avec du VL codant pour la GFP ($2.10E+07$ TU/g) soit par la veine porte, soit en LIL soit en LIL avec lavages pré- et post-infusion du vecteur (n = 3 par groupe). Des groupes contrôles de rat non pré-immunisés contre la VSVg ont été également injectés selon les trois mêmes voies d'abord. Les rats ont ensuite été sacrifiés dix jours plus tard, et le taux de transduction hépatocytaire a été évalué comme précédemment par qPCR et immunohistochimie anti-GFP sur coupes de foie. La dissémination virale extra-hépatique a été quantifiée par virémie au déclampage et qPCR à la recherche d'ADN de vecteur dans le rein, la rate et les testicules au sacrifice. Le protocole expérimental est récapitulé sur le chronogramme de la figure 25.

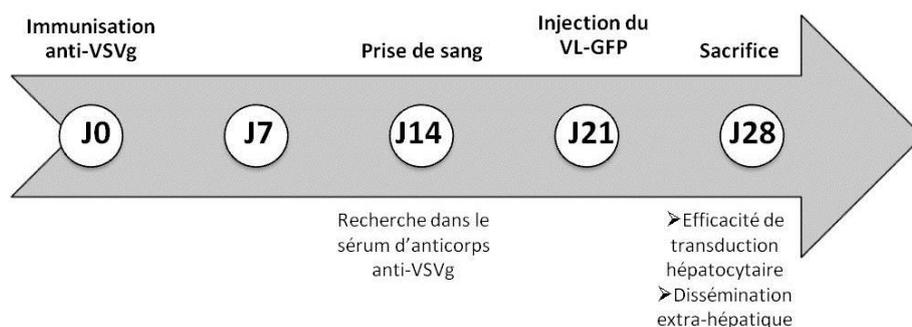


Figure 25: Chronogramme de l'injection de vecteur lentiviral codant pour la GFP (VL-GFP) après immunisation préalable contre la protéine d'enveloppe VSVg.

II.2.2.1.2 - Validation de l'immunisation anti-VSVg

La cinétique de la synthèse des anticorps anti-VSVg chez le rat avait été précédemment établie et les anticorps étaient détectables dès le 14^{ème} jour après injection systémique d'un VL. Chez les 10 rats pré-immunisés (rats I+), des anticorps anti-VSVg ont effectivement été détectés dans le sérum à J14 en ELISA, quelle que soit la dilution du sérum utilisée (Figure 26A), à des taux équivalents à ceux des rats contrôle positif, et supérieurs à ceux des rats non immunisés (I-; $p < 0,001$). Le pouvoir neutralisant de ces anticorps sur la transduction par les VL a été testé par infection de cellules Huh7 avec un milieu contenant du VL codant pour la GFP préalablement incubé avec du sérum des rats. L'analyse en cytométrie de flux après 4 jours de culture a retrouvé un taux moyen de transduction des cellules de 98,3 +/- 0,8% lorsque le VL avait été mis en contact avec le sérum des rat non immunisés (Figure 26B), équivalent au taux retrouvé en l'absence de contact avec du sérum de rats, alors qu'il était de 7,7 +/- 9,2% après contact avec le sérum des rats pré-immunisés ($p < 0,0001$).

II.2.2.1.3 - Efficacité de l'injection en LIL sur la transduction hépatocytaire

L'intervention a été tolérée de la même façon dans tous les groupes de rats. L'immunohistochimie anti-GFP sur le foie au sacrifice a mis en évidence une réduction importante du taux de transduction hépatocytaire chez les rats préalablement immunisés pour les trois types d'injection du VL-GFP (Figure 27). Le LIL était plus efficace que l'injection en veine porte (PV) chez les rats I- (1,70 +/- 0,62% versus 0,52 +/- 0,22%, $p = 0,01$) comme chez les rats I+ (0,33 +/- 0,22% versus 0,01 +/- 0,01%, $p = 0,01$). Par contre, il n'y avait pas de différence d'expression entre le groupe de rats I+ injectée en LIL et le groupe de rats I-

injectés en VP. L'addition des étapes de lavage hépatique (LIL-W) a quant à elle inhibé toute transduction hépatique.

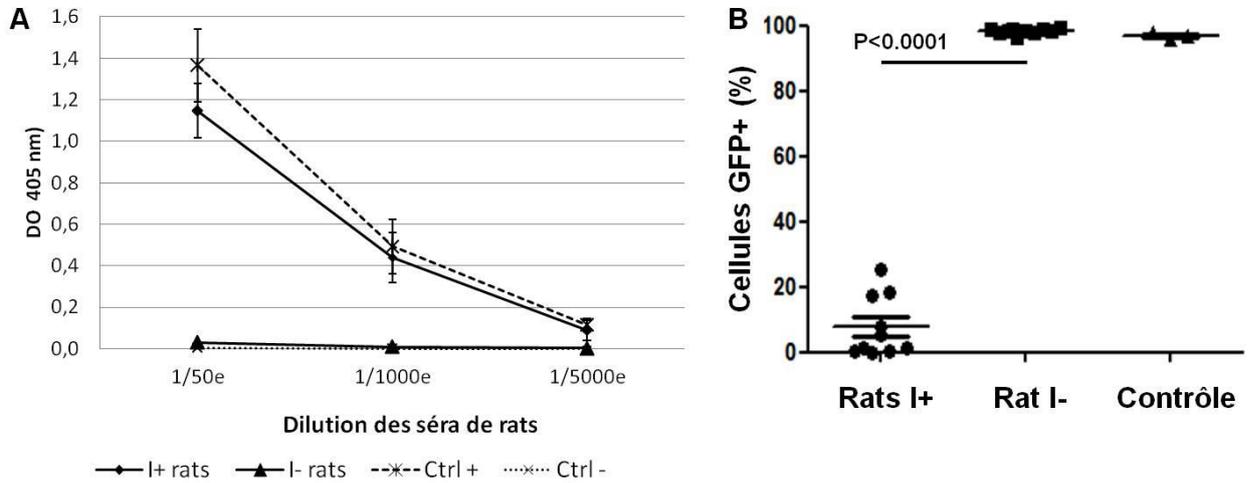


Figure 26: Vérification de l'immunisation des rats contre la protéine d'enveloppe VSVg après injection systémique d'une faible dose de vecteur lentiviral. A: recherche d'anticorps anti-VSVg dans le sérum des rats après 14 jours. B: vérification du pouvoir neutralisant de ces anticorps contre l'infection par un vecteur lentiviral pseudotypé VSVg par un test de neutralisation *in vitro*.

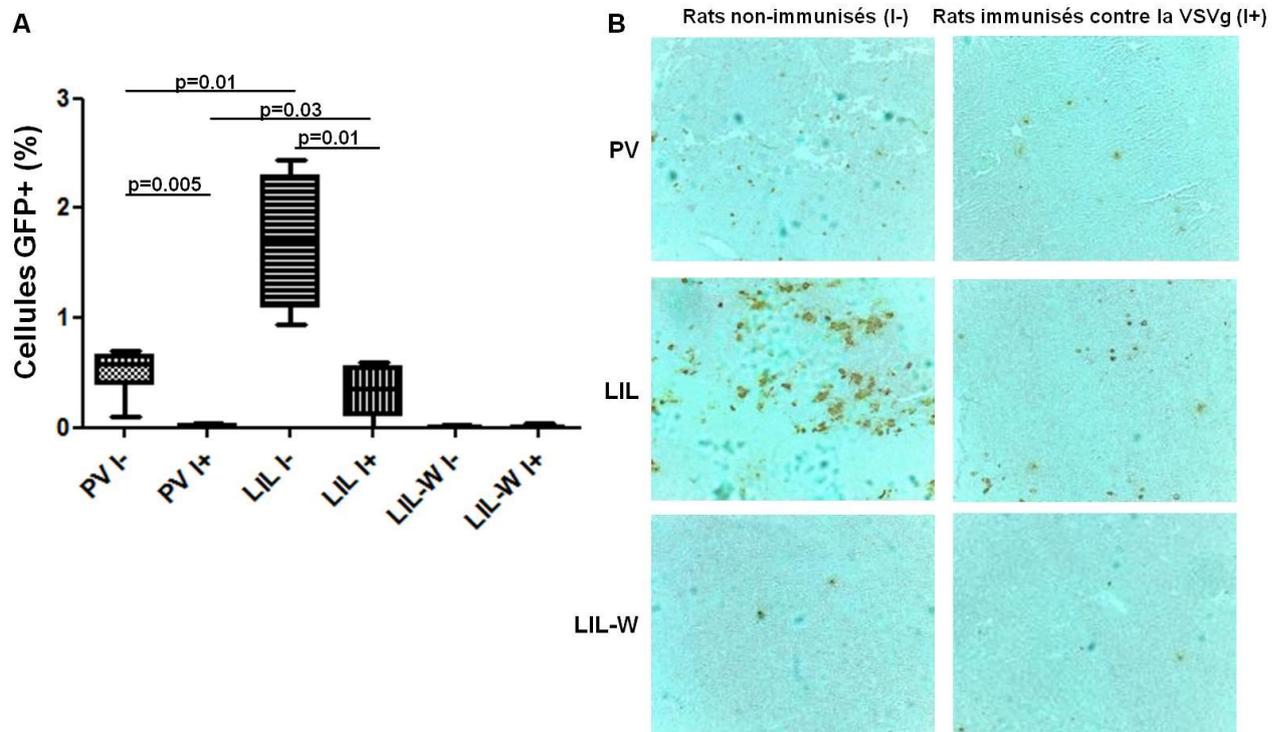


Figure 27: Efficacité de transduction hépatocytaire à J7 en immunohistochimie anti-GFP, chez les rats pré-immunisés contre la VSVg (I+) ou non (I-). A: Pourcentage d'hépatocytes GFP+ après comptage au microscope (x400), en fonction de la voie d'injection: veine porte (PV), foie isolé en hyperpression, sans (LIL) et avec lavages hépatiques (LIL-W). B: photographies de lames de foie (grossissement x100) représentatives de chaque groupe de rats injecté. Les cellules GFP+ sont marquées en marron.

II.2.2.1.4 - Efficacité de l'injection en LIL sur la dissémination extra-hépatique

Le nombre de particules lentivirales infectieuses présentes dans le sérum 5 minutes après leur passage dans la circulation sanguine a été quantifié par cytométrie de flux sur des cellules Huh7 cultivées en présence du sérum des rats. Il n'a pas été retrouvé de particule lentivirale dans le sérum de tous les rats pré-immunisés contre la VSVg, quelle que soit la voie d'injection du VL (Figure 28). Chez les rats non immunisés, le taux moyen de cellules GFP+ était de 38,32 +/- 20,65% pour les rats injectés en LIL+W, significativement inférieur à l'injection en veine porte (86,03 +/- 0,91%, p=0,01) ou en LIL seul (90,43 +/- 2,73%, p=0,01).

L'intégration du génome viral a été recherchée en qPCR sur différents organes extra-hépatiques au sacrifice: la rate en tant qu'organe immunitaire, le rein comme organe de filtration et d'élimination et les testicules afin d'estimer le risque de transmission à la descendance. Chez les rats pré-immunisés contre la VSVg, il n'a été détecté de copies de génome LV à un taux significatif dans aucun des trois organes testés et ce, indépendamment de la voie d'injection du VL-GFP. Parmi les rats non immunisés, du génome de VL a été détecté à un taux très faible, inférieur à 1%, dans le rein et le testicule, et il y en avait 3 à 10 fois moins après injection en LIL avec lavages (p = 0,01). L'injection en LIL seul n'a pas montré de différence significative sur l'intégration extra-hépatique du VL par rapport à la veine porte. Les taux de VL retrouvés dans la rate étaient bien plus importants, allant jusqu'à 0,34 +/- 0,07 cv/gh en injection PV. Dans la rate, les injection en LIL et LIL avec lavages ont permis d'obtenir une diminution de 3 et 6 fois respectivement du nombre de copies de VL retrouvées (0.12 +/- 0.07 cv/gh and 0.05 +/- 0.03 cv/gh, p = 0.01). La comparaison des rats I+ et I- appariés par type d'injection a montré une réduction très importante de l'intégration du VL dans les trois organes testés pour l'injection en PV et en LIL (Figure 29), confirmant l'efficacité de l'immunisation préalable contre la VSVg dans la prévention de la dissémination extra-hépatique. Chez les rats non immunisé, l'injection en LIL avec lavages a permis d'obtenir à elle seule des taux indétectables de VL dans les organes, sauf la rate.

II.2.2.1.5 - Conclusions

Ces résultats ont été soumis pour publication dans Human Gene Therapy Methods en septembre 2014 (Annexe 1). Cette étude nous a permis de créer et de valider un modèle murin simple d'immunisation contre la VSVg par développement d'anticorps sériques neutralisants anti-VSVg dès le 14ème jour après vaccination. Chez ces rats, il a été mis en évidence une

réduction importante de la transduction hépatocytaire après injection d'un VL-GFP, quelle que soit la voie d'administration utilisée, et une inhibition complète de la dissémination extra-hépatique. La technique LIL a néanmoins permis de restaurer une efficacité de transduction hépatique équivalente à celle existant chez des rats non immunisés contre la VSVg et injectés en veine porte. Chez ces rats, l'injection en LIL a été plus efficace sur la transduction hépatique, mais n'a pas montré d'efficacité en terme de biosécurité, que ce soit sur la virémie au déclampage ou sur l'intégration dans les organes extra-hépatiques. La technique LIL-W a montré que le fait d'ajouter un lavage pré- et post-infusion du vecteur dans le foie isolé inhibait toute transduction hépatocytaire, mais diminuait significativement la quantité de particules infectieuses relarguées par le foie au déclampage.

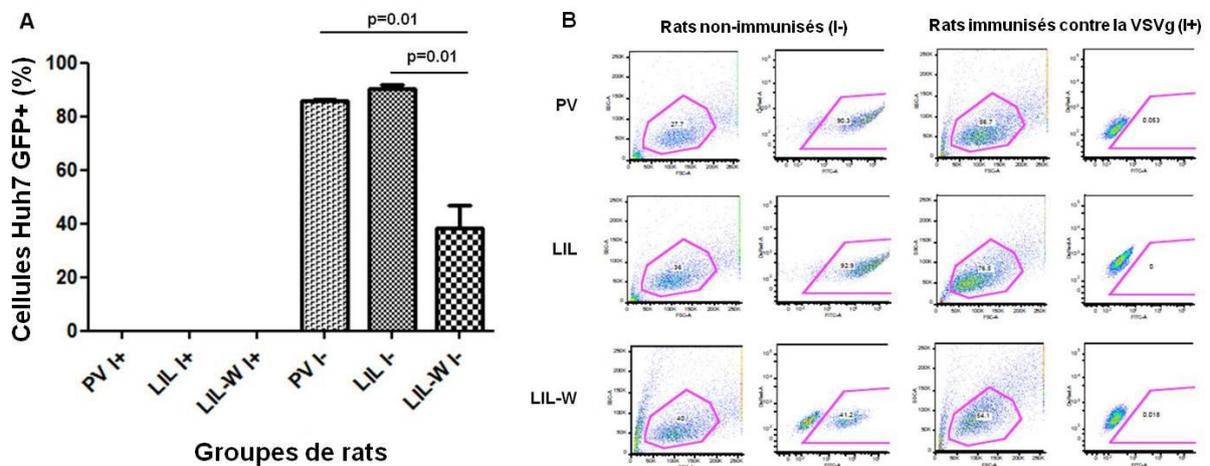


Figure 28: Virémies à 5 minutes en analyse FACS. L'injection du vecteur était faite soit par la veine porte (PV), soit en hyperpression dans le foie sans lavage (LIL) ou avec lavages (LIL-W), chez des rats pré-immunisés (I+) ou non (I-) contre l'enveloppe VSVg du vecteur lentiviral.

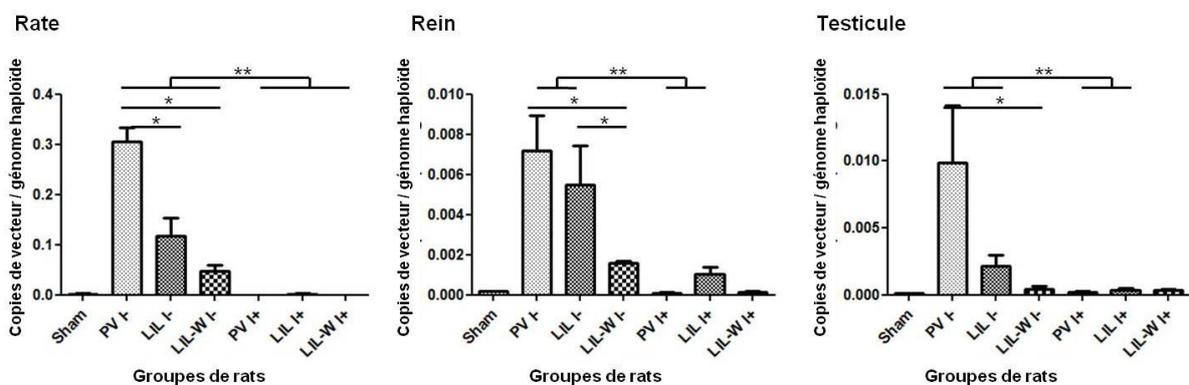


Figure 29: Présence de génome lentiviral dans les organes extra-hépatiques en qPCR au sacrifice. Le nombre de copies de séquences d'ADN codant pour la GFP retrouvées dans la rate, le rein et le testicule en fonction du type d'injection et du statut immunitaire des rats a été donné en terme de moyenne +/- écart-type. Une différence statistiquement significative entre deux groupes de rats est représentée par "*", et celles entre des groupes de rats pré-immunisés (I+) ou non (I), appariés par type d'injection, par "**".

II.2.2.2 - Lavages hépatiques pré- ou post-injection

Il était donc intéressant de rechercher si, en découplant les deux lavages, il n'était pas possible de conserver un taux de transduction hépatocytaire satisfaisant tout en conservant l'efficacité obtenue sur la dissémination extra-hépatique.

II.2.2.2.1 - Protocole expérimental

Des groupes de 5 rats Wistar femelles de 6 semaines (poids moyen 135g) ont été constitués, et ont été injectés avec un vecteur lentiviral codant pour la GFP ($0,5.10E+07$ TU/g) soit par la veine porte, soit en LIL soit en LIL avec lavages pré- et/ou post-infusion du vecteur. Le lavage du foie a été réalisé de la même façon avant et après infusion du vecteur lentiviral, par instillation douce (5ml/min) de sérum physiologique durant 4 minutes par la veine gastro-duodénale et retrait par la VCI, de façon à ce qu'environ deux fois la masse sanguine du rat soit utilisée à chaque lavage. Le détail des groupes de rats est donné dans le tableau X.

Tableau X: Descriptif des groupes de rats injectés avec un vecteur lentiviral codant pour la GFP en veine porte ou en LIL avec lavages hépatiques pré- ou post-infection.

Groupe de rats	Voie d'injection	Animaux inclus	Décès péri-opératoires	Animaux au sacrifice à J7
Groupe 1	Veine porte	5	0	5
Groupe 2	LIL	5	0	5
Groupe 3	Lavage + LIL	4	4	0
Groupe 4	Lavage + LIL + Lavage	2	2	0
Groupe 5	LIL + Lavage	6	0	6
Groupe 6	LIL + Lavage hépariné	4	4	0
Groupe 7	Sham, non injectés	5	0	5

LIL: Lentiviral in Isolated Liver

II.2.2.2.2 - Tolérance clinique à la procédure

Dans ces groupes de rats, les tentatives de lavage pré-infusion du vecteur ou pré-et post-infusion du vecteur se sont soldées par le décès de tous les premiers animaux injectés dans les 24 heures post-opératoires, alors que cette chirurgie avait été bien tolérée lors des expérimentations précédentes. Ces groupes de rats n'ont donc pas été complétés, et les expérimentations se sont centrées sur le lavage post-injection du VL, en ajoutant un groupe de rats (groupe 6) dont le lavage hépatique après injection du VL a été réalisé avec du sérum hépariné (héparine non fractionnée, 5000 UI/L). Cette molécule inhibe en effet de manière

compétitive l'attachement de la VSVg sur les récepteurs cellulaires (Guibinga, Miyano-hara et al. 2002) et pourrait ainsi renforcer l'effet de flush des particules lentivirales au lavage.

II.2.2.2.3 - Efficacité de transduction et dissémination extra-hépatique

En PCR quantitative et en analyse immuno-histochimique anti-GFP sur coupes en paraffine de foie au sacrifice à J7 il n'a pas été retrouvé de perte d'efficacité de transduction (valeur médiane de transduction en immuno-histochimie de 2,5 [0,3-4,5] lorsqu'il y avait un lavage post-infusion par rapport à la technique LIL sans lavage (valeur médiane 2,9 [0,3-4,6]), et cette efficacité de transduction restait supérieure à l'injection simple par veine porte (médiane du nombre de cellules transduites 0,2 [0,1-2,0]) (Figure 30 A et B). Par contre, dans le groupe avec lavage hépariné, il n'a pas été retrouvé de copies de vecteur en qPCR ni de cellules GFP+ en immuno-histochimie, mais les prélèvements hépatiques avaient été réalisés post-mortem.

L'étude de la quantité de particules infectieuses circulantes dans le sérum des animaux 5 minutes après déclampage a été réalisée par infection de cellules Huh7 en culture par du sérum des rats, et les cellules GFP+ ont été comptées en FACS. Il a été trouvé une tendance à un nombre plus faible de particules circulantes lorsqu'il y avait un lavage hépatique post-infusion du vecteur, mais cette différence n'était pas statistiquement significative du fait de la grande disparité interindividuelle retrouvée (Figure 30C).

II.2.2.2.4 - Conclusions

Chez ces rats, la tolérance à la procédure LIL avec lavages pré-hépatiques, a été bien inférieure à celle précédemment constatée, sans qu'il n'y ait d'explication liée à un changement de procédure ou à des difficultés particulières au cours de l'intervention. Il semblerait néanmoins que l'utilisation d'un lavage au NaCl 0,9% après injection du vecteur en LIL dans le foie et avant déclampage permette de diminuer la dissémination extra-hépatique tout en préservant l'efficacité de transduction hépatocytaire.

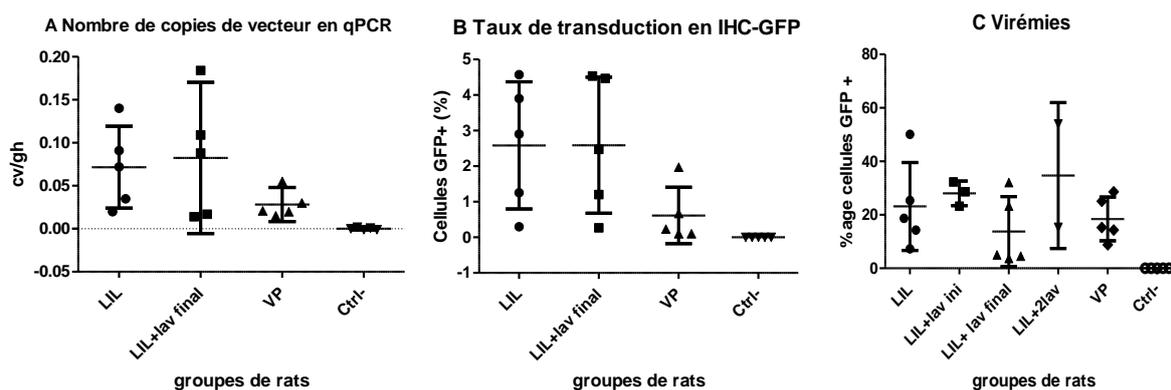


Figure 30: Efficacité de transduction et sur la prévention de la dissémination extra-hépatique du lavage hépatique lors de l'injection en LIL de vecteur lentiviral codant pour la GFP. **A:** recherche du nombre de copies de vecteur en qPCR; **B:** nombre de cellules transduites en immuno-histochimie anti-GFP; **C:** analyse de la virémie résiduelle en FACS. Les taux moyens de chaque groupes sont représentés sous forme de moyenne et d'écart-type. lav ini: lavage pré-infusion du vecteur en LIL; lav final: lavage post-infusion du vecteur en LIL; 2lav: lavages pré- et post-infusion du vecteur en LIL; VP: veine porte; Ctrl-: groupe contrôle négatif non injecté.

II.2.2.3 - Amélioration du milieu d'injection du vecteur lentiviral dans un foie d'architecture normale

II.2.2.3.1 - Modification de la viscosité du milieu par les globules rouges

En parallèle aux travaux sur l'amélioration de la technique chirurgicale d'injection du VL dans le foie, une seconde approche a consisté à essayer d'améliorer le milieu d'injection du vecteur lentiviral afin d'augmenter l'efficacité de transduction initiale. Pour cela, il a tout d'abord été évalué l'intérêt d'adjoindre des globules rouges (GR) au milieu d'injection afin de 1) restaurer une viscosité du milieu plus proche de celle du sang et 2) utiliser l'effet de massage endothélial des GR dans les sinusoides hépatiques (Braet and Wisse 2002) afin de "pousser" de façon mécanique plus de particules virales au travers des fenestrations endothéliales.

Protocole expérimental

Un premier groupe de 5 rats Wistar a été injecté en LIL avec une solution de PBS contenant 50% de GR afin de tester la tolérance clinique de la procédure. Deux autres groupes de 5 rats ont ensuite été injectés en LIL avec du VL-GFP à la dose de $0,5 \cdot 10^7$ TU/g avec respectivement 50% et 25% de GR dans le milieu d'injection. Les rats ont été sacrifiés à J7

post-opératoire et l'efficacité de transduction hépatocytaire a été évaluée par qPCR et par immuno-histochimie anti-GFP. Les taux de transduction obtenus ont été comparés avec ceux obtenus précédemment par injection en veine porte et en LIL (groupes 1 et 2).

Tolérance de la procédure d'autotransfusion et efficacité sur la transduction hépatique

La tolérance clinique de la procédure a été globalement bonne, avec une élévation très modérée (2 fois la normale) et transitoire des transaminases hépatiques à J1 et 10% (2 rats) de décès postopératoires (valeur attendue avec la procédure LIL). L'hématocrite pré-opératoire moyen dans le groupe test de tolérance de l'autotransfusion était de 41,9% +/- 1,1% et baissait légèrement et de façon non significative à J1 à 26,8 +/- 6,7% avant de revenir à J7 à des valeurs normale (43,4% +/- 2,9%).

En immuno-histochimie anti-GFP sur des coupes de foie au sacrifice, le nombre de cellules GFP+ dans le foie était moins important dans les groupes de rats dont le milieu d'injection du VL contenait des globules rouges que dans le groupe contrôle positif (injecté en LIL avec du VL mais sans GR), et ce d'autant plus que le taux de GR était élevé (Figure 31). Ainsi, le taux de transduction des rats injectés avec 25% et 50% de globule rouges dans le milieu était de 0,52 +/- 0,38% et 0,84 +/- 0,49% respectivement, comparés à un taux de 4,0 +/- 1,6% après injection en LIL avec une solution de VL standard ($p \leq 0,03$). Ces résultats étaient concordants avec le nombre de copies de génome de VL dans le foie en qPCR.

II.2.2.3.2 - Modification de la viscosité du milieu par adjonction de Ficoll® 70 PM

Le Ficoll® 70 PM est un polysaccharide, polymère de sucrose et d'épichlorohydrine, utilisé pour augmenter la densité et la viscosité du milieu sans modification de sa pression osmotique (Venturoli and Rippe 2005). Il a été choisi en alternative aux globule rouges du fait de sa densité (supérieure à 1,1), sa petite taille (4,5 nm), son absence de compétition avec le VL pour l'accrochage sur des récepteurs membranaires et sa tolérance *in vivo* déjà établie (Winding 1981; Sorensson, Ohlson et al. 2001).

Evaluation de l'efficacité du Ficoll® 70 PM sur la transduction de cellules Huh7 en culture

Dans un premier temps, la toxicité cellulaire du Ficoll® 70 PM a été évaluée pour des concentrations de 25% et 50% dans du milieu de culture cellulaire Advanced (densités respectives à 20°C: 1,099 et 1,161). Les tests de survie cellulaire après une exposition courte de 20 minutes comme une exposition longue de 24 heures ont retrouvé un taux de survie de 80% et 64% respectivement, sans différence statistiquement significative entre les groupes.

L'influence du Ficoll® 70 PM sur la transduction des cellules Huh7 a ensuite été évaluée par adjonction de Ficoll® 70 PM à 25% dans le surnageant lentiviral déposé sur les cellules et mis à incuber pendant 20 minutes, avec ou sans étape de spinoculation. Ceci devait permettre de se rapprocher le plus possible des conditions d'injection du VL en LIL, c'est à dire avec un temps de clampage hépatique de 20 minutes et une injection du vecteur en hyperpression. Quelle que soit la multiplicity of infection (MOI) utilisée, il a été retrouvé un taux de cellules GFP+ en FACS plus de deux fois supérieur dans les puits infectés avec le LV en présence de Ficoll. Le pourcentage moyen de cellules positives était ainsi de 1,8% +/- 0,28% à la MOI de 0,5, de 30,4% +/- 3,5% à la MOI de 5 et de 89,3% +/- 3,8% à la MOI de 50 après infection avec Ficoll (Figure 32). Pour les mêmes MOI, il a été retrouvé respectivement 0,8%, 6,4% et 44,3% de cellules positives dans les puits infectés avec le LV-GFP sans Ficoll. Ces résultats ont néanmoins été établis sur trop peu d'échantillons pour être statistiquement significatifs. L'ajout de la spinoculation n'a pas permis d'augmenter le taux de cellules transduites de manière significative, que l'infection des cellules ait été réalisée avec ou sans Ficoll dans le milieu.

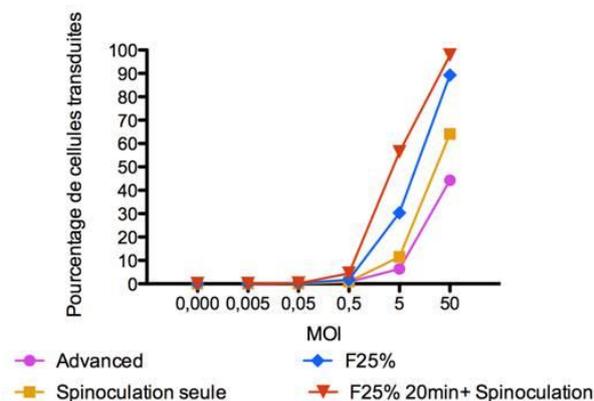


Figure 32: Efficacité de transduction *in vivo* de cellules Huh7 infectées pendant 20 minutes avec un vecteur lentiviral codant pour la GFP, sans ou en présence de 25% de Ficoll® 70 PM et d'une étape de spinoculation. Advanced: cellules contrôle cultivées et infectées en milieu DMEM Advanced; Spinoculation seule: cellules infectées en milieu DMEM Advanced avec une étape de spinoculation; F25%: cellules infectées en présence de Ficoll® 70 PM; F25% 20 min + spinoculation: cellules infectées en présence de Ficoll® 70 PM et avec une étape de spinoculation. MOI: multiplicity of infection.

Tolérance et efficacité du Ficoll® 70 PM sur la transduction hépatique in vivo

Deux groupes de 5 rats ont été injectés en LIL, le premier a reçu un volume de 8,9 ml/Kg de PBS avec 25% de Ficoll® 70PM pour tester la tolérance des rats à cette molécule, le second a reçu du VL-GFP à la dose de $0,5.10E+07$ TU/g dilué dans la même solution de Ficoll à 25% dans du PBS.

Le protocole chirurgical a été aussi bien toléré que dans les groupes de rats précédents, avec un seul décès dans le groupe Ficoll® 70PM/VL-GFP. L'injection de Ficoll® 70PM a induit une tendance immédiate à une moindre coagulation, nécessitant la réalisation systématique d'une suture sur le point de cathétérisation veineux, mais n'a pas provoqué d'anémie ou de saignement secondaire, de trouble de la glycémie ou eu des répercussion sur le poids des animaux. Les dosages des transaminases ont retrouvé une élévation transitoire à 1,4X la valeur initiale à J1, résolutive à J7.

Le taux moyen de cellules GFP-positives en immuno-histochimie à J7 était de 0,96% +/- 0,3% (Figure 31), significativement diminué par rapport aux rats injectés en LIL avec du PBS seul (4,0% +/- 1,6%, $p=0,004$), et il a été détecté 0,012 +/- 0,02 cv/gh en qPCR, taux plus faible également que dans le groupe contrôle injecté en LIL.

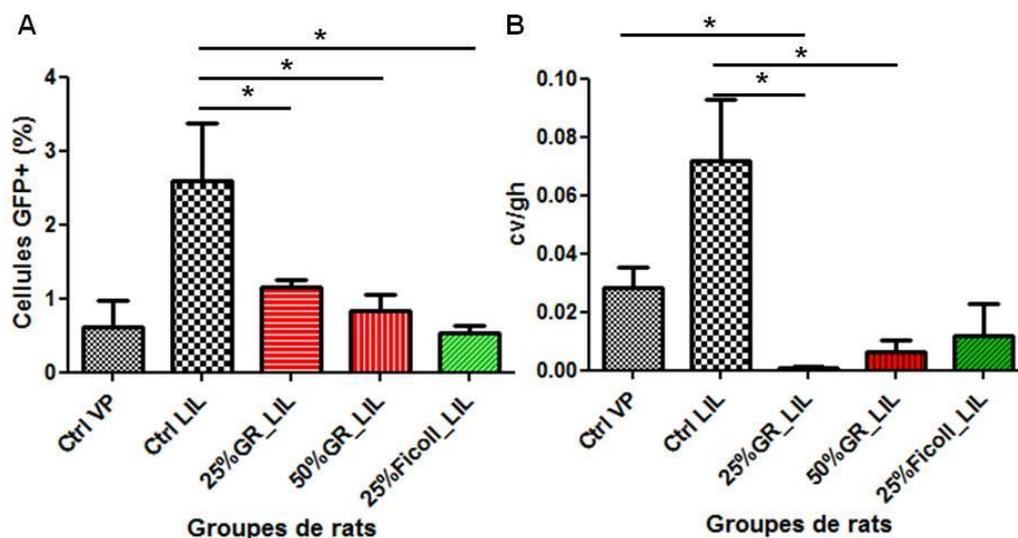


Figure 31: Evaluation de l'efficacité de transduction hépatocytaire après augmentation de la viscosité du milieu d'injection par ajout de globules rouges autologues ou de Ficoll® 70PM, ou augmentation du nombre de fenestrations endothéliales par agoniste sérotoninergique (DOI). **A:** Taux d'hépatocytes GFP+ en immuno-histochimie sur coupes de foie en paraffine. x%GR: pourcentage de globules rouges présents dans le milieu d'injection du vecteur; PV ou LIL: voie d'injection de vecteur lentiviral GFP+ en LIL ou veine porte. **B:** nombre de copies de vecteur par génome haploïde (cv/gh) en qPCR. Les différences significatives sont représentées par une étoile (*).

II.2.2.3.3 - Conclusions des essais d'augmentation de la viscosité

Les procédures d'autotransfusion de GR et d'adjonction du Ficoll® 70PM ont été bien tolérées sur le plan clinique et hépatique par les animaux. Les essais préalables *in vitro* semblaient en faveur d'une efficacité supérieure du Ficoll sur la transduction des cellules en culture, mais ceci ne s'est pas confirmé chez les animaux, avec au contraire une diminution significative du taux de cellules GFP positives dans le foie à J7; ceci pourrait être expliqué par l'absence de déformabilité des particules de Ficoll, rendant leur passage dans les sinusoides hépatiques inefficace en terme de massage endothélial. L'injection de GR a eu le même effet négatif, ce qui pourrait être expliqué par des phénomènes d'adsorption du VL sur la membrane des GR par co-attachement à la phosphatidyl sérine (Setty, Kulkarni et al. 2002).

II.2.2.4 - Thérapie génique *in vivo* et fibrose hépatique

II.2.2.4.1 - Augmentation du nombre des fenestrations endothéliales par les agonistes sérotoninergiques

Des travaux récents portant sur les modifications hépatiques induites par l'âge ont montré que les capacités de régénération de foie étaient diminuées à la fois par une perte de la prolifération hépatocytaire (Ikegami, Nishizaki et al. 2000; Krupczak-Hollis, Wang et al. 2003) et par la pseudocapillarisation des sinusoides hépatiques qui associe une diminution du nombre des fenestrations et un épaississement de l'endothélium (Hilmer, Cogger et al. 2005; DG, Cogger et al. 2007), tout comme dans les cirrhoses débutantes (Mori, Okanoue et al. 1993). Poursuivant ces travaux, l'équipe de Furrer *et al.* (Furrer, Rickenbacher et al. 2011) a récemment montré l'implication de la voie de la sérotonine dans l'initiation de la régénération hépatique, et a mis en évidence l'effet positif du 2,5-dimethoxy-4- iodoamphetamine (DOI), un agoniste du récepteur HTR2 à la sérotonine, sur l'augmentation du nombre des fenestrations endothéliales et l'amélioration de la microvascularisation hépatique chez des rats âgés. Afin de pouvoir par la suite utiliser cette molécule en traitement adjuvant à l'injection de VL en LIL dans un foie présentant des lésions de fibrose, nous avons dans un premier temps testé sa tolérance clinique et son efficacité chez des rats Wistar jeunes, puis nous l'avons utilisée chez des rats LEC âgés de 6 mois.

Protocole expérimental

Quatre rats Wistar de 7 semaines ont reçu un traitement adjuvant par DOI, à la dose de 1 mg/ Kg matin et soir pendant 2 jour. Le DOI en poudre avait été préalablement solubilisé de façon stérile dans du PBS, et la solution à 200 µg/ml était administrée par voie intrapéritonéale. L'injection du VL-GFP en LIL a été effectuée comme précédemment décrit le lendemain de ce traitement et les rats ont été sacrifiés sept jours plus tard pour analyse de l'efficacité de transduction hépatique. De la même façon, 3 rats de 24 semaines ont été soumis au même protocole expérimental.

Résultats

Dans le groupe des rats jeunes, l'un est décédé en période post-opératoire d'une éviscération. Les trois autres rats ont montré une très bonne tolérance clinique au DOI, sans augmentation significative des enzymes hépatiques ni déglobulisation. L'analyse de la transduction hépatique au sacrifice a retrouvé un nombre faible de copies de vecteurs en qPCR (0,0028 +/- 0,0039 cv/gh), ainsi qu'un taux de cellules transduites de 1,23 +/- 0,43%, significativement inférieur à une injection en LIL seul ($p = 0,007$).

Dans le groupe des 3 rats âgés de 24 semaines, l'injection de DOI a également été parfaitement tolérée, et un des rats est décédé au décours immédiat de l'injection en LIL. Le pourcentage de fibrose hépatique lors de l'injection était de 3,86 +/- 1,59%. Au sacrifice, il n'a pas été retrouvé de copies de vecteur en qPCR ($< 2.10^{-4}$ cv/gh), ni de cellules GFP positives en immuno-histochimie.

Conclusions

La microvascularisation hépatique étant altérée par la fibrose hépatique, le but de cette étude était de tester l'intérêt d'un traitement préalable par agoniste sérotoninergique, le DOI, avant injection de VL en LIL dans le foie. Chez des rats jeunes sans hépatite sous-jacente, le DOI a été bien toléré sur le plan clinique, mais n'a pas eu d'effet positif sur la transduction hépatocytaire, comme attendu au vu de l'absence d'effet constaté sur les fenestrations endothéliales dans un groupe de rats identiques (Furrer, Rickenbacher et al. 2011); il y a au contraire eu une diminution du taux de cellules transduites. Chez les rats plus âgés qui présentaient un taux de fibrose de 3,9 % en moyenne, les mêmes constatations ont été faites.

Ceci pourrait être lié au fait qu'il faudrait augmenter la taille des fenestrations plutôt que leur nombre, ou encore pouvoir restaurer plus de déformabilité dans le tissu fibrotique pour permettre le passage des particules lentivirales. Deux molécules ont été retrouvées susceptibles d'avoir un tel effet: l'éthanol utilisé en quantités modérées mais au long cours qui augmente de 20% environ le diamètre des fenestrations (Fraser, Bowler et al. 1980), dont on ne peut guère envisager l'application chez l'homme, et le misakinolide, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine qui induit la formation de gros pores *de novo* une heure après application sur des cellules *in vitro* (Braet, Spector et al. 1998), mais qui a une toxicité cellulaire significative (39% de survie) et pourrait par altération du cytosquelette également perturber le cycle d'entrée du VL dans les hépatocytes.

II.2.2.4.2 - Transduction du foie fibrotique

La fibrose hépatique induisant une pseudo-capillarisation des sinusoides hépatiques, elle pourrait ainsi prévenir la transduction hépatocytaire en empêchant le passage des particules virales au travers des fenestrations endothéliales. Nous avons donc cherché à évaluer l'efficacité de la technique d'injection LIL, permettant de forcer mécaniquement ce passage, sur un foie de rat fibrotique. Afin d'essayer d'améliorer encore plus le taux de transduction initiale, mais aussi la tolérance des animaux à la procédure chirurgicale, deux molécules anti-fibrotiques ont également été testées en traitement néo-adjuvant à l'injection du VL codant pour la GFP. La première est la silymarine, molécule issue du chardon-Marie ou artichaut sauvage (*Silybum marianum*), qui diminue la fibrose en inhibant la prolifération et l'activation des cellules stellaires du foie (Tsai, Liu et al. 2008; Kim, Yang et al. 2012), et aurait des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et immuno-modulatrices (Johnson, He et al. 2003; Hussain, Jassim et al. 2009); elle a déjà été utilisée en essais cliniques chez l'homme (Shaker, Zalata et al. 2011). La seconde est la N-acétylcystéine, acide aminé non essentiel aux propriétés anti-oxydantes utilisé depuis longtemps comme mucolytique et hépatoprotecteur, en particulier comme antidote aux surdosages en paracétamol. Elle diminue les phénomènes de fibrose hépatique en modulant l'activation des cellules hépatiques stellaires en réponse à un stress oxydatif (Mazo, de Oliveira et al. 2013).

Protocole expérimental

Le degré de fibrose hépatique présent chez les rats LEC en fonction de leur âge avait été préalablement déterminé (Chap. II.1.3), et les premiers résultats permettaient d'estimer le taux de fibrose hépatique à 6 mois à environ 5%.

Des rats LEC âgés de 24 semaines en moyenne ont eu une première biopsie hépatique (BH1), enlevant un lobe caudé, au début du protocole expérimental, afin d'avoir une évaluation histologique et quantitative par analyse morphométrique numérisée du degré de fibrose hépatique initial. Ils ont été ensuite placés sous traitement anti-fibrotique par silymarine (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) en gavage quotidien à 50 mg/Kg dilués dans 2 ml d'eau chauffée à 50°C, ou par N-acétylcystéine (Bristol-Myers Squibb, Paris, France) administrée dans l'eau de boisson à la dose de 50 mg/Kg/j. Les rats contrôle n'ont reçu aucun traitement particulier.

Après un mois de traitement (J28), une nouvelle biopsie hépatique (BH2) du lobe droit inférieur a été réalisée pour évaluer la progression de la fibrose après traitement, et un vecteur lentiviral codant pour la GFP (VL-GFP) a été injecté en LIL à la dose de $5 \cdot 10^9$ pi/Kg, dans les deux groupes traités préalablement et un groupe contrôle non traité; un dernier groupe a été injecté à la même dose en veine porte (VP), pour comparer l'efficacité du LIL par rapport à une voie d'injection classique dans un foie fibrotique. Tous les rats ont été sacrifiés une semaine après l'injection du VL-GFP (J36) pour étude histologique du foie sur coupes fixées au formol 3% et incluses en paraffine, et analyse du taux de transduction hépatocytaire en immuno-histochimie anti-GFP. Le protocole expérimental est résumé dans la figure 33 et le détail des groupes de rats formés dans le tableau XI.

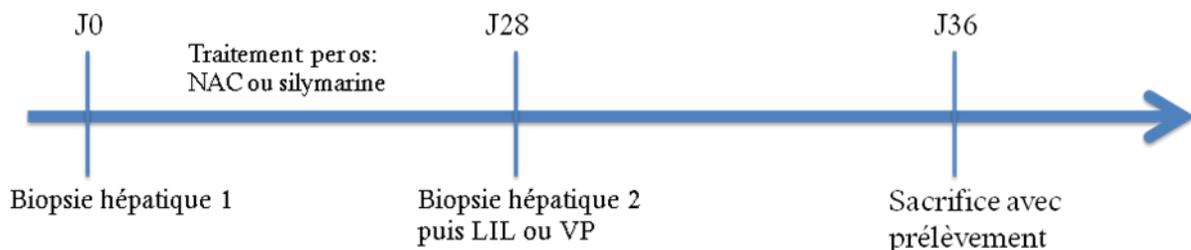


Figure 33: Chronogramme de l'injection de vecteur lentiviral codant pour la GFP à des rats LEC présentant une fibrose hépatique. Certains groupes de rats ont reçu un traitement adjuvant par molécule anti-fibrosante (N-acétylcystéine ou silymarine).

Tableau XI: Descriptif des groupes de rats Long-Evans Cinnamon constitués et nombre de survivants aux différents points du suivi

Groupe	Age médian à l'inclusion (semaines)	Nombre de rats à J0 (BH 1)	Traitement anti-fibrotique	Nombre de rats à J28 (BH2) et injection VL-GFP	Voie d'injection du VJ-GFP (5.10^9 pi/Kg)	Nombre de rats à J36 (Sacrifice)
S	29	8	Silymarine 50 mg/Kg/j	6	LIL	1
NAC	25	5	N-acétylcystéine 50 mg/Kg/j	5	LIL	1
LIL	23,5	8	/	5	LIL	0
VP	20	5	/	5	VP	1

NAC: N-acétylcystéine; VP: injection du VL-GFP en veine porte; LIL: injection du VL-GFP en hyperpression dans un foie isolé de la circulation sanguine; BH: biopsie hépatique. La différence d'âge à l'inclusion dans les différents groupes de rats est due à une adaptation per-protocole rendue nécessaire par la présence d'une fibrose hépatique plus évoluée que dans les estimations faites initialement et qui a entraîné un fort taux de décès des premiers rats placés en expérimentation.

Tolérance clinique aux traitements anti-fibrotiques et aux interventions chirurgicales

La tolérance clinique des rats LEC aux traitements par silymarine et NAC a été réalisée par observation quotidienne à la recherche de signes de souffrance animale, et par pesée hebdomadaire des rats. Il n'a pas été retrouvé de modification physique ou comportementale entre les rats traités et leurs témoins, et l'évolution de leur poids, resté globalement stable tout au long du suivi, n'a pas été différente.

Deux rats du groupe S et trois du groupe LIL sont décédés dans les heures qui ont suivi la BH1, l'un d'une hémorragie non contrôlée et les 4 autres par probable insuffisance hépatocellulaire trop importante; leurs foies présentaient en effet déjà des signes d'une cirrhose très avancée. Le taux de mortalité à 7 jours post-opératoires a été de 19,2% après la BH1, celui après la seconde intervention avec injection du VL-GFP a été de 87,5% en LIL et 80% en VP (NS). L'autopsie des rats a montré dans plus de la moitié des cas un caillot sanguin dans la veine cave inférieure sus-hépatique remontant jusque dans l'oreillette droite ayant vraisemblablement causé le décès par syndrome de Budd-Chiari aigu; il n'avait jamais été fait ce genre de constatation auparavant et ce phénomène pourrait s'expliquer par les troubles de la coagulation induits par une insuffisance hépatocellulaire chronique. Au final, seuls 3 foies ont pu être prélevés frais pour analyse de la transduction hépatocytaire à J7, et deux ont été récupérés en période post-mortem précoce à plus de 5 jours de l'injection dans le groupe VP.

Efficacité des traitements anti-fibrotiques sur la fibrose hépatique

L'analyse histologique des lames avec gradation de la fibrose en 4 stades qualitatifs de gravité croissante a été très hétérogène entre les animaux, mais n'a pas mis en évidence de différence significative dans la progression de celle-ci entre les rats traités par silymarine, NAC ou non traités. Ainsi, 2/3 des rats du groupe S et 100% de ceux du groupe NAC présentaient déjà une fibrose de grade F4 à J0, et il n'y a eu aucune progression ou régression significative de celle-ci après un mois de traitement (Figure 34A). Du fait de la mortalité post-opératoire retrouvée chez ces premiers rats, l'âge de mise en expérimentation des suivants avait été abaissé de presque 8 semaines, ce que reflète l'existence d'une fibrose peu sévère à J0 chez tous les rats non traités, avec jusqu'à 50% d'entre eux qui présentaient des lésions de grade F3 et F4 un mois plus tard.

Des lésions de cirrhose (Figure 34B) ont été retrouvées dans 10 cas sur 25 à J0 (40%) et 13 cas sur 21 à J28 (62%, NS). A J0, 1/3 des rats du groupe S et 100% de ceux du groupe NAC (âgés de 25 semaines ou plus) présentaient des lésions de cirrhose, alors qu'il n'y en avait pas chez les rats non traités (<25 semaines). Un mois plus tard, 40% des rats non traités, 66% de ceux du groupe S et 100% du groupe NAC présentaient ce type de lésion (NS). Il n'a pas été objectivé de lésion évocatrice de carcinome hépatocellulaire.

L'analyse numérisée des aires de fibrose (Figure 34C) a retrouvé une corrélation non pas avec le type de traitement administré mais avec l'âge des rats (Figure 34D), avec un coefficient de corrélation de 81% (IC95% [0,61-0,91], $p < 0,0001$). Confirmant les données histologiques, il n'a pas été retrouvé de différence de pourcentages d'aire de fibrose à J0 entre les groupes S, NAC et LIL, mais il y avait moins de fibrose dans le groupe VP (2,61 +/- 0,96%) que dans le groupe S (17,72 +/- 15,52%, $p = 0,011$) et le groupe NAC (11,67% +/- 5,69%, $p < 0,01$). Il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les 4 groupes à J28 et la progression de la fibrose n'a pas été significative.

Evaluation de la transduction hépatocytaire

Seuls les foies de 5 rats, dont deux post-mortem à J4, ont pu être analysés en immunohistochimie anti-GFP pour quantifier le nombre d'hépatocytes GFP positifs. Il n'a pas été retrouvé de cellule GFP positive sur les différentes coupes analysées, concernant un rat du groupe S, un du groupe NAC et trois du groupe VP, ni dans les zones de fibrose hépatique, ni

au sein des nodules de régénération hépatocytaires. Les analyses par qPCR ont conforté ce résultat, puisqu'il a été retrouvé moins de 0,01 cv/gh chez tous ces rats.

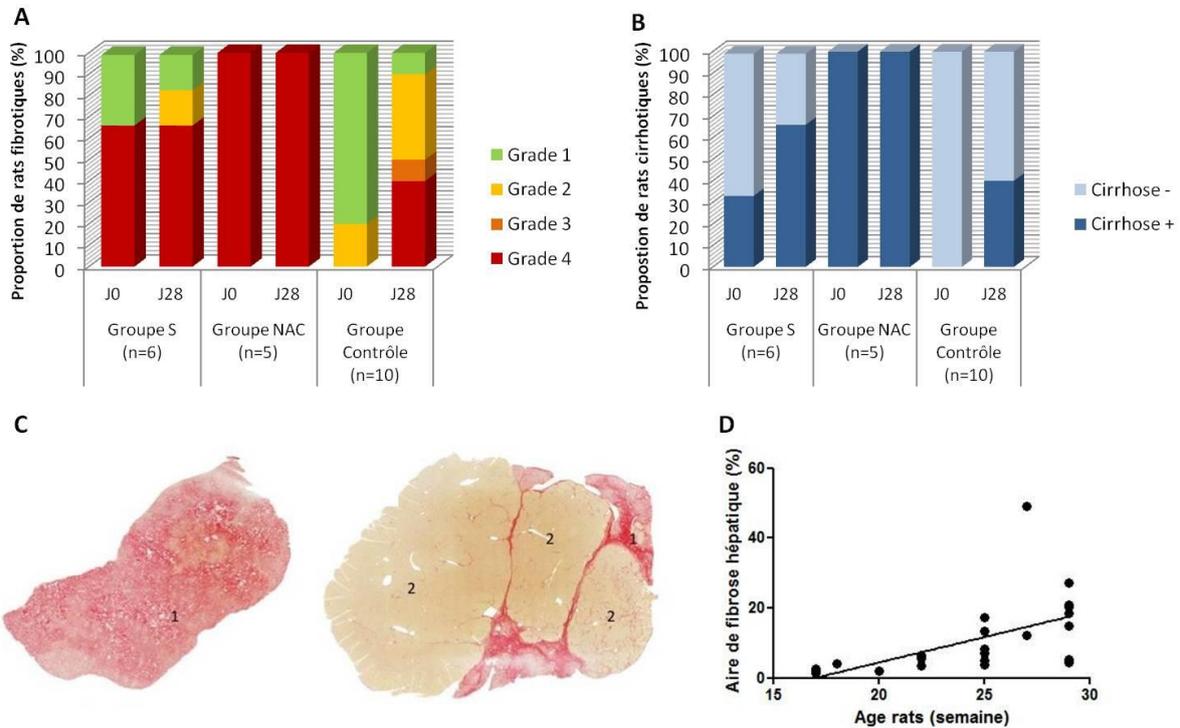


Figure 34: Analyse histologique de l'évolution des lésions d'hépatite chronique chez les rats LEC avec ou sans traitement anti-fibrotique. A: répartition des rats en fonction des grades de sévérité de la fibrose hépatique en analyse histologique conventionnelle et évolution en un mois de traitement par silymarine (groupe S), N-acétylcystéine (groupe NAC) ou sans traitement (groupe contrôle, incluant les rats des groupes LIL et VP). B: répartition des rats en fonction de la présence de cirrhose sur les biopsies à J0 et J28 de traitement. C: photographie de lames de foie après coloration au rouge Picrosirius, la fibrose apparaissant en rouge foncé. 1 = fibrose mutilante; 2 = nodule hépatocyttaire de régénération. D: courbe de corrélation entre l'aire de fibrose calculée après numérisation des lames (en %) et l'âge des rats.

Conclusions

Le but de cette étude était d'évaluer la capacité de transduction du foie fibrotique par vecteurs lentiviraux, ce qui n'a pas été démontré jusqu'ici, au contraire des vecteurs AAV (Sobrevals, Enguita et al. 2012) ou SV40 (Simian Virus 40) (Sobrevals, Rodriguez et al. 2010). Un premier problème rencontré a été une sous estimation initiale du degré de fibrose hépatique après 6 mois, qui nous a contraint à abaisser l'âge des rats, rendant ainsi les différents groupes difficilement comparables sur le plan de l'évolution de la fibrose avec ou sans traitement anti-fibrotique. Les biopsies réalisées avant et après traitement n'ont cependant

pas permis d'objectiver de régression des lésions hépatiques avec la silymarine et la NAC. Le taux de mortalité à l'injection du VL-GFP a été de plus de 80% à 7 jours, que ce soit par LIL ou VP, alors que les taux attendus étaient respectivement de 10% et <1% respectivement. Ceci est probablement dû à l'insuffisance hépatocellulaire importante et aux décompensations vasculaires liés à la cirrhose hépatique très avancée chez les rats LEC. Néanmoins, cela ne contre-indique pas forcément une future utilisation en clinique humaine, où le taux de fibrose retrouvé est compris en général entre 2 et 5%. L'efficacité de transduction hépatique par VL semble ici quasiment nulle, que l'injection ait été faite en VP ou en LIL avec ou sans traitement anti-fibrotique préalable, mais le peu d'animaux prélevés ne permettent aucune conclusion définitive, dans la mesure où il existe en général de très grandes variations interindividuelles même en l'absence de fibrose hépatique sous-jacente.

II.3 - THERAPIE GENIQUE *IN VIVO* CHEZ LE RAT LONG-EVANS CINNAMON

II.3.1 - ADMINISTRATION D'UN VECTEUR LENTIVIRAL CODANT POUR LE PEPTIDE OSIP108

Le peptide OSIP108 est un décapeptide végétal, issu d'*Arabidopsis thaliana*, qui a montré *in vitro* un effet positif sur la survie de cellules ATP7B *-/-* en culture placées dans un milieu riche en cuivre (Spincemaille, Pham et al. 2014). Il agirait par détoxification au niveau mitochondrial (Spincemaille, Chandhok et al. 2014), ce qui lui conférerait des propriétés anti-oxydantes. Afin d'en évaluer le potentiel thérapeutique dans la maladie de Wilson, un VL codant pour le peptide OSIP108 a donc été construit (VL-OSIP108). L'expression de ce peptide a été placée sous contrôle du promoteur mTTR, pour restreindre son expression au niveau du foie, et des séquences-cible du miR142-3pT en tandem lui ont été accolées, afin de prévenir la survenue d'une immunité cellulaire spécifiquement dirigée contre le produit du transgène (Brown, Venneri et al. 2006). Ce vecteur lentiviral a été injecté à différentes doses à des rats LEC.

II.3.1.1 - Protocole expérimental

Quatre rats LEC de 5-6 semaines de vie ont eu une injection systémique d'une solution de VL-OSIP108, à une dose de 1.10^7 pi/g.

Trois autres rats ont eu une injection d'une dose plus faible de 1.10^6 pi/g en LIL, dont on pouvait attendre une efficacité de transduction identique (Dariel, Nguyen et al. 2009).

Un groupe contrôle était composé de 5 rats LEC non traités.

Les rats ont été pesés et surveillés cliniquement de façon hebdomadaire, avec cotation du score ALF, jusqu'au sacrifice à 28 semaines. Un prélèvement sanguin a été réalisé avant, puis tous les mois après l'injection du VL-OSIP108.

II.3.1.2 - Tolérance et efficacité clinico-biologique

Les injections par voie systémique se sont soldées par un décès quasi-immédiat, vraisemblablement par réaction toxique au milieu d'injection trop concentré. Tous les rats injectés en LIL ont survécu sans signe majeur de souffrance post-opératoire.

Les rats injectés en LIL ont donc été suivis durant 20 semaines sur le plan clinique et biologique. Ils ont tous trois présenté un pic de cytolyse hépatique biologique à 10 semaines de vie (valeurs médianes des ASAT à 32,9 $\mu\text{kat/l}$ et des ALAT à 22,6 $\mu\text{kat/l}$), très transitoire et sans retentissement clinique (Figure 35), et non statistiquement différent des valeurs subnormales retrouvées dans le groupe contrôle (ASAT = 3,8 $\mu\text{kat/l}$ et ALAT = 4,8 $\mu\text{kat/l}$). Au sacrifice, leur taux de survie était identique à celui des rats contrôle (non injectés) avec un des rats décédé d'hépatite aiguë à 20 semaines de vie, mais leur survie sans signe clinique d'hépatite aiguë a été significativement améliorée (Figure 36). En ce qui concerne l'évolution des marqueur de maladie de Wilson, la COA ne s'est pas normalisée, mais les rats ont présenté sur une plusieurs prises de sang des signes de normalisation du REC.

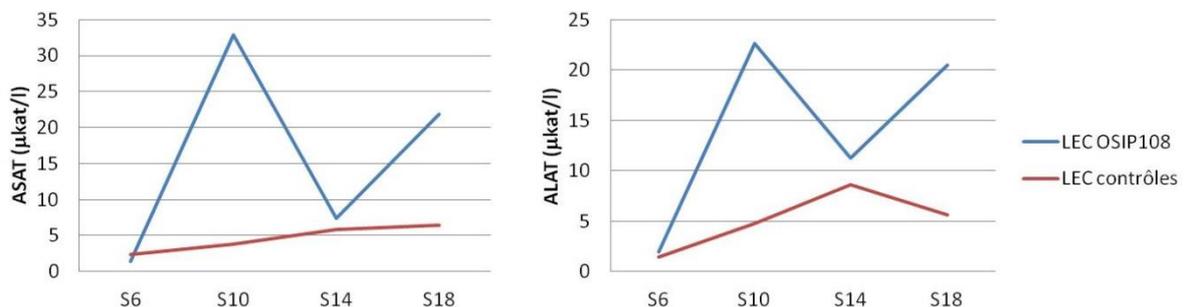


Figure 35: Evolution des marqueurs de cytolysé hépatique entre 6 et 18 semaines d'âge chez les rats LEC injectés avec le vecteur lentiviral codant pour le peptide OSIP108, comparé à des rats MEC contrôles.

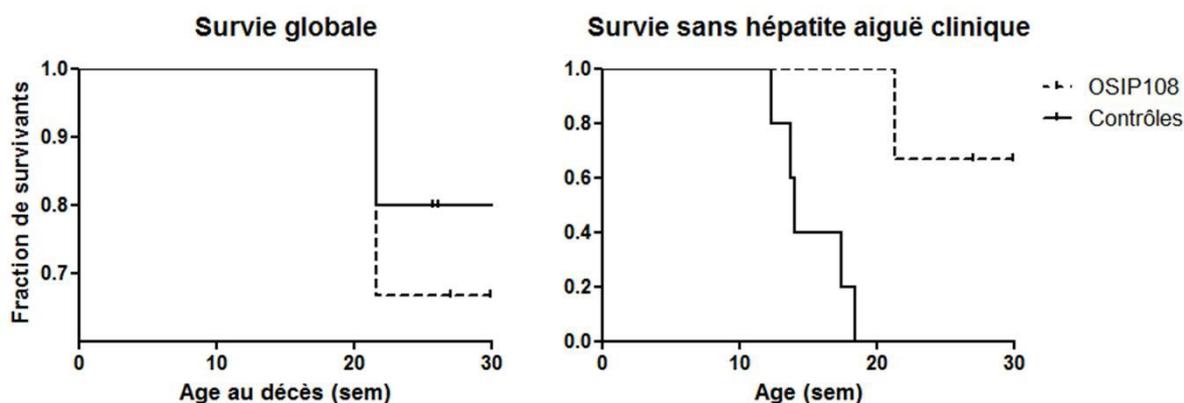


Figure 36 : Courbes de survie globale et de survie sans signes cliniques d'hépatite aiguë des rats LEC traités par injection de vecteur lentiviral codant pour le peptide OSIP108, et rats LEC contrôles.

II.3.1.3 - Conclusions

Cette expérimentation préliminaire a mis en évidence l'existence d'un effet bénéfique potentiel de l'injection du VL-OSIP108 chez les rats LEC, avec une survie sans HA clinique augmentée, même si elle n'a pas été corrélée à l'hépatite biologique retrouvée. L'action du peptide OSIP108 ne passant pas par la restauration d'une protéine ATP7B fonctionnelle, il n'y a pas eu d'augmentation objective de la COA, mais le REC a été retrouvé normalisé chez plusieurs animaux, phénomène encore non expliqué puisque l'action de détoxification du peptide OSIP108 ne passerait pas par l'élimination du cuivre hépatocytaire et que les variations du CuExc ont été comparables dans le groupe traité et dans le groupe contrôle.

II.3.2 - ADMINISTRATION D'UN VECTEUR LENTIVIRAL CODANT POUR LE CDNA DU GENE ATP7B

Préalablement à toute application *in vivo*, le vecteur lentiviral codant pour l'ATP7B a été testé par infection de cellules Huh7 en culture, et il a été créé une lignée de cellules stables. L'extraction des protéines de ces cellules a permis de retrouver de la protéine ATP7B par technique ELISA (anticorps monoclonal de souris anti-ATP7B, Abnova), ce qui a été confirmé par immunofluorescence indirecte (anticorps polyclonal de lapin anti-ATP7B, Abnova) sur cellules mises sur lame par cyospin. La fonctionnalité de la protéine sur cellules en culture a ensuite été analysée par un test de survie cellulaire en milieu à concentrations croissantes en chlorhydrate de cuivre, mais les cellules infectées n'ont jamais montré une meilleure survie en milieu toxique que les cellules contrôle non infectées.

II.3.1.1 - Protocole expérimental

Une première dose de vecteur lentiviral de $0,6E+07$ pi/g a été injectée par voie systémique à 4 rats LEC (groupe 1), deux mâles et deux femelles âgés de 4-5 semaines. Un groupe contrôle (groupe C) injecté avec du PBS a également été mis en place. La surveillance mensuelle de ces rats s'est faite par évaluation clinique de la survenue de signes cliniques d'hépatite aiguë, par dosages de marqueurs biologiques dans le sérum et par biopsies de foie à 7 jours, 8 mois de l'injection et au décès.

Après 10 mois de suivi de ces rats et au vu des résultats préliminaires obtenus, il nous a semblé nécessaire d'augmenter le taux de transduction hépatocytaire initial, afin d'obtenir une efficacité thérapeutique plus précoce. Trois autres groupes de rats ont donc reçu successivement du VL-ATP7B:

- Le groupe 2 (n=4 rats) a été injecté de la même manière mais à une dose 5 fois supérieure ($3E+07$ pi/g). Le taux de transduction initial attendu était estimé à 15%. Leur suivi a été le même que pour le groupe 1.
- Le groupe 3 (n=5 rats) a été injecté en LIL à la dose de $0,6E+07$ pi/g, avec un taux de transduction initial présumé de 25-30%. Le suivi de ces rats n'a pas inclu de biopsies hépatiques itératives du fait des accolements post-opératoires présents dans la région hépatique après une injection en LIL.
- Le groupe 4 (n=10 rats) était composé de rats LEC nouveau-nés qui ont été injectés par voie systémique (veine temporale) à la dose de $5E+07$ pi/g, avec un taux initial de transduction hépatique attendu de 20-25%. Parmi ces rats, 5 étaient vivants au moment du sevrage et ont pu être suivis au long cours. Les modalités de ce suivi étaient superposables aux groupes précédents, avec une première biopsie hépatique réalisée vers 22 semaines de vie.

II.3.1.2 - Evaluation de l'efficacité de transduction

L'efficacité de transduction a été évaluée en cours de suivi par des biopsies hépatiques à 7 jours dans les groupes 1 et 2, puis à 8 mois dans le groupe 1 et au sacrifice dans le groupe 2, à 5 mois dans le groupe 4 (stade post-hépatite permettant d'évaluer également le degré de fibrose comparativement aux rats du même âge injectés en LIL avec du VL-GFP) et seulement au sacrifice dans le groupe 3, où les adhérences postopératoires induisent une "fusion" des lobes hépatiques en un seul bloc et ne permettent pas de réaliser une biopsie

chirurgicale sans risque hémorragique important. Les résultats individuels de chaque rat ont été résumés dans le tableau XII.

La quantification du nombre de copies de vecteur présentes dans le génome hépatique en qPCR, dans les groupes où deux prélèvements ont été réalisés, était superposable à court et long terme. Il a été retrouvé des taux moyens de 16,9% +/- 7,2% et 17,7% +/- 5,7% d'hépatocytes transduits à J7 dans les groupes 1 et 2 respectivement, avec une grande variabilité interindividuelle mais significativement plus élevés que dans le groupe contrôle (1,2% +/- 1,9%, p=0,03), alors qu'il n'y avait que 8,2% +/- 11,6% à 5 mois dans le groupe 4 (Figure 37A.).

La présence de protéine ATP7B a été retrouvée par ELISA chez tous les rats du groupe 1 et les deux rats survivants du groupe 2. En immunofluorescence indirecte sur coupes de foie cryopréservées, moins de 1% de cellules positives ont été comptées dans le foie des 6 rats injectés avec du LV-ATP7B et prélevés à J7 (groupes 1 et 2), en position plutôt centrolobulaire. Sur les biopsies hépatiques réalisées à huit mois de vie chez les deux rats survivants du groupe 1, il a été retrouvé des nodules de régénération entièrement composé de cellules exprimant la protéine ATP7B (Figure 37B), alors qu'aucune cellule ATP7B+ n'a été mise en évidence dans le groupe C. Des travées d'hépatocytes ATP7B+ ont également été mises en évidence dans le foie du rat C50 (groupe 2) au sacrifice à 13 mois, et chez deux des 3 rats du groupe 4 biopsiés à 5 mois.

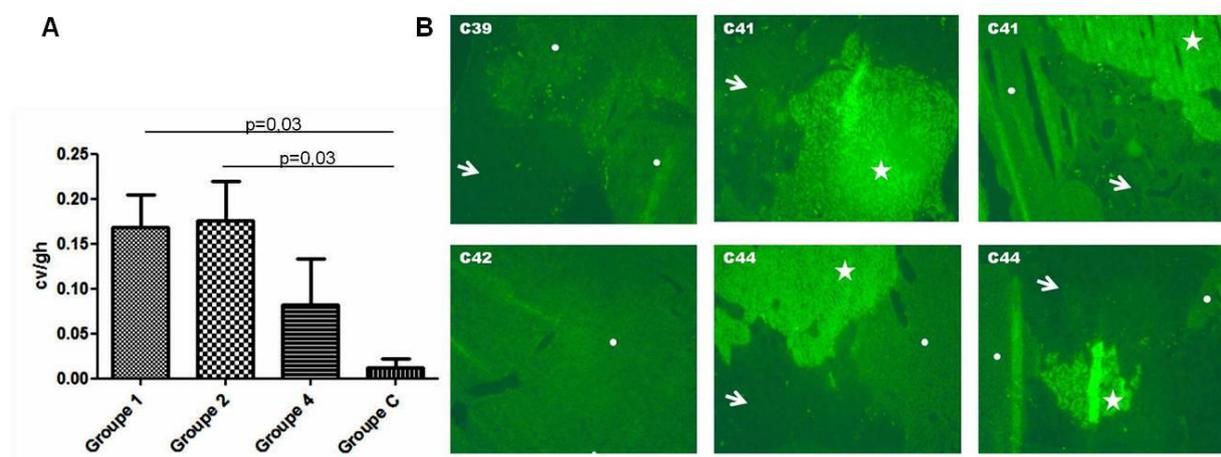


Figure 37: Recherche de l'efficacité de transduction hépatique après injection avec du vecteur lentiviral codant pour l'ATP7B. **A:** quantification du nombre de copies de vecteur par génome haploïde (cv/gh) en qPCR. **B:** immunofluorescence indirecte anti-ATP7B sur biopsies hépatiques à 8 mois dans les groupes 1 (rats C41 et C44) et C (rats 39 et C42). La flèche blanche marque les zones de fibrose hépatique, le point blanc les nodules de régénération non transduit, et l'étoile blanche les nodules d'hépatocytes transduits.

II.3.1.3 - Evaluation de la fonctionnalité de la protéine ATP7B dans le foie

La restauration d'une activité ATP7B hépatique suffisante pour avoir un retentissement systémique a été évaluée par dosages mensuels de deux marqueurs sériques de la MW, l'activité oxydase de la céruléoplasmine (COA) et le cuivre changeable relatif (REC). A court terme (7 jours), deux rats du groupe 1 ont présenté une normalisation du taux de COA, mais sans effet concomitant sur le REC et qui ne s'est pas maintenue sur les prises de sang des mois suivants (Tableau XII). Aucun rat des trois autres groupes injectés avec du VL-ATP7B n'a présenté d'amélioration du REC et de la COA à court terme. Parmi les 4 rats des groupes 1 à 3 qui ont survécu plus de huit mois, il est apparu à long terme une restauration définitive de la COA et du REC chez deux d'entre eux, et de la COA uniquement chez un troisième (Tableau XII). Les rats du groupe 4, encore en suivi, n'ont pour l'instant pas montré de restauration de la COA à 8 mois post-injection.

II.3.1.4 - Effets sur la survie et le délai d'apparition de l'hépatite aiguë clinique

La thérapie génique par injection de VL-ATP7B n'a pas eu d'efficacité sur la survie globale des différents groupes d'animaux comparés au groupe C (Figure 38A). Ainsi, les médianes de survie étaient respectivement de 231,5 et 125 jours dans les groupes 1 et 3, contre 306 jours dans le groupe C ($p=0,57$). Les décès postopératoires étaient comptés comme événements censurés et le suivi des groupes de rats s'est achevé après 60 semaines par sacrifice des rats survivants.

Il n'y a pas eu non plus d'amélioration de la survie sans hépatite aiguë clinique dans les 4 groupes de rats ATP7B comparés au groupe C (Figure 38B). Tous les rats ont présenté un ictère cutanéomuqueux entre 9 et 20 semaines. Les médianes de survie sans hépatite aiguë étaient de 102 jours, 100 jours et 85 jours respectivement dans les groupes 1, 3 et 4, contre 120 jours dans le groupe C ($p = 0,11$). Il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les valeurs médianes des ASAT, des ALAT, de la bilirubinémie et du CuExc entre les rats des groupes 1 à 4 et ceux du groupe contrôle, à âge égal (Figure 39). Il n'a pas non plus été retrouvé d'amélioration des valeurs médianes maximales de ces 4 paramètres chez les rats traités avec le VL-ATP7B par rapport à ceux du groupe contrôle. Enfin, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la précocité ou l'intensité de l'hépatite aiguë et la restauration au long cours d'une protéine ATP7B fonctionnelle.

L'analyse des dosages du cuivre dans le foie des rats des groupes 2 et 3 a retrouvé des concentrations allant de 5,88 à 13,02 $\mu\text{mol/g}$, compatibles avec celles retrouvées au même âge chez des rats LEC non traités (Tableau XII). De même, la quantification de la fibrose hépatique au sacrifice a montré un taux de fibrose médian de 11,5% [6,1% - 15,7%] chez les rats traités des groupes 1 à 3, correspondant aux valeurs retrouvées chez des rats de plus de six mois sans traitement de la MW et sans restriction cuprique alimentaire (médiane de fibrose à 16,67 [1,05 - 50,9], ns). Par contre, cette valeur était significativement augmentée par rapport aux rats du même âge sous aliment sans cuivre C1041 (médiane de fibrose à 1,8% [0,8 - 4,5], $p=0,001$), ainsi qu'avec les rats LEC traités par trientine et acétate de zinc dont les score de fibrose médians étaient de 2,16% [1,36 - 3,29] ($p=0,0007$) et 1,62% [1,41 - 2,01] ($p=0,016$).

L'analyse histologique des foies sur biopsies ou au sacrifice a retrouvé des lésions d'hépatite chronique active compatibles avec l'âge respectif des rats, de même que la quantification numérique de la fibrose (Tableau XII). Les biopsies les plus précoces faites à 5 mois dans le groupe 4 retrouvaient ainsi des lésions très discrètes de fibrose septale, alors que les rats âgés de 8 mois ou plus présentaient tous des plages plus ou moins étendues de fibrose intense ou mutilante majeure (F3 à F4) avec prolifération ductulaire, semée de nodules de régénération, et pour les rats des groupes 1 et C un état pré-cirrhotique ou de cirrhose avérée. Aucun foyer de carcinome hépatocellulaire n'a été mis en évidence.

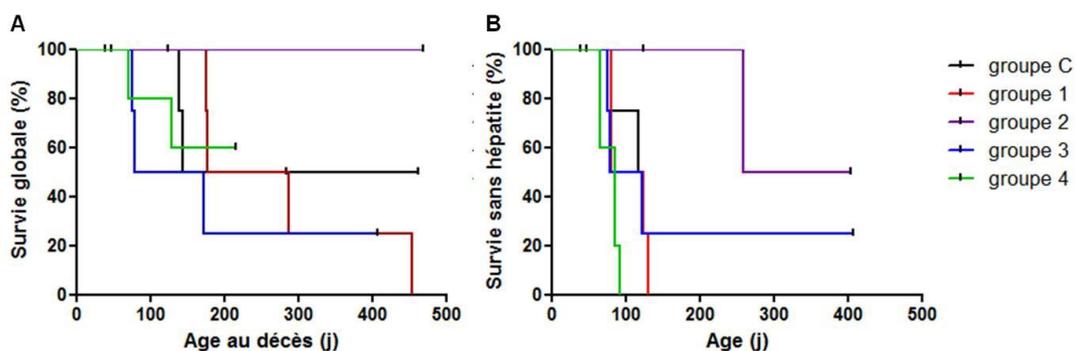


Figure 38: Courbes de survie et de survie sans hépatite aiguë clinique des différents groupes de rats LEC injectés avec du vecteur lentiviral codant pour l'ATP7B. **A:** survie globale des rats en fonction de leur âge en jour. **B:** survie sans hépatite aiguë clinique.

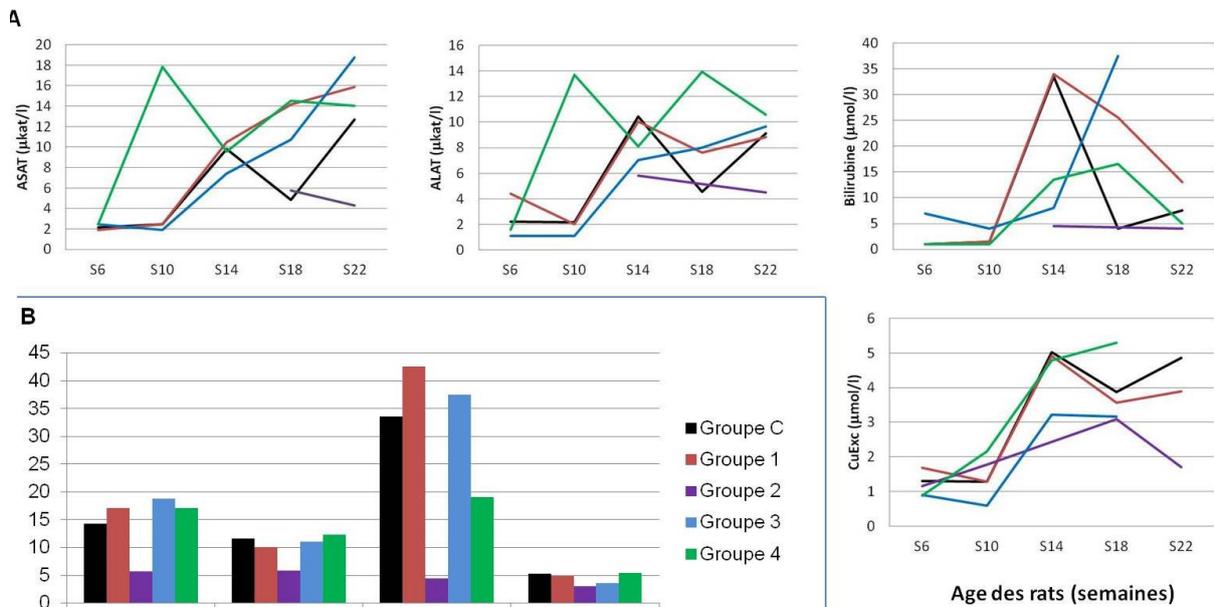


Figure 39: Evolution des valeurs médianes des marqueurs sériques d'hépatite aiguë dans les différents groupes de rats Long-Evans Cinnamon traités par du vecteur lentiviral codant pour l'ATP7B. **A:** Evolution des valeurs des transaminases hépatiques (ASAT et ALAT), de la bilirubinémie et du cuivre échangeable (CuExc) au cours du temps dans les 5 groupes de rats. L'âge des rats est donné entre 6 et 22 semaines (S6 à S22). **B:** valeurs médianes maximales des 4 mêmes marqueurs sériques dans les groupes de rats LEC.

II.3.1.5 - Conclusions

L'injection de VL-ATP7B à différents groupes de rats LEC jeunes à des doses croissantes, par voie systémique ou en LIL, a permis d'objectiver l'existence d'une bonne intégration du cDNA plasmidique du hATP7Bco dans les hépatocytes, avec un maintien des copies du transgène dans le temps, malgré la régénération hépatocytaire liée à l'hépatite chronique. L'expression de la protéine ATP7B a été objectivée par méthodes immuno-enzymatiques, avec une augmentation de l'expression de celle-ci dans le temps. Ce résultat est corrélé à l'apparition d'une correction phénotypique biologique, puisque la restauration de taux normaux de COA et de REC a pu être mise en évidence chez des 3 des 4 rats ayant survécu plus de huit mois.

Néanmoins, ce traitement n'a pas eu d'effet sur la survie ou la survie sans maladie des animaux. Les valeurs maximales des transaminases et de la bilirubine n'ont pas été diminuées au cours de l'épisode d'hépatite aiguë inaugural, et la thérapie génique ne semble pas avoir modifié l'évolution de la phase d'hépatite chronique active, avec développement d'une fibrose hépatique sévère identique à celle de rats non traités; il n'a enfin pas été objectivé de diminution significative de la concentration tissulaire hépatique en cuivre.

Tableau XII: Récapitulatif des principaux résultats obtenus chez les rats Long-Evans Cinnamon traités avec le vecteur lentiviral codant pour l'ATP7B, comparés à leurs contrôles.

Groupe	Rat	Sexe	Age à l'injection	Type d'injection	Age aux premiers signes d'HA (sem)	Age au décès (semaines)	Marqueurs sériques de la Maladie de Wilson						qPCR sur biopsie hépatique		Présence de protéine ATP7B sur biopsie hépatique				Autres analyses du foie				
							COA (U/l)			REC (%)					ELISA		Immuno-fluorescence indirecte		Age	Teneur en cuivre (mmol/g)	Aire de fibrose (%)	Histologie	
							7 sem	8 mois	13 mois (sacrifice)	7 sem	8 mois	13 mois (sacrifice)	Age (sem)	cv/gh	Age (sem)	ATP7B	Age	ATP7B					
C	C38	Male	5 sem	PBS, VCI	19	21	0	/	/	35	/	/	7	0,002	7	-	8 mois	/	/	/	/	/	/
	C39	Male	5 sem	PBS, VCI	18	63 (sacrifice)	0	0	6,9	38	25	26	7	0,04	7	-	8 mois	-	8 mois	/	17,5	F4; C+	
	C42	Femelle	5 sem	PBS, VCI	17	41 (post-op)	0	57	/	29	35	/	7	0,001	7	-	8 mois	-	8 mois	/	1,8	F4	
	C43	Femelle	5 sem	PBS, VCI	11	20	2,3	/	/	44	/	/	7	0,007	7	-	8 mois	/	/	/	/	/	
1	C40	Male	5 sem	LV-ATP7B,	18	26	9,9	/	/	35	/	/	7	0,124	7	+	/	/	/	/	/	/	
	C41	Male	5 sem	LV-ATP7B,	19	42	13,2	33	/	30	21	/	7	0,119	7	+	8 mois	++	8 mois	/	15,7	F4; C+	
	C44	Femelle	5 sem	LV-ATP7B,	11	63	44,2	88,4	31,9	37	13	14	7	0,273	7	+	8 mois	++	8 mois	/	11,5	F4	
	C45	Femelle	5 sem	LV-ATP7B,	11	25	47,7	/	/	41	/	/	7	0,159	7	+	/	/	/	/	/	/	
2	C49	Male	5 sem	LV-ATP7B,	/	5 (post-op)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	C50	Male	5 sem	LV-ATP7B,	36	67 (sacrifice)	0	4,1	0	26	21	26	7	0,219	7	+	13 mois	+	13 mois	5,88	8,58	F2-F3	
	C51	Femelle	5 sem	LV-ATP7B,	/	5 (post-op)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	C52	Femelle	5 sem	LV-ATP7B,	/	18 (sacrifié par erreur)	0	/	/	25	/	/	7	0,132	7	+	/	/	18 sem	/	3,4	NC	
3	C73	Femelle	6 sem	LV-ATP7B,	/	6 (per-op)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	C74	Femelle	6 sem	LV-ATP7B,	10	11	4,7	/	/	50	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	C75	Male	6 sem	LV-ATP7B,	11	11	4,1	/	/	48	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	C76	Male	6 sem	LV-ATP7B,	/	58 (sacrifice)	13,4	4,8	119,7	42	62	18	58	1,4	/	/	13 mois	-	12 mois	13,02	13,7	F2-F3	
	C77	Male	6 sem	LV-ATP7B,	17	24	10,3	/	/	53	/	/	/	/	/	/	/	/	24 sem	9,96	6,1	F2	
4	C201	Male	4 jours	LV-ATP7B, VQ	13	...	0	3,1	51	/	/	22	0,142	/	/	5 mois	+	5 mois	/	1,43	F0-F1		
	C202	Male	4 jours	LV-ATP7B, VQ	12	...	0	14,6	51	/	/	22	0,002	/	/	5 mois	+	5 mois	/	2,3	F1		
	C203	Male	4 jours	LV-ATP7B, VQ	12	...	0	0,4	62	/	/	22	0,001	/	/	5 mois	-	5 mois	/	2,58	F2		
	C204	Femelle	4 jours	LV-ATP7B, VQ	9	18	0	/	63	/	/	18	0,005	/	/	/	/	4 mois	/	11,1	F3-F4		
	C205	Femelle	4 jours	LV-ATP7B, VQ	9	10	0	/	53	/	/	10	0,259	/	/	/	/	/	/	/	/	/	

Le type d'injection décrit à la fois le contenu (PBS ou VL-ATP7B) et la voie d'injection: veine cave inférieure (VCI) ou veine de la queue (VQ) pour les injections systémiques, LIL pour l'injection en foie isolé en hyperpression. Sont ensuite fournies les valeurs à court et long terme du dosage de l'activité oxydase de la céruléoplasmine (COA) et du cuivre échangeable relatif (REC), marqueurs diagnostics de la maladie de Wilson, les valeurs en rouge étant normalisées. Enfin, les résultats des analyses effectuées sur le foie sont données en nombre de copies de vecteur par génome haploïde (cv/gh) en qPCR, et en présence (+) ou absence (-) de protéine ATP7B sur les analyses en ELISA ou immunofluorescence indirecte.

DISCUSSION

III.1 - MARQUEURS BIOLOGIQUES DE SUIVI CHEZ LE RAT LONG-EVANS CINNAMON

La souche des rats LEC a été beaucoup explorée au cours des années 1980-90, où le continuum hépatite aiguë vers 4 mois de vie, hépatite chronique active chez les survivants avec évolution de la fibrose en cirrhose et CHC a été clairement établi (Masuda, Yoshida et al. 1988; Suzuki, Kanno et al. 1995; Betto, Kaneda et al. 1996). Néanmoins, aucune de ces études n'a cherché à définir de normes reproductibles et fiables, cliniques, histologiques ou biologiques, permettant d'assurer un suivi de l'évolution de la pathologie hépatique dans cette espèce. Ainsi, il n'existe pas dans la littérature de score clinique d'hépatite aiguë décrit chez les rats LEC, sauf une progression en trois stades, mêlant histologie, biologie et clinique, proposée par l'équipe de Kasai *et al.* (Kasai, Osanai et al. 1990). Nous avons donc dans un premier temps cherché à établir un score de sévérité de l'HA chez les rats LEC, basé uniquement sur des données cliniques observationnelles, en retenant trois critères. Le premier concernait l'extension de l'ictère cutanéomuqueux, et les deux suivants des caractères de souffrance animale, la réaction au stimulus et l'évolution du poids (Carstens and Moberg 2000).

De même, il n'a été retrouvé qu'un seul article proposant une fourchette des valeurs normales et pathologiques chez le rat LEC des marqueurs sanguins d'HA classiquement utilisés, les transaminases hépatiques et la bilirubine, sans étude précise de leur fiabilité (Fong, Gonzalez et al. 2004). Nous avons donc affiné ces normes en comparant les valeurs de ces marqueurs biologiques avant et pendant l'épisode d'HA et établi les valeurs-seuil de pathologie par courbes ROC, ainsi que leurs sensibilités et spécificités respectives (Schmitt, Podevin et al. 2013).

Nous avons ensuite testé deux marqueurs sériques de diagnostic non invasif de la MW, la COA et le REC, en comparant leurs valeurs chez des rats LEC et celles des rats Long-Evans. L'activité oxydase de la céruléoplasmine avait déjà été utilisée comme marqueur d'efficacité dans des essais précliniques de thérapie génique chez le rat LEC, où il était indiqué soit une fourchette de valeurs normales établie chez des rats Long-Evans Agouti (Meng, Miyoshi et al. 2004), soit aucune valeur de référence normale (Terada, Nakako et al. 1998; Merle, Encke et al. 2006). Le REC est un nouveau marqueur décrit récemment chez l'homme comme étant plus fiable que les marqueurs utilisés jusqu'ici, la cuprémie et la

cuprurie des 24 heures (El Balkhi, Trocello et al. 2011). Nous l'avons donc étalonné chez le rat LEC et avons démontré sa fiabilité avec une sensibilité de 97,3% et surtout une spécificité de 100%. Nous avons de plus établi qu'il restait un excellent marqueur diagnostique de MW sous traitement par chélateurs du cuivre ou sels de zinc, tout aussi performant que la COA, ce qui n'avait jamais été prouvé dans la littérature et ce qui n'est pas le cas du cuivre sérique total et de la cuprurie chez l'homme, rendant un diagnostic de MW nécessaire avant tout traitement (Weiss, Gotthardt et al. 2011; Aggarwal and Bhatt 2013).

Le développement de lésions de fibrose hépatique et de cholangiofibrose a été mis en évidence depuis longtemps chez le rat LEC, mais sans que la cinétique d'apparition de ces lésions (Masuda, Yoshida et al. 1988; Suzuki, Kanno et al. 1995), ni que le degré d'extension de celles-ci ne soit apprécié autrement que de manière qualitative sur coupes histologiques. Le développement récent de nouveaux outils de quantification du degré de fibrose, comme l'analyse morphométrique numérique semi-automatique (Boursier, de Ledinghen et al. 2014), nous a permis de proposer une courbe de cinétique d'apparition de la fibrose chez le rat LEC précise, avec un pourcentage de fibrose de moins de 3% avant hépatite aiguë et une extension rapide des lésions entre 5 et 7 mois, allant jusqu'à 18-20% avant de se stabiliser définitivement. Néanmoins, l'hétérogénéité des lésions visible sur l'aspect macroscopique du foie au sacrifice ne permet pas d'extrapoler les données numériques obtenues à partir de l'analyse de quelques lames à l'ensemble du foie sans perte importante de fiabilité, et il nous semble donc que la quantification par aire de fibrose doit être utilisée uniquement pour des pourcentages de fibrose inférieurs à 10% avec un foie macroscopiquement homogène. Nous avons également établi qu'un régime déficient en cuivre, ainsi que les traitements bien conduits par triéthylènetétramine et acétate de zinc, permettaient de réduire le pourcentage de fibrose hépatique, alors qu'en cas de lésion préalable avérée, les traitements anti-fibrosants (NAC et silymarine) ne montraient pas d'effet positif. L'analyse histo-pathologique des lames est actuellement en cours et nous permettra de mieux définir la cinétique d'apparition des lésions morphologiques. Des résultats partiels retrouvent des lésions de fibrose très différentes de celles existant dans le foie humain, rendant l'utilisation de scores validés comme le score METAVIR (Bedossa and Poynard 1996) non applicable. En première approche, il a donc été proposé l'établissement d'un score en 4 grades de sévérité de la fibrose, mais qui doit être affiné avant toute utilisation validée future. La lecture des lames des rats les plus vieux nous permettra également de caractériser les éventuelles lésions néoplasiques présentes, afin d'évaluer chez les rats traités par thérapie génique s'il y a eu un effet bénéfique sur la

carcinogénèse hépatique. Enfin, ces études anatomo-pathologiques vont nous permettre d'évaluer chez le rat LEC l'utilisation de différentes mesures non invasives de la fibrose hépatique, comme le FibroScan et l'ARFI, techniques de mesure externe de l'élasticité du foie (Afdhal 2012; Karlas, Hempel et al. 2012; Cales, Boursier et al. 2014), ainsi que le FibroMètre, basé sur un algorithme prenant en compte différents marqueurs sanguins de la fonctionnalité du foie (Cales, de Ledinghen et al. 2013) et déjà testé sur certaines souches de rats (Yan, Lin et al. 2011). Ceci permettra par la suite de pouvoir effectuer un suivi de l'évolution de la fibrose hépatique chez ces rats de manière non invasive et reproductible au cours du temps.

III.2 - LA TECHNIQUE D'INJECTION EN FOIE ISOLE EN HYPERPRESSION, ESSAIS ET ERREURS

Dans la thérapie génique *in vivo* du foie, il existe une double problématique, puisqu'il faut en même temps obtenir le taux de transduction hépatocytaire le plus élevé possible tout en garantissant la biosécurité du patient, en prévenant en particulier toute dissémination extra-hépatique qui pourrait potentiellement mener au développement de tumeurs d'organes liées à une insertion ectopique du transgène. Depuis plusieurs années, notre équipe a cherché à développer un modèle d'injection ciblée du vecteur dans le foie, en ischémie et hyperpression contrôlée permettant d'augmenter d'un facteur 10 le taux de transduction initial dans le foie (Dariel, Nguyen et al. 2009; Schmitt, Flageul et al. 2010) tout en limitant la dissémination extra-hépatique par une diminution du relarguage des vecteurs dans la circulation systémique (Cardoso, Branchereau et al. 1993; Dariel, Nguyen et al. 2009).

La durée optimale d'ischémie-hyperpression et le volume ainsi que la pression d'injection ayant déjà été fixés auparavant (Dariel, Nguyen et al. 2009), nous avons cherché à améliorer encore le taux de transduction initial en modifiant des paramètres du milieu d'injection du VL. Il fallait *a priori* ne pas altérer le potentiel d'infectivité des VL, en changeant des paramètres comme le pH ou la température. C'est pourquoi nous nous sommes intéressé à la viscosité du milieu afin de la rapprocher de celle du sang. En effet, il a été démontré que les globules rouges, en passant dans les sinusoides hépatiques, induisaient un phénomène de "massage endothélial", poussant mécaniquement les grosses particules comme les lipoprotéines au travers des fenestrations endothéliales (Braet and Wisse 2002). Nous avons donc tenté de recréer cet effet en ajoutant par autotransfusion des érythrocytes à une

concentration donnée au milieu d'injection du VL. Nous avons aussi essayé d'utiliser un polysaccharide, le Ficoll® 70 PM, qui augmente la viscosité sans modifier la pression osmotique et qui est bien toléré *in vivo* (Winding 1981; Sorensson, Ohlson et al. 2001; Venturoli and Rippe 2005). La tolérance de ces deux procédures *in vitro* et *in vivo* a été excellente, mais il n'y a pas eu d'effet positif constaté sur la transduction hépatique, en immunohistochimie anti-GFP comme en qPCR, après injection en LIL de VL-GFP chez le rat. Au contraire, les taux de cellules transduites étaient significativement plus faibles qu'avec un milieu d'injection classique. Ceci pourrait s'expliquer par une liaison des particules lentivirales sur la membrane des GR dont la surface est pourvue de récepteurs à la phosphatidyl sérine (Setty, Kulkarni et al. 2002), à laquelle se lie facilement la protéine d'enveloppe VSVg du VL (Schlegel, Tralka et al. 1983; Copreni, Castellani et al. 2008); la formation de complexes volumineux GR-VL dans le sang pourrait avoir ainsi inhibé le passage du VL dans l'espace de Disse. L'utilisation de Ficoll® 70 PM en adjuvant à l'infection de cellules en culture permettait une augmentation de la viscosité de 15%, et avait montré un effet bénéfique sur l'efficacité de transduction, potentiellement dû la formation de pseudopolycations de faible charge positive induisant une répulsion électrostatique des VL vers les cellules (Shah and Dubin, 1995; Wang and Dubin, 1998; Fissell, Hofmann et al. 2010). Néanmoins, cet effet ne s'est pas confirmé après injection *in vivo*: les particules polymériques, neutres vis à vis de l'adhésion des VL mais n'ayant pas la même déformabilité que les GR, n'ont pas joué le même rôle de "rouleau-compresseur" et de répulsion électrostatique dans les sinusoides hépatiques.

Chez les êtres humains et les primates non humains, il existe en outre une immunité non spécifique systémique développée contre la protéine d'enveloppe VSVg couramment utilisée dans les VL, médiée par le complément et par réaction humorale (DePolo, Reed et al. 2000; Sandrin, Boson et al. 2002) et qui, en l'absence de modèle de petit animal de cette immunisation spontanée n'a pas été réellement prise en compte dans les essais précliniques de TG par vecteurs lentiviraux. Nous avons donc immunisé des rats contre la VSVg par injection systémique d'un VL, puis avons testé l'efficacité de la technique d'injection LIL sur la restauration d'une transduction hépatique dans ce modèle de rat. En effet le LIL, en isolant le foie de la circulation sanguine, diminue le volume sanguin en contact avec le VL d'environ 80% et pourrait ainsi permettre une moindre inhibition des particules pseudotypées VSVg. Afin de diminuer encore la quantité de sérum en contact avec le VL, nous avons également adjoint une étape de lavage hépatique avant injection du VL en LIL. L'injection en LIL a

effectivement permis de maintenir un taux de transduction hépatique chez les rats immunisés, équivalent à celui obtenu par injection en VP chez des rats non immunisés contre la VSVg, alors qu'une injection de ce type n'avait aucune efficacité après vaccination. Par contre, l'adjonction d'un lavage hépatique a empêché toute transduction ultérieure. Nos hypothèses pour expliquer cet effet sont une inhibition potentielle de l'effet de massage endothélial par les GR et/ou une diminution de la température dans le foie qui peut ralentir l'entrée du VL dans les cellules.

En ce qui concerne la prévention de la dissémination extra-hépatique des particules infectieuses, cette même étude n'a pas permis de retrouver l'efficacité du LIL seul, mais l'addition d'une étape de lavage post-infusion du VL dans le foie par du NaCl 0,9% semble avoir été efficace pour diminuer le nombre de particules retrouvées dans le sang quelques minutes après déclampage, sans altération du taux de transduction hépatocytaire. Par contre, un lavage hépatique au sérum hépariné semble avoir été plutôt délétère sur la transduction hépatique. Son utilisation découlait de la capacité de l'héparine à inhiber de manière compétitive l'attachement de la VSVg sur les récepteurs cellulaires (Guibinga, Miyanohara et al. 2002), qui devait permettre de renforcer l'effet de flush des particules lentivirales au lavage, mais a été probablement administrée de façon trop précoce, avant l'entrée du VL dans les hépatocytes.

A contrario, la pré-immunisation des rats contre la VSVg a totalement inhibé la dissémination extra-hépatique du VL, quelle que soit la voie d'injection du vecteur, par simple contact avec la circulation systémique, et il n'a été retrouvé ni particule infectieuse résiduelle dans le sérum après 5 minutes, ni ADN du vecteur dans les organes testés des rats.

Ces études démontrent donc tout le potentiel futur de l'utilisation de l'immunité innée contre la VSVg chez les primates dans la prévention de la dissémination systémique du VL, à condition d'utiliser la voie d'injection en LIL, éventuellement associée à un lavage post-infusion du vecteur, ce qui est applicable en essai clinique par des techniques endovasculaires avec utilisation de cathéters à ballonnets (Khorsandi, Bachellier et al. 2008).

III.3 - THERAPIE GENIQUE *IN VIVO* DE LA MALADIE DE WILSON

Comme pour de nombreuses maladies héréditaires du foie, la MW entraîne une destruction progressive du parenchyme hépatique menant à la constitution de lésions d'hépatite chronique avec fibrose puis cirrhose. Le plus souvent, ces maladies sont

diagnostiquées alors qu'il existe déjà des lésions de fibrose hépatique, rendant les possibilités de traitement par thérapie génique plus complexes, du fait du renforcement de la barrière physique entre la circulation sanguine et les hépatocytes (Hilmer, Cogger et al. 2005; DG, Cogger et al. 2007; Yao, Lin et al. 2013), de l'inflammation chronique existante et de la destruction des hépatocytes qui ne permettent pas le maintien au long cours d'un transgène non intégratif (Sobrevals, Enguita et al. 2012). Peu d'essais ont à ce jour porté sur la thérapie génique dans un foie déjà fibrotique, et seule l'équipe de Sobrevals *et al.* a récemment rapporté un premier succès dans la transduction d'un foie déjà fibrotique, par utilisation d'un vecteur intégratif rSV40 ou Simian virus 40 codant l'IGF1 (insulin growth factor 1) (Sobrevals, Rodriguez et al. 2010).

Nous avons donc tenté une première approche de TG par vecteurs lentiviraux dans un foie fibrotique chez le rat LEC, en expérimentant à la fois une voie d'injection classique par la veine porte et la technique LIL, cette dernière étant potentiellement susceptible de forcer mécaniquement le passage au travers des fenestrations persistantes. Nous avons également adjoint à ces essais différentes molécules adjuvantes, susceptibles soit d'induire une diminution au moins partielle de la fibrose septale (Tsai, Liu et al. 2008; Kim, Yang et al. 2012; Mazo, de Oliveira et al. 2013), soit de restaurer un nombre de fenestrations endothéliales plus important pour augmenter les possibilités de passage des VL vers l'espace de Disse (Furrer, Rickenbacher et al. 2011). Ces premiers essais se sont révélés peu concluants, avec un très fort taux de mortalité opératoire (>80%), en VP comme en LIL, et une absence de détection à 7 jours de transduction hépatocytaire, que ce soit sur la détection d'ADN viral en qPCR ou sur l'expression de la protéine GFP. Cependant, le taux de fibrose (jusqu'à 18% à l'injection) et de cirrhose (62% des rats) était plus important que sur nos estimations initiales (2 à 5%), qui correspondait à celui retrouvé en moyenne chez les patients humains. Il sera donc nécessaire de compléter ces études et de tester d'autres voies d'injection comme l'injection rétrograde par la voie biliaire (Gao, Xie et al. 2013) qui permet de s'affranchir du passage de la barrière endothéliale, ou l'injection intra-hépatique directe (Pastore, Nusco et al. 2013).

La mise au point de la TG par vecteurs lentiviraux dans la MW avant la survenue de fibrose hépatique a consisté en premier lieu à établir une courbe dose-réponse à l'injection systémique de VL. Ceci a montré l'existence d'une relation non linéaire entre la quantité de vecteur injectée et le taux de transduction hépatocytaire correspondant, avec une quasi-absence de réponse aux faibles doses, puis une augmentation très rapide de la transduction au-

delà de la dose de 1.10^7 pi/g. Ces résultats sont concordants avec ceux déjà établis concernant la transduction du foie par vecteurs HD-Ad, qui montrent le même type de profil d'expression (Nunes, Furth et al. 1999; Morral, O'Neal et al. 2002).

Les premiers essais avec le vecteur OSIP108 ont permis d'obtenir une amélioration de la survie sans HA clinique, mais ces premières données restent à confirmer, de même que le mode d'action exact du peptide OSIP108 qui agirait comme détoxifiant en diminuant le stress oxydatif de la cellule (Spincemaille, Pham et al. 2014). L'injection d'un VL-ATP7B à des doses plus ou moins élevées a quant à elle démontré la possibilité d'obtenir une transduction hépatocytaire par VL avec un maintien du nombre de copies de l'ADN viral en qPCR et de l'expression du transgène à long terme. Il a été possible d'obtenir une correction phénotypique avec restauration d'un taux normal de COA et/ou de REC chez 3 des 4 rats suivis pendant plus de 8 mois, ce qui n'avait jamais été rapporté jusque là dans les essais de thérapie génique, cellulaire ou de transgénèse préalable (Tableau XIII) et qui traduirait la présence d'une protéine ATP7B fonctionnelle dans plus de 30% des hépatocytes (Merle, Stremmel et al. 2007; Gupta 2014). Néanmoins, il n'a pas été possible d'obtenir une amélioration des signes cliniques, biologiques et histologiques liés à l'existence d'une toxémie cuprique et au développement d'une hépatite chronique active, avec en particulier la survenue d'une HA clinique autour de 14 semaines de vie, un taux de mortalité identique à celui de rats LEC non traités, des taux de cuivre sérique et hépatique pathologiques, et le développement d'une fibrose hépatique extensive. L'apparition d'une correction des marqueurs diagnostiques de la MW à long terme ainsi que l'augmentation progressive du nombre d'hépatocytes ATP7B+ en immunofluorescence indirecte sur biopsies hépatique, avec à terme la présence de nodules de régénération entièrement peuplés de cellules corrigées et à hauteur d'environ 40% de la masse hépatocytaire visualisée, seraient en faveur de l'existence d'un avantage sélectif conféré aux hépatocytes transduits par le VL. En effet, il ne semble pas y avoir de prolifération amplifiée des hépatocytes transduits au cours de la croissance normale du foie, comme en témoigne l'absence de correction massive des rats injectés en période néonatale. Cependant, à partir du moment où il existe une destruction des hépatocytes par toxémie cuprique, les cellules transduites, protégées du stress oxydatif induit, proliféreraient de façon préférentielle, repeuplant progressivement le foie, ce que semble corroborer le fait que de rares cellules ATP7B+ avaient été objectivées à 7 jours de l'injection, contre 40% des hépatocytes formant les nodules de régénération huit mois plus tard. Ces données sont concordantes avec celles obtenues par Mahli *et al.* en 2002 (Malhi, Irani et al. 2002) après injection intra-splénique d'hépatocytes de rats LEA à des rats LEC; il n'avait pas été mis en évidence d'effet clinique

positif 5 mois après transplantation hépatocytaire alors que des ARNm et de la protéine ATP7B étaient détectés dans le foie, mais après 20 mois de suivi une repopulation du foie à 97% par les hépatocytes transduits a été mise en évidence avec une amélioration franche de la COA et de la concentration intra-hépatocytaire en cuivre (Tableau XIII), atteignant des valeurs subnormales. Un essai de transgénèse plus récent (Meng, Miyoshi et al. 2004) a montré l'existence d'une nette amélioration de la survie des rats transgéniques à 60 semaines (taux de survie de 96%), sans survenue de signes cliniques d'HA ni de fibrose hépatique au sacrifice, mais s'il a été détecté la présence de l'expression ARNm et protéique d'ATP7B, il n'y a pas eu de restauration complète de la synthèse d'holocéroléoplasmine et les taux de cuivre sérique et de COA n'ont pas été normalisés. Enfin, deux essais de TG *in vivo* chez le rat LEC ont été rapportés. Le premier, utilisant des vecteurs adénoviraux (Terada, Nakako et al. 1998), a permis d'obtenir à court terme l'expression de la protéine ATP7B, mais avec une disparition très rapide par développement d'une réaction immunitaire contre le vecteur de première génération (non gutless), et une apparition en faible quantité d'holocéroléoplasmine dans le sérum et de cuivre dans la bile, sans correction de la COA et du cuivre sérique. Le second a posé la preuve de principe de la TG par vecteurs lentiviraux chez le rat LEC (Merle, Encke et al. 2006), par injection directe de VL mais aussi d'hépatocytes corrigés *ex vivo*, mais si la présence de protéine ATP7B en faibles quantités a été possible, il n'y a pas eu de correction de la COA, du cuivre intra-hépatique ou de l'histologie du foie à moyen terme. Cette étude ayant été arrêtée au bout de 24 semaines, il n'est pas possible de conclure sur l'apparition d'une efficacité thérapeutique à long terme, ni sur une repopulation progressive du foie par les cellules transduites. Les résultats de ces différents essais sont résumés dans le tableau XIII. Enfin, un dernier essai préclinique par injection de VL chez des fœtus de souris *atp7b* *-/-* a été récemment publié par l'équipe de Roybal *et al.* (Roybal, Endo et al. 2011). Ils ont rapporté la détection de la protéine ATP7B dans le foie à 4 et 20 semaines de vie, ainsi qu'une diminution significative du cuivre hépatique et une histologie préservée à 20 semaines, mais selon nos résultats chez le rat LEC, le délai d'analyse pourrait être un peu court, même chez des souris, pour conclure à une efficacité thérapeutique certaine.

Ces travaux mettent donc clairement en évidence la nécessité d'arriver à un taux initial de transduction hépatocytaire très élevé dans la MW, de l'ordre de 30 à 50% (Ala, Walker et al. 2007; Merle, Stremmel et al. 2007; Schilsky 2009; Gupta 2014). Pour cela, outre l'amélioration de la technique d'injection du vecteur, il sera probablement nécessaire de travailler à l'amélioration de la production du VL afin d'en augmenter le titre tout en

conservant un bon degré de purification. En effet, les techniques de concentration simples induisent une toxicité directe, liée à la présence dans le milieu d'injection de débris cellulaires et protéiques, à l'origine d'une réaction toxique lors de l'injection systémique (Podevin, Otta et al. 2004). Cela a été par exemple le cas au cours de nos travaux lors de l'injection de grandes quantités de vecteur OSIP108, mais a pu être contré par l'injection en LIL qui diminue l'intensité du contact avec le système immunitaire circulant en relâchant progressivement une plus faible quantité de particules virales dans la circulation sanguine au déclampage. Un autre axe de développement serait de coupler les transgènes dans un même vecteur ou dans plusieurs vecteurs co-injectés, afin d'agir non seulement sur la correction génétique du déficit génétique causal de la MW en restaurant l'ATP7B, mais aussi sur différentes conséquences de celui-ci, comme le stress oxydatif avec un gène codant pour OSIP108, ou le développement de la fibrose hépatique avec des miRNA anti-fibrotiques ou anti-TNF α (Chen, Wu et al. 2012; He, Huang et al. 2012; Noetel, Kwiecinski et al. 2012).

Enfin, les contraintes liées à la nécessité d'un taux de transduction élevé, aux phénomènes de régénération hépatocytaire et de fibrose et à la pression de sélection peuvent inciter à explorer dans les années à venir d'autres voies de thérapie génique et cellulaire. Ainsi, les vecteurs AAV ont une grande efficacité de transduction hépatique et ne sont pas immunogènes, mais ils ne peuvent pas être utilisés dans les maladies régénératives du fait de leur non intégration qui induit une perte d'expression du transgène au fil des divisions cellulaires. De plus, ils ne sont pas capables d'intégrer des transgènes de grande taille (Flageul, Aubert et al. 2009), comme le cDNA du gène ATP7B qui fait 4400 pb. Néanmoins, ils pourraient trouver une application dans les prochaines années par développement de stratégies d'édition de gène et de réparation *in situ*, pour des mutations courtes et ciblées, à l'aide de zinc-finger nucleases comme l'a proposé Abarrategui-Pontes *et al.* (Abarrategui-Pontes, Thinard et al. 2014, *in subm*) dans le traitement de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 chez le rat Gunn, ou du système CRISPR/Cas 9 testé pour l'instant sur des hépatocytes *in vitro* (Senis, Fatouros et al. 2014). De même, les vecteurs HD-Ad qui ont de plus grandes capacités d'encapsidation tout en transduisant très efficacement le foie (Montenegro-Miranda, Pichard et al. 2014) mais ne sont pas non plus intégratifs pourraient apporter efficacement des TALE nucléases dans les cellules hépatiques (Holkers, Maggio et al. 2013). En parallèle, une autre voie de recherche très intéressante, surtout au vu des résultats obtenus dans les essais précliniques sur la MW, serait d'utiliser de façon privilégiée la thérapie cellulaire couplée à la thérapie génique, puisqu'il a été montré à terme une repopulation à 97% du foie de rats LEC

par des hépatocytes normaux (Malhi, Irani et al. 2002). Le développement récent des IPSc (Takahashi and Yamanaka 2006), qui permet la reprogrammation de fibroblastes d'un patient en un autre type cellulaire qui peut être entre temps corrigé de son défaut génétique par thérapie génique (Zhang, Chen et al. 2011), pourrait ainsi à terme permettre une transplantation de cellules autologues corrigées et s'affranchir des problèmes d'immunité liés aux greffes hétérologues et de la pénurie de donneurs. Néanmoins, il reste encore beaucoup de travail expérimental préalable à effectuer sur ces cellules (Diecke, Jung et al. 2014) avant d'en envisager une application clinique directe.

CONCLUSION

Au cours de ces travaux, nous avons donc pu successivement:

- 1) Approfondir la caractérisation de la souche du rat Long-Evans Cinnamon, en définissant des normes biologiques d'hépatite aiguë et de diagnostic de la maladie de Wilson dans cette espèce, dont l'utilisation nouvelle du cuivre échangeable relatif, et en définissant mieux la cinétique d'apparition de la fibrose, par utilisation de l'analyse morphométrique numérisée de la fibrose,
- 2) Démontrer l'intérêt de la technique d'injection LIL pour restaurer une transduction hépatique efficace malgré une immunisation préalable contre la protéine d'enveloppe VSVg, qui existe de façon constitutive chez les êtres humains, et
- 3) Prouver la possibilité d'obtenir à long terme une correction phénotypique de la maladie de Wilson chez le rat LEC, mais sans pouvoir prévenir l'apparition de lésions hépatiques dues à la toxémie cuprique.

Il va donc être nécessaire d'adapter notre stratégie pour obtenir un taux de transduction initial très important et pouvoir à terme restaurer la fonction de la protéine ATP7B en quantité suffisante pour prévenir l'apparition de la maladie hépatique, ou éviter son aggravation en cas de fibrose préexistante.

Tableau XIII: Tableau récapitulatif des essais précliniques de thérapie génique et cellulaire chez le rat LEC

ETUDE	VIRUS		RATS			DUREE DU SUIVI	ANALYSES EFFECTUEES (rats LEC corrigés)								
	Type viral	Titre viral	Nb par groupe	Age injection	Type injection		Histologie foie	IFI	WB (174 kDa)	RT-PCR	COA (U/l)	Holo-CPL (PAGE)	Cu sérique (µg/dl)	Cu hépatique (µg/g sec)	Cu biliaire
Merle, Scand J gastro, 2006	LV-PGK-ATP7B	7500 ng p24/ml	3	6-8 sem	VQ	6 mois	S24 : Fibrose septale	J15 : 6 +/- 4% S24 : 4 +/- 3,5%	/	J15 : + S24 : +	J15 : 4-10 S24 : 1, 3, 2, 3	/	/	S24 : 700-2000	/
Terada, J Biol Chem, 1998	Adéno-CAG-ATP7B	1.10 ¹⁰ PFU/rat	NC	4-5 sem	VQ	14 jours	/	J1 : + J3 : ++ J10 : +	J3 : + dans foie	/	J3 : 3 J14 : 2, 3	J3 : ++ J14 : +	J3 : 19 J14 : 15	/	/
Terada, FEBS, 1999	Adéno-CAG-ATP7B	1.10 ¹⁰ PFU/rat	2	6 et 11 sem	VQ	3 jours	/	/	/	/	/	+	/	/	2, 63 ng/min
Meng, Bioch Biophysica Acta, 2004	Rats transgéniques (CAG)		NC	/	/	60 semaines	S60: Foie normal	/	+ dans tous organes	+ dans tous organes	S6: 1 >S12: 10	S10: +	S6: 10 >S12: 75-100	/	S6: 2 µg/min >S12: 11-14 µg/min
Yoshida, Gastroenterology, 1996	Hépatocytes de rats LEA (3.10 ⁶ +		27	7 sem	VP + hépatectomie partielle	30 sem	S30: subnormale	/	/	S30: +	/	/	/	S30: 97	/
Malhi, Gastroenterol, 2002	Hépatocytes de rats LEA (1.10 ⁶ +		19	1-2 sem	Intra-splénique	20 mois	M5: 40% zones saines M20: mieux que non traités	/	/	M5: - M20: 64% rats + (97% hépatocytes +)	M5: 0 M20: 21 +/- 9	/	/	M5: 700-1400 M20: 28 - 270	M5: 16 ng/min (1 rats sur 3) M20: 2, 2
Schmitt, 2014	LV-miTR-ATP7Bco		4	4 à 7 sem	Systémique / LIL	13 mois	S13: ilem non traités	M8: +	/	/	>M8: >30	/	>M8: 32 - 120	370 - 830	/
Valeurs LEC non traités							Cirrhose (Merle) fibrose, cancer	-	-	-	0-8 (Meng)	-	8 (Terada) S6: 10 après 12 sem : >150 (Meng)	59 et + : >250 (Meng) 530: 187 (Yoshida)	1, 1 ng/min (Terada) 2-6 µg/min (Meng) <7 ng/min
[Schmitt 2013]							N: 1-2% fibrose WD: >2,5%				N: >27 WD: <27		N: <66,7 WD: >66,7	/	/
Valeurs rats LEA							Foie normal				S6: 18 >S16: 30-40 (Meng)	+ (Meng)	S6: 100 S12 et + : 160-240 (Meng)	S9: 5 >S13: 13 (Meng) <20 (Malhi) 530: 4, 2 (Yoshida)	10 µg/min (Meng) >8 ng/min (Malhi)

CPL : céruléoplasmine ; COA : activité oxydase de la céruléoplasmine ; Cu: cuivre; LV : lentivirus; LIL: lentivirus in isolated liver injection; VP: veine porte; VQ: veine de la queue. Durées: S ou sem = semaines; M = mois; IFI: immunofluorescence indirecte; WB: western-blot, "+": présence de protéine ou d'ARNm ATP7B.

MATERIEL ET METHODES

IV.1 - BIOLOGIE MOLECULAIRE, CLONAGE ET VECTOROLOGIE

IV.1.1 - DESIGN DES SEQUENCES, PRIMERS, OBTENTION DES SEQUENCES - PFS1 ET PFS2

Le plasmide vecteur "CCLsin.PPT.Enh1mTTR.(AgeSal).Wpre.142-3pT-T13" a été obtenu auprès de la société GeneCust (Luxembourg) par synthèse d'une séquence d'ADN de 1432 bases, comprenant le promoteur mTTR, les sites de restriction AgeI et SalI et les séquences cible du miR142-3p (séquence mTTR(AgeSal)MirTsynthgen). Cette séquence a été clonée en HpaI et KpnI dans le plasmide "CCLsin.PPT.Enh1mTTR.eGFP.Wpre.142-3pT(216)" fourni par l'unité INSERM U948. Il a été utilisé pour le clonage des plasmides pFS1 et pFS2 intégrant les transgènes hATP7Bco et OSIP108 respectivement.

Inserts:

- La séquence du transgène hATP7Bco a été obtenue par double digestion AgeI-SalI à partir du plasmide "pRRL.PPT.SF.ATP7B.i2GFPBsd" fourni par l'équipe du Pr Esteban (Guangzhou, Chine) (Zhang, Chen et al. 2011).
- La séquence du peptide OSIP108 a été obtenue par synthèse de deux oligonucléotides par Eurogentech® (Eurogentec S.A., Seraing, Belgique) :
OSIP 108-F "CCGGTggtttaaacaccATGCTATGTGTGCTTCAAGGTTTAAGGGAGTAGgatatcG" et
OSIP108-R "TCGACgatatcCTACTCCCTTAAACCTTGAAGCACACATAGCATggtgtttaaacA".
Dix millilitres des deux oligonucléotides à 100 mM ont été placés en présence de 20 ml de tampon d'annealing (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM), à 95°C pendant 4 minutes, suivis de 10 minutes à 70°C puis refroidis à température ambiante. La séquence double brin obtenue présentait les caractéristiques listées sur la figure 40.



Figure 40: Carte de restriction de l'insert OSIP108 obtenu par synthèse d'oligonucléotides.

clonage des plasmides vecteurs pFS1 et pFS2

➤ Digestion

Dix microlitres de solution du plasmide "CCLsin.PPT.Enh1mTTR.(AgeSal).Wpre.142-3pT-T13" et 15 µl de solution d'insert hATP7Bco ont été digérés par 1,5 µl de chaque enzyme, AgeI-HF et Sall-HF (New England BioLabs, Evry, France), dans 5 µl de tampon 4 et 17 µl d'eau stérile, une heure à 37°C.

Après vérification des bandes obtenues par migration sur gel de Tris-Acétate-EDTA 1%, les fragments d'ADN ont été récupérés par une étape d'extraction sur gel avec le kit Macherey-Nagel.

➤ Ligation

L'ADN obtenu a été quantifié au Nanodrop et le calcul des ratios de ligation a été fait selon la formule suivante:

$$\text{Qté Insert (ng)} = \text{Taille Insert / Taille Vecteur (pb)} * 3(\text{ratio Insert/Vecteur désiré}) * \text{Qté Vecteur (ng)}$$

Les ligations ont été effectuées avec la T4DNA ligase (New England BioLabs), par mise en présence de 1 µl d'ADN vecteur, le volume calculé correspondant au ratio désiré d'ADN de l'insert, 2 µl de tampon, et 1 µl de T4DNA ligase, dans de l'eau ppi pour un volume total de 20 µl. Le mélange a été placé à 16°C durant une nuit.

➤ Transformation

Cinq microlitres du produit de ligation de chaque ratio ont été dilués dans 30 µl de solution de bactéries Top10 chimiocompétentes (Invitrogen™). Les échantillons ont été placés 30 minutes dans la glace avant d'être exposés à une température de 45°C pendant 90 secondes, avant d'être à nouveau remis dans la glace pendant deux minutes. Ils ont ensuite été re-suspendus dans 250 µl de SOC et placés une heure en incubation à 37°C sous agitation douce. La solution a ensuite été étalée sur boîtes de Pétri contenant un gel de LB-Agar additionné d'ampicilline 1‰ et mise en incubateur à 37°C pendant 24h.

➤ Vérification du plasmide cloné

Les clones bactériens obtenus ont été amplifiés par culture durant une nuit à 37°C en milieu liquide dans 5 ml de LB avec ampicilline. Le culot bactérien a ensuite été obtenu par centrifugation à 12000 rpm pendant 5 minutes.

L'ADN du plasmide pFS1 (ATP7B) a été récupéré à l'aide du kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), selon les instructions du fabricant, et re-suspendu dans 40 µl de tampon Tris-EDTA.

L'ADN du plasmide pFS2 (OSIP108) a été obtenu par précipitation de l'ADN à l'acétate de potassium. Après centrifugation, le culot bactérien a été re-suspendu dans 100 µl de milieu de culture, auquel ont été ajoutés 300 µl de tampon de lyse (0,5 ml SDS 10% + 0,1 ml NaOH 10N dilués dans 9,4 ml d'eau ppi, préparé extemporanément) puis 150 µl de tampon d'acétate de potassium (5M, pH 4,8), mélangés à chaque fois doucement. L'ensemble a ensuite été centrifugé à 13000 rpm pendant 2 minutes, le surnageant a été placé dans un nouveau tube et il y a été ajouté 900 µl d'éthanol absolu préalablement refroidi à -20°C. Après centrifugation à 13000 rpm pendant 5 minutes, le surnageant a été enlevé et le culot séché par papier absorbant. Un deuxième lavage à l'éthanol 70% (1 ml) a ensuite été réalisé, puis le culot a à nouveau été séché pendant 30 minutes sous hotte avant d'être dissout dans 50 µl de Tris-EDTA en incubation d'une heure à 37°C.

Un microlitre de chaque échantillon d'ADN a ensuite été digéré par deux ou trois enzymes de restriction choisies sur la séquence du plasmide attendue de façon à confirmer l'intégration de l'insert en bonne position dans le plasmide vecteur, et dans le sens voulu. Les cartes et profils de restriction de ces deux plasmides sont présentés en Annexe 3.

➤ Culture bactérienne pour production de plasmide à grande échelle (MaxiPrep)

Les plasmides vérifiés ont alors été amplifiés par culture de 500 µl de la solution de pré-culture conservée à 4°C dans 500 ml de LB-ampicilline, à 37°C pendant 24 heures sous agitation douce (250 rpm). Le culot bactérien a été récupéré

par centrifugation de 30 minutes à 3300 rpm (4°C, re-suspendu dans 12 ml de tampon RES (Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Maxi, Macherey-Nagel), puis lysé par ajout de 12 ml de tampon LYS, mélangé par agitation douce et laissé reposer 5 minutes à température ambiante, avant d'être inactivé par 12 ml de tampon NEU. Une centrifugation de 10 minutes à 3300 rpm a ensuite permis de récupérer le surnageant sur colonnes avec filtre, préalablement équilibrées par dépôt de 25 ml de tampon EQU. Après un lavage de 15 ml de tampon EQU, le filtre a été ôté de la colonne échangeuse d'ions et la colonne lavée par adjonction de 25 ml de tampon WASH. L'ADN a ensuite été récupéré dans un Falcon 50 ml dans 15 ml de tampon ELU, précipité par ajout de 10,5 ml d'isopropanol et agitation vigoureuse, puis culoté par centrifugation de 30 minutes à 15000g à 4°C. Il a été ensuite réalisé un lavage du culot par 5 ml d'éthanol 70° refroidi à -20°C, centrifugé de la même façon, puis le culot a été mis à sécher sous lampe 30 minutes avant d'être dissout dans 300 µl de tampon Tris-EDTA.

L'ADN plasmidique obtenu a enfin été dosé au Nanodrop, vérifié par digestion enzymatique de 1 µl de la solution et mis à la concentration de 1 µg/µl dans le même tampon avant d'être stocké à -20°C.

IV.1.2 - PRODUCTION, PURIFICATION ET TITRATION DES VECTEURS LENTIVIRAUX

Les vecteurs utilisés (Figure 41) étaient des vecteurs lentiviraux (VL) SIN ou Self-INactivated (Zufferey, Dull et al. 1998), ayant perdu toute capacité transcriptionnelle de leur LTR (Long Terminal Repeat) viral dans la cellule hôte par délétion de la région promoteur/enhancer de ce LTR. L'expression de ces transgènes a été placée sous le contrôle d'un promoteur foie-spécifique, le promoteur de la transthyréine murine (mTTR) associé à des activateurs synthétiques hépato-spécifiques (Nguyen, Bellodi-Privato et al. 2005). Ces vecteurs contenaient également en amont du promoteur mTTR la séquence cPPT/CTS (central polypurine tract/ central terminaison sequence) améliorant la translocation nucléaire des complexes de pré-intégration (Follenzi, Ailles et al. 2000; Zennou, Petit et al. 2000), ainsi qu'un élément de régulation post-transcriptionnelle, le WPRE (Woodchuck post-transcriptional regulatory element) en aval du transgène pour augmenter son niveau d'expression (Zufferey, Donello et al. 1999). Ils comportaient également 4 copies en tandem de la séquence complémentaire du miRNA 142-3p (142-3pT) en aval du transgène, afin

d'inhiber la traduction de celui-ci dans les cellules du système immunitaire comme les cellules de Küpfer et de prévenir la survenue d'une immunité cellulaire spécifiquement dirigée contre le produit du transgène utilisé (Brown, Gentner et al. 2007; Schmitt, Remy et al. 2010). Les différents transgènes utilisés au cours de ces travaux sont listés ci-dessous:

- Le cDNA de la green fluorescent protein (GFP), utilisé dans les expérimentations de mises au point de techniques de transduction hépatocytaire, afin de quantifier par immuno-histochimie le nombre de cellules transduites (Dariel, Nguyen et al. 2009);
- Le cDNA de la B-UGT1A1, utilisé avec succès dans le traitement de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 chez le rat Gunn (Schmitt, Flageul et al. 2010; Schmitt, Remy et al. 2010), et qui a servi ici dans les expériences d'immunisation des rats contre la protéine d'enveloppe VSVg du VL;
- Le cDNA humain de l'ATP7B, séquence optimisée de 4398 pb gracieusement fournie par l'équipe du Pr Esteban (Zhang, Chen et al. 2011).
- La séquence synthétique du peptide OSIP108, petite séquence de 33 paires de bases ayant montré des propriétés anti-oxydantes *in vitro* (Spincemaille, Pham et al. 2014), et dont les propriétés *in vivo* ont été testées en collaboration avec l'équipe du Dr K. Thevissen (Katholieke Universiteit Leuven, Louvain, Belgique).

Les productions de hauts titres de vecteurs lentiviraux ont été réalisées par co-transfection des cellules 293T par trois plasmides : le plasmide vecteur contenant le transgène, le promoteur mTTR et les séquences-cible en tandem du miR-142-3p, le plasmide d'emballage codant pour les protéines de structure et enzymatiques virales (psPAX2) et le plasmide pMD2G codant pour la protéine d'enveloppe VSVg (protéine G du Virus de la Stomatite Vésiculeuse). Les surnageants viraux ont été concentrés par ultracentrifugation (50 000g, 90 min, 4°C). Les titres des vecteurs ont été déterminés par PCR quantitative en temps réel (qPCR) après infection de cellules HeLa. Ces productions ont été réalisées directement au sein de l'unité INSERM UMR1064 (Dr TH NGuyen) ou par le laboratoire de thérapie génique (INSERM U1089, Dr P. Moullier).

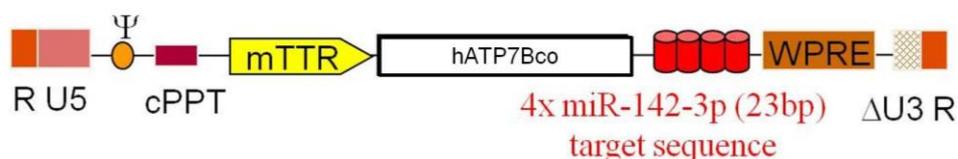


Figure 41: Schéma du vecteur lentiviral codant pour la séquence hATP7B codon-optimized, sous contrôle du promoteur mTTR et comportant les 4 séquences-cible en tandem du miR142-3p. Seul le transgène différait de cette séquence pour les trois autres vecteurs utilisés.

IV.2 - EXPERIMENTATION ANIMALE

IV.2.1 - *LE RAT LONG-EVANS CINNAMON, PROVENANCE ET ELEVAGE*

Les rats Long-Evans Cinnamon (LEC) ne sont actuellement plus élevés pour commercialisation par l'ensemble des animaleries européennes, et il a été nécessaire de s'adresser à l'Institute for Animal Reproduction (IAR), à Ibaraki au Japon pour faire venir une dizaine d'animaux au Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire (SCAHU) d'Angers. Ceux-ci ont servi de reproducteurs afin de constituer un élevage propre de cette espèce. Leur venue a été conditionnée par la réalisation préalable de tous les tests sanitaires correspondant aux normes de la Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA, 2002), dont une partie a été effectuée par le service du contrôle sanitaire (CDTA) d'Orléans.

Les trois mâles et sept femelles LEC reproducteurs ont été placés dès la fin de la période de quarantaine en zone de reproduction. Leur alimentation était exclusivement composée d'aliment Altromin® C1041 (Genestil, Royaucourt, France), contenant moins de 1 ppm de cuivre, contre 13 ppm dans l'aliment pour rongeur standard. Les femelles ayant des difficultés à élever leurs petits, souvent par manque de lait, il a été nécessaire de placer les portées de rats LEC en nourrice auprès de rates Sprague ou Wistar d'élevage courant ayant eu des petits au même moment. Au sevrage à 6 semaines, les rats LEC étaient ensuite transférés en zone d'expérimentation. Ils étaient hébergés en cages de 3 à 6 animaux, selon les recommandations du Ministère français de l'Agriculture, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture et sur un cycle nyctéméral de 12 heures. Selon les protocoles expérimentaux, ils recevaient une alimentation normale ou de l'aliment Altromin C1041®.

La législation ayant évolué au cours de la réalisation de ces travaux, les expérimentations débutées après janvier 2012 ont toutes été soumises à l'obtention préalable d'une saisine délivrée par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale (CEEA) des Pays de la Loire, puis après le 14 février 2013 d'un agrément du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

IV.2.2 - TECHNIQUES D'INJECTION DU VECTEUR

Toutes les injections ont été réalisées sous anesthésie générale à l'isoflurane 3% dans l'oxygène. L'analgésie per-opératoire des interventions avec laparotomie était réalisée par injection sous-cutanée de butorphanol (0,5 mg/kg). Il était administré en complément dans l'eau de boisson de l'ibuprophène (30 mg/kg) pendant 48 heures. La solution de vecteur lentiviral pure était décongelée à température ambiante, centrifugée 2 minutes à 5000 trs/min, puis le volume de surnageant correspondant à la dose à administrer était dilué (en cas d'injection par LIL) dans du PBS, de telle sorte à obtenir un volume final d'injection de 8,9 ml/Kg, auquel était adjoint du polybrène à 1X (1,5-diméthyl-1,5-diazaundecaméthylène polyméthobromide, hexadimétrine bromide, Sigma-Aldrich, France), polymère cationique permettant d'augmenter le pouvoir infectieux des rétrovirus (Davis, Rosinski et al. 2004).

IV.2.2.1 - Injection en veine de la queue

Une vasodilatation était réalisée par trempage de la queue dans de l'eau chauffée à 40°C pendant quelques secondes. La veine était ensuite repérée sans difficulté sur le côté de la queue du rat allongé en décubitus latéral, et ponctionnée à l'aide d'une aiguille de 30 Gauge. L'injection était réalisée sans recherche préalable de reflux veineux, avec un maximum de 300 µl par injection. L'hémostase était réalisée par compression douce, et l'animal n'était réveillé qu'après s'être assuré de ne pas avoir induit d'ischémie distale par extravasation d'une partie du liquide.

IV.2.2.2 - Injection en veine temporale sur le rat nouveau-né

L'utilisation de l'isoflurane à cet âge étant délétère, la sédation des rats a été obtenue par refroidissement. Concrètement, les rats, protégés dans un doigt de gant, ont été placés 10 minutes dans un bain d'eau glacée. Une fois l'immobilité obtenue, 100 à 200 µl de solution lentivirale ont été injectés dans la veine temporale à l'aide d'une aiguille à insuline (30 Gauge); la veine était visualisée à contre jour d'une lumière froide. Après l'injection, les rats étaient réchauffés sous lampe à UV avant d'être replacés auprès de leur mère.

IV.2.2.3 - Protocole opératoire d'injection en veine porte ou en veine cave inférieure

Rasage de la face antérieure de l'abdomen et du thorax, désinfection à la Bétadine alcoolique.
Laparotomie médiane xipho-pubienne. Mise en place de trois écarteurs de paroi.
Extériorisation de la masse intestinale sur une compresse humide.
Prélèvement sanguin en veine iliaque commune droite, hémostase par compression.
Injection du virus dans la veine porte ou la veine cave inférieure par l'intermédiaire d'une aiguille de 30 Gauge.
Hémostase par compression, plus ou moins aidée par application d'une compresse de Surgicel®, voire d'un point de suture au Prolène 8/0 sur la VCI en cas de saignement persistant. Réintégration des anses dans la cavité abdominale.
Fermeture en 2 plans au Vicryl 3/0.

IV.2.2.4 - Protocole chirurgical d'injection en LIL

Rasage de la face antérieure de l'abdomen et du thorax, désinfection à la Bétadine alcoolique.
Laparotomie médiane xipho-pubienne. Mise en place de trois écarteurs de paroi.
Laparotomie médiane,
Ponction sanguine en veine iliaque commune droite, hémostase par compression.
Dissection des vaisseaux péri-hépatiques et clampage.
Injection du virus en hyperpression dans la VCI par l'intermédiaire d'une aiguille de 30 gauge.
Hémostase par compression, avec Surgicel® au besoin, à défaut par un point de Prolène 10/0.
Durée d'ischémie hépatique : 20 minutes maximum.
Durée d'hyperpression hépatique : 5 ou 10 minutes en fonction du protocole.
Déclampage.
Vérification de l'hémostase. Réintégration des anses abdominales après lavage au sérum physiologique.
Fermeture en 2 plans au Vicryl 3/0.

IV.2.2.5 - Protocole chirurgical d'injection en LIL avec lavages hépatiques

Mise en place d'un billot au niveau de la jonction thoraco-abdominale pour mieux exposer le foie.

Rasage de la face antérieure de l'abdomen et du thorax, désinfection à la Bétadine alcoolique.

Laparotomie médiane xipho-pubienne. Mise en place de trois écarteurs de paroi.

Dissection prudente de la veine cave inférieure sus-hépatique, après section du ligament falciforme, jusqu'à en faire le tour.

Extériorisation du foie en haut à droite, maintenu par une compresse humide.

Extériorisation des anses digestives sur la gauche, dans une compresse humide ; ceci expose parfaitement le hile hépatique.

Si besoin : lobectomie inférieure droite après ligature du hile par un point de Vicryl 4/0.

Dissection de la veine cave inférieure (VCI) sous-hépatique supra- et infra-rénale droite, mise en place d'un lac de Vicryl 4/0 sur la VCI en aval de la veine rénale droite.

Dissection de la veine porte (VP) et de la veine gastro-duodénale (VGD), ainsi que de l'artère hépatique.

Mise en place d'un lac de Vicryl 4/0 autour de la portion distale de la VP, et d'une ligature appuyée de PDS 8/0 à la base de la VGD, laissée lâche.

Ligature proximale de la VGD au PDS 8/0.

Insertion dans la VGD d'un cathlon de diamètre ~0,7 mm biseauté. Une aiguille 26 gauge a été préalablement insérée dans son autre extrémité (Figure 42).

Insertion d'un cathlon 24 gauge dans la VCI sous-hépatique, maintenu par le lac resserré autour et renforcé par un clip.

Mise en place d'un clip sur l'artère hépatique, resserrage du lac autour de la VP, renforcé par un clip microchirurgical.

Clampage de la VCI sus-hépatique.

Lavage hépatique : instillation de sérum physiologique par le cathlon de la VP à 5ml/min pendant 4 minutes. Recueil du liquide par la VCI. Remise en place d'un bouchon sur le cathlon de la VCI.

Injection du vecteur viral en 30 sec dans le foie, en hyperpression.

Incubation virale pendant 5 minutes.

Création d'une bourse de PDS 8/0 autour du cathlon placé dans la VCI.

Lavage hépatique : instillation de sérum physiologique par le cathlon de la VP à 5ml/min pendant 4 minutes. Recueil du liquide par la VCI.

Déclampage de la VCI sus-hépatique, puis de l'artère hépatique.

Déclampage de la VP, Retrait du cathélon placé dans la VGD et fermeture de l'orifice vasculaire par la ligature précédemment mise en place.

Déclampage de la VCI infra-hépatique et retrait du cathéter ; fermeture de l'orifice par l'intermédiaire de la bourse de PDS.

Vérification de l'hémostase, réintégration des anses digestives et toilette péritonéale au sérum physiologique tiède.

Fermeture de la paroi abdominale en deux plans, au Vicryl 3/0.

Réveil de l'animal.

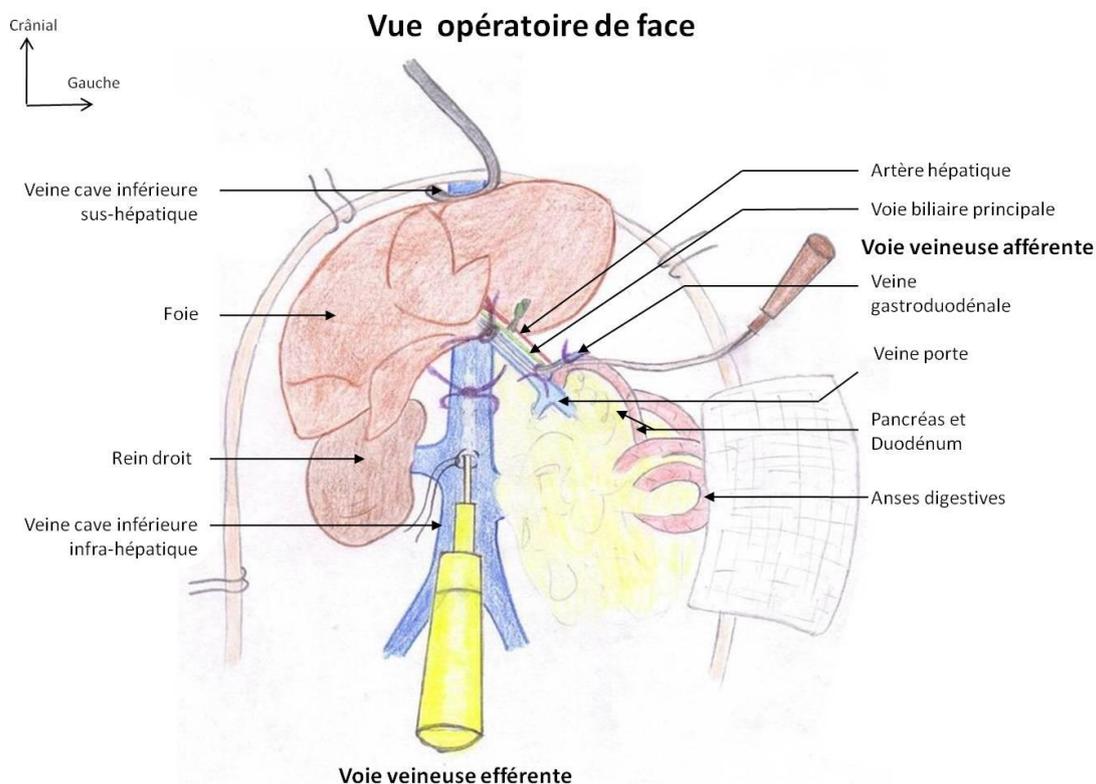


Figure 42: Schéma anatomique de l'injection de vecteur dans un foie isolé de la circulation sanguine et en hyperpression. Mise en place d'une voie veineuse afférente dans la veine gastro-duodénale et d'une voie efférente dans la veine cave inférieure sus-rénale, pour permettre des lavages hépatiques.

IV.2.3 - AUTRES GESTES DE ROUTINE

IV.2.3.1 - Administrations de médicaments

Les médicaments étaient administrés soit par dilution dans l'eau de boisson des rats, soit par gavage. Le gavage était réalisé sur des animaux vigiles saisis fermement par le cou,

tête placée en hyperextension. Une canule de gavage était alors insérée délicatement par la bouche jusque dans l'estomac et le médicament délivré. Lorsque le traitement était dilué dans l'eau de boisson, le volume d'eau consommé quotidiennement par le rat était calculé (200 ml/Kg) après pesée du rat, et la quantité de médicament nécessaire était diluée dans ce volume de boisson.

IV.2.3.2 - Prises de sang

Les prises de sang étaient réalisées sous anesthésie à l'isoflurane, par ponction rétro-orbitaire à l'aide d'une pipette Pasteur. Il était ainsi prélevé de 0,5 à 2 ml de sang. L'hémostase était obtenue par compression douce de la région orbitaire avant le réveil de l'animal. Si besoin, une goutte du sang obtenu était déposée sur une lancette et le taux d'hémoglobine était mesuré à l'aide d'un appareil Hemocue (Hemocue France, Meaux, France). Le sang était ensuite centrifugé 10 minutes à 8000 trs/min afin de récupérer le sérum pour les analyses ultérieures.

IV.2.3.3 - Autotransfusion de culots de globules rouges

Avant injection du VL, un volume sanguin de 8,9 ml/Kg était prélevé en veine cave inférieure à l'aide d'une aiguille de 26 Gauge, immédiatement centrifugé à 3000 tours/minute pendant 3 minutes pour obtenir un culot globulaire tout en limitant l'hémolyse, puis après retrait du sérum, redilué délicatement au taux d'hématocrite voulu dans le volume adéquat de solution lentivirale complétée de PBS et polybrène comme décrit dans la technique LIL. Le mélange obtenu était ensuite immédiatement réinjecté au rat grâce à une aiguille de 26 Gauge.

IV.2.3.4 - Biopsies hépatiques

Sous anesthésie générale comme précédemment décrite.

Rasage de la face antérieure de l'abdomen et du thorax, désinfection à la Bétadine alcoolique.

Laparotomie médiane xipho-pubienne. Mise en place de trois écarteurs de paroi.

Extériorisation de la masse intestinale sur une compresse humide.

Si besoin, prélèvement sanguin en veine iliaque commune droite, hémostase par compression.

Mise en place d'une ligature au Vicryl 3/0 à la base du lobe hépatique à prélever (droit inférieur, caudé ou gauche).

Section du parenchyme hépatique en aval de cette ligature, vérification de l'hémostase +/- complément par application d'une compresse de Surgicel®.

Lavage de la cavité abdominale, réintégration des anses intestinales.

Fermeture de la paroi abdominale en deux plans, au Vicryl 3/0.

Réveil de l'animal.

IV.2.3.5 - Sacrifices

Sous anesthésie générale comme précédemment décrite.

Laparotomie médiane xipho-pubienne.

Ponction de la veine cave inférieure avec un cathlon de 18 Gauge, décès de l'animal par exsanguination.

Prélèvement systématique du foie et selon les expérimentations de différents organes additionnels, reins, rate, gonades, cerveau, intestin.

IV.3 - EXPERIMENTATIONS *IN VITRO*

IV.3.1 - CULTURES CELLULAIRES

Le milieu de culture utilisé était du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®, Life Technologies) en flacons de 500 ml, auquel étaient ajoutés 45 ml de sérum de veau fœtal (SVF), 5 ml de streptomycine-pénicilline, 5 ml de glutamine et 5 ml d'HEPES (Gibco®, Life Technologies). La solution, gardée stérile, était stockée à +4°C et remise à température ambiante 2h avant utilisation. Les tests de survie cellulaire au MTT nécessitaient un milieu incolore, le DMEM-MC incolore, complété selon le même protocole que le DMEM standard.

Les cellules utilisées étaient des cellules 293T, cellules embryonnaires de rein humain, pour la production des vecteurs lentiviraux, des cellules HeLa pour la titration des VL et des cellules Huh7, issues d'une lignée immortelle d'hépatocarcinome humain pour les expérimentations de transfection ou d'infection et les tests de survie cellulaire.

Pour un maintien en culture des cellules, celles-ci étaient placées dans des boîtes de culture contenant 10 ml de milieu de culture. Lors de chaque passage (2 fois par semaine en

routine), le milieu était aspiré, les cellules rincées une ou deux fois à l'aide de sérum physiologique, puis détachées par dépôt de 1,5 ml de trypsine 1X, incubées 5 minutes à 37°C. 9 ml de milieu de culture étaient ensuite ajoutés dans la boîte, les cellules en suspension homogénéisées à la pipette, puis placées dans de nouvelles boîtes de culture au 1/10^{ème} et au 1/20^{ème}, remises en incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

Lors des expérimentations d'infection ou de transformation des cellules, 10 µl du reste de la solution de cellules en suspension était dilué dans 90 µl de bleu de tripan et les cellules étaient comptées sur lame de Mallassez sur 2 fois dix champs ($x = \text{nombre total de cellules}/2$). Le nombre de cellules totales présentes dans la boîte de culture était calculé à l'aide de la formule:

$$n = x * 9.10^5.$$

Du milieu de culture était ensuite ajouté dans le Falcon contenant les cellules en suspension de manière à avoir la concentration voulue par la suite dans les puits de culture (plaques 6, 12 ou 24 puits).

IV.3.2 - TEST DE SURVIE CELLULAIRE

Il a fait appel au MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich France), composé de couleur jaune transformé par les déshydrogénases mitochondriales dans les cellules vivantes en cristaux violets, secondairement solubilisés pour permettre une lecture de la densité optique par spectrophotométrie.

Les cellules Huh7 ont été mises en plaques 6 puits à raison de 50000 cellules par puits, 24 heures avant transfection. Le lendemain, après vérification de la bonne croissance des cellules (confluence à ~80%), les cellules ont été lavées au sérum physiologique et recouvertes de 800 µl de DMEM avant d'être transfectées avec le plasmide pFS1 contenant le cDNA du gène ATP7B, le plasmide pFS2 contenant la séquence peptidique OSIP108 ou le plasmide p216 codant pour la GFP (contrôle de transfection). Pour cela, il a été préparé la solution de transfection composée, pour une plaque de cellules, de 250 µl d'H₂O stérile, 10 µl de l'ADN plasmidique à 1 µg/µl, 500 µl d'HEPES et 250 µl de CaCl₂ ajouté goutte à goutte sur vortex. Après incubation de 15-20 minutes à température ambiante, 166 µl de la solution

de transfection a été déposée dans chaque puits et les cellules ont été remises 24 heures en incubateur à 37°C.

Après vérification de la bonne transfection par observation des cellules GFP+ au microscope à fluorescence, les cellules ont été à nouveau lavées, puis le milieu de culture DMEM a été remplacé par du DMEM-MC, additionné de chlorure de cuivre (CuCl₂) à concentrations croissantes de 0 à 0,75 mM. Les cellules ont été ensuite remises en incubateur durant trois jours.

Le MTT a alors été ajouté dans chaque puits au 1/10^{ème} du volume, avec une solubilisation initiale de la molécule à 5 mg/ml dans du PBS et incubé pendant 4 heures à 37°C. Le tampon de lyse (SDS 10%, HCl 10 mM dans du PBS) a alors été ajouté à raison de 1 volume par puits et les plaques remises en incubateur pendant 24 heures. La lecture de la DO a été faite au spectrophotomètre à 570 et 630 nm, et la moyenne des deux a été prise en compte.

IV.3.3 - INFECTION DE CELLULES HUH7 PAR DU LENTIVIRUS DANS UN MILIEU AVEC FICOLL® 70 PM

Le Ficoll® 70 PM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) a été testé en adjuvant à l'infection par VL. Pour cela, il a été dilué à 25% dans le milieu de culture des cellules contenant du surnageant lentiviral codant pour la GFP à MOI (Multiplicity Of Infection) croissantes, et celui-ci a été laissé au contact des cellules pendant 20 minutes ou 24 heures, avec ou sans étape de spinoculation (centrifugation de la plaque à 1500 rpm pendant 5 minutes). La densité du milieu a été mesurée à l'aide d'un densitomètre à réfraction. Les cellules ont ensuite été replacées dans un milieu de culture pendant trois jours, et l'expression de la GFP a été observée au microscope à fluorescence et quantifiée par cytométrie de flux (LSRII, BD) après fixation du culot cellulaire obtenu dans 100 µl de paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes puis re-suspension dans du DMEM complet. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Flowjo®.

IV.3.4 - TEST DE NEUTRALISATION IN VITRO DU VECTEUR LENTIVIRAL PAR DES ANTICORPS ANTI-VSVG

Une solution contenant du sérum de rat et du surnageant brut de solution de VL codant pour la GFP à un ratio 1:20 a été incubée pendant 20 minutes à 37°C puis déposée sur des cellules Huh7 préalablement mises en culture en plaques 12 puits dans 200 µl de DMEM sans SVF, durant 30 minutes à 37°C. Le milieu de culture a ensuite été complété pour obtenir un volume total de 500 µl par puits et les cellules remises en incubateur pendant 3 jours. Les cellules GFP+ ont ensuite été comptées comme précédemment par FACS.

IV.4 - ANALYSES SÉRIQUES

IV.4.1 - DOSAGES SANGUINS USUELS

Les dosages sanguins des transaminases hépatiques - Aspartate aminotransférase (ASAT) et Alanine aminotransférase (ALAT) -, de la bilirubinémie, de la lactate déshydrogénase (LDH), de l'urée et de la créatinine ont été réalisés sur les analyseurs de routine du plateau technique biologique du CHU de Nantes. L'hématocrite a été dosé dans le laboratoire d'hémostase du CHU d'Angers.

IV.4.2 - ACTIVITE OXYDASE DE LA CERULEOPLASMINE

L'activité oxydase de la céruléoplasmine (COA) a été mesurée selon la technique décrite par Schosinsky en 1974 (Schosinsky, Lehmann et al. 1974), en utilisant comme substrat l'*o*-dianisidine dihydrochloride (4,4'-diamino-3,3'-diméthoxy-biphényle, Sigma-Aldrich France, Saint-Quentin Fallavier, France). Deux eppendorfs de 2 ml étaient préparés contenant chacun 375 µl de tampon acétate à pH 5 (mélange d'acide acétique 0,1M et d'acétate de sodium à 0,1M), 25 µl de sérum du rat à tester, et 100 µl d'*o*-dianisidine dihydrochloride (250 mg/dl) préparés extemporanément et mis à température de 30°C. Le mélange était incubé à 30°C durant 5 minutes pour le 1^{er} eppendorf et 15 minutes pour le second. La réaction était stoppée par addition de 1 ml d'acide sulfurique à 9M. La mesure de l'absorbance (DO) était réalisée par spectrophotométrie à 540 nm et l'activité enzymatique était calculée selon la formule: $COA (U/l) = (DO_{15 \text{ min}} - DO_{5 \text{ min}}) * 625$.

IV.4.3 - DOSAGES SÉRIQUES DU CUIVRE

Les séra conservés à -80°C étaient envoyés en carboglace au Laboratoire de Toxicologie Biologique de l'Hôpital Lariboisière (AP-HP, Paris) dans les 7 jours suivant le prélèvement. Chaque échantillon, décongelé à température ambiante, était ensuite dilué dans de l'EDTA 3g/l (1:1) et incubé à température ambiante pendant une heure avant d'être ultrafiltré sur un filtre Amicon® Ultra-4® avec un seuil de 30 kDa (Millipore, Molsheim, France). Les dosages du cuivre sérique total (CuT) et du cuivre échangeable (CuExc) étaient ensuite réalisés par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (ETAAS, 5100 Perkin Elmer, Les Ulis, France). Le taux de cuivre échangeable relatif (REC) était calculé comme suit : $REC = CuExc/CuT$ (%).

IV.4.4 - RECHERCHE D'ANTICORPS SÉRIQUES PAR ELISA ANTI-VSVG ET ANTI-GFP

Toutes les techniques d'ELISA ont été réalisées sur des plaques Maxisorp™ 96 wells ELISA plates (Sigma-Aldrich, Lyon, France), et les échantillons de sérum analysés en triplicate.

Les plaques étaient cottées la veille au soir par 5 ml de PBS contenant 10 µl de la solution mère de protéine (protéine monoclonale GFP à 1 mg/ml, Clontech), ou directement par dépôt de particules lentivirales pseudotypées VSVg (et codant pour le glypican 3 et la β-galactosidase) préalablement inactivées par une triple stérilisation aux rayons ultraviolets de 90 secondes chacune (Bio-Rad GS Gene Linker® UV chamber) (Jean, Morales-Rayas et al. 2011). Les protéines dans la solution lentivirale étaient quantifiées par la méthode de Lowry modifiée (Raghupathi and Diwan 1994), en utilisant le kit DC™ protein assay kit de Bio-Rad (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) selon les instructions du fabricant. La concentration protéique était ensuite déterminée par comparaison de la densité optique lue au spectrophotomètre à 750 nm avec une courbe de référence d'albumine bovine (BSA) diluée allant de 0 à 20 ng/ml; la dilution utilisée dans ce cas était de 20 µg/ml. La plaque était ensuite incubée à 4°C durant une nuit.

Après 3 rinçages de 200 µl de PBS-Tween 20 à 0,5%, les puits ont été saturés à l'aide de BSA 1% diluée dans du PBS-Tween 20 à 0,5% pendant 90 minutes à température ambiante. Les séra ont été dilués en cascade dans du PBS pour obtenir des dilution au 1/50^{ème},

1/1000^{ème} et 1/5000^{ème}, puis 50 µl de chaque dilution ont été déposés en triplicate dans un puits et incubés 90 minutes à 37°C. Le contrôle positif était un anticorps monoclonal de souris anti-GFP (Ozyme). Après trois nouveaux rinçages comme précédemment décrit, l'anticorps secondaire biotynilé anti-IgG de rat (Jackson-ImmunoResearch) dilué dans du PBS au 1.10⁻⁴ était déposé dans les puits et incubé une heure à 37°C. La Horse streptavidine peroxydase (Vector®) diluée au 1/1500^{ème} était ensuite déposée dans les puits après trois nouveaux rinçages au PBS-Tween 20 0,5% et incubée également une heure à 37°C. Après une dernière étape de rinçages, la révélation se faisait à l'aide de 50 µl d'ABTS (Roche) laissés incubés 3 à 5 minutes dans le puits avant de stopper la réaction avec 50 µl d'eau distillée et de lire la plaque au spectrophotomètre (Dynatech Lab. MR) à 405 nm. Une seconde technique de révélation a été aussi utilisée, avec le kit TMB Reagent (BD Opt EIA™), dont le mélange des réactifs A et B (1:1) était préparé 15 minutes avant dépôt à l'abri de la lumière, 100 µl de la solution étant déposés dans les puits et la réaction stoppée par ajout de 50 µl d'acide phosphorique 1M; la lecture de la plaque se faisait alors à 450 nm.

IV.5 - ANALYSES TISSULAIRES

IV.5.1 - PREPARATION DES BIOPSIES

Les biopsies hépatiques ont été fixées dans du formaldéhyde 3,7% pendant au moins 24 heures puis incluses dans des blocs de paraffine au laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU de Nantes. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées au microtome et séchées à 56°C sur la nuit.

IV.5.2 - HISTOLOGIE STANDARD

Les coupes ont tout d'abord été déparaffinées par bains successifs de toluène ou xylène puis alcool 100% et 70% avant d'être réhydratées dans de l'eau ppi et placées dans un tampon de PBS. Elles ont ensuite été placées dans différents bains pour réaliser une coloration standard HPS (Hématoxyline - Phloxine - Safran). Ces techniques ont été réalisées en routine dans le laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU d'Angers.

IV.5.3 - IMMUNO-HISTOCHIMIE GFP

Après une phase de réhydratation comme précédemment décrit, les peroxydases endogènes ont été inactivées (H_2O_2 3%, 30 minutes). Une saturation des sites non spécifiques de l'anticorps primaire a été ensuite réalisée avec du sérum de cheval (kit Vectastain Universalis ABC KIT) dilué au $1/100^{\text{ème}}$ dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Puis l'anticorps primaire monoclonal de souris anti-GFP (Clontech) dilué au $1/100^{\text{ème}}$ dans une solution contenant du PBS Tween 20 (0,1% v/v) et BSA (1% w/v) a été incubé pendant 2 heures en atmosphère humide à température ambiante. Après incubation avec un anticorps secondaire biotinylé (Vectastain Universalis ABC KIT) dilué au $1/50^{\text{ème}}$ dans du PBS contenant du sérum de cheval 2% pendant 30 minutes à température ambiante, le complexe d'avidine et de peroxydase (Vectastain ABC reagent) a été ajouté pendant 30 minutes à température ambiante. La révélation s'effectuait avec la DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Vector) et les lames étaient contre-colorées à l'hémalun de Mayer. Finalement les lames étaient à nouveau déshydratées et montées en milieu organique (Acrytol).

L'observation des lames a été réalisée au microscope. Le cytoplasme des cellules exprimant la GFP présente un aspect granuleux marron. Les cellules positives sont comptées sur chaque lame au grossissement $\times 400$ sur 10 champs successifs. Chaque champ comprend en moyenne 300 hépatocytes. Le résultat est exprimé en pourcentage de cellules transduites.

IV.5.4 - IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE ANTI-ATP7B

La recherche de l'expression dans le foie de la protéine ATP7B a été faite sur des biopsies de foie congelées préalablement dans de l'isopentane (Sigma-Aldrich), et coupées au cryostat en coupes de 5 μm . Le tissu était ensuite fixé par incubation à température ambiante sous hotte avec 200 μl de paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS pendant 15 minutes. Les cellules étaient perméabilisées par incubation de 15 minutes sur glace dans 200 μl de PBS-0,1% Triton® X-100 (Sigma-Aldrich), puis lavées par trois bains de PBS. Le blocage des sites non spécifiques a été réalisé par dépôt de 100 μl de sérum de chèvre à $1/10^{\text{ème}}$ du volume dans du PBS-BSA 1% et incubation d'une heure à température ambiante. L'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-ATP7B (Abnova) a alors été déposé à raison de 100 μl par lame, dilué au $1/200^{\text{ème}}$ dans du PBS-BSA 1%, et laissé incuber une nuit à 4°C. Il a ensuite été

réalisé 5 lavages successifs au PBS, puis l'anticorps secondaire de singe anti-IgG de lapin Alexa Fluor® 568 (Life Technologies) a été dilué au 1/500^{ème} dans la solution de PBS-BSA 1%, déposé à raison de 100 µl par lame et laissé incuber à température ambiante pendant deux heures dans le noir. Après six lavages successifs au PBS, les coupes ont été montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage ProLong® Gold Antifade reagent with DAPI (Invitrogen). Les lames ont finalement été stockées à 4°C et lues au microscope à fluorescence (Zeiss).

IV.5.5 - ANALYSE DE LA FIBROSE HEPATIQUE

La lecture histologique des lames a été effectuée après coloration standard HPS (Hémalun, Phloxine, Safran) réalisée sur les automates du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU d'Angers. Les coupes de foie ont été lues et interprétées par un anatomopathologiste confirmé spécialisé dans le foie, le Professeur Marie-Christine Rousselet-Chapeau, chef de ce service. Les lésions histologiques hépatiques des rats LEC n'étant pas comparables à celles retrouvées chez les humains, il n'a pas été possible d'appliquer directement le score METAVIR de quantification standard de la fibrose hépatique. Les résultats ont été rendus avec une gradation qualitative globale en 4 grades de l'extension de la fibrose: discrète (grade F1), modérée (grade F2), importante (grade F3) et mutilante (grade F4).

La réalisation d'un score de fibrose (ou aire de fibrose) par analyse semi-automatique d'images numérisées a nécessité une coloration spéciale des lames au rouge Picrosirius, réalisée en routine dans le laboratoire d'anatomie pathologique du CHU d'Angers. Les lames ont ensuite été numérisées à l'aide d'un scanner (Aperio Scanscope™, Leica Biosystems), puis la fibrose a été quantifiée à l'aide d'un programme informatique développé sous le programme de traitement d'images ImageJ® (National Institute of Health, USA) au sein du laboratoire HIFIH, UPRES 3859 d'Angers. Une étape d'élimination manuelle des artéfacts restait nécessaire, et ces analyses ont été réalisées par un ingénieur spécialisé, M. J. Chaigneau. Les résultats ont été rendus en pourcentage d'aire de fibrose totale.

IV.5.6 - DETECTION DE LA PROTEINE ATP7B DANS LES CELLULES ET LE FOIE EN ELISA

Extraction des protéines de foie total

Cinq cent microgrammes de foie ont été broyés dans un moulin dans 2 ml de tampon sucrose (0,25 M sucrose, 10 mM Tris 1M pH 7,4, 1 mM EDTA 0,5M) additionné de Complete inhibiteur de protéases (Roche) 1X. La solution a ensuite été décantée dans un tube eppendorf avant d'être centrifugée à 13000 rpm. Le surnageant a été récupéré et les protéines ont été dosées à l'aide du kit BC Assay (Interchim). La gamme étalon a été réalisée par dilutions successives de BSA (2 mg/ml) dans du PBS 1X, afin d'obtenir des concentrations de 2 mg/ml à 0,125 mg/ml. 25 µl de chaque dilution de la gamme et des échantillons à quantifier (aux dilutions de 1/2, 1/10, 1/50 et 1/250) ont été déposés en duplicate sur microplaque 96 puits à fond plat (Falcon). Il a ensuite été rajouté dans chaque puits 200 µl de mélange des réactifs A et B (en proportions 50:1), puis la plaque a été mise en incubateur à 37°C pendant 30 minutes, avant d'être lue au spectromètre à 570 nm. Une courbe de DO en fonction de la gamme de BSA a été établie, permettant d'extrapoler la quantité de protéines totales présentes dans chaque échantillon.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Les plaques étaient cottiées la veille au soir par les extraits protéiques de foie, à des dilutions de 0,1 mg à 10 mg et incubées à 4°C. Le contrôle positif était un extrait de protéines de cellules infectées par du VL-ATP7B dans lequel la présence de protéine ATP7B avait été précédemment établie. Une gamme de protéine recombinante ATP7B (1 mg/ml, Abnova) de 0,1 mg à 100 ng a été déposée en parallèle sur la plaque. Le lendemain, un anticorps primaire anti-ATP7B (anticorps monoclonal de souris, Abnova) a été déposé dans les puits au 1/500ème, après rinçages comme explicité précédemment, suivi d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris au 1/200ème (Vector). La révélation se faisait à l'aide du kit TMB Reagent (BD Opt EIA™), avec une lecture de l'absorbance à 450 nm. La gamme ATP7B a permis d'établir une courbe de DO en fonction de la quantité de protéine et de quantifier ainsi la protéine présente dans chaque échantillon de foie de rat.

IV.5.7 - RECHERCHE D'ADN VECTORIEL DANS LES TISSUS ANIMAUX

Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée sur les biopsies hépatiques, ainsi que sur les prélèvements de testicule, de rate et de rein, à l'aide du DNeasy Blood and Tissue kit pour ADN génomique (Qiagen, Courtaboeuf, France), selon les instructions du fabricant. Les biopsies ont été lysées pendant au moins 4 heures à 56°C sur agitateur rotatif dans 180 µl de tampon ATL contenant 20 µl de protéinase K. A la solution de lyse ont ensuite été ajoutés 200 µl de tampon AL et d'éthanol absolu, soigneusement mélangés avant que le mélange soit transféré sur colonne DNeasy. Après centrifugation d'une minute à 8000 rpm, la colonne a été lavée soigneusement par 500 µl de deux tampons successifs, AW1 et AW2, séparés par une centrifugation d'une minute à 8000 rpm. Après une étape de centrifugation de 3 minutes à 14000 rpm permettant de bien assécher la colonne, celle-ci a été placée sur un eppendorf avant d'ajouter 100 µl de tampon d'élution AE préalablement chauffé à 70°C sur la membrane et de le laisser incubé 1 minute à température ambiante. Une dernière centrifugation d'une minute à 8000 rpm permet de récupérer l'ADN dans l'eppendorf. La concentration d'ADN obtenu a ensuite été mesurée au Nanodrop.

PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les échantillons ont été testés en triplicate sur plaque de 96 puits, chaque puits contenant 10 µl de Fast SYBR® Green MasterMix (Applied Biosystems), 0,4 µl de primers à 10 µM, 7,6 µl d'eau stérile et 2 µl de la solution d'ADN (50 ng/µl) à quantifier. Des primers spécifiques de l'extrémité 5'– non transcrite du vecteur lentiviral ciblant la séquence GAG ont été utilisés pour quantifier l'ADN du VL : GAG-F (5' GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA3') et GAG-R (3' GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC5'). Pour les expérimentations en lien avec l'immunisation contre l'enveloppe VSVg du VL, ce sont des primers spécifiques de la GFP qui ont été directement utilisés: GFP-F (5'ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA3'), et GFP-R (5'GGCGGATCTTGAAGTTCACC3') Les résultats ont été normalisés par rapport à l'amplification d'ADN génomique, à l'aide de primers spécifiques de la séquence du gène β-actine de rat: Act-F (5'AGCCATGTACGTAGCCATCCA3') et Act-R

(5'TCTCCGGAGTCCATCACAATG3'). Le programme de qPCR, réalisée sur système de détection de séquences ABI-7900 (Applied Biosystems), consiste en une phase d'activation de la polymérase et dénaturation de l'ADN (10 minutes à 95°C) suivie de 40 cycles d'amplification (15 secondes à 95°C, 60 secondes à 60°C). Les résultats sont rendus en valeur de Ct (cycle seuil de détection) puis analysés à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2007® et exprimés en nombre de copies par génome haploïde. Une courbe de standardisation est réalisée en utilisant des dilutions de 100 à 0,01 copies de vecteur lentiviral dans du génome de rat. Le nombre de copies de vecteur dans l'échantillon d'ADN à tester est alors calculé en introduisant sa valeur ΔCt [$Ct(GAG)-Ct(HPRT)$] dans la formule issue de la courbe de standardisation.

IV.5.8 - DOSAGE DU CUIVRE DANS LES TISSUS

Les organes ont été envoyés après cryocongélation au Laboratoire de toxicologie biologique de l'hôpital Lariboisière à Paris (Dr S. El Balkhi). Le tissu a ensuite été séché en étuve pendant une nuit à 80°C avant d'être pesé et minéralisé par dissolution dans une solution d'acide nitrique, à 70°C pendant 2 heures. Une fois les tissus complètement digérés, la solution a été ramenée à une concentration tissulaire de 10g/L par ajout d'eau Milli-Q® (Merck Millipore, Guyancourt, France). Cette solution a ensuite été dosée en ICP-MS (Inductively-Coupled Plasma - Mass Spectrometry) en utilisant un étalonnage par la méthode des ajouts dosés et la concentration en cuivre a été rapportée au poids sec de l'échantillon.

IV.6 - ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide des logiciels Excel (Microsoft 2007), R et GraphPad Prism 5.04 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). La comparaison des données quantitatives a fait appel au test de Mann-Whitney non apparié ou de Kruskal-Wallis en cas de groupes multiples, et celle des données qualitatives au test exact de Fisher. Les analyses de corrélation ont été réalisées par le test de Spearman. Les calculs de sensibilité et spécificité ont été faits par établissement de Receiving Operating Curves (courbes ROC), de même que les calculs d'aire sous la courbe (AUC) correspondante avec un intervalle de confiance de 95%. Les courbes de survie ont été comparées avec le test du log-rank (test de Mantel-Cox). Le seuil de significativité statistique retenu était fixé à 5% ($p < 0,05$).

ANNEXES

Annexe 1 : articles parus ou soumis en lien direct avec cette thèse

- **Schmitt F**, Podevin G, Poupon J, Roux J, Legras P, Trocello JM, Woimant F, Lapr votte O, NGuyen TH, El Balkhi S (2013). Evolution of Exchangeable Copper and Relative Exchangeable Copper through the course of Wilson's disease in the Long Evans Cinnamon rat. **PLoS One**. Dec, 17 Epub (*IF* = 3,73).....**p.127**
- **Françoise Schmitt**, Morwenn Le Boulc'h, Sébastien Boni, Vanessa Gauttier, Alison CreneGuy, Tuan Huy NGuyen, Nicolas Ferry, Guillaume Podevin (2014). Restoration of liver transduction efficacy with lentiviral vectors in rats pre-immunized against viral particles. Soumis pour publication *in* Human Gene Therapy Methods.....**p.139**

Annexe 2 : article portant sur l'injection de vecteur ad noviral en foie isolé en hyperpression

- **Schmitt F**, Pastore N, Abarrategui-Pontes C, Flageul M, Myara A, Laplanche S, Labrune P, Podevin G, Nguyen T, Brunetti-Pierri N. (2014) Correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats by surgical delivery of low doses of HDAd vectors. *Hum Gene Ther Methods* 25: 181-186.....**p.156**

Annexe 3 : cartes de restriction des plasmides pFS1 et pFS2.....**P.162**

Evolution of Exchangeable Copper and Relative Exchangeable Copper through the Course of Wilson's Disease in the Long Evans Cinnamon Rat

Françoise Schmitt^{1,2}, Guillaume Podevin², Joël Poupon³, Jérôme Roux⁴, Pierre Legras⁴, Jean-Marc Troceno^{5,6}, France Woimant^{5,6}, Olivier Laprèvote^{3,7}, Tuan Huy NGuyen¹, Souleiman El Balkhi^{3,6,8*}

1 INSERM UMR1064, Jean Monnet Hospital, Nantes, France, **2** HIFIH - Pediatric Hepatogastroenterology Team, University Hospital of Angers, Angers, France, **3** Laboratory of Biological Toxicology, Lariboisière Hospital, APHP, Paris, France, **4** SCAHU, Animal Facility, Medicine University of Angers, Angers, France, **5** Department of Neurology, Lariboisière Hospital, APHP, Paris, France, **6** Centre national de Maladie Rare Wilson, Lariboisière Hospital, APHP, Paris, France, **7** Analytical and Experimental Toxicology (C-TAC), Faculty of Pharmacy, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **8** INSERM U1144, Variability of the Response to Psychotropic Drugs, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Faculty of Pharmacy, Paris, France

Abstract

Background: Wilson's disease (WD) is an inherited disorder of copper metabolism leading to liver failure and/or neurological impairment. Its diagnosis often remains difficult even with genetic testing. Relative exchangeable copper (REC) has recently been described as a reliable serum diagnostic marker for WD.

Methodology/Principal Findings: The aim of this study was to validate the use of REC in the Long Evans Cinnamon (LEC) rat, an animal model for WD, and to study its relevance under different conditions in comparison with conventional markers. Two groups of LEC rats and one group of Long-Evans (LE) rats were clinically and biologically monitored from 6 to 28 weeks of age. One group of LEC rats was given copper-free food. The other groups had normal food. Blood samples were collected each month and different serum markers for WD (namely ceruloplasmin oxidase activity, exchangeable copper (CuEXC), total serum copper and REC) and acute liver failure (serum transaminases and bilirubinemia) were tested. Every LEC rat under normal food developed acute liver failure (ALF), with 40% global mortality. Serum transaminases and bilirubinemia along with total serum copper and exchangeable copper levels increased with the onset of acute liver failure. A correlation was observed between CuEXC values and the severity of ALF. Cut-off values were different between young and adult rats and evolved because of age and/or liver failure. Only REC, with values >19%, was able to discriminate LEC groups from the LE control group at every time point in the study. REC sensitivity and specificity reached 100% in adults rats.

Conclusions/Significance: REC appears to be independent of demographic or clinical data in LEC rats. It is a very simple and reliable blood test for the diagnosis of copper toxicosis owing to a lack of ATP7B function. CuEXC can be used as an accurate biomarker of copper overload.

Citation: Schmitt F, Podevin G, Poupon J, Roux J, Legras P, et al. (2013) Evolution of Exchangeable Copper and Relative Exchangeable Copper through the Course of Wilson's Disease in the Long Evans Cinnamon Rat. PLoS ONE 8(12): e82323. doi:10.1371/journal.pone.0082323

Editor: Fanis Missirlis, Queen Mary University of London, United Kingdom

Received: August 20, 2013; **Accepted:** October 31, 2013; **Published:** December 17, 2013

Copyright: © 2013 Schmitt et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work has been partially funded by grants from the Fondation de l'Avenir. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding was received for this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: souleiman.el-balkhi@lrb.aphp.fr

Introduction

Wilson's disease (WD) is a rare autosomal recessive disorder of copper metabolism due to loss of function mutations in the gene encoding ATP7B protein (GeneBank: U03464.1) [1]. This protein acts as a copper ATPase transporter, particularly in the liver where it ensures both excretion of copper from the hepatocytes into the bile and incorporation of copper into apoceruloplasmin. This yields to an efficient and stable protein: holoceruloplasmin (Cp) [2]. Defective ATP7B protein leads to progressive accumulation of copper in the liver and other tissues, resulting in hepatic and/or neurological impairment. Once diagnosed, the disease must be treated by lifelong use of copper chelating agents or by zinc salt therapy [3], and even in some extreme cases require liver

transplantation [2,4]. Absence or delay of treatment can lead to irreversible sequelae and even death.

The diagnosis of WD is based on a combination of clinical and biological findings and can be confirmed by genetic analysis. Specialized laboratories can identify up to 97% of WD patients [5]. Determination of copper in liver biopsy remains a common practice to confirm WD in some countries. However, liver biopsy is invasive and genetic testing is costly and not available everywhere. In addition, classic biological tests lack specificity to identify some cases of WD patients, especially when extrahepatic signs are not developed (i.e. with no Kayser-Fleischer ring or MRI imaging abnormalities). On the other hand, there is a need to diagnose WD in presymptomatic patients in order to start their

decoupling therapy before the onset of the disease. A more rapid and cost-effective test is therefore required.

Exchangeable copper (CuEXC) and its derived Relative Exchangeable Copper (REC, ratio CuEXC/total copper %) has recently been proposed as a new biomarker for diagnosing WD in humans [6]. In that study, REC provided 100% specificity and sensitivity. CuEXC corresponds to the labile fraction of copper bound mainly to albumin [7,8,9]. An increase of CuEXC superior to normal levels is thought to reflect a blood and tissue copper overload that occurs after saturation of hepatocytes and the spillage of Cp unbound copper into the blood owing to hepatic cytolysis. However, in that study [6], almost all of the patients already had already had neurological and/or hepatic manifestations related to WD and were compared with healthy subjects, meaning that the sickest of the sick were compared with the "healthiest" of the healthy. In addition, it is possible that the onset of disease manifestations (9 months-60 years) [10,11] could vary according to the nature of the mutation, environmental conditions (such as daily copper intake) and general health status (not related to WD hepatic or renal failure). In order to confirm the validity of REC as a specific and sensitive non-invasive biomarker regardless of biological status and environmental conditions, we tested it in a WD animal model and followed it up throughout the progression of the disease.

Among WD animal models, one of the most studied is the Long-Evans Cinnamon (LEC) rat [12], a natural mutant strain of Long-Evans rat discovered in Japan in 1983 [13]. As in WD, LEC rats suffer from an inherited disorder of copper metabolism due to a loss of function mutation in the *ATP7B* gene [14,15], but without any reported neurological impairment [12,16]. Its hereditary hepatitis has been correlated with a 900 bp lack at the 3' end of *ATP7B* gene [17]. The sensitivity of this animal model to dietary copper [18] and the natural tendency to develop acute liver failure (ALF) make it suitable to evaluate the sensitivity and the specificity of copper related parameters even in extreme conditions. A copper profile in LEC rats includes reduction of serum level of copper, reduction of ceruloplasmin and ceruloplasmin oxidase activity (COA) and copper accumulation in the liver. In the majority of studies, an elevation of bilirubinemia and liver transaminases starts between 10 to 14 weeks of age, corresponding to the first acute liver failure episode [19,20,21].

Hence, the first aim of this study was to assess the ability of the REC to discriminate LEC rats (with an *ATP7B* mutation) from Long-Evans (LE) control rats (without *ATP7B* mutation), whatever their copper intake regimens or the progression of the underlying liver failure. The second aim was to determine the accuracy of CuEXC as a biomarker able to reflect copper overload before and after the onset of liver failure.

Materials and Methods

2.1 Ethical statement, animal care and experimental procedures

Long-Evans Cinnamon rats were first purchased from IAR (Institute for Animal Reproduction, Ibaraki, Japan) and then bred at the animal facilities of Angers, France. Long-Evans (LE) rats were directly purchased from Janvier, Inc. (Janvier S.A.S, Le Genest St-Isle, France). The animals were housed at the animal facilities of Angers University Medical School (SCAHU) and received human care according to the guidelines of the French Agriculture Ministry. Long-Evans Cinnamon and Long-Evans rats were 6 weeks old at the beginning of the study and there were both males and females. They were maintained in a 12-hour light cycle and fed ad libitum. Their food was composed of either Altromin®

1320 diet normally dosed in copper (13 ppm) or Altromin® C1041 food containing less than 1 ppm of copper (0.367 mg/kg). Both were provided by GENESTIL®, Royaucourt, France. This experiment was authorized by the "Pays de la Loire" ethical committee for animal experimentation (CEEA.2012.12). On weaning, the animals were all kept on normal food for one week for acclimatization and then were given either normal or C1041 food. The daily clinical monitoring and blood sampling began at week 6. Blood was drawn from the retro-orbital sinus every four weeks or in case of clinical signs of liver failure. This procedure was performed under isoflurane general anesthesia (3% v/v in air), without additional use of analgesics.

Altogether, 15 LEC rats received normal food (8 males, 7 females), 9 LEC rats (6 males, 3 females) had C1041 food and 6 Long-Evans rats (3 males, 3 females) served as the control group which was also given normal food. Hereafter, these three groups will be referred to as LEC, C1041 LEC and LE, respectively.

Careful clinical observation of the LEC rats resulted in the gradation of the symptoms developed during acute liver failure (ALF). These signs included extension of jaundice, behavior of the rat, and weight variations, in agreement with veterinarian pain scales [22]. It allowed us to establish a classification of hepatic failure in 4 grades of severity, going from no clinical disease to fulminant hepatitis (Table 1). To our knowledge, this has not been performed elsewhere. Rats scoring up to 6 were humanely sacrificed under general anesthesia by exsanguination, and blood samples as well as liver biopsies were processed.

2.2 Liver function tests

Serum total bilirubin and alanine (ALT) and aspartate (AST) aminotransferases were measured in the Department of Biochemistry at the Nantes University Hospital.

2.3 Serum ceruloplasmin oxidase activity

The enzymatic oxidase activity of ceruloplasmin is directly correlated to its functionality in the serum, meaning that copper has been properly incorporated in apoceruloplasmin by the action of the *ATP7B* protein in the liver. Hence, COA is a direct reflection of the functionality of *ATP7B* in hepatocytes and is collapsed in WD patients [23]. Ceruloplasmin oxidase activity was measured with *o*-dianisidine dihydrochloride (4, 4'-diamino-3,3'-dimethoxy-biphenyl) as substrate (Sigma-Aldrich France, Saint-Quentin Fallavier, France), as described by Schosinsky in 1974 [24]. Absorbance was measured at 540 nm on a Beckman-Coulter

Table 1. Acute liver failure intensity scale in the LEC rat.

Score	Mucocutaneous appearance	Behavior	Weight
0	Exclusively pink	Hyperactive	Gain
1	Yellow ears and/or tail	Quiet	Stable
2	Yellow ears, tail and snout	Response to stimuli	Loss
3	Yellow ears, tail, snout and feet	Dying	

The sum of the numbers obtained in each column attributes of a grade for the intensity of hepatic failure as follows:

- 0: no hepatic disease;
- 1-3: mild hepatic failure;
- 4-5: moderate hepatic failure;
- 6-8: fulminant hepatitis.

doi:10.1371/journal.pone.0082323.t001

DU®640 spectrophotometer. Ceruloplasmin oxidase activity was defined as "625*absorbance" and reported in units/liter (U/l).

2.4 Serum Copper concentration, CuEXC and REC

The technical approach for the determination of exchangeable copper has already been published [6,25]. Briefly, blood samples were collected and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Serum was immediately frozen at -80°C , sent in dry ice to be analyzed in fewer than 7 days at the laboratory of Biological Toxicology at Lariboisière Hospital (Paris). Serum was thawed for 20 minutes at room temperature. It was then diluted with EDTA $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (1:1) and incubated for one hour at room temperature before ultrafiltration on Amicon® Ultra-4® filters with a 30 kDa cutoff (Millipore, Molsheim, France). The measurements of copper in ultrafiltrates were performed by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS) (5100, Perkin Elmer, Les Ulis France). Total serum copper was measured by the same instrument. REC was calculated following the formula: $\text{REC} = \text{CuEXC}/\text{Total serum copper \%}$.

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R® 2.13.1 software, with a significance level at $P < 0.05$. For quantitative values, Wilcoxon's paired test or Mann-Whitney test were used as comparison tests for small samples, and unpaired *t*-test for larger ones.

Received Operating Curves (ROC), sensitivity (SE) specificity (SP) and likelihood ratio analysis were established using GraphPad Prim® 5.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA), with confidence intervals (CI) fixed at 95%.

Results

3.1 Liver disease evolution in the LEC rats

All LEC rats under normal feeding presented clinical signs of ALF owing to their underlying pathology during the course of the experiment at a median age of 13 weeks (9–18). There was a broad range of severity in the development of ALF from moderate jaundice of ears and tails without behavioral changes to severe mucocutaneous jaundice with complete exhaustion of the animal leading to death within 24 hours. As expected, no rat in the C1041

LEC group or in the LE control group showed signs of ALF during the 28 weeks of monitoring (Figure 1a).

The death rate in the normally fed LEC rat group was as high as 40% at the end of the study. Five rats in this group spontaneously died of ALF (sex ratio: 1:1), half of them with patent signs of ALF and one rat was euthanized with fulminant liver failure. The females tended to develop severe ALF sooner than the males with a median age of death at 13 weeks (9–21) versus 15 weeks (13–22), but this was not statistically significant. No rat in the C1041 LEC rat group died (Figure 1b), and one male in the LE control group was found dead at 18 weeks from what appeared to be a fight with its congeners.

Transaminases. The usual ALF serum markers were evaluated in the LEC rats and their evolution during the course of the disease was monitored (Figure 2). Normal values were assessed in the LE control group as being inferior to 2.5 and 1.5 $\mu\text{kat}/\text{L}$ for AST and ALT respectively. Serum transaminases revealed a pathological increase in the LEC group at 10 weeks of age, compared with C1041 LEC rats and control LE rats. Their values peaked at approximately 20 weeks (AST: $11.1 \pm 5.1\ \mu\text{kat}/\text{L}$ and ALT: $9.0 \pm 4.1\ \mu\text{kat}/\text{L}$) before they began a progressive decrease but without reaching normal values again. In the C1041 LEC group, no increase in transaminases levels could be found. Total bilirubinemia showed the same evolution with an increase from the first clinical signs of ALF and with values correlated to the intensity of liver damage, reaching up to 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ in case of fulminant liver failure. Contrary to the transaminases, bilirubinemia decreased to normal values after the end of an ALF episode.

3.2 Copper related markers

Copper related biomarkers varied in an age-related manner (Figure 3). Indeed, at 6 weeks, total serum copper, CuEXC, and COA were significantly lower and REC was significantly higher in all of the LEC rats compared with the LE control group. These markers evolved during the rest of the study. We tested sensitivity (SE) and specificity (SP) for two distinct groups: young rats (6 to 10 weeks) and adult rats (14 to 28 weeks).

Total serum copper. Total serum copper in LE rats significantly increased over time ($P < 0.005$) with a mean value at 6 weeks of $11.2 \pm 1.3\ \mu\text{mol}/\text{L}$ versus $24.4 \pm 1.6\ \mu\text{mol}/\text{L}$ at

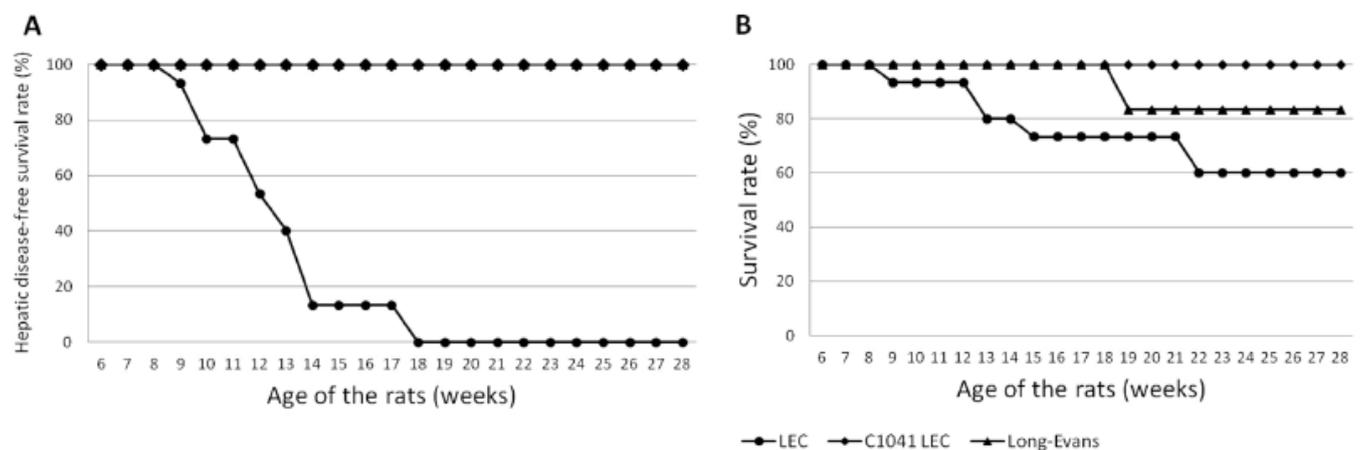


Figure 1. Survival and disease-free survival curves of the rats. Figure 1A shows acute liver failure present in every Long-Evans Cinnamon (LEC) rat under normal feeding, compared with C1041-fed LEC rats or to control Long-Evans (LE) rats. Figure 1B provides survival rates of the three groups of rats during the 28-week study. doi:10.1371/journal.pone.0082323.g001

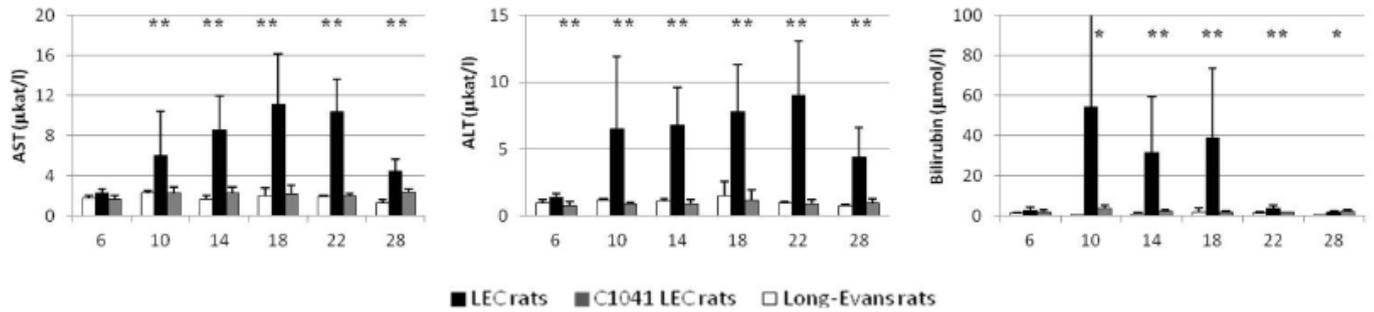


Figure 2. Evolution of transaminases over time in the different groups of rats. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) values are given in terms of means and standard deviation for each group at each time point, measured in weeks of life. One star (*) represents a statistically significant difference between the LEC and the LE group, and a double star (**), the difference between the LEC group and both the LE and C1041 LEC groups.

doi:10.1371/journal.pone.0082323.g002

week 28 (Figure 3). This increase became non-significant in the LE adult rats (>10 weeks old).

In young rats, total serum copper cutoff at 10.2 µmol/L resulted in an SE 97.3% and SP 91.7% (Figure 4 and Table S2). In the adult rats (>10 weeks old), a cutoff at 18.0 µmol/L yielded a SE 97% and SP 98% (Figure 5 and Table S2).

With the values taken together (regardless of age, liver failure and copper regimen), a cutoff set at 10.5 µmol/L yielded poor sensitivity (76.6%) but good specificity (97.1%) (Figure 6 and Table S1). Liver failure in LEC rats on normal food caused a significant

increase in serum copper levels which then partially overlapped with LE rat values.

Exchangeable copper. Long-Evans CuEXC values remained relatively constant over time and always inferior to 2.0 µmol/L, whereas LEC CuEXC values varied with liver failure, becoming significantly higher than LE values after 10 weeks ($P < 0.001$) (Figure 3). C1041 LEC values remained systematically lower than 1.15 µmol/L throughout the study, i.e. lower than LEC and LE levels. The mean CuEXC LEC rat value at 6 weeks was lower than that of the LE control rats (0.71

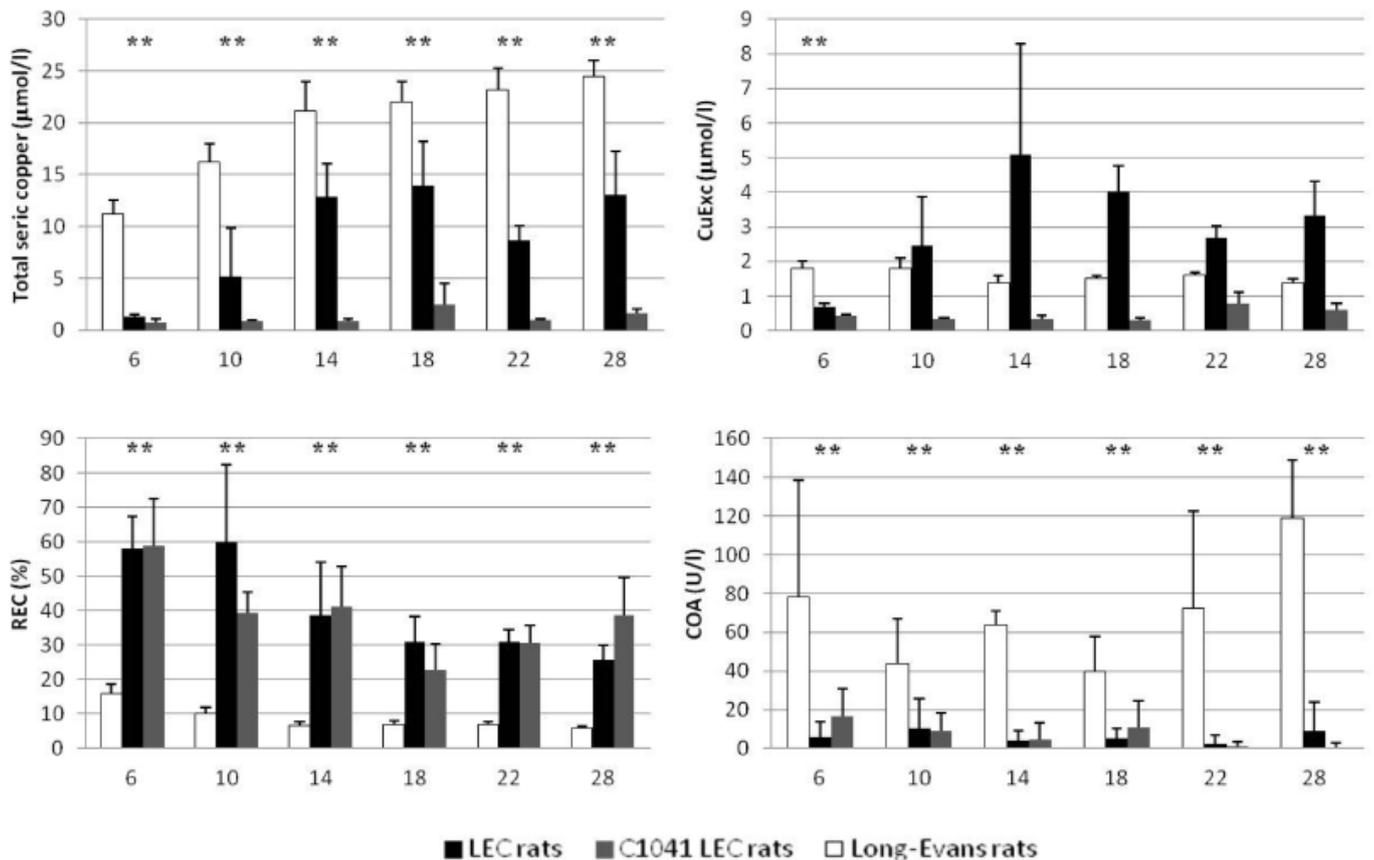


Figure 3. Evolution of Wilson's disease serum markers over time in the different groups of rats. Values are given in terms of means and standard deviation for each group at each time point, measured in weeks of life. The usual biological markers of WD are total serum copper and ceruloplasmin oxidase activity (COA), and new evaluated tools are represented by exchangeable copper (CuExc) and relative exchangeable copper (REC). A double star (**) represents the difference between the LE group and both the LEC and C1041 LEC groups.

doi:10.1371/journal.pone.0082323.g003

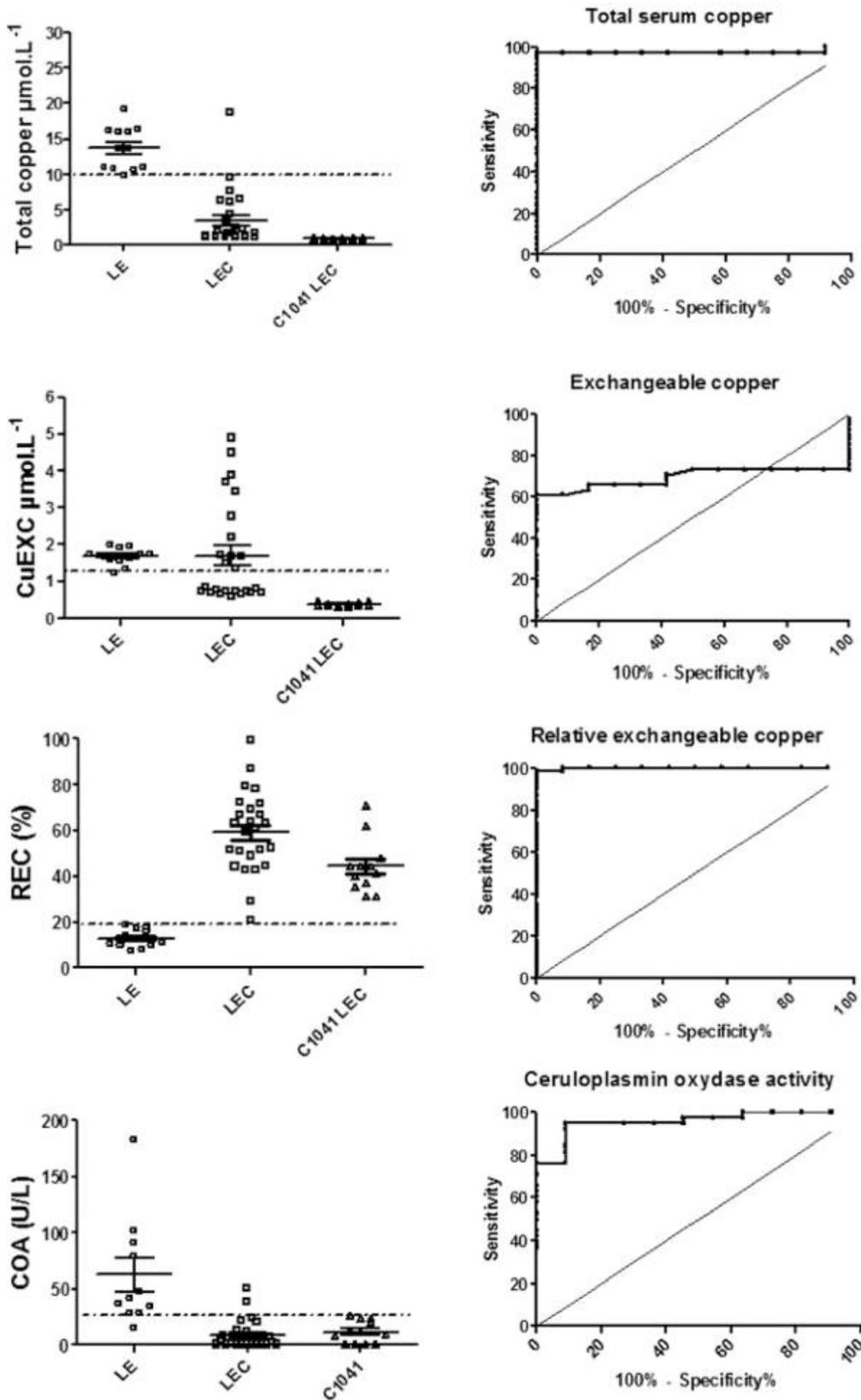


Figure 4. ROC tests for Wilson's disease biomarkers in young LEC, C1041 LEC and Long-Evans rats and associated LEC versus LE rat ROC curves. Total serum copper, exchangeable copper (CuExc), relative exchangeable copper (REC) and ceruloplasmin oxidase activity (COA) young rat results are shown. Broken lines represent the cut-off value obtained from ROC analysis.
doi:10.1371/journal.pone.0082323.g004

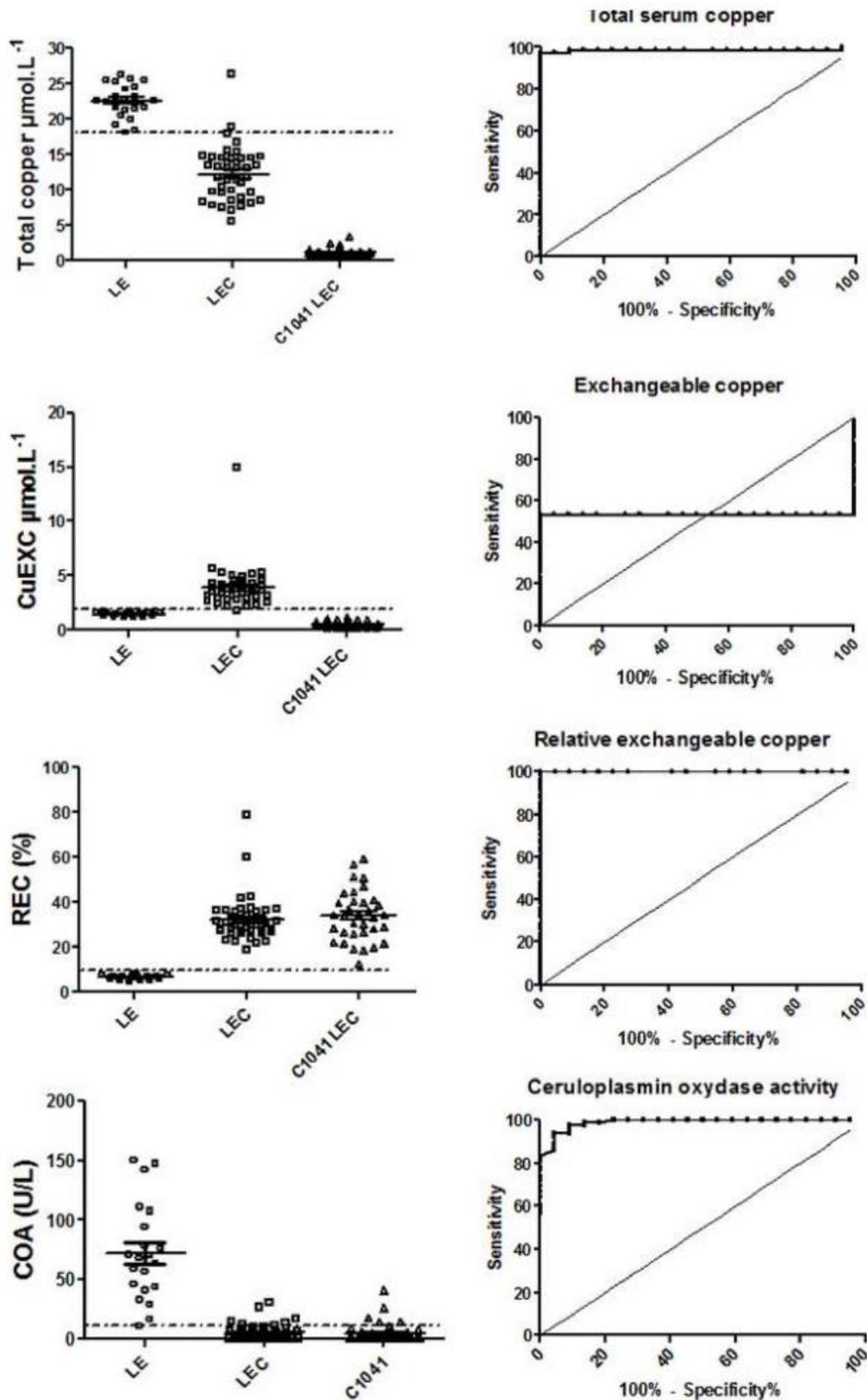


Figure 5. ROC tests for Wilson's disease biomarkers in adult LEC, C1041 LEC and Long-Evans rats and associated LEC versus LE rat ROC curves. Total serum copper, exchangeable copper (CuExc), relative exchangeable copper (REC) and ceruloplasmin oxidase activity (COA) in adult rat results are shown. Broken lines represent the cut-off value obtained from ROC analysis.
doi:10.1371/journal.pone.0082323.g005

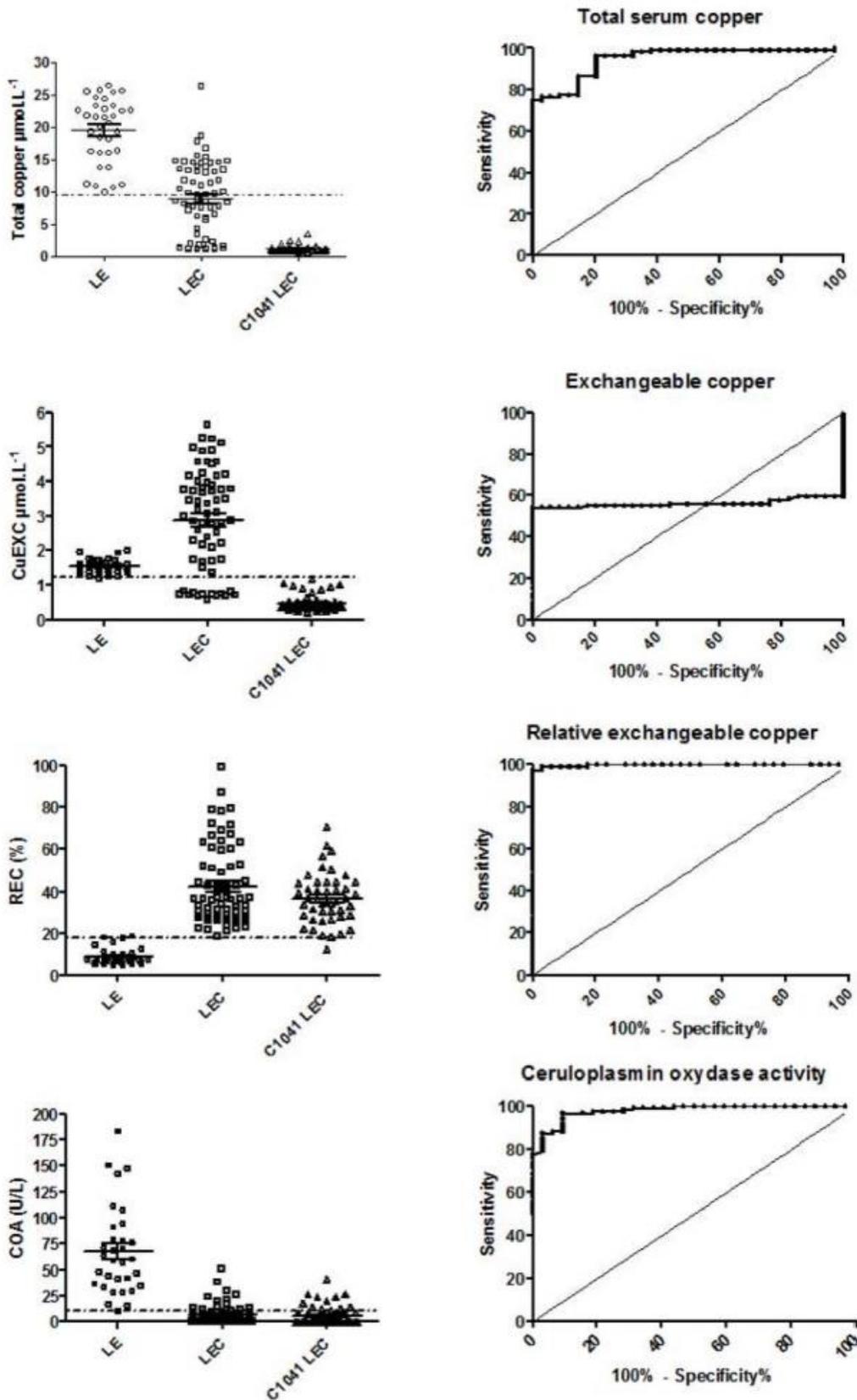


Figure 6. Global ROC tests for Wilson's disease biomarkers in LEC, C1041 LEC and Long-Evans rats and associated LEC versus LE rat ROC curves. Total serum copper, exchangeable copper (CuExc), relative exchangeable copper (REC) and ceruloplasmin oxidase activity (COA) in adult rats results are shown. Broken lines represent the cut-off value obtained from ROC analysis.
doi:10.1371/journal.pone.0082323.g006

+/- 0.07 $\mu\text{mol/l}$ vs. 1.8 +/- 0.2 $\mu\text{mol/l}$, $P=0.001$) but like total serum copper, CuEXC values were also dependent on copper intakes and ALF. Thus, CuEXC was unable to discriminate all of the LEC from the LE control group and yielded very low sensitivity and specificity (Figures 4 and 5).

Relative exchangeable copper. In both the LEC and C1041 LEC groups, REC was significantly higher than in the LE control group ($P<0.01$) at every time point of the study. Mean values were at 49.5% +/- 16.6% in the LEC group, 36.5% +/- 3.8% in the C1041 LEC group, versus 8.9% +/- 1.2% in the LE control group. A cutoff set at 18.2% offered SE and SP at 98% and 100%, respectively, in young rats. A cutoff set at 10.5% offered 100% SE and 100% SP for adult rats (Figures 4 and 5, Table S2). Taking the young and adult values together, a cutoff set at 19.0% enabled the marker to discriminate both LEC groups from the LE control group with 97.3% sensitivity and 100% specificity (Figure 6 and Table S1). REC values were not significantly different between male and female rats for all groups (Figure 7). In addition, REC was independent of weight and remained discriminating whatever the copper regimens (Figures 4 and 5) and the degree of liver failure, as shown below (Figure 8).

Ceruloplasmin oxidase activity. Ceruloplasmin oxidase activity revealed the same type of results with LE mean values (68.7 +/- 16.6 U/l) always superior to LEC (6.3 +/- 3.7 U/l) and C1041 LEC (6.0 +/- 3.9) values ($P<0.01$) (Figure 3). Nevertheless, great inter-individual and intra-individual disparities were observed and were greater with the COA assay than with other copper related markers. In the young rats, a cutoff at 27.2 U/L yielded 94.7% SE and 90.9% SP. In the adults, a COA cutoff at 16.6 U/L provided SE 93.7% and SP 95.5% (Figure 5, Table S2).

Copper related markers evolution in acute liver failure. There were great inter-individual disparities at each time point owing to the different ages at the onset of ALF. We therefore studied the evolution of different markers before and during ALF (Figure 8). For this analysis, we only used the values of the LEC rat group.

AST and ALT were 2- to 3-fold higher than normal values in cases of clinical ALF (11.47 +/- 7.11 $\mu\text{kat/l}$ vs. 4.18 +/- 2.75 $\mu\text{kat/l}$, $P<0.0001$ and 8.66 +/- 5.34 $\mu\text{kat/l}$ vs. 4.08 +/- 3.90 $\mu\text{kat/l}$, $P<0.0001$, respectively). Mean bilirubinemia ranged from 2.88 +/- 1.97 $\mu\text{mol/l}$ to 66.88 +/- 145.8 $\mu\text{mol/l}$. The

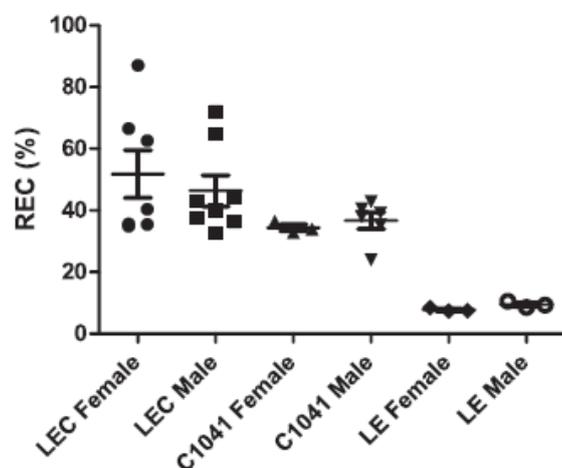


Figure 7. Influence of gender on REC values. Mean +/- SEM values are given separately for females and males in each group of LEC or LE rats.

doi:10.1371/journal.pone.0082323.g007

total serum copper of LEC rats after the onset of ALF (12.3 +/- 4.1 $\mu\text{mol/l}$) approached levels equivalent to the values of the LE control group (19.3 +/- 1.5 $\mu\text{mol/l}$). The mean value of CuEXC increased from 2.05 +/- 1.36 $\mu\text{mol/L}$ before the onset of ALF to 4.13 +/- 2.18 $\mu\text{mol/L}$ during ALF (Figure 8).

There was a slight but significant decrease in REC values after ALF (34.5 +/- 11.9% vs. 49.8% +/- 11.2% before ALF, $P=0.004$), but values during ALF did not reach the cutoff of 19%. COA did not show any significant difference before or after the onset of ALF (Figure 8).

We then attempted to correlate the values of these markers with the degree of ALF as defined in Table 1 (Figure 9). Despite the small number of rats in the moderate and fulminate liver failure groups (scoring 4-5 and 6-8 according to Table 1), we observed a correlation between the degree of liver failure and bilirubinemia, total serum copper and CuEXC, respectively. COA and REC were not influenced by the degree of liver failure, confirming their ability to discriminate LEC regardless of hepatic dysfunction.

Discussion

4.1 REC as a WD diagnostic tool in LEC rats

In a previous study in humans [6], REC appeared to be an excellent marker for the diagnosis of WD, with 100% SP and SE among the tested subjects. Nevertheless, this first study only dealt with patients with suspected WD and REC served as discriminatory factor between the WD patients and the healthy subjects, regardless of sex, age or the degree of underlying liver failure. We therefore sought to test the validity of this new biomarker throughout the course of the liver disease, from a presymptomatic stage to the beginning of chronic liver failure, and to study the potential effects of copper depletion on the evolution of REC values. Owing to the sensitivity of Long Evans Cinnamon rats to dietary copper and their tendency to develop liver failure, this WD animal model enabled us to test REC even in extreme conditions.

In this study, we demonstrated that REC could be used as a non-invasive and reliable diagnostic tool for WD in LEC rats. REC remained discriminating between LEC and LE rats throughout the study and was, in particular, not influenced by the presence of liver damage or by the copper intake regimen. Despite the fact that REC tended to decrease in adult rats and during ALF, LEC values always remained superior to 19%, with excellent sensitivity and specificity. Taking only adult rat values into account, the sensitivity and specificity of REC was 100%. Nevertheless, the decrease in REC values between 6 to 14-week-old Long-Evans rats and their stability after the age of 14 weeks indicated that it could be necessary to establish specific standards in a young population. In addition, it is well established that copper metabolism varies according to age [13].

Giving copper-free food to LEC rats prevented them from developing any clinical or biological signs of ALF throughout the course of this experiment. This was in agreement with other results [18]. Although these rats did not show disease-related symptoms, REC was elevated in all rats from the beginning of the study. On the contrary, total serum copper and exchangeable copper varied according to the copper intake regimen and the degree of liver failure. Total serum copper yielded good SE and SP in young and adult rats (one at a time) but the number of false positives was too high after the onset of ALF.

Clinical observation of our LEC rats was in agreement with data in the literature [13,15,19,27] with at least one episode of ALF before the age of 20 weeks in 100% of the cases without specific treatment. Among them, about 40% died of this first acute episode of liver failure and the rest survived with poor clinical and

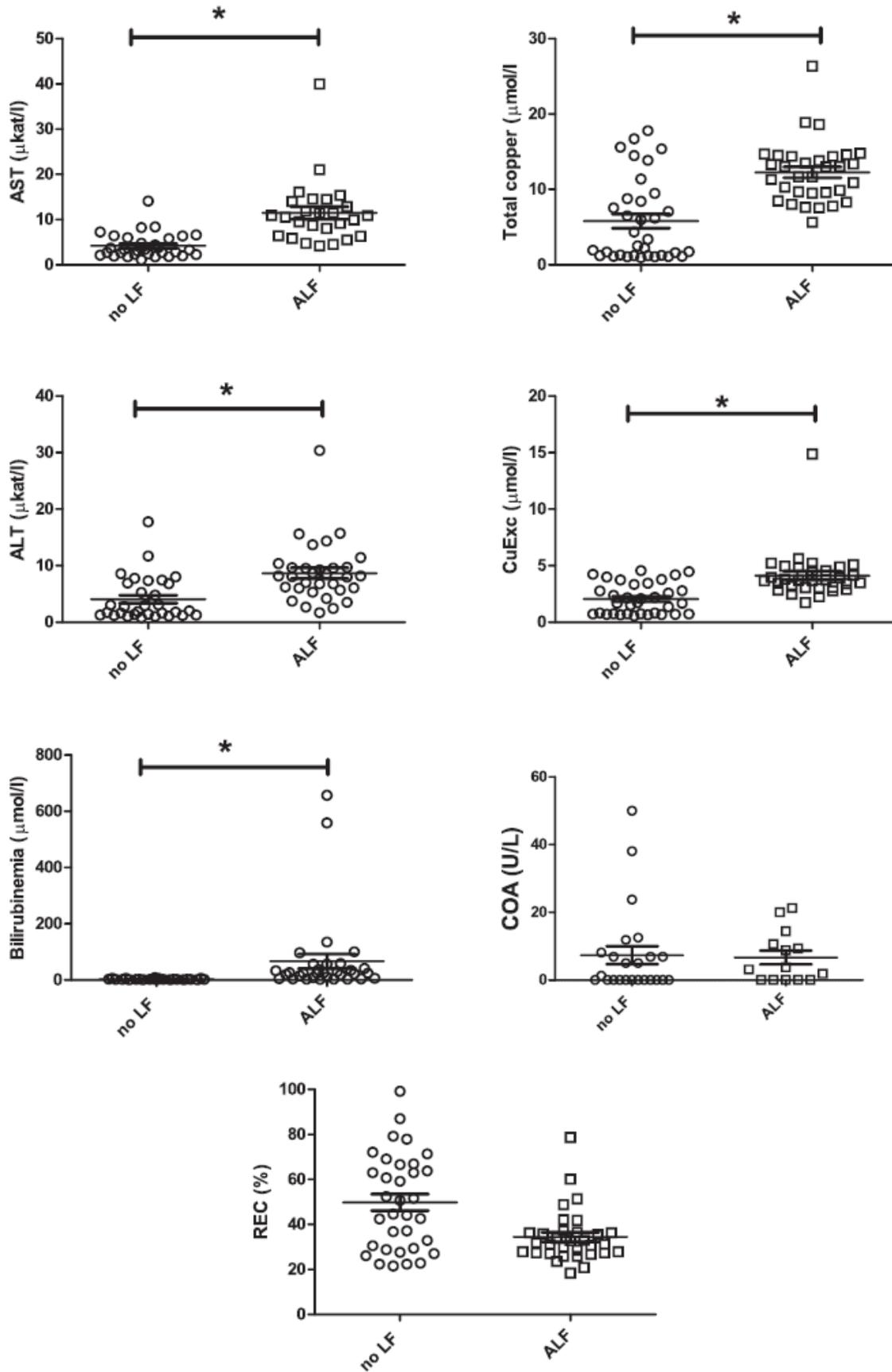


Figure 8. Comparison of serum biomarkers according to the presence or absence of acute liver failure. Values, means and SEM are given. One star (*) represents a statistically significant difference between the two groups.
doi:10.1371/journal.pone.0082323.g008

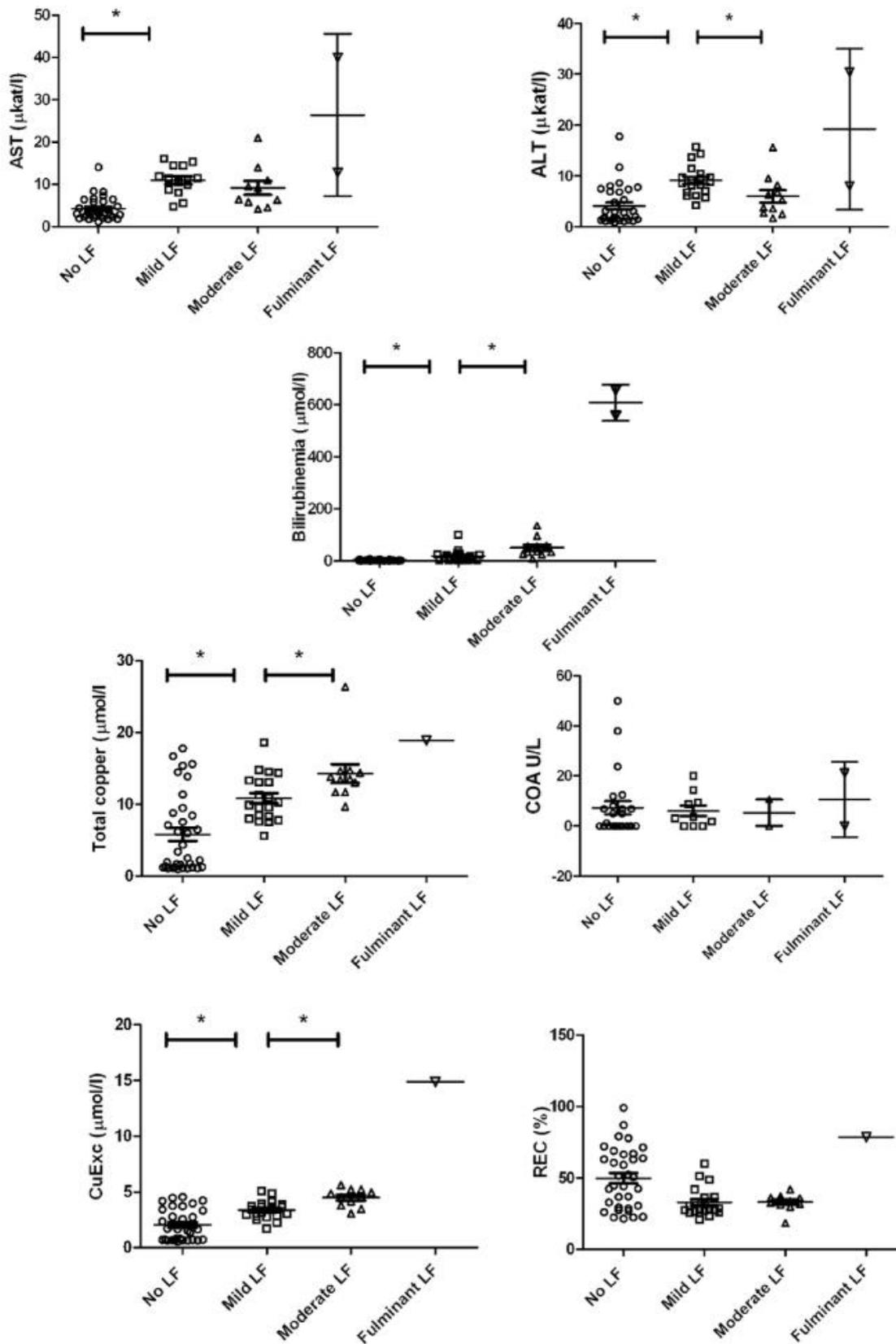


Figure 9. Evolution of serum biomarkers according to the grade of severity of acute hepatic failure. Values, means and SEM are given. One star (*) represents a statistically significant increase in serum marker value between the two grades of ALF.
doi:10.1371/journal.pone.0082323.g009

biological signs of chronic liver disease such as chronic jaundice and mild elevation of ALT and AST. In this group, transaminases were within normal ranges until the age of 10 weeks and bilirubinemia levels were normal after ALF had stopped. On the contrary, total serum copper increased during ALF to the values found in the LE control group. The only markers that could discriminate LEC rats throughout the study were COA (in agreement with Merle et al. [23]) and REC. However, COA has been reported to be almost absent in the LEC strain in some studies [26] but has been detected in others [19]. In our LEC rats, COA had great inter and intra-individual disparities.

Further studies are required in order to guarantee the specificity of REC in differentiating WD from other kinds of liver disease. Preliminary results using a model of cholestasis in rats showed that REC values were considerably lower than REC values in our animal model (data not shown).

4.2 CuEXC evolution during liver failure

Within the population of LEC rats, our results indicate that total serum copper and CuEXC levels were correlated to ALF. CuEXC in LEC rats started to increase with elevation of the hepatic cytolysis markers (ALT and AST) and its values remained high as the ALF settled.

As suggested in previous studies [18,28,29], copper is supposed to progressively accumulate in LEC hepatocytes during the first weeks of life until cytosolic storage capacities are overwhelmed. This could be accelerated by a massive burden of dietary copper as recently reported by Sijaj et al. [18]. Liver accumulated copper induces liver deterioration through oxidative stress and cell cycle activation and is finally released in the blood – not bound to ceruloplasmin – then eliminated through kidney ultrafiltration. This leads to an elevation of urinary copper. CuEXC has been described as the labile fraction of copper bound to different molecules such as albumin and transcuprein [8]. Hence, an increase in CuEXC serum levels could indicate the presence of abnormally high amount of toxic extrahepatic copper.

Another potential use of CuEXC could be as a marker of decoppering therapy efficiency. In fact, we have observed that CuEXC levels did not vary with time in the group of C1041 LEC rats whose copper intakes were quasi-absent and always remained under 1.0 $\mu\text{mol/l}$. Zinc-salt therapy, for instance, acts by inducing metallothionein synthesis in the enterocytes [30], which sequester copper and eliminate it through feces [31]. Overtime, it

depletes copper from the organism by a negative imbalance between intakes and outtakes. It is for this reason that CuEXC could be a good and simple marker for long-term monitoring with a persistent low value being the sign of good observance. Further studies will therefore be needed to assess the potential use of CuEXC as a monitoring marker in rats under chelating or zinc salt therapy.

Since CuEXC corresponds to the labile fraction of copper not bound to ceruloplasmin, the only factor that could a priori cause REC values to evolve toward normal values should be the restoration of holoceruloplasmin levels in the serum which is controlled by a functional ATP7B protein in the liver [32,33]. This hypothesis must be validated in a WD patient with a liver transplantation and could have a future application in pre-clinical trials in LEC rats by helping the following up of WD gene therapy.

Conclusion

In summary, our results indicate that REC could be used as a reliable WD diagnostic marker with 100% sensitivity and 100% specificity. REC is at least as good as COA to discriminate LEC (ATP7B-) from LE (ATP7B+) rats. In addition, it does not depend on the existence of underlying liver damage or on the copper intake regimen. On the other hand, we propose the use of exchangeable copper as a marker which able to reflect copper overload before and during ALF. Finally, in comparison with normal Long-Evans rats, we can propose cut-off values for each serum marker tested in this WD animal model.

Supporting Information

Table S1 Results of ROC curve analysis of serum markers for Wilson's disease.
(DOC)

Table S2 Detailed ROC curve analysis of Wilson's disease markers in young and adult LEC rats.
(DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FS SE GP. Performed the experiments: FS SE. Analyzed the data: FS SE JMT FW JP. Contributed reagents/materials/analysis tools: OL THN SE FS. Wrote the paper: FS SE. Animal care and sampling: JR PL.

References

- Lalioti V, Sandoval I, Cassio D, Dudos-Vallec JC (2010). Molecular pathology of Wilson's disease: a brief. *J Hepatol* 53: 1151–1153.
- Schilsky ML (2009) Wilson disease: current status and the future. *Biochimie* 91: 1278–1281.
- Merle U, Stremmel W, Encke J (2007) Perspectives for gene therapy of Wilson disease. *Curr Gene Ther* 7: 217–220.
- Medici V, Mirante VG, Fassati IR, Pompili M, Forti D, et al. (2005) Liver transplantation for Wilson's disease: The burden of neurological and psychiatric disorders. *Liver Transpl* 11: 1056–1063.
- Kenney SM, Cox DW (2007) Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Hum Mutat* 28: 1171–1177.
- El Balkhi S, Trocello JM, Poupon J, Chappuis P, Massicot F, et al. (2011) Relative exchangeable copper: a new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis. *Clin Chim Acta* 412: 2254–2260.
- Venclinov TI, Beattie JH, Dainty JR, Hollands WJ, Fairweather-Tait SJ, et al. (2007) Stable isotope pilot study of exchangeable copper kinetics in human blood plasma. *J Trace Elem Med Biol* 21: 138–140.
- Buckley WT, Vanderpool RA (2008) Analytical variables affecting exchangeable copper determination in blood plasma. *Biomaterials* 21: 601–612.
- El Balkhi S, Poupon J, Trocello JM, Massicot F, Woimant F, et al. (2010) Human plasma copper proteins speciation by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Solutions for columns calibration by sulfur detection. *Anal Chem* 82: 6904–6910.
- Kim JW, Kim JH, Seo JK, Ko JS, Chang JY, et al. (2013) Genetically confirmed Wilson disease in a 9-month old boy with elevations of aminotransferases. *World J Hepatol* 5: 156–159.
- Chappuis P, Callebert J, Quignon V, Woimant F, Laplanche JL (2007) Late neurological presentations of Wilson disease patients in French population and identification of 8 novel mutations in the ATP7B gene. *J Trace Elem Med Biol* 21: 37–42.
- Vonk WI, Wijmenga C, van de Sluis B (2008) Relevance of animal models for understanding mammalian copper homeostasis. *Am J Clin Nutr* 88: 840S–845S.
- Yoshida MC, Masuda R, Sasaki M, Takeichi N, Kobayashi H, et al. (1987) New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat. *J Hered* 78: 361–365.
- Suzuki KT, Kanno S, Misawa S, Aoki Y (1995) Copper metabolism leading to and following acute hepatitis in LEC rats. *Toxicology* 97: 81–92.
- Masuda R, Yoshida MC, Sasaki M, Dempo K, Mori M (1988) Hereditary hepatitis of LEC rats is controlled by a single autosomal recessive gene. *Lab Anim* 22: 166–169.
- Hayashi M, Fuse S, Endoh D, Horiguchi N, Nakayama K, et al. (2006) Accumulation of copper induces DNA strand breaks in brain cells of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, an animal model for human Wilson Disease. *Exp Anim* 55: 419–426.
- Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW (1994) The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat Genet* 7: 541–545.

18. Sijaj R, Sauer V, Stoppeler S, Spiegel HU, Kohler G, et al. (2013) Dietary copper triggers onset of fulminant hepatitis in the Long-Evans cinnamon rat model. *World J Gastroenterol* 18: 5542–5550.
19. Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, et al. (1991) Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease. *J Clin Invest* 87: 1858–1861.
20. Sone K, Maeda M, Wakabayashi K, Takeichi N, Mori M, et al. (1996) Inhibition of hereditary hepatitis and liver tumor development in Long-Evans cinnamon rats by the copper-chelating agent trientine dihydrochloride. *Hepatology* 23: 764–770.
21. Fong RN, Gonzalez BP, Fuentealba IC, Cherian MG (2004) Role of tumor necrosis factor-alpha in the development of spontaneous hepatic toxicity in Long-Evans Cinnamon rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 200: 121–130.
22. Carstens E, Moberg GP (2000) Recognizing pain and distress in laboratory animals. *ILAR J* 41: 62–71.
23. Merle U, Eisenbach C, Weiss KH, Tuma S, Stremmel W (2009) Serum ceruloplasmin oxidase activity is a sensitive and highly specific diagnostic marker for Wilson's disease. *J Hepatol* 51: 925–930.
24. Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF (1974) Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clin Chem* 20: 1556–1563.
25. El Balkhi S, Poupon J, Trocetto JM, Leyendecker A, Massicot F, et al. (2009) Determination of ultrafiltrable and exchangeable copper in plasma: stability and reference values in healthy subjects. *Anal Bioanal Chem* 394: 1477–1484.
26. Terada K, Nakako T, Yang XL, Iida M, Aiba N, et al. (1998) Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA. *J Biol Chem* 273: 1815–1820.
27. Kasai N, Osanai T, Miyoshi I, Kamimura E, Yoshida MC, et al. (1990) Clinicopathological studies of LEC rats with hereditary hepatitis and hepatoma in the acute phase of hepatitis. *Lab Anim Sci* 40: 502–505.
28. Bartee MY, Lutsenko S (2007) Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level. *Biomaterials* 28: 627–637.
29. Gray LW, Peng F, Molloy SA, Pendyala VS, Muchenditsi A, et al. (2012) Urinary copper elevation in a mouse model of Wilson's disease is a regulated process to specifically decrease the hepatic copper load. *PLoS One* 7: e38327.
30. Yuzbasiyan-Gurkan V, Grider A, Nostrand T, Cousins RJ, Brewer GJ (1992) Treatment of Wilson's disease with zinc: X. Intestinal metallothionein induction. *J Lab Clin Med* 120: 380–386.
31. Anderson LA, Hakojarvi SL, Boudreaux SK (1998) Zinc acetate treatment in Wilson's disease. *Ann Pharmacother* 32: 78–87.
32. Bahde R, Kapoor S, Bhargava KK, Schilsky ML, Palestro CJ, et al. (2012) PET with ⁶⁴Cu-histidine for noninvasive diagnosis of biliary copper excretion in Long-Evans cinnamon rat model of Wilson disease. *J Nucl Med* 53: 961–968.
33. Meng Y, Miyoshi I, Hirabayashi M, Su M, Mototani Y, et al. (2004) Restoration of copper metabolism and rescue of hepatic abnormalities in LEC rats, an animal model of Wilson disease, by expression of human ATP7B gene. *Biochim Biophys Acta* 1690: 208–219.

ScholarOne Manuscripts™

Human Gene Therapy

[Main Menu](#) / [Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Human Gene Therapy*.

Manuscript ID: HUMB-2014-116

Title: Restoration of liver transduction efficacy with lentiviral vectors in immunized against viral particles

Authors: Schmitt, Françoise
Le Boulc'h, Morwenn
Boni, Sébastien
Gauttier, Vanessa
Creneguy, Alison
N'Guyen, Tuan Huy
Ferry, Nicolas
Podevin, Guillaume

Date Submitted: 13-Sep-2014

 Print  Return

Restoration of liver transduction efficacy with lentiviral vectors in rats pre-immunized against viral particles

Françoise Schmitt¹⁻³, Morwenn Le Boulc'h², Sébastien Boni^{2,4}, Vanessa Gauttier³, Alison Creneqy³, Tuan Huy NGuyen³, Nicolas Ferry², Guillaume Podevin^{1,2}.

¹ HIFIH, UPRES 3859, équipe hépato-gastroentérologie pédiatrique, Université d'Angers, CHU d'Angers, Angers, France.

² INSERM U948, Laboratoire de biothérapies hépatiques, Université de Nantes, Hôtel Dieu, Nantes, France

³ INSERM UMR1064, Centre de Recherche en Transplantation et en Immunologie, Université de Nantes, CHU Jean Monnet, Nantes, France.

⁴ PACeM, Plate-forme d'Analyse Cellulaire et Moléculaire, SFR 4208, Angers, France

Corresponding author:

Françoise Schmitt, MD

HIFIH UPRES 3859

Service de chirurgie pédiatrique

CHU d'Angers

4, rue Larrey

49933 ANGERS cedex 09, FRANCE

Mail: francoise.schmitt@univ-angers.fr

Phone number: +33.2.41.35.42.90

Short title: Liver transduction despite lentiviral immunization

Abstract

Introduction: Gene therapy's interest increases with years, but the use of lentiviral vectors (LV) in humans is limited by a neutralizing immune response against the VSVg protein envelope. The aim of this study was (1) to evaluate the efficacy of the *in vivo* hepatic transduction in a rat modeling this human pre-immune response against LV, and (2) to prove the ability of the surgical injection of LV into a surgically Isolated Liver (LIL) to restore an efficient transduction in the liver of these rats.

Material and methods: Rats were immunized via intravenous injection of a VSVg-pseudotyped LV. Two weeks later, the presence of anti-VSVg neutralizing antibodies was assessed. Then, a GFP-encoding VSVg-pseudotyped LV was injected either through the portal vein or using the LIL approach, with or without liver washing (LIL-W). Transduction efficacy was tested 7 days later through qPCR and anti-GFP immuno-histochemistry in the liver. Extra-hepatic transduction as well as viremia were also assessed.

Results : All pre-immunized animals developed anti-VSVg neutralizing antibodies. Transduction efficacy after portal vein injection significantly decreased in pre-immunized animals compared to controls (0.01% versus 0.52%, $p=0.03$), and LIL restored the expected transduction level (0.33%) in VSVg-immunized rats. In non-immunized rats, LIL-W allowed a >50% decrease in viremia and no detection of vector genome in the extra-hepatic organs, but inhibited the liver transduction. No LV particles could be detected in the serum of the pre-immunized rats 5 minutes after LV injection, or in the extra-hepatic organs at sacrifice.

Conclusion : Pre-immunization of rats against VSVg protein efficiently mimics human seric inhibition of LV, thus protecting them against viral dissemination. The LIL approach in pre-immunized rats allowed a restoration of a good transduction efficacy in the liver. The LIL-W technique was efficient on viral dissemination in non-immunized rats, but prevented any liver transduction.

Introduction

Since the cure of the first X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) children in 2000 (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000 ; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2010), gene therapy has become a promising tool for the treatment of inherited diseases, and there are now up to 1800 gene therapy clinical trials ongoing or completed worldwide (Ginn *et al.*, 2013). With the better knowledge of pathophysiology, mechanism of action and adverse effects of gene therapy vectors, it is now clear that every particular disease may require a specific gene therapy strategy (Matsui *et al.*, 2011). Among critical issues to be addressed are the type of vector used, the requirement to target a specific organ or tissue and to prevent dissemination, the methods to counteract an immune response against the product of the transgene, the site of injection or the way to achieve long-term expression of the transgene.

The liver is the site of many enzymatic pathways. Hence, hepatocytes represent target cells for gene therapy of many inherited metabolic liver diseases, with some recent successes in the treatment of Crigler-Najar type 1 disease with lentiviral vectors in rats (Schmitt *et al.*, 2010a) or of haemophilia B through the use of adeno-associated viruses in human (Nathwani *et al.*, 2011). Nevertheless, in these diseases there is neither alteration of the liver parenchyma nor proliferation of hepatocytes, which ensures a better access of gene therapy vectors to hepatocytes as well as a sustained expression of the transgene. Concerning cirrhotic liver diseases, few pre-clinical studies have yet obtained a long-term correction of the underlying protein functionality. In these diseases, one condition may be the stable integration of the transgene in the genome of transduced hepatocytes to ensure long term expression of the transgene in the progeny of dividing cells, making lentiviral vectors more attractive than non-integrative vectors in this indication. Hence, Merle *et al.* (Merle *et al.*, 2006) obtained promising results in Wilson disease gene therapy with a LV encoding for human ATP7B cDNA, compared to the previous work of Terada *et al.*

with adenoviruses (Terada *et al.*, 1998) for the cure of the Long-Evans Cinnamon rat, an animal model for Wilson disease.

Lentiviral vectors are mostly pseudo-typed with the G glycoprotein from the vesicular stomatitis virus (VSVg). Such pseudo-typing allows to achieve higher titers of lentiviral vectors with increased purity and stability of the viral particle (Burns *et al.*, 1993), can be produced in GMP and was safely used in clinical trials (Aiuti *et al.*, 2013; Cavazzana-Calvo *et al.*, 2012). Lentiviral vectors can also efficiently transduce post-mitotic cells of many tissues in animals (Naldini *et al.*, 1996; Kafri *et al.*, 1997). However a thorough limitation for human applications of such LV-VSVg pseudotyped particles arises from the fact that VSVg is inhibited by the serum of primates, including humans (DePolo *et al.*, 2000; Negre *et al.*, 2000). This non-specific inhibition is mediated by the complement, as shown by experiences of heat inactivation of the serum, which restores LV transduction efficiency, although it could also partially result from antibodies activity. Such adverse effects have not been seen in rodents, making experimentations on this topic difficult.

Our team is developing a surgical strategy of gene delivery in the liver, called the LIL approach (Lentiviral in Isolated Liver approach), which allows a 10-fold increase in hepatocytes transduction levels compared to lentiviral vectors delivered via the portal vein (Dariel *et al.*, 2009; Schmitt *et al.*, 2010b). This approach also decreases the extra-hepatic viremia after liver declamping (Podevin *et al.*, 2004; Dariel *et al.*, 2009). We reasoned that the contact of the LV particle with serum proteins (complement and antibodies) might be limited by LIL due to the small volume of serum present in the liver. Also, a further reduction of potential contact of LVs with serum proteins could be achieved by a preliminary step of liver washing before LV injection. On the opposite, one could take advantage of the innate response against VSVg to prevent the extra-hepatic dissemination of lentiviral particles after restoration of the blood flow in the liver in a safety perspective to decrease unwanted transduction of extra hepatic organs.

To test this hypothesis, we developed a rodent model of VSVg-pseudotyped LV inactivation by pre-immunisation of Wistar rats. These pre-immunised animals were then transduced with a LV encoding for the green fluorescent protein (GFP) via the portal vein or the LIL approach with or without washing steps to test (1) the transduction efficacy and (2) the extra-hepatic transduction after LV release in the systemic circulation.

Material and methods

Experimental procedures

Wistar male rats were purchased from Janvier (Janvier S.A.S, Le Genest St-Isle, France) and housed at the animal facilities of Nantes medical university. Following current recommendations from the French

Ministère de l'Agriculture, they were maintained under a 12 hours light cycle and fed *ad libitum*. After one acclimatization week, at the age of 4 weeks, they were randomly assessed in the different experimental groups. The experimental plan is summarized in Figure 1. Half of them were immunized against VSVg via tail vein injection of a saline solution of VSVg pseudotyped LV encoding for UGT1A1 at a dose of $1.10E+09$ ip/kg. Fourteen days later, blood was taken retro-orbitally from every rat to detect the presence of antibodies against VSVg. Then, a solution containing a LV encoding the green fluorescent protein (GFP) under the control of the murine transthyretin protein promoter (mTTR) at a dose of $2.10E+10$ ip/kg was delivered to the liver either through direct infusion in the portal vein (PV) or under Lentiviral in Isolated Liver (LIL) approach (Dariel *et al.*, 2009) with and without liver washing (3 animals/group). Control rats received saline. Animals were sacrificed seven days later through exsanguination under general anesthesia and the liver, the spleen, the kidney and the testis were taken and frozen at -80°C for further analysis. One sample of the liver was fixed in 3% formaldehyde for histological examination.

Every experimental procedure was performed under general anesthesia with isoflurane 3% in air. Peri-operative analgesia consisted in subcutaneous injection of butorphanol 0.25 mg/kg and animals received ibuprofen 30 mg/kg in drinking water after operation. Every LV injection required a median laparotomy and intestines were retracted left. Portal vein injection (PV) was performed with a 30 gauges needle and hemostasis was obtained by gentle compression. The LIL procedure consisted in dissecting all the vessels around the liver (supra and infra-hepatic vena cava, hepatic artery and portal vein) and the right renal vein, with further insertion of a small catheter into the gastro-duodenal vein after its upstream ligation. A simultaneous clamping of the supra-hepatic vena cava with a Satinsky clamp and with micro-vascular arterial clamps for the other vessels was realized. The lentiviral vector solution, containing $2.10E+10$ ip/kg diluted in saline (0.9%) for a final volume of 8.9 ml/kg and 1% polybrène (Sigma-Aldrich), was then injected in the isolated liver through the gastro-duodenal catheter at a pressure previously established at 10 cm H₂O (Dariel *et al.*, 2009) and maintained there for 5 minutes (Figure 2). LIL with washing steps (LIL-W) required an additional 24 gauges catheter inserted in the infra-hepatic vena cava. A first anterograde washing of the liver with 0.9% saline solution (20 ml at 5 ml/min) released blood from the liver, then the distal catheter was closed and the LV solution was injected as previously described. After 5 minutes, a second similar washing was performed to remove remaining LV particles before unclamping. Blood circulation was then restored, the catheters were removed and PDS 8/0 ligatures closed vessel holes. Isoflurane was stopped during liver clamping to prevent an overdose leading to respiratory failure, and restored at 1-2% afterwards. Some blood was taken with a 30 gauge needle from the right iliac vein five minutes after LV have been placed in contact with the systemic circulation, then the abdominal cavity was washed with 0.9% saline and the intestine was reintegrated before the abdominal wall was

closed in two plans with 3/0 absorbable sutures. The surgical procedures received agreement from the Pays de la Loire ethical comity for animal experimentation (CEEA 2012.12).

Lentiviral vector production and titration

HeLa, HuH7, and 293T cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum, 10mmol/L of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 2 mmol/L of glutamine, and antibiotics. High-titer lentiviral vector stocks were generated as previously described (Nguyen *et al.*, 2002) by calcium phosphate-mediated transient transfection of 293T cells by 3 plasmids, namely the vector transfer plasmid, the packaging plasmid psPAX2, and the vesicular stomatitis virus G protein (VSVg) envelope protein-coding plasmid pMD2G. These self-inactivated transfer vectors harbored the GFP complementary DNA under the control of a liver specific promoter, the murine transthyretin promoter (mTTR) fused to a synthetic hepatocyte-specific enhancer (Nguyen *et al.*, 2005). They expressed 4 target-sequences of the 142-3p micro RNA (kindly provided by Luigi Naldini), which prevents the expression of the transgene in immune cells, avoiding the development of a specific immune response against GFP (Brown *et al.*, 2006). They also harbored the cis-acting central polypurine tract (cPPT) and the central termination sequence (CTS) from the human immunodeficiency virus 1, and the posttranscriptional regulatory element from the woodchuck hepatitis virus (WPRE). Vector titers were determined on HeLa cells by q-PCR using the Mesa Green q-PCR MasterMix Plus (Eurogentec, France) and with an ABI Prism 7700 sequence detection system. For this titration, the following primers (Eurogentec) specific for 5'-untranslated lentiviral vectors were used: GAG-F, GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA; GAG-R, GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC. For normalization of the amount of genomic DNA, primers specific for b-actin gene were used: HB2-F, TCCGTGTGGATCGGCGGCTCCA; HB2-R, CTGCTTGCTGATCCACATCTG. A standard curve was generated by using dilutions of lentiviral vector plasmid in genomic DNA extracted from HeLa cells as previously described (Nguyen *et al.*, 2002).

Anti-VSVg antibody detection through enzyme-linked immune-sorbent assay

Maxisorp™ 96 wells ELISA plates (Sigma-Aldrich, Lyon, France) were directly coated with VSVg pseudotyped LV encoding another transgene than GFP (namely glypican 3 and beta-galactosidase) to prevent crossed detection of anti-GFP antibodies. Lentiviral particles had been previously inactivated by a three-step sterilization procedure consisting in a 90 seconds exposition to ultraviolet rays (Bio-Rad GS Gene Linker® UV chamber). Proteins in the LV solution were quantified by the modified Lowry method (Raghupathi and Diwan, 1994), using the DC™ protein assay kit from Bio-Rad (Bio-Rad, Marnes-la-

Coquette, France) in accordance with the instructions of the manufacturer. Optical density (OD) was measured by spectrophotometry at 750 nm and the concentration in proteins was determined by comparison with the curve obtained with a bovine serum albumin (BSA) calibration range (0 to 20 ng/ml). Fifty microliters of the LV solution (20 µg/ml) were then placed on each well, and the plate was incubated overnight at 4°C.

Next day, non specific sites were blocked by a 90 minutes incubation with 200 µl of PBS-Tween 20 0.5%-BSA 1% at room temperature (RT). Seric samples were then diluted at 1/50, 1/1000 and 1/5000, set down in triplicate and incubated at 37°C during 90 minutes. Fifty microliters of a biotinylated secondary antibody diluted 1/2000 (Vectastain® Elite ABC kit, Vector Labs, France) were added after three washings of PBS-Tween20 0.5% and incubated one hour at 37°C. The plate was then washed again before 50 µl of 1/1500 diluted Streptavidine peroxidase were added and incubated one hour at 37°C. Revelation was performed by 5 minute incubation at RT with 50 µl of 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS, Roche, Mannheim, Germany), stopped with 50 µl distilled water. OD was read by spectrophotometry at 405 nm.

In vitro neutralization assay

Seric neutralizing antibodies developed against VSVg should prevent cell transduction by ligation on the LV envelope. A mix solution containing the serum of the rats and a LV-GFP solution at a previously defined 1:20 dilution was incubated during 30 minutes at 37°C and placed with 200 µl culture medium without bovine fetal serum on 12 wells-plates of human hepatocarcinoma Huh7 cells during 30 additional minutes. Culture medium was then completed to 500 µl/well and cells were cultured at 37°C during three days. GFP-positive cells were then counted by FACS analysis (LSRII, BD Bioscience, San Jose, CA) and results were analyzed with the Flowjo® software.

Viremia

Human hepatocarcinoma Huh7 cells were incubated during 4 days in presence of the serum of the rats harvested either before or five minutes after LV infusion. Serum dilutions were 1/10 and 1/100. If LV infectious particles remained present in the serum of any rat, Huh7 would be infected and express GFP after 4 days. GFP-positive cells were then counted by FACS analysis as described above.

Lentiviral vector genome copies determination in rat tissues

Total DNA was extracted from tissue samples using the DNeasy Blood & Tissue Qiagen extraction kit in accordance with the manufacturer's recommendations and diluted in 50 µl AE medium. Quantification was made using a Nanodrop® device (ND 1000, USA). Quantitative real time PCR was performed using

the MesaGreen qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentech, Angers, France) in a total volume of 20 µl (10 µl master mix, 0.2 µl primer forward 10 µM, 0.2 µl primer reverse 10 µM, 7.6 µl H₂O) with 100 ng of template DNA using LV GFP-F (5'ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA 3') and GFP-R (5'GGCGGATCTTGAAGTTCACC 3') specific primers, and normalization rat β-actin primers Act-F (5'AGCCATGTACGTAGCCATCCA 3') and Act-R (5'TCTCCGGAGTCCATCACAATG 3'). Cycling conditions consisted in 10 minutes at 95°C followed by 40 cycles at 94° C for 20 seconds, 60° C for 30 seconds and 72° C for 45 seconds, and a final elongation step (10 minutes at 72°C) before end dissociation (95°C during 15 sec, 60°C during 15 sec and 95°C during 15 sec). Serial dilutions (10² to 10⁻² copies) of the psPAX2 plasmid in rat total genome were used as control to determine the amounts of LV copies, and results were analyzed with the 2003 Excel® software (Microsoft, USA).

Anti GFP immuno-histochemistry

Immuno-histochemistry was performed on liver formalin-fixed/paraffin embedded sections (5 µm). Sections were rehydrated with toluene and alcohol washings. Endogenous peroxidase activity was inhibited by a 30-minute incubation at RT with a 3% H₂O₂ solution, non specific sites were blocked with an exposition to 1:100 horse serum diluted in PBS during 20 minute. The monoclonal primary mouse anti-GFP antibody (Clontech, Saint Germain en Laye, France) diluted 1:100 in PBS containing bovine serum albumin (2% wt/vol) and Tween 20 (0.1% vol/vol) was applied for 2 hours at RT. The GFP-positive cells were revealed with successive addition of a biotinylated goat antimouse immunoglobulin and a streptavidin-peroxidase complex (Vectastain® Elite ABC kit, Vector Labs, Peterborough, UK) using the 3,3'-diaminobenzidine (DAB peroxidase substrate kit, Vector Labs) as chromogenic substrate. Slides were counterstained with hematoxylin, and the GFP-positive cell index was calculated as the percentage of positively stained hepatocytes in 10 fields at ×40 magnification (one field containing 300 hepatocytes).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prim® 5.04 for Windows software (GraphPad Software, San Diego, CA). The unpaired two-sided Mann-Whitney test was used for the comparison of quantitative values, given as mean +/- standard deviation (SD). The significance level was set at p<0.05.

Results

Anti-VSVg immunization

The kinetics of anti-VSVg antibody synthesis had been previously established, showing that they were detectable in the serum of the rats as soon as day 14 by ELISA (data not shown). At day 14, mean OD of

the 10 VSVg-vaccinated rats was comparable to positive controls at every dilution of the serum tested (Figure 3a), and was statistically different from non-vaccinated rats ($p < 0.0001$) and from negative controls ($p < 0.003$). The ability of antibodies to inactivate LV particles and inhibit their transduction efficacy was tested by infection of Huh7 cells in culture with a mixture composed by a LV encoding for GFP and the serum of the rats. FACS analysis at day 4 revealed a $98.3 \pm 0.8\%$ mean transduction level for the cells infected with the LV incubated with the serum of non-immunized rats, comparable to cells only infected with the LV. On the contrary, when the LV had been exposed to the serum of VSVg-immunized rats, the mean transduction level was only $7.7 \pm 9.2\%$ ($p < 0.0001$), demonstrating the neutralization ability of the anti-VSVg antibodies on LV transduction.

Efficacy of the surgical procedure on liver transduction

Vaccination against VSVg did not impaired surgical outcome. Altogether, LIL-W procedure was clinically as well tolerated as LIL and PV injections. Liver tolerance to the surgical procedure had been previously assessed (supplementary data 1). As shown in figure 4a, anti-GFP immuno-histochemistry on formalin-fixed liver biopsies at day 7 proved that anti-VSVg vaccination significantly reduced the level of transduced hepatocytes whatever the type of LV injection. For example, transduction levels after PV injection decreased from $0.52\% \pm 0.22\%$ to $0.01\% \pm 0.01\%$ in pre-immunized rats ($p = 0.03$). LIL was more efficient to transduce hepatocytes than PV injection in non-immunized rats ($1.70 \pm 0.62\%$ vs $0.52 \pm 0.22\%$, $p = 0.01$) as well as in anti-VSVg vaccinated rats ($0.33 \pm 0.22\%$ vs $0.01 \pm 0.01\%$, $p = 0.03$). We found no difference in the transduction level of pre-immunized rats injected with LIL compared to the PV injection in non-immunized rats ($0.33 \pm 0.22\%$ vs $0.52 \pm 0.22\%$, $p = 0.13$), in favor of a rescue of hepatic transduction by the LIL procedure in pre-immunized rats. On the contrary, the addition of washing steps of the liver prevented any hepatocyte transduction even in non pre-immunized rats.

Impact of anti-VSVg immunization on lentiviral extra-hepatic dissemination

The amount of LV particles present in the serum of the rats 5 minutes after restoration of a liver blood flow was assessed by FACS analysis of Huh7 cells cultured in the presence of the serum of the rats. Infectious LV particles were undetectable in all sera of anti-VSVg immunized rats, regardless of the type of LV injection (Figure 5). In non-immunized rats, mean values for PV, LIL and LIL with washing steps were respectively $86.03 \pm 0.91\%$, $90.43 \pm 2.73\%$ and $38.32 \pm 20.65\%$. Hence, LIL with washing steps remained significantly lower than PV or LIL alone injection ($p = 0.01$ each), whereas LIL alone was not more efficient than PV injection in preventing systemic viral release.

The integration of LV genome in extra-hepatic organs was then screened by qPCR in the spleen, the testis and the kidney (Figure 6). In the pre-immunized rats (I+), there was no significant levels of LV copies to be detected in the three organs, whatever the type of LV injection. In the non-immunized population (I-),

LV were detected at a very low level in both kidney and testicle (under 1% transduced cells), 3 to 10 times lower with the LIL-W injection than the PV one ($p = 0.01$); LIL alone did not appear to significantly decrease LV dissemination as compared to PV. Levels of vector copies in the spleen were much higher, at 0.34 ± 0.07 vc/hg with the PV injection. In this organ, LIL as well as LIL-W were efficient to decrease LV integration, with a 3-fold and a 6-fold reduction of the number of detected LV copies respectively (0.12 ± 0.07 vc/hg and 0.05 ± 0.03 vc/hg, $p = 0.01$). Comparing I+ to I- rats, paired by the type of LV injection, there was a dramatic reduction of LV integration in each organ tested (Figure 6) for the PV and the LIL groups, confirming the efficacy of the anti-VSVg immunization to prevent LV systemic dissemination. In the I- rats, only the LIL-W injection allowed a sufficient decrease in released infectious particles levels to prevent extra-hepatic dissemination, excepted for the spleen.

Discussion

Direct inactivation of VSVg pseudotyped lentiviral particles by simple contact with the serum severely impairs direct delivery gene therapy strategies in humans. As this effect does exist in primates (Sandrin *et al.*, 2002) but not in rodents or other species, it has not yet been particularly taken into account in previous LV pre-clinical assays. To our knowledge, this study is the first one that specifically addresses this topic. DePolo *et al.* (DePolo *et al.*, 2000) has demonstrated that VSVg-pseudotyped lentiviral particles were rapidly and completely inactivated by contact with native serum of primates or humans, but that this effect disappeared when the serum had previously been heat-inactivated. It suggested that the innate immunity against VSVg could be mediated not only by direct action of the complement, but by the existence of neutralizing antibodies too. To mimic this effect, we have developed a simple and reproducible model of rodent pre-immunization against VSVg. Hence, a single low-dose systemic injection of VSVg-pseudotyped LV has been sufficient to induce the development of specific VSVg neutralizing antibodies, that were detectable in the serum of the animals as soon as day 14. From that time, a simple contact between a LV particle and the serum of an immunized rat was sufficient to inhibit the infectious ability of the LV, as assessed by the neutralization assay which revealed a 14-fold reduction in the number of GFP positive cells by FACS analysis. These data are concordant with previously described neutralization assays of VSVg-pseudotyped LV with the serum of primates (DePolo *et al.*, 2000; Sandrin *et al.*, 2002), making our rodent model accurate for further analysis towards *in vivo* prevention of LV inactivation by contact with the serum.

As expected by the results of the neutralization assay, *in vivo* administration of the GFP encoding LV through the portal vein, which provided a direct and prolonged contact with the whole serum of the rats, did not result in any hepatocyte transduction in the vaccinated (I+) rats. Our hypothesis was that the LIL approach, in isolating the liver blood content from the systemic circulation, could decrease the exposition of the LV to serum components, and thus reduce LV inhibition. In the I- rats, this technique was useful to enhance liver transduction levels compared to PV injections, as previously described (Dariel *et al.*, 2009). In the I+ rats, LIL allowed a restoration of liver transduction equivalent to the one obtained with the PV injection in the I- rats, but there remained a significant 80% decrease compared to I- LIL injected rats. This implies that LIL transduction efficacy mainly comes from direct contact of the LV particles with the hepatocytes during the time of liver infusion, and not from iterative contacts after blood flow restoration. Indeed, one can assume that LIL-injected LV particles, when released in the systemic circulation of I+ rats, should be inactivated as in the PV injection. These results also show that LV inhibition by contact with the serum may act in a dose-dependent manner and suggest that depleting the liver from its blood content before LV injection may better preserve LV transduction efficacy. Nevertheless, adding washing steps with a 0.9% NaCl solution before and after LV injection through the LIL procedure completely inhibited any transduction efficacy in the liver. This adverse effect might be explained by the fact that the second wash before liver declamping, while forcing LV particles out of the liver and then collapsing the number of released particles in the systemic circulation, does not allow enough time for contact between the hepatocytes and the LV. It also may be due to the replacement of blood by 0.9% NaCl in the liver sinusoids during the first wash, before LV infusion. It thus may change some essential parameters for LV transduction efficacy, and particularly the temperature of the LV solution, inferior to 37°C, that could lower the entrance of LV particles in the hepatocytes. One other underestimated point could be the "endothelial massage" effect due to the passage of red blood cells into the liver sinusoids, which deformation induces a mechanical pressure that forces small particles such as LV through the fenestrae (Wisse *et al.*, 1985; Braet and Wisse, 2002). Replacing blood by 0.9% NaCl may have suppressed this important tool for liver transduction. The effect of separate pre- and post-LV injection liver washing should be clarified by further experimentations. It is noteworthy that Fujita *et al.* (Fujita *et al.*, 2006) had previously developed a similar procedure of liver perfusion with washes and hyper pressure to deliver Sendai virus to hepatocytes. In their experiment, they obtained good transduction efficiency with a similar pressure as in our experiment, but the size of their viral particle was higher and might partially have modified pressure and viscosity conditions of the viral medium.

The second major finding of this study was the respective impact of the type of LV injection and the anti-VSVg immunization toward LV extra-hepatic dissemination. To address this topic, we have analyzed not only the amount of viral particles released in the serum of the rats, but the presence of viral genome in

three key organs, namely the spleen as immunologic center, the kidney for his role in blood filtration, and the testicle to target the potential risk of germ line transmission. On the contrary to previous experiments (Cardoso *et al.*, 1993; Podevin *et al.*, 2004; Dariel *et al.*, 2009), LIL injection did not appear to lower the number of released infectious particles in the serum compared to PV injection in the non-immunized rats. Similarly, the number of vector copies detected by qPCR in the testis and in the kidney, while very low, was not different between both ways of injection. Nevertheless, this technique allowed a 3-fold reduction in transduction levels in the spleen compared to PV injection.

Given the inefficiency of LIL on vector dissemination, we developed the LIL-W technique. Indeed, the first step of washing was thought to prevent contact of LV with the serum, and the second wash before LV release in the systemic circulation was meant to remove as much LV particles from the liver as possible, thus enhancing biosecurity in preventing LV extra-hepatic dissemination (Fujita *et al.*, 2006). The 50% decrease in the number of LV infectious particles released in the serum as well as the significantly lower amount of vector genome detected by qPCR in the different organs at sacrifice supported this hypothesis. But even this technique did not achieve to make extra-hepatic dissemination disappear.

On the contrary, extra-hepatic detection of lentiviral genome or particle was fully prevented by simple contact with the serum of the rats containing anti-VSVg antibodies, whatever the route of administration of the LV. This result brings new insights for the use of VSVg in LV production, because it confers an excellent "natural" protection for non-human primates and humans toward LV dissemination out of the targeted organ. DePolo *et al.* (DePolo *et al.*, 2000) had previously demonstrated that there was a 80 to 100% decrease in VSVg-pseudotyped LV transduction levels on different cultured cell lines after a 1-hour incubation with the serum of non human primates, which was confirmed by the experiments of Sandrin *et al.* (Sandrin *et al.*, 2002) two years later. But to our knowledge, our work is the first demonstration of *in vivo* voluntary extinction of VSVG-pseudotyped lentiviral vector infectivity by the serum of animals, and only one previous study had determined the existence of native anti-VSVg antibodies in some strains of mice (Ochsenbein *et al.*, 1999).

In conclusion, in the present study we have addressed the specific topic of direct liver gene delivery by lentiviral vectors despite the VSVg innate immunity existing in primates, which constitutes a great limitation for the development of future clinical trials. We have created a rodent model of vaccination against VSVg protein, able to inhibit LV transduction by simple contact with its serum, thus mimicking the effects previously described in non-human primates and humans. We have then proved that the LIL technique was able to restore a good liver transduction level in VSVg pre-immunized rats, and that there was no extra-hepatic dissemination of LV particles in this specific model. It thus highlights another

advantage in using the VSVg protein for the lentiviral envelop, as protective tool in future human gene therapy trials toward extra target organ transduction. The addition of liver washing steps resulted in decreased extra-hepatic LV dissemination even in non VSVg-vaccinated rats, but prevented any liver transduction too. Further experimentations are still needed to better determine the exact role and interest of pre- and post-LV infusion washings to achieve good liver transduction levels without dissemination at release.

Acknowledgments

This work was partially supported by grants from the Association Française contre les Myopathies.

Conflict of interest

None

Bibliography

- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., *et al.* (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* **341**, 1233-1237.
- Braet, F., and Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* **1**, 1.
- Brown, B.D., Venneri, M.A., Zingale, A., Sergi, L., *et al.* (2006). Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* **12**, 585-591.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., *et al.* (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8033-8037.
- Cardoso, J.E., Branchereau, S., Jeyaraj, P.R., Houssin, D., *et al.* (1993). In situ retrovirus-mediated gene transfer into dog liver. *Hum Gene Ther* **4**, 411-418.
- Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., and Aiuti, A. (2011). Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 1. *Curr Opin Immunol* **24**, 580-584.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., De Saint Basile, G., Gross, F., *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-672.
- Dariel, A., Nguyen, T.H., Pichard, V., Schmitt, F., *et al.* (2009). A new surgical approach to improve gene transfer in liver using lentiviral vectors. *J Pediatr Surg* **44**, 517-522.
- Depolo, N.J., Reed, J.D., Sheridan, P.L., Townsend, K., *et al.* (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther* **2**, 218-222.
- Fujita, S., Eguchi, A., Okabe, J., Harada, A., *et al.* (2006). Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. *Biol Pharm Bull* **29**, 1728-1734.
- Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., *et al.* (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med* **15**, 65-77.

- Hacein-Bey-Abina, S., Hauer, J., Lim, A., Picard, C., *et al.* (2010) Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **363**, 355-364.
- Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H., *et al.* (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* **17**, 314-317.
- Matsui, H., Hegadorn, C., Ozelo, M., Burnett, E., *et al.* (2011). A microRNA-regulated and GP64-pseudotyped lentiviral vector mediates stable expression of FVIII in a murine model of Hemophilia A. *Mol Ther* **19**, 723-730.
- Merle, U., Encke, J., Tuma, S., Volkmann, M., *et al.* (2006). Lentiviral gene transfer ameliorates disease progression in Long-Evans cinnamon rats: an animal model for Wilson disease. *Scand J Gastroenterol* **41**, 974-982.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., *et al.* (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-267.
- Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G., Rangarajan, S., Rosales, C., *et al.* (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* **365**, 2357-2365.
- Negre, D., Mangeot, P.E., Duisit, G., Blanchard, S., *et al.* (2000). Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* **7**, 1613-1623.
- Nguyen, T.H., Bellodi-Privato, M., Aubert, D., Pichard, V., *et al.* (2005). Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Mol Ther* **12**, 852-859.
- Nguyen, T.H., Oberholzer, J., Birraux, J., Majno, P., *et al.* (2002). Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther* **6**, 199-209.
- Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., *et al.* (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**, 2156-2159.
- Podevin, G., Ota, E., Nguyen, J.M., Pichard, V., *et al.* (2004). Factors influencing immune response after in vivo retrovirus-mediated gene transfer to the liver. *J Gene Med* **6**, 16-21.
- Raghupathi, R.N., and Diwan, A.M. (1994). A protocol for protein estimation that gives a nearly constant color yield with simple proteins and nullifies the effects of four known interfering agents: microestimation of peptide groups. *Anal Biochem* **219**, 356-359.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., *et al.* (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100**, 823-832.
- Schmitt, F., Flageul, M., Dariel, A., Pichard, V., *et al.* (2010b). Transient increase in intrahepatic pressure mediates successful treatment of the Gunn rat with reduced doses of lentiviral vector. *Hum Gene Ther* **21**, 1349-1356.
- Schmitt, F., Remy, S., Dariel, A., Flageul, M., *et al.* (2010a). Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* **139**, 999-1007, 1007 e1001-1002.
- Terada, K., Nakako, T., Yang, X.L., Iida, M., *et al.* (1998). Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA. *J Biol Chem* **273**, 1815-1820.
- Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P., *et al.* (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* **5**, 683-692.

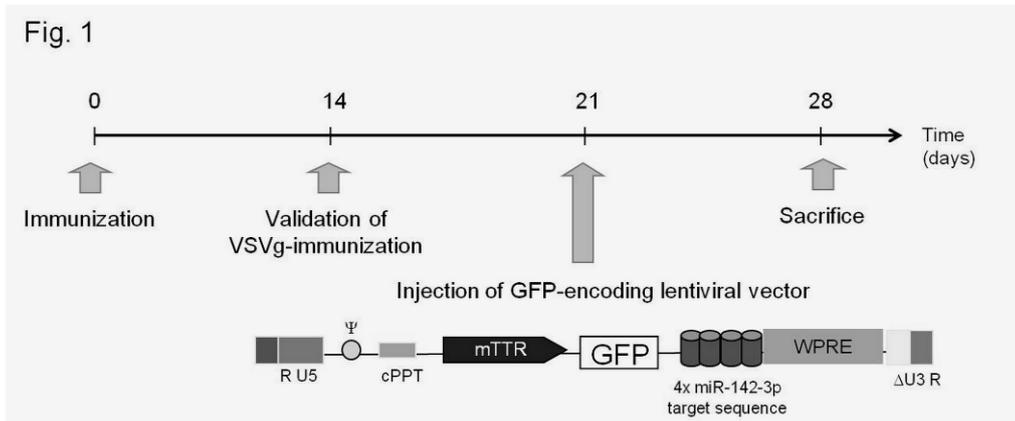


Figure 1: Experimental design. After VSVg immunization, the presence of neutralizing anti-VSVg antibodies in the serum of the rats was assessed, before a lentiviral vector encoding for the green fluorescent protein (GFP) under the control of the murine transthyretin promoter (mTTR) was injected in the liver through three different ways. Animal were sacrificed one week later for serum and tissue analysis.

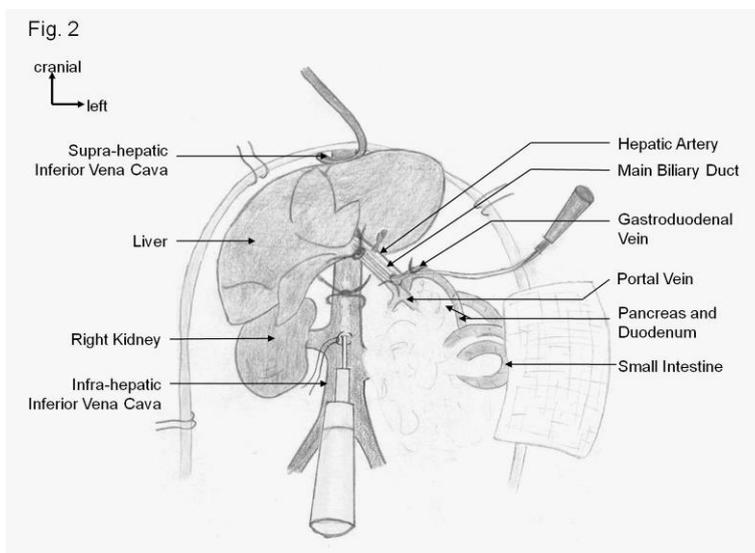


Figure 2: Front operating view of the Lentivirus in Isolated Liver (LIL) procedure. Washing steps of the liver require catheters inserted in both the gastro-duodenal vein and the inferior vena cava, LIL alone is limited to the catheterization of the gastro-duodenal vein.

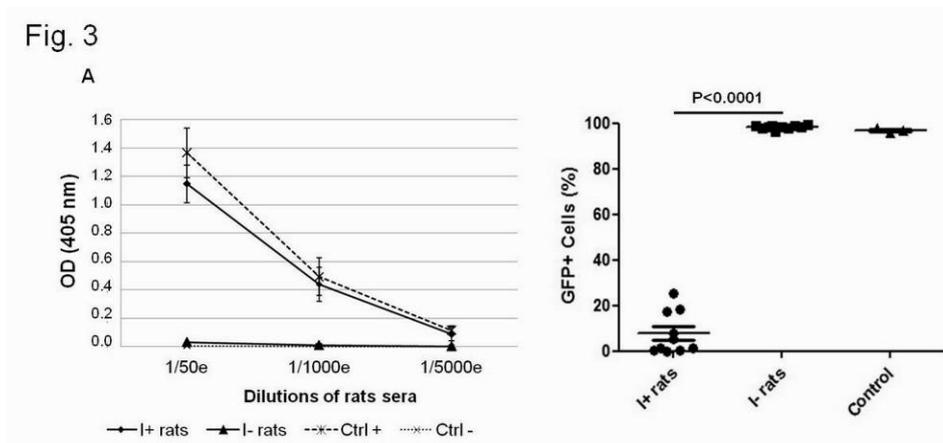


Figure 3: Detection of neutralizing anti-VSVg antibodies in the serum of the rats. **3A:** presence of anti-VSVg antibodies in the serum of pre-immunized rats (I+ rats), versus non immunized rats (I- rats) and controls (Ctrl). Mean values for each group of rats are represented with standard deviation. **3B:** Neutralization assay of the VSVg-pseudotyped lentiviral vector by incubation with the serum of the rats at day 14. Huh7 cells were then infected with the medium and analysed by FACS after 4 day. Control cells were only infected by the lentiviral vector.

Fig. 4

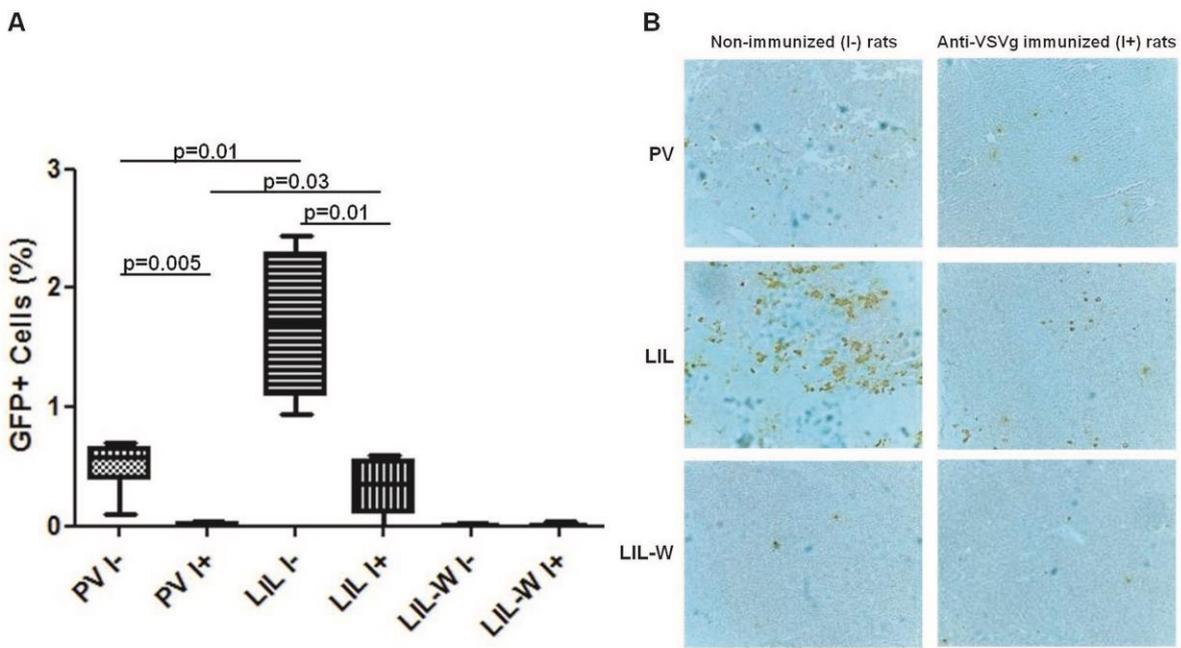


Figure 4: Transduction efficacy by anti-GFP immuno-histochemistry at day 7 of LV-GFP injection in the liver of anti-VSVg pre-immunized rats (I+) compared to non immunized rats (I-). **4A:** Percentage of GFP-positive hepatocytes after counting (x40). Three methods of lentiviral vector (LV) injection in the liver were tested: portal vein injection (PV), LV into a surgically Isolated Liver (LIL) alone and LIL with washing steps (LIL-W). **4B:** photographs of liver samples after anti-GFP immuno-histochemistry (x10). GFP-positive cells appear in brown.

Fig. 5

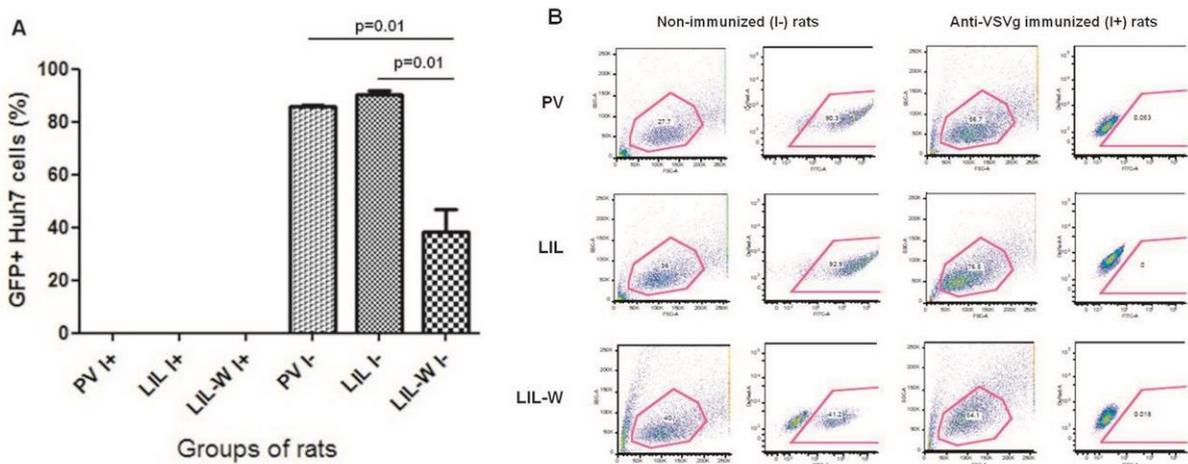


Figure 5: Quantification of infectious viral particles present in the serum of the rats 5 minutes after release from the liver. **5A:** Percentages of LV-GFP infected cell are represented a mean +/- SD in each group of injected rats, after a 4 days contact with the serum of the rats diluted in the culture medium. **5B:** examples of FACS analysis for each subgroup of rats.

Fig.6

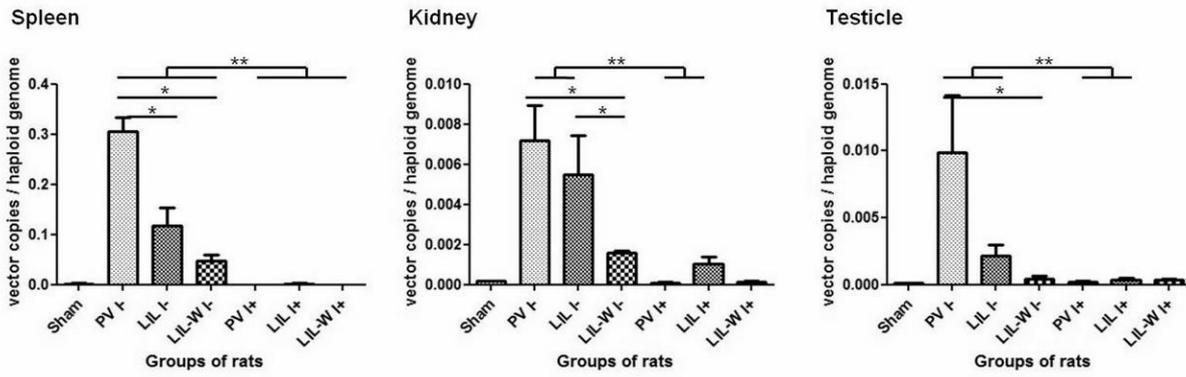
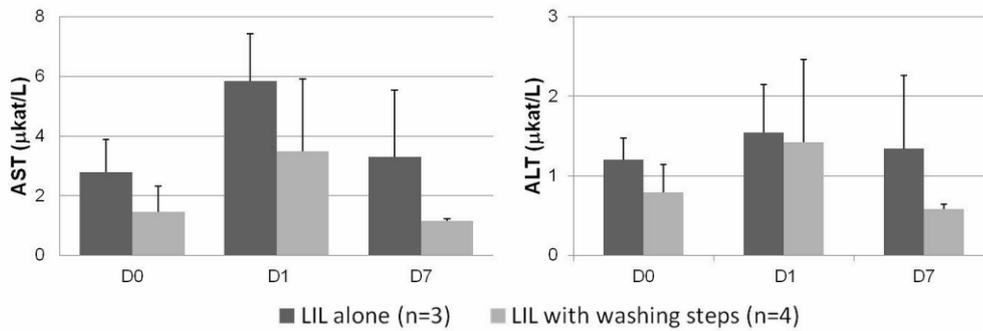


Figure 6: Lentiviral vector dissemination in extra-hepatic organs at sacrifice. Amount of GFP ADN sequences detected by qPCR are given as mean +/- SD for each group of rats. Significant differences between two groups of rats are represented by "*", and "***" represents differences between groups of VSVg-immunized (I+) or non-immunized (I-) rats, paired by the type of LV injection.

SupplData1



Suppl data 1: Liver tolerance to the Lentivirus in Isolated Liver (LIL) with washing steps procedure, compared to the LIL alone procedure. Aspartate and alanine amino-transferases (AST and ALT) were quantified in the serum of wistar rats before (D0), 24 hours (D1) and seven days (D7) after LV infusion. Liver transaminases showed a mild elevation at day 1 in both groups, that did not reach pathological values (<3N), and returned to normal values within one week.

Correction of Hyperbilirubinemia in Gunn Rats by Surgical Delivery of Low Doses of Helper-Dependent Adenoviral Vectors

Françoise Schmitt^{1,2}, Nunzia Pastore³, Cecilia Abarategui-Pontes¹, Maude Flageul¹, Anne Myara⁴,
Sophie Laplanche⁴, Philippe Labrune⁵, Guillaume Podevin^{2,6},
Tuan Huy Nguyen¹, and Nicola Brunetti-Pierri^{3,7}

Abstract

Helper-dependent adenoviral (HDAd) vectors are attractive for liver-directed gene therapy because they can drive sustained high levels of transgene expression without chronic toxicity. However, high vector doses are required to achieve efficient hepatic transduction by systemic delivery because of a nonlinear dose response. Unfortunately, such high doses result in systemic vector dissemination and dose-dependent acute toxicity with potential lethal consequences. We have previously shown in nonhuman primates that delivery of HDAd in surgically isolated livers resulted in a significantly higher hepatic transduction with reduced systemic vector dissemination compared with intravenous delivery and multiyear transgene expression. Encouraged by these data, we have now employed a surgical vector delivery method in the Gunn rat, an animal model for Crigler–Najjar syndrome. After vector delivery into the surgically isolated liver, we show phenotypic correction at the low and clinically relevant vector dose of 1×10^{11} vp/kg. Correction of hyperbilirubinemia and increased glucuronidation of bilirubin in bile was achieved for up to 1 year after vector administration. Surgical delivery of the vector was well tolerated without signs of acute or chronic toxicity. This method of delivery could thereby be a safer alternative to liver transplantation for long-term treatment of Crigler–Najjar syndrome type I.

Introduction

HELPER-DEPENDENT ADENOVIRAL (HDAd) vectors are attractive for liver-directed gene therapy because they can drive long-term transgene expression from transduced hepatocytes. After intravascular administration of adenoviral (Ad) vectors in rodents and non human primates, hepatocyte transduction follows a nonlinear dose response that has important consequences on both safety and efficacy (Nunes *et al.*, 1999; Morral *et al.*, 2002). In mice, the dose of 1×10^{11} vp/kg results in barely detectable transgene expression, whereas a dose of 1×10^{12} vp/kg gives a disproportionately high level of transgene expression (Tao *et al.*, 2001). Hydrodynamic injections of HDAd in mice allows for improved liver transduction with reduced systemic toxicity

(Brunetti-Pierri *et al.*, 2005) and has been successfully recapitulated in rats (Dimmock *et al.*, 2011). Nevertheless, hydrodynamic injections as performed in rodents cannot be performed in humans for safety reasons. Hence, minimally invasive methods of liver occlusion have been successfully developed to mimic hydrodynamic injection of HDAd vector in nonhuman primates, allowing substantially higher levels of hepatocyte transduction (Brunetti-Pierri *et al.*, 2007). Alternatively, higher liver transduction efficiency can be achieved with lower vector doses and with reduced systemic vector dissemination by delivering the vector into the surgically isolated liver (Brunetti-Pierri *et al.*, 2006). By this method of HDAd delivery, transgene expression has persisted for up to 7 years in nonhuman primates without long-term adverse effects (Brunetti-Pierri *et al.*, 2013). Therefore, this surgical

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMRS 1064, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Hôtel Dieu, 44093 Nantes, France.

²Pediatric Hepatogastroenterology–HIFIH Laboratory, UPRES 3859, SFR 4038, 49933 Angers, France.

³Telethon Institute of Genetics and Medicine, 80131 Napoli, Italy.

⁴Service de Biologie, Groupe Hospitalier Saint Joseph, 75674 Paris, France.

⁵Service de Pédiatrie, Hôpital Antoine Bécclère, 92141 Clamart, France.

⁶INSERM U948, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Hôtel Dieu, 44093 Nantes, France.

⁷Department of Translational Medicine, Federico II University, 80131 Napoli, Italy.

method may be attractive for severe inherited disorders, particularly those in which invasive procedures, such as liver transplantation, remains the only therapeutic option available.

Crigler–Najjar syndrome type I is a rare and severe inborn error of liver metabolism caused by complete deficiency of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 (UGT1A1), the enzyme responsible for the conjugation of bilirubin. As a result, affected patients present high serum levels of unconjugated bilirubin that cannot be excreted in the bile, thus accumulating in various organs, including the brain (Strauss *et al.*, 2006). Jaundice is the clinical hallmark of the disease and results in elevated risks of irreversible and potentially lethal brain damage (referred to as *kernicterus*) that may occur at any time when serum bilirubin raises above 20 mg/dl (342 μ M). Patients are usually treated for extended hours with phototherapy that results in increased excretion of bilirubin. However, phototherapy is time-consuming (up to 14 hr/day) and has a negative impact on the quality of life. Moreover, its efficacy decreases with aging. Although liver is macroscopically and microscopically normal, patients with Crigler–Najjar syndrome type I often undergo orthotopic liver transplantation to achieve correction of the enzyme deficiency. To overcome the drawbacks related to shortage of donors, mortality and morbidity related to the transplantation procedures, and risks of lifelong immunosuppression, alternative therapies are highly needed. The small percentage of hepatocytes required for phenotypic correction (Fox *et al.*, 1998; Brunetti-Pierri and Lee, 2005), the availability of a spontaneous animal model (e.g., the Gunn rat), and the ease of biological assessment of therapeutic efficiency make Crigler–Najjar syndrome a paradigm for gene therapy of inherited liver diseases. Therefore, during the past two decades, several studies have documented proof of principles of gene therapy for Crigler–Najjar syndrome in the Gunn rat using various vectors, such as viral vectors based on retrovirus (Nguyen *et al.*, 2007), lentivirus (van der Wegen *et al.*, 2006; Schmitt *et al.*, 2010), recombinant SV40 virus (Sauter *et al.*, 2000), Ad and HDAd (Askari *et al.*, 1996; Toietta *et al.*, 2005; Dimmock *et al.*, 2011; Pastore *et al.*, 2013), AAV (Seppen *et al.*, 2006), and naked plasmid DNA (Danko *et al.*, 2004; Jia and Danko, 2005). However, so far none of these approaches has clearly emerged as superior to the others for a long-term correction of Crigler–Najjar syndrome type I.

In this study, we investigated the potential of surgical delivery of clinically relevant low doses of HDAd vectors in the isolated liver to achieve long-term therapeutic correction of hyperbilirubinemia in the Gunn rat model.

Materials and Methods

Animal studies

Rats were housed in the animal facilities of Nantes University Medical School (Nantes, France) and were maintained under a 12 hr light cycle, fed *ad libitum*, receiving humane care according to the guidelines of the French Ministère de l'Agriculture. Male homozygous (j/j) Gunn rats weighing 293 \pm 30 g (age 11–13 weeks old) were used for the study.

HDAd vector

HDAd-UGT1A1 has been previously described (Dimmock *et al.*, 2011) and bears a liver-specific PEPCK-WL

expression cassette (Palmer and Ng, 2003; Brunetti-Pierri *et al.*, 2006), driving the expression of the human *UGT1A1* gene. HDAd was produced in 116 cells with the helper virus AdNG163 as described elsewhere (Palmer and Ng, 2003). Helper virus contamination was determined as described elsewhere (Palmer and Ng, 2003) and found to be <0.05%. DNA analyses of HDAd genomic structure were confirmed as described elsewhere (Palmer and Ng, 2003).

Vector administration

All procedures were performed under isoflurane general anesthesia (3% [v/v] in air). Homozygous (j/j) Gunn rats were injected with a vector dose of 1×10^{11} vp/kg. For portal vein (PV) injection, 0.3 ml of vector solution was injected intraportally over 1 min, using a 30-gauge needle, and hemostasis was obtained by gentle compression at the site of injection ($n=6$). High-volume injection of HDAd vector in the surgically isolated liver (HIL procedure) was performed as previously described ($n=6$) (Dariel *et al.*, 2009; Schmitt *et al.*, 2010). Briefly, the liver was totally excluded from the systemic blood flow by clamping the hepatic afferent and efferent vessels. The vector was infused in a large volume (8.9 ml/kg body weight) in the inferior vena cava (IVC) through a 30-gauge needle over 1 min. We have previously shown that this volume corresponds to an intrahepatic pressure of 10 cm H₂O by connecting a graduated water column to the catheter (Dariel *et al.*, 2009), whereas the normal hepatic pressure is below 1 cm H₂O. After 10 min of liver occlusion, blood flow was restored by declamping the suprahepatic IVC, hepatic artery and PV, and then the infrahepatic IVC. IVC hemostasis was achieved either by compression with Surgicel (Ethicon) or by 10/0 suturing of the vessel. Control animals did not receive any injection or surgical procedure ($n=4$).

Serum bilirubin and bilirubin conjugates

Blood was collected by retro-orbital sampling. Serum total bilirubin was measured in the routine biochemistry department of Nantes University Hospital. Normal range of serum bilirubin has been set as <8.5 μ M by comparison between normal and cholestatic rats, with a 75% sensitivity and 100% specificity (area under the curve [AUC] 0.938, 95% confidence interval 0.882–0.994) (Schmitt *et al.*, 2013). Bile was collected by bile duct cannulation after laparotomy at the time of sacrifice. The presence of monoglucuronide and diglucuronide bilirubin conjugates was determined by alkaline methanolysis as previously reported (Muraca and Blanckaert, 1983).

Hepatic vector genome copies

Total DNA was extracted from tissue samples using phenol–chloroform extraction and quantified by measuring the absorbance at 260 nm. Quantitative real-time PCR was performed using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) in a total volume of 20 μ l (10 μ l master mix, 2 μ l primer forward 10 μ M, 2 μ l primer reverse 10 μ M, 6 μ l H₂O) with 100 ng of template DNA using HDAd-specific primers: forward, 5'-TCTGAATAATTTTGTGTTACTCATA GCGCG-3'; reverse, 5'-CCCATAAGCTCCTTTTAACTTGT TAAAGTC-3'. Cycling conditions consisted of heating at 95°C for 10 min followed by 45 cycles at 95°C for 10 sec, 60°C for 7 sec, and 72°C for 20 sec. Serial dilutions (10^7 to

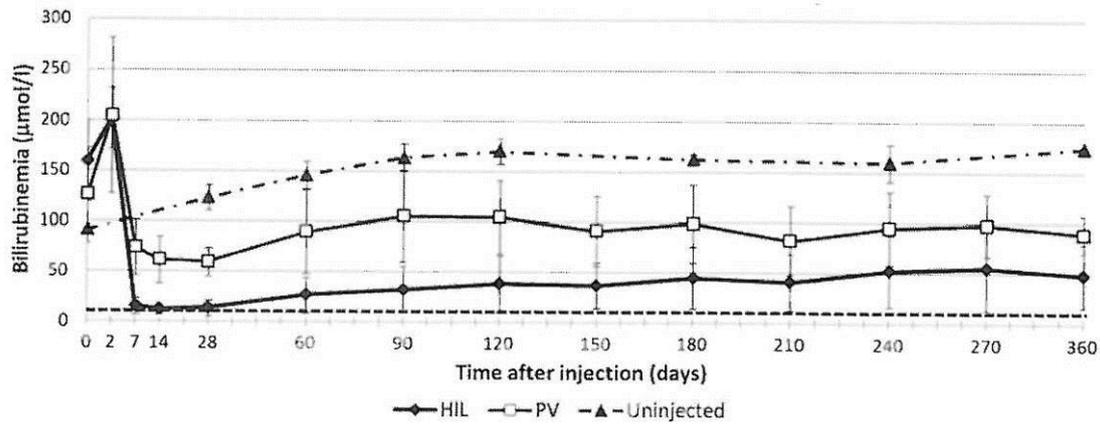


FIG. 1. Serum bilirubin levels in Gunn rats. Rats were injected with HDAd vectors encoding the human UGT1A1 under the control of a liver-specific promoter at a dose of 1×10^{11} vp/kg. Vector solution was injected by the isolated liver surgical procedure (HIL injection, closed diamonds, $n=6$) or into the portal vein (PV, open squares, $n=6$). A control group was not injected with the vector (closed triangles, $n=4$). Each value plotted represents mean \pm SD, and normal serum bilirubin range values fall below the dotted line. HDAd, helper-dependent adenoviral.

10^1 copies) of the plasmid pA21.7-PWL-hUGT1A1 bearing the PCR target sequence were used as a control to determine the amounts of HDAd. Results were analyzed with Light-Cycler software version 3.5 (Roche).

Statistical analysis

Data are expressed as mean values \pm standard deviations in the bar and line plots. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.04 software for Windows (GraphPad Software). Statistical significance was assessed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test for quantitative values inside one group of animals, and the Mann-Whitney test for comparisons between groups. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

HIL and PV injection procedures were both well tolerated, none of the treated animals died, and they all recovered from the surgical procedures within 24 hr. During the year of observation after vector administration, none of the rats developed appreciable clinical signs of illnesses and there was no evidence of tumor formation on necropsy. Liver histology by H&E was normal at sacrifice. ALT increased slightly, although not significantly, at 48 hr and 7 days postinjection without reaching values above the normal range in rats undergoing either HIL or PV injections: mean ALT values rose from a preoperative 0.68 ± 0.06 μ kat/liter to 1.49 ± 1.26 μ kat/liter at day 7 in the HIL group (nonstatistically significant, NS), and from 0.63 ± 0.30 μ kat/liter to 2.20 ± 3.44 μ kat/liter in the PV group.

To investigate therapeutic efficacy, serum bilirubin levels were monitored over time. As shown in Fig. 1, there was a peak of bilirubin at 48 hr, which might have resulted from the surgical procedure, in both the HIL group and in the PV group (201.8 ± 29.9 μ M vs. 204.5 ± 77.14 μ M, respectively, NS). From day 7 and for the first 2 months post vector administration, there was a marked (over 90%) reduction of baseline bilirubin levels in the HIL group. Thereafter, there was a sustained 70% reduction of baseline serum bilirubin at levels

that were just above the upper limit of the normal range (< 8.5 μ M). In this HIL group, all serum bilirubin measurements post vector administration were significantly lower than the baseline values ($p=0.03$). Similarly, mean serum bilirubin values in the PV group decreased at day 7 postinjection but never fell below 50 μ M (nadir at 59.3 ± 14.2 μ M), which corresponds to a 53% reduction of baseline measurements, and they were significantly lower than initial bilirubin values only during the first month post-injection. At the time of sacrifice, serum bilirubin in the HIL group was significantly lower than the PV group ($p=0.026$). In contrast to rats injected with HDAd, serum bilirubin in the control group always remained elevated with values up to 150 μ M. Hence, serum bilirubin levels in both HIL and PV groups were significantly lower than that in the control group throughout the entire period of observation ($p=0.024$). At the time of

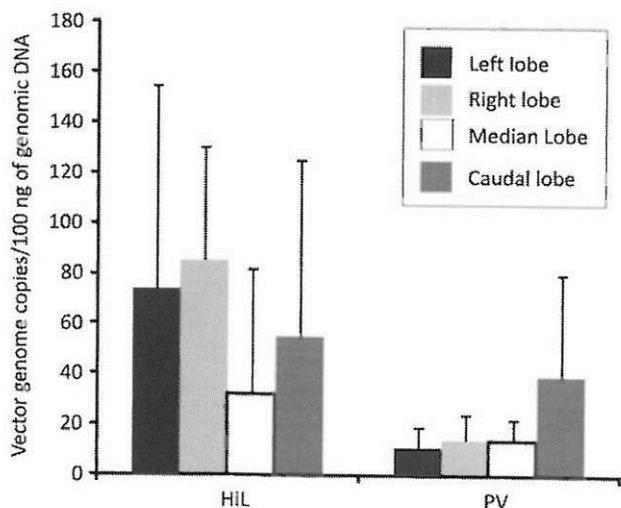


FIG. 2. Hepatic vector genome copies. Quantitative PCR analysis performed at the time of sacrifice on liver lobes from Gunn rats administered with vector by HIL or PV injections. Values are presented as mean \pm SD.

sacrifice at day 360 post vector administration, bile was collected by bile duct cannulation and liver lobes were harvested for evaluation of transduction efficiency. HDAd genome copies detected by quantitative PCR appeared to be higher in the livers of Gunn rats that underwent the HIL procedure compared with PV injection, and no preferential vector uptake among liver lobes was detected by either routes of administration (Fig. 2). Bile samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Fig. 3A). Because Gunn rats are homozygous for a frameshift mutation in the *UGT1A1* gene, they completely lack bilirubin conjugation activity and no bilirubin conjugates are detected in their bile (Fig. 3). Bilirubin mono-

and di-conjugates were present in the bile of both HIL and PV groups at a mean proportion of $70.7 \pm 36.7\%$ and $36.5 \pm 37.1\%$, respectively (Fig. 3B). Both were significantly higher than the value found in control uninjected Gunn rats, but in contrast to the HIL group, bilirubin conjugates in the PV group remained significantly lower than the $95.4 \pm 0.8\%$ level of the wild-type group ($p = 0.024$).

Discussion

In the present study, we showed that HDAd delivery into surgically isolated livers results in improved correction of

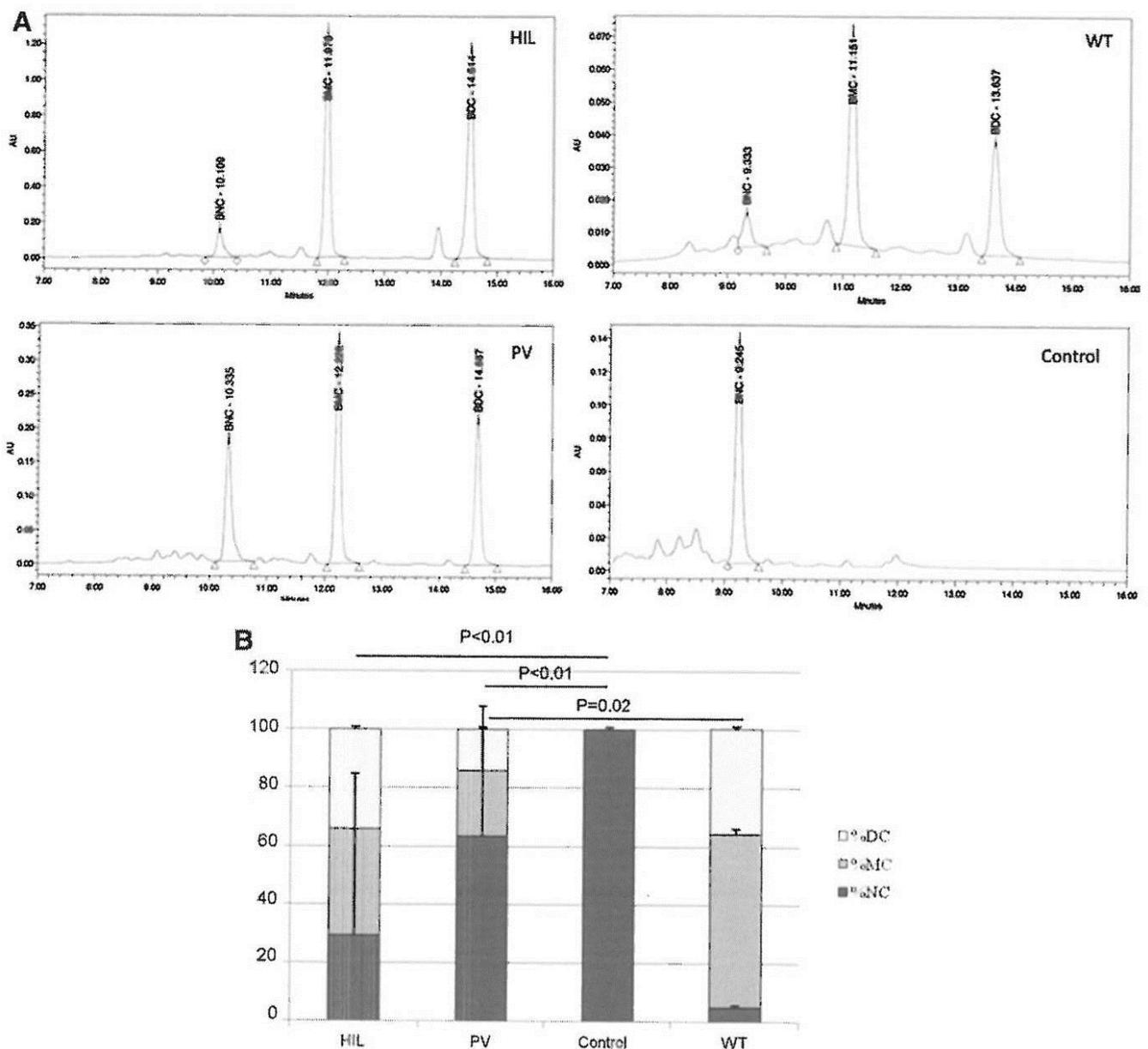


FIG. 3. Excretion of bilirubin glucuronides in bile 1 year post-injection. (A) Representative HPLC spectra of bile collected by cannulation of bile duct of Gunn rats that received HDAd by HIL injection (HIL) or PV injection (PV). As controls, biles from control untreated Gunn rat (Control) or wild-type rat (WT) are shown. (B) The graph represents the mean \pm SD of the proportions of biliary bilirubin glucuronides determined by HPLC (at least $n = 3$ rats per group). %DC, percentage bilirubin diglucuronide conjugates; %MC, percentage bilirubin monoglucuronide conjugates; %NC, percentage unconjugated bilirubin; HPLC, high-performance liquid chromatography.

hyperbilirubinemia compared with the injection of the same vector at the same dose in the PV. Vector retention and increased intrahepatic pressure are likely playing a role in the improved efficacy of HIL delivery over PV injection. Ad vector particles injected into the bloodstream cross the liver endothelium through the sinusoidal fenestrations, thereby reaching hepatocytes through the space of Disse. Liver fenestrations have been previously shown to play an important role in HDAd-mediated liver transduction (Brunetti-Pierri *et al.*, 2005; Vetrini *et al.*, 2010). In rodents and humans, the mean diameter of the fenestrations is about 100 nm, which is also the mean size of Ad particles (Lievens *et al.*, 2004; Snoeys *et al.*, 2007). Injection of HDAd into the liver after complete vascular exclusion results in an increase of intrahepatic pressure that forces viral particles through the fenestrations, producing higher hepatocyte transduction (Brunetti-Pierri *et al.*, 2005, 2007).

We have shown that vector injection performed in surgically occluded livers results in improved correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats that was sustained for up to 1 year postvector administration. This result is consistent with our previous studies in nonhuman primates showing that HDAd delivered by a similar surgical procedure resulted in transgene expression for several years after vector administration (Brunetti-Pierri *et al.*, 2006, 2013). The present study supports the efficacy of HDAd-mediated gene therapy to achieve long-term expression of UGT1A1 that results in sustained correction of hyperbilirubinemia with low and clinically relevant doses of vector that fall below 6×10^{11} vp/kg, which was found to be lethal in one human subject (Raper *et al.*, 2003). Gunn rats tolerated well the HIL procedure. Nevertheless, in humans vector delivery can be achieved using less invasive procedures, such as balloon catheter-mediated isolated hepatic perfusion that is used in cancer patients to treat irresectable liver metastases (van Etten *et al.*, 2004).

Given the potential of HDAd for liver-directed gene therapy, different strategies have been investigated to overcome the threshold to hepatocyte transduction and the obstacle of the acute toxicity. Because the severity of the acute response is dose dependent and appears to correlate with extrahepatic systemic vector dissemination, some of these approaches aimed at preferential targeting of the vector to the liver, thereby allowing the use of lower vector doses. One such strategy is based on vector delivery into the hepatic artery through a percutaneously placed catheter, while hepatic venous outflow is occluded by a balloon occlusion catheter percutaneously positioned in the IVC. This method resulted in improved hepatic transduction compared with intravenous injection of the vector (Brunetti-Pierri *et al.*, 2009). In another approach, effective dose reduction was achieved by ultrasound-guided direct injections of HDAd into the liver parenchyma, resulting in improved efficacy and reduced toxicity compared with intravenous injections (Pastore *et al.*, 2013). While this latter approach may be unsuitable for indications where a large number of transduced hepatocytes are needed to obtain clinically relevant benefits, it can be still attractive for Crigler–Najjar syndrome that requires a relatively low percentage of corrected hepatocytes to achieve clinically relevant reduction of hyperbilirubinemia. Compared with these two strategies, the approach investigated in the present study is clearly more invasive. Nevertheless, it is potentially more effective

to achieve higher levels of hepatocyte transduction. Intrahepatic injections resulted in approximately 80% reduction of serum bilirubin levels using a 10-fold higher dose of the same vector (Pastore *et al.*, 2013), which resulted in complete correction by the HIL delivery method. A follow-up of nonhuman primates injected with HDAd has revealed that transgene expression persisted for multiple years after vector delivery without long-term adverse effects. However, transgene expression levels slowly declined over time to less than 10% of peak values by the end of the observation period (Brunetti-Pierri *et al.*, 2013). This slow decline in expression is likely dependent upon gradual loss of transduced hepatocytes because of physiologic hepatocyte turnover, loss of the extrachromosomal vector genome, or a combination of both. The higher levels of transduction that can be achieved by the surgical delivery method are expected to result in longer correction, and this advantage should be taken into account when comparing risk:benefit ratios of the different vector delivery methods.

In summary, we have described a simple surgical procedure to improve the therapeutic index of HDAd vectors for Crigler–Najjar syndrome type I gene therapy. Transient blood flow occlusion and increased intrahepatic pressure are both likely to contribute in increasing the efficiency of liver gene transfer. In conclusion, this study supports the application of surgical vector delivery method, which is still less invasive than liver transplantation and may lead to long-term therapeutic levels of transgene expression in Crigler–Najjar syndrome type I.

Acknowledgments

This work was supported by the Italian Telethon Foundation (P37TELC to N.B.-P.), the Italian Ministry of Health (GR-2009-1594913 to N.B.-P.), the Association Française contre les Myopathies (to T.H.N.), the Association Francophone des Glycogénoses (to T.H.N.), and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-MRAR_CRINAGENETHER) (to T.H.N.).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Askari, F.K., Hitomi, Y., Mao, M., and Wilson, J.M. (1996). Complete correction of hyperbilirubinemia in the Gunn rat model of Crigler–Najjar syndrome type I following transient *in vivo* adenovirus-mediated expression of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *Gene Ther.* 3, 381–388.
- Brunetti-Pierri, N., and Lee, B. (2005). Gene therapy for inborn errors of liver metabolism. *Mol. Genet. Metab.* 86, 13–24.
- Brunetti-Pierri, N., Palmer, D.J., Mane, V., *et al.* (2005). Increased hepatic transduction with reduced systemic dissemination and proinflammatory cytokines following hydrodynamic injection of helper-dependent adenoviral vectors. *Mol. Ther.* 12, 99–106.
- Brunetti-Pierri, N., Ng, T., Iannitti, D.A., *et al.* (2006). Improved hepatic transduction, reduced systemic vector dissemination, and long-term transgene expression by delivering helper-dependent adenoviral vectors into the surgically isolated liver of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 17, 391–404.
- Brunetti-Pierri, N., Stapleton, G.E., Palmer, D.J., *et al.* (2007). Pseudo-hydrodynamic delivery of helper-dependent adenoviral

- vectors into non-human primates for liver-directed gene therapy. *Mol. Ther.* 15, 732–740.
- Brunetti-Pierri, N., Stapleton, G.E., Law, M., *et al.* (2009). Efficient, long-term hepatic gene transfer using clinically relevant HDAd doses by balloon occlusion catheter delivery in nonhuman primates. *Mol. Ther.* 17, 327–333.
- Brunetti-Pierri, N., Ng, T., Iannitti, D., *et al.* (2013). Transgene expression up to 7 years in nonhuman primates following hepatic transduction with helper-dependent adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 24, 761–765.
- Danko, I., Jia, Z., and Zhang, G. (2004). Nonviral gene transfer into liver and muscle by balloon occlusion catheter delivery in the Gunn rat. *Hum. Gene Ther.* 15, 1279–1286.
- Dariel, A., Nguyen, T.H., Pichard, V., *et al.* (2009). A new surgical approach to improve gene transfer in liver using lentiviral vectors. *J. Pediatr. Surg.* 44, 517–522.
- Dimmock, D., Brunetti-Pierri, N., Palmer, D.J., *et al.* (2011). Correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats using clinically relevant low doses of helper-dependent adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 22, 483–488.
- Fox, I.J., Chowdhury, J.R., Kaufman, S.S., *et al.* (1998). Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 338, 1422–1426.
- Jia, Z., and Danko, I. (2005). Single hepatic venous injection of liver-specific naked plasmid vector expressing human UGT1A1 leads to long-term correction of hyperbilirubinemia and prevention of chronic bilirubin toxicity in Gunn rats. *Hum. Gene Ther.* 16, 985–995.
- Lievens, J., Snoeys, J., Vekemans, K., *et al.* (2004). The size of sinusoidal fenestrae is a critical determinant of hepatocyte transduction after adenoviral gene transfer. *Gene Ther.* 11, 1523–1531.
- Morrall, N., O'Neal, W.K., Rice, K., *et al.* (2002). Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons. *Hum. Gene Ther.* 13, 143–154.
- Muraca, M., and Blanckaert, N. (1983). Liquid-chromatographic assay and identification of mono- and diester conjugates of bilirubin in normal serum. *Clin. Chem.* 29, 1767–1771.
- Nguyen, T.H., Aubert, D., Bellodi-Privato, M., *et al.* (2007). Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer. *Gene Ther.* 14, 1270–1277.
- Nunes, F.A., Furth, E.E., Wilson, J.M., and Raper, S.E. (1999). Gene transfer into the liver of nonhuman primates with E1-deleted recombinant adenoviral vectors: safety of readministration. *Hum. Gene Ther.* 10, 2515–2526.
- Palmer, D., and Ng, P. (2003). Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Mol. Ther.* 8, 846–852.
- Pastore, N., Nusco, E., Piccolo, P., *et al.* (2013). Improved efficacy and reduced toxicity by ultrasound-guided intrahepatic injections of helper-dependent adenoviral vector in Gunn rats. *Hum. Gene Ther. Methods* 24, 321–327.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., *et al.* (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148–158.
- Sauter, B.V., Parashar, B., Chowdhury, N.R., *et al.* (2000). A replication-deficient rSV40 mediates liver-directed gene transfer and a long-term amelioration of jaundice in Gunn rats. *Gastroenterology* 119, 1348–1357.
- Schmitt, F., Remy, S., Dariel, A., *et al.* (2010). Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* 139, 999–1007, 1007.e1–e2.
- Schmitt, F., Podevin, G., Poupon, J., *et al.* (2013). Evolution of exchangeable copper and relative exchangeable copper through the course of Wilson's disease in the Long Evans Cinnamon rat. *PLoS One* 8, e82323.
- Seppen, J., Bakker, C., de Jong, B., *et al.* (2006). Adeno-associated virus vector serotypes mediate sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats. *Mol. Ther.* 13, 1085–1092.
- Snoeys, J., Lievens, J., Wisse, E., *et al.* (2007). Species differences in transgene DNA uptake in hepatocytes after adenoviral transfer correlate with the size of endothelial fenestrae. *Gene Ther.* 14, 604–612.
- Strauss, K.A., Robinson, D.L., Vreman, H.J., *et al.* (2006). Management of hyperbilirubinemia and prevention of kernicterus in 20 patients with Crigler-Najjar disease. *Eur. J. Pediatr.* 165, 306–319.
- Tao, N., Gao, G.P., Parr, M., *et al.* (2001). Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol. Ther.* 3, 28–35.
- Toietta, G., Mane, V.P., Norona, W.S., *et al.* (2005). Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3930–3935.
- van der Wegen, P., Louwen, R., Imam, A.M., *et al.* (2006). Successful treatment of UGT1A1 deficiency in a rat model of Crigler-Najjar disease by intravenous administration of a liver-specific lentiviral vector. *Mol. Ther.* 13, 374–381.
- van Etten, B., Brunstein, F., van, I.M.G., *et al.* (2004). Isolated hypoxic hepatic perfusion with orthograde or retrograde flow in patients with irresectable liver metastases using percutaneous balloon catheter techniques: a phase I and II study. *Ann. Surg. Oncol.* 11, 598–605.
- Vetrini, F., Brunetti-Pierri, N., Palmer, D.J., *et al.* (2010). Vasoactive intestinal peptide increases hepatic transduction and reduces innate immune response following administration of helper-dependent Ad. *Mol. Ther.* 18, 1339–1345.

Address correspondence to:

Dr. Nicola Brunetti-Pierri
Telethon Institute of Genetics and Medicine
Via P. Castellino, 111
80131 Napoli
Italy

E-mail: brunetti@tigem.it

Dr. Tuan Huy Nguyen
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM)
UMRS 1064
CHU Hôtel Dieu
44093 Nantes
France

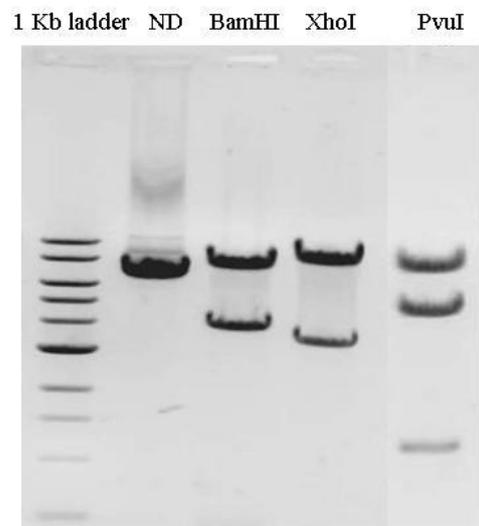
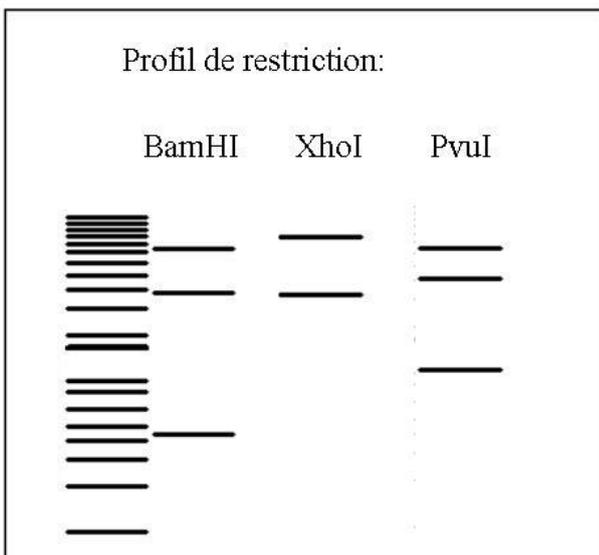
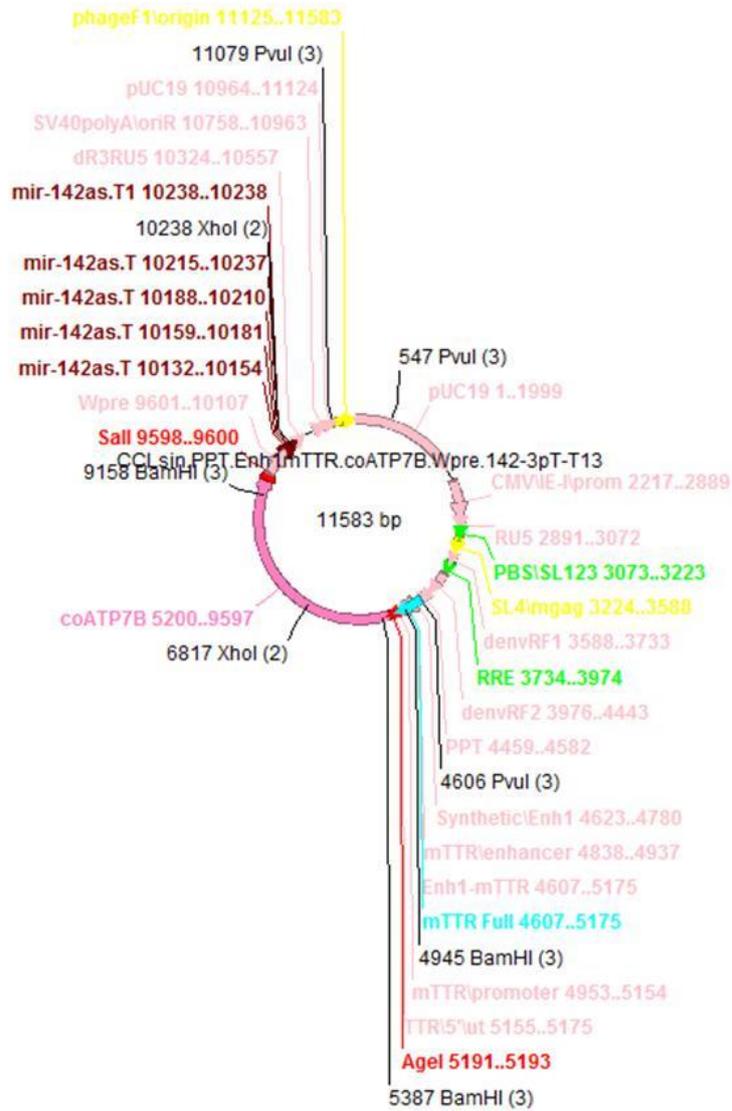
E-mail: tuan.nguyen@univ-nantes.fr

Received for publication January 2, 2014;
accepted after revision March 2, 2014.

Published online: March 4, 2014.

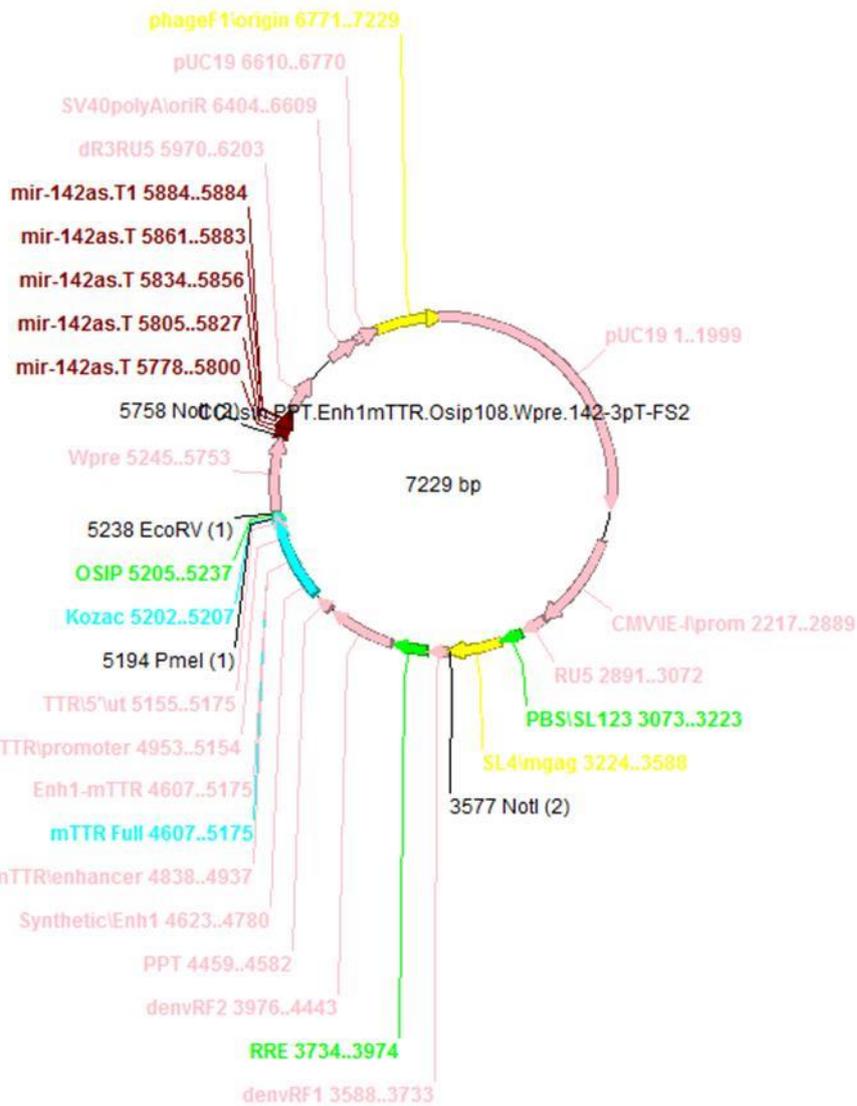
Carte du plasmide pFS1

CCLsinPPT.Enh1mTTR.coATP7B.Wpre.142-3pT-FS1

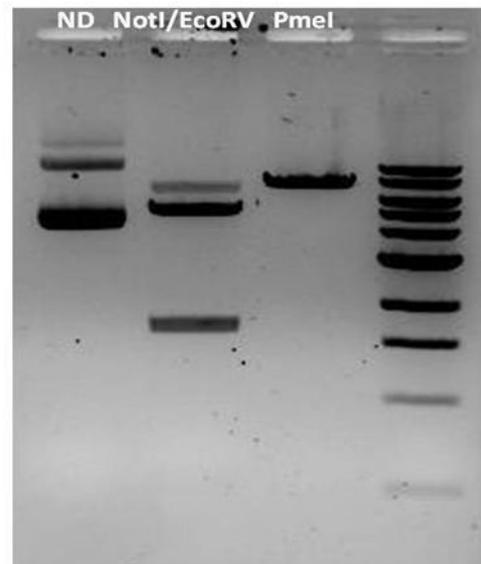


Carte du plasmide pFS2

CCLsinPPT.Enh1mTTR.OSIP108.Wpre.142-3pT-FS2



Profil de restriction:



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abarrategui-Pontes, C. (2014). Mise au point des stratégies d'édition de gène à l'aide d'endonucléases artificielles pour le traitement des hépatopathies héréditaires: application à la maladie de Crigler-Najjar de type I. Thèse de Doctorat, Université de Nantes.
- Abarrategui-Pontes, C., Thinard, R., Fine, E.J., Thepenier, V., Remy, S., Ménoret, S., Tesson, L., Delbos, F., Myara, A., Laplanche, S., Labrune, P., Pineau, O., Cradick, T.J., Bao, G., Podevin, G., Anegon, I., Nguyen, T.H. (2014). Correction of UDP-glucuronosyltransferase genetic mutation in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I using ZFN-mediated genome editing. *In subm.*
- Acland, G. M., G. D. Aguirre, et al. (2005). "Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness." *Mol Ther* **12**(6): 1072-82.
- Afdhal, N. H. (2012) "Fibroscan (transient elastography) for the measurement of liver fibrosis." *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **8**(9): 605-7.
- Aggarwal, A. and M. Bhatt (2013) "Update on Wilson disease." *Int Rev Neurobiol* **110**: 313-48.
- Aiuti, A., F. Cattaneo, et al. (2009). "Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency." *N Engl J Med* **360**(5): 447-58.
- Ala, A., A. P. Walker, et al. (2007). "Wilson's disease." *Lancet* **369**(9559): 397-408.
- Alazard-Dany, N., A. Nicolas, et al. (2009). "Definition of herpes simplex virus type 1 helper activities for adeno-associated virus early replication events." *PLoS Pathog* **5**(3): e1000340.
- Alton, E. W., A. Baker, et al. (2013) "The safety profile of a cationic lipid-mediated cystic fibrosis gene transfer agent following repeated monthly aerosol administration to sheep." *Biomaterials* **34**(38): 10267-77.
- Amalfitano, A. (1999). "Next-generation adenoviral vectors: new and improved." *Gene Ther* **6**(10): 1643-5.
- Annoni, A., B. D. Brown, et al. (2009). "In vivo delivery of a microRNA-regulated transgene induces antigen-specific regulatory T cells and promotes immunologic tolerance." *Blood* **114**(25): 5152-61.
- Apolonia, L., S. N. Waddington, et al. (2007). "Stable gene transfer to muscle using non-integrating lentiviral vectors." *Mol Ther* **15**(11): 1947-54.
- Ariza, L., L. Gimenez-Llort, et al. (2014) "Central nervous system delivery of helper-dependent canine adenovirus corrects neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis type VII mice." *Hum Gene Ther* **25**(3): 199-211.
- Arnon, R., R. Annunziato, et al. (2011) "Liver transplantation for children with Wilson disease: comparison of outcomes between children and adults." *Clin Transplant* **25**(1): E52-60.
- Assi, H., M. Candolfi, et al. (2012) "Gene therapy for brain tumors: basic developments and clinical implementation." *Neurosci Lett* **527**(2): 71-7.
- Aubert, D., S. Menoret, et al. (2002). "Cytotoxic immune response blunts long-term transgene expression after efficient retroviral-mediated hepatic gene transfer in rat." *Mol Ther* **5**(4): 388-96.
- Bartosch, B. and F. L. Cosset (2009). "Studying HCV cell entry with HCV pseudoparticles (HCVpp)." *Methods Mol Biol* **510**: 279-93.
- Beatty, R. M., M. Jackson, et al. (2002). "Delivery of glucose-6-phosphatase in a canine model for glycogen storage disease, type Ia, with adeno-associated virus (AAV) vectors." *Gene Ther* **9**(15): 1015-22.
- Bedossa, P. and T. Poynard (1996). "An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group." *Hepatology* **24**(2): 289-93.
- Bem, R. S., D. A. Muzzillo, et al. (2011) "Wilson's disease in southern Brazil: a 40-year follow-up study." *Clinics (Sao Paulo)* **66**(3): 411-6.
- Betto, H., K. Kaneda, et al. (1996). "Development of intralobular bile ductules after spontaneous hepatitis in Long-Evans mutant rats." *Lab Invest* **75**(1): 43-53.
- Bigg, P. W., M. M. Sleeper, et al. (2013) "The effect of neonatal gene therapy with a gamma retroviral vector on cardiac valve disease in mucopolysaccharidosis VII dogs after a decade." *Mol Genet Metab* **110**(3): 311-8.
- Bischof, D. and K. Cornetta (2010) "Flexibility in cell targeting by pseudotyping lentiviral vectors." *Methods Mol Biol* **614**: 53-68.
- Blacklow, N. R., M. D. Hoggan, et al. (1967). "Isolation of adenovirus-associated viruses from man." *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(4): 1410-5.
- Bligh, S. W., H. A. Boyle, et al. (1992). "1H NMR studies of reactions of copper complexes with human blood plasma and urine." *Biochem Pharmacol* **43**(2): 137-45.
- Bokhoven, M., S. L. Stephen, et al. (2009). "Insertional gene activation by lentiviral and gammaretroviral vectors." *J Virol* **83**(1): 283-94.
- Bouard, D., D. Alazard-Dany, et al. (2009). "Viral vectors: from virology to transgene expression." *Br J Pharmacol* **157**(2): 153-65.

- Boursier, J., V. de Ledinghen, et al. (2014) "Precise evaluation of liver histology by computerized morphometry shows that steatosis influences liver stiffness measured by transient elastography in chronic hepatitis C." *J Gastroenterol* **49**(3): 527-37.
- Braet, F., I. Spector, et al. (1998). "A novel structure involved in the formation of liver endothelial cell fenestrae revealed by using the actin inhibitor misakinolide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13635-40.
- Braet, F. and E. Wisse (2002). "Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review." *Comp Hepatol* **1**(1): 1.
- Brigham, K. L., K. B. Lane, et al. (2000). "Transfection of nasal mucosa with a normal alpha1-antitrypsin gene in alpha1-antitrypsin-deficient subjects: comparison with protein therapy." *Hum Gene Ther* **11**(7): 1023-32.
- Brown, B. D., A. Cantore, et al. (2007). "A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice." *Blood* **110**(13): 4144-52.
- Brown, B. D., B. Gentner, et al. (2007). "Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state." *Nat Biotechnol* **25**(12): 1457-67.
- Brown, B. D., G. Sitia, et al. (2007). "In vivo administration of lentiviral vectors triggers a type I interferon response that restricts hepatocyte gene transfer and promotes vector clearance." *Blood* **109**(7): 2797-805.
- Brown, B. D., M. A. Venneri, et al. (2006). "Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer." *Nat Med* **12**(5): 585-91.
- Brunetti-Pierri, N. and B. Lee (2005). "Gene therapy for inborn errors of liver metabolism." *Mol Genet Metab* **86**(1-2): 13-24.
- Brunetti-Pierri, N., T. Ng, et al. (2013) "Transgene expression up to 7 years in nonhuman primates following hepatic transduction with helper-dependent adenoviral vectors." *Hum Gene Ther* **24**(8): 761-5.
- Brunetti-Pierri, N., D. J. Palmer, et al. (2004). "Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates." *Hum Gene Ther* **15**(1): 35-46.
- Buiakova, O. I., J. Xu, et al. (1999). "Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation." *Hum Mol Genet* **8**(9): 1665-71.
- Bull, P. C., G. R. Thomas, et al. (1993). "The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene." *Nat Genet* **5**(4): 327-37.
- Burns, J. C., T. Friedmann, et al. (1993). "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 8033-7.
- Cales, P., J. Boursier, et al. (2014) "Improved fibrosis staging by elastometry and blood test in chronic hepatitis C." *Liver Int* **34**(6): 907-17.
- Cales, P., J. Boursier, et al. (2009). "[FibroMeters: a family of blood tests for liver fibrosis with high diagnostic performance and applicability in clinical practice]." *Pathol Biol (Paris)* **57**(6): 459-62.
- Cales, P., V. de Ledinghen, et al. (2013) "Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection." *Ann Intern Med* **159**(5): 371-2.
- Campos, S. K. and M. A. Barry (2007). "Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting." *Curr Gene Ther* **7**(3): 189-204.
- Cardoso, J. E., S. Branchereau, et al. (1993). "In situ retrovirus-mediated gene transfer into dog liver." *Hum Gene Ther* **4**(4): 411-8.
- Carlson, M. S., D. Vidovic, et al. (2014) "Immunological ignorance allows long-term gene expression after perinatal recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to murine airways." *Hum Gene Ther* **25**(6): 517-28.
- Carstens, E. and G. P. Moberg (2000). "Recognizing pain and distress in laboratory animals." *ILAR J* **41**(2): 62-71.
- Catana, A. M. and V. Medici (2012) "Liver transplantation for Wilson disease." *World J Hepatol* **4**(1): 5-10.
- Cavazzana-Calvo, M., A. Fischer, et al. (2012) "Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 1." *Curr Opin Immunol* **24**(5): 580-4.
- Chen, S. J., J. Tazelaar, et al. (2000). "In vivo selection of hepatocytes transduced with adeno-associated viral vectors." *Mol Ther* **1**(5 Pt 1): 414-22.
- Chen, S. W., B. Y. Wu, et al. (2012) "Suppression of CB1 cannabinoid receptor by lentivirus mediated small interfering RNA ameliorates hepatic fibrosis in rats." *PLoS One* **7**(12): e50850.
- Copreni, E., S. Castellani, et al. (2008). "Involvement of glycosaminoglycans in vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped lentiviral vector-mediated gene transfer into airway epithelial cells." *J Gene Med* **10**(12): 1294-302.
- Cunningham, S. C., A. P. Dane, et al. (2008). "Gene delivery to the juvenile mouse liver using AAV2/8 vectors." *Mol Ther* **16**(6): 1081-8.

- Dalvi, A. (2014) "Wilson's disease: Neurological and psychiatric manifestations." *Dis Mon* **60**(9): 460-464.
- Dalvi, A. and M. Padmanaban (2014) "Wilson's disease: Etiology, diagnosis, and treatment." *Dis Mon* **60**(9): 450-459.
- Dameron, C. T. and M. D. Harrison (1998). "Mechanisms for protection against copper toxicity." *Am J Clin Nutr* **67**(5 Suppl): 1091S-1097S.
- Dariel, A., T. H. Nguyen, et al. (2009). "A new surgical approach to improve gene transfer in liver using lentiviral vectors." *J Pediatr Surg* **44**(3): 517-22.
- Davis, H. E., M. Rosinski, et al. (2004). "Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation." *Biophys J* **86**(2): 1234-42.
- DePolo, N. J., J. D. Reed, et al. (2000). "VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum." *Mol Ther* **2**(3): 218-22.
- Derrick-Roberts, A. L., C. E. Pyragius, et al. (2014) "Lentiviral-Mediated Gene Therapy Results in Sustained Expression of beta-Glucuronidase for up to 12 Months in the Gus(mps/mps) and up to 18 Months in the Gus(tm(L175F)Sly) Mouse Models of Mucopolysaccharidosis Type VII." *Hum Gene Ther* **25**(9): 798-810.
- DG, L. E. C., V. C. Cogger, et al. (2007). "Age-related changes in the liver sinusoidal endothelium: a mechanism for dyslipidemia." *Ann N Y Acad Sci* **1114**: 79-87.
- Diecke, S., S. M. Jung, et al. (2014) "Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells." *Korean J Intern Med* **29**(5): 547-557.
- Domingo, J. L., M. Gomez, et al. (1998). "Concurrent administration of D-penicillamine and zinc has no advantages over the use of either single agent on copper excretion in the rat." *Toxicology* **126**(3): 195-201.
- Donsante, A., D. G. Miller, et al. (2007). "AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma." *Science* **317**(5837): 477.
- Duclos-Vallee, J. C., P. Ichai, et al. (2006). "[Wilson's disease]." *Rev Prat* **56**(5): 469-74.
- El Balkhi, S., J. M. Trocillo, et al. (2011) "Relative exchangeable copper: a new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis." *Clin Chim Acta* **412**(23-24): 2254-60.
- Ezquer, F., M. T. Nunez, et al. (2005). "Antisense gene delivered by an adenoassociated viral vector inhibits iron uptake in human intestinal cells: potential application in hemochromatosis." *Biochem Pharmacol* **69**(11): 1559-66.
- Fang, B., R. C. Eisensmith, et al. (1994). "Gene therapy for phenylketonuria: phenotypic correction in a genetically deficient mouse model by adenovirus-mediated hepatic gene transfer." *Gene Ther* **1**(4): 247-54.
- FELASA Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies: W. Nicklas (Convenor), P. Baneux, R. Boot, T. Decelle, A. Deeny, M. Fumanelli & B. Illgen-Wilcke (2002). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units *Laboratory Animals* **36**: 20-42.
- Ferenci, P., A. Czlonkowska, et al. (2007). "Late-onset Wilson's disease." *Gastroenterology* **132**(4): 1294-8.
- Fischer, A., S. Hacein-Bey-Abina, et al. (2011) "Gene therapy for primary adaptive immune deficiencies." *J Allergy Clin Immunol* **127**(6): 1356-9.
- Fissell, W. H., C. L. Hofmann, et al. (2010) "Size and conformation of Ficoll as determined by size-exclusion chromatography followed by multiangle light scattering." *Am J Physiol Renal Physiol* **298**(1): F205-8.
- Flageul, M., D. Aubert, et al. (2009). "Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors." *J Gene Med* **11**(8): 689-96.
- Flotte, T. R., B. C. Trapnell, et al. (2011) "Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing alpha1-antitrypsin: interim results." *Hum Gene Ther* **22**(10): 1239-47.
- Follenzi, A., L. E. Ailles, et al. (2000). "Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences." *Nat Genet* **25**(2): 217-22.
- Follenzi, A., G. Sabatino, et al. (2002). "Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors." *Hum Gene Ther* **13**(2): 243-60.
- Fong, R. N., B. P. Gonzalez, et al. (2004). "Role of tumor necrosis factor-alpha in the development of spontaneous hepatic toxicity in Long-Evans Cinnamon rats." *Toxicol Appl Pharmacol* **200**(2): 121-30.
- Foster, H., L. Popplewell, et al. (2012) "Genetic therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy." *Hum Gene Ther* **23**(7): 676-87.
- Fraser, R., L. M. Bowler, et al. (1980). "Damage of rat liver sinusoidal endothelium by ethanol." *Pathology* **12**(3): 371-6.
- Furrer, K., A. Rickenbacher, et al. (2011) "Serotonin reverts age-related capillarization and failure of regeneration in the liver through a VEGF-dependent pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(7): 2945-50.

- Gao, L., L. Xie, et al. (2013) "Efficacy of MRI visible iron oxide nanoparticles in delivering minicircle DNA into liver via intrabiliary infusion." *Biomaterials* **34**(14): 3688-96.
- Gaspar, H. B., S. Cooray, et al. (2011) "Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction." *Sci Transl Med* **3**(97): 97ra80.
- Gauttier, V., V. Pichard, et al. (2013) "No tumour-initiating risk associated with scAAV transduction in newborn rat liver." *Gene Ther* **20**(7): 779-84.
- Ginn, S. L., I. E. Alexander, et al. (2013) "Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update." *J Gene Med* **15**(2): 65-77.
- Goodman, Z. D., R. L. Becker, Jr., et al. (2007). "Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis." *Hepatology* **45**(4): 886-94.
- Goulinet-Mainot, S., Tranchart, H., Groyer-Picard, M-T., Lainas, P., Saloum Diop, P., Holopherne, D., Gonin, P., Benihoud, K., Ba, N., Gauthier, O., Franco, D., Guettier, C., Pariente, D., Weber, A., Dagher, I., Huy Nguyen, T. (2012). Improved hepatocyte engraftment after portal vein occlusion in LDL receptor-deficient WHHL rabbits and lentiviral-mediated phenotypic correction in vitro. *Cell Med.* **4**, 85-98.
- Gourley, G. R. (1997). "Bilirubin metabolism and kernicterus." *Adv Pediatr* **44**: 173-229.
- Grompe, M., K. Overturf, et al. (1998). "Therapeutic trials in the murine model of hereditary tyrosinaemia type I: a progress report." *J Inherit Metab Dis* **21**(5): 518-31.
- Grossman, M., D. J. Rader, et al. (1995). "A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia." *Nat Med* **1**(11): 1148-54.
- Guibinga, G. H., A. Miyanohara, et al. (2002). "Cell surface heparan sulfate is a receptor for attachment of envelope protein-free retrovirus-like particles and VSV-G pseudotyped MLV-derived retrovirus vectors to target cells." *Mol Ther* **5**(5 Pt 1): 538-46.
- Gupta, S. (2014) "Cell therapy to remove excess copper in Wilson's disease." *Ann N Y Acad Sci* **1315**: 70-80.
- Ha-Hao, D., U. Merle, et al. (2002). "Chances and shortcomings of adenovirus-mediated ATP7B gene transfer in Wilson disease: proof of principle demonstrated in a pilot study with LEC rats." *Z Gastroenterol* **40**(4): 209-16.
- Hacein-Bey-Abina, S., J. Hauer, et al. (2010) "Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." *N Engl J Med* **363**(4): 355-64.
- Halbert, C. L., D. K. Madtes, et al. (2010) "Expression of human alpha1-antitrypsin in mice and dogs following AAV6 vector-mediated gene transfer to the lungs." *Mol Ther* **18**(6): 1165-72.
- Harris, Z. L. and J. D. Gitlin (1996). "Genetic and molecular basis for copper toxicity." *Am J Clin Nutr* **63**(5): 836S-41S.
- Harris ZL, Morita H, et Gitlin J (1997): The biology of human ceruloplasmin. In: Multicopper-oxidases (A.Messerschmidt, ed) World Scientific Pub Co., Singapore 285-305.)
- Hauswirth, W. W., T. S. Aleman, et al. (2008). "Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial." *Hum Gene Ther* **19**(10): 979-90.
- Haute Autorité de Santé (2008). GUIDE – AFFECTION DE LONGUE DURÉE: Maladie de Wilson. Protocole National de Diagnostic et de Soins
- He, Y., C. Huang, et al. (2012) "The potential of microRNAs in liver fibrosis." *Cell Signal* **24**(12): 2268-72.
- Heikkila, P., T. Parpala, et al. (1996). "Adenovirus-mediated gene transfer into kidney glomeruli using an ex vivo and in vivo kidney perfusion system - first steps towards gene therapy of Alport syndrome." *Gene Ther* **3**(1): 21-7.
- Helene, C. (1991). "The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides." *Anticancer Drug Des* **6**(6): 569-84.
- Herweijer, H. and J. A. Wolff (2007). "Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery." *Gene Ther* **14**(2): 99-107.
- Herzog, R. W., J. N. Hagstrom, et al. (1997). "Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11): 5804-9.
- Hilmer, S. N., V. C. Cogger, et al. (2005). "Age-related changes in the hepatic sinusoidal endothelium impede lipoprotein transfer in the rat." *Hepatology* **42**(6): 1349-54.
- Holkers, M., I. Maggio, et al. (2013) "Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells." *Nucleic Acids Res* **41**(5): e63.
- Humbert, J. M., C. Frecha, et al. (2012) "Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vectors are highly superior to vesicular stomatitis virus G pseudotypes for genetic modification of monocyte-derived dendritic cells." *J Virol* **86**(9): 5192-203.
- Hussain, S. A., N. A. Jassim, et al. (2009). "Anti-inflammatory activity of silymarin in patients with knee osteoarthritis. A comparative study with piroxicam and meloxicam." *Saudi Med J* **30**(1): 98-103.

- Huster, D. (2010) "Wilson disease." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **24**(5): 531-9.
- Ikegami, T., T. Nishizaki, et al. (2000). "The impact of donor age on living donor liver transplantation." *Transplantation* **70**(12): 1703-7.
- Ishak, K., A. Baptista, et al. (1995). "Histological grading and staging of chronic hepatitis." *J Hepatol* **22**(6): 696-9.
- Jean, J., R. Morales-Rayas, et al. (2011) "Inactivation of hepatitis A virus and norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses)." *Food Microbiol* **28**(3): 568-72.
- Jessup, M., B. Greenberg, et al. (2011) "Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure." *Circulation* **124**(3): 304-13.
- Johansson, A., G. Nowak, et al. (2004). "Adenoviral-mediated expression of porphobilinogen deaminase in liver restores the metabolic defect in a mouse model of acute intermittent porphyria." *Mol Ther* **10**(2): 337-43.
- Johnson, V. J., Q. He, et al. (2003). "Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses." *Planta Med* **69**(1): 44-9.
- Joshua Lederberg et Edward Tatum, *Reflections on Research and the Future of Medicine*, Columbia University, 1966.
- Kafri, T., U. Blomer, et al. (1997). "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors." *Nat Genet* **17**(3): 314-7.
- Karlas, T., M. Hempel, et al. (2012) "Non-invasive evaluation of hepatic manifestation in Wilson disease with transient elastography, ARFI, and different fibrosis scores." *Scand J Gastroenterol* **47**(11): 1353-61.
- Kasai, N., T. Osanai, et al. (1990). "Clinico-pathological studies of LEC rats with hereditary hepatitis and hepatoma in the acute phase of hepatitis." *Lab Anim Sci* **40**(5): 502-5.
- Kasid, A., S. Morecki, et al. (1990). "Human gene transfer: characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(1): 473-7.
- Kay, M. A., P. Baley, et al. (1992). "Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(1): 89-93.
- Khorsandi, S. E., P. Bachellier, et al. (2008). "Minimally invasive and selective hydrodynamic gene therapy of liver segments in the pig and human." *Cancer Gene Ther* **15**(4): 225-30.
- Kim, M., S. G. Yang, et al. (2012) "Silymarin suppresses hepatic stellate cell activation in a dietary rat model of non-alcoholic steatohepatitis: analysis of isolated hepatic stellate cells." *Int J Mol Med* **30**(3): 473-9.
- Korman, J. D., I. Volenberg, et al. (2008). "Screening for Wilson disease in acute liver failure: a comparison of currently available diagnostic tests." *Hepatology* **48**(4): 1167-74.
- Kotterman, M. A. and D. V. Schaffer (2014) "Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy." *Nat Rev Genet* **15**(7): 445-51.
- Krupczak-Hollis, K., X. Wang, et al. (2003). "Growth hormone stimulates proliferation of old-aged regenerating liver through forkhead box m1b." *Hepatology* **38**(6): 1552-62.
- Lalioi, V., G. Muruais, et al. (2009). "Molecular mechanisms of copper homeostasis." *Front Biosci* **14**: 4878-903.
- Lamartina, S., E. Sporeno, et al. (2000). "Characteristics of the adeno-associated virus preintegration site in human chromosome 19: open chromatin conformation and transcription-competent environment." *J Virol* **74**(16): 7671-7.
- Léger, A. (2012). *Pharmacologie moléculaire des vecteurs adéno-associés in situ dans le muscle squelettique: implications de la régulation épigénétique endogène sur l'expression du génome recombinant*. Nantes, Faculté de médecine.
- Li, A., J. Qian, et al. (2013) "Modulation of miR122 expression affects the interferon response in human hepatoma cells." *Mol Med Rep* **7**(2): 585-90.
- Li, X. H., Y. Lu, et al. (2011) "Clinical and molecular characterization of Wilson's disease in China: identification of 14 novel mutations." *BMC Med Genet* **12**: 6.
- Linn, F. H., R. H. Houwen, et al. (2009). "Long-term exclusive zinc monotherapy in symptomatic Wilson disease: experience in 17 patients." *Hepatology* **50**(5): 1442-52.
- Liu, A. Q., L. Y. Ge, et al. (2014) "Silencing of the hTERT Gene by shRNA Inhibits Colon Cancer SW480 Cell Growth In Vitro and In Vivo." *PLoS One* **9**(9): e107019.
- Loewen, N., D. A. Leske, et al. (2004). "Long-term retinal transgene expression with FIV versus adenoviral vectors." *Mol Vis* **10**: 272-80.
- Loudianos G, G. J. (2000). "Wilson's disease." *Seminars in liver disease* **20**(3): 12.

- Luoma, L. M., T. M. Deeb, et al. (2010) "Functional analysis of mutations in the ATP loop of the Wilson disease copper transporter, ATP7B." *Hum Mutat* **31**(5): 569-77.
- Macedo, G., J. C. Maia, et al. (2000). "Wilson's disease: challenging diagnosis, management, and liver transplantation timing." *Transplant Proc* **32**(8): 2668.
- Malhi, H., A. N. Irani, et al. (2002). "Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease." *Gastroenterology* **122**(2): 438-47.
- Malhi, H., B. Joseph, et al. (2008). "Development of cell therapy strategies to overcome copper toxicity in the LEC rat model of Wilson disease." *Regen Med* **3**(2): 165-73.
- Masuda, R., M. C. Yoshida, et al. (1988). "Hereditary hepatitis of LEC rats is controlled by a single autosomal recessive gene." *Lab Anim* **22**(2): 166-9.
- Masuda, R., M. C. Yoshida, et al. (1988). "High susceptibility to hepatocellular carcinoma development in LEC rats with hereditary hepatitis." *Jpn J Cancer Res* **79**(7): 828-35.
- Matrai, J., A. Cantore, et al. (2011) "Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk." *Hepatology* **53**(5): 1696-707.
- Matukonis, M., M. Li, et al. (2002). "Development of second- and third-generation bovine immunodeficiency virus-based gene transfer systems." *Hum Gene Ther* **13**(11): 1293-303.
- Mazo, D. F., M. G. de Oliveira, et al. (2013) "S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in experimental nonalcoholic steatohepatitis." *Drug Des Devel Ther* **7**: 553-63.
- McCarty, D. M., H. Fu, et al. (2003). "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo." *Gene Ther* **10**(26): 2112-8.
- Medici, V., V. G. Mirante, et al. (2005). "Liver transplantation for Wilson's disease: The burden of neurological and psychiatric disorders." *Liver Transpl* **11**(9): 1056-63.
- Medici, V., G. C. Sturniolo, et al. (2005). "Efficacy of zinc supplementation in preventing acute hepatitis in Long-Evans Cinnamon rats." *Liver Int* **25**(4): 888-95.
- Meng, Y., I. Miyoshi, et al. (2004). "Restoration of copper metabolism and rescue of hepatic abnormalities in LEC rats, an animal model of Wilson disease, by expression of human ATP7B gene." *Biochim Biophys Acta* **1690**(3): 208-19.
- Merle, U., C. Eisenbach, et al. (2009). "Serum ceruloplasmin oxidase activity is a sensitive and highly specific diagnostic marker for Wilson's disease." *J Hepatol* **51**(5): 925-30.
- Merle, U., J. Encke, et al. (2006). "Lentiviral gene transfer ameliorates disease progression in Long-Evans cinnamon rats: an animal model for Wilson disease." *Scand J Gastroenterol* **41**(8): 974-82.
- Merle, U., M. Schaefer, et al. (2007). "Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study." *Gut* **56**(1): 115-20.
- Merle, U., W. Stremmel, et al. (2007). "Perspectives for gene therapy of Wilson disease." *Curr Gene Ther* **7**(3): 217-20.
- Merle, U., K. H. Weiss, et al. (2010) "Truncating mutations in the Wilson disease gene ATP7B are associated with very low serum ceruloplasmin oxidase activity and an early onset of Wilson disease." *BMC Gastroenterol* **10**: 8.
- Moal, F., D. Chappard, et al. (2002). "Fractal dimension can distinguish models and pharmacologic changes in liver fibrosis in rats." *Hepatology* **36**(4 Pt 1): 840-9.
- Mochizuki, S., H. Mizukami, et al. (2004). "Long-term correction of hyperphenylalaninemia by AAV-mediated gene transfer leads to behavioral recovery in phenylketonuria mice." *Gene Ther* **11**(13): 1081-6.
- Montenegro-Miranda, P. S., V. Pichard, et al. (2014) "In the rat liver, Adenoviral gene transfer efficiency is comparable to AAV." *Gene Ther* **21**(2): 168-74.
- Mori, T., T. Okanoue, et al. (1993). "Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis." *Hepatology* **17**(5): 891-7.
- Morrall, N., W. K. O'Neal, et al. (2002). "Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons." *Hum Gene Ther* **13**(1): 143-54.
- Nagasaki, Y., Y. Matsubara, et al. (1999). "Reversal of hypopigmentation in phenylketonuria mice by adenovirus-mediated gene transfer." *Pediatr Res* **45**(4 Pt 1): 465-73.
- Naha, K. and M. Prabhu (2011) "Galactorrhea with menstrual irregularity: something other than a prolactinoma?" *Ann Gastroenterol* **24**(3): 225-227.
- Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." *Science* **272**(5259): 263-7.
- Nathwani, A. C., E. G. Tuddenham, et al. (2011) "Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B." *N Engl J Med* **365**(25): 2357-65.
- Negre, D., P. E. Mangeot, et al. (2000). "Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells." *Gene Ther* **7**(19): 1613-23.

- Nguyen, T. H., D. Aubert, et al. (2007). "Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer." *Gene Ther* **14**(17): 1270-7.
- Nguyen, T. H., M. Bellodi-Privato, et al. (2005). "Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats." *Mol Ther* **12**(5): 852-9.
- Nguyen, T. H. and N. Ferry (2007). "Gene therapy for liver enzyme deficiencies: what have we learned from models for Crigler-Najjar and tyrosinemia?" *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **1**(1): 155-71.
- Nicoleau, C., P. Viegas, et al. (2011) "Human pluripotent stem cell therapy for Huntington's disease: technical, immunological, and safety challenges human pluripotent stem cell therapy for Huntington's disease: technical, immunological, and safety challenges." *Neurotherapeutics* **8**(4): 562-76.
- Noetel, A., M. Kwiecinski, et al. (2012) "microRNA are Central Players in Anti- and Profibrotic Gene Regulation during Liver Fibrosis." *Front Physiol* **3**: 49.
- Nunes, F. A., E. E. Furth, et al. (1999). "Gene transfer into the liver of nonhuman primates with E1-deleted recombinant adenoviral vectors: safety of readministration." *Hum Gene Ther* **10**(15): 2515-26.
- Oka, K., C. E. Mullins, et al. (2014) "Gene therapy for rhesus monkeys heterozygous for LDL receptor deficiency by balloon catheter hepatic delivery of helper-dependent adenoviral vector." *Gene Ther*.
- Overturf, K., M. al-Dhalimy, et al. (1997). "Adenovirus-mediated gene therapy in a mouse model of hereditary tyrosinemia type I." *Hum Gene Ther* **8**(5): 513-21.
- Palmer, D. J. and P. Ng (2005). "Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy." *Hum Gene Ther* **16**(1): 1-16.
- Paneda, A., E. Lopez-Franco, et al. (2013) "Safety and liver transduction efficacy of rAAV5-cohPBGD in nonhuman primates: a potential therapy for acute intermittent porphyria." *Hum Gene Ther* **24**(12): 1007-17.
- Pastore, N., E. Nusco, et al. (2013) "Improved efficacy and reduced toxicity by ultrasound-guided intrahepatic injections of helper-dependent adenoviral vector in Gunn rats." *Hum Gene Ther Methods* **24**(5): 321-7.
- Paulk, N. K., K. Wursthorn, et al. (2010) "Adeno-associated virus gene repair corrects a mouse model of hereditary tyrosinemia in vivo." *Hepatology* **51**(4): 1200-8.
- Philippe, S., C. Sarkis, et al. (2006). "Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17684-9.
- Pichon, C., L. Billiet, et al. (2010) "Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking." *Curr Opin Biotechnol* **21**(5): 640-5.
- Podevin, G., N. Ferry, et al. (1996). "In vivo retroviral-mediated transfer of a marker-gene in ornithine transcarbamylase-deficient Spf(ash) mice." *J Pediatr Surg* **31**(11): 1516-9.
- Podevin, G., E. Otta, et al. (2004). "Factors influencing immune response after in vivo retrovirus-mediated gene transfer to the liver." *J Gene Med* **6**(1): 16-21.
- Podevin, G., V. Pichard, et al. (2002). "In-vivo retroviral gene transfer to the liver is cancelled by an immune response against the corrected cells. Can it be avoided?" *Pediatr Surg Int* **18**(7): 595-9.
- Polishchuk, E. V., M. Concilli, et al. (2014) "Wilson disease protein ATP7B utilizes lysosomal exocytosis to maintain copper homeostasis." *Dev Cell* **29**(6): 686-700.
- Powell, J. S., M. V. Ragni, et al. (2003). "Phase 1 trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion." *Blood* **102**(6): 2038-45.
- Raghupathi, R. N. and A. M. Diwan (1994). "A protocol for protein estimation that gives a nearly constant color yield with simple proteins and nullifies the effects of four known interfering agents: microestimation of peptide groups." *Anal Biochem* **219**(2): 356-9.
- Raper, S. E., N. Chirmule, et al. (2003). "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer." *Mol Genet Metab* **80**(1-2): 148-58.
- Raper, S. E., J. M. Wilson, et al. (1998). "Developing adenoviral-mediated in vivo gene therapy for ornithine transcarbamylase deficiency." *J Inherit Metab Dis* **21 Suppl 1**: 119-37.
- Rauch, H. (1983). "Toxic milk, a new mutation affecting copper metabolism in the mouse." *J Hered* **74**(3): 141-4.
- Rip, J., M. C. Nierman, et al. (2005). "Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: working toward clinical application." *Hum Gene Ther* **16**(11): 1276-86.
- Roberts, E. A. and M. L. Schilsky (2003). "A practice guideline on Wilson disease." *Hepatology* **37**(6): 1475-92.
- Rosenberg, S. A., P. Aebersold, et al. (1990). "Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction." *N Engl J Med* **323**(9): 570-8.
- Roth, D. A., N. E. Tawa, Jr., et al. (2001). "Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A." *N Engl J Med* **344**(23): 1735-42.
- Roy, D. N., G. Sen, et al. (2010) "Combination therapy with andrographolide and d-penicillamine enhanced therapeutic advantage over monotherapy with d-penicillamine in attenuating fibrogenic response and

- cell death in the periportal zone of liver in rats during copper toxicosis." *Toxicol Appl Pharmacol* **250**(1): 54-68.
- Roybal, J. L., M. Endo, et al. (2011) "Early gestational gene transfer with targeted ATP7B expression in the liver improves phenotype in a murine model of Wilson's disease." *Gene Ther* **19**(11): 1085-94.
- Salmon, F., K. Grosios, et al. (2014) "Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera(R))." *Expert Rev Clin Pharmacol* **7**(1): 53-65.
- Sanchez-Albisua, I., T. Garde, et al. (1999). "A high index of suspicion: the key to an early diagnosis of Wilson's disease in childhood." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **28**(2): 186-90.
- Sandrin, V., B. Boson, et al. (2002). "Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates." *Blood* **100**(3): 823-32.
- Sandrini, J., J. Boursier, et al. (2014) "Quantification of portal-bridging fibrosis area more accurately reflects fibrosis stage and liver stiffness than whole fibrosis or perisinusoidal fibrosis areas in chronic hepatitis C." *Mod Pathol* **27**(7): 1035-45.
- Sasaki, M., M. C. Yoshida, K. Kagami, N. Takeichi, H. Kobayashi, K. Dempo, and M. Mori. (1985). Spontaneous hepatitis in an inbred strain of Long- Evans rats. *Rat News Letter*. 14:4-6. 2.
- Sauer, V., R. Sijaj, et al. (2011) "Repeated transplantation of hepatocytes prevents fulminant hepatitis in a rat model of Wilson's disease." *Liver Transpl* **18**(2): 248-59.
- Sawaki, M., A. Hattori, et al. (1998). "Chronic liver injury promotes hepatocarcinogenesis of the LEC rat." *Carcinogenesis* **19**(2): 331-5.
- Schaefer, M., H. Roelofsen, et al. (1999). "Localization of the Wilson's disease protein in human liver." *Gastroenterology* **117**(6): 1380-5.
- Schilsky, M. L. (2009). "Wilson disease: current status and the future." *Biochimie* **91**(10): 1278-81.
- Schilsky, M. L., N. Quintana, et al. (1998). "Spontaneous cholangiofibrosis in Long-Evans Cinnamon rats: a rodent model for Wilson's disease." *Lab Anim Sci* **48**(2): 156-61.
- Schilsky, M. L., I. H. Scheinberg, et al. (1994). "Liver transplantation for Wilson's disease: indications and outcome." *Hepatology* **19**(3): 583-7.
- Schlegel, R., T. S. Tralka, et al. (1983). "Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site?" *Cell* **32**(2): 639-46.
- Schmitt F. (2008) Thérapie génique in vivo médiée par les vecteurs lentiviraux dans une approche chirurgicale et par un vecteur régulé par un microARN endogène : application à la maladie de Crigler-Najjar de type 1. Mémoire pour l'obtention du master 2 BBRT, Faculté de Médecine de Nantes.
- Schmitt, F., M. Flageul, et al. (2010) "Transient increase in intrahepatic pressure mediates successful treatment of the Gunn rat with reduced doses of lentiviral vector." *Hum Gene Ther* **21**(10): 1349-56.
- Schmitt, F., S. Remy, et al. (2010) "Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats." *Gastroenterology* **139**(3): 999-1007, 1007 e1-2.
- Schmitt, F., G. Podevin, et al. (2013) "Evolution of exchangeable copper and relative exchangeable copper through the course of Wilson's disease in the Long Evans Cinnamon rat." *PLoS One* **8**(12): e82323.
- Schmitt, F., N. Pastore, et al. (2014) "Correction of hyperbilirubinemia in gunn rats by surgical delivery of low doses of helper-dependent adenoviral vectors." *Hum Gene Ther Methods* **25**(3): 181-6.
- Schosinsky, K. H., H. P. Lehmann, et al. (1974). "Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride." *Clin Chem* **20**(12): 1556-63.
- Senis, E., C. Fatouros, et al. (2014) "CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: An adeno-associated viral (AAV) vector toolbox." *Biotechnol J*.
- Seppen, J., C. Bakker, et al. (2006). "Adeno-associated virus vector serotypes mediate sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats." *Mol Ther* **13**(6): 1085-92.
- Setty, B. N., S. Kulkarni, et al. (2002). "Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion." *Blood* **99**(5): 1564-71.
- Shah, D. (2014) "Wilson's disease: Hepatic manifestations." *Dis Mon* **60**(9): 465-474.
- Shah, G, Dubin, PL (1995). Adsorbitive interaction of Ficoll standards with porous glass size exclusion chromatography columns. *Journal of Chromatography A* **693**: 197-203.
- Shaker, M. E., K. R. Zalata, et al. (2011) "Comparison of imatinib, nilotinib and silymarin in the treatment of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress, injury and fibrosis." *Toxicol Appl Pharmacol* **252**(2): 165-75.
- Sijaj, R., V. Sauer, et al. (2013) "Dietary copper triggers onset of fulminant hepatitis in the Long-Evans cinnamon rat model." *World J Gastroenterol* **18**(39): 5542-50.
- Sobrevals, L., C. Rodriguez, et al. (2010) "Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats." *Hepatology* **51**(3): 912-21.
- Sobrevals, L., M. Enguita, et al. (2012) "AAV vectors transduce hepatocytes in vivo as efficiently in cirrhotic as in healthy rat livers." *Gene Ther* **19**(4): 411-7.

- Somanathan, S., F. Jacobs, et al. (2014) "AAV Vectors Expressing LDLR Gain-of-Function Variants Demonstrate Increased Efficacy in Mouse Models of Familial Hypercholesterolemia." *Circ Res* **115**(6): 591-9.
- Sone, K., M. Maeda, et al. (1996). "Inhibition of hereditary hepatitis and liver tumor development in Long-Evans cinnamon rats by the copper-chelating agent trientine dihydrochloride." *Hepatology* **23**(4): 764-70.
- Sorensson, J., M. Ohlson, et al. (2001). "A quantitative analysis of the glomerular charge barrier in the rat." *Am J Physiol Renal Physiol* **280**(4): F646-56.
- Spincemaille, P., G. Chandhok, et al. (2014) "The plant decapeptide OSIP108 prevents copper-induced apoptosis in yeast and human cells." *Biochim Biophys Acta* **1843**(6): 1207-15.
- Spincemaille, P., D. H. Pham, et al. (2014) "The plant decapeptide OSIP108 prevents copper-induced toxicity in various models for Wilson disease." *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Steindl, P., P. Ferenci, et al. (1997). "Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge." *Gastroenterology* **113**(1): 212-8.
- Stroka, D., A. Keogh, et al. (2014) "In vitro rescue of FGA deletion by lentiviral transduction of an afibrinogenemic patient's hepatocytes." *J Thromb Haemost*.
- Suda, T. and D. Liu (2007). "Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications." *Mol Ther* **15**(12): 2063-9.
- Sun, M. S., C. J. Pan, et al. (2002). "Sustained hepatic and renal glucose-6-phosphatase expression corrects glycogen storage disease type Ia in mice." *Hum Mol Genet* **11**(18): 2155-64.
- Sundberg, M. and O. Isacson (2014) "Advances in stem-cell-generated transplantation therapy for Parkinson's disease." *Expert Opin Biol Ther* **14**(4): 437-53.
- Suzuki, K. T., S. Kanno, et al. (1995). "Copper metabolism leading to and following acute hepatitis in LEC rats." *Toxicology* **97**(1-3): 81-92.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* **131**(5): 861-72.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-76.
- Tao, N., G. P. Gao, et al. (2001). "Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver." *Mol Ther* **3**(1): 28-35.
- Tazawa, H., S. Kagawa, et al. (2013) "Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy." *Expert Opin Biol Ther* **13**(11): 1569-83.
- Terada, K., N. Aiba, et al. (1999). "Biliary excretion of copper in LEC rat after introduction of copper transporting P-type ATPase, ATP7B." *FEBS Lett* **448**(1): 53-6.
- Terada, K., T. Nakako, et al. (1998). "Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA." *J Biol Chem* **273**(3): 1815-20.
- Theophilos, M. B., D. W. Cox, et al. (1996). "The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease." *Hum Mol Genet* **5**(10): 1619-24.
- Tripathy, S. K., H. B. Black, et al. (1996). "Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors." *Nat Med* **2**(5): 545-50.
- Trocello, J. M., P. Chappuis, et al. (2009). "[Wilson disease]." *Presse Med* **38**(7-8): 1089-98.
- Trocello, J. M., P. Chappuis, et al. (2010) "[Abnormal copper metabolism in adult]." *Rev Med Interne* **31**(11): 750-6.
- Tsai, J. H., J. Y. Liu, et al. (2008). "Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats." *J Viral Hepat* **15**(7): 508-14.
- Venturoli, D. and B. Rippe (2005). "Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability." *Am J Physiol Renal Physiol* **288**(4): F605-13.
- Verma, I. M. and M. D. Weitzman (2005). "Gene therapy: twenty-first century medicine." *Annu Rev Biochem* **74**: 711-38.
- Viecelli, H. M., R. P. Harbottle, et al. (2014) "Treatment of phenylketonuria using minicircle-based naked-DNA gene transfer to murine liver." *Hepatology* **60**(3): 1035-43.
- Volpers, C. and S. Kochanek (2004). "Adenoviral vectors for gene transfer and therapy." *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S164-71.
- Vonk, W. I., C. Wijmenga, et al. (2008). "Relevance of animal models for understanding mammalian copper homeostasis." *Am J Clin Nutr* **88**(3): 840S-5S.
- Walther, W. and U. Stein (2000). "Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases." *Drugs* **60**(2): 249-71.
- Wang, Y, Dubin PL (1998) Observation of ficoll charge using size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 800: 181-185

- Wang, L., H. Morizono, et al. (2012) "Preclinical evaluation of a clinical candidate AAV8 vector for ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency reveals functional enzyme from each persisting vector genome." *Mol Genet Metab* **105**(2): 203-11.
- Wanisch, K. and R. J. Yanez-Munoz (2009). "Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age." *Mol Ther* **17**(8): 1316-32.
- Wapnir, R. A. (1998). "Copper absorption and bioavailability." *Am J Clin Nutr* **67**(5 Suppl): 1054S-1060S.
- Weiss, K. H., D. N. Gotthardt, et al. (2011) "Zinc monotherapy is not as effective as chelating agents in treatment of Wilson disease." *Gastroenterology* **140**(4): 1189-1198 e1.
- Wilson SAK, progressive lenticular degeneration, a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver, *Brain* 1912, 34:20-509
- Winding, O. (1981). "Cerebral microembolization following carotid injection of dextran microspheres in rabbits." *Neuroradiology* **21**(3): 123-6.
- Wisse, E., F. Jacobs, et al. (2008). "The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer." *Gene Ther* **15**(17): 1193-9.
- Woods, N. B., V. Bottero, et al. (2006). "Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma." *Nature* **440**(7088): 1123.
- Wu, G. Y., J. M. Wilson, et al. (1991). "Receptor-mediated gene delivery in vivo. Partial correction of genetic analbuminemia in Nagase rats." *J Biol Chem* **266**(22): 14338-42.
- Wu, J., J. R. Forbes, et al. (1994). "The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene." *Nat Genet* **7**(4): 541-5.
- Xing, E. M., V. W. Knox, et al. (2013) "The effect of neonatal gene therapy on skeletal manifestations in mucopolysaccharidosis VII dogs after a decade." *Mol Genet Metab* **109**(2): 183-93.
- Yamada, T., T. Agui, et al. (1993). "Inhibition of the copper incorporation into ceruloplasmin leads to the deficiency in serum ceruloplasmin activity in Long-Evans cinnamon mutant rat." *J Biol Chem* **268**(12): 8965-71.
- Yan, F. R., J. G. Lin, et al. (2011) "Sparse logistic regression for diagnosis of liver fibrosis in rat by using SCAD-penalized likelihood." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 875309.
- Yang, Y., S. E. Haecker, et al. (1996). "Immunology of gene therapy with adenoviral vectors in mouse skeletal muscle." *Hum Mol Genet* **5**(11): 1703-12.
- Yao, Q., Y. Lin, et al. (2013) "Curcumin ameliorates intrahepatic angiogenesis and capillarization of the sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis." *Toxicol Lett* **222**(1): 72-82.
- Yin, H., W. Xue, et al. (2014) "Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype." *Nat Biotechnol* **32**(6): 551-3.
- Yiu, W. H., Y. M. Lee, et al. (2010) "Complete normalization of hepatic G6PC deficiency in murine glycogen storage disease type Ia using gene therapy." *Mol Ther* **18**(6): 1076-84.
- Yoshida, M. C., R. Masuda, et al. (1987). "New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat." *J Hered* **78**(6): 361-5.
- Yoshida, Y., Y. Tokusashi, et al. (1996). "Intrahepatic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans cinnamon rats." *Gastroenterology* **111**(6): 1654-60.
- Zarogoulidis, P., K. Darwiche, et al. (2013) "Suicide Gene Therapy for Cancer - Current Strategies." *J Genet Syndr Gene Ther* **4**.
- Zennou, V., C. Petit, et al. (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." *Cell* **101**(2): 173-85.
- Zhang (2002). *Methods in enzymology*, Vol. 346, Intravascular delivery of plasmid DNA 125 [71 **Surgical Procedures for Intravascular Delivery** of Plasmid DNA to Organs By Guofeng Zhang, Vladimir Budker, Phillip Williams, Kristine Hanson and Jon A. Wolff.
- Zhang, S., S. Chen, et al. (2011) "Rescue of ATP7B function in hepatocyte-like cells from Wilson's disease induced pluripotent stem cells using gene therapy or the chaperone drug curcumin." *Hum Mol Genet* **20**(16): 3176-87.
- Zufferey, R., J. E. Donello, et al. (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." *J Virol* **73**(4): 2886-92.
- Zufferey, R., T. Dull, et al. (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." *J Virol* **72**(12): 9873-80.

RESUMÉS ET MOTS CLÉ

Thérapie génique *in vivo* des hépatopathies héréditaires cirrhogènes par des lentivirus recombinants à immunogénicité atténuée et dans une approche chirurgicale : application à la maladie de Wilson

La maladie de Wilson (MW) est une hépatopathie héréditaire régénérative causée par des mutations du gène ATP7B, qui code pour un transporteur hépatocytaire du cuivre. Elle induit une accumulation toxique de cuivre dans le foie et le cerveau, responsable d'une cirrhose précoce et de troubles neuropsychiatriques. Les traitements actuels sont lourds et une transplantation hépatique peut être nécessaire, laissant la place à des alternatives thérapeutiques innovantes, dont la thérapie génique (TG).

Nous avons tout d'abord validé plusieurs marqueurs sériques diagnostiques de la MW et de suivi de l'hépatite aiguë, et adapté l'analyse morphométrique numérisée de la fibrose hépatique au rat LEC, modèle animal de la MW. Nous avons ensuite développé une technique d'injection chirurgicale du vecteur lentiviral (VL) en foie isolé en hyperpression, en avons prouvé l'efficacité sur la restauration de la transduction chez des rats pré-immunisés contre la protéine d'enveloppe du VL et l'avons appliquée à la TG du foie fibrotique. Enfin, nous avons créé un VL codant pour le cDNA du gène ATP7B, sous contrôle d'un promoteur foie-spécifique et contenant des séquences-cibles du miR142-3p, contrant la survenue d'une immunité spécifique. Injecté à des rats LEC, il a permis de restaurer à long terme une activité enzymatique de l'ATP7B en quantité suffisante pour induire une expression phénotypique, mais n'a pas empêché l'évolution vers la fibrose hépatique.

Ces travaux ont démontré l'applicabilité de la TG *in vivo* par VL dans la MW, tout en confirmant la nécessité d'un taux de transduction initial très élevé pour obtenir une efficacité thérapeutique suffisante et prévenir toute fibrose hépatique.

***In vivo* gene therapy of hereditary regenerative liver diseases with low immunogenic lentiviral vectors and in a surgical approach : application to Wilson's disease.**

Wilson's disease (WD) is a hereditary liver disease due to mutations in the ATP7B gene, which encodes for a copper transporter in the liver. It leads to a toxic accumulation of copper in the liver and the brain, responsible for early cirrhosis and neuropsychiatric disorders. Current medications are burdensome and may imply liver transplantation, which is in favor of alternative therapeutic strategies, such as gene therapy (GT).

In this work we have first validated different biological markers for WD diagnosis and acute liver disease progression, as well as the use of computerized morphometric analysis of liver fibrosis in the LEC rat, an animal model for WD. We have then developed a surgical approach for the injection of the lentiviral vector (LV) into an isolated liver in hyperpressure. Its use allowed a restoration of the transduction efficacy after LV injection in rats pre-immunized against the LV envelop protein, and we have addressed its potential for GT in a fibrotic liver. We have then injected in young LEC rats a LV encoding for the cDNA of the ATP7B gene, under control of a liver-specific promoter and containing target sequences of the miR142-3p, to prevent the development of a specific immune response. It allowed a long-term restoration of the ATP7B enzymatic activity, but did not prevent the occurrence of liver fibrosis.

Thus, we have demonstrated that *in vivo* lentiviral GT could be applied to WD, but that a very high initial hepatocytes transduction level was mandatory to achieve a therapeutic efficiency and to prevent the development of liver failure.

Mots clé: thérapie génique, vecteurs lentiviraux, maladie de Wilson, rat Long Evans Cinnamon, fibrose hépatique