

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**DEVELOPPEMENT DE METHODES DE PRODUCTION
ET D'ANALYSE DE VECTEURS RECOMBINANTS
DERIVES DE L'*ADENO-ASSOCIATED VIRUS*.**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : Chimie-Biologie

Discipline : Médecine

Spécialité : Virologie

Présentée

et soutenue publiquement par

BLOUIN Véronique

Le 21 Juin 2007, devant le jury ci-dessous

Président du jury :	Dr. Nicolas Ferry
Rapporteurs :	Dr. Otto Merten
	Dr. Olivier Danos
Examineur :	Dr. Richard Snyder
Directeur de Thèse :	Dr. Philippe Moullier

Liste des Abréviations

AAV: adeno-associated virus
AAVr: *adeno-associated virus recombinant*
rcAAV: *replicatif competent adeno-associated virus*
Ad: adénovirus
ADN:acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
ARN: acide ribonucléique
CARE: *cis-acting replication element*
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CMV: Cytomégalovirus
CPV: *Canine parvovirus*
CsCl: Chlorure de Césium
Db: double brin
FGF-R: *Fibroblast Growth Factor Receptor*
FIX: facteur IX de coagulation
GFP: *green fluorescent protein*
GFU : *GFP forming unit*
GMP : *Good manufacturing practices*
HEK : *Human Embryonic Kidney*
HGFR: *hepatocyte growth factor receptor*
HIV: *Human Immunodeficiency Virus*
HS: héparan sulfate
HSPG: *heparan sulfate proteoglycan*
HSV: *Herpes simplex virus*
ITR: *Inverted terminal repeat*
kb: kilobase
kDa: KiloDalton
LacZ: gène de la β -galactosidase d'E.Coli
LAM-PCR : *linear amplification-mediated-PCR*

LFU *LacZ forming unit*

Mdx: modèle murin de la myopathie de Duchenne

MEpo: érythropoïétine murine

MOI: *Multiplicity Of Infectious*

MVM: *Mouse Virus Minute*

Nls: *nuclear localization signal*

PA: signal de polyadénylation

pb: paire de base

PI: particules infectieuses

pI: point isoélectrique

PT : particules totales

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PDGFR: *platelet derived growth factor receptor*

RBE: *Rep Binding Element*

RBS: *Rep Binding Site*

RCA: *Replication Center Assay*

RT-PCR: *Reverse Transcriptase PCR*

sb: simple brin

ScAAVr : *self-complementary adeno-associated virus recombinant*

SNC: système nerveux central

SVF: sérum de veau foetal

trs: *terminal resolution site*

T.U. : *Transducing Units*

vg: *vector genome*

Sommaire

ILLUSTRATIONS.....	4
INTRODUCTION.....	6
I. LA THERAPIE GENIQUE AU MOYEN DU VECTEUR DERIVE DE L'ADENO-ASSOCIATED VIRUS (AAVR).....	6
<i>Définition d'un vecteur viral.</i>	9
II. BIOLOGIE DE L'AAV.....	9
<i>A- Le génome AAV.....</i>	9
1- Généralités.	9
2- Organisation génomique de l'AAV.	12
3- Propriétés physico-chimiques de l'AAV.	14
4- Structure des capsides AAV.	16
III. LE CYCLE VIRAL DE L'AAV.....	19
<i>A- Description du cycle viral de l'AAV.</i>	19
1- En phase de latence.	19
2- En phase répllicative.	24
2a- En présence de l'adénovirus.	24
2b- Dans le cas où le virus auxiliaire est un herpès virus.	25
2c - Les mécanismes de la réplication.	26
3- Les différences pour les autres sérotypes.	32
<i>B. Les étapes de l'infection de l'AAV dans la cellule.</i>	33
1- Liaison à la membrane cellulaire.	33
1a- Selon le sérotype AAV, des récepteurs spécifiques ont été mis en évidence.	36
2 - Entrée dans la cellule.	38
3- Trafic intracellulaire.....	40
1a- Transport intracellulaire de l'AAV-5.....	44
1b- Transport intracellulaire de l'AAV-8 comparé à l'AAV-2.	45
4- Import nucléaire.	47
5- Tropicité in vivo.	50
<i>C- Statut moléculaire du génome viral dans la cellule transduite.....</i>	54
1- In vitro.....	54
2- In vivo.....	58
IV. LES VECTEURS AAV RECOMBINANTS DERIVES DE L'AAV.....	61
<i>A- Le génome des vecteurs AAVr dérivés de l'AAV.....</i>	62
<i>B- Design des vecteurs AAVr.....</i>	65
1- Les vecteurs homologues.	65
2- Les vecteurs AAV hybrides.	66
2a. Les capsides chimères.	66
2b. Les capsides mosaïques.	67
3- Les vecteurs <i>dsAAVr</i> ou <i>scAAVr</i>	69
4- Les vecteurs dits « <i>trans-spliced</i> » ou trans-épissés.....	71
V. PRODUCTION DE VECTEURS AAV RECOMBINANTS.....	73
<i>A- Méthodes de production transitoire.....</i>	74
1- La transfection.	75
1a. Utilisation du Phosphate de Calcium.	77
1b. Utilisation de molécules synthétiques.....	78
2- Le système amplicon HSV recombinant.....	79

3- Le système d'expression en Baculovirus.....	81
<i>B- Etablissement de lignées cellulaires stables de production.</i>	84
1- Etablissement de lignées d'encapsidation.....	87
1a. Développement de lignées cellulaires 293 où le gène <i>rep</i> intégré est sous le contrôle d'un promoteur inductible.....	87
1b. Développement de lignées cellulaires dérivées des cellules HeLa ou des cellules A549 ayant les gènes <i>rep</i> et <i>cap</i> intégrés et placés sous le contrôle des promoteurs natifs de l'AAV.....	88
2- Apport du plasmide vecteur.....	89
2a. Par transfection d'un plasmide vecteur.....	89
2b. Par infection à l'aide du système hybride Ad/AAVr.....	90
3- Apport des fonctions auxiliaires.....	90
3a. Par infection d'un adénovirus thermosensible.....	91
3b. Par infection d'un virus herpès déficient pour la réplication.....	91
3c. Intégration des séquences adénovirales nécessaires à la réplication de l'AAV, avec contrôle de leur expression.....	92
<i>C- Développement de techniques de purification des AAVr.....</i>	92
1- Selon la densité: gradient de CICs.....	92
2- Selon densité et chromatographie d'affinité ou échangeuse d'ions.....	93
3- Selon la technique de chromatographie: colonnes échangeuses d'ions.....	94
VI. CARACTERISATION DES PARTICULES PRODUITES.....	98
<i>A- Caractérisation des vecteurs produits.</i>	98
1- Evaluation par titration des AAVr.....	98
2- Evaluation de la qualité d'un lot de vecteur produit.....	99
2a. Tests de détection des ADN contaminants par PCR quantitative sur le produit fini....	100
2b. Détection de particules compétentes pour la réplication (AAVrc).....	101
2c. Pureté protéique des lots d'AAVr purifiés.....	101
3- Tests de sécurisation.....	102
4- Définition de la notion de standard, développement d'un système d'évaluation.....	102
<i>B- L'émergence de nouveaux sérotypes nécessite le développement de nouvelles méthodes de caractérisation des vecteurs AAVr.</i>	103
1- Développement d'anticorps monoclonaux spécifiques des capsides assemblées.....	103
2- Connaissances des propriétés structurales des particules AAV en solution dans les conditions physiologiques.....	104
2a. Cartographie des capsides AAV par des protéases.....	104
2b. Identification du sérotype par son profil protéolytique de la capside.....	106
VII. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	108
RESULTATS :	110
I. ETABLISSEMENT DE LIGNEES CELLULAIRES STABLES HYBRIDES D'ENCAPSIDATION.	110
<i>A- Présentation du travail.</i>	110
1- Etablissement d'une lignée cellulaire stable d'encapsidation pour l'AAV-5.....	111
2- Principe du système hybride <i>rep</i> de l'AAV-2 et <i>cap</i> du sérotype d'intérêt.....	112
3- Etablissement de lignées hybrides Hela <i>rep2-cap5</i> et Hela <i>rep2-cap1</i>	112
<i>B- Matériels et Méthodes.</i>	113
1- Cellules et virus.....	113
2- Constructions plasmidiques.....	113
3- Extraction de l'ADN génomique et analyse par PCR et Southern-blot.....	114
4- Analyse par western-blot.....	115
5- Réaction de coupure (<i>Nicking assay</i>).....	116
6- Production, purification et titration des vecteurs AAVr.....	116
7- Réplication <i>in vivo</i> des plasmides contenant les séquences <i>rep-cap</i> des AAV-1, -2, -5.....	117
8- Expression et purification de la protéine Rep78 fusionnée à un marqueur Histine.....	117

9- Analyse <i>in vivo</i>	118
C- Résultats.....	118
1- Caractérisation de la lignée stable d'encapsulation HeR5C5 obtenue.....	119
2- Etablissement de lignées cellulaires hybrides d'encapsulation.....	123
3- Sélection des clones stables hybrides.....	125
4- Evaluation des clones sélectionnés.....	126
4-1- Test de production des vecteurs AAVr.....	126
4-2- Etude de la stabilité des clones en culture cellulaire.....	127
4-3- Evaluation <i>in vivo</i> chez la souris.....	128
D- Discussion des problèmes liés à l'utilisation des lignées cellulaires hybrides pour une application clinique:.....	130
1- Le choix des cellules HeLa :.....	131
2- La détection de séquences intégrées de façon aspécifique dans les capsides AAVr.....	131
II. DISCUSSION DU PREMIER ARTICLE :	134
III. DISCUSSION DU DEUXIEME ARTICLE :	139
DISCUSSION GENERALE.....	142
BIBLIOGRAPHIE.....	147
ARTICLES ANNEXES:.....	169

1- *Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process.*

2- *Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus.*

3- *Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines.*

4- *Recombinant adeno-associated virus type 2 mediates highly efficient gene transfer in regenerating rat skeletal muscle.*

5- *Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle.*

6- *Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle.*

Illustrations

FIGURES :

- Figure 1** p.13 : Organisation génomique de l'AAV sauvage
- Figure 2** p.15 : Représentation de la surface d'une capsid
- Figure 3** p.17 : Modèle atomique de monomère de VP3
- Figure 4** p.20 : Représentation schématique du cycle viral de l'AAV-2
- Figure 5** p.22 : Structure de l'ITR
- Figure 6** p.28 : Modèle de réplication de l'AAV
- Figure 7** p.31 : Phase répliquative du cycle viral de l'AAV-2
- Figure 8** p.39 : Représentation schématique de l'entrée et du transport intracellulaire
- Figure 9** p.41 : Transport intracellulaire du vecteur AAV-2
- Figure 10** p.46 : Modèle de transduction intracellulaire par l'AAV-2 et l'AAV-8
- Figure 11a** p.57 : Un modèle d'intégration site-spécifique de l'AAV-2 au niveau de l'AAVS1, par Linden, 1996
- Figure 11b** p.59 : Un autre modèle d'intégration d'après Hamilton, 2004
- Figure 12** p.63 : Organisation génomique de l'AAV recombinant
- Figure 13** p.68 : Schéma de production de bibliothèques de capsides AAV d'après Müller et al., 2003. Vecteurs chimères
- Figure 14** p.70 : Schéma de transduction de vecteur double brin
- Figure 15** p.72 : Stratégies pour contourner la limitation de taille du génome recombinant, d'après Warrington, 2006
- Figure 16** p.76 : Schéma de production de vecteurs par transfection
- Figure 17** p.83 : Schéma de production en système baculovirus dans des cellules Sf9
- Figure 18** p.86 : Schéma d'établissement de lignée stable
- Figure 19** p.95 : Purification et visualisation des particules AAVr purifiées
- Figure 20** p.105 : Profil de digestion protéolytique

TABLEAUX :

Tableau 1	p.11 :	Origine des différents sérotypes et leur clonage
Tableau 2	p.52 :	Efficacité de transduction des sérotypes AAV dans différents tissus
Tableau 3	p.97 :	Récapitulatif des protocoles de purification AAVr

RESULTATS :

Figure 1bis	p.120 :	Southern blot et western blot pour les cellules HeR2C2 et HeR5C5
Figure 2bis	p.121 :	Test de réplication <i>in vivo</i> .
Figure 3bis	p.123 :	Activité de coupure de la protéine Rep
Figure 4bis	p.124 :	Plasmides transfectés pour générer les clones cellulaires
Figure 5bis	p.125 :	Analyse des clones par Southern blot et western blot
Tableau 1bis	p.119 :	Résultats production à partir des cellules HeR2C2 et HeR5C5
Tableau 2bis	p.124 :	Résultats production d'AAVr sur les différents clones
Tableau 3bis	p.125 :	Stabilité de production des clones.

INTRODUCTION

I. La Thérapie Génique au moyen du vecteur dérivé de l'Adéno-Associated Virus (AAVr).

La thérapie génique repose sur le transfert et l'expression spécifiques de gènes thérapeutiques dans des cellules ou organe cibles. C'est donc l'utilisation du gène comme médicament. L'objectif est de corriger des maladies héréditaires mono-géniques en apportant une copie fonctionnelle du gène pour remplacer/compenser le gène « non fonctionnel » ou encore de façon moins spécifique, de diminuer la progression de maladies acquises (cancer, maladies auto immunes, ...).

La thérapie génique représente un défi complexe qui consiste à faire exprimer le bon gène, dans les bonnes cellules; à éventuellement contrôler le niveau d'expression de ce gène, et que cette expression persiste à long terme en particulier dans le cas des maladies génétiques monogéniques qui nécessitent un traitement définitif.

L'un des écueils est de pouvoir délivrer l'ADN thérapeutique aux cellules sachant que les barrières naturelles rendent ce transfert peu ou pas efficace. La nature nous propose les virus, desquels sont dérivés les virus recombinants dont la plupart sont défectifs pour la réplication. Les virus exploitant les motifs et le métabolisme cellulaires, pénètrent et délivrent leur matériel génétique dans le noyau de la cellule hôte.

Plusieurs types de vecteurs viraux ont été développés et utilisés dans des expérimentations de transfert de gène aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ces expériences permettent d'évaluer les avantages et inconvénients de chacun. Au-delà de l'expérimentation dans le modèle murin qui permet bien souvent d'obtenir des corrections phénotypiques, des essais précliniques chez les gros animaux sont nécessaires pour confirmer l'effet thérapeutique à une plus grande échelle lorsque le modèle existe, mais également réaliser une partie des études de

toxicité, de bio-distribution. Ce n'est qu'après avoir respecté ce schéma général qu'un essai clinique peut être envisagé (1260 essais menés à ce jour).

Ce mémoire de thèse fait le choix délibéré de n'aborder que le vecteur dérivé des virus Adéno-Associés (AAV), pour lequel l'équipe à laquelle j'appartiens s'efforce de produire et purifier dans des conditions GMP (*Good Manufacturing Procedure*) des lots destinés à des essais cliniques de Phase I/II chez l'homme.

La plupart des systèmes de transfert de gènes sont dérivés de virus pathogènes humains ou animaux. Contrairement aux autres vecteurs, l'AAV est non pathogène et n'a jamais été associé à une situation pathologique particulière. Peut-être le virus sauvage est-il associé à certains avortements spontanés et sans doute également a-t-il un effet protecteur à l'égard du cancer du col de l'utérus. Depuis un peu plus de 40 ans, c'est comme contaminant des préparations adénovirales que les AAV ont été découverts, (Atchison *et al.*, 1965) (Atchison *et al.*, 1966) (Hoggan *et al.*, 1966). Cette découverte a conduit au développement des premiers vecteurs dérivés des AAV décrits en 1984 (Tratschin *et al.*, 1984) (Hermonat and Muzyczka, 1984), conduisant aux premiers essais de transfert de gènes avec succès dans plusieurs modèles de rongeurs et de gros animaux (pour revues, voir (Snyder *et al.*, 1999) (Monahan and Samulski, 2000)). Les études précliniques dans des modèles animaux ont montré le fort potentiel de l'AAVr comme système de transfert de gène. En 1996, l'équipe de T.Flotte a réalisé le premier essai clinique de phase I chez des patients atteints de mucoviscidose (Flotte *et al.*, 1996) à l'aide d'un AAV-CFTR de sérotype-2.

Même si aujourd'hui l'utilisation des vecteurs AAVr représente encore une faible proportion (3,7% des protocoles cliniques réalisés en 2006) des vecteurs développés aux stades des essais de phase I/II (*Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*, <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>), un nombre croissant d'essais thérapeutiques (46 essais en 2006) utilisant l'AAV, se mettent en place actuellement. Il est important de noter que parmi l'ensemble des essais cliniques en phase I/II, l'AAVr-2 et depuis peu l'AAVr-1 (dans le cadre de la myopathie de Duchenne) sont les seuls sérotypes utilisés.

Parmi les maladies génétiques qui ont été l'objet d'essais thérapeutiques utilisant l'AAVr chez l'homme, la mucoviscidose et l'hémophilie mais aussi les myopathies de

Duschenne ou encore la dégénérescence spongieuse du système nerveux central ou maladie dite de Canavan.

Le traitement de la mucoviscidose, maladie génétique autosomique récessive, repose sur le transfert de l'ADNc du gène CFTR (Flotte *et al.*, 1996) (Aitken *et al.*, 2001) (Wagner *et al.*, 2002) (Fischer *et al.*, 2003). Des essais ont montré que l'application d'un AAVr-2 CFTR sur l'épithélium nasal, sinusal et bronchique permettait une correction partielle mais transitoire du défaut électro-physiologique caractéristique de la maladie avec cependant, une réponse inflammatoire partielle sans doute responsable de l'expression transitoire dans le poumon (Flotte, 2005) (Warrington and Herzog, 2006).

Un essai de phase I chez des patients atteints d'hémophilie B (déficit en facteur IX) a consisté en l'administration intra-portale d'AAV-2-FIX. Cet essai a montré qu'il était possible d'obtenir des niveaux thérapeutiques de facteurs IX. Cependant, les patients ont développé une réponse inflammatoire hépatique avec élévation transitoire des transaminases accompagnée d'une perte d'expression du transgène. Les auteurs de cette étude clinique ont suspecté et documenté une réponse cellulaire contre la capsid de l'AAV2 en faisant l'hypothèse d'une réactivation d'une réponse T mémoire contre le sérotype utilisé (Manno *et al.*, 2006).

De plus en plus de données précliniques indiquent que l'AAVr est un vecteur sans doute capable d'apporter un bénéfice thérapeutique dans certaines indications comme les maladies génétiques de la rétine, du système nerveux central et périphérique, du muscle squelettique. Plus récemment, la découverte que le sérotype-9 de l'AAV est capable de transduire efficacement le muscle cardiaque ouvre de nouvelles perspectives pour traiter des affections héréditaires ou acquises de cet organe. Le foie est sans doute une cible privilégiée dans un bon nombre de maladies héréditaires du métabolisme, mais récemment des aspects de biosécurité spécifique à cet organe ont été soulevés devant le possible lien entre la transduction par l'AAV et l'émergence de tumeur hépatique.

Quoi qu'il en soit, devant l'accroissement des données précliniques souvent spectaculaires en particulier dans les modèles de grands animaux, l'AAVr devient un véritable enjeu pour lequel les aspects de bioproduction restent un défi surtout au regard des nombreux sérotypes aujourd'hui disponibles et également de la nature des séquences d'ADN à encapsider (simple vs double brin).

Définition d'un vecteur viral.

Les virus se sont avérés être des vecteurs de choix pour le transfert de gènes, leurs propriétés font d'eux de bons candidats. En effet, ils ont naturellement la capacité d'infecter la cellule cible, d'y transférer leur matériel génétique et d'utiliser la machinerie cellulaire à leur profit. Cette aptitude naturelle des virus a conduit au développement des vecteurs viraux pour le transfert de gènes.

Traditionnellement, les vecteurs viraux sont défectifs pour la réplication, mais conservent la capacité à se fixer à la surface des cellules, d'être internalisés, de transférer le matériel génétique dans la cellule et de permettre l'expression du transgène. La succession de ces événements est regroupée sous le terme de "transduction". La prolifération de ces vecteurs viraux ne pourra s'opérer qu'en présence des éléments de réplication et d'encapsidation virale. Ces séquences virales, en partie ou totalement délétées du vecteur recombinant, seront apportées *en trans* pour permettre la production des vecteurs viraux.

II. Biologie de l'AAV.

A- Le génome AAV

1- Généralités.

L'AAV est un parvovirus humain défectif, non pathogène (Berns and Giraud, 1996). Aucune maladie ne lui est associée. Les parvovirus sont parmi les plus petits et les plus simples virus à ADN infectant les animaux. Il appartient à la famille des parvovirus "helper-dépendant". La famille des *Parvoviridae* se décompose en deux sous-familles: d'une part, les *Densovirinae* qui infectent les invertébrés en particulier les insectes et d'autre part, la sous-famille des *Parvovirinae* qui infectent les vertébrés, cette sous-famille regroupe les genres *Parvovirus* parmi lesquels le Virus Minute de la souris, le parvovirus Canin et les *Dependovirus* auxquels appartiennent les Virus Adéno-Associés de type humain, simien, canin, ovin, porcin, aviaire.

Cette sous-famille des *Dependovirus* se caractérise par son incapacité à pouvoir se répliquer de manière autonome. Pour se répliquer, l'AAV a besoin d'un virus auxiliaire qui peut-être l'adénovirus, le virus herpès, le CMV (cytomégalovirus), l'HPV (human papillomavirus) ou le virus de la vaccine qui, pour ce dernier, ne lui n'apporte que des fonctions auxiliaires partielles (Buller *et al.*, 1981).

Douze sérotypes d'AAV ont été identifiés à ce jour, les sérotypes 1, 2, 3, 4, 6 et 12 ont été isolés et identifiés à partir de préparations adénovirales, les autres sérotypes 5, 7, 8, 9, 10 et 11 à partir de tissus humains ou de primates (Atchison *et al.*, 1966) (Schmidt *et al.*, 2006). Un sérotype est considéré comme nouveau, s'il ne réagit pas efficacement avec les sérums spécifiques neutralisants des autres sérotypes et qu'il présente un profil sérologique différent des sérotypes existants et caractérisés. De cette façon, huit sérotypes distincts ont été décrits avec un tropisme cellulaire différent. L'AAV-6 n'est pas vraiment un sérotype supplémentaire, puisque sa sérologie est identique à celle de l'AAV-1 (Gao *et al.*, 2002a) (Grimm *et al.*, 2003b) (Gao *et al.*, 2004b). Les profils sérologiques de l'AAV-10 et de l'AAV-11 ne sont pas encore bien caractérisés (Mori *et al.*, 2004). Ils sont cependant, considérés dans la littérature, comme des sérotypes différents (Wu *et al.*, 2006c). L'AAV-12 qui vient d'être isolé reste aussi peu caractérisé (Schmidt, présentation à l'ASGT 2006). Par ailleurs, environ 100 nouveaux isolats d'AAV ont pas été isolés par la technique de PCR qui consiste à amplifier une courte séquence ADN de la région variable du gène de la capsidie appelée « *signature PCR* » à partir de séquences ADN (Schmidt *et al.*, 2006). Cette stratégie a été retenue pour rechercher de nouveaux AAV isolés (Katano *et al.*, 2004). Ces isolats sont dits variants d'AAV car il n'est pas possible de les distinguer par des réactions anticorps neutralisants croisées.

Sérotyp	Origine des sérotypes	Clonage du génome viral	N°accession (gène bank)
AAV-1	Préparation d'adénovirus simien SV15	1999 (Xiao W. <i>et al.</i>)	AF063497
AAV-2	Préparation d'adénovirus humain de type 12	1982 (Samulski J. <i>et al.</i>)	J01901
AAV-3	Préparation d'adénovirus humain de type 7	1996 (Muramatsu S. <i>et al.</i>) 1998 (Rutledge E.A. <i>et al.</i>)	U48704 AF028705
AAV-4	Préparation d'adénovirus simien SV15	1997 (Chiorini J.A. <i>et al.</i>)	U89790
AAV-5	Condylome génital d'origine humaine	1999 (Chiorini J.A. <i>et al.</i>)	AF085716
AAV-6	Préparation d'adénovirus humain de type 5	1998 (Rutledge E.A. <i>et al.</i>)	AF028704
AAV-7	Tissu cardiaque de singe rhésus	2002 (Gao G. <i>et al.</i>)	AF513851
AAV-8	Tissu cardiaque de singe rhésus	2002 (Gao G. <i>et al.</i>)	AF513852
AAV-9	Tissu humain	2004 (Gao G. <i>et al.</i>)	AY530553
AAV-10	Tissu de singe cynomologus	2004 (Mori <i>et al.</i>)	AY631965
AAV-11	Tissu de singe cynomologus	2004 (Mori <i>et al.</i>)	AY631966
AAV-12	Préparation d'adénovirus simien	2006 (Schmidt <i>et al.</i>)	

Tableau 1 : L'origine des différents sérotypes et leur clonage.

Depuis la découverte de l'AAV en 1965, de nombreux sérotypes d'AAV ont été clonés chez l'homme et le singe et sont représentés dans ce tableau. Parmi ces douze sérotypes, certains ont été isolés à partir de préparations d'adénovirus infectant l'homme ou le singe, d'autres ont été isolés directement à partir de tissus humain ou simien. La séquence de leur génome est disponible dans « *gene bank* », à l'exception du sérotyp-12.

2- Organisation génomique de l'AAV.

Les Parvovirus ont une organisation génomique simple. Ce sont des virus qui ont un génome à ADN linéaire simple brin. Dans le monde viral, leur biologie les classe dans un groupe à part. Il semblerait que les Parvovirus forment la seule famille de virus à ADN qui se répliquent dans le noyau de cellules d'invertébrés et de vertébrés. La simplicité du génome viral explique qu'aucune ADN polymérase n'est codée par le génome des parvovirus, ce qui rend les parvovirus totalement dépendants des facteurs cellulaires de l'hôte pour se répliquer. L'AAV de sérotype-2 a été le premier identifié et le mieux caractérisé. Il circule largement dans la population, dont 80 à 95% présente des anticorps dirigés contre l'AAV-2, mais seule une minorité présente des anticorps neutralisants (Chirmule *et al.*, 1999) (Xiao *et al.*, 1999).

Les particules virales AAV-2 contiennent un génome ADN simple brin de 4675 pb (GenBank J01901 et AF043303 Samulski, 1982, (Srivastava *et al.*, 1983)). Le génome de l'AAV-2 se compose de deux principaux cadres de lecture ouverts (ORFs) (Berns and Giraud, 1996), les gènes *rep* et *cap*, bordés par des séquences palindromiques identiques non codantes de 145 pb appelées «ITR» pour *Inverted Terminal Repeat*.

Le gène *rep* code pour les quatre protéines régulatrices Rep78, 68, 52 et 40 responsables de la réplication du génome viral (Im and Muzyczka, 1990) et de la régulation des promoteurs viraux (Pereira *et al.*, 1997). Les promoteurs p5 et p19 conduisent à la transcription des ARNm codant respectivement pour les protéines Rep78/68 et Rep52/40. Le deuxième cadre de lecture ouvert est sous le contrôle du promoteur p40 codant pour les protéines de la capsidie ou structurales VP1, VP2, VP3 synthétisées suite à l'épissage alternatif de deux transcrits communs. VP1 est traduit à partir d'un ARN épissé peu abondant. La synthèse de VP2 et VP3 s'effectue à partir du même transcrit mais avec deux codons initiateurs différents, le codon ATG pour la protéine VP3 et le codon plus rare ACG pour la protéine VP2. L'efficacité de traduction nettement plus faible de VP2 par rapport à VP3 sont à l'origine de leur représentation quantitativement différente dans l'assemblage de la capsidie (Berns and Giraud, 1996) (Ruffing *et al.*, 1992). Ces trois protéines s'assemblent pour former une capsidie symétrique icosaédrique.

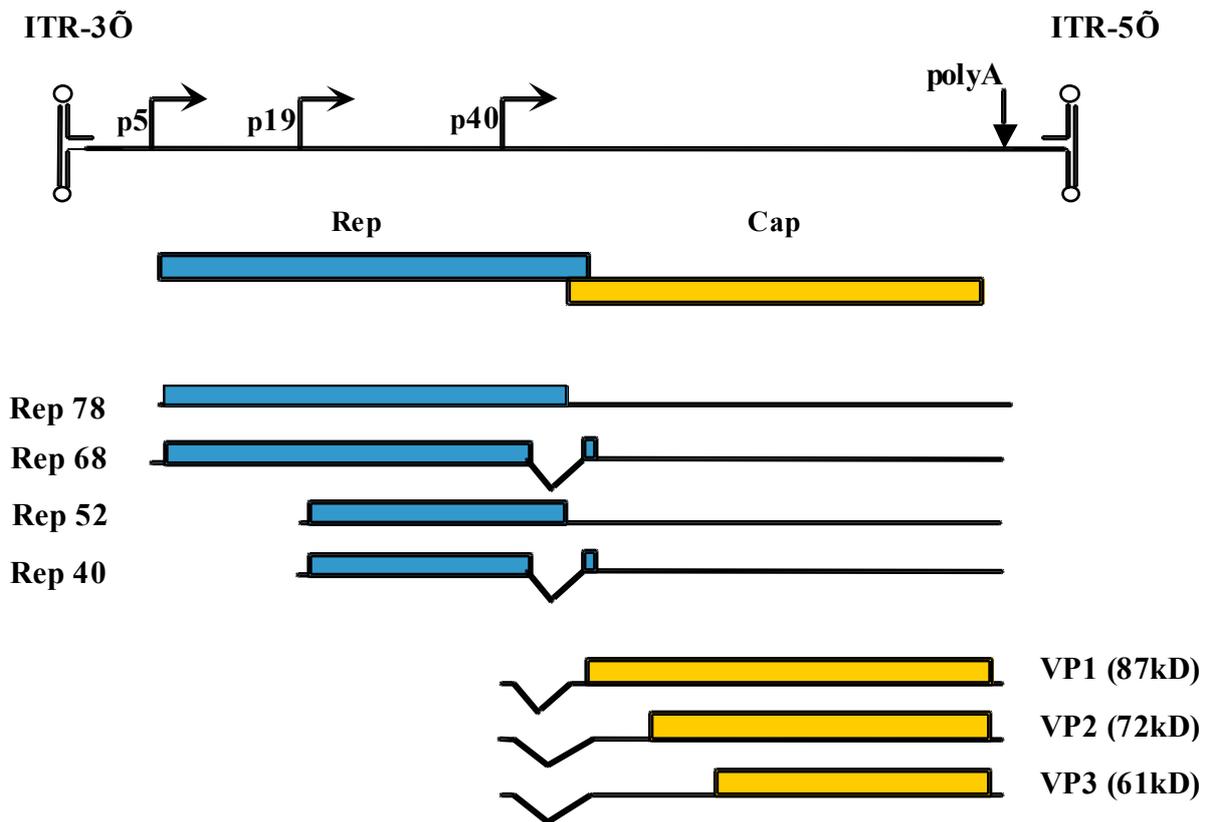


Figure 1 : Organisation g'nomique de l'AAV2 (adapt' de N.Muzyczka, 1992).

Le g'nome de l'AAV2 est constitu' d'unemol'cule d'ADNlin'aire simple brin de 4679 nucl'otides de polarit' positive ou n'gative. Des s'quences ITR (*Inverted Terminal Repeat*) de 145 nucl'otides fl'anquent les g'nes *rep* et *cap* de l'AAV aux extr'mit's . Les promoteurs p5 et p19 initient les transcrits codant pour les prot'ines de r'gulation Rep78, rep68 et Rep52, Rep40 respectivement. Le promoteur p40 initie un transcrit qui codent pour les 3 prot'ines de la capsid VP1, VP2, VP3.

Les régions promotrices p5, p19 et p40 sont régulées en cascade sous le contrôle de facteurs cellulaires, de protéines apportées par le virus auxiliaire et par les protéines Rep.

Les séquences ITR, qui bordent le génome AAV, sont des séquences palindromiques qui s'apparient pour former une structure secondaire partiellement double brin en forme de «T». Elles sont nécessaires en *cis* à l'encapsidation, à l'intégration et à la mobilisation du virus et jouent le rôle d'origine de réplication de l'ADN (Snyder *et al.*, 1993).

3- Propriétés physico-chimiques de l'AAV.

La particule virale est non enveloppée de forme icosaédrique et de petite taille comprise entre 20 à 25 nm de diamètre, elle possède une densité en gradient de chlorure de césium comprise entre 1,40 et 1,45 g/cm³. La haute densité relative des particules AAV permet de les séparer facilement après centrifugation sur gradient de chlorure de césium, des particules adénovirales issues des fonctions auxiliaires (l'adénovirus de taille cinq fois supérieure à l'AAV migre approximativement à une densité de 1,35 g/cm³) (de la Maza and Carter, 1980). Ce sont des particules qui résistent à la chaleur : 56°C pendant 1 heure à l'inverse des particules adénovirales. De même, elles supportent un pH bas et résistent partiellement à certaines protéases et à des détergents comme le chloroforme (Bachmann *et al.*, 1979).

Les virions sont composés des trois protéines VP1, VP2 et VP3 de masse moléculaire respective 87, 72 et 62 kDa (Rose *et al.*, 1971) (Johnson *et al.*, 1977), l'assemblage de ces trois protéines forme une capside composée dans une proportion de 90% de VP3 et 5% de VP1 et VP2 chacune. La structure des capsides comporte 60 sous-unités protéiques qui forment un icosaèdre avec 20 faces et 12 sommets. Approximativement 50% du poids moléculaire du virion correspond à des protéines qui sont N-acétylées, le reste étant l'ADN viral.

En résumé, ce sont des particules dont la capside a une structure compacte, de faible taille ayant des propriétés de résistance importante.

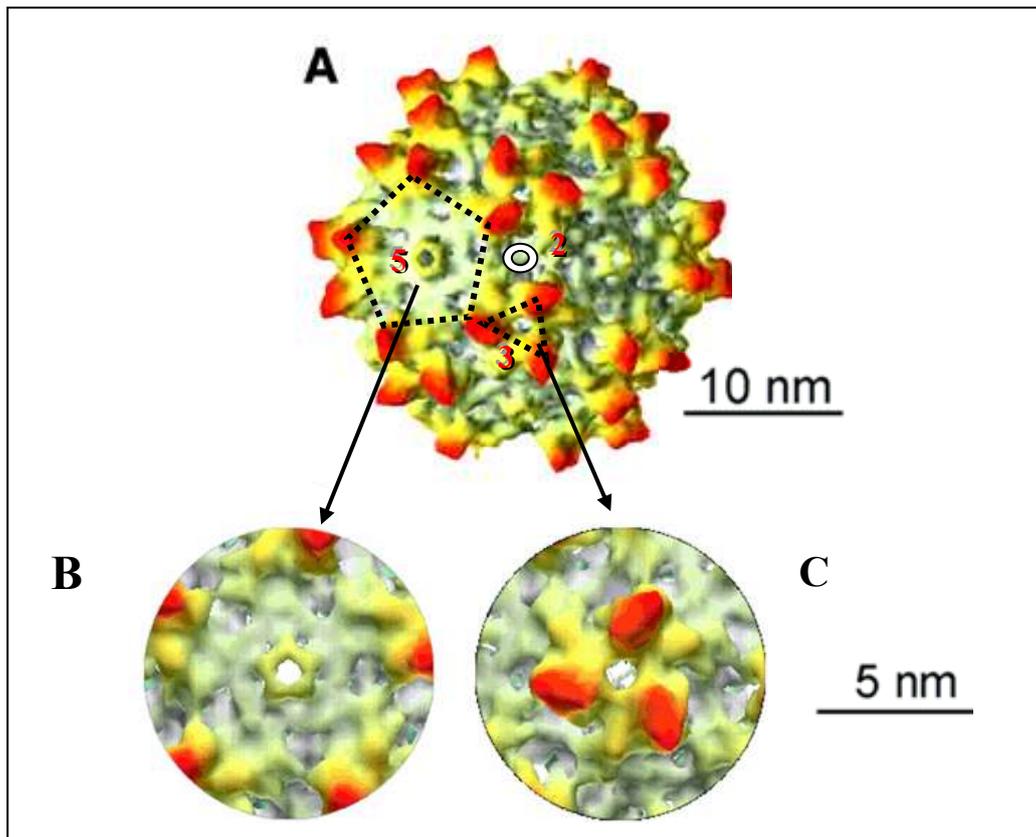


Figure 2 : Représentation de surface de capside

Vue tridimensionnelle (d'après Kronenberg et *al.*, 2001)

En A, représentation extérieure de la particule d'après une image reconstituée par cryomicroscopie électronique, à une résolution de 1,05 nm, selon un angle de symétrie d'ordre 2 figuré par le cercle blanc (2).

En surface, les zones rouges représentent les éléments extérieurs au radian, formant des pics d'environ 2 nm qui donnent un aspect épineux à la capside.

B et C représentent les axes de symétrie d'ordre 5 (5) et d'ordre 3 (3), les pointillés noirs indiquent les pics présents autour de chaque axe.

Les particules virales produites à partir de cellules infectées sont hétérogènes et peuvent être séparées sur gradient de chlorure de césium en fonction de leur densité selon qu'elles sont vides ou pleines. Ainsi, des particules de faible densité apparaissent vides en microscopie électronique à transmission alors que des particules à haute densité apparaissent pleines en microscopie électronique (figure 2). Parmi les particules produites, il existe des formes immatures ou défectives appelées DI (« *Defective Interfering particles* »). Ces particules peuvent avoir un génome incomplet encapsidé et sont sensibles au chloroforme et/ou ont une densité faible qui les distingue des particules matures.

4- Structure des capsides AAV.

S.Kronenberg et al., ont analysé des capsides vides de l'AAV-2 acquises par cryo-microscopie électronique, la reconstitution de 1800 images icosaédriques de capsides leur a permis d'établir la structure tridimensionnelle (voir figure 3, page suivante) (Kronenberg *et al.*, 2001).

Des travaux plus récents ont permis de visualiser la structure des sous-unités de la capside par cristallisation aux rayons X à une résolution de 3 Angström (Xie *et al.*, 2002). C'est la capside du parvovirus canin (CPV) qui a été la première caractérisée par cristallographie (Tsao *et al.*, 1991). La structure atomique de la capside du parvovirus canin est celle qui se rapproche la plus de celle de l'AAV. Pourtant les séquences du CPV et l'AAV ne sont homologues qu'à 20% (Chapman and Rossmann, 1993). Les données atomiques ont permis d'aligner et de voir que la protéine majeure de la capside VP3 de l'AAV est concordante avec la protéine VP2 du CPV (Chapman and Rossmann, 1993; Girod *et al.*, 1999).

Les études de l'architecture de la capside (Xie *et al.*, 2002) ont montré que la sous-unité VP3 de la capside des *dependovirus* dont l'AAV s'organise comme celle des parvovirus autonomes. Le motif en forme de cylindre β enroulé comprenant deux feuilletts antiparallèles est un motif commun aux capsides des virus. Ainsi, le modèle structural de base des protéines VP correspond à 8 feuilletts β antiparallèles, reliés par des boucles et/ou des hélices α avec en particulier 5 grandes boucles (I à V) (Wu *et al.*, 2000). Parmi elles, la boucle la plus longue est à l'origine des protubérances les plus proéminentes observées chez l'AAV-2 (figure 3).

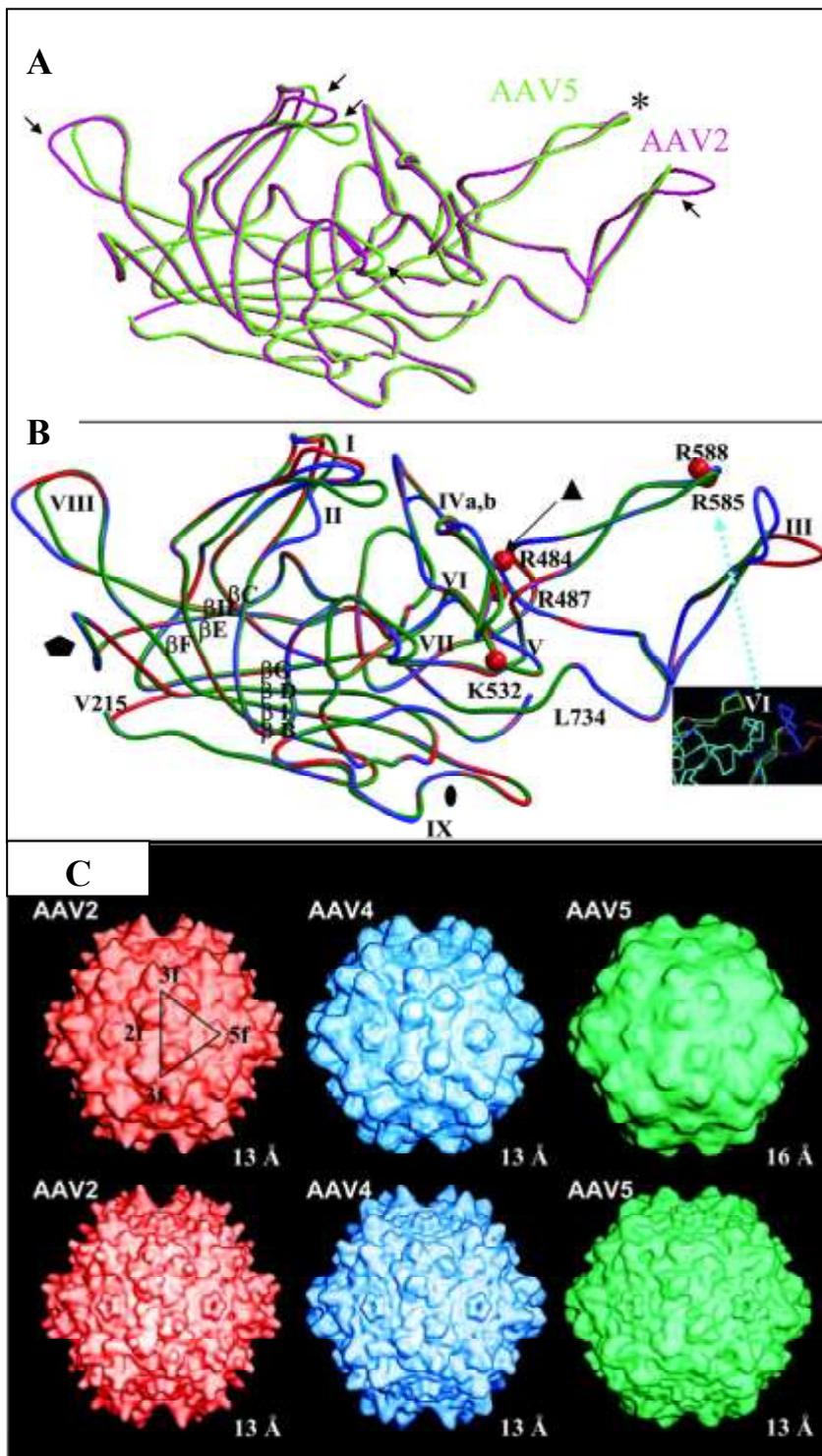


Figure 3 : En A, modèle atomique de monomère de VP3 de l'AAV-5 basée sur la structure cristallographique de l'AAV-2, superposé à la structure enroulée de l'AAV-2. Les flèches indiquent les variations au niveau des boucles β , d'après Walters et al., 2004. En B, superposition de représentation enroulée de monomère de VP3 de modèle atomique de l'AAV-2, de l'AAV-5 et l'AAV-4. En C, comparaison de la structure atomique des capsides de l'AAV-5, l'AAV-4 avec celle de l'AAV-2. Représentation de la surface selon un angle de symétrie d'ordre 2, vue à une résolution de 13 Angströms. 2f, 3f, 5f figurent les axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5 respectivement, d'après Padron et al., 2005.

Les boucles G-H de trois protéines de la capside se regroupent autour d'un axe de symétrie d'ordre 3 pour former 3 pics à l'extérieur de la capside (voir figure 3). C'est à ce niveau que sont localisés les acides aminés basiques R588 et R585, impliqués dans la liaison au récepteur héparan sulfate (Kern *et al.*, 2003) (Opie *et al.*, 2003). La structure atomique de l'AAV-4 a montré des différences de structure au niveau des boucles G-H qui pourrait expliquer en partie son tropisme cellulaire et son profil antigénique propres (Padron *et al.*, 2005).

Plus récemment, la structure cristallographique de l'AAV-4 comparée avec celle de l'AAV-2 montre des différences au niveau des axes de symétrie d'ordre 2 et d'ordre 3 et une différence de topologie au niveau du sommet du canal de l'axe de symétrie d'ordre 5. Toutes les variations au niveau des boucles de surface sont associées à des acides aminés impliqués dans la reconnaissance avec les récepteurs, la transduction, et les anticorps qui réagissent contre l'AAV-2. Ces observations suggèrent que ces régions exposées de la capside peuvent aussi jouer des rôles similaires chez les autres sérotypes (Govindasamy *et al.*, 2006). Les études cristallographiques et aux rayons X de l'AAV-5 ont permis de comparer la structure de la capside avec celles des AAV-2 et AAV-4 (DiMattia *et al.*, 2005) (Padron *et al.*, 2005).

Depuis, d'autres sérotypes font l'objet d'études préliminaires de cristallographie aux rayons X : l'AAV-8 (Lane *et al.*, 2005) et l'AAV-1 (Miller *et al.*, 2006). Ces deux sérotypes présentent la même organisation structurale que les virions AAV déjà caractérisés, avec des axes de symétries d'ordre 2 et 3. La capside de ces deux sérotypes est aussi formée de 60 protéines virales, avec dix protéines virales par unité asymétrique cristallographique (Miller *et al.*, 2006)

En résumé, la structure des AAV est plus fermée que les parvovirus autonomes des mammifères et les parvovirus d'insectes (Simpson *et al.*, 1998). Les motifs répétés en cylindre β forment le cœur de la structure de la capside des parvovirus.

III. Le cycle viral de l'AAV.

A- Description du cycle viral de l'AAV.

Le cycle viral de l'AAV se décompose en deux phases successives orchestrées par la présence ou l'absence du virus auxiliaire (figure 4, page suivante).

La présence de virus auxiliaire déclenche le passage de la phase latente à la phase productive. Pendant la phase productive, il y a expression des gènes *rep* et *cap*, le génome est activement répliqué dans le noyau, puis il est encapsidé dans des particules virales pré-assemblées. La succession de ces événements dure environ 30 heures.

1- En phase de latence.

Seul, le virus entre en phase de latence et s'intègre dans le génome cellulaire de façon stable. De nombreux travaux ont montré que l'AAV s'intègre dans le génome cellulaire chez l'homme, préférentiellement au niveau d'un site du chromosome 19: l'AAVS1 placé au niveau du locus 19q13, 4 (Berns *et al.*, 1975) (Handa *et al.*, 1977) (Samulski, 1993) (Kotin *et al.*, 1990) (Kotin *et al.*, 1992). Cette intégration site-spécifique, nécessite les protéines virales Rep et les origines de répllication de l'AAV.

En absence de virus auxiliaire, l'AAV reste en latence dans la cellule sous forme intégrée à l'état de provirus. Une telle infection des cellules par l'AAV n'est pas productive et se caractérise par l'absence d'expression détectable des gènes viraux, l'absence de répllication virale et également d'assemblage de particules AAV.

L'intégration stable du génome de l'AAV dans le génome de la cellule hôte est associée à une répression des gènes de l'AAV. Ce sont les protéines Rep78 et 68 qui sont responsables de la répression des gènes en se fixant sur une séquence consensus localisée dans le promoteur p5 identique à celle présente dans les ITR, appelée RBS pour «*Rep Binding Site*» (figure 5 p22).

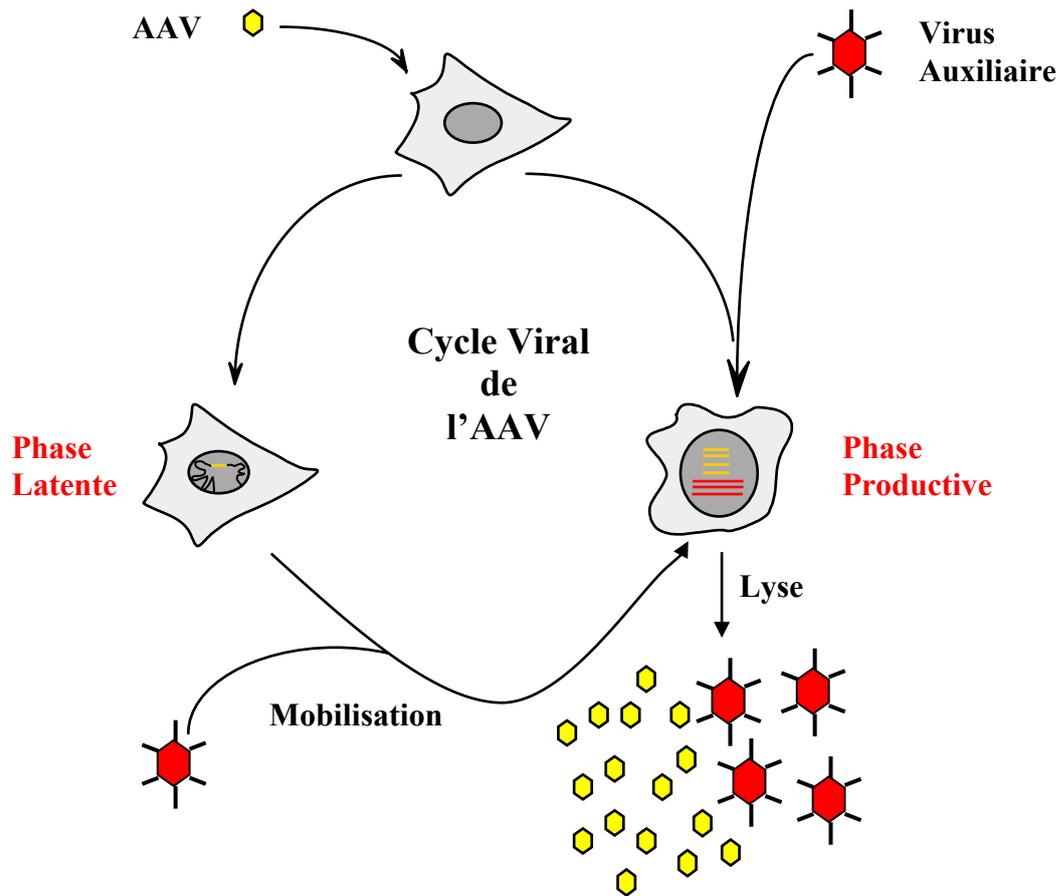


Figure 4 : Représentation schématique du cycle viral de l'AAV-2.

⇒ *En absence de virus auxiliaire*, l'infection de cellules par l'AAV-2 conduit à une **phase de latence** où les gènes *rep* et *cap* ne sont pas exprimés et s'intègrent dans le génome cellulaire.

⇒ *En présence d'un virus auxiliaire*, tel que l'adénovirus et l'herpès virus, la co-infection ou la mobilisation de l'AAV-2 constitue la **phase productive** du cycle viral où les gènes de l'AAV s'expriment, se répliquent et s'encapsident dans le noyau de la cellule. Les particules virales néo-synthétisées sont relarguées au moment de la lyse cellulaire provoquée par le virus auxiliaire.

Ce site RBS juxtapose une autre séquence consensus indispensable pour initier la transcription: la boîte TATA. La proximité des deux séquences expliquerait le rôle des protéines Rep dans la répression de la transcription. En effet, leur fixation sur la séquence RBS pourrait par encombrement stérique, empêcher la fixation du facteur de transcription TFIID et/ou de la TBP pour «*TATA Binding Protein*» sur la boîte TATA, d'où une répression de l'expression du promoteur p5.

De plus, le facteur cellulaire YY1 se fixe au niveau du promoteur p5 en position -60 et +1 par rapport au site d'initiation. La fixation du facteur YY1 sur son site YY1 en position -60, a pour effet d'empêcher la fixation du facteur MLTF pour «*Major Late Transcription Factor*» et par conséquence, de réprimer le promoteur p5.

Par contre, la fixation du facteur YY1 sur le site en position +1 permet le recrutement et l'orientation de la RNA polymérase II, impliquée dans la transcription. En absence d'adénovirus, la fixation en position +1 conduit à une faible expression à partir du promoteur p5, alors responsable d'une production minimale de protéines Rep78/68 suffisante pour réprimer ce même promoteur. Il existe donc un équilibre fin entre YY1 et Rep78/68 à l'origine du contrôle précis du promoteur p5.

La production des protéines Rep de l'AAV est régulée positivement ou négativement et dépend de plusieurs facteurs, dont la nature de la cellule hôte et la présence ou l'absence de virus auxiliaire. Selon l'état de la cellule, les protéines Rep peuvent avoir des effets trans-répresseur ou trans-activateur sur les promoteurs de l'AAV.

Dans les cellules HeLa et 293, en absence de virus auxiliaire, Rep est régulée négativement (Beaton *et al.*, 1989) (Kyostio *et al.*, 1994), les promoteurs p5 et p19 sont réprimés par les protéines Rep. Pour le promoteur p40, la répression par les protéines Rep - toujours en l'absence de virus auxiliaire - a été décrit dans les cellules 293 (Tratschin *et al.*, 1986) (Trempe and Carter, 1988).

Lorsque les cellules 293 sont infectées par l'adénovirus, l'effet sur la production de Rep est plus complexe, l'infection permet d'activer la synthèse des protéines Rep essentielles pour la trans-activation du promoteur p40, alors que dans les cellules HeLa, les protéines Rep transactivent le p40 en présence ou en absence de l'adénovirus (Tratschin *et al.*, 1986).

Les protéines Rep sont multifonctionnelles et ont des fonctions particulières de modulation de la transcription des AAV (McCarty *et al.*, 1991) et de promoteurs hétérologues (Horer *et al.*, 1995). Les protéines majeures Rep78 et Rep68 agissent sur le promoteur p5 dans l'intégration site-spécifique dans le génome humain (Weitzman *et al.*, 1994). Ces protéines forment sans doute des multimères et par leur extrémité N-terminale se lient aux séquences ITR. C'est au niveau des 200 premiers acides aminés du domaine N-terminal de Rep que sont localisés le site de liaison à l'ADN et les activités endonucléase et hélicase dépendantes de l'ATP (Im and Muzyczka, 1989) (Im and Muzyczka, 1990) (Owens *et al.*, 1993) (Chiorini *et al.*, 1994) (Davis *et al.*, 2000). La protéine Rep68 se lie de façon covalente et spécifique à l'extrémité 3' de l'ITR au niveau du site appelé «site de résolution terminale» (*trs*) du génome au moment de la réplication de l'ADN viral durant la réaction dite de «résolution terminale» (Im and Muzyczka, 1990) (Snyder *et al.*, 1990). Cette liaison à l'ADN et la réaction de résolution terminale, sont centrales à l'intégration préférentielle du génome de l'AAV au niveau du locus AAVS1. Des expériences de mutations ont permis de déterminer les acides aminés impliqués dans la liaison à l'ADN. En effet, la mutation de 3 acides aminés chargés (Arg-107, Lys-136, Arg-138) en N-terminal, conduit à la perte du site de liaison RBS (Hickman *et al.*, 2004).

Les protéines Rep52/40 sont impliquées dans la production de génomes simple brin et dans la modulation des promoteurs AAV (Chejanovsky and Carter, 1989) (Smith and Kotin, 1998) (Pereira *et al.*, 1997) et par conséquent modulent la synthèse des protéines Rep78 et Rep68. Elles sont aussi, par leur activité hélicase, impliquées dans l'encapsidation de ces génomes dans les particules virales préassemblées au niveau du nucléole (Dubielzig *et al.*, 1999) (King *et al.*, 2001).

Les séquences ITR bordant les extrémités du génome de l'AAV sont nécessaires en *cis* à la réplication et à l'encapsidation du génome viral dans les capsides préformées. Elles sont indispensables au cycle viral de l'AAV, c'est d'ailleurs à ce titre qu'elles apparaissent comme les séquences minimales nécessaires dans la génération des vecteurs AAV recombinants (Ni *et al.*, 1994) (Berns, 1996) (Xiao *et al.*, 1997). Ce sont de véritables origines de réplication de l'ADN viral par le biais d'interactions avec les protéines majeures Rep78 et rep68. Ces séquences interviennent aussi dans l'intégration de l'AAV, en l'absence de virus auxiliaire (Balagué *et al.*, 1997) (Nahreini *et al.*, 1992) (Samulski, 1993) (Yang *et al.*, 1997), et

sont indispensables à la mobilisation (ou « rescue ») de la séquence intégrée dans le génome cellulaire en présence de virus auxiliaire (Gottlieb and Muzyczka, 1988) (Hong *et al.*, 1992) (Samulski *et al.*, 1982) (Samulski *et al.*, 1983) (Wang *et al.*, 1995) (Wang *et al.*, 1996) (Young and Samulski, 2001).

Le site minimal RBE pour « *Rep binding element* », motif répété : (GAGC)₃, localisé dans le palindrome A de l'ITR, est aussi retrouvé dans le chromosome 19 correspondant au site préférentiel d'intégration de l'AAV sauvage (AAVS1) et dans le promoteur p5 de l'AAV. Cette séquence RBS est aussi présente dans certains promoteurs viraux et cellulaires (Batchu *et al.*, 1994) (Horer *et al.*, 1995) (Kokorina *et al.*, 1998) (Kyostio *et al.*, 1994) (McCarty *et al.*, 1991) (Pereira *et al.*, 1997) (Weitzman *et al.*, 1994) (Wonderling and Owens, 1996) (Wonderling and Owens, 1997).

2- En phase répllicative.

Un élément déterminant dans le cycle viral de l'AAV est la nécessité d'un effet auxiliaire (ou « helper ») apporté par les différents virus auxiliaires ou également dans des conditions permissives particulières.

Les virus auxiliaires les plus traditionnellement considérés sont l'adénovirus et le virus herpès simplex.

2a- En présence de l'adénovirus.

Le promoteur p5 est transactivé par la protéine adénovirale E1A et par la protéine cellulaire YY1 (Lewis *et al.*, 1995) (Shi *et al.*, 1991). L'activation du promoteur p5 conduit à la production des protéines Rep78/68. Ces protéines transactivent à leur tour les autres promoteurs de l'AAV p19 et p40, conduisant à une production abondante des protéines Rep52/40 et des protéines de la capsid virale (Pereira *et al.*, 1997). Outre la protéine E1A, les éléments auxiliaires nécessaires à la répllication de l'AAV, sont les protéines E2A, le complexe E1B-E4 et les ARN VA (Ward *et al.*, 1998). C'est l'expression très précoce du gène E1A qui permet l'activation de l'expression des autres gènes de l'adénovirus nécessaires au cycle viral de l'AAV.

Parmi les gènes de l'adénovirus, les transcrits précoces sont d'abord initiés, conduisant à la synthèse de la protéine E1B de 55 kDa et la protéine ORF6 de E4 de 34 kDa. Ces deux protéines forment un complexe dans la cellule infectée et contrôlent l'accumulation des ARNm de l'adénovirus et de l'AAV dans le cytoplasme. L'expression du gène E2A conduit à la synthèse de la protéine DBP pour «*DNA Binding Protein*» de 72 kDa, qui est une protéine multifonctionnelle présente au niveau des centres réplcatifs lors de l'infection adénovirale. La protéine DBP régule la traduction des protéines de l'AAV et stimule la transcription en agissant sur le promoteur p5. Quant aux ARN-VA, ils sont nécessaires à la traduction efficace des ARNm de l'adénovirus et de l'AAV (Janik *et al.*, 1981) (Janik *et al.*, 1989).

2b- Dans le cas où le virus auxiliaire est un herpès virus.

Les gènes nécessaires à l'AAV ont des fonctions distinctes de ceux identifiés pour l'adénovirus. Bien que les premières expériences indiquent qu'HSV-1 était seulement capable d'induire la synthèse des protéines de l'AAV sans production détectable de particules AAV (Atchison, 1970) (Blacklow *et al.*, 1970). Plusieurs autres études montrent que des productions d'AAV-2, co-infectées avec de l'HSV-1 ou -2, donnent des titres d'AAV similaires à ceux obtenus après une infection adénovirale (Buller *et al.*, 1981) (Handa and Carter, 1979). Sept cadres ouverts de lecture codant pour des facteurs essentiels de l'HSV-1 ont été identifiés comme indispensables *in vitro*, à la formation du complexe hélicase-primase. Ce complexe hélicase-primase, nécessaire à la formation des centres réplcatifs de l'AAV, est constitué des protéines UL5, UL8, UL52, également du groupe UL30/42 (ADN polymérase et protéine accessoire) et UL9 (protéine d'origine de liaison). Les protéines Rep co-localisent au niveau des centres actifs de la réplcation avec la protéine herpétique ICP8 codée par UL29. *In vitro*, la protéine ICP8 est une protéine cruciale de l'herpès, elle est assimilée fonctionnellement à la protéine DBP de l'adénovirus (Lehman and Boehmer, 1999) (Stracker *et al.*, 2004).

Certains aspects des fonctions auxiliaires restent confus. Ainsi, des travaux ont montré que les fonctions enzymatiques du complexe hélicase-primase (UL5/UL8/UL52) ne seraient pas strictement requises pour la réplcation du génome de l'AAV-2 mais plutôt pour orienter la localisation nucléaire correcte de la protéine ICP8 (DBP) dans les centres de réplcation de l'AAV-2 (Stracker *et al.*, 2004). En effet, comme il avait été initialement décrit par Lukonis *et al.*, en l'absence d'un seul des trois gènes du complexe (UL5/UL8/UL52), la protéine ICP8

reste dispersée dans le nucléoplasme (Lukonis and Weller, 1997). De même, le rôle spécifique de l'ADN polymérase d'HSV-1 dans le cycle viral de l'AAV n'est pas encore totalement défini. Pour aborder cette question, des études réalisées avec des mutants dépourvus de l'ADN polymérase de l'herpès ou en présence d'un inhibiteur de cette enzyme (l'acide phosphono-acétique) démontrent que sa fonction dans le cycle viral de l'AAV n'est pas obligatoire (Handa and Carter, 1979) (Weindler and Heilbronn, 1991) (Toublanc *et al.*, 2004). Plus tard, il a été montré que le complexe UL30/42 de l'HSV-1 formé par l'ADN polymérase et la protéine UL29 permettent la réplication *in vitro* de l'AAV.

Il reste à définir quels sont les facteurs d'HSV-1 impliqués dans l'expression des gènes de l'AAV. Une étude récente a montré que la protéine ICPO d'HSV-1 est capable d'activer l'expression des gènes rep à partir du génome sous forme latente, intégrée (Geoffroy *et al.*, 2004). Dans cette configuration, le génome AAV était transcriptionnellement silencieux et la synthèse des protéines Rep était activée par ICPO sans qu'il y ait réplication de l'AAV.

Il apparaît donc que parmi les facteurs d'HSV-1 contribuant au cycle viral de l'AAV-2, aucun d'entre eux ne posséderait l'activité transactivatrice équivalente à celle des protéines E1A de l'adénovirus.

Des protéines cellulaires interviennent dans la réplication de l'ADN de l'AAV, la protéine RPA pour «*replication protein A*», les ADN polymérases δ et ϵ , la protéine topoisomérase II, la PCNA pour «*proliferating cell nuclear antigen*» et la RFC pour «*replication factor C*», elles sont localisées dans les centres réplcatifs (Ni *et al.*, 1998).

2c - Les mécanismes de la réplication.

Le mécanisme de réplication est propre aux parvovirus et dérivé du modèle de réplication par cercle roulant des bactériophages.

Trois facteurs clefs contrôlent l'expression des gènes de l'AAV: les protéines Rep78 et Rep68, la protéine E1A de l'adénovirus et la protéine cellulaire YY1 (Chang *et al.*, 1989) (Berns, 1996).

La réplication de l'ADN de l'AAV met en jeu différents acteurs. Tout d'abord les protéines Rep78/68 qui se fixent au niveau de leur site spécifique RBS pour «*Rep Binding Site*». Elles sont nécessaires au repliement des séquences inversées répétées, voir figure 5 p28 **(1)**. C'est l'étape qui initie la réplication de l'AAV, où les molécules d'ADN simple brin

(ssDNA) sont converties en molécules d'ADN double brin (dsDNA) transcriptionnellement actives. Au niveau du repliement de l'ITR, la structure en épingle à cheveux laisse l'extrémité 3'OH libre, elle sert d'amorce pour initier la synthèse de l'ADN dans le sens 5' vers 3', au moyen d'une ADN polymérase cellulaire (2).

Une forme répliquative dimérique est obtenue, présentant une extrémité correspond à une ITR complète fermée (3). A ce stade deux orientations sont possibles.

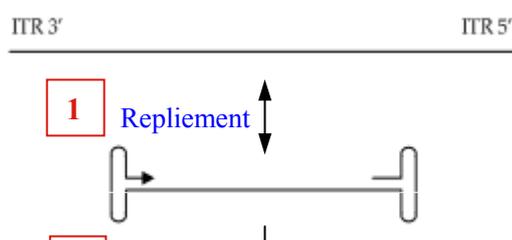
Premièrement, la coupure a lieu sur le brin parental (en trait plein) opposé à la position initiale d'amorce 3'OH, au niveau du site de résolution (*trs*). De sorte qu'une nouvelle amorce 3'OH est créée, permettant la reconstitution de l'extrémité, ce mécanisme porte le nom de résolution terminale au cours duquel il y a inversion des ITR (4). Puis, la séquence terminale répétée est dénaturée grâce à l'activité hélicase des protéines Rep (6), les séquences palindromiques peuvent alors à nouveau adopter une structure en «*hairpin*». Finalement, les nouvelles amorces issues de l'«*hairpin*» servent à déplacer la synthèse vers une nouvelle molécule d'ADN répliquée (7) appelée RF pour «*Replicative Form*». Le déplacement du brin non répliqué conduit à une molécule d'ADN simple brin pouvant être encapsidée ultérieurement. Cette voie génère deux génomes AAV complets.

L'autre orientation possible correspond à une absence de clivage au niveau du *trs* (5), des formes dimères peuvent apparaître, et aussi des concatémères de plus grandes tailles.

L'étape de résolution terminale nécessite la fixation des protéines Rep au niveau du site RBS, et la présence du site *trs* (Snyder *et al.*, 1993).

Des travaux ont montré que les protéines Rep interagissent sous la forme de dimères ou de complexes multimériques (Zhou *et al.*, 1999) (Hickman *et al.*, 2004). Elles peuvent se fixer sur une autre séquence localisée dans la structure en épingle à cheveux formée par l'ITR appelée RBS'. Il a été montré que cette séquence RBS' est toujours positionnée de la même façon vis à vis du *trs*.

La fixation des protéines Rep78/68, au niveau du site RBS et l'interaction avec le RBS', entraîne l'extrusion de la structure en épingle à cheveux contenant le *trs*, par une activité hélicase et une hydrolyse de l'ATP des protéines Rep78/68. Les protéines Rep, par leur activité hélicase, déroulent la structure secondaire de l'ITR en une structure linéaire, amorce possible pour une synthèse complète d'ADN sur le brin complémentaire (6). Ceci aboutit à une molécule d'ADN double brin.



La réinitiation d'un cycle de réplication a lieu après déplacement d'une molécule d'ADN simple brin (nouvellement synthétisée), puis par repliement de l'ITR en épingle à cheveux (7) et à la synthèse d'un nouveau brin d'ADN (8).

Un cycle de réplication produit un dimère, substrat résultant de la réplication et transcriptionnellement actif (8) et une molécule d'ADN simple brin qui peut être encapsidée dans les capsides pré-assemblées (9).

En résumé, pour qu'il y ait réplication de l'AAV, il faut que le génome ADN simple brin flanqué des ITR, soit coupé au niveau du site spécifique *trs* par une protéine Rep ATP dépendante. Brister et al., ont déterminé une séquence minimale de 7 bases 3'-CCGGT/TG-5', qui est présente seulement sur le brin coupé et est indispensable pour que la coupure, par les protéines Rep, ait lieu (Brister and Muzyczka, 1999). Ils ont, aussi, identifié une structure potentielle boucle-queue au niveau du *trs*, ATP dépendante, correspondant à une activité hélicase de Rep.

Par ailleurs, les protéines Rep78 et 68 fixées au site RBS de l'ITR, agissent sur les promoteurs p5, p19 et p40 par une transactivation *en cis*. Ceci n'est possible que si l'ADN se replie afin de se rapprocher et d'interagir sur les promoteurs p19 et p40. Des facteurs cellulaires tels que, les protéines HMG1 pour «*High Mobility Group I*» forment des complexes avec les protéines Rep de l'AAV. La protéine HMG1 est une protéine non-histone associée à la chromatine qui interagit avec la protéine Rep en favorisant la formation du complexe « Rep-ADN », elle stimule l'activité de coupure spécifique du brin d'ADN et d'hydrolyse de l'ATP de la protéine Rep. Cette protéine HMG1 agirait en favorisant la courbure de l'ADN (Costello *et al.*, 1997).

Les protéines mineures Rep52 et Rep40, par leur activité hélicase et ATPase, sont impliquées dans l'encapsidation des génomes simple brin dans les particules virales vides pré-assemblées (Dubielzig *et al.*, 1999) (King *et al.*, 2001). Des expériences de protection à la DNase ont conduit à établir un modèle, dans lequel des complexes hélicases agissent en mobilisant les capsides de sorte que l'ADN simple brin s'encapside dans les particules à l'image d'un système de pompage. En l'absence de virus auxiliaire, le contrôle des promoteurs p5 et p19 s'exerce par une répression des protéines Rep52/40 (Horer *et al.*, 1995) (Kyostio *et al.*, 1994). A l'inverse, en présence d'adénovirus, ces protéines transactivent le promoteur p5 (Pereira *et al.*, 1997). Le mode d'action des protéines Rep52/40 est différent des protéines

majeures Rep78/68 car elles ne possèdent pas de site de liaison à l'ADN. En effet, La protéine Rep52 empêche la répression exercée par les protéines Rep78/68 sur le promoteur p5 en formant un complexe Rep78/68-Rep52 (Pereira and Muzyczka, 1997).

Parallèlement les protéines Cap VP1, VP2, VP3 sont synthétisées et assemblées dans le nucléole, aboutissant à la formation de capsides vides. Ces capsides migrent ensuite dans le nucléoplasme où l'ADN néosynthétisé est alors encapsidé pour former des particules matures. Au cours de la réplication, des particules immatures ou défectives, c'est-à-dire des particules pouvant contenir un génome incomplet ou être vides, sont également produites. Elles sont en excès par rapport aux particules matures (Grimm *et al.*, 1999).

Les formes RF sont accumulées pendant la synthèse des protéines Rep et Cap. A ce moment, l'ADN simple brin s'accumule en grande quantité mais ne parvient à son maximum qu'après que les formes RF et les protéines Rep et Cap aient atteint leur maximum de synthèse.

Au delà du contrôle de l'expression des promoteurs de l'AAV, d'autres fonctions sont attribuées aux protéines Rep. Ainsi, elles peuvent réguler l'expression de promoteurs hétérologues cellulaires ou viraux (Antoni *et al.*, 1991) (Hermonat *et al.*, 1984) (Hermonat, 1994) (Horer *et al.*, 1995) (Labow *et al.*, 1987) (Oelze *et al.*, 1994) (Rittner *et al.*, 1992), soit par interaction protéine-protéine avec des protéines cellulaires régulatrices ou virales (Di Pasquale and Stacey, 1998) (Hermonat *et al.*, 1998) (Weger *et al.*, 1999), soit directement par fixation à des séquences ADN, spécifiques de facteurs de transcription (Batchu *et al.*, 1994) (Chon *et al.*, 1999) (Oelze *et al.*, 1994) (Wonderling and Owens, 1996) (Zhan *et al.*, 1999).

L'expression des gènes de l'AAV est réprimée de façon active par les quelques protéines majeures (Rep78 et Rep68) produites pendant l'infection. Si pendant cette phase de latence virale survient une surinfection des cellules *in vitro* ou *in vivo* par un virus auxiliaire, il y a activation de l'expression des gènes de l'AAV et mobilisation de son génome à partir de sa forme intégrée par amplification du génome de l'AAV. Cela correspond à un cycle répliatif complet identique à la phase virale productive (figure 7, page suivante).

Il y a production d'un stock viral contenant un mélange d'AAV et de virus auxiliaire. Ce schéma résume les principales étapes de la phase répliatif du cycle viral de l'AAV de type-2 (sachant qu'il reste le mieux étudié) quand le virus auxiliaire est un adénovirus. Les fonctions adénovirales nécessaires sont représentées et leur niveau d'action est indiqué par des flèches bleues.

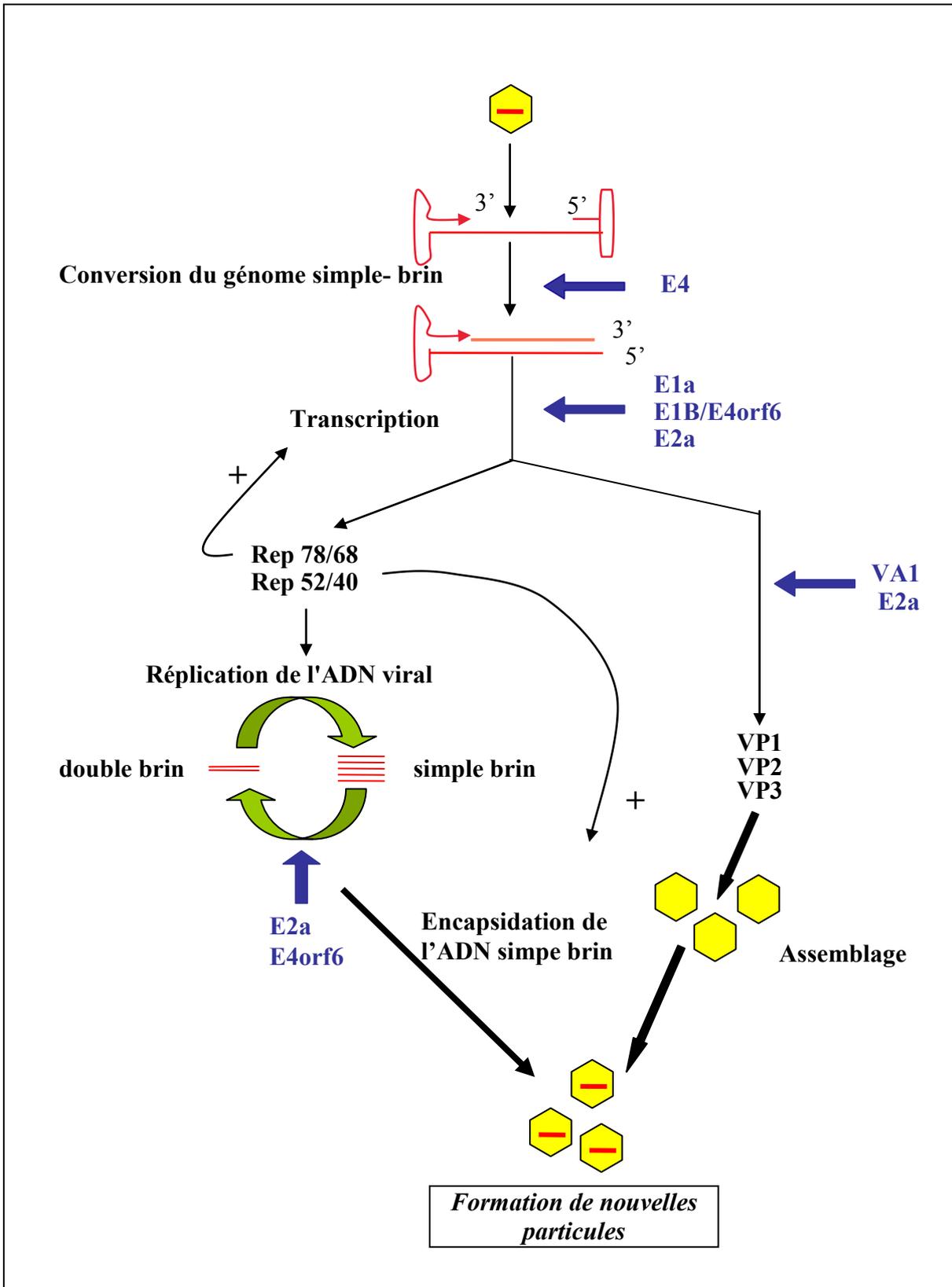


Figure 7 : Phase répliquative du cycle viral de l'AAV-2 en présence d'un virus auxiliaire: l'adénovirus (adapté de Salvetti et al., 1999).

Le schéma détaille les événements cellulaires de la phase productive. Cette phase répliquative se déroule dans le noyau et nécessite la présence de facteurs auxiliaires (l'intervention des protéines adénovirales sont représentées par des flèches bleues).

3- Les différences pour les autres sérotypes.

Jusqu'à ce jour, le sérotype -5 est celui qui diffère le plus de l'AAV-2 et des autres sérotypes -1 à -11 que ce soit au niveau des nucléotides ou au niveau des acides aminés. L'homologie des séquences *rep* de l'AAV-2 avec l'AAV-5 est de 67% et de 60% avec la séquence *cap* (Chiorini *et al.*, 1999b). Cependant, la taille et l'organisation génétique du génome ADN simple brin de l'AAV-5 est similaire à l'AAV-2 et cette organisation peut être étendue à l'ensemble des sérotypes. La comparaison avec les autres sérotypes isolés montre que des différences sont observées principalement au niveau des protéines Rep et des séquences ITRs uniques (cf figure 5 p22). Le sérotype-5 reste à part pour la réplication de son génome. De sorte qu'il n'est pas possible que les protéines Rep de l'AAV-2 puissent se fixer aux ITR de l'AAV-5, permettre une mobilisation et une enfin la réplication du génome du sérotype 5 car, l'ITR de l'AAV-5 n'a une homologie de séquence que de 56% avec l'ITR de l'AAV-2 (Chiorini *et al.*, 1999a). Au contraire, pour les autres sérotypes -1, -2, -3, -4, -6, -7, -8, -9 et -10, les protéines Rep et les ITR sont interchangeables et peuvent être utilisées pour produire des AAV recombinants des différents sérotypes cités.

Les ITR servent d'origine de réplication à l'ADN viral. A l'intérieur des ITR, deux éléments ont été décrits comme centraux pour la réplication, le motif répété GAGC et le *trs*. Des différences dans les ITR ont été rapportées entre les différents sérotypes, mais la capacité à adopter une conformation en épingle à cheveux, la présence du site de fixation de Rep et le *trs*, sont conservés entre tous les sérotypes.

Entre les promoteurs p5 de l'AAV-2 et p7 de l'AAV-5, des similitudes ont été trouvées (Qiu *et al.*, 2002). Par contre, la séquence consensus du site de résolution terminale est absente. Les éléments de transcriptions principaux tels que la TATA box et les sites de liaisons de Rep et de MLTF (pour «*major late transcript factor*») sont conservés. En revanche, les sites YY1 positionnés en +1 et - 60 par rapport au début de la transcription n'ont pas été retrouvés pour l'AAV-5. Cette dernière observation suggère que l'expression des gènes de l'AAV-5 est régulée différemment de celle de l'AAV-2. En effet, les ARN générés à partir des promoteurs p7 et p19 de l'AAV-5 sont majoritairement polyadénylés et ne sont pas épissés de sorte que seules les protéines Rep78 et Rep52 sont synthétisées (Qiu *et al.*, 2004).

La séquence CARE (pour «*Cis Acting Replication Element*») au niveau du p5 du génome de l'AAV-2 n'est pas retrouvé dans le génome de l'AAV-5 (Nony *et al.*, 2001). Cette séquence a été caractérisée pour être capable de permettre la réplication du génome AAV en absence d'ITR. La séquence CARE est également impliquée dans les phénomènes d'amplification du génome *rep-cap* (sans les ITR) intégré de façon stable dans des lignées d'encapsidation (Nony *et al.*, 2003) (Liu *et al.*, 1999).

Les séquences du promoteur p19 et son organisation sont conservées de même que la présence et la position relative de fixation des facteurs de transcription au niveau du promoteur p40, appelé p41 pour l'AAV-5. Seuls quelques décalages d'alignements apparaissent avec les séquences des autres sérotypes (Chiorini *et al.*, 1999b).

B. Les étapes de l'infection de l'AAV dans la cellule.

Les particules virales de chaque sérotype AAV ont des propriétés distinctes incluant un profil de transduction et de biodistribution tissulaire différent.

Les principales étapes de l'infection sont 1) la liaison à la membrane par attachement à un ou des motifs (récepteurs,...) 2) l'étape d'endocytose 3) le transport vésiculaire et échappement du compartiment endosomal 4) l'import nucléaire 5) le désassemblage de la capsid 6) la conversion de l'ADN simple brin en double brin.

1- Liaison à la membrane cellulaire.

L'efficacité d'infection de la cellule hôte par l'AAV est déterminée en partie par l'étape de liaison à la membrane cellulaire. Cette étape implique des récepteurs ou motifs spécifiques cellulaires.

Lors d'une infection virale, la première étape est l'attachement à la membrane cellulaire. Une large variété de molécules présentes à la surface cellulaire est connue pour servir de récepteurs d'attachement viraux. Ces récepteurs sont classés dans la superfamille des récepteurs les plus ubiquitaires qui possèdent une partie glycosylée exposée à la surface de la membrane.

Les protéoglycanes sont des protéines dont une partie de leur séquence est constituée de résidus polysaccharides glyco-aminoglycans, chacun composé d'unité répétée de disaccharides. Ces résidus sont associés à la fois à la matrice extracellulaire et à la membrane plasmique (Hileman *et al.*, 1998). Des travaux ont montré que la présence des protéoglycanes héparan sulfate (HSPG) est directement corrélée à une infection efficace des cellules par les AAV-2. Cette protéine membranaire a été identifiée comme le récepteur primaire pour l'AAV-2 (Summerford and Samulski, 1998). Cependant la corrélation entre la quantité de récepteurs héparan sulfate à la surface des cellules et la sensibilité des cellules à l'infection par l'AAV-2 reste discutée (Qiu and Brown, 1999). La présence de groupes héparan sulfate à la surface et aussi dans la matrice extracellulaire de nombreuses cellules, explique le tropisme assez large de l'AAV-2. L'héparan sulfate apparaît comme le motif d'attachement principal de l'AAV-2 mais de faible affinité. Un traitement préalable des cellules avec des enzymes digérant les groupements héparans sulfates ou la compétition avec de l'héparine n'empêche pas totalement la liaison de l'AAV-2 à la cellule ciblée. De plus, des lignées cellulaires CHO dépourvues de groupes héparan sulfate apparaissent très faiblement permissives à l'AAV-2 (Summerford and Samulski, 1998).

Des études de mutagenèses et de cristallographie de la structure ont permis d'identifier les acides aminés (les résidus arginine en position 585 et 588) de la capsid de l'AAV-2 responsables de la liaison à l'héparine (Opie *et al.*, 2003) (Zhang *et al.*, 2002) (Xie *et al.*, 2004) et plus précisément que le changement d'un seul acide aminé peut influencer la liaison à l'héparine (Wu *et al.*, 2006a).

L'attachement de l'AAV-2 à la cellule hôte semble être régi par un mécanisme en deux étapes. Dans un premier temps, l'AAV-2 s'attache à la membrane cellulaire à un récepteur primaire: les protéoglycanes héparan sulfate puis, intervient un co-récepteur qui peut être la sous-unité $\beta 5$ de l'intégrine $\alpha V\beta 5$ ou le FGFR1 pour «*human fibroblast growth factor receptor 1*» (Sanlioglu *et al.*, 2000) (Qing *et al.*, 1999). Summerford *et al.*, ont montré que l'intégrine $\alpha V\beta 5$ joue un rôle dans l'infection efficace de l'AAV-2 non pas en tant que récepteur primaire d'attachement à la cellule mais plutôt pour faciliter l'internalisation du virus dans la cellule (Summerford *et al.*, 1999). Cette intégrine $\alpha V\beta 5$ est également impliquée dans l'internalisation de l'adénovirus et l'on connaît la dépendance de l'AAV2 à l'adénovirus...

La nécessité de ces deux co-récepteurs permettrait en partie sans doute d'expliquer pourquoi des types cellulaires exprimant à leur surface membranaire le motif héparan sulfate

sont transduits différemment par l'AAV-2. Un autre co-récepteur de l'AAV-2 a récemment été mis en évidence, le HGFR pour « *hepatocyte growth factor receptor* » (Kashiwakura *et al.*, 2005). Ce récepteur HGF, c-Met est composé d'une chaîne α de 50 kDa, liée par un pont disulfure à une sous-unité β de 145 kDa, formant un complexe de 190 kDa (Nakamura *et al.*, 1989) (Bottaro *et al.*, 1991). Comme avec le motif HSPG, HGF lie des molécules « héparine-like » à la surface des hépatocytes et l'héparine soluble dans le sérum.

Enfin, encore plus récemment, il a été montré que l'AAV-2 peut également utiliser l' $\alpha 5\beta 1$ comme co-récepteur alternatif dans les cellules 293 qui n'ont pas le co-récepteur $\alpha V\beta 5$. Les cellules 293 sont connues pour être déficientes en co-récepteur $\alpha V\beta 3/\beta 5$ mais elles possèdent le récepteur $\alpha V/\alpha 5V\beta 1$, une intégrine alternative (Asokan *et al.*, 2006). Cependant, les anticorps monoclonaux dirigés contre l' $\alpha V\beta 5$ et non contre l' $\alpha 5\beta 1$ sont capables d'inhiber la transduction de lignées cellulaires par l'AAV-2.

L'implication des co-récepteurs $\alpha V\beta 5$ et hFGFR1 dans l'internalisation de l'AAV-2 reste discutée. Le même groupe qui réfute le rôle de l'héparan sulfate comme récepteur primaire remet également en cause le rôle des co-récepteurs $\alpha V\beta 5$ et hFGFR1 (Qiu and Brown, 1999). Ces auteurs ont montré que l'AAV-2 n'était pas capable de se lier aux chaînes αV ou $\beta 5$ dénaturées de l'intégrine. L'hypothèse de l'implication du co-récepteur $\alpha V\beta 5$ s'appuie sur des expériences d'affinité entre l'intégrine $\alpha V\beta 5$ et l'adénovirus. Elles montrent clairement que le co-récepteur $\alpha V\beta 5$ intervient dans l'internalisation mais aussi dans la perméabilisation membranaire plutôt que dans l'attachement de l'adénovirus au même titre que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ ceci par l'intermédiaire d'un résidu RGD situé à la base du penton de l'adénovirus (Wickham *et al.*, 1993). L'absence de ce motif RGD au niveau de la capsid de l'AAV-2 (Ruffing *et al.*, 1994) est une donnée supplémentaire qu'avance l'équipe de Qiu *et al.*, pour contredire l'implication de l'intégrine $\alpha V\beta 5$ (Qiu and Brown, 1999). Des expériences de compétitions par une intégrine $\alpha V\beta 5$ purifiée soluble, même à forte concentration, ou par un peptide RGD incubé avec des cellules HeLa ou CHO n'inhibent pas la transduction par l'AAV-2. A l'inverse, dans une deuxième expérience, Summerford *et al.*, ont montré une diminution de la transduction à l'aide d'un AAV-LacZ (Summerford and Samulski, 1998). En résumé, l'AAV-2 doit agir directement avec la sous-unité $\beta 5$ de l'intégrine à la surface de la cellule par une voie RDG indépendante.

1a- Selon le sérotype AAV, des récepteurs spécifiques ont été mis en évidence.

L'AAV-2 et l'AAV-3 sont proches au niveau de leur séquence. L'AAV-3 semble s'attacher à la cellule de la même façon que le sérotype-2, i.e. par attachement aux récepteurs HSPG ou facteur de croissance des fibroblastes (Summerford and Samulski, 1998) (Handa *et al.*, 2000) (Blackburn *et al.*, 2006). L'AAV-3, comme l'AAV-2, se fixe sur des colonnes d'héparine, mais leur profil d'élution est quelque peu différent. Ce qui suggère une différence d'affinité de liaison pour le récepteur héparan sulfate entre ces deux sérotypes (Rabinowitz *et al.*, 2002).

Par contre, il n'a pas été identifié de récepteur spécifique pour l'AAV-1 alors que l'homologie de sa séquence protéique avec l'AAV-2 et -3 est forte (83%). Ainsi l'AAV-1 ne lie pas le motif héparan sulfate (Rabinowitz *et al.*, 2002). Cependant, l'AAV-1 et les sérotypes-4, -5, -6 s'attachent à des motifs acides sialiques aux caractéristiques différentes mais présents en abondance à la surface cellulaire.

Par contre, les AAV-4 et -5 sont éloignés de l'AAV-2 et n'ont une homologie de leur séquence protéique que de 55%. Ils ne se lient pas au récepteur héparan sulfate mais à des récepteurs acides sialiques par des liaisons α -2,3 O-acides sialiques pour l'AAV-4 et α -2,3 et α -2,6 N-acides sialiques pour l'AAV-5 (Kaludov *et al.*, 2001) (Walters *et al.*, 2001).

Un récepteur spécifique du sérotype-5 a été identifié par l'équipe de J.A.Chiorini, le récepteur PDGFR pour «*platelet-derived growth factor receptor*» (Pasquale *et al.*, 2003). Il existe des récepteurs PDGFR- α et - β , tous deux appartenant au sous-groupe des récepteurs tyrosine kinase. Ces récepteurs comprennent : (i) une partie extra-cellulaire se liant au ligand ; (ii) un domaine transmembranaire ; (iii) une région à activité kinase intra-cellulaire (Yarden and Ullrich, 1988) (Williams, 1989). Ce récepteur a été mis en évidence après analyse de 45 lignées cellulaires permissives ou non à la transduction par l'AAV-5. L'étude des profils d'expression des gènes montre une corrélation entre l'expression du PDGFR et la transduction par l'AAV-5. Le tropisme de l'AAV-5 est donc corrélé au profil d'expression du récepteur PDGFR- α . Parmi le panel de lignées cellulaires analysées, 100% des cellules qui sont permissives à l'AAV-5 expriment au moins l'un des deux récepteurs PDGFR- α ou PDGFR- β (Pasquale *et al.*, 2003). Ces mêmes auteurs ont observé que la présence du récepteur PDGFR à la

surface des cellules du système nerveux central, des yeux, du poumon est corrélée à l'efficacité de transduction de ces tissus par l'AAV-5.

Le sérotype -6, hybride naturel de l'AAV-1 et de l'AAV-2 (Xiao *et al.*, 1999) a des caractéristiques quasi identiques à celle de l'AAV-1 vis à vis du récepteur à l'héparan sulfate. Cependant, des expériences de compétitions avec de l'héparine soluble n'inhibent pas l'attachement de l'AAV-6 au pôle apical des cellules épithéliales respiratoires et ce contrairement à l'AAV-2. De même, l'AAV-6 n'entre pas en compétition avec l'AAV-2 au niveau de l'étape d'entrée. L'ensemble de ces observations indiquent que les capsides AAV-2 et AAV-6 se lient à des récepteurs différents (Halbert *et al.*, 2001). Dernièrement, il a été montré que l'AAV-1 et l'AAV-6 se lient aussi par des liaisons α -2,3 et α -2,6 N-acides sialiques (Wu *et al.*, 2006c).

Quant aux sérotypes-7 et -8, ils ont une homologie de 83% et 84% respectivement avec la séquence protéique du sérotype-1 excepté pour une région hyper variable suggérant qu'ils pourraient partager un récepteur commun (Gao *et al.*, 2002a). Récemment, un récepteur cellulaire spécifique de l'AAV-8 a été mis en évidence, le récepteur de la laminine de 37/67 kDa (LamR), il est important pour la liaison à la cellule et la transduction par l'AAV-8 *in vitro* et *in vivo* (Akache *et al.*, 2006). Ce récepteur jouerait aussi un rôle dans la transduction par trois autres sérotypes étroitement proches -2, -3 et -9. La surexpression de LamR à la surface de cellules NIH 3T3 conduit à une augmentation de la transduction de ces cellules par les vecteurs AAV-8, -2, -3 et -9. Et à l'inverse, l'utilisation dans des cellules NIH 3T3 d'ARNi dirigés contre LamR inhibe la transduction par les AAV-8, AAV-2, AAV-3 et AAV-9 (Akache *et al.*, 2006).

L'AAV-9, isolé par Gao *et al.* en 2004, présente une remarquable efficacité de transduction du myocarde (Pacak *et al.*, 2006) (Inagaki *et al.*, 2006). L'analyse de la biodistribution démontre un tropisme pour les tissus « extracardiaque » similaire des AAVr-8 et -9. Cependant, le récepteur cellulaire de l'AAV-9 reste encore inconnu. Malgré tout, son tropisme préférentiellement cardiaque a conduit à évaluer les ligands cardiaques qui se lient à l'AAV-9. Les travaux de Pacak *et al.*, suggèrent que les capsides AAV-9 sont incapables de se lier à un récepteur ubiquitaire comme les HSPG, car ce sérotype ne diffuse pas dans l'organisme après une injection intraveineuse, ce qui participe à renforcer la très forte affinité de l'AAV-9 pour le muscle cardiaque (Pacak *et al.*, 2006). Ils ont aussi montré que les capsides

pseudotypées AAVr-2/9 sont capables de passer avec succès au travers des parois vasculaires et de transduire les cardiomyocytes après administration intraveineuse d'un gène marqueur (Pacak *et al.*, 2006).

Les AAV-10 et 11 isolés à partir de singes *cynomolgus* partagent respectivement 84% et 65% des acides aminés de la capsidie avec ceux de l'AAV-2. L'analyse phylogénique des protéines de capsidie AAV a montré que les AAV-10 et AAV-11 ressemblent plus à, respectivement, l'AAV-8 et l'AAV-4 (Mori *et al.*, 2004). Pour l'instant, aucun récepteur spécifique ne leur a été attribué.

Les protéines de la capsidie de l'AAV-12, le dernier des sérotypes isolés, présentent des homologies de séquence avec l'AAV-11 (84%) et l'AAV-4 (78%). Ce que l'on peut dire pour le moment est qu'il n'utilise pas de récepteur héparan sulfate ni de liaison à l'acide sialique (Schmidt ASGT, 2006). Cette interaction virus-cellule propre à ce sérotype suggère que l'AAV-12 pourrait avoir un tropisme unique.

2 - Entrée dans la cellule.

Des expériences : (i) de marquage des particules sauvages de l'AAV-2 à des marqueurs fluorescents (anticorps conjugués au Cy-3, S³⁵) (Sanlioglu *et al.*, 2000) (Bartlett *et al.*, 2000) (Hansen *et al.*, 2001a), (ii) d'immuno-cytochimie avec un anticorps monoclonal A20 dirigé contre les particules pré-assemblées de l'AAV-2, (iii) des techniques de fragmentation subcellulaire ont permis de suivre l'entrée et le cheminement des particules virales à l'intérieur de la cellule jusqu'au noyau (Bartlett *et al.*, 2000) (Xiao *et al.*, 2002).

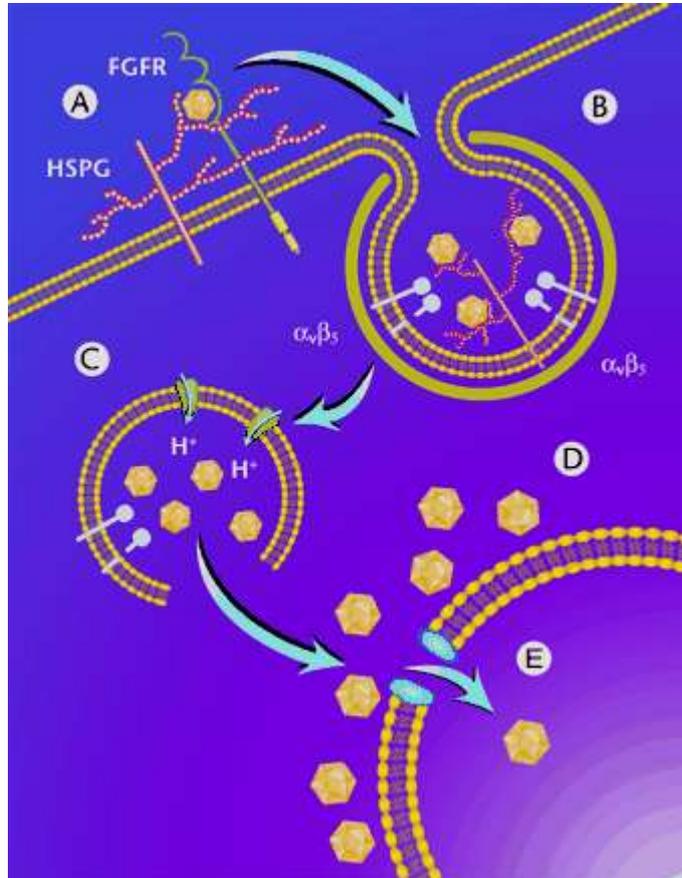


Figure 8 : Représentation schématique de l'entrée et du transport intracellulaire par endocytose de l'AAV-2 dans les cellules HeLa. (Bartlett et al., 2000)

Suite à la liaison avec les groupements héparan sulfate (A) et le co-récepteur FGFR, l'AAV est rapidement internalisé par formation de vésicules (B) recouvertes de clathrine impliquant le co-récepteur $\alpha_v \beta_5$ intégrine.

Une fois internalisé, le virus est dans un environnement acide (par acidification des endosomes) qui permet la pénétration à l'intérieur du cytosol (C). Après relargage des endosomes, la particule d'AAV est accumulée au niveau périnucléaire (D) et lentement pénètre au travers de la membrane nucléaire dans le noyau (E).

Le désassemblage de la capsid de l'AAV se déroulerait par des voies impliquant des Phosphatidyl Inositol 3 Kinase (PI 3K).

Pour les étapes initiales d'infection, il semblerait que comme pour l'adénovirus, l'internalisation de l'AAV-2 commence par la liaison à son récepteur puis l'entrée dans la cellule par endocytose suivi de la libération des particules vers les endosomes précoces (figure 8). Des analyses ultrastructurales de la membrane cellulaire montrent que l'internalisation a lieu par le biais de puits recouverts de clathrine (coated pits) dans des régions non spécifiques de la membrane cellulaire (Bartlett *et al.*, 2000). Les intégrines activeraient les endosomes dans lesquels la dynamine (protéine de 100 kDa cytosolique ayant une activité ATPasique) est impliquée en permettant le détachement de la vésicule néoformée de la membrane plasmique. Cependant, la fonction précise de cette dynamine dans la formation des vésicules reste controversée (Marks *et al.*, 2001) (Sever *et al.*, 2000). Par ailleurs, une voie dynamine-indépendante pourrait aussi être empruntée par les AAVr (Duan *et al.*, 1999). L'utilisation d'une voie d'entrée qui passe ou non par des clathrines serait variable d'une cellule à l'autre. La libération des particules virales du compartiment vésiculaire s'opère rapidement par acidification de ces vésicules. Cependant le mécanisme d'endocytose et les étapes ultérieures jusqu'au noyau restent encore mal déterminés.

Xiao *et al.*, ont pu évaluer que l'AAV-2 entre rapidement dans la cellule en absence d'adénovirus et s'échappe des endosomes précoces avec une demi-vie d'environ 10 min après infection de cellules HeLa par des AAV marqués au fluor 488. Les AAV s'accumulent autour du noyau et persistent au niveau périnucléaire entre 16 et 24 H. Par contre, en présence d'adénovirus, les particules intactes d'AAV sont rapidement transportées jusqu'au noyau dès 40 min après la co-infection. L'action de l'adénovirus suggère qu'une ou plusieurs protéines de la capsid adénovirale facilite(nt) le transport intra cellulaire alors que seules les endosomes ne semblent pas affectés par la présence des adénovirus (Xiao *et al.*, 2002).

L'AAV-5 s'internalise aussi via des puits recouverts de clathrine. Par contre, le transport se ferait plutôt à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Wu *et al.*, 2006b). Ce transport par l'appareil de Golgi n'apparaît que comme une étape transitoire avant l'entrée dans le noyau.

3- Trafic intracellulaire.

La figure 9 page suivante représente les étapes du trafic intracellulaire connues.

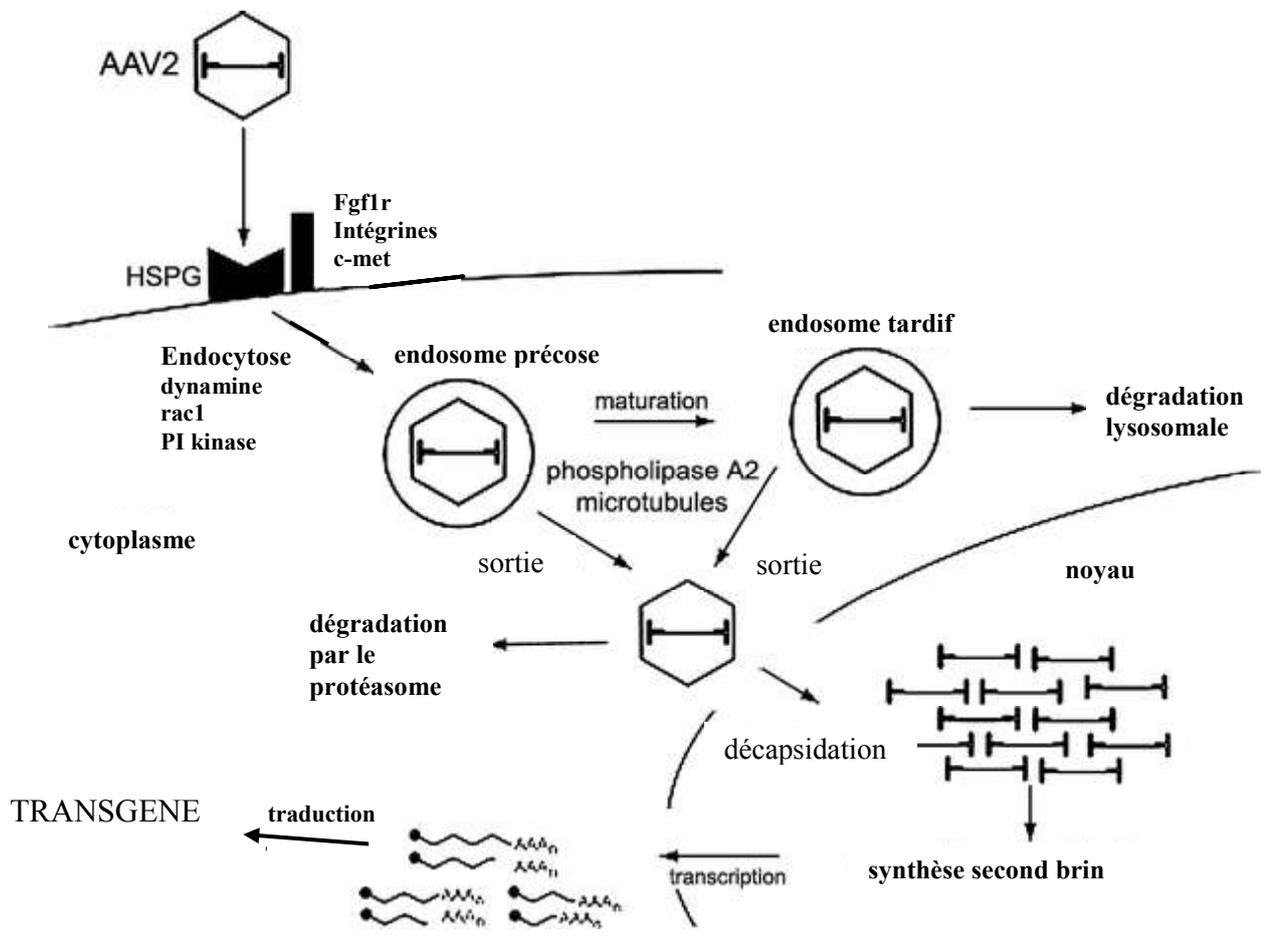


Figure 9 : Transport intracellulaire du vecteur AAV-2 d'après Warrington et al., 2006.

L'AAV-2 se lie au récepteur protéoglycan héparan sulfate à la surface de la cellule et s'internalise via 3 co-récepteurs potentiels (FGFR, intégrines et les récepteurs c-met). L'endocytose de l'AAV-2 est dépendant de la dynamine, de rac-1 et des activités PI kinase. Les particules AAVr sont dirigées dans les compartiments endosomaux précoce et tardif en utilisant une activité phospholipase A2, puis elles sont transportées vers le noyau par une voie microtubule dépendante. Une partie significative du vecteur de départ peut être dégradé par le protéasome ou par les protéases lysosomales. L'entrée du vecteur intact dans le noyau n'est pas encore claire : après désassemblage de la capsid, la synthèse du second brin à partir du génome viral fournit une matrice transcriptionnellement active menant à l'expression du transgène.

Cette représentation permet de faire le lien entre récepteur-entrée-traffic intracellulaire. Le trafic intracellulaire des AAV apparaît être similaire aux parvovirus autonomes pendant les 2 premières heures (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998) (Vihinen-Ranta *et al.*, 2000) (Parker and Parrish, 2000).

Les particules AAV semblent, en effet, avoir besoin d'une acidification des endosomes précoces. C'est ainsi que l'action d'inhibiteurs spécifiques de l'acidification des vésicules (par action sur les pompes à protons) comme la bafilomycine A₁ ou le chlorure d'ammonium diminuent le transport nucléaire et inhibent la transduction par les AAV (Bartlett *et al.*, 2000) (Douar *et al.*, 2001) (Hansen *et al.*, 2001a) (Nicklin *et al.*, 2001). D'autre part, des études d'inhibition par la bréfeldine A (inhibiteur de la transition entre les endosomes précoces et tardifs) montrent que le traitement par la bréfeldine A des cellules infectées par des vecteurs AAVr diminue l'efficacité du transfert de gène. A l'inverse, cette drogue n'a pas d'effet sur la transduction des adénovirus recombinants qui sont des particules passant dans le cytosol directement après les endosomes précoces.

Tous ces éléments indiquent qu'une grande proportion des particules d'AAV doivent transiter par les endosomes tardifs (Douar *et al.*, 2001). Cette observation est confirmée par une étude de fractionnement sur gradient de densité de vésicules cytoplasmiques (Hansen *et al.*, 2001b). Dans les deux premières heures qui suivent l'infection, les particules d'AAV semblent s'accumuler dans des endosomes denses, acides, appelés endosomes tardifs.

Par ailleurs, d'autres études suggèrent que les particules d'AAV peuvent être relarguées dans le cytoplasme tout de suite après les endosomes précoces. Ainsi, Bartlett *et al.*, ont montré que des drogues dirigées contre les lysosomes comme le chlorure d'ammonium (cette drogue augmente le pH intracellulaire des organelles dès son addition) inhibent la transduction des AAV seulement pendant les 30 premières min qui suivent l'infection (Bartlett *et al.*, 2000).

De plus, l'interaction des AAV avec l'intégrine $\alpha_V\beta_5$ conduit à l'activation de la protéine cellulaire Rac1 et le phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) qui sont nécessaires au transport des particules vers le noyau. Rac1 est une enzyme responsable d'une cascade de réarrangements du cytosquelette permettant le trafic intracellulaire des particules virales (figure 9 page précédente). Le traitement par le nocodazole et la cytochalasine B qui désorganisent les microtubules et les microfilaments réduit aussi l'accumulation de virus dans le noyau

(Seisenberger *et al.*, 2001). Des images de microscopie confocales montrent que la présence du co-récepteur intégrine β_5 permet l'internalisation des particules AAV-2 jusqu'au noyau (Summerford *et al.*, 1999). Summerford *et al.*, ont proposé un modèle d'entrée qui fait intervenir l'intégrine en tant que récepteur secondaire et/ou d'autres co-récepteurs pouvant intervenir pour permettre l'endocytose.

Selon le sérotype AAV, il semble donc que les mécanismes de transport intracellulaire, d'entrée dans le noyau et le désassemblage de la capsid soient différents (Ding *et al.*, 2005).

Le développement de l'imagerie notamment au travers d'une technique nouvelle appelée «*single virus tracing*» (SVT), a permis de visualiser avec une haute résolution spatiale et temporelle les virus individuellement dans une cellule en culture. Par cette technique, Seisenberger *et al.*, ont pu analyser plus en détail les étapes spécifiques de l'infection cellulaire. En accord avec le modèle d'infection de l'AAV-2 actuellement connu, la plupart des virions suivent une diffusion normale endosomale ou lysosomale. Contrairement aux conclusions établies par les techniques de microscopie conventionnelle, aucune accumulation nucléaire ni de pénétration lente de la membrane nucléaire n'a été observée par SVT. De plus, le temps total mis pour pénétrer la membrane cytoplasmique, le transport cytoplasmique et l'entrée nucléaire du virus était plus court que par les autres méthodes (Seisenberger *et al.*, 2001). En effet, il a été possible de détecter par SVT au moins un AAV-2 marqué au Cy5 dans le noyau de 50% des cellules et ceci 15 min après l'addition du virus aux cellules.

Le passage des particules par des endosomes tardifs reste encore une étape peu documentée. Toutefois, des mutants cellulaires déficients en endosomes associés aux petites guanosines triphosphatases (GT-Pases) ont permis de constater que les particules d'AAV pouvaient utiliser deux voies d'entrée différentes : soit par les endosomes précoces, soit par les endosomes tardifs (Sieczkarski and Whittaker, 2003).

Par ailleurs, deux groupes ont montré que l'action d'inhibiteurs du protéasome comme le MG-132 conduit à une augmentation de l'accumulation intracellulaire du génome viral sous forme d'ADN simple brin qui a le potentiel d'être transcriptionnellement actif une fois transformé en double brin (Duan *et al.*, 2000) (Douar *et al.*, 2001). Ces observations suggèrent que l'ubiquitination des AAVr interfère avec la transduction par une voie autre que celle du

compartiment endosomal. Toutefois, l'action des inhibiteurs du protéasome sur la transduction varie selon le type cellulaire. Il apparaît donc clairement qu'il existe des voies alternatives de transport. Hansen et al., ont montré que pour des cellules peu permissives à l'infection par l'AAV comme les NIH3T3, le virus s'accumule dans les endosomes précoces à l'inverse des cellules 293 qui elles, s'infectent bien (Hansen *et al.*, 2000) (Hansen *et al.*, 2001b). Le traitement par l'hydroxyurée (inhibiteur des ribonucléotides réductases) augmente l'accumulation des virions dans les endosomes tardifs par un mécanisme inconnu et accroît le transport des particules AAV vers le noyau. Par ailleurs, une partie des particules virales accumulées dans les endosomes précoces peut être relarguée avant l'acidification des endosomes et conduire à un défaut d'import nucléaire. Dans ce cas, les particules peuvent être séquestrées dans des lysosomes (Hansen *et al.*, 2001b) ou alors dégradées après ubiquitination dans la voie du protéasome (compartiment cellulaire de dégradation des protéines) (Duan *et al.*, 2000) (Douar *et al.*, 2001) (Yan *et al.*, 2002).

Toutes ces voies peuvent être assimilées à des « pièges » à particules virales et représentent des obstacles à la transduction des AAV.

1a- Transport intracellulaire de l'AAV-5.

L'étude du transport des particules virales dans un organe polarisé comme l'épithélium bronchique a permis de mettre en évidence des différences de transduction pour des AAV de sérotype différent. En effet l'AAV-2 transduit peu ou pas la surface apicale de l'épithélium de l'épithélium bronchique contrairement à l'AAV-5 (Zabner *et al.*, 2000). Si la liaison et l'endocytose de l'AAV-2 au niveau de la membrane apicale ne sont pas les facteurs limitants à la transduction de ces tissus polarisés, l'étape limitante correspond au processus d'endocytose et au transport du virus jusqu'au noyau (Duan *et al.*, 2000). Au niveau moléculaire, l'ubiquitination de la capsid virale apparaît comme un des principaux éléments responsables de l'inefficacité du transport de l'AAV-2 jusqu'au noyau et/ou dans un deuxième temps les événements nucléaires nécessaires à la conversion du génome viral pour son expression. Par ailleurs, l'ubiquitination des AAV-2 conduisant à la dégradation par le protéasome afin d'éliminer les AAV défectueux se produit de façon tissu-spécifique. De plus, Yan et al., montrent que les inhibiteurs de protéasome agissent différemment sur la transduction de l'épithélium bronchique par les AAV de sérotypes-2 et -5 (Yan *et al.*, 2002). L'AAV-5 s'accumule dans les compartiments de Golgi après endocytose, suggérant que les

sérotypes AAV peuvent utiliser des voies distinctes de transduction (Bantel-Schaal *et al.*, 2002).

Une seconde étude par la même équipe montre que des inhibiteurs tripeptidiques de protéasome (tel que LLnL) augmentent très fortement la transduction par les AAV-2 de la surface apicale de l'épithélium bronchique, à l'inverse ils n'agissent pas sur les AAV-5. Cette augmentation de la transduction par les inhibiteurs de protéasome n'est pas retrouvée à la face basolatérale de l'épithélium bronchique pour aucun des deux sérotypes. Ces résultats suggèrent que les AAV-2 et AAV-5 partagent un mécanisme de transport intracellulaire identique impliquant le système protéasome-ubiquitination mais ce mécanisme n'a pas de répercussion sur la synthèse du second brin d'ADN (Ding *et al.*, 2003).

Une étude récente a démontré que la biologie de la transduction de l'AAV-2 et l'AAV-5 différait significativement entre les épithéliums respiratoires polarisés humain et de souris. Ceci remet en question la pertinence d'utiliser la souris comme modèle pour les tests précliniques d'efficacité des différents sérotypes AAV, au moins pour cet organe (Yan *et al.*, 2006).

L'analyse du virus bovin adéno-associé (BAAV) récemment identifié montre qu'il présente un cadre ouvert de lecture codant pour les protéines Rep et des séquences ITR très similaires à ceux de l'AAV-5 et qu'il est le seul signalé comme pouvant trans-complémenter la réplication et l'encapsidation de l'AAV-5 (Schmidt *et al.*, 2004) (Schmidt and Chiorini, 2006). Des études de transduction ont montré que comme l'AAV-5, le virus BAAV se lie à la cellule par une liaison α 2-3 acide sialique et que sa transduction est acide sialique dépendante (Kaludov *et al.*, 2001) (Walters *et al.*, 2001). Cependant, contrairement à l'AAV-5 le prétraitement par des protéases comme la trypsine n'affecte pas l'attachement du BAAV à la cellule, il n'utilise donc pas de protéines pour sa liaison et son entrée dans la cellule. Ce virus BAAV diffère de l'AAV-5 au niveau de l'internalisation et de l'infection car l'utilisation d'inhibiteurs des gangliosides affecte sa transduction mais pas celle de l'AAV-5 (Schmidt and Chiorini, 2006).

1b- Transport intracellulaire de l'AAV-8 comparé à l'AAV-2.

Récemment, il a été montré que le sérotype-8 présente une cinétique d'entrée et de transport intracellulaire et nucléaire différents qui lui sont propres (figure 11) (Akache *et al.*, 2007).

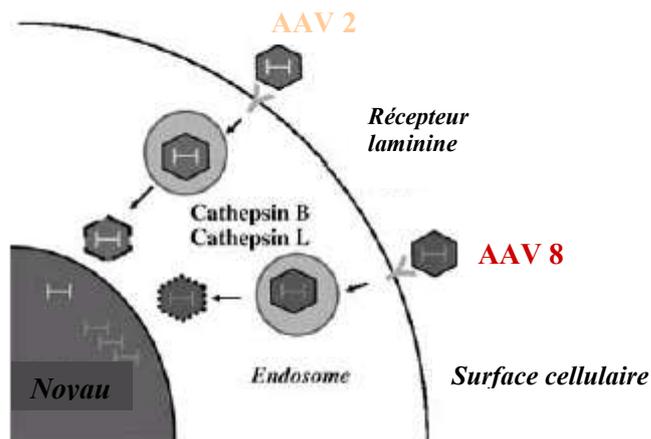


Figure 10 : Modèle de transduction intracellulaire par l'AAV-2 et l'AAV-8, d'après Akache et al., 2007.

Le récepteur laminine sert de récepteur cellulaire pour les deux sérotypes, leur permettant de se lier et d'entrer dans la cellule. Une fois la particule dans les endosomes, les cathépsines B et L lient et clivent les 2 capsides AAV. Toutefois des différences de cinétiques entre les deux sérotypes sont observées, en particulier le désassemblage plus rapide des particules AAV-8.

En dépit de l'intérêt grandissant pour ce sérotype peu d'éléments sur son mécanisme de transduction sont connus. La majeure partie des études entreprises pour connaître les étapes d'infection ont été menées avec l'AAV-2. Dans le noyau, la capsid de l'AAV est désassemblée pour libérer son génome et permettre sa transcription et sa réplication.

Comme nous l'avons vu précédemment dans le cas de l'AAV-2, cette procédure est lente et inefficace ce qui est sans doute un des facteurs majeurs limitant pour la transduction par les AAV-2 recombinants. A l'inverse, les virions d'AAV-8 sont beaucoup plus rapidement désassemblés, ce qui explique probablement leur très robuste efficacité de transduction (Thomas *et al.*, 2004).

Des études de digestion par les cathepsines B et L suggèrent que ces deux enzymes sont impliqués dans les traitements des AAV-2 et AAV-8 dans les différents endosomes et qu'elles peuvent amorcer le désassemblage nucléaire des capsides virales ; étape préalable à l'expression du transgène (Akache *et al.*, 2007). En effet, les cathepsines sont des protéases endosomales antérieurement montrées comme impliquées dans le désassemblage de la capsid de nombreux virus tels Ebola ou les réovirus (Chandran *et al.*, 2005) (Ebert *et al.*, 2002). Akache *et al.*, ont montré que les cathepsines digèrent les virions des sérotypes-2, -5 et -8 différemment créant un profil de restriction virus-spécifique (Akache *et al.*, 2007).

4- Import nucléaire.

Le mécanisme d'entrée dans le noyau est encore controversé.

Une première équipe a montré que les particules s'accumulent rapidement au niveau périnucléaire et pénètrent intactes dans le noyau (Bartlett *et al.*, 2000) par un mécanisme d'entrée particulièrement lent, si bien que le désassemblage de la capsid se déroulerait après le passage de l'enveloppe nucléaire. Toutefois, ce désassemblage pourrait tout aussi bien s'effectuer dans le cytoplasme qu'au niveau périnucléaire ou encore dans l'endosome.

Par microscopie confocale, des expériences de marquages des particules avec des fluochromes (AAV-Cy3 ou AAV-S³⁵) ont permis de suivre l'import nucléaire (Sanlioglu *et al.*, 2000) (Seisenberger *et al.*, 2001). Grâce à ces méthodes, les données dont on dispose suggèrent que les particules d'AAV traversent la membrane nucléaire, non désassemblées sans faire intervenir le complexe complexe associé aux pores nucléaires (NPC) (Sanlioglu *et al.*, 2000)

(Seisenberger *et al.*, 2001). Cependant, Xiao *et al.*, ont montré que la majorité des particules AAV présentes à l'extérieur ou à l'intérieur du noyau sont désassemblées (Xiao *et al.*, 2002). Ce qui ouvre le débat sur le statut moléculaire des particules quand elles passent la barrière nucléaire.

Des études plus récentes montrent que les pores nucléaires peuvent laisser passer des particules dont le diamètre est inférieur à 39 nm or la taille des particules AAV est d'un diamètre compris entre 18 à 24 nm. Ces particules passeraient donc au travers des pores sans avoir besoin d'être désassemblées (Pante and Kann, 2002). De la même façon, certains virus comme le virus simien SV40 ou le virus de l'hépatite B (36 nm de diamètre) sont importés intacts (Greber and Fassati, 2003). La possibilité d'un virion intact au moment du passage de l'enveloppe nucléaire indiquerait que le désassemblage de la capsid s'opérerait alors dans le noyau.

Par ailleurs, Xiao *et al.*, ont montré que le transport des particules AAV dans des cellules HeLa pouvait avoir une cinétique totalement différente selon que les cellules étaient co-infectées ou non par l'adénovirus (Xiao *et al.*, 2002). En effet, ils ont montré que la co-infection par l'adénovirus et l'AAV-2 marqués par des anticorps monoclonaux conjugués au fluor accélère la pénétration dans le noyau de l'AAV où des particules intacts sont retrouvées dès 40 min après l'infection. Ceci indique que l'adénovirus modifierait le mécanisme d'entrée des particules AAV dans le noyau et qu'en présence d'adénovirus, les particules AAV sont désassemblées. Ainsi, le transport au travers des pores nucléaires serait facilité par l'adénovirus et ainsi ne serait pas bloqué par des inhibiteurs du NPC (thapsigargane).

Le processus de désassemblage représente l'étape finale qui délimite deux phénomènes antagonistes. D'une part, la capsid de l'AAV représente une protection pour le génome viral nécessaire pour garder intacte le matériel génétique afin d'être véhiculé jusqu'au noyau. D'autre part, la finalité de l'infection virale est de libérer le génome viral à l'intérieur de la cellule. C'est-à-dire qu'à la fois la capsid doit être stable puis elle doit présenter une certaine labilité (instabilité). Dans le mécanisme d'infection, le désassemblage de la capsid correspond à un état d'équilibre entre protection et exposition du génome viral pour que celui-ci soit compétent à la transduction. De plus, la forme moléculaire sous laquelle le génome viral entre dans le noyau est très controversée.

Une autre étude (Thomas *et al.*, 2004) montre que la barrière principale à la transduction du foie par des particules AAV-2 est le non-désassemblage des particules dans le noyau empêchant ainsi la conversion d'ADN simple brin en double brin (la forme

transcriptionnellement active). D'autre part, cela suggère que le désassemblage dans le noyau détermine la capacité à compléter des ADN simples brins d'orientation opposée pour qu'ils s'apparient et forment des ADN doubles brins stables et biologiquement actifs. Le passage sous la forme double brin du génome viral peut constituer une étape limitante pour une transduction efficace. Dans l'étude de Thomas et al., l'organe ciblé est le foie pour lequel différents sérotypes AAV-2, -6, -8 sont comparés. Dans des études précédentes, il a été montré que la conversion du génome simple brin en double brin s'opère plutôt par appariement de brin complémentaire que par la synthèse «*de novo*» dans la cellule hépatique. Les résultats montrent que les AAV-6 et -8 transduisent le foie plus efficacement que l'AAV-2. Cette différence proviendrait de l'étape de désassemblage de la capsid et de l'entrée dans le noyau. En effet, l'AAV-2 arriverait plus lentement dans le noyau que les AAV-6 et -8. Des expériences de résistance à la DNase I des génomes viraux simples brins qui sont instables et potentiellement inactifs ont mis en évidence que les génomes viraux simples brins véhiculés par des AAV-2 seraient plus exposés aux dégradations au moment de la décapsidation avant qu'ils aient eu le temps de s'apparier. Une hypothèse serait qu'il existe des facteurs cellulaires qui empêcheraient l'appariement des brins de polarité complémentaire pour le sérotype-2 ; ces facteurs agissant différemment selon le sérotype (Thomas *et al.*, 2004). Par conséquent, ces observations suggèrent que le transport intracellulaire peut varier d'un sérotype à l'autre et influencer directement le profil de transduction des vecteurs recombinants qui en dérivent.

Une propriété commune aux capsides des parvovirus est la formation de pores ouverts au niveau des axes de symétrie d'ordre 5 qui traversent la capsid des virions. Ces pores fonctionnent comme des portes pour l'encapsidation des ADN simples brins mais aussi pour externaliser les séquences N-terminales de la protéine VP1 où est localisé le domaine catalytique phospholipase A2 (PLA2) (Lombardo *et al.*, 2002) (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998). En effet la partie unique N-terminale de VP1 possède un signal de localisation nucléaire (NLS) et une activité PLA2 essentielle pour l'infection virale (Girod *et al.*, 2002). Bleker et al., ont montré que des capsides AAV-2 natives ne présentent pas d'activité PLA2 (Bleker *et al.*, 2005), ce qui est en accord avec l'hypothèse que la partie N-terminale de VP1 est située à l'intérieur des capsides intactes AAV-2 (Kronenberg *et al.*, 2001). D'ailleurs des études antérieures ont montré qu'un domaine conservé « PLA2-like » localisé dans la région unique N-terminale de VP1 de la plupart des parvovirus autonomes joue un rôle important dans l'infectivité (Dorsch *et al.*, 2002) (Girod *et al.*, 2002). Cette région ne devient accessible sur des virions intactes qu'après traitement à la chaleur ou à l'urée (Cotmore *et al.*, 1999)

(Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). L'activité PLA2 semble nécessaire entre l'étape d'accumulation périnucléaire des virions et l'étape d'expression précoce des gènes (Girod *et al.*, 2002) (Zadori *et al.*, 2001). Depuis, des études ont montré qu'après prétraitement à la chaleur la partie N-terminale de VP1 des virions AAV-2 impliquée dans l'infectivité est exposée à la surface de la capsidie et qu'elle est sensible à la digestion protéolytique par la trypsine (Bleker *et al.*, 2005). Ces traitements des capsides participent à l'investigation menée sur les changements conformationnels des virions AAV pendant l'infection. Récemment, les travaux de Sonntag *et al.*, ont montré que des groupes d'acides aminés basiques en N-terminale de la capsidie sont impliqués dans l'étape d'entrée précytoplasmique qui prépare le virus à l'entrée nucléaire. Des micro-injections d'anticorps spécifiques de la capsidie dans le noyau bloquent complètement l'infection de l'AAV-2, renforçant l'hypothèse que les capsides AAV-2 arrivent intactes dans le noyau pour introduire le génome (Sonntag *et al.*, 2006).

5- Tropisme in vivo.

La diversité du tropisme cellulaire des différents sérotypes provient de leur capacité à exploiter une variété de récepteurs primaires et secondaires.... Cette voie d'entrée spécifique dans la cellule a pour intérêt de restreindre leur capacité à transduire certains types cellulaires au profit d'une plus grande efficacité. En effet, une façon d'améliorer le transfert de gène vers la cellule cible est de profiter des différences naturelles de tropisme entre les différents sérotypes. L'identification de séquences uniques de la capsidie AAV avec des caractéristiques de liaison au récepteur différentes est une approche légitime pour étendre le tropisme des sérotypes connus. Cette approche prend en compte la diversité naturelle et l'évolution des AAV chez les primates. Par une technique de PCR des séquences nouvelles des protéines de la capsidie ont été identifiées (100 séquences protéiques uniques) (Gao *et al.*, 2003).

Le tropisme cellulaire et tissulaire de chaque sérotype a pu être étudié au travers des vecteurs AAVr. La majorité de ces vecteurs possède une cassette d'expression bordée par les ITR du sérotype-2 et dans ce cas, seule la capsidie varie et est responsable des différences de transduction. Nous reviendrons sur les vecteurs recombinants dans le chapitre suivant. Les applications *in vivo* des différents sérotypes a permis d'établir pour la majorité des organes, le ou les sérotypes les plus efficaces pour le transfert de gènes. Outre leurs propriétés individuelles qui les rendent plus efficaces à transduire tels ou tels organes ou tissus, ils offrent

également une alternative dans les cas où le patient présente des anticorps dirigés contre un sérotype donné.

Il apparaît clairement que chaque sérotype possède des propriétés individuelles associées à des tropismes différents. D'où l'importance de définir les domaines de la capsid, responsables des spécificités de chaque sérotype.

L'analyse du phénotype associé à des mutations ou à des insertions de ligands au niveau de la capsid d'une part (Girod *et al.*, 1999) (Rabinowitz *et al.*, 1999) (Wu *et al.*, 2000) (Grifman *et al.*, 2001), l'identification des épitopes des anticorps monoclonaux impliqués dans les interactions cellules-AAV et dans la neutralisation de l'infection par l'AAV d'autre part (Wobus *et al.*, 2000) (Moskalenko *et al.*, 2000) suggèrent que le site de liaison à l'héparine est localisé au niveau de boucles putatives de la région codante pour VP3. Le tropisme de l'AAV-2 peut être changé génétiquement en insérant un peptide ligand dans la capsid virale. L'insertion d'un résidu de 14 acides aminés dans la région codante de la capsid (Girod *et al.*, 1999), permet d'étendre le tropisme de l'AAV-2 à des cellules non permissives, sans effet sur l'encapsidation. De la même façon, des expériences *in vitro* d'insertion du récepteur qui lie la serpène, dans les régions N-terminales de VP1 et VP2 peuvent aussi changer le tropisme de l'AAV (Wu *et al.*, 2000). Ces résultats ont permis d'identifier les régions critiques, à l'intérieur de la capsid, potentiellement responsables de la liaison au récepteur cellulaire, l'encapsidation de l'ADN, la formation de capsid et l'infection.

Afin de préciser quels sont les acides aminés impliqués et comment ces marqueurs s'organisent par rapport à la structure tri-dimensionnelle de l'AAV, des régions entre les sérotypes ont été échangées à l'intérieur d'une sous-unité de la capsid, formant alors des virus chimériques de nature homologue. Ces modifications ont été obtenues soit par des techniques classiques de clonage (Hauck *et al.*, 2003), soit par une approche faisant intervenir des marqueurs dits "marker-rescue" pour repérer et sélectionner les mutants intéressants (Bowles *et al.*, 2003).

Type tissulaire	Efficacité de transduction Sérotypes optimaux	Références
Muscle squelettique	AAV1-AAV6-AAV7>AAV5	Gao, 2002; Gao,2004; Nakai, 2005; Thomas, 2004.
Foie	AAV9=AAV8>AAV7> AAV1>AAV5	Gao,2002; Gao,2004; Xiao, 1999; Blankinship, 2004; Chao, 2000.
Pancréas	AAV8> AAV1>AAV2	Loiler, 2005; Wang, 2004
Rein	AAV1=AAV2=AAV5	Takeda, 2004.
Poumon	AAV9>AAV5 et AAV6	Gao, 2004
Rétine	AAV5>AAV4>AAV1=AAV2=AAV3	Weber, 2003
Photorécepteur	AAV5>AAV2	Weber, 2003
Cellule Dendritique	AAV6	Aldrich, 2006
Tumeur solide et Mélanome	AAV2>AAV1 et AAV3	Hacker, 2005
Glioblastome	AAV8=AAV7>AAV6>AAV2>AAV5	Harding, 2006
Cellule Gliale	AAV2>AAV4 et AAV5	Thorsen, 2006
Cerveau	AAV7>AAV8>AAV5> AAV1>AAV4	Alisky, 2000 ; Burger, 2004; Davidson,2000; Wang, 2003
Tissu cardiaque	AAV9>AAV8>AAV1	Wang, 2005; Pacak, 2006; Inagaki, 2006

Tableau 2 : Efficacité de transduction des sérotypes AAV dans différents tissus.

Trois études basées sur des stratégies différentes ont permis d'aboutir à des résultats concordants.

1) D'après des informations biochimiques sur le ligand héparan sulfate et des études précédentes de mutations dirigées de résidus acides aminés sélectionnés dans la capsid AAV, des échanges de résidu alanine (acide aminé neutre) avec d'autres résidus basiques ou des combinaisons de résidus basiques ont suggéré : (i) que les résidus arginine en position 585 et 588 sont les principaux acides aminés impliqués dans la liaison à l'héparan sulfate et (ii) que la mutation de ces résidus a peu d'effet sur les autres étapes du cycle viral (Opie *et al.*, 2003).

2) D'après la structure atomique de l'AAV-2 actuellement connue, des mutations des protéines de la capsid ont permis d'identifier des acides aminés basiques positionnés en trois groupes au niveau de différents sites de la capsid de l'AAV-2. Chaque groupe est impliqué différemment dans les étapes de la transduction des cellules par l'AAV (Grimm *et al.*, 2003b).

Ces deux équipes ont conjointement montré que le groupe des acides aminés qui intervient dans la liaison à l'héparan sulfate correspond à cinq résidus basiques localisés au niveau des pics de protubérance de symétrie axiale d'ordre 3 formés par les sous-unités protéiques VP3 de la capsid de l'AAV-2. La substitution par les résidus acides aminés 585 jusqu'à 590 de l'AAV-2, d'une région de l'AAV-5 prédite d'après la structure comme équivalente, génère un virus hybride capable de lier efficacement l'héparan sulfate, d'encapsider l'ADN mais il n'est pas infectieux (Opie *et al.*, 2003). A l'inverse, l'AAV-3 qui se lie à l'héparan sulfate ne possède pas les résidus arginine en position 585 et 588 mais les résidus neutres sérine et thréonine, respectivement (Negishi *et al.*, 2004) (Rabinowitz *et al.*, 2004).

3) Une autre approche élaborée par Samulski *et al.*, consiste à co-transfecter différents ratios de plasmides vecteurs hybrides *rep-cap* pour les sérotypes de 1 à 5 générant, ainsi, des AAV recombinants formés d'une capsid mosaïque (Rabinowitz *et al.*, 2004). Cette méthode dite de « transcapsidation » permet de définir les structures fonctionnelles entre les sérotypes sans avoir besoin de connaître la structure cristallographique de chaque sérotype (Rabinowitz *et al.*, 2004). Elle permet également de générer de nouveaux vecteurs AAVr.

Depuis, Shi *et al.*, ont montré par des mutations insertionnelles, qu'il est possible de modifier le tropisme de l'AAV-2 en insérant le peptide RGD-4C en position 520 et/ou 584.

Ces modifications entraînent des vecteurs incapables de se lier à l'héparine mais présentant alors de nouveaux tropismes (Shi *et al.*, 2006).

Au-delà des acides aminés impliqués : (i) dans la reconnaissance du récepteur ; (ii) la transduction et (iii) la réactivité avec les anticorps contre la capsid de l'AAV-2, des régions variables à la surface des capsides ont été identifiées à partir de la structure cristallographique de l'AAV-2 et des modèles pseudo-atomiques des AAV-4 et -5 (Govindasamy *et al.*, 2006).

Des régions basiques (BR) de la capsid AAV-2 représentant des séquences possibles de localisation nucléaire, se sont montrées essentielles pour l'assemblage et le caractère infectieux du virion (Grieger *et al.*, 2006). L'analyse de la structure tridimensionnelle montre que le changement des résidus lysine et arginine en asparagine interrompt la liaison hydrogène entre les acides aminés basiques ce qui peut empêcher l'assemblage de virions intacts (Grieger *et al.*, 2006). Ces régions BR sont conservées dans les sérotypes de 1-11, suggérant une fonction commune pour l'ensemble de ces sérotypes.

C- Statut moléculaire du génome viral dans la cellule transduite.

Le génome viral délivré dans le noyau de la cellule est sous une forme ADN simple brin qui doit être converti en ADN double brin pour pouvoir être traduit par la machinerie cellulaire. Dans le noyau de la cellule cible, le statut moléculaire du génome viral simple brin de l'AAV dépend de la présence ou non du virus auxiliaire; le mieux caractérisé étant l'adénovirus.

1- In vitro.

Des analyses de clones cellulaires issus de la surinfection de cellules Detroit 6 par du virus AAV-2 ont montré qu'un nombre relativement bas de génomes AAV étaient intégrés dans le génome de la cellule hôte (Cheung *et al.*, 1980). C.Laughlin a obtenu des résultats analogues avec des cellules KB infectées par du virus AAV-2 (Laughlin *et al.*, 1986). Dans les cultures cellulaires, le virus AAV s'intègre effectivement au niveau du site AAVS1, mais l'efficacité et la spécificité de l'intégration exigent les gènes *rep* de l'AAV; ce processus étant

négocié par l'attachement des protéines Rep78/68 à l'ITR et aux séquences AAVS1 (Weitzman *et al.*, 1994).

En absence d'adénovirus (ou toutes autres fonctions auxiliaires), la principale propriété du virus AAV est sa capacité à entrer en phase de latence. Cette entrée en latence se caractérise par l'intégration préférentielle au niveau de l'AAVS1 dans le génome cellulaire (Kotin and Berns, 1989) (Kotin *et al.*, 1990) (Kotin *et al.*, 1992). L'étape d'intégration du virus dans la cellule hôte n'a pas d'effet apparent sur la croissance cellulaire ni sur la morphologie de la cellule (Handa *et al.*, 1977). La région AAVS1 comprend un site RBS pour "Rep Binding Site", la séquence consensus identifiée est semblable à celle présente dans les ITR de l'AAV. De nombreux sites RBS ont été identifiés tout au long du génome humain (Wonderling and Owens, 1997) estimé à environ 2.10^5 fois dans le génome (Young *et al.*, 2000a). La fréquence élevée de la séquence RBS et le fait que l'intégration soit spécifiquement localisée sur le chromosome 19 ont amené à rechercher les facteurs qui dirigent l'intégration site-spécifique et les mécanismes qui sont mis en jeu pour privilégier ce site plutôt que le reste du génome. Un autre facteur nécessaire à l'intégration spécifique est la présence d'un site de clivage spécifique appelé *trs* pour "terminal resolution site" au niveau de l'AAVS1, comparable à celui présent dans les ITR (Linden *et al.*, 1996b) (Linden *et al.*, 1996a) (Young *et al.*, 2000a) (Meneses *et al.*, 2000).

Afin de comprendre ce qui peut gouverner l'intégration préférentielle, de nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées. A partir d'expériences de liaison à l'ADN (Weitzman *et al.*, 1994), de retard sur gel (McCarty *et al.*, 1994) (Smith and Kotin, 2000) et de visualisation directe par microscopie électronique (Young *et al.*, 2000b), il a pu être montré que les protéines Rep78/68 s'associaient en complexes multimériques pour se lier au site AAVS1 et permettre l'association avec l'ITR de l'AAV.

L'AAVS1 présente une conformation de l'ADN compatible avec la réaction de coupure par les protéines Rep78/68. La conformation super enroulée de la double hélice de l'ADN doit rendre le site *trs* accessible sous forme simple brin. Des expériences de mutations de 2 ou 3 nucléotides altérant un des sites RBS ou *trs* entraînent la perte d'intégration spécifique (Linden *et al.*, 1996b).

Les éléments essentiels au mécanisme d'intégration spécifique sont la séquence AAVS1 pouvant être réduite à une séquence minimale de 33bp (Linden *et al.*, 1996a)

contenant les deux signaux RBS et *trs*, les ITR présents sur le génome de l'AAV et les protéines Rep78/68 (Balagué *et al.*, 1997) (Surosky *et al.*, 1997) (Philpott *et al.*, 2002).

Toutefois, l'expression détectable des promoteurs de l'AAV n'est possible qu'en présence du virus auxiliaire et par conséquent la synthèse des protéines Rep en son absence est essentiellement indétectable. Or les protéines Rep78/68 sont essentielles au mécanisme d'intégration. Plusieurs possibilités peuvent être envisagées pour expliquer leur présence : soit elles proviennent d'une synthèse faible *de novo* induite après transactivation du promoteur p5 par des facteurs cellulaires ; soit des protéines Rep sont associées aux particules infectieuses d'AAV.

Un premier modèle hypothétique d'intégration spécifique de l'AAV-2 dans le chromosome 19 au niveau du site AAVS1, a été proposé par Linden *et al.*, qui fait intervenir les protéines Rep78/68 (Linden *et al.*, 1996b) (Linden *et al.*, 1996a). Ce modèle (page suivante, figure 11a) décrit l'intégration en 6 étapes.

La première correspond à la formation d'un complexe entre les sites RBS de l'AAVS1 et l'ADN viral sous forme double brin par l'intermédiaire des protéines Rep78/68. Ces dernières seraient associées à des facteurs cellulaires de réplication se fixant sur le site RBS d'un des ITR de l'AAV, lui-même associé au RBS de l'AAVS1 (étape I). Les protéines Rep coupent, ensuite, spécifiquement le brin d'orientation positive du site AAVS1 au niveau du *trs* (étape II). Les polymérases cellulaires initient la synthèse du brin d'ADN à partir du *trs*. Puis il y a déplacement le long de la séquence AAVS1 et saut ou « *switch* » des polymérases cellulaires vers le brin d'ADN néo-synthétisé qui va alors servir de brin matrice. Ce saut entraîne une inversion de la séquence AAVS1. L'ADN polymérase effectue un second saut prenant l'ADN viral comme brin matrice (étape III). Ce second saut aboutit à une nouvelle inversion et crée un lien entre les séquences AAV et AAVS1, initiant la réplication du génome de l'AAV (étape IV). Un troisième déplacement de brin permet le retour vers l'AAVS1 (étape V). Le dernier déplacement de brin correspond à la liaison entre l'AAV et l'AAVS1 conduisant à l'intégration de l'AAV dans le génome cellulaire (étape VI). Le saut d'un brin à l'autre est une caractéristique de la réplication des AAV en absence d'infection lytique adénovirale. Au cours de la dernière étape, des phénomènes de réparation de l'ADN se produisent et de possibles phénomènes de circularisation ultérieure.

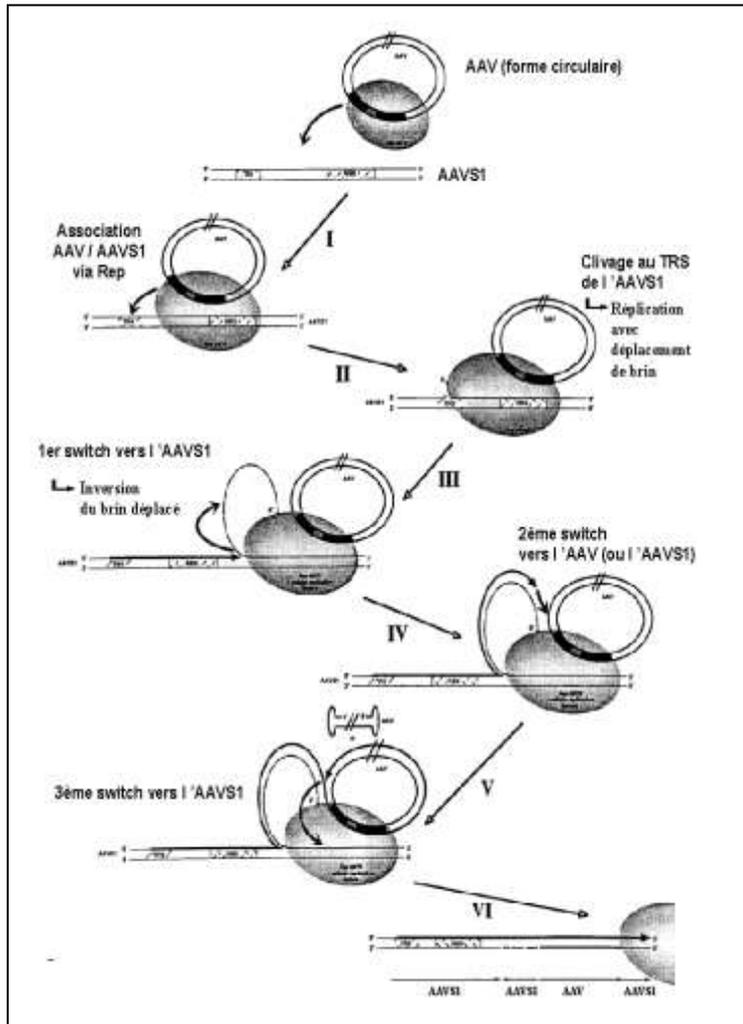


Figure 11a : Un modèle d'intégration site-spécifique de l'AAV-2 au niveau de l'AAVS1 proposé par Linden et al., 1996.

Ce modèle démontre que les protéines Rep78/68 lient les fragments cellulaires et viraux et qu'elles peuvent servir de pont entre l'ITR de l'AAV et le site AAVS1 (Weitzman *et al.*, 1994) (Chiorini *et al.*, 1994) (Chiorini *et al.*, 1995). Cette interaction spécifique des protéines Rep permet la réplication et l'intégration préférentielles de l'AAV au niveau du site AAVS1 (Linden *et al.*, 1996a) (Kotin, 1994). De plus, des expériences *in vitro* indiquent que les protéines Rep ont un rôle primordial de coupure de la séquence *trs* (Urcelay *et al.*, 1995). La protéine Rep apparaît donc, comme l'élément central du mécanisme d'intégration du génome viral (Surosky *et al.*, 1997) (Smith and Kotin, 2000).

Depuis, Hamilton *et al.*, proposent un modèle qui détaille les phénomènes moléculaires entre les génomes viral et cellulaire (figure 11b, page suivante).

Plusieurs études de la structure physique des génomes AAV intégrés suggèrent que les insertions virales sont plutôt orientées en tandem tête-queue par l'intermédiaire des ITR de l'AAV (Cheung *et al.*, 1980) (McLaughlin *et al.*, 1988) (Samulski *et al.*, 1989) (Laughlin *et al.*, 1986). Les concatémères correspondent à des tandems de deux à quatre copies de transgène au niveau du locus d'intégration en fonction de la multiplicité d'infection initiale (Laughlin *et al.*, 1986) (McLaughlin *et al.*, 1988). Ces tandems possèdent au moins une à deux copies de séquences ITR entre deux génomes adjacents.

Par ailleurs, une étude *in vitro* suggère que le site *trs* de l'ITR ne serait pas directement nécessaire à l'intégration de l'AAV mais plutôt à la mobilisation de ce génome intégré (Young and Samulski, 2001).

Très récemment, une étude *in vitro* basée sur l'analyse plus sensible - la LAM-PCR (« *linear amplification-mediated-PCR* ») - qui consiste à élargir la recherche d'évènements d'intégration par recherche de formes intégrées au hasard dans le génome cellulaire, n'a pas mis en évidence de jonctions AAV-AAVS1 après analyse de 280 clones cellulaires HeLa et HepG2 infectés par du virus AAV (Drew *et al.*, 2007).

2- In vivo.

Il reste toujours à déterminer si le phénomène d'intégration site-spécifique de l'AAV se produit naturellement dans la cellule hôte d'origine humaine ou animale.

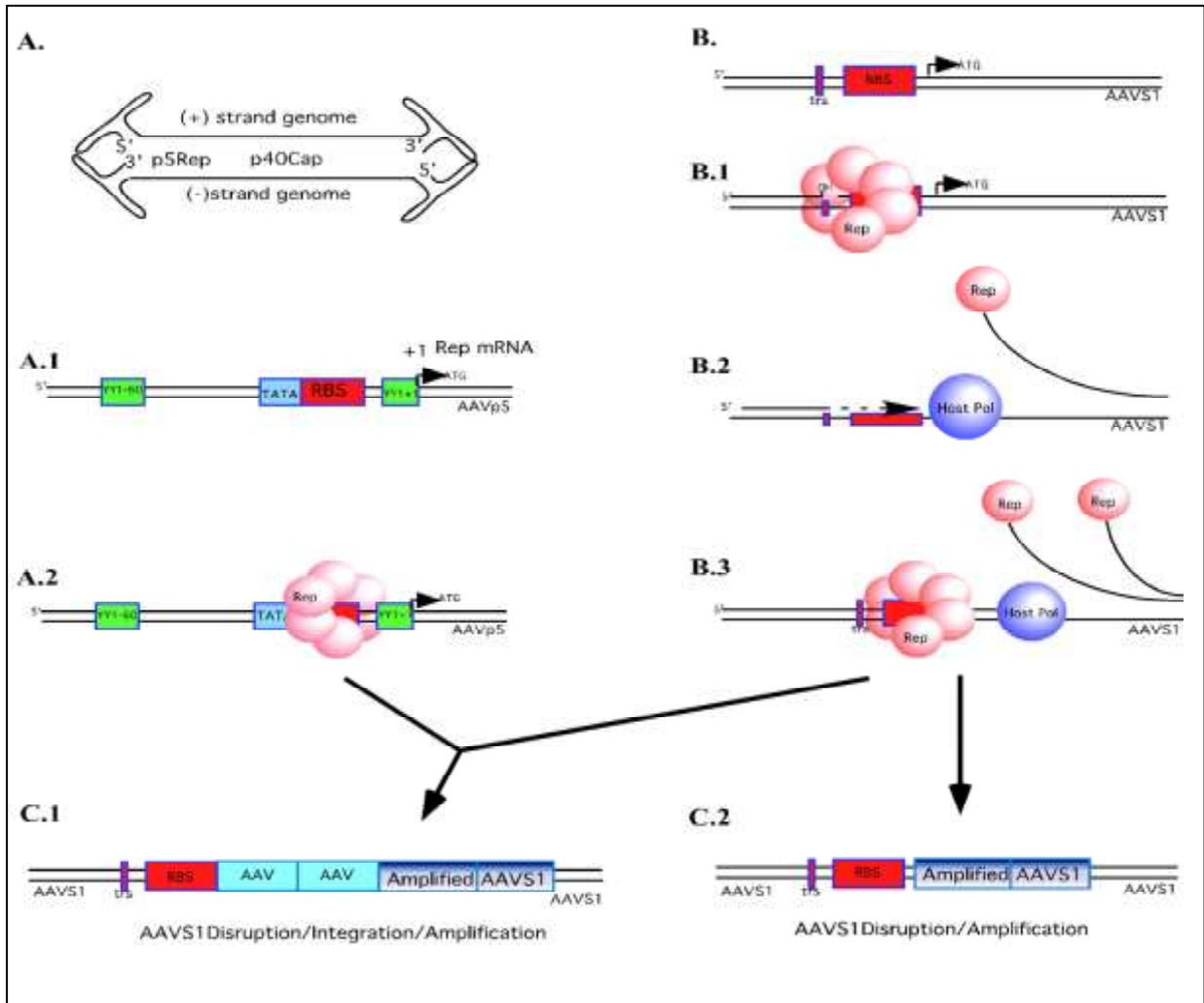


Figure 11b : Un autre modèle d'intégration d'après Hamilton et al., 2004. En A, représentation du génome AAV avec les ITR, intégration via le P5 minimum, incluant le RBS, le facteur de transcription YY1 et la boîte TATA. En B, représentation du site AAVS1, incluant le RBS, le site de coupure *trs*. Les protéines Rep se lient de façon covalente à l'extrémité 5' du site de coupure. Pour que l'intégration s'opère, il faut qu'il y ait recombinaison entre AAVS1 et le P5, par l'intermédiaire des protéines Rep, conduisant à l'insertion de la séquence AAV dans le locus AAVS1 du chromosome 19.

Cependant, il est généralement admis que le mode le plus commun de persistance de l'AAV soit sous forme de concatémères tête-queue (Carter, 2004) et que dans des cellules quiescentes et en absence de pression de sélection, la majorité des concatémères restent sous forme épisomique (Schnepp *et al.*, 2003) (Schnepp *et al.*, 2005) (Chen *et al.*, 2001) (Warrington and Herzog, 2006).

Selon l'organe transduit, le génome viral peut persister sous différentes formes. L'ADN viral peut s'intégrer par recombinaison non homologue, persister sous forme d'épisomes ou par combinaison des deux. À ce jour, cette propriété unique d'intégration site-spécifique n'a été documentée que dans des cellules transformées en culture et n'a jamais été démontrée dans des tissus extraits directement chez l'humain. Seulement deux études ont tenté d'examiner l'infection du virus AAV chez des primates non humains (Afione *et al.*, 1996) (Dutheil *et al.*, 2004). Par amplification par PCR, l'ADN AAV a été retrouvé intégré au niveau du site AAVS1 chez un seul animal.

Afin de caractériser la façon dont l'ADN viral persiste dans les tissus humains infectés, la présence d'ADN d'AAV a été recherchée parmi 175 échantillons de tissus d'origine humaine. L'AAV a été retrouvé dans 7 sur 101 prélèvements d'amygdales et dans 2 parmi 74 autres tissus (rate et poumon). Pour ces neuf échantillons, il n'a pas été possible de détecter d'intégration de l'AAV au niveau du site AAVS1 par la technique de PCR-alu qui amplifie au niveau de jonctions ADN viral – génome humain. Une autre analyse plus sensible, la LAM-PCR, n'a mis en évidence que quelques très rares événements d'intégration dont un au niveau du chromosome 1. Par ailleurs, aucune insertion dans l'AAVS1 n'a été détectée dans cette étude (Schnepp *et al.*, 2005). Une nouvelle technique d'amplification par cercle roulant a permis de montrer que la majorité des séquences virales AAV retrouvées dans ces tissus étaient sous forme de cercles extra-chromosomiques (Schnepp *et al.*, 2005).

La capacité d'intégration préférentielle du virus AAV ne semble pas être retrouvée pour les vecteurs AAVr. Les études *in vitro* de cellules en culture ou *in vivo* chez l'animal suggèrent que le génome recombinant persiste sous forme épisomique circulaire. Lorsqu'il s'intègre, c'est de façon non spécifique et certainement pas spécifique du site AAVS1. L'analyse des séquences AAVr sous forme intégrée montre de fortes homologies avec les formes intégrées du virus AAV (structures concatémériques, réarrangements au niveau des jonctions ADN viral et cellulaire). Toutefois, la présence de structures épisomiques circulaires

stables est une caractéristique des vecteurs AAVr et serait concordant avec l'expression à long terme des gènes transduits par le vecteur AAVr.

L'intégration du virus AAV dans le génome cellulaire peut engendrer des perturbations selon le site d'intégration. Cette dernière peut, en effet, modifier l'activité d'un gène et une étude *in vitro* de la région encadrant le site AAVS1 a montré que le virus AAV pouvait s'intégrer à proximité des gènes *TNNT1* et *TNNT3* transcriptionnellement actifs dans le muscle squelettique et cardiaque (Dutheil *et al.*, 2000). Ce travail suggère que l'intégration site-spécifique de l'AAV dans l'ADN de l'hôte pouvait résulter de la formation de jonctions *TNNT1*-AAV. Il est donc possible que l'intégration de l'AAV dans ou à proximité des gènes muscle-spécifiques change l'expression de ces gènes. L'analyse par Southern blot de cellules infectées de façon latente par l'AAV et l'analyse des jonctions cellule-virus montrent que l'intégration site-spécifique de l'AAV au site AAVS1 conduit au réarrangement du gène *TNNT1* dans deux des quatre lignées cellulaires étudiées. Cependant, il est difficile de dire si ces réarrangements peuvent conduire à un changement phénotypique des cellules musculaires car ces dernières sont multinuclées (Dutheil *et al.*, 2000).

➤ En présence d'adénovirus

En présence d'une infection par un virus auxiliaire, le génome viral intégré est excisé par un phénomène dit de mobilisation ou « *rescue* ». Cette étape de mobilisation se caractérise par la reconnaissance des sites RBS dans les ITR par les protéines Rep dont la synthèse est induite par le virus auxiliaire. Les protéines Rep clivent au niveau des sites *trs* présents dans les ITR adjacents, le génome intégré est alors mobilisé et peut ainsi initier sa réplication (voir cycle viral, figure 4 p20). L'AAV change d'état passant d'un état de latence à un état productif. Cette phase d'infection productive conduit à la formation de nouvelles particules infectieuses.

IV. Les vecteurs AAV recombinants dérivés de l'AAV.

A- Le génome des vecteurs AAVr dérivés de l'AAV.

La réplication de l'AAV est dépendante des 2 séquences ITR de 145 bp qui flanquent le génome AAV. Ce sont les éléments primaires *en cis*, nécessaires pour une infection productive et la génération d'AAV recombinant (AAVr) (Xiao *et al.*, 1997).

La construction de vecteurs AAVr est possible car les séquences ITR de l'AAV apportent tous les éléments nécessaires *en cis* à la réplication et l'encapsidation du génome viral recombinant (McLaughlin *et al.*, 1988) (Samulski *et al.*, 1989). Seules les ITR sont conservés pour l'obtention d'AAVr et tout le génome *rep-cap* de l'AAV est ainsi retiré (déléte) pour être remplacé par le transgène (sa cassette d'expression). Des études récentes indiquent que les ITRs possèdent une faible activité transcriptionnelle (Haberman *et al.*, 2000). Les gènes *rep* et *cap* sont alors apportés *en trans* en même temps que les fonctions auxiliaires permettant la production de particules infectieuses (voir figure 12 page suivante). Un élément important pour qu'une production d'AAVr soit optimale est la taille de l'ADN à encapsider. La taille du vecteur avec les séquences ITR peut difficilement excéder 105% de celle du virus sauvage, soit une taille maximale de 4,7 kb. Inversement, il est préférable que cette taille ne soit pas inférieure à 3,5 Kb (Tullis and Shenk, 2000).

En effet, si la taille de l'insert n'est pas dans un intervalle compris entre 50% et 110% de la taille du virus AAV, l'ADN peut s'encapsider partiellement ou être remanié et les particules générées peuvent être instables et/ou peu infectieuses (Dong *et al.*, 1996). Pour des génomes recombinants de petite taille (compris entre 2,9 et 3,4 kb) le taux d'accumulation d'ADN viral simple brin par molécule d'ADN sous forme réplivative est 3 à 8 fois plus faible que pour le virus AAV-2 (Tullis and Shenk, 2000).

D'ailleurs, des génomes recombinants dont la taille est inférieure ou égale à 50% de celle du virus AAV peuvent être encapsidés sous forme de génomes multimères répétés (cas des AAVr dits double brin ou « *self-complementary* » (McCarty *et al.*, 2001)).

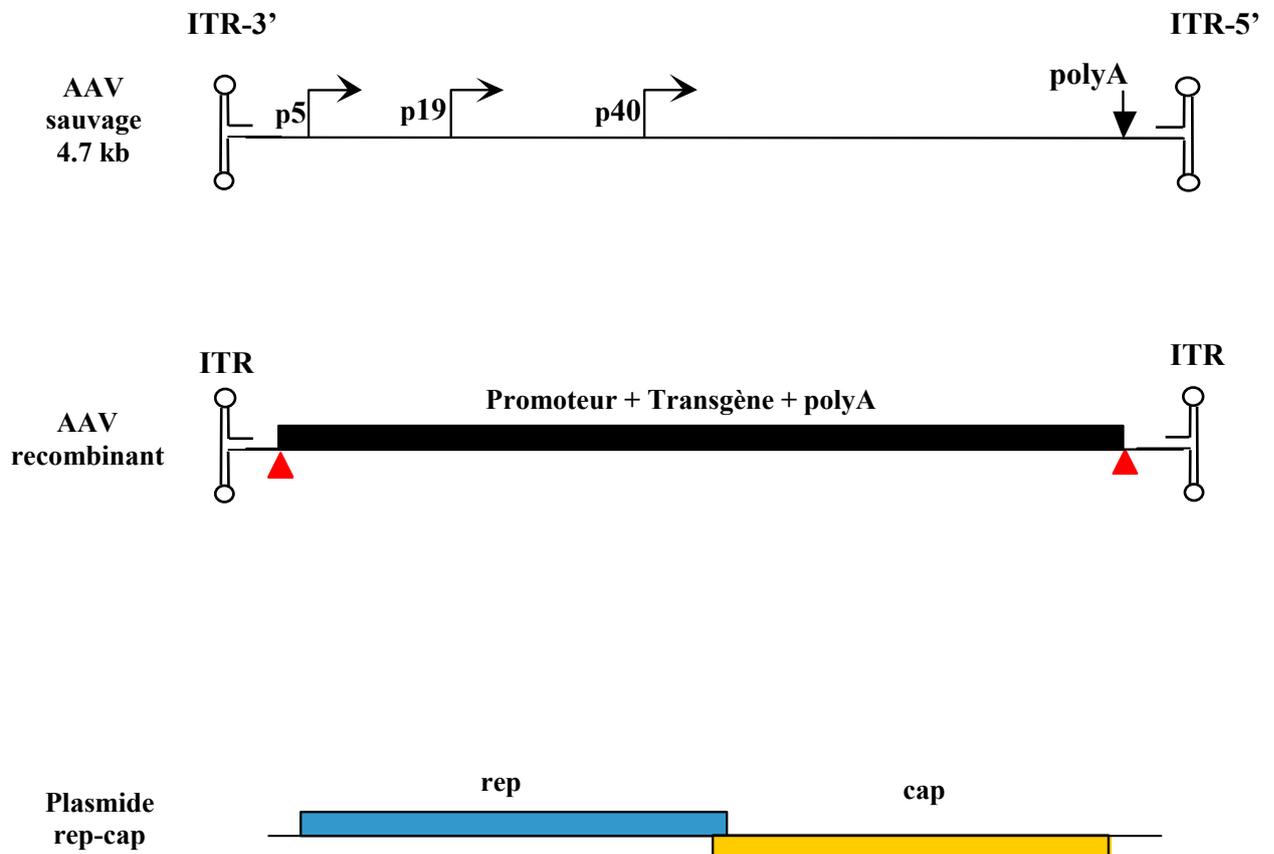


Figure 12 : Organisation génomique du vecteur AAV recombinant.

Adapté de Samulski et al., 1987. Le vecteur est délété des séquences codantes *rep-cap*, et remplacées par la cassette d'expression portant le gène thérapeutique.

Parallèlement, d'autres études ont identifié une région ADN de l'AAV-2 exerçant un rôle dans l'amélioration de la production des vecteurs AAVr. En effet, les vecteurs AAVr se répliquent moins efficacement que les virus AAV. Ce déficit est en partie due à la présence d'une région ADN impliquée *en cis* dans la réplication appelée CARE pour « *cis acting DNA replication element* » (Tullis and Shenk, 2000) (Nony *et al.*, 2001). Cette séquence CARE est localisée en position 194 –1882 du génome AAV-2. De sorte qu'un vecteur AAVr-2 qui ne possède pas cette région produit 14 fois moins d'ADN de formes répliquatives monomères qu'un virus AAV-2 (Tullis and Shenk, 2000). Récemment l'analyse détaillée de cette région a permis de localiser les séquences ADN impliquées dans l'activité répliquative et de réduire cette région au promoteur p5 minimal (Francois *et al.*, 2005). Les éléments requis pour qu'il y ait réplication *in vivo* sont le site de fixation de la TATA *binding protein* (TATA BP), le site de fixation de la protéine Rep (RBS'), le site de clivage de Rep (*trs+1*) et la structure secondaire du *trs+1*.

Une autre analyse suggère que la présence des domaines AD de la région CARE et le *trs* intact sont suffisants pour permettre une réplication du génome AAVr exclusivement sous forme circulaire. Dans ce cas, les domaines ITR ne semblent pas indispensables (Musatov *et al.*, 2002). Ce qui suggère que deux voies de réplication de l'ADN existent, qu'elles sont indépendantes et peuvent être séparées.

Grimm *et al.*, ont trouvé que parmi les particules de virus AAV-2 produites 50% sont vides, alors que pour un AAV-2 recombinant les particules vides produites représentent 80% (Grimm and Kleinschmidt, 1999) indiquant que l'encapsidation de génomes recombinants est un processus assez inefficace.

L'utilisation des vecteurs *in vitro* et *in vivo* a mis en évidence certains points critiques à améliorer. Plus particulièrement, l'application *in vivo* chez les gros animaux a montré qu'il était nécessaire d'avoir des productions virales à des titres et d'un niveau de pureté élevés pour obtenir un effet thérapeutique notable.

Plusieurs stratégies ont été développées pour améliorer la capacité de production et de transduction des vecteurs AAVr. Ces améliorations peuvent être apportées à différents niveaux : (i) par des modifications de la cassette d'expression du vecteur ; (ii) par le développement de vecteurs AAVr de différentes natures ; (iii) par le développement de

nouvelles techniques de production ; (iv) par le développement de nouveaux procédés de purification.

Les différentes méthodes de production et de purification seront développées ultérieurement.

B- Design des vecteurs AAVr.

1- Les vecteurs homologues.

Parmi les douze sérotypes AAV isolés, le sérotype-2 est le mieux caractérisé et reste celui qui a été le plus utilisé dans des études de transfert de gènes. De nombreuses études *in vivo* ont montré que chaque sérotype présente une préférence tissulaire. Cette préférence tissulaire améliore la sécurité virale car le fait qu'un sérotype d'AAVr soit plus spécifique de tissus ou d'organes donnés entraîne une diminution de la Multiplicité d'infection (MOI) locale (Xiao *et al.*, 1999) (Chao *et al.*, 2000) (Chao *et al.*, 2001) (Davidson *et al.*, 2000) (Zabner *et al.*, 2000). Ils peuvent en effet transduire certains tissus beaucoup plus efficacement que l'AAVr-2.

Comme il est décrit dans le chapitre II, l'organisation génomique de l'AAV est telle que chaque sérotype possède des séquences ITR qui lui sont propres. De sorte que pour produire un vecteur homologue, le plasmide vecteur portant la cassette d'expression est encadré des séquences ITR du même sérotype que les gènes *rep* et *cap* de l'AAV apportés *en trans*. Le vecteur AAVr issu de cette production est homologue. C'est-à-dire que les gènes codant pour les protéines fonctionnelles et les protéines de structures ainsi que les ITR flanquant la cassette d'expression sont du même sérotype.

La production de vecteurs homologues nécessite de construire un plasmide vecteur portant le transgène avec les ITR correspondant à chacun des sérotypes. La production de tels vecteurs reste difficile à gérer, pour simplifier la production il est possible d'encapsider le même vecteur AAV flanqué des ITR de l'AAV de sérotype-2 dans toutes les autres capsides, à l'exception du sérotype-5. Ainsi, des analyses comparatives peuvent être facilement menées pour la plupart des sérotypes connus avec une même cassette d'expression flanquée des ITR -2.

Cette propriété vient de la forte homologie entre les protéines Rep et les ITR correspondants des différents sérotypes (à l'exception du sérotype 5).

2- Les vecteurs AAV hybrides.

Dans le cas des vecteurs homologues, le génome AAV de type-5 ne reconnaît pas les séquences ITR de l'AAV-2. Il ne peut donc pas avoir de coupure ni répllication par les protéines Rep de l'AAV-5 avec un plasmide vecteur portant les ITR-2. Une autre stratégie a permis de contourner le problème en développant des plasmides hybrides *rep-cap* permettant d'utiliser le même plasmide vecteur. Ainsi, des plasmides contenant les gènes *rep* de type-2 sont fusionnés aux gènes *cap* de type-5. Cette stratégie a été étendue aux autres sérotypes.

La génération des vecteurs AAV hybrides nécessite donc la combinaison des gènes *rep* et *cap* des différents sérotypes entre eux. Le développement des vecteurs hybrides a permis d'utiliser le même plasmide vecteur contenant les ITR du type-2 avec un plasmide portant le gène hybride *rep* de l'AAV-2 et *cap* d'un autre sérotype. Les particules ainsi produites possèdent une capsidie du sérotype correspondant à celui du gène *cap*. Le même génome recombinant flanqué des ITR de l'AAV-2 peut être encapsidé dans les capsides des différents sérotypes respectifs (Rabinowitz *et al.*, 2002) (Auricchio *et al.*, 2001) (Yang *et al.*, 2002). L'intérêt principal est de pouvoir produire des vecteurs de sérotypes différents à partir du même matériel génétique (plasmide vecteur) et de s'affranchir de paramètres liés à la répllication et à l'encapsidation, qui pourraient influencer l'efficacité de production.

Les vecteurs AAVr représentent un outil de transfert de gènes très versatile puisque les protéines de la capsidie des différents sérotypes peuvent être interchangeées facilement permettant d'obtenir des vecteurs AAV recombinants aux propriétés de transduction unique et propre au sérotype choisi (Auricchio and Rolling, 2005).

2a. Les capsides chimères.

Un vecteur chimérique présente une capsidie composée de protéines VP issues du mélange de domaines ou d'acides aminés des différents sérotypes d'AAV.

La génération de virions chimériques inclut l'approche par recrutement de marqueurs ou des mutagenèses des virions AAVr vers un mélange des domaines de surface à partir de résidus acides aminés simples ou multiples. Le mélange des capsides est aléatoire (figure 13).

Ces vecteurs sont générés par permutation de domaines protéiques spécifiques de la capside d'un sérotype avec des régions similaires d'un autre sérotype. Le but étant de modifier le tropisme de façon à le rediriger vers un type cellulaire spécifique (Bartlett *et al.*, 1999) (Ried *et al.*, 2002) (Muller *et al.*, 2003) (Ponnazhagan *et al.*, 2002) (Perabo *et al.*, 2003). Toutefois, une seule permutation de domaine ne suffit pas toujours à changer le tropisme du nouveau vecteur généré. Cette stratégie a pour avantage de cibler spécifiquement un type cellulaire, mais elle a pour inconvénient majeur d'avoir une efficacité d'assemblage significativement diminuée. Les titres de particules produites et l'efficacité de transduction des cellules cibles restent faibles (Gigout *et al.*, 2005).

2b. Les capsides mosaïques.

Un virion mosaïque peut être défini comme une structure composée d'un mélange de sous-unités de capsides issues de différents sérotypes. Ces vecteurs peuvent être générés par combinaisons de plasmides auxiliaires qui codent pour les protéines de la capside de différents sérotypes et de protéines d'un même sérotype de capside mutante ou à partir de sous-unités de capside mutante d'un même sérotype.

Ces vecteurs sont produits par tri-transfection de cellules 293 où les plasmides transfectés codent pour l'un, les gènes auxiliaires de l'adénovirus et pour les 2 autres, des gènes *rep-cap* de deux sérotypes différents (Hauck *et al.*, 2003) (Rabinowitz *et al.*, 2004). Les 2 plasmides qui portent les gènes *rep-cap* sont apportés à des ratios variables conduisant à la formation de vecteurs chimères de sérotypes-1 et -2.

Leur capside virale est formée de protéines VP des 2 sérotypes dans des proportions aléatoires. Dans les expériences de Hauck *et al.*, ces vecteurs ont l'avantage de pouvoir être purifiés sur des colonnes héparine puisque l'incorporation de protéines VP du sérotype-2 confère à ces particules une affinité pour les groupements héparan sulfate qui n'est pas possible avec l'AAV-1. *In vivo*, les vecteurs chimères 1-2 pourront transduire efficacement le muscle comme un AAV-1 et mais également le foie comme un AAV-2. Une autre application de ces vecteurs mosaïques AAV-1/2 modifiés par échange du motif RGD4C de l'AAV-2 est la possibilité de cibler les intégrines présent sur les structures vasculaires (Stachler and Bartlett, 2006).

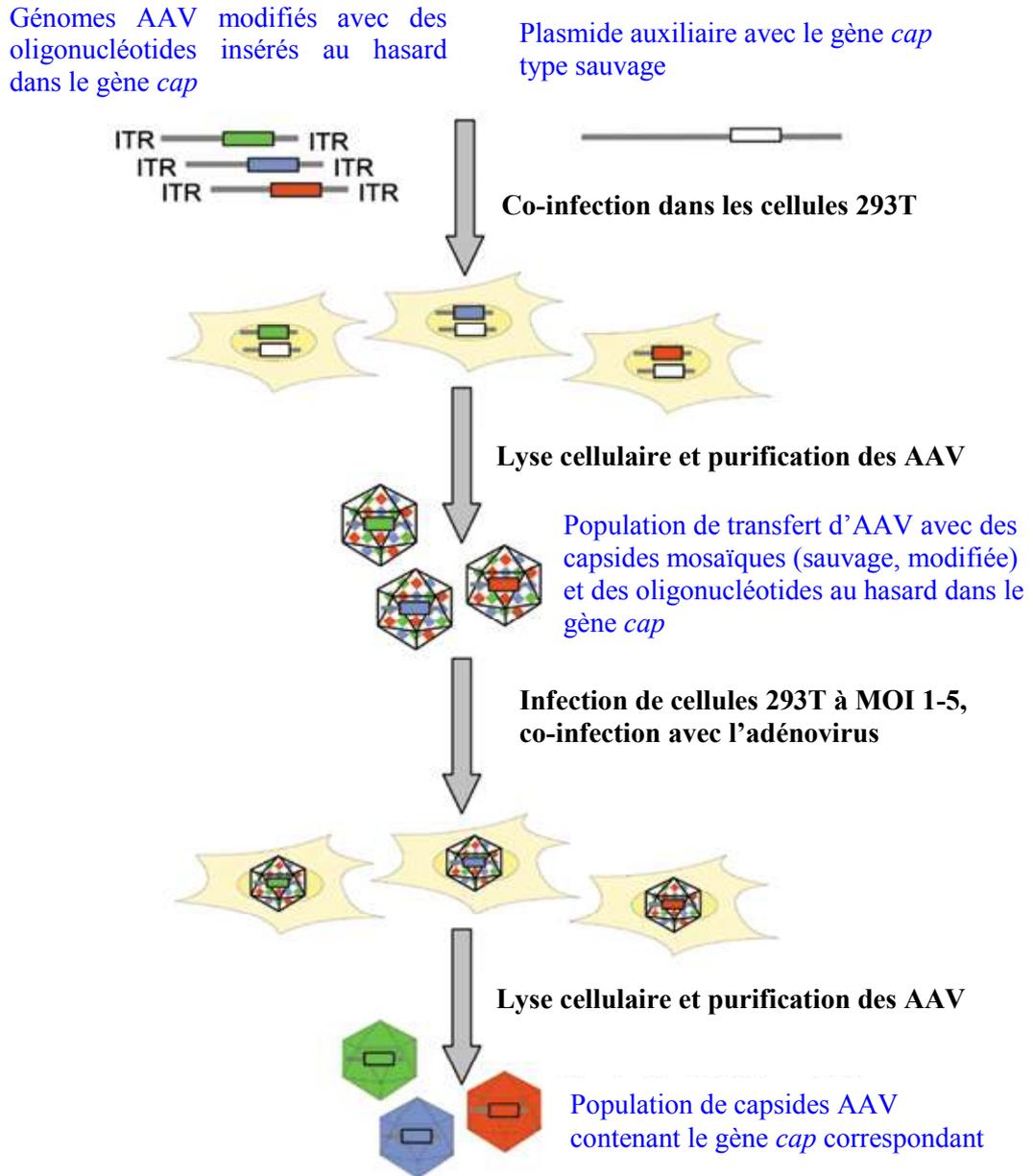


Figure 13 : Schéma de production de bibliothèques de capsides AAV d'après Müller et al, 2003. Vecteurs chimères.

3- Les vecteurs *dsAAVr* ou *scAAVr*.

Les vecteurs AAVr classiques portent un génome ADN sous la forme simple brin qui une fois dans la cellule transduite est converti en une molécule ADN double brin transcriptionnellement active. La conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin est une étape limitante pour la transduction des vecteurs AAVr (Ferrari *et al.*, 1996) (Fisher *et al.*, 1996). Cette conversion en ADN double brin peut se faire soit par une synthèse *de novo* du second brin, soit par un appariement de deux brins d'ADN complémentaire (un brin positif et un brin négatif) provenant de virions différents qui ont infecté la même cellule. L'apport de vecteurs à une forte multiplicité d'infection (M.O.I.) est en faveur d'un appariement (Nakai *et al.*, 2000b). En effet, l'inefficacité de transduction de certains organes par les vecteurs AAVr serait due à un défaut de passage de molécules d'ADN simple brin en ADN double brin. Cette étape contribuerait en partie à l'expression lente du transgène *in vivo*.

Pour contourner l'étape limitante de la synthèse du second brin d'ADN, des vecteurs *dsAAVr* ou *scAAVr* pour « *double-strand or self-complementary AAV* » ont été développés. Ce sont des vecteurs qui possèdent *en cis* deux exemplaires identiques du gène à encapsider. Sachant que la taille du génome vecteur à encapsider ne doit pas dépasser celle du génome viral (4.7 kb), la taille des gènes insérés dans les vecteurs *dsAAVr* doit être inférieure ou égale à la moitié du génome viral soit à une taille inférieure ou égale à 2,35 kb.

La particule AAVr peut encapsider deux copies ou un dimère inversé répété de molécules d'ADN. Ces deux copies d'ADN doivent spontanément s'apparier par repliement puisque les deux demi-molécules sont complémentaires l'une de l'autre, dites « *self-complementary* », formant alors une molécule double brin (figure 14). *In vitro* et *in vivo*, les vecteurs *scAAVr* transduisent significativement plus efficacement que les vecteurs conventionnels « *single-stranded* » (*ssAAVr*). De plus, les vecteurs *scAAVr* permettent une expression du transgène instantané, dès l'entrée dans le noyau et le désassemblage de la capside, comparée à celle des vecteurs *ssAAVr*.

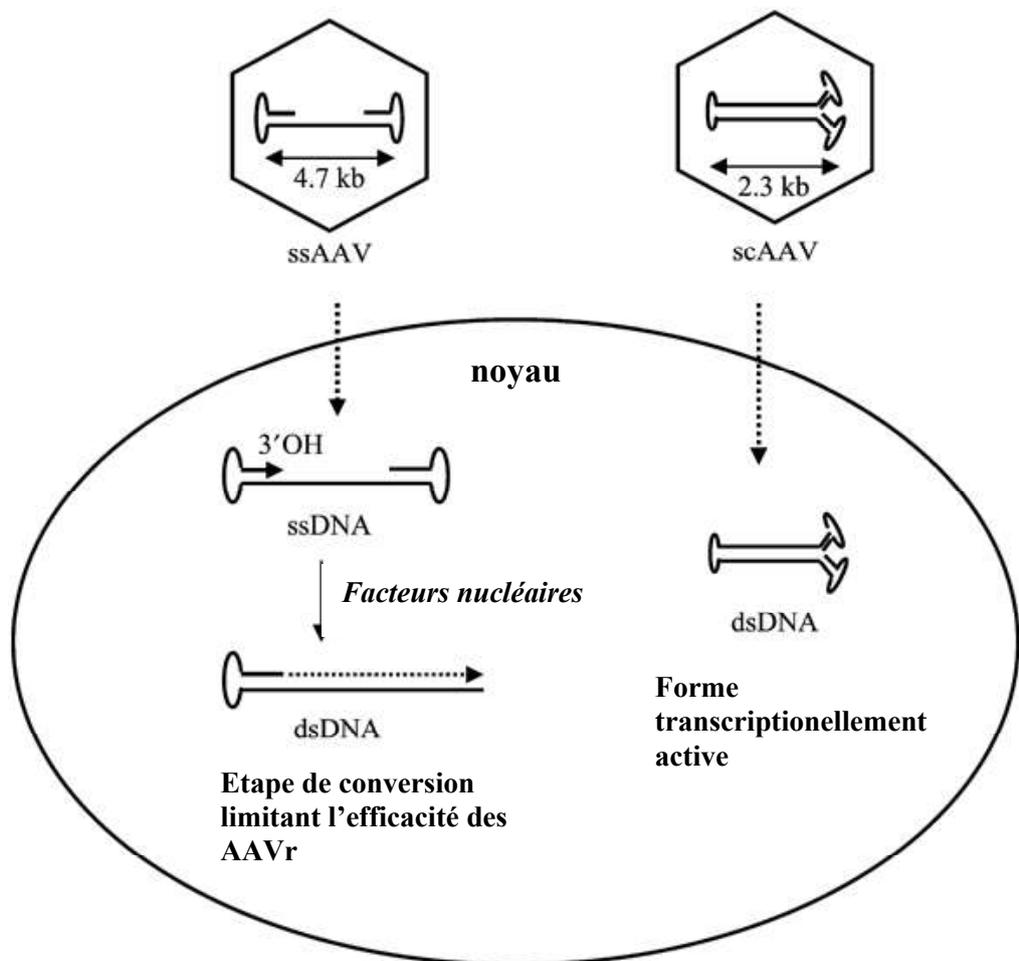


Figure 14 : Schéma de transduction de vecteur double brin d'après Le Bec et al, 2006.

Le vecteur AAV_{sc} porte une délétion dans la séquence D ou une mutation dans le site *trs* d'un des ITR. La taille du génome viral du vecteur *sc* est limitée à la moitié de la taille du génome viral du vecteur conventionnel, soit environ 2,3 kb.

Pour produire plus efficacement les vecteurs scAAVr et éviter la production de populations mixtes de génomes ss et sc, un vecteur muté a été construit pour générer uniquement des génomes dimères (sc). Pour cela le *trs* à partir duquel s'initie la réplication en cercle roulant est délété sur l'un des ITR, l'autre ITR restant intact. Le produit final est un génome « *self-complementary* » avec un ITR muté au milieu et un ITR sauvage à chaque extrémité. La production de ce vecteur muté, purifié sur gradient de chlorure de césium a montré que 90 - 95% des vecteurs étaient des scAAVr (McCarty *et al.*, 2003).

Le développement récent de ces vecteurs scAAVr représente un outil intéressant d'évaluation du transfert de gènes dans des études de maladies du système nerveux central pour lequel ces vecteurs ont une haute efficacité de transduction (McCarty *et al.*, 2001). D'autres études de transfert de gènes dans des hépatocytes *in vivo* avec des vecteurs scAAVr a permis à l'équipe de M. Kay de proposer un nouveau modèle de transduction des AAVr *in vivo* (Nakai *et al.*, 2000b). Ce modèle ne fait pas intervenir la synthèse du second brin d'ADN et/ou le modèle du cercle roulant mais un mécanisme d'appariement de brins simples brins complémentaires de génomes AAVr conduisant à une expression stable dans le foie (Nakai *et al.*, 2000b).

Très récemment, l'équipe de Srivastava a montré que la taille des génomes encapsidés peut être augmentée jusqu'à 3,3 kb, tout en conservant une production efficace des vecteurs scAAVr (Wu *et al.*, 2007). L'utilisation d'un plasmide auxiliaire muté pour réduire l'expression des protéines Rep conduit à une production d'AAVr majoritairement (90%) double brin (Wu *et al.*, 2007). La mutation du codon AUG en ACG diminuant l'expression des protéines Rep78/68 a pour effet d'améliorer l'encapsidation du génome recombinant et permet par conséquent l'encapsidation de molécules d'ADN de taille supérieure à la taille du génome viral.

4- Les vecteurs dits « *trans-spliced* » ou trans-épissés.

Comme nous l'avons abordé plus haut, une des particularités des vecteurs AAVr est leur capacité à former *in vivo* des concatémères tête-queue (Giraud *et al.*, 1995) (Linden *et al.*, 1996b) (Yang *et al.*, 1997). De sorte qu'il a été possible de transférer des gènes de grande taille comme le gène de la dystrophine (11 kb) (Wang *et al.*, 2000) ou le gène codant pour le facteur VIII humain (7-9 kb) (Chao and Walsh, 2001).

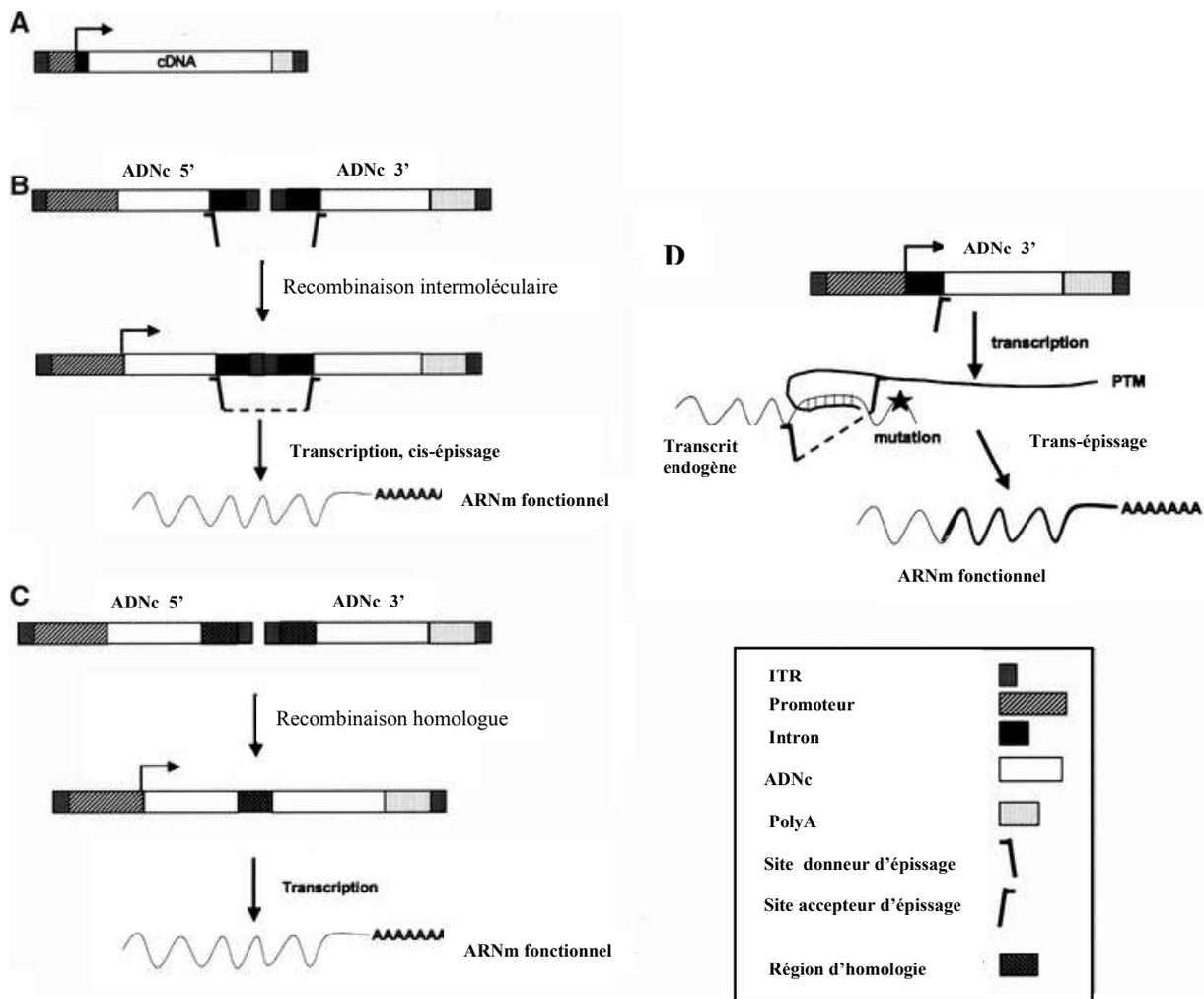


Figure 15 : Stratégies pour contourner la limitation de taille du génome recombinant encapsidé, d'après Warrington et al., 2006.

En A : vecteur dit conventionnel de taille inférieure ou égale à celle du génome sauvage.

En B : deux vecteurs portant chacun une partie du transgène, qui sera complet après **recombinaison intermoléculaire et cis-épissage**.

En C : deux vecteurs qui portent une partie du transgène et tous les deux une séquence identique, permettant **une recombinaison homologue** et une expression de ce transgène.

En D : vecteur exprimant une molécule de **trans-épissage** (PTM) qui peut s'hybrider à un transcrit endogène, permettant une réaction de trans-épissage et formation d'un ARNm fonctionnel

Une manière de surmonter la limite de taille d'encapsidation (4.7 kb) dans des particules AAV est de répartir le cDNA codant pour ces longs transgènes sur plusieurs plasmides vecteurs pour générer plusieurs stocks d'AAV recombinants correspondants. Des sites accepteurs et donneurs d'épissage sont positionnés de façon à ce que, lors de la formation des concatémères, un transcrite thérapeutique puisse être reconstitué. Cette approche de vecteurs trans-épissés a été testé avec succès en utilisant un gène rapporteur dans le muscle de souris (Duan *et al.*, 2001) (Sun *et al.*, 2000) (Yang *et al.*, 1999), le foie (Nakai *et al.*, 2000a), et la rétine (Reich *et al.*, 2003). Cette stratégie a été également appliquée pour le gène minidystrophine dans les souris mdx (modèles de dystrophie musculaire de Duchenne) (Liu *et al.*, 2005) (Lai *et al.*, 2005). Les mécanismes de circularisation et de concatémérisation du génome AAVr résultant de la recombinaison intra- et intermoléculaire de l'ADN viral impliquent les séquences ITR (Yan *et al.*, 2005) (figure 15).

V. Production de vecteurs AAV recombinants.

Les vecteurs AAV recombinants sont capables d'exprimer un transgène à long terme avec une faible toxicité *in vivo*.

La dose thérapeutique va dépendre du tissu et de la maladie ciblée. Le transfert de gène efficace *in vivo* par les vecteurs AAVr exige une multiplicité d'infection (ou M.O.I.) entre 10^3 et 10^5 particules physiques d'AAVr (*vector genome* : vg) par cellule et dépend du type cellulaire ciblé. La dose clinique estimée chez l'homme est alors comprise entre 10^{11} vg d'AAVr par individu pour la rétine et 10^{14} vg par individu pour des organes comme le foie. Actuellement, les méthodes de production développées ont pour objectif de produire des vecteurs AAVr à grande échelle pour permettre des études précliniques chez le gros animal, de toxicologies réglementaires et des essais cliniques de Phase I/II. La spécialité du transfert de gènes à l'aide des vecteurs AAVr cherche donc à optimiser les rendements de production, la qualité des procédés de purification des lots selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BFP) ou « Good Manufacturing Practices » (GMP). De la même façon, la caractérisation des stocks

produits doivent répondre aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) dans la mesure du possible.

Les protocoles de production des vecteurs AAVr ont été initialement développés par deux équipes (McLaughlin, 1988) (Samulski *et al.*, 1989). Ces protocoles sont basés sur une méthode classique de transfection transitoire dans des cellules 293 dérivées de rein embryonnaire humain (HEK pour *Human embryonic kidney*), exprimant de façon constitutive les protéines E1 adénovirales. La première étape consiste à transférer deux plasmides, un plasmide vecteur qui code pour le gène d'intérêt flanqué des deux ITR et les gènes *rep* et *cap* dépourvus des ITR. Puis, les fonctions auxiliaires peuvent être apportées soit après infection par un adénovirus (ou herpès) soit sous forme de plasmide ne codant que pour les fonctions auxiliaires et limitant ainsi une co-production d'adénovirus.

Pour améliorer le rendement des lots de vecteurs AAVr produits et l'efficacité de transduction *in vivo* de ces vecteurs, différentes méthodes de production et de purification ont été développées. Le choix des méthodes de production influe sur le choix de la méthode de purification ultérieure. En effet, la mise au point des différentes étapes de purification des vecteurs dépend à la fois des propriétés physico-chimiques des capsides de la particule virale, des méthodes de production du vecteur, du type de cellule productrice et aussi des conditions de culture des cellules.

Le lysat cellulaire contient des quantités variables de contaminants de composition différente issues des cellules productrices, du milieu de culture et du virus auxiliaire, des différents additifs chimiques et biologiques comme les détergents et endonucléases. Il est important que la production du vecteur soit compatible avec les étapes de purification ultérieures tout en conservant un bon rendement (Burova and Ioffe, 2005).

A- Méthodes de production transitoire.

A l'échelle des laboratoires académiques, la majorité des méthodes de production des particules virales sont encore basées sur la transfection transitoire de cellules 293.

1- La transfection.

Pour produire des vecteurs AAVr quatre éléments génétiques sont nécessaires.

- 1) La culture de cellules de mammifères ou de cellules d'insectes.
- 2) Un plasmide vecteur appelé pAAVr et contenant la cassette d'expression dont la taille ne doit pas excéder 4,5 Kb bordée des séquences inverses répétées de l'AAV (ITR).
- 3) Un plasmide appelé pRep-Cap et codant pour des gènes *rep* et *cap* de l'AAV sans les ITR.
- 4) Un plasmide appelé pAd et apportant les fonctions auxiliaires dérivées de l'adénovirus de type 5.

La figure 16, page suivante, représente les différents modes de production de particules AAVr par transfection transitoire.

Le premier système de production consiste à apporter les 2 plasmides (pAAVr, pRep-Cap) par co-transfection. Dans ce système, les séquences chevauchantes entre le pAAVr et le pRep-Cap sont éliminées réduisant la génération d'AAV sauvage après recombinaison dans les lots d'AAVr produits (Samulski *et al.*, 1989). Dans les temps reculés de la production par transfection transitoire, l'adénovirus sauvage était classiquement utilisé pour apporter les fonctions auxiliaires (Samulski *et al.*, 1989). Cependant ce protocole conduisait à la production simultanée d'AAVr et d'adénovirus sauvage souvent incompatible à l'emploi et l'évaluation *in vivo* de ces stocks (Monahan *et al.*, 1998).

Une solution partielle à ce problème a été l'utilisation d'un adénovirus défectif pour la réplication permettant d'obtenir des stocks d'AAVr non pas contaminés majoritairement par de l'adénovirus sauvage mais par un adénovirus soit thermosensible soit délété de la région E1, dans tous les cas, défectif pour la réplication (Snyder *et al.*, 1997) (Salveti *et al.*, 1998).

Une étape d'amélioration importante a été de remplacer l'infection adénovirale par un plasmide (pAd) qui porte les gènes auxiliaires E2, orf6 de E4 et VA-RNA (Grimm *et al.*, 1998) (Salveti *et al.*, 1998) (Xiao *et al.*, 1998) (Matsushita *et al.*, 1998). La région E1 étant apportée par la cellule 293 utilisée.

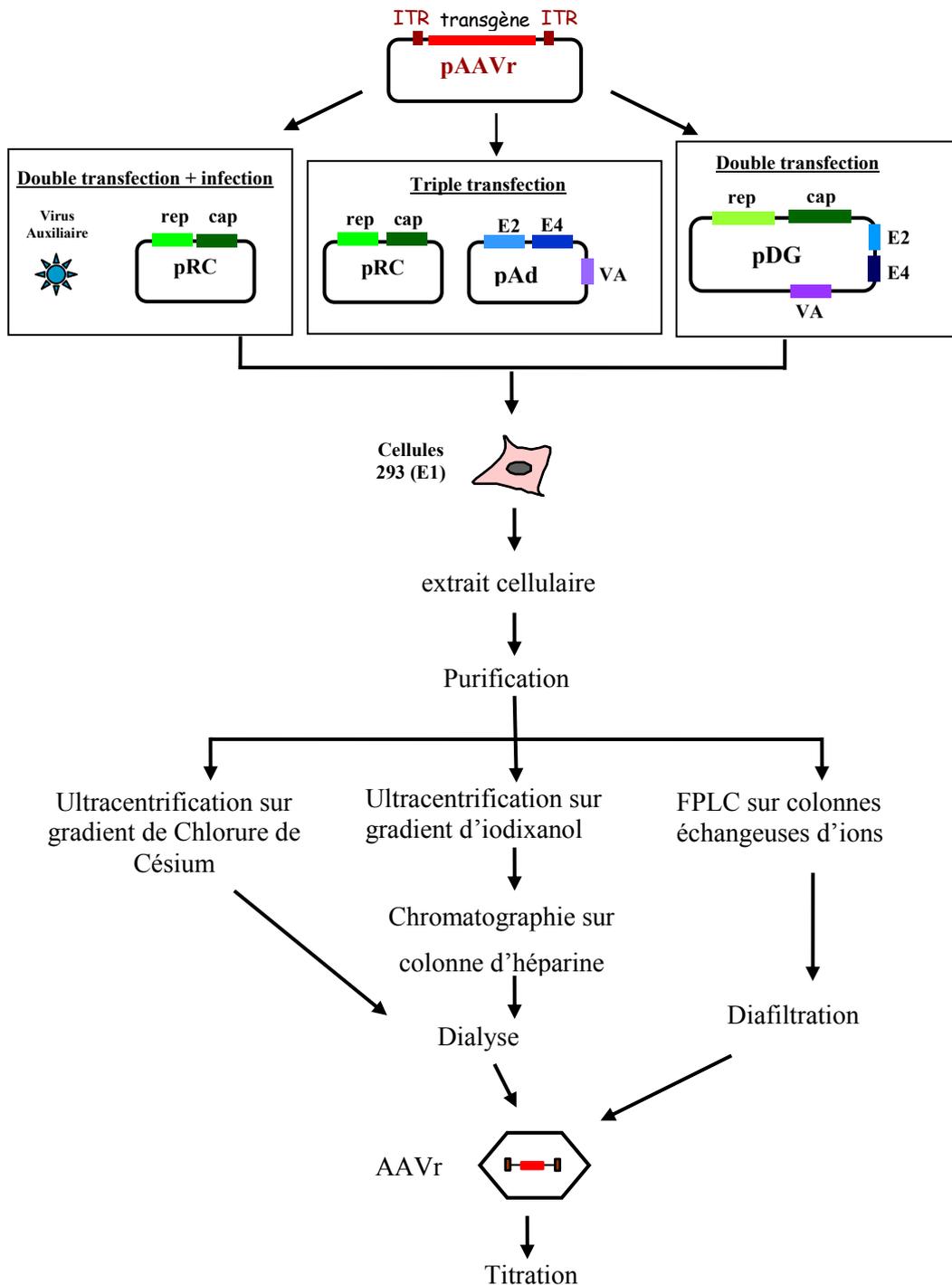


Figure 16 : Schéma de production de vecteurs par transfection.

Représentation schématique de la production d'AAVr par transfection de cellules 293 au moyen du plasmide vecteur et du plasmide portant les gènes *rep-cap*. Les fonctions adénovirales peuvent être apportées par infection des cellules par l'adénovirus ou par transfection d'un plasmide codant les protéines adénovirales auxiliaires.

L'assemblage d'AAVr repose alors sur une seule étape de tri-transfection dans les cellules HEK 293 des plasmides pAAVr, pRep-Cap et pAd apportés à un ratio équimolaire. Quarante-huit à soixante-douze heures après, les cellules sont récoltées et l'AAVr extrait et purifié. L'avantage de cette approche du « tout transfection » est double : l'élimination de la contamination par l'adénovirus auxiliaire car le pAd ne peut générer d'adénovirus infectieux et l'augmentation des titres AAVr produits. La production a été également améliorée en modulant le rapport des Rep78/68 en faveur de Rep52. Cette modulation a été obtenue soit par mutation de l'ATG de *rep78* en ACG (Xiao *et al.*, 1998), soit en remplaçant le promoteur p5 de l'AAV-2 par un promoteur non induit MMTV LTR pour « *mouse mammary tumor virus long terminal repeat* » (Grimm *et al.*, 1998)

La construction du plasmide qui porte à la fois les gènes *rep-cap* et les fonctions auxiliaires de l'adénovirus, le pDG pour le sérotype-2, a amélioré l'étape critique de transfection et par conséquent les titres d'AAVr. Plusieurs plasmides dit « *helper* » dérivés du pDG permettent de produire aujourd'hui les différents sérotypes AAVr de -1 à -6 où le gène *rep* de sérotype-2 est fusionné au gène *cap* de sérotype -1 à -6 (Grimm *et al.*, 2003a). L'emploi de la double transfection améliore les rendements de production jusqu'à 100 TU/cellule contre 1 à 10 TU/cellule par tri-transfection.

Selon la nature de la lignée cellulaire utilisée, différents protocoles de transfection existent entraînant quelques variations dans la cinétique et les rendements de production.

1a. Utilisation du Phosphate de Calcium.

La lignée cellulaire 293 est une lignée qui se transfecte facilement. L'utilisation du chlorure de calcium (CaCl_2 à 2,5M) et l'HeBS 2X (pH 7,05) conduit à la formation de précipité de phosphate de calcium et à une transfection efficace pouvant atteindre jusqu'à 70 à 80% de cellules transfectées pour les cellules 293. La solution d'HeBS 2X est composée de chlorure de sodium (NaCl/280 mM final), de phosphate dibasique de sodium (NaHPO_4 /1,5 mM final) et de N-(2 Hydroethyl)piperazine N'-(2-éthanesulfonic acid) (Hépès/50 mM final).

Les cellules sont maintenues en culture dans un milieu DMEM pour « *Dulbecco's modified Eagle's medium* » supplémenté par 10% ou 5% de SVF (sérum de veau foetal), 4,5 g/l de glucose et 1% (vol/vol) de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont transfectées à

80% de confluence puis maintenues en culture dans du milieu DMEM 5 ou 0% de SVF pendant 48 à 60 H selon les protocoles.

1b. Utilisation de molécules synthétiques.

Pour les lignées cellulaires qui sont plus difficiles à transfecter comme les cellules HeLa, la transfection par précipitation au phosphate de calcium n'est pas efficace. D'autres méthodes ont été développées pour améliorer l'efficacité de transfection. Des molécules synthétiques regroupées sous le terme de PEI (EUROMEDEX) pour polymères d'éthylènimine, ont été produites. Ces molécules organiques possèdent une très grande densité de charge cationique permettant un emballage de l'ADN par liaisons ioniques. Un atome sur trois de cette molécule est un résidu azote protonable transformant le polymère en une « éponge à protons » sur toute l'échelle des pH (Boussif *et al.*, 1996). Cette propriété permet de tamponner le milieu endosomal et empêche la dégradation par le système lysosomal de l'ADN transfecté. Les différentes molécules PEI se distinguent par leur taille (PEI 22 kDa, 25 kDa et PEI 800 kDa) et leur topologie (PEI 25 kDa ramifié et ExGen 500 qui correspond à du PEI 22 kDa linéaire et plus récemment le jetPEI qui est linéaire et présente moins de toxicité résiduelle).

Une étude comparative de ces PEI a montré que ces molécules ont une capacité différente à compacter l'ADN en nanoparticules (Goula *et al.*, 1998), à transfecter les cellules avec de faibles quantités d'ADN et qu'elles n'ont pas la même sensibilité au sérum lors de la transfection. Ainsi ExGen 500 est le PEI la plus efficace pour compacter l'ADN, pour transfecter de faibles quantités d'ADN et il est également le moins sensible au sérum (Boussif *et al.*, 1996). Cette molécule permet de réaliser des transfections transitoires ou stables avec une grande efficacité et une faible toxicité, avec ou sans sérum et sur un grand nombre de types cellulaires.

Le principe de la transfection avec le PEI est que l'ADN et le PEI forment par interaction de charges des micro-précipités qui, par gravité, vont se déposer sur les cellules et y pénétrer par endocytose (Boussif *et al.*, 1995).

L'équipe du Généthon à Evry a mis au point et utilise comme molécule synthétique le PEI (25 kDa, 10 mM) pour produire transitoirement des AAVr sur cellules 293 HEK. Plus précisément des cellules 293 HEK sont cultivées à 70-80% de confluence. Un premier mélange est effectué entre l'ADN (plasmide rep-cap, plasmide auxiliaire adénoviral (pAd) et plasmide

vecteur portant le transgène) et solution de NaCl 150mM. Un deuxième mélange est composé de NaCl 150mM et PEI dans un ratio de 2,25 µl de PEI par µg d'ADN. Le précipité est calculé pour un plateau de T500 de cellules 293 (soit environ $5 \cdot 10^7$ cellules) pour lequel 14 ml de complexe sont ajoutés à 35 ml de milieu (DMEM 4,5 g/l de glucose et 10% de SVF, 2mM de glutamine, 1% SVF). Six heures après la transfection, le même volume, soit 35 ml de milieu DMEM 1g/l de glucose, 2mM de glutamine et 10% SVF sont ajoutés sur les cellules transfectées. Les cellules sont récoltées environ 40 heures après avoir rajouté le milieu.

Dans d'autres laboratoires, les cellules HeLa sont transfectées avec l'ExGen 500, dans des conditions différentes de celles du Généthon. En effet, la transfection du complexe ExGen 500/NaCl/ADN a lieu sur des cellules cultivées avec du milieu DMEM à 1 g/l de glucose sans sérum et sans antibiotique. Le précipité est laissé 4 à 5 heures, puis du milieu DMEM 10% SVF à 4,5 g/l de glucose avec antibiotiques est ajouté dans un même volume.

Des modifications chimiques particulières pour cibler les cellules difficiles à transférer sont possibles par couplage avec des sucres tels que le mannose, le galactose, le lactose ou le fucose (Zanta *et al.*, 1997).

Très récemment l'utilisation du PEI sous sa forme linéaire plutôt que ramifiée a permis d'augmenter l'efficacité de transfection d'au moins un facteur 10 des cellules HeLa connues comme étant difficiles à transférer (Reed *et al.*, 2006).

Quelle que soit la méthode employée par précipitation au phosphate de calcium ou avec des molécules synthétiques, la qualité de la transfection dépend de plusieurs critères qui sont la pureté de l'ADN, l'état des cellules en culture et leur confluence. De plus, à chaque nouveau type cellulaire la transfection nécessite une mise au point spécifique de la lignée cellulaire.

Ces protocoles conventionnels par transfection transitoire produisent entre 10^2 à 10^4 vg/cellule pour « *vector genome* ». La transfection transitoire suppose le plus souvent que les cellules sont adhérentes. Or des cellules adhérentes sont plus difficiles à cultiver à grande échelle en particulier au niveau industriel. Dans le but d'augmenter la capacité de production d'autres systèmes ont été développés.

2- Le système amplicon HSV recombinant.

Le vecteur amplicon est un plasmide procaryotique qui contient la cassette d'expression du transgène et seulement deux éléments d'ADN non codant du virus herpès simplex de type-1 (HSV-1) : un signal d'encapsidation d'ADN viral (pac) et une origine de réplication l'ADN viral (ori). Ces deux éléments sont nécessaires et suffisants à la réplication de l'ADN du vecteur et son encapsidation en concatémères dans les virions HSV-1, en présence des fonctions auxiliaires de l'HSV-1. Ces fonctions auxiliaires peuvent être fournies soit par un virus HSV-1 défectif pour la réplication (délétion de ICP27) (Lim *et al.*, 1996), soit par le génome HSV-1 défectif pour la réplication cloné dans un cosmide (Fraefel *et al.*, 1996) ou dans un chromosome bactérien artificiel (BAC) d'E.Coli (Saeki *et al.*, 1998) (Saeki *et al.*, 2001) (Stavropoulos and Strathdee, 1998).

Epstein *et al.*, ont développé une nouvelle stratégie pour produire de plus grandes quantités de vecteurs très faiblement contaminés par le virus auxiliaire (Logvinoff and Epstein, 2001) (Zaupa *et al.*, 2003). Ce système utilise un virus auxiliaire recombinant HSV-1 qui contient le signal pac bordé par des sites loxP. Ce virus auxiliaire est compétent pour la réplication et l'encapsidation dans des cellules normales, mais dans des cellules qui expriment la recombinase CRE, les signaux pac sont efficacement délétés du génome du virus auxiliaire. L'amplicon, qui contient un signal pac sans sites loxP, est encapsidé alors que le virus auxiliaire ne l'est pas.

Les vecteurs amplicons conservent la plupart des propriétés du virus d'origine. Parmi elles, des propriétés intéressantes de transfert de gènes et une capacité à transduire efficacement de nombreux types cellulaires quiescents ou en division. Ce sont des vecteurs faiblement immunogènes car ils sont dépourvus de gènes viraux, ce qui les rend non toxiques et leur confère une capacité à transférer plus de 150 kb d'ADN exogène (taille du génome de l'HSV-1 : 152 kb).

Des vecteurs amplicons chimères ou hybrides HSV-1/AAV ont été développés utilisant des éléments génétiques (ori et pac) issus du virus HSV-1, des éléments génétiques ITR de l'AAV et le gène *rep* sous le contrôle de son promoteur natif. Sur ce principe, des vecteurs AAVr-2 ou AAVr-5 ont été produits dans des cellules 293 HEK, préalablement transfectées par le plasmide amplicon vecteur portant le gène d'intérêt suivi d'une infection par le vecteur HSV-1d27-rc (contenant à la place les gènes *rep-cap* sous le contrôle de leur promoteur natif respectivement de sérotype-2 ou -5) (Conway *et al.*, 1999) (Wustner *et al.*, 2002). A noter que contrairement au sérotype-2, la production d'AAVr-5 par ce système est significativement plus faible que par la méthode de transfection transitoire (Wustner *et al.*, 2002). Cependant, l'inévitable présence de virus auxiliaire contaminant dans la production de

vecteurs engendre des problèmes comme des effets cytopathiques, des réponses immunitaires mais aussi le risque de générer du virus auxiliaire compétent pour la réplication.

Toutefois, les amplicons HSV-1 ont pour inconvénient d'avoir une expression du transgène en général transitoire (Oehmig *et al.*, 2004).

3- Le système d'expression en Baculovirus.

Les *Baculoviridae* sont une grande famille de virus à ADN double brin enveloppé. En biotechnologie, le baculovirus le plus utilisé est l'*Autographa californica Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcMNPV) composé d'un génome circulaire de 134 kbp avec 154 cadres ouverts de lecture (Kitts and Possee, 1993) (kitts, 1996). Le baculovirus AcMNPV peut être propagé dans différentes lignées cellulaires d'insectes, celles commercialisées pour la production des baculovirus *in vitro* sont les Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), Sf21 ou *High Five* (Schmid, 1996).

Ce système d'expression présente plusieurs avantages : **1)** la présence de promoteurs forts (polyhédrine ou p10) capables de produire des quantités élevées de protéines hétérologues sans limitation de la taille du gène ; **2)** les cellules d'insectes possèdent la capacité d'accomplir les principales modifications post-transcriptionnelles permettant la production de protéines biologiquement actives ; **3)** ce système est facile à mettre en œuvre, facilement transposable à grande échelle, les cellules poussent en suspension dans une variété de milieux sans sérum commercialement disponibles (Merten *et al.*, 2005). En comparaison avec les cellules de mammifères, les cellules d'insectes peuvent atteindre une densité cellulaire plus élevée, ils tolèrent une forte osmolarité et une concentration plus importante de déchets métaboliques. Le baculovirus AcMNPV n'a pas de limitation de taille de transgène, il est non pathogène pour les vertébrés et est incapable de se répliquer dans les cellules de mammifères.

Il a été montré que des VLP pour « *particules like virus* » correspondant à des capsides vides peuvent être correctement produites dans des cellules d'insecte. Les cellules infectées par le baculovirus expriment les protéines structurales qui peuvent s'auto assembler en structures multimériques tridimensionnelles (Maranga *et al.*, 2002). Des particules AAV-LP pour « *AAV-like particles* » peuvent être produites avec le système baculovirus (Ruffing *et al.*, 1992).

Les premiers systèmes de production avec trois différents baculovirus recombinants ne permettaient pas une stœchiométrie correcte des VP1 :VP2 :VP3, 1 :1 :10. D'autres systèmes avec deux baculovirus recombinants portant le gène *rep* et le plasmide vecteur, alors que le gène *cap* est apporté par un adénovirus $\Delta E1$, produisent des particules AAVr avec un rendement équivalent à la production transitoire sur cellules 293 (Sollerbrant *et al.*, 2001). Cependant si ce système est efficace il n'est pas optimal puisqu'il passe par une étape d'infection adénovirale.

Plus récemment, Kotin *et al.*, ont amélioré la production en séparant les gènes *rep* et *cap* et le vecteur AAV sur trois baculovirus recombinants différents (Urabe *et al.*, 2002). Les constructions baculovirus sont modifiées afin de réguler l'expression des protéines Rep en réduisant les Rep78/68 et en surexprimant les Rep52/40 (Li *et al.*, 1997) (Grimm *et al.*, 1998). La substitution des promoteurs naturels de *rep* par des promoteurs d'insectes a permis d'éliminer le virus auxiliaire (Urabe *et al.*, 2002). De la même façon, le promoteur p40 est remplacé par le promoteur polyhédrine et pour avoir une stœchiométrie correcte des protéines VP, les codons initiateurs de VP1 et VP2 ont été remaniés (Urabe *et al.*, 2002). La séquence du vecteur AAV n'est pas modifiée et est apportée par un troisième baculovirus recombinant. Dans ce système, la production d'AAVr est basée sur une tri-transfection des baculovirus recombinants (BacRep, BacCap et Bacvecteur) en quantité équimolaire 1/1/1 dans les cellules d'insectes Sf9 qui sont récoltées trois jours après l'infection (figure 17, p82). La production d'AAVr dans les cellules d'insectes est de $4.5 \cdot 10^4$ vg par cellule Sf9 contre $5 \cdot 10^3$ vg par cellule 293 soit une augmentation d'approximativement 10 fois en faveur du système baculovirus (Urabe *et al.*, 2002).

Récemment, cette même équipe a mis au point une méthode de production d'AAVr-5 homologue (Urabe *et al.*, 2006a). Si le système baculovirus semble prometteur et potentiellement capable de lever une limitation technologique, l'une des faiblesses du système est l'instabilité des baculovirus auxiliaires qui perdent leurs fonctions au cours des passages entraînant une chute des titres en AAVr produits. Pour pallier à l'instabilité des vecteurs baculovirus et pour étendre ce système de production à grande échelle, des éléments codants des vecteurs baculovirus Rep et Cap ont été modifiés (Kohlbrenner *et al.*, 2005).

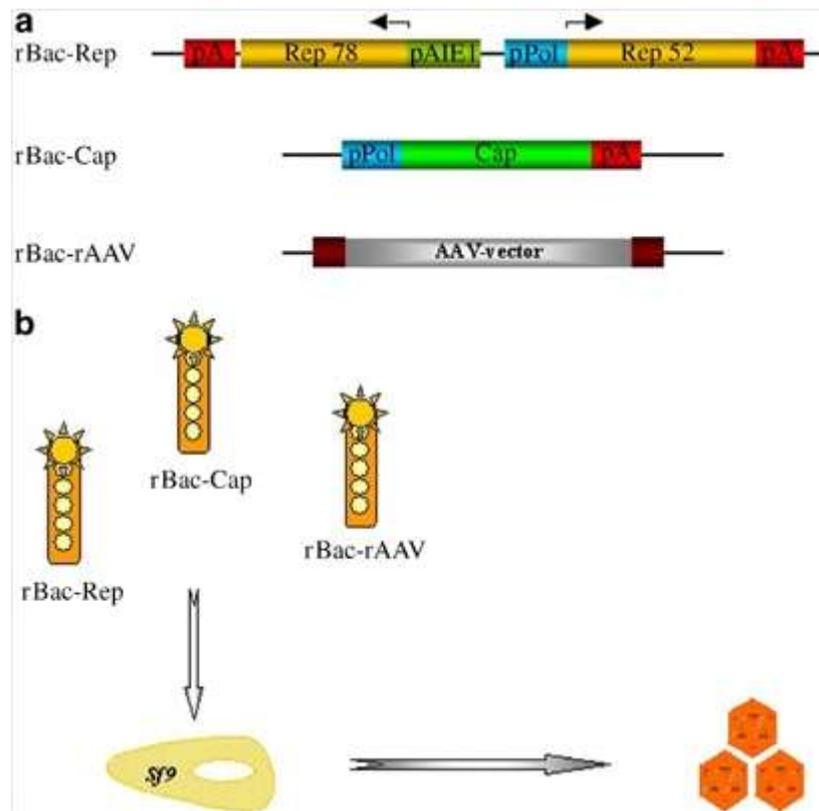


Figure 17 : Schéma de production en système baculovirus dans les cellules d'insecte Sf9 d'après O. Merten, 2005.

Très récemment, des modifications ont été apportées pour améliorer la qualité de la production : (i) Aucoin et al., ont montré qu'en faisant varier la multiplicité d'infection (M.O.I) de chaque baculovirus (BacCap, BacRep, Bacvecteur), le rapport capsides sur particules infectieuses est amélioré quand ces trois baculovirus sont ajoutés en quantité équivalente et à forte M.O.I. (Aucoin, 2006), (ii) en augmentant la température jusqu'à 30 degrés au moment de l'infection, le titre en particules infectieuses est triplé (Aucoin *et al.*, 2007), (iii) en diminuant les interactions hydrophobes par l'utilisation de nucléases pour éviter les liaisons ADN-AAVr, de détergents pour améliorer l'extraction combiné à une méthode de purification par chromatographie, le rendement peut atteindre 75% à partir des AAVr-2 extraits (Chahal *et al.*, 2007).

Ce système baculovirus permet un rendement de 5000 à 10 000 TU/cellule (Zolotukhin, 2005).

Cependant, les inconvénients majeurs de ce système sont : (i) qu'il s'agit d'une production transitoire ; (ii) qu'il faut produire et caractériser trois stocks de baculovirus ; (iii) que l'instabilité latente des baculovirus recombinants persiste.

B- Etablissement de lignées cellulaires stables de production.

Malgré des améliorations de la production transitoire d'AAVr, le rendement de production reste faible puisque seulement 10^3 à 10^4 particules AAVr sont produites par cellule soit 100 fois moins que le type sauvage (Samulski *et al.*, 1989) (Snyder *et al.*, 1997) (Salvetti *et al.*, 1998) (Xiao *et al.*, 1998) (Matsushita *et al.*, 1998)). Ce mode de production transitoire est également peu reproductible et difficilement transposable en production à grande échelle. L'étape de transfection, fastidieuse et aléatoire, représente un des points critiques à améliorer. Par exemple, l'adaptation en bioréacteur est difficilement envisageable, voir impossible. Dans une optique de développement en conditions GMP pour des essais cliniques, la méthode de transfection transitoire implique une certification des différents composants utilisés et donc des contraintes fortes.

Pour établir une lignée cellulaire stable de production, le choix de la lignée de départ dépend de plusieurs critères dont la capacité à assembler efficacement les particules AAVr. Les cellules HEK293 sont une lignée de choix, mais l'expression constitutive du gène E1a de

l'adénovirus intégré dans ces cellules a pour effet de transactiver le promoteur p5, activant ainsi l'expression des protéines Rep78/68 toxiques pour la cellule, d'où une instabilité de la lignée cellulaire (Clark *et al.*, 1995). Plusieurs critères sont considérés pour évaluer d'autres lignées cellulaires : la capacité à assembler efficacement les particules AAVr, l'extinction efficace des gènes *rep-cap* en absence de virus auxiliaire et aussi la capacité à mobiliser les séquences virales et le vecteur intégrées dans le génome cellulaire plus facilement que dans les cellules 293 (Tratschin *et al.*, 1985).

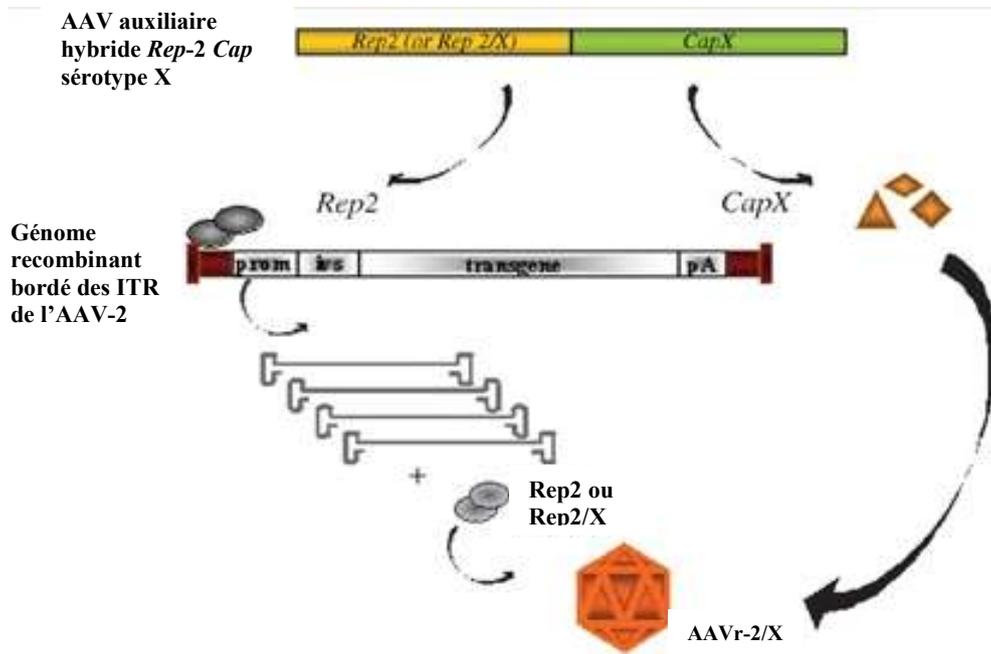
Plusieurs études indiquent que l'expression constitutive du gène *rep* inhibe la prolifération cellulaire (Khleif *et al.*, 1991) (Labow *et al.*, 1987) et par conséquent agit sur la stabilité de la cellule rendant difficile l'établissement de lignée stable d'encapsidation.

La mise en évidence de l'effet toxique du gène *rep* (Saudan *et al.*, 2000) (Schmidt *et al.*, 2000) et sans doute aussi du gène *cap* pour la cellule, impose de contrôler leur expression lorsqu'ils sont intégrés dans un génome cellulaire.

Un point important est d'estimer le nombre de copies efficaces *rep-cap* sans les ITR, nécessaire pour accomplir une synthèse des protéines Rep et Cap et assembler des particules AAVr à des rendements supérieurs ou égaux à ceux des systèmes transitoires. En effet, au cours de la réplication d'un AAV sauvage ou pour produire un AAVr, un grand nombre de copies des gènes *rep-cap* sont présents dans la cellule provenant respectivement, soit de la réplication de l'AAV, soit de l'introduction par transfection de nombreuses copies de plasmides *rep-cap* dans les cellules. Par conséquent, il est probable que la présence de seulement quelques copies de gènes *rep-cap* soit insuffisant pour produire un niveau élevé de protéines Rep et Cap.

Plusieurs équipes ont concentré leur effort sur l'établissement de lignées stables d'encapsidation. Le principe est d'intégrer les gènes *rep* et *cap* dans le génome cellulaire et qu'ils restent en phase de latence (Clark *et al.*, 1995) (Chadeuf *et al.*, 2000) (Mathews *et al.*, 2002).

Le déclenchement de la production de particules AAVr se fait en infectant la lignée par un adénovirus sauvage ou un herpès (figure 18, p85). Dans un deuxième temps, les lignées stables productrices sont complétées après intégration du vecteur AAVr (Mathews *et al.*, 2002) (Farson *et al.*, 2004) (Toublanc *et al.*, 2004). En théorie, une partie des fonctions auxiliaires peut aussi être intégrée en stable mais doit immanquablement être régulée.



Il existe des exemples dans la littérature de telles lignées stables, mais il semblerait que justement leur stabilité soit remise en question. L'une des raisons évoquées est la réelle difficulté de maintenir une régulation serrée des fonctions auxiliaires vis-à-vis de la transactivation des gènes *rep78/68*.

Deux types de lignées cellulaires d'encapsidation ont été établis.

1- Etablissement de lignées d'encapsidation.

1a. Développement de lignées cellulaires 293 où le gène *rep* intégré est sous le contrôle d'un promoteur inductible.

Comme nous l'avons vu précédemment les cellules 293 ont le gène E1a de l'adénovirus intégré dans leur génome, étant donné que ce gène E1a s'exprime de façon constitutive, l'intégration supplémentaire des gènes *rep* et *cap* sous le contrôle de leur promoteur natif dans les cellules 293 n'est pas stable (Yang *et al.*, 1994). En effet, l'expression du gène E1 va initier l'expression du gène *rep* et la réplication en levant la répression exercée par les facteurs cellulaires et par les protéines Rep (Beaton *et al.*, 1989) (Pereira *et al.*, 1997) (Shi *et al.*, 1991). L'établissement de clones cellulaires *rep* et *cap* dérivés des cellules 293 ayant conservés leur promoteur natif fut un échec (Clark *et al.*, 1995) (Chadeuf *et al.*, 2000).

Pour résoudre ce problème, Qiao *et al.*, ont développé une lignée cellulaire 293 pour laquelle l'expression du gène *rep* est sous le contrôle d'un promoteur inductible (Qiao *et al.*, 2002). Les clones cellulaires obtenus s'avèrent peu stable en culture au-delà de 10 passages. Ce même auteur a élaboré un système sans virus auxiliaire inductible dans la lignée cellulaire 293 basé sur le principe de la séparation conditionnelle des quatre séquences *rep* en utilisant le système CRE/Lox (Qiao *et al.*, 2002). L'expression du gène *rep* est induite après infection par un adénovirus délété des gènes E1A, E1B, et E3 et portant le gène CRE. Les clones produisent des titres d'AAVr supérieurs à ceux obtenus par la méthode classique de transfection transitoire. Par contre, Tessier *et al.*, ont montré que l'infection adénovirale de lignées cellulaires *rep-cap* dérivées de cellules 293 ou TE671, ne permettait pas ou peu l'amplification des gènes *rep-cap* (Tessier *et al.*, 2001).

1b. Développement de lignées cellulaires dérivées des cellules HeLa ou des cellules A549 ayant les gènes *rep* et *cap* intégrés et placés sous le contrôle des promoteurs natifs de l'AAV.

Plusieurs groupes ont pu isolés des clones cellulaires dérivés des cellules HeLa contenant intégrés une copie ou plus des gènes *rep* et *cap* de l'AAV-2, sous le contrôle de leur promoteur natif et sans les ITRs (Clark *et al.*, 1995) (Tamayose *et al.*, 1996) (Gao *et al.*, 1998) (Inoue and Russel, 1998) (Chadeuf *et al.*, 2000).

L'utilisation des promoteurs natifs pour contrôler l'expression des gènes *rep* et *cap* se sont avérés être essentiels puisque ces promoteurs, et en particulier le promoteur de *rep* p5, sont naturellement silencieux en absence de virus auxiliaire. Le rendement de production d'AAVr est dépendant du nombre de copies *rep* et *cap* intégré par cellule (Inoue and Russel, 1998) (Fan and Dong, 1997). De façon inattendue, lorsque ces clones cellulaires *rep* et *cap* sont transfectés par un plasmide vecteur et infectés par un adénovirus, les rendements de production d'AAVr sont 10 à 100 fois supérieurs à celui obtenus par transfection transitoire de cellules 293 (Chadeuf *et al.*, 2000). Ce niveau élevé d'assemblage de particules AAVr est corrélé avec la capacité des cellules à synthétiser efficacement les protéines Rep et Cap malgré le fait qu'il existe un nombre réduit de copies *rep* et *cap* (entre 2/3 à 20) présents dans chaque cellule (Gao *et al.*, 1998) (Clark *et al.*, 1999) (Liu *et al.*, 1999). Deux jours après l'infection par l'adénovirus, l'analyse par Southern blot met en évidence une amplification du nombre de copies par cellule des gènes *rep* et *cap* (Clark *et al.*, 1995) (Inoue and Russel, 1998) (Chadeuf *et al.*, 2000) (Liu *et al.*, 2000). Ce phénomène était inattendu puisque que la séquence nucléotidique portant les gènes *rep* et *cap* intégrés est dépourvue des ITRs. Une région au niveau du promoteur p5 de l'AAV-2 a été identifiée et impliquée dans l'amplification des gènes *rep* et *cap* au cours de l'infection adénovirale (Tessier *et al.*, 2001).

Etant donné que la présence de séquences HPV 18 dans les cellules HeLa, représente un danger potentiel, d'autres lignées cellulaires ont été considérées. Des clones cellulaires *rep* et *cap* issus des cellules A549 (lignée dérivant d'un adénocarcinome du poumon humain) ont été isolés. Ces clones sont capables d'assembler efficacement des particules d'AAVr (Gao *et al.*, 2002b) (Farson *et al.*, 2004) et de produire des stocks d'AAVr au même titre que les cellules B50 dérivées des cellules HeLa (Gao *et al.*, 2002b).

2- Apport du plasmide vecteur

La seconde étape du développement de lignées cellulaires stables productrices d'AAVr consiste à introduire le plasmide vecteur AAVr dans le génome des lignées cellulaires d'encapsidation. L'intégration du plasmide vecteur peut être réalisée soit par transfection soit par infection.

2a. Par transfection d'un plasmide vecteur.

La co-transfection d'un plasmide vecteur et d'un plasmide portant le gène de résistance à un antibiotique a permis d'obtenir des clones cellulaires producteurs stables (Clark *et al.*, 1995) (Mathews *et al.*, 2002) (Toublanc *et al.*, 2004). Dans ces cas, la sélection des clones cellulaires était basée sur la détection de l'expression du transgène porté par le plasmide vecteur comme les gènes GFP pour *Green fluorescence protein* ou LacZ. Il est apparu qu'il n'existait pas de corrélation entre le niveau d'expression du transgène et la capacité des cellules à produire des stocks à haut titre d'AAVr après infection par le virus auxiliaire. En particulier, il a été remarqué que les clones producteurs les plus efficaces expriment bien souvent le transgène à un niveau faible et pas dans toutes les cellules (Mathews *et al.*, 2002). Ce qui suggère qu'après l'intégration, le transgène localisé entre les ITRs est silencieux dans la plupart des cellules.

A partir de ces observations, la sélection actuelle des clones cellulaires producteurs se déroule en plusieurs étapes ; (i) une sélection par un antibiotique (un plasmide conférant la résistance à une drogue comme l'hygromycine B est co-transfecté avec le plasmide vecteur) ; (ii) sélection par PCR des clones contenant le transgène ; (iii) évaluation du nombre de copies intégrées du transgène par Southern blot (Blouin *et al.*, 2004). L'ultime test est l'infection par l'adénovirus ou l'herpès virus qui permet de déclencher l'assemblage de particules AAVr. Les clones producteurs sont sélectionnés sur leur capacité à produire des vecteurs AAVr ($> 10^4$ génome par cellule) (Farson *et al.*, 2004). Plusieurs clones cellulaires produisent des titres d'AAVr au moins égaux à ceux obtenus par transfection transitoire de cellules 293. Au laboratoire, des lignées cellulaires productrices pour l'encapsidation de gènes thérapeutiques comme les gènes α -L-iduronidase humain (IDUAh) ou adrénoleucodystrophie humaine (ALDh) ont été établis dans des cellules HeLa *rep* et *cap* de l'AAV-2. Ces lignées produisent des stocks

d'AAVr aussi efficacement qu'en système transitoire comme la transfection sur la lignée cellulaire 293 (Toublanc *et al.*, 2004).

2b. Par infection à l'aide du système hybride Ad/AAVr.

La production d'AAV peut être réalisée en utilisant un système viral hybride Ad/AAVr dans lequel la cassette d'expression du transgène bordée des ITR est insérée à la place de la région adénovirale E1 dans un vecteur adénoviral de première génération. Ce système nécessite d'infecter d'abord avec l'adénovirus sauvage pour fournir les fonctions E1 qui activent alors, les promoteurs natifs de l'AAV. Pour améliorer la production de vecteurs AAVr, plusieurs paramètres de production peuvent être optimisés, le plus important est la MOI pour « *multiplicity of infection* » de chaque adénovirus sauvage et hybride Ad/AAVr (de 10 à 100 selon les études et selon la lignée cellulaire) (Gao *et al.*, 1998) (Liu *et al.*, 1999), mais aussi le temps d'infection pour les deux virus, l'intervalle de temps entre les deux infections, et le temps optimum avant de récolter les cellules (Merten *et al.*, 2005). Aucune étude spécifique n'aborde la question du moment optimal d'infection de la cellule d'encapsidation, qui est pendant la phase exponentielle de croissance. Dans ce système de production, les cellules doivent être infectées en premier par l'adénovirus sauvage, et 15 à 24 H après avec le virus hybride Ad/AAVr pour laisser le temps nécessaire à l'expression du gène avec un pic de la protéine E1a à 20-24H, conduisant à l'induction de niveaux élevés d'expression des gènes *rep* et *cap* (Gao *et al.*, 1998) (Liu *et al.*, 1999).

Ce système hybride Ad/AAVr a aussi l'avantage d'être adaptable à grande échelle en bioréacteur.

3- Apport des fonctions auxiliaires

Le système de production à partir de lignée cellulaire d'encapsidation a pour inconvénient d'utiliser un virus auxiliaire sauvage qui se réplique en même temps que l'AAVr. Pour se répliquer, le virus auxiliaire utilise la machinerie cellulaire au détriment de la production de vecteurs AAVr. Il devient alors un contaminant des stocks AAVr qu'il faut éliminer par une procédure efficace de purification. Actuellement, les procédés de purification pour les applications cliniques permettent l'élimination du virus auxiliaire. Cependant, un

contrôle en amont de la réplication du virus sauvage, c'est-à-dire au moment de la production des vecteurs AAVr, limite la proportion du virus contaminant dans le lysat cellulaire.

Afin d'éviter ou tout au moins de minimiser la production du virus auxiliaire compétent pour la réplication, différentes stratégies ont été développées.

3a. Par infection d'un adénovirus thermosensible.

Les adénovirus délétés de la région E1 sont non répliatifs, mais ne peuvent être retenus puisque ce gène E1 est exigé pour transactiver le promoteur p5 de l'AAV (Chang *et al.*, 1989). Une autre possibilité est d'utiliser un adénovirus thermosensible où la réplication est contrôlée par la température (Myers *et al.*, 1980). Les Adts125 et Adts149 sont des mutants thermosensibles pour la DBP (*DNA Binding Protein*) et l'ADN polymérase, respectivement (Ensinger and Ginsberg, 1972). Ces adénovirus se répliquent à la température permissive de 32°C, mais est incapable de se répliquer à la température non permissive de 39°C. La plupart des mutants thermosensibles de la région E2b testés par l'équipe de W.Gao n'affecte pas la production d'AAVr et même certains conduisent à un rendement supérieur d'encapsulation comparé à un adénovirus sauvage (Gao *et al.*, 1998). A 37°C, température optimale pour la production des AAVr, la thermosensibilité des adénovirus devient relative. Ceci est responsable d'un échappement partiel au blocage de la réplication adénovirale mais néanmoins, cette stratégie permet une réduction significative du nombre d'adénovirus contaminant dans les stocks d'AAVr (Farson *et al.*, 2004).

3b. Par infection d'un virus herpès déficient pour la réplication.

Une alternative est d'utiliser d'autres virus auxiliaires et en particulier l'HSV pour *herpes simplex virus*. Plusieurs études ont montré que ce virus est capable d'aider puissamment à la réplication et l'assemblage d'AAVr (Buller *et al.*, 1981) (Tilley and Mayor, 1984) (Weindler and Heilbronn, 1991). Un certain nombre d'HSV-1 mutants défectifs pour la réplication sont disponibles. Ces différents mutants ont été testés individuellement pour leur capacité à produire des particules AAVr (Toublanc *et al.*, 2004). Seuls les mutants HSVΔUL30 et HSVΔUL9 qui sont défectifs pour la réplication de l'ADN herpétique (Marcy *et*

al., 1990) (Malik *et al.*, 1992) sont capables d'induire l'assemblage d'AAVr à des niveaux équivalents à ceux obtenus avec l'HSV-1 sauvage (Toublanc *et al.*, 2004).

3c. Intégration des séquences adénovirales nécessaires à la réplication de l'AAV, avec contrôle de leur expression.

Les fonctions auxiliaires de l'adénovirus (E1A-E1B, E2B, E4orf6 et VA-RNA) peuvent être intégrées en stable dans le génome de clones cellulaires producteurs (avec *rep-cap* et le vecteur AAVr intégrés) à conditions que leur expression soit contrôlée et régulée. Des clones cellulaires dérivés des cellules HeLa ont été établis avec un système inductible *tet-off*. Toutefois, même si la production d'AAVr est possible, les titres de vecteurs sont faibles et les clones cellulaires instables (Qiao *et al.*, 2002).

C- Développement de techniques de purification des AAVr

Les particules d'AAVr sont produites dans le noyau des cellules, il est donc nécessaire de les extraire et de les purifier. Différentes méthodes de purifications se sont développées, s'adaptant au développement de nouveaux sérotypes et aux exigences de leur évaluation dans les essais précliniques et cliniques.

Les particules AAV résistent à des conditions extrêmes: pH, détergents, températures élevées. Cette stabilité physicochimique de l'AAV a permis de manipuler les virions facilement pour éliminer les contaminants ADN et/ou protéiques d'origine virale ou cellulaire. Cette propriété est aussi importante pour la stabilité du vecteur final produit.

Les développements majeurs en production améliorent le rendement de particules produites par cellule et favorisent l'émergence de systèmes transposables à grande échelle.

1- Selon la densité: gradient de CICs.

La particule AAV est composée d'une capsidie icosaédrique et d'une molécule simple brin d'ADN de polarité positive ou négative, avec une densité comprise entre 1,40 et 1,45 g/cm, cette densité varie selon le sérotype (Rutledge *et al.*, 1998).

Les premiers vecteurs AAVr produits ont été purifiés par des gradients de Chlorure de Césium (CICs). Le principe repose sur la séparation des différents composants en fonction de leur densité. Les contaminants ADN et protéines cellulaires migrent à des densités de CICs différentes sur le gradient permettant leur séparation. Cette technique est très utilisée pour séparer des petites productions d'AAVr et permet de purifier tous les sérotypes AAVr puisqu'elle repose sur un seul critère, la densité. La plupart des protocoles exploitent deux ultracentrifugations successives sur gradients de CICs suivies d'une étape de dialyse pour éliminer le CICs toxique. L'étape de dialyse reste critique dans la mesure où des traces de CICs peuvent persister dans les lots d'AAVr, responsable alors des réactions inflammatoires *in vivo*. Cette méthode de purification a pour autre inconvénient également d'obtenir des préparations de vecteurs de qualité variable avec des titres infectieux significativement faibles et éventuellement la formation d'agrégats. Même après deux ou trois gradients de CICs, la pureté n'est pas optimale.

Auricchio *et al.*, ont mis en évidence un effet délétère du CICs sur l'infectivité des particules AAVr, quand elles restent dans le CsCl le nombre de particules infectieuses chute d'un facteur deux toutes les 24 heures (Auricchio *et al.*, 2001). Toutefois ce point reste controversé car un autre groupe n'a pas vu de différence du rapport « vecteur génome (vg)/particule infectieuse (PI) » entre des stocks purifiés par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions et ceux purifiés sur gradients de CICs (Zen *et al.*, 2004).

2- Selon densité et chromatographie d'affinité ou échangeuse d'ions.

L'ultracentrifugation sur un gradient iso-osmotique d'iodixanol est une alternative au gradient de CICs. Ce milieu dense n'est pas toxique et est même utilisé comme produit de contraste en imagerie médicale. De plus, il évite l'agrégation des particules AAVr et ne semble pas réduire l'infectivité des particules (Potter *et al.*, 2002) (Zolotukhin *et al.*, 1999). La méthode de purification comprend une étape d'ultracentrifugation sur un gradient discontinu d'iodixanol suivie d'une chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine (Zolotukhin *et al.*, 1999) ou une chromatographie échangeuse d'ions (Zolotukhin *et al.*, 2002). Dans le cas d'une colonne d'affinité, les particules AAVr sont éluées par un gradient de chlorure de sodium

(NaCl) entre 400 à 600 mM. Puis, les particules AAVr sont dialysées dans un tampon physiologique (PBS 1X). Cette méthode permet d'éliminer la contamination ADN, une partie des particules vides et diminue le rapport vg/PI (<100) (Brument *et al.*, 2002) (Potter *et al.*, 2002).

Les stocks d'AAVr présentent un degré de pureté significativement meilleur comparé à la purification sur deux gradients successifs de ClCs. Malgré tout, ces deux méthodes de purification ne peuvent être envisagées pour des productions à grande échelle.

A part, une méthode de purification par chromatographie d'affinité utilisant un anticorps spécifique des capsides assemblées (A20) et spécifique du sérotype-2 a été développée (Wistuba *et al.*, 1997) (Grimm *et al.*, 1998) mais elle reste encore très onéreuse. L'affinité pour les groupements mucine a été exploitée pour le sérotype-5 qui a permis de le purifier par chromatographie en une seule étape sur colonne d'affinité mucine (Auricchio *et al.*, 2001).

3- Selon la technique de chromatographie: colonnes échangeuses d'ions.

La chromatographie sur colonne est la méthode la plus puissante et adaptable aux différents sérotypes pour purifier des vecteurs AAVr. Les modes de chromatographies applicables pour l'AAVr incluent l'échange d'ions, l'affinité, le gel filtration et les interactions hydrophobiques. Seule cette méthode a permis d'améliorer considérablement et à grande échelle la pureté des stocks AAVr.

Une série d'étapes d'optimisation sont nécessaires pour obtenir un vecteur à un titre et un degré de pureté élevés. L'étape de pré-purification est décisive sur l'efficacité des étapes ultérieures. La façon dont les particules AAVr sont extraites des noyaux des cellules aura un impact sur le choix du procédé de purification. Selon que les AAVr sont extraits par congélation/décongélation ou bien par action de détergents éventuellement associés à l'emploi de nucléases (benzonase) ou par éclatement des cellules à l'aide d'un homogénéiseur sous pression, la nature des contaminants cellulaires et ADN cellulaire va changer (Anderson *et al.*, 2000) (Auricchio *et al.*, 2001) (Clark *et al.*, 1999) (Drittanti *et al.*, 2001) (Gao *et al.*, 2000) (Kaludov *et al.*, 2002) (O'Riordan *et al.*, 2000) (Potter *et al.*, 2002) (tableau 3). A noter que l'ajout de détergents, de nucléases et parfois des protéases sont difficiles à éliminer.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non ci
sont requis pour visionner ce

VP1
VP2
VP3

Figure 19 : Purification d'une préparation de vecteurs AAVr-1GFP par chromatographie sur résine échangeuse d'ions, d'après Urabe et al., 2006.

Le chromatogramme montre la séparation des particules vides (E) des particules pleines (F).

Une photo de **microscopie électronique** de chaque pic représente les particules icosaédriques vides (un point au centre des particules), et les particules pleines. Les différentes fractions sont déposées sur un gel de polyacrylamide, le **western blot** correspondant est représenté ci-dessus avec les trois protéines de la capsid VP1, VP2 et VP3 marquées par un anticorps polyclonal anti-VP de type-5. En parallèle, les particules totales sont dosées par PCR pour chaque fraction.

La purification par chromatographie échangeuse d'ions est basée sur la charge nette des protéines à l'extérieure de la capsid. Cette charge nette des protéines de surface dépend du point isoélectrique (pI) des groupes d'acides aminés. Le pH, la salinité et la nature des matrices sont les principaux paramètres à considérer pour optimiser la purification.

La purification de vecteurs AAVr-2, -4, -5 sur résines échangeuses d'ions a été rapportée par plusieurs groupes (Gao *et al.*, 2000) (Brument *et al.*, 2002) (Kaludov *et al.*, 2002) (Smith *et al.*, 2003) suivant un schéma global : (i) une première colonne échangeuse de cations avec différents supports possibles (POROS 20 HE, UNOS-S1, SP Sépharose HP), (ii) une deuxième colonne échangeuse d'anions pouvant aussi avoir des supports différents (POROS 50 PI, POROS-HQ, Mono Q HR, Source 15 Q). Cependant, certains protocoles de purification n'utilisent pas forcément deux types de colonnes. Dans certains procédés, la petite taille des virus AAVr ($3.3 \cdot 10^6$ Daltons) est mise à profit pour éliminer les protéines contaminantes de faibles poids moléculaires (Smith *et al.*, 2003) ou pour concentrer la solution virale par la technique de filtration sur gel. Pour exemple, les particules AAVr-5 peuvent être purifiées par une seule colonne échangeuse d'anions combinée à une étape de filtration sur gel Superdex (Smith *et al.*, 2003).

La chromatographie sur colonne n'élimine pas les particules vides co-purifiées avec les particules pleines. Une étude récente, basée sur le caractère anionique un peu plus faible des particules vides par rapport aux particules pleines, décrit une méthode de chromatographie échangeuse d'ions qui élimine les particules vides (figure19) (Qu *et al.*, 2007).

Aujourd'hui, face à l'intérêt grandissant pour les sérotypes autres que le -2, des procédés de purification sont développés avec pour objectif qu'ils soient universels à tous les sérotypes avec un bon rendement, un haut degré de pureté et que le procédé puisse être transposable à grande échelle (Davidoff *et al.*, 2004) (Chahal *et al.*, 2007). Pour chaque sérotype, l'optimisation de la liaison à la matrice du virus et le rendement des étapes de chromatographie, s'opère en ajustant le pH et la concentration en NaCl.

Tableau 3: récapitulatif des différents protocoles de purification par chromatographie.

VI. Caractérisation des particules produites.

A- Caractérisation des vecteurs produits.

1- Evaluation par titration des AAVr.

Les vecteurs AAVr peuvent être titrés par différentes techniques:

◆ **Le Dot Blot** qui évalue le génome (le transgène thérapeutique) des virions AAVr, exprimé en **vg/ml**. Cette titration correspond aux particules physiques pleines et ne comptabilise donc pas les particules vides présentes dans la préparation d'AAVr. Elle a l'avantage de permettre de titrer tous les sérotypes d'AAVr de façon assez homogène, indépendamment du tropisme de chacun.

◆ **La PCR quantitative** permet également de titrer les particules physiques pleines par un dosage par PCR du transgène, exprimé aussi en **vg/ml**.

◆ **Le RCA pour « Replication Center Assay »** détermine le nombre de particules infectieuses par ml. Ce test est basé sur la mesure de la réplication d'un vecteur AAV dans une cellule co-infectée par : (i) de l'adénovirus qui apporte les fonctions auxiliaires ; (ii) de l'AAV sauvage qui apporte les fonctions Rep (McLaughlin, 1998). Les fonctions Rep peuvent aussi être apportées lorsque ces dernières sont intégrées dans le génome d'une lignée. Deux exemples sont les cellules HeLa *rep-cap* (Salvetti *et al.*, 1998) (Snyder *et al.*, 1996). Le titre infectieux est exprimé en **PI/ml**.

Cette technique tient compte de l'infectabilité des cellules Hela par le vecteur AAVr. Actuellement, les différents sérotypes produits ne transduisent pas toujours ces cellules. Dans ce cas, cette titration ne peut donc avoir lieu.

◆ **La détermination du nombre de cellules transduites** exprimée en **TU/ml** pour « Transducing Unit ». Ce test peut être effectué pour les vecteurs AAVr dont le transgène est

un gène marqueur comme les gènes β galactosidase ou GFP pour « *Green Fluorescein Protein* » observé au microscope à fluorescence. On parle alors de **LFU** pour « **LacZ Forming Unit** » et **GFU** pour « **GFP Forming Unit** » respectivement.

Malgré des variabilités « cassette d'expression dépendante » ou d'un transgène à l'autre, pour un sérotype donné, le rapport entre les mesures de ces trois titrations (**vg/ml**, **PI/ml**, **TU/ml**) est généralement constant. Par exemple, pour l'AAVr-2, le rapport entre **vg/ml** et **PI/ml** est de l'ordre de 50 à 100 alors que le rapport du titre **PI/ml** sur le titre en **TU/ml** se situe entre 20 à 50 (Salveti *et al.*, 1998).

◆ **Le test Elisa permet de titrer toutes les particules AAVr.** Ce test est basé sur l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît les capsides assemblées (A20), c'est-à-dire les particules vides et les particules pleines de sérotype-2 (Grimm and Kleinschmidt, 1999). Par contre, la spécificité de cet anticorps restreint l'utilisation du test au sérotype-2. Très récemment, d'autres anticorps reconnaissant les capsides AAV assemblées spécifiques des sérotypes-1/-6, -4 et -5 ont été isolés (Kuck *et al.*, 2006). Ils vont permettre la quantification de toutes les particules AAVr-1, -6, -4 et -5.

2- Evaluation de la qualité d'un lot de vecteur produit.

Pour des applications cliniques, les vecteurs AAVr sont fabriqués conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication des médicaments (BPF) ou *Good Manufacturing Practices* (GMP). La transposition des méthodes de production de grade recherche vers la fabrication à grande échelle conformes aux G.M.P actuelles fut un défi important pour les vecteurs AAVr-2 et le reste aussi, pour les autres sérotypes.

Les propriétés physicochimiques des virions AAVr sont favorables aux méthodes de fabrication admises par l'industrie, au stockage à long terme et à l'administration directe *in vivo*. De plus, les virions d'AAVr sont stables sur une large plage de pH et de températures et supportent la congélation.

Le tableau suivant récapitule les tests demandés pour un lot d'AAV clinique, d'après R.Snyder (Snyder and Francis, 2005).

Dans ce tableau, les tests sont séparés en trois groupes en fonction de l'étape de production du lot d'AAVr, 1) au moment de la récolte, 2) en fin de procédure de purification et 3) après l'aliquotage final, avant la libération du lot quand le vecteur est conditionné en dose injectable.

Etape Récolte	Etape Vrac purifié	Etape Produit final aliquoté
Stérilité ou charge microbiologique	Stérilité ou charge microbiologique	Stérilité
Mycoplasme	Pureté protéique	Titre en particules infectieuses (pi)
Contaminants viraux adventices <i>in vitro</i>	Titre en particules infectieuses (pi)	Titre en vecteurs génomes (vg)
	Titre en vecteurs génomes (vg)	Détection AAVrc
	Identité (restriction enzymatique)	Expression du transgène
	Détection AAVrc	Endotoxines
	ADN cellulaire résiduelle	Agrégation
	ADN plasmidique résiduel	Apparence, osmolarité, dosage BSA, pH
	pH	Identité
	Conductivité ou Osmolarité	Stabilité (vg, pi, pureté protéique)
	Contrôle des produits résiduels issus de la production	

2a. Tests de détection des ADN contaminants par PCR quantitative sur le produit fini.

⇒ Quantification de l'ADN résiduel cellulaire (293 HEK, Sf9, A549, PerC6....) :

Les monographies des vecteurs, en cours de rédaction, ne fixeront pas le seuil de quantité d'ADN résiduel dans les lots de vecteurs de transfert de gènes. Ce seuil sera étudié au cas par cas, en fonction du mode de production et de la cible thérapeutique.

La référence est donc le seuil défini par les vaccins produits dans les mêmes conditions. La dose d'ADN résiduel ne doit pas dépasser 100 pg par dose injectable.

⇒ Quantification d'ADN résiduel plasmidique :

Elle concerne les procédés de production par transfection transitoire.

⇒ Quantification d'ADN indésirable encapsidé dans les particules AAVr :

Cette quantification fait suite aux résultats récents montrant qu'il existe une encapsidation de séquences procaryotiques, dans les vecteurs AAVr en dehors des ITR (Chadeuf *et al.*, 2005). Ces résultats ont des implications dans la caractérisation des vecteurs AAVr cliniques. Actuellement, l'ampicilline n'est plus utilisée comme gène de résistance dans les constructions plasmidiques.

2b. Détection de particules compétentes pour la réplication (AAVrc).

Des cellules permissives dépourvues des gènes AAV sont infectées par des dilutions de vecteurs AAVr purifiés en présence d'adénovirus pendant 48 heures. Dans ce test, seules les particules qui ont encapsidé un génome AAV de type sauvage ou pseudo-sauvage sont capables de se répliquer.

Pour augmenter la sensibilité, cette étape d'infection est répétée deux à trois fois pour amplifier les particules AAVrc éventuelles qui sont alors détectées par PCR en prenant une amorce qui reconnaît la séquence D de l'ITR et une autre amorce qui s'accroche dans la séquence *rep*.

2c. Pureté protéique des lots d'AAVr purifiés.

L'évaluation de la pureté des productions AAVr s'effectue en déposant une quantité de particules pleines (vecteurs génome: vg) équivalentes à une dose injectée chez le patient dans la mesure des capacités du test (pour exemple, environ 1.10^{11} vg dans la rétine) sur un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE). Le gel est ensuite révélé par coloration soit au bleu de Coomassie (sensibilité comprise entre 9 et 18 ng de protéines), soit au nitrate d'argent (sensibilité entre 0,3 et 0,6 ng de protéines). Bien que la sensibilité de la coloration au bleu de Coomassie soit plus faible (30 fois plus faible que le nitrate d'argent), elle reste admise.

Pour la validation, il faut déposer une dose maximale (là aussi, cette dose dépendant des capacités du test) pour identifier des éventuelles protéines contaminantes. Le lot d'AAVr est estimé pur à 100% quand ne sont révélées que les trois protéines VP1, VP2, VP3 de la capsid. Pour ce test, une référence AAVr-2 peut être déposée en parallèle.

3- Tests de sécurisation.

Ce sont les tests de Contrôles Qualités décrits dans les pharmacopées, demandés sur les médicaments stériles injectables, applicables à tous les vecteurs de transfert de gènes. Ces tests vérifient qu'au niveau des étapes intermédiaires ou sur le produit final, il n'y a pas d'agents contaminants détectables ou de résidus issus de la procédure de purification.

- Test de stérilité
- Test de détection des mycoplasmes
- Test de détection d'endotoxines
- Tests de détection des virus adventices :
 - ⇒ Virus humains
 - ⇒ Virus porcins (si au cours de la procédure de production, le vecteur a été en contact avec de la trypsine)
 - ⇒ Virus bovins (si au cours de la procédure de production, le vecteur a été en contact avec du sérum de veau fœtal)
 - ⇒ Autre en fonction des spécificités.

4- Définition de la notion de standard, développement d'un système d'évaluation.

Les vecteurs AAVr sont connus pour être des véhicules de transfert de gènes efficaces dans des modèles animaux. Les caractéristiques attrayantes de ce système vecteur reposent principalement sur une expression du gène à long terme avec peu ou pas de toxicité suite à l'administration dans divers tissus (Xiao *et al.*, 1996) (Snyder *et al.*, 1997) (Flotte *et al.*, 1993) (Flannery *et al.*, 1997) (During *et al.*, 1998) (Le Meur *et al.*, 2007). Des essais cliniques chez l'homme démontrent un très bon profil de sécurité global, mais des problèmes de réponses immunitaires, de dissémination ou aussi d'intégration des vecteurs AAVr persistent. Actuellement, les conditions expérimentales et les doses administrées chez les animaux et les humains sont difficilement comparables à cause d'un manque de méthode systématique permettant d'évaluer les titres des lots de vecteurs injectés entre chaque essai (Flotte *et al.*, 1996) (Wagner *et al.*, 1998) (Kay *et al.*, 2000).

Aujourd'hui même si beaucoup de travaux impliquent l'AAVr-2, les essais précliniques utilisant les autres sérotypes continuent de se développer rapidement. Pour s'affranchir des variations apportées par le sérotype, les doses administrées sont classiquement basées exclusivement sur le titre en « *vector genome* » par ml. Les vecteurs génomes peuvent être titrés par PCR ou par dot blot (technique d'hybridation). Cependant ces techniques sont différentes, d'où l'idée d'inclure un standard interne au moment du dosage des vecteurs AAVr en suivant l'exemple du standard vecteur adénoviral (référence ATCC : VR-1516).

De plus, les résultats des essais *in vivo* utilisant différents sérotypes restent difficiles à interpréter, en partie à cause des variations inter-études des paramètres de dosage (le titre des vecteurs, les doses injectées, les promoteurs, et les transgènes). La nature défective des vecteurs AAVr rend difficile la détermination des particules infectieuses. Quand elle est possible, le titre en particules infectieuses est dépendant de la cellule utilisée pour la titration et donc difficilement comparable d'un sérotype à l'autre pour une même cassette d'expression.

L'homogénéisation des différents résultats serait possible par la mise en place de standards AAV qui permettraient de comparer les résultats des essais *in vivo* entre eux et pourraient servir de référence pour la caractérisation des lots d'AAVr cliniques.

B- L'émergence de nouveaux sérotypes nécessite le développement de nouvelles méthodes de caractérisation des vecteurs AAVr.

1- Développement d'anticorps monoclonaux spécifiques des capsides assemblées.

Le test Elisa développé par l'équipe de J.Kleinschmidt permet de doser à la fois les particules vides et pleines puisqu'il repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal A20 qui reconnaît les particules assemblées (Grimm and Kleinschmidt, 1999). Cet anticorps est spécifique du sérotype-2. Depuis, d'autres anticorps monoclonaux désignés ADK1a et b, ADK4 ou ADK5a et b qui réagissent spécifiquement avec les capsides des sérotypes-1/-6, -4 et -5, respectivement ont été produits. Ces anticorps reconnaissent exclusivement les capsides assemblées et non pas

les protéines dénaturées ou libres de la capsid (Kuck *et al.*, 2006). Ils permettent la caractérisation et la quantification des vecteurs AAV -1 et -6, AAV-4 ou AAV-5.

2- Connaissances des propriétés structurales des particules AAV en solution dans les conditions physiologiques.

La manipulation de la structure des particules AAV a comme intérêt majeur de pouvoir cartographier et comprendre l'implication des acides aminés de la capsid. L'intérêt étant d'exploiter l'information pour modifier le tropisme ou l'efficacité de transduction. Comprendre ces différents modèles architecturaux permettra d'optimiser le développement de ces vecteurs pour les applications en transfert de gènes.

La détermination de la structure tridimensionnelle des capsides virales de l'AAV des sérotypes-2, -4, -5 et celle à l'étude les sérotypes-1 et -8, donne des informations structurales importantes sur les virions dans une conformation basse énergie. Cependant, peu d'informations existent sur les propriétés du virion AAV en solution dans des conditions physiologiques (Van Vliet *et al.*, 2006).

2a. Cartographie des capsides AAV par des protéases.

Des études de digestion aux protéases de capsid AAVr ont permis de montrer des différences de sensibilité aux protéases d'un sérotype à l'autre. L'analyse protéolytique utilisant la trypsine et la chymotrypsine, permet de distinguer l'AAV-2 de l'AAV-1 et l'AAV-5 (cf figure 20) (Van Vliet *et al.*, 2006). Les capsides vides AAV-2 présentent une sensibilité plus grande à la trypsine et la chymotrypsine comparée aux capsides contenant de l'ADN.

Cette différence de sensibilité aux protéases peut être exploitée pour étudier les changements structuraux dynamiques qui surviennent au niveau de la capsid AAV pendant le cycle viral (Van Vliet *et al.*, 2006). Une autre étude récente montre une différence de coupure par les cathepsines entre l'AAV-2 et l'AAV-4 qui peut expliquer les différences observées entre le désassemblage de leur capsid et leur efficacité de transduction (Akache *et al.*, 2007).

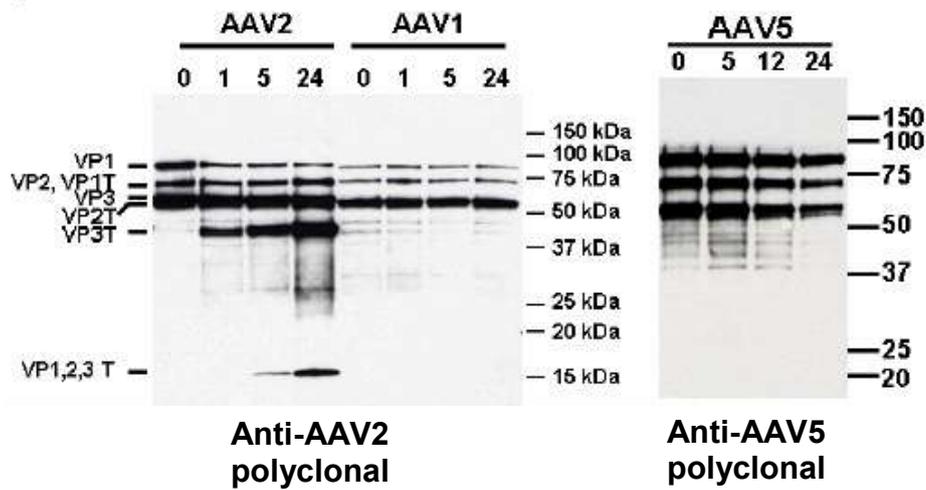


Figure 20 : Profil de digestion par la trypsine des capsides AAVr-2, -1 et -5 d'après VanVliet et al., 2006. L'incubation des virions à 37°C sans trypsine (0) ou traitées par 0,02% de trypsine pendant 1, 5 et 24 H montre que les capsides AAV-2 présentent un profil protéolytique différent des profils des capsides AAV-1 et -5.

2b. Identification du sérotype par son profil protéolytique de la capside.

L'analyse par digestion protéolytique des capsides AAV de différents sérotypes permet d'établir un profil de digestion unique pour chaque sérotype. Ce profil de digestion permet d'établir une sorte « d'empreinte protéolytique » propre à chaque sérotype (figure 21). Cette empreinte peut alors servir pour la validation de l'identité des capsides (Van Vliet *et al.*, 2006).

C. Influence des méthodes de production et purification sur l'efficacité de transduction *in vivo*.

Aujourd'hui, l'avancée des études *in vivo*, principalement chez le gros animal, montre qu'au-delà de l'efficacité de transduction des vecteurs AAVr et une expression à long terme aussi bien dans des cellules quiescentes qu'en division, les AAVr présentent une réponse inflammatoire et immunitaire faible. Elle serait due à leur capacité limitée à transduire les cellules dendritiques (Jooss *et al.*, 1998) et à la délétion de tous les gènes du génome viral.

Les premiers essais *in vivo* montraient une efficacité de transduction faible. Les études étaient bien souvent limitées aux petits animaux. En effet, un des principaux obstacles était un niveau limité de production des vecteurs AAVr et un degré de pureté insuffisant.

Grâce à des systèmes de production et de purification plus performants, des essais chez des gros animaux et en particulier les primates ont permis de confirmer l'efficacité des AAVr et leur persistance à long terme.

Pour répondre à de nouveaux besoins (l'administration de vecteurs à titres élevés *in vivo*, dans des organes comme le foie), il a fallu augmenter le titre et la concentration les préparations d'AAVr.

L'augmentation des titres des lots d'AAVr fait apparaître des limites de la solubilité et des phénomènes d'agrégaions des vecteurs concentrés (Huang, 2000) (Croyle *et al.*, 2001)

(Wright *et al.*, 2003) (Xie *et al.*, 2004). L'agrégation des vecteurs peut aussi influencer la biodistribution lors de l'administration *in vivo*, pouvant déclencher des réponses immunitaires indésirables contre le vecteur. Ces réponses immunitaires ont été reportées après administration des vecteurs en préclinique (Chenuaud *et al.*, 2004) (Flotte, 2004) (Gao *et al.*, 2004a) ou clinique (High, 2004). Plus récemment, des phénomènes de réactions immunitaires sont aussi apparus suite à des injections à haute dose de vecteurs (Sabatino *et al.*, 2005) (Manno *et al.*, 2006) (Brantly *et al.*, 2006).

Face à ces résultats, la nécessité de poursuivre l'optimisation des méthodes de purifications et les formulations apparaît comme un objectif prioritaire pour le développement de vecteurs AAVr.

Cette optimisation peut porter sur le développement de systèmes de purification par chromatographie échangeuse d'ions pour tous les sérotypes, qui éliminent les particules vides contaminantes (Urabe *et al.*, 2006b). Mais elle doit aussi rechercher des moyens efficaces qui évitent la formation d'agrégations dans les lots de vecteurs concentrés tout en maintenant la stabilité des lots stockés (Wright *et al.*, 2005) (Chahal *et al.*, 2007).

VII. Objectifs du travail de Thèse.

Le Laboratoire de Thérapie Génique de Nantes s'est donné comme mission de développer des vecteurs pour le transfert de gènes, avec comme finalité d'optimiser ces vecteurs pour des applications cliniques.

Pour répondre au mieux à ces attentes, le laboratoire s'est d'abord intéressé à l'étude de l'adénovirus et de l'*Adeno-Associated Virus* d'un point de vue fondamental avant d'étudier les vecteurs viraux qui en sont dérivés. En parallèle, un travail constant de recherche et de développement des techniques de production et de purification des vecteurs a permis leur amélioration. Grâce à ces approches, l'essentiel des projets de recherche du laboratoire repose désormais sur l'utilisation de l'*Adeno-Associated Virus* et les vecteurs qui en sont dérivés.

En effet, les AAVr présentent de nombreux atouts pour le transfert de gènes, qui ont été évalués dans de nombreuses études précliniques. Ces vecteurs sont faiblement immunogènes et peu toxiques. Ils sont capables de transduire efficacement et à long terme de nombreux organes et tissus hautement différenciés comme le muscle, le système nerveux central et le foie, et grâce à la découverte de différents sérotypes un organe cible peut être transduit de façon spécifique. Une seule administration a permis de corriger des maladies génétiques chez des modèles animaux.

Les essais cliniques en cours dans le monde sont encourageants même s'ils montrent la nécessité de perfectionner encore les méthodes de production et de purification des vecteurs AAVr.

L'une des stratégies du laboratoire repose sur le développement de lignées cellulaires stables pour la production d'AAVr comme alternative à la production classique de vecteurs par transfection transitoire. Le but recherché étant de simplifier les différentes étapes et de permettre une adaptation de la production à grande échelle qui répond aux exigences d'un usage clinique.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans cette thématique de recherche qui vise tout d'abord, à développer de nouveaux outils de productions des vecteurs AAVr en poursuivant le développement de lignées cellulaires stables d'encapsidation. J'ai ainsi contribué à l'établissement d'une lignée cellulaire stable d'encapsidation pour l'AAV de sérotype-5 avant de développer au laboratoire les lignées stables hybrides. Ces dernières expriment les protéines Rep de l'AAV de sérotype-2 et les protéines Cap d'un autre sérotype pour produire des vecteurs viraux hybrides de tropismes différents en fonction de l'organe ciblé en thérapie génique.

Dans un deuxième temps, j'ai également participé à la mise en œuvre d'une méthode de purification par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions adaptable aux différents sérotypes produits.

Enfin, mon séjour dans le laboratoire de Richard Snyder, à Gainesville, en Floride, m'a permis d'aborder l'aspect appliqué en participant à la production à grande échelle de vecteurs AAVr cliniques. De plus au cours de cette année, j'ai abordé un aspect plus fondamental avec Kim Van Vliet, conduisant à la caractérisation des capsides de vecteurs AAVr de différents sérotypes par une cartographie protéolytique de leurs capsides.

RESULTATS :

I. Etablissement de lignées cellulaires stables hybrides d'encapsulation.

A- Présentation du travail.

Comme nous l'avons abordé précédemment, la procédure classique de production des vecteurs AAVr consiste à co-transfecter de l'ADN sous forme plasmidique en transitoire dans des cellules HEK 293. Cette méthode ne permet pas de produire des lots d'AAVr à haut titre et n'est pas transposable à grande échelle pour une production en bioréacteur. En effet, les cellules cultivées sont adhérentes et, il est difficilement envisageable de transfecter des cellules en suspension dans les conditions actuelles décrites pour la culture en suspension.

Une alternative à cette méthode de production est l'établissement de lignées cellulaires stables, productrices. Deux étapes principales permettent d'obtenir ces lignées cellulaires productrices. Un premier clonage cellulaire permet l'intégration en stable des gènes *rep* et *cap* de l'AAVr sans les séquences ITRs, associé à un gène de résistance à un antibiotique comme la néomycine, qui permet de sélectionner les clones résistants (Clark *et al.*, 1995) (Chadeuf *et al.*, 2000) (Mathews *et al.*, 2002) (Gao *et al.*, 1998) (Gao *et al.*, 2002b). Un deuxième clonage cellulaire est effectué à partir des clones sélectionnés précédemment, en intégrant un plasmide vecteur, associé cette fois à un second gène de résistance à un antibiotique comme l'hygromycine. Les clones générés sont alors capables de produire efficacement des particules AAVr suite à une étape unique d'infection par un vecteur auxiliaire. La faisabilité du système a largement été démontrée par plusieurs équipes (Mathews *et al.*, 2002) (Farson *et al.*, 2004; Toublanc *et al.*, 2004).

Les lignées cellulaires stables d'encapsulation sont issues de deux types cellulaires, les cellules HeLa et A549. Pour ces deux lignées, seuls les gènes *rep* et *cap* de l'AAV-2 sous le contrôle de leurs promoteurs natifs sont intégrés. L'utilisation des promoteurs natifs de l'AAV pour diriger l'expression des gènes *rep* et *cap* s'est avérée essentielle puisque ces séquences

promotrices, et en particulier le promoteur p5 de *rep*, sont naturellement silencieuses en absence de virus auxiliaire. Les promoteurs sont réprimés par l'action de facteurs cellulaires et des protéines Rep (Beaton *et al.*, 1989) (Pereira *et al.*, 1997) (Shi *et al.*, 1991).

1- Etablissement d'une lignée cellulaire stable d'encapsidation pour l'AAV-5.

Actuellement, les vecteurs AAVr des différents sérotypes sont produits par transfection transitoire dans des cellules HEK293 selon la procédure décrite par Grimm *et al.*, (Grimm *et al.*, 1998). Pour s'affranchir de l'étape de transfection, nous avons démontré l'intérêt d'établir des lignées stables d'encapsidation pour le sérotype-2. Cette lignée stable d'encapsidation appelée HeRC32, permet de produire efficacement des AAVr et de façon reproductible. Ces cellules HeRC32 produisent plus de 10^5 particules d'AAVr par cellule, comparées aux cellules 293 retenues pour produire de façon performante des vecteurs AAVr, qui produisent seulement 6.10^3 particules par cellule après transfection transitoire du plasmide vecteur AAVr, du plasmide rep-cap et des fonctions adénovirales (Chadeuf *et al.*, 2000).

Sur le même principe que le clone HeLa *rep* et *cap* de sérotype-2, nous avons d'abord obtenu une lignée d'encapsidation pour le sérotype-5, appelée HeR5C5. Ce clonage cellulaire a consisté à transférer de façon stable le plasmide *rep* et *cap* du génome de l'AAV-5 délété des ITRs. Nous avons vérifié l'intégration des gènes *rep* et *cap* par PCR. Mais, l'analyse par Southern blot, après infection avec l'adénovirus, n'a pas montré d'amplification des gènes *rep* et *cap*. Parallèlement, nous n'avons pas pu détecter de particules d'AAVr produites à partir de cette lignée HeR5C5.

Les études faites avec la lignée cellulaire stable HeLa rep-cap de l'AAV-2, montrent qu'en présence d'un virus auxiliaire tel que l'adénovirus, les gènes *rep* et *cap* intégrés sont amplifiés au moins 100 fois (Clark *et al.*, 1995) (Chadeuf *et al.*, 2000) (Inoue and Russel, 1998) (Liu *et al.*, 2000). La capacité des lignées d'encapsidation à assembler efficacement des particules AAVr est corrélée au phénomène d'amplification, permettant une synthèse élevée des protéines Rep et Cap. Au laboratoire, nous avons montré qu'une région englobant le promoteur p5 était impliquée dans ce phénomène d'amplification (Nony *et al.*, 2001) (Francois *et al.*, 2005).

Nous avons alors produit la lignée stable hybride pour les gènes *rep2/5* et *cap5*. Cette lignée n'assemblait que faiblement les particules d'AAVr. Elle présentait des caractéristiques différentes de la lignée homologue AAV-5, à savoir que les gènes *rep2/5 cap5* sont détectés et amplifiés après une infection par l'adénovirus. L'analyse par western blot a montré que des protéines Rep et Cap étaient synthétisées après infection par l'adénovirus, mais le profil d'expression des protéines Rep78/68 ne correspond pas à celui obtenu pour la lignée HeRC32.

2- Principe du système hybride *rep* de l'AAV-2 et *cap* du sérotype d'intérêt.

L'isolement continu de nouveaux sérotypes AAV et leur utilisation en transfert de gène a montré qu'ils présentaient tous un tropisme différent, et bien souvent plus spécifique que l'AAV-2. La plupart des essais *in vivo* recherche le sérotype optimal à leur modèle animal. Des études comparatives de plusieurs sérotypes ont été menées afin de déterminer le sérotype optimal pour un organe donné (Burger *et al.*, 2004). Pour limiter les paramètres qui peuvent intervenir dans l'efficacité de transduction entre plusieurs sérotypes, des vecteurs AAVr pseudotypés ont été développés. Le principe est de conserver le même plasmide vecteur portant le gène d'intérêt à transduire, bordé des séquences ITR du sérotype-2. Un plasmide auxiliaire porte les gènes *rep* et *cap* et les fonctions adénovirales. Dans ces plasmides dit auxiliaires seul le gène *cap* diffère et correspond au sérotype choisi, le gène *rep* issu de l'AAV-2 est conservé (Grimm *et al.*, 1998). Lors de la production, les protéines fonctionnelles Rep78/68/52/40 de l'AAV-2, initient la répllication à partir des séquences ITR du sérotype-2 présentes *in cis* sur le plasmide vecteur.

Sur le principe du système hybride, nous avons décidé d'établir des lignées stables d'encapsulation pour les sérotypes-1 (HeLa rep2-cap1) et -5 (HeLa rep2-cap5).

3- Etablissement de lignées hybrides HeLa *rep2-cap5* et HeLa *rep2-cap1*.

En mettant à profit cette propriété, nous avons établi des lignées stables d'encapsulation dans lesquelles une partie ou tout le gène *rep* de l'AAV-2 était fusionné avec le gène *cap* de l'AAV-1 ou l'AAV-5. Nous avons montré que les lignées cellulaires hybrides obtenues sont capables d'assembler efficacement des particules AAVr.

B- Matériels et Méthodes.

1- Cellules et virus.

Les clones cellulaires stables HeR2/5C5, HeR2C5, HeR2C1 ont été obtenus en co-transfectant le plasmide pR2/5C5, pspR2C5, pspR2C1 respectivement et le plasmide pPGK-Néo apportant la résistance à la généticine (G418, Gibco BRL) (avec un rapport 10/1). Les clones individuels ont été sélectionnés et amplifiés dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Sigma), supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Hyclone) et 1% de pénicilline et streptomycine (Gibco BRL, 5000 U/ml).

Le virus auxiliaire utilisé était un adénovirus sauvage de type 5 (ATCC VR-5) produit au laboratoire selon la procédure standard, par amplification sur des cellules HEK 293 et titré sur ces mêmes. Le titre infectieux est exprimé en PI/ml déterminé par la technique de RCA (*Replicatif Center Assay*.)

Les amorces PCR choisies pour pXR5-1 (5'-CAACAAGGTGGTGAATCCG-3') et pXR5-2 (5'-TCTTCCAACCAATCTGGAGG-3') correspondent respectivement aux positions 425-445 et 1155-1175 de l'ORF de Cap de l'AAV de sérotype-5 sauvage. Cette PCR sélectionne les clones de la lignée cellulaire HeR2/5C5 et amplifie un fragment de 750 bp. Pour les autres lignées cellulaires, nous avons utilisé les mêmes amorces Rep2 (5'-CGAGATTGTGATTAAGGTCC-3') et Rep4 (5'-CCGCATATTGGGGATCGTAC-3') qui correspondent respectivement aux positions 335-355 et 1238-1257 dans l'ORF de Rep de l'AAV-2, et qui amplifie un fragment de 923 bp.

Les AAV recombinants produits à partir des différentes lignées cellulaires ont été titrés sur les cellules HEK293, HeRC32 et HeR5C5.

2- Constructions plasmidiques.

Le plasmide pR2/5C5 correspond au plasmide pXR5 construit au laboratoire de J.Samulski (Rabinowitz *et al.*, 2002). Les plasmides pspR2C5 et pspR2C1 proviennent des plasmides pDF5 and pDF1 obtenus par J.Kleinschmidt. Le plasmide pDF5 a été digéré par *BstEII* en partie 5' du gène *rep* de sérotype-2 et *Clal* à la fin du gène *cap* de sérotype-5. Le

fragment *BstEII/ClaI* obtenu a été cloné dans le plasmide psp72 (Promega) linéarisé par digestion *PvuI/ClaI*, la partie 5' du gène *rep* de sérotype-2 provient du plasmide psp72RC sérotype-2 par digestion *PvuI/BstEII*. En suivant la même stratégie pour le plasmide pspR2C1, nous avons digéré le plasmide pDF1 par *SfiI* en 5' du gène *rep* de sérotype-2, et par *ClaI* en 3' du gène *cap* de sérotype-1, les plasmides psp72 et psp72RC ont été linéarisés par digestion *PvuI/ClaI* et *SfiI/PvuI*, respectivement. Les gènes *cap* sont sous le contrôle du promoteur p40 de l'AAV-2. Pour les plasmides pDF5 et pDF1, les gènes *cap* ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN viral sauvage. Le gène *cap* de l'AAV-2, provenant du pDG par digestion *SwaI/ClaI*, est remplacé par les gènes *cap* des AAV-1 et -5 (Grimm *et al.*, 2003a).

Les séquences *rep-cap* des AAV-1, -2 et -5 ont été clonées dans le plasmide pSP72 (Promega). Le plasmide pR1C1 contient les nucléotides 135 à 4584 de l'AAV-1 (Genbank #NC_002077), obtenu par sous-clonage du fragment *HindIII/AvrII* à partir du plasmide pAV1H (Xiao *et al.*, 1999) entre les sites *HindIII* and *XbaI* de pSP72. Le plasmide pR2C2 contient les nucléotides 188 à 4484 de l'AAV-2 (Genbank #NC_001401) et a été précédemment appelé pspRC (Chadeuf *et al.*, 2000). Il a été obtenu par sous-clonage d'un fragment *XbaI* à partir de pSub201 (Samulski *et al.*, 1989) dans le site *XbaI* de pSP72. Le plasmide pR5C5 contient les nucléotides 258 à 4447 de l'AAV-5 (Genbank #AF085716). La séquence *rep-cap* a été excisée par digestion *NotI/SpeI* de pAAV5-2, qui contient le génome de l'AAV-5 sans les ITR, clonée dans le pBluescript SK+ (provenant de J.A.Chiorini), puis dans pSP72 par *HindIII* et *XbaI*.

Les séquences codant pour les protéines Rep68 de l'AAV-2 et Rep78 de l'AAV-5 ont été clonées dans les sites *NdeI/BamHI* du vecteur d'expression pET-19b (Novagen). Le système pET permet l'expression des protéines recombinantes dans E.coli.

3- Extraction de l'ADN génomique et analyse par PCR et Southern-blot.

L'ADN génomique totale des clones est extrait par lyse des cellules dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM ; NaCl 100 mM ; sodium dodécyl sulfate (SDS) 1% contenant 500 µg/ml de protéinase K (Eurobio). Après digestion sur la nuit à 56°C, l'ADN est extrait par deux phénol-chloroforme successifs et précipité à l'isopropanol.

Une première sélection des clones est faite par PCR à partir de 5 µl des ADN génomiques dilués au 1/10^{ème} et 1/50^{ème}. Les réactions de PCR sont réalisées avec la Taq polymérase (Gibco BRL) pendant 30 cycles (30 sec à 94°C, 30 sec à 60°C, 30 sec à 72°C), dans un thermocycler Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 9600).

Pour l'analyse en Southern-blot, les ADN des clones HeR2/5C5(HeXR5) et HeR5C5 sont digérés par *BamHI* pour libérer un fragment de 1,4 Kb et par *EcoRI* pour libérer un fragment de 1,6 Kb pour les ADN des clones HeR2C2, HeR2C1 et HeR2C5. Les ADN sont migrés sur un gel d'agarose à 0,8% et transférés en conditions alcalines (NaOH 0,4 N) sur une membrane Hybond N⁺ (Amersham). La membrane est hybridée avec une sonde *rep* marquée à la fluorescéine (*Gene Images random prime labeling module*; Amersham Biosciences) et incubée à 65°C sur la nuit. La sonde *rep* est issue de psp72RC par digestion *SfiI/BamHI*, donnant un fragment à 509 bp en partie 5' de l'AAV-2, sauf pour le clonage de la lignée cellulaire HeR5C5 où la sonde provient de la digestion *BamHI* de pBS/RC5 (Chiorini), donnant un fragment de 1443 bp correspondant au gène *rep* de l'AAV-5.

Après hybridation, la membrane est lavée en SSC 1X (NaCl 0.15 M, Citrate de Sodium 0,015 M ; Research Organics)- SDS 0,1% puis en SSC 0,5X- SDS 0,1%, pendant 15 min à 65°C pour chaque lavage. La membrane est manipulée selon le protocole de détection « *Gene Images CDP-Star detection* » ; Amersham) et exposée contre un film autoradiographique.

4- Analyse par western-blot.

Pour la détection des protéines Rep et Cap, les protéines totales sont extraites par lyse des culots cellulaires en présence ou non d'adénovirus, dans un tampon Tris-HCl 10 mM ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM ; Nonidet P-40 1% ; déoxycholate de sodium 0,5%, SDS 0,1% pH 7,5, supplémenté par un cocktail d'inhibiteurs de protéases « *Complete* » (Roche, Mannheim). Après deux heures d'extraction sur la glace et centrifugation 5 min/15000 rpm/4°C, les concentrations en protéines sont estimées par le Kit « *BioRad Protein Assay reagent* » (Biorad). L'équivalent de 10 µg de protéines sont déposés par puits pour chaque échantillon et séparés par électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide 10% en présence de SDS, puis transférés sur membrane de nitrocellulose ECL (Amersham Biosciences). Les protéines Rep et Cap sont détectées par les premiers anticorps 303.9 et B1 respectivement, dilués au 1/20 (fournis par J.Kleinschmidt, DKFZ- Heidelberg) comme décrit précédemment (Chadeuf *et al.*, 2000). L'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase et la révélation se fait par le Kit de détection de chimiluminescence activée (ECL, Amersham). La membrane est alors exposée contre un film autoradiographique.

5- Réaction de coupure (*Nicking assay*).

Les réactions endonucléases des protéines Rep sont effectuées sur des substrats d'ADN double brin. L'ITR AAV-5, un fragment de 211 bp, est isolé par digestion *EcoRI-BglII* du plasmide pR5C5 (donné par J. A. Chiorini). Le promoteur p7 de l'AAV-5, un fragment de 247 bp est isolé par digestion *NotI-SwaI* du plasmide pR5C5. L'ITR de l'AAV-2, un fragment de 180 bp est isolé par digestion *PvuII-XbaI* du plasmide pSub201. Le promoteur p5 de l'AAV-2, un fragment de 160 bp isolé par digestion *PpuMI-PpuMI* du plasmide pCARE.LZ (Nony *et al.*, 2001). Les fragments de restriction sont déphosphorylés, purifiés sur gel d'agarose et marqués en bout 5' à 37°C, dans un volume de réaction de 30 µl contenant 50 µCi d'ATP [γ -³²P] (5,000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) et 10 U de polynucléotides kinase T4 (New England Biolabs). Après 20 minutes à 65°C pour inactiver la kinase, les nucléotides non incorporés sont éliminés sur une colonne G-25 Sephadex (Amersham Pharmacia Biotech). Le fragment ITR AAV-2 est digéré par *BglII*, de sorte que seul le brin coupé reste marqué. Le fragment p5 est digéré par *BbrPI* ou *MspI* pour enlever soit le brin codant marqué, soit le brin non codant non marqué respectivement. Tous les substrats sont purifiés sur gel PAGE, élués du gel dans un tampon Tris-EDTA, précipités à l'éthanol et repris dans 10 µl d'eau. Les concentrations finales des substrats ADN sont déterminées sur la base de l'activité spécifique, quantifiées sur une microplaque au compteur à scintillation (TopCount, Packard).

Les réactions de coupure sont effectuées dans 20 µl de réaction contenant 25 mM HEPES-KOH (pH7.5), 6.25 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 1 µg poly(dIdC), 0.2 ng de sérum albumine bovine, 2000 cpm de substrat ADN radiomarké et 3 picomoles soit de Rep68 AAV-2, soit de Rep78 AAV-5. Après 1h à 37°C, les produits de réaction digérés par la protéinase K, sont extraits au phénol-chloroforme, précipités à l'éthanol et séparés sur gels dénaturants 6% de polyacrylamide contenant 50% d'urée. Les gels sont séchés et exposés contre un film autoradiographique à - 80°C

6- Production, purification et titration des vecteurs AAVr.

Les différentes lignées hybrides d'encapsidation sont testées pour leur capacité à produire des vecteurs AAVr. Pour toutes ces lignées, les vecteurs sont générés par transfection d'un plasmide vecteur, suivit d'une infection par un vecteur auxiliaire l'adénovirus. Les plasmides vecteurs pAAVCMVnlsLacZ et pAAVCMVGFP sont flanqués des ITR de sérotype-2 pour les AAVr produits à partir des lignées HeR2C2, HeR2/5C5, HeR2C5, HeR2C1, et des

ITR de sérotype-5 pour la lignée cellulaire HeR5C5. Les plasmides sont transfectés, soit par la méthode ExGen 500 (Euromedex) ou par une précipitation standard au phosphate de calcium. 30 µg de plasmide vecteur sont transfectés pour l'ExGen dans un milieu DMEM sans SVF, ni antibiotique, et 12,5 µg avec la précipitation au phosphate de calcium. Cinq ou six heures après, les cellules sont infectées par l'adénovirus à MOI : 50 dans du milieu DMEM 5% SVF, 2,7 g/l de glucose. 48 H après, les cellules sont récoltées et reprises dans un tampon de lyse. Les AAVr sont extraits par trois cycles de congélation/décongélation et les débris cellulaires sont éliminés par deux centrifugations successives à 3000 rpm/15 min/4°C et 10,000 G/10 min/4°C. Les AAVr sont purifiés par ultra-centrifugation sur gradient de ClCs suivant la procédure standard (Salveti *et al.*, 1998). Nous avons ajouté un second gradient de ClCs pour améliorer la pureté des préparations AAVr. Les lots d'AAVr sont titrés par Dot Blot, *Replication Center Assay* (RCA) et *Transducing Units* (TU) (Salveti *et al.*, 1998). Les cellules HeRC32 ont servi à titrer les particules infectieuses de tous les lots d'AAVr, excepté les AAVr produits à partir des cellules HeR5C5, où les particules infectieuses sont titrées sur les cellules HeR5C5.

Afin d'homogénéiser la nomenclature des lignées cellulaires, la lignée de référence HeRC32 correspondant au sérotype-2 est ici appelée HeR2C2.

7- Réplication *in vivo* des plasmides contenant les séquences rep-cap des AAV-1, -2, -5.

Les cellules HEK293 ensemencées en plaque 6 puits, sont transfectées avec 2 µg de plasmide rep-cap par précipitation standard au phosphate de calcium. Après 6h, les cellules sont infectées (ou non) avec de l'adénovirus de type 5 à MOI 10 particules infectieuses par cellule. Les cellules sont récoltées 48h après et l'ADN total est extrait et digéré soit par *DpnI* soit par *MboI*. Les produits de digestion sont ensuite séparés sur gel d'agarose 1% et analysés par Southern-blot avec une sonde spécifique du plasmide pSP72 (fragment *XmnI-NdeI* de 575 bp). Les signaux d'hybridation sont détectés par autoradiographie avec le système de détection Gene Images CDP-Star (Amersham Biosciences).

8- Expression et purification de la protéine Rep78 fusionnée à un marqueur Histine.

Les protéines Rep68 de l'AAV-2, fusionnées à dix groupements Histine (His₁₀) en N-terminal, sont exprimées dans les bactéries *E. Coli* BL21(DE3) pLysS et purifiées en conditions natives, par chromatographie sur colonne d'agarose Nickel-NTA (Qiagen). Selon le même protocole, les protéines de fusion Rep78 de l'AAV-5 sont produites à partir des bactéries BL21pLysS préparées et induites conformément aux instructions du fabricant (Novagen). Les protéines sont purifiées sur une colonne de Nickel. Les bactéries sont lysées par une sonication sur la glace et les extraits cellulaires clarifiés sont incubés avec de l'agarose lié à un groupement *Ni-nitrilotriacétique acid* (Ni-NTA) (Qiagen) pendant 1 h à 4°C, suivis d'une élution par du tampon d'imidazole 250 mM contenant 50 mM NaH₂PO₄/300 mM NaCl (pH 8). Une protéine β-galactosidase marquée à l' His₁₀ est exprimée et purifiée dans les mêmes conditions et sert de contrôle négatif. Les protéines éluées sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, colorées au bleu de Coomassie et quantifiées par le dosage de BioRad Protein Assay reagent. Les protéines purifiées Rep68 d'AAV-2 sont désalées sur colonne PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech) dans un tampon contenant 25 mM Tris-HCl (pH7.5), 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% NP40 et 20% glycérol. Les protéines purifiées Rep78 de l'AAV-5 sont dialysées en PBS 1X/15% glycérol, aliquotées et conservées à -80°C. Nous avons vérifié la spécificité de Rep68 de l'AAV-2 et de Rep78 de l'AAV-5 sur western-blot avec un anticorps anti-Rep 303.9 comme décrit précédemment.

9- Analyse *in vivo*.

Les préparations d'AAVr-1, -2, -5, sont testées *in vivo* par injections intramusculaires de souris Black10 âgées de six semaines, sous anesthésie par injection intrapéritonéale de Kétamine/Xylamine (100mg/kg, respectivement). Pour les vecteurs AAVCMVnlsLacZ de sérotypes-2 et -5, 3.10⁸ particules dans 25 µl et, pour le sérotype-1, 5.10⁷ particules dans 25 µl, sont respectivement injectées dans le muscle tibial antérieur, avec une seringue Hamilton 50 µl/aiguille de 30 gauge. Les souris sont sacrifiées 3 semaines après l'injection et les muscles sont traités et analysés comme décrit précédemment (Favre *et al.*, 2000).

C- Résultats.

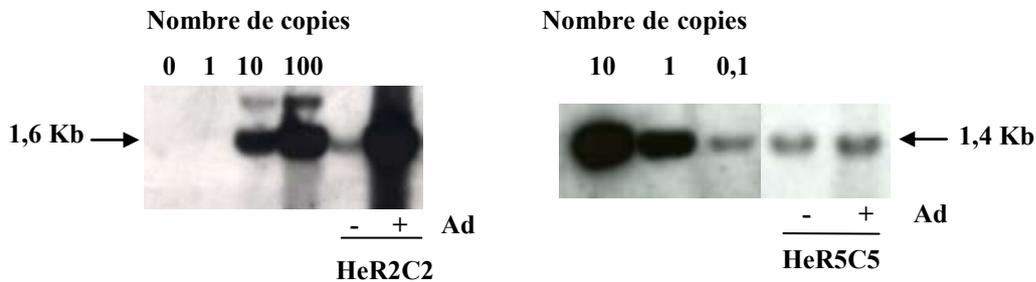
1- Caractérisation de la lignée stable d'encapsulation HeR5C5 obtenue.

Nous avons testé la lignée cellulaire d'encapsulation HeR5C5 pour sa capacité à produire des vecteurs AAV5 GFP, comparée à la lignée HeR2C2. Aucune particule virale n'a pu être détectée. Pour produire des vecteurs AAVr à partir de cette lignée homologue AAV-5, le plasmide vecteur transfecté doit posséder les séquences ITR de sérotype-5. Contrairement aux autres sérotypes, les protéines Rep de l'AAV-5 ne peuvent encapsider un génome avec les ITR de l'AAV-2 (Chiorini *et al.*, 1999a). Le site de coupure *trs* (AGTG TGGC) identifié dans l'ITR de l'AAV-5 est différent dans les ITR des autres sérotypes AAV (Chiorini *et al.*, 1999a).

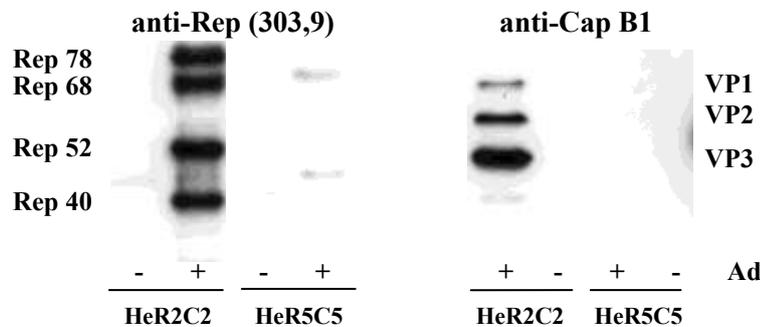
Cell line	DOT BLOT P/ml	RCA PI/ml	GFU TU/ml
HeR2C2	$1,9 \cdot 10^{10}$	$1,6 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$
HeR5C5	ND	ND	ND

Tableau 1: Résultats de production d'AAV2GFP à partir des cellules HeR2C2 et d'AAV5GFP à partir des cellules HeR5C5.

Afin de comprendre pourquoi la lignée HeR5C5 ne produisait pas de particules AAVr détectables, nous avons analysé cette lignée par Southern blot et par western blot après infection ou non par de l'adénovirus. Contrairement à la lignée HeR2C2, aucune amplification du génome *rep-cap* n'est observée en présence d'adénovirus. L'analyse par western blot (figure1) montre qu'aucune protéine Rep et Cap n'est synthétisée après infection adénovirale.



Southern blot



Western blot

Figure 1: Le Southern blot montre qu'il n'y a pas d'amplification du gène *rep*, suite à une infection adénovirale des cellules. De la même façon, les protéines Rep et Cap ne sont pas détectées par les anticorps anti-Rep et anti-Cap.

Nous avons rappelé précédemment qu'un assemblage efficace des particules d'AAVr dans les cellules HeR2C2 est corrélé avec une amplification du génome *rep-cap* d'environ 100 fois. L'analyse de la séquence du gène *rep* de l'AAV-5 révèle que la séquence CARE du promoteur p5 de l'AAV-2 impliquée dans le phénomène d'amplification (Nony *et al.*, 2001) n'est pas présente.

Des réactions de réplication *in vivo* de plasmides contenant les séquences *rep-cap* des AAV hybrides de sérotypes-1, -2 et -5, montrent que les plasmides sans les ITR des sérotypes-1 et -2 peuvent se répliquer dans les cellules 293, alors que le plasmide du sérotype-5 ne se

réplique pas (figure2). Sur le Southern blot suivant, la digestion par MboI révèle l'ADN répliqué alors que la digestion par DpnI ne coupe que l'ADN méthylé produit par les bactéries.

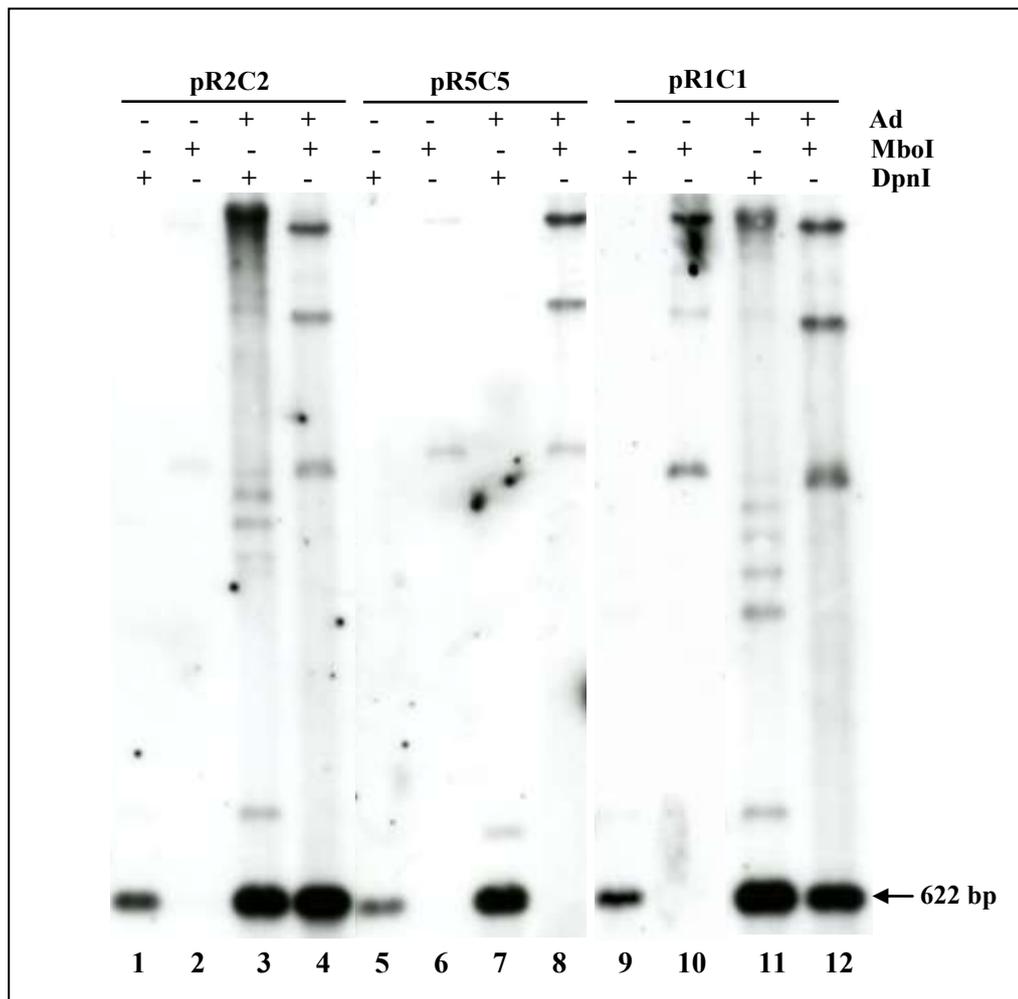


Figure 2 : Test de répllication *in vivo* pour les gènes *rep* de chaque sérotype-1, -2, -5 dans les cellules 293.

Le test de répllication du plasmide pR5C5, montre que la digestion par MboI ne fait pas apparaître de bande à 622 pb en présence d'adénovirus (piste 8, fig 2), signifiant qu'il n'y a pas eu de répllication dans les cellules 293. Le plasmide pR2C2, contrôle positif de répllication en présence d'adénovirus, fait apparaître une bande de 622 bp, produit de digestion par MboI (piste 4, fig2). En absence d'adénovirus, ce fragment est présent après digestion par DpnI pour les trois plasmides pR2C2, pR5C5 et pR1C1 (piste 1, 5 et 9) et sert de contrôle positif de

transfection. Le test de réplication du plasmide pR1C1 donne un profil identique au sérotype-2, traduisant une réplication *in vivo* dans les cellules 293.

Nous avons analysé *in vitro*, l'activité de coupure de la protéine Rep 78 de l'AAV-5 comparée à celle de la protéine Rep 68 de l'AAV-2 sur deux substrats différents : les séquences ITR et les promoteurs *rep* des sérotypes-2 et -5. Dans cette expérience, nous avons pu vérifier la spécificité de la protéine Rep de l'AAV-2 et la protéine Rep de l'AAV-5. Sur le blot suivant (figure 3), on peut voir que Rep 68 de l'AAV-2 coupe uniquement le substrat ITR de l'AAV-2 (ITR-2, piste 2), et Rep 78 de l'AAV-5, le substrat ITR de l'AAV-5 (ITR-5, piste 1), mettant ainsi en évidence la spécificité de chaque « grande » Rep, comme cela a été décrit dans la littérature (Chiorini *et al.*, 1999a). Les bandes de coupure sont indiquées par les flèches.

Pour le sérotype-2, le promoteur p5 du gène *rep* de l'AAV-2 sert de contrôle positif avec apparition d'une bande en présence de la protéine Rep 68 de l'AAV-2, correspondant au site de coupure *trs* localisé dans la séquence CARE (p5N, piste 2). Contrairement au fragment *rep* de l'AAV-5, qui en présence de la protéine Rep78 de l'AAV-5, ne montre pas de signal correspondant à une coupure (p7, piste 1). Le site *trs* n'est pas retrouvé au niveau du promoteur p7 de l'AAV-5. La région CARE identifiée en 5' du gène *rep* de l'AAV-2 n'existe pas dans le génome de l'AAV-5.

Il apparaît donc que la région CARE au niveau du promoteur p5 de l'AAV-2 est un élément essentiel dans l'établissement de lignée stable d'encapsidation. Cette région responsable du phénomène d'amplification du génome de l'AAV-2, doit être conservée dans les futures constructions plasmidiques utilisées pour établir les lignées cellulaires.

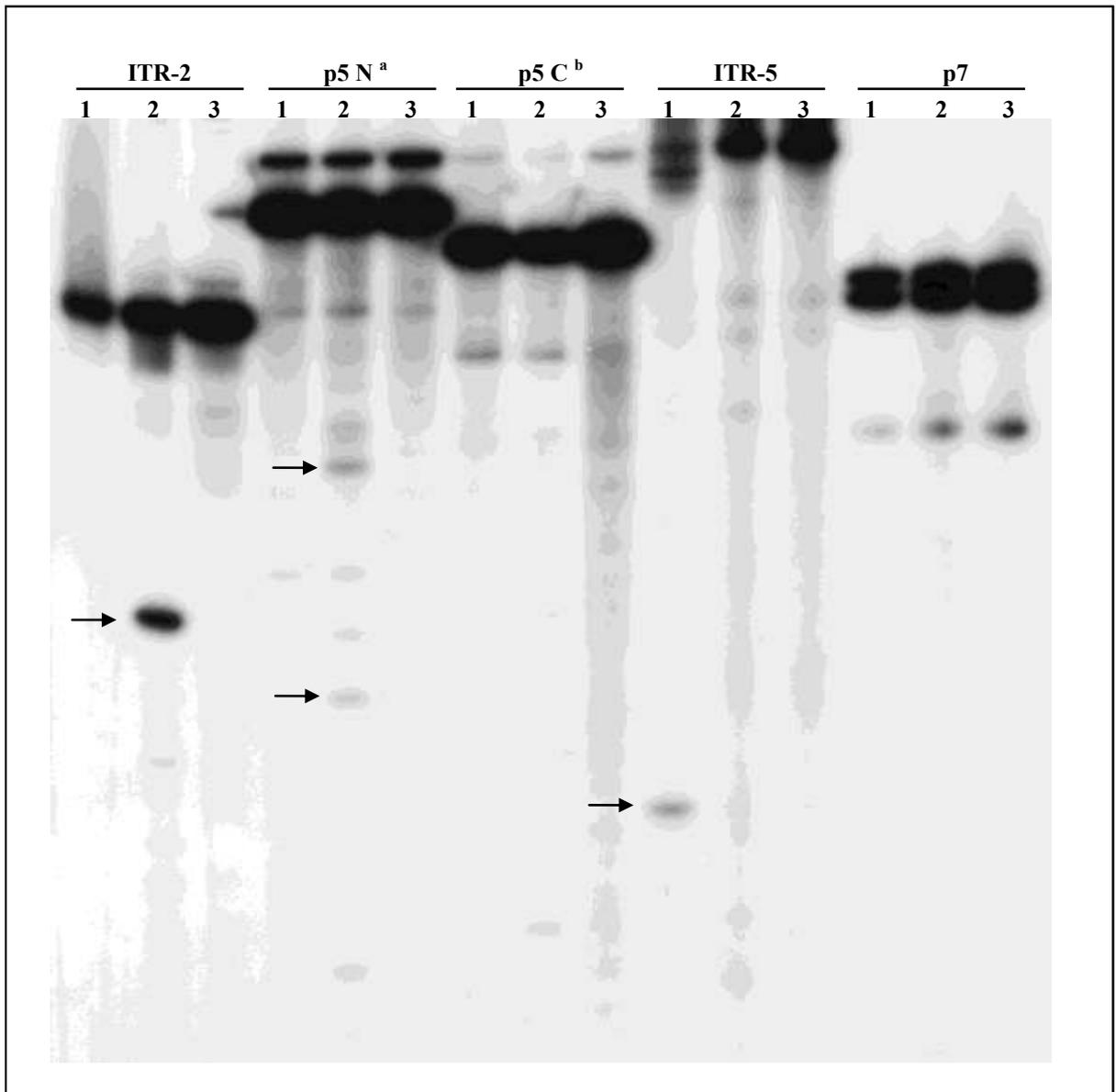


Figure 3. Activité de coupure de la protéine Rep78 de l'AAV-5 et de la protéine Rep 68 de l'AAV-2 sur les substrats ITRs et promoteurs *rep* des deux sérotypes.

a N: brin non-codant, b C: brin codant

1: AAV-5 Rep78, 2: AAV-2 Rep68, 3: β-galactosidase.

2- Etablissement de lignées cellulaires hybrides d'encapsulation.

Nous avons mis à profit les résultats obtenus pour le sérotype-5 pour établir des lignées cellulaires stables d'encapsulation pour d'autres sérotypes que l'AAV-2. A savoir que

la condition requise pour assembler efficacement des particules AAVr est la présence de la région CARE au niveau du gène *rep* de l'AAV-2. Pour cela nous avons construit différents plasmides pour lesquels le gène *rep* correspondant au sérotype-2 est fusionné au gène *cap* des sérotypes -5 ou -1. Avec dans un premier temps pour le sérotype-5, un plasmide hybride au niveau du gène *rep* où la partie 5' jusqu'au promoteur p19 de sérotype-2 est fusionnée à la partie 3' du gène *rep* de sérotype-5. Le schéma ci-contre représente les différents plasmides qui ont permis de générer les lignées correspondantes. Pour les systèmes hybrides, la région CARE est représentée au niveau de la partie 5' issue de l'AAV-2

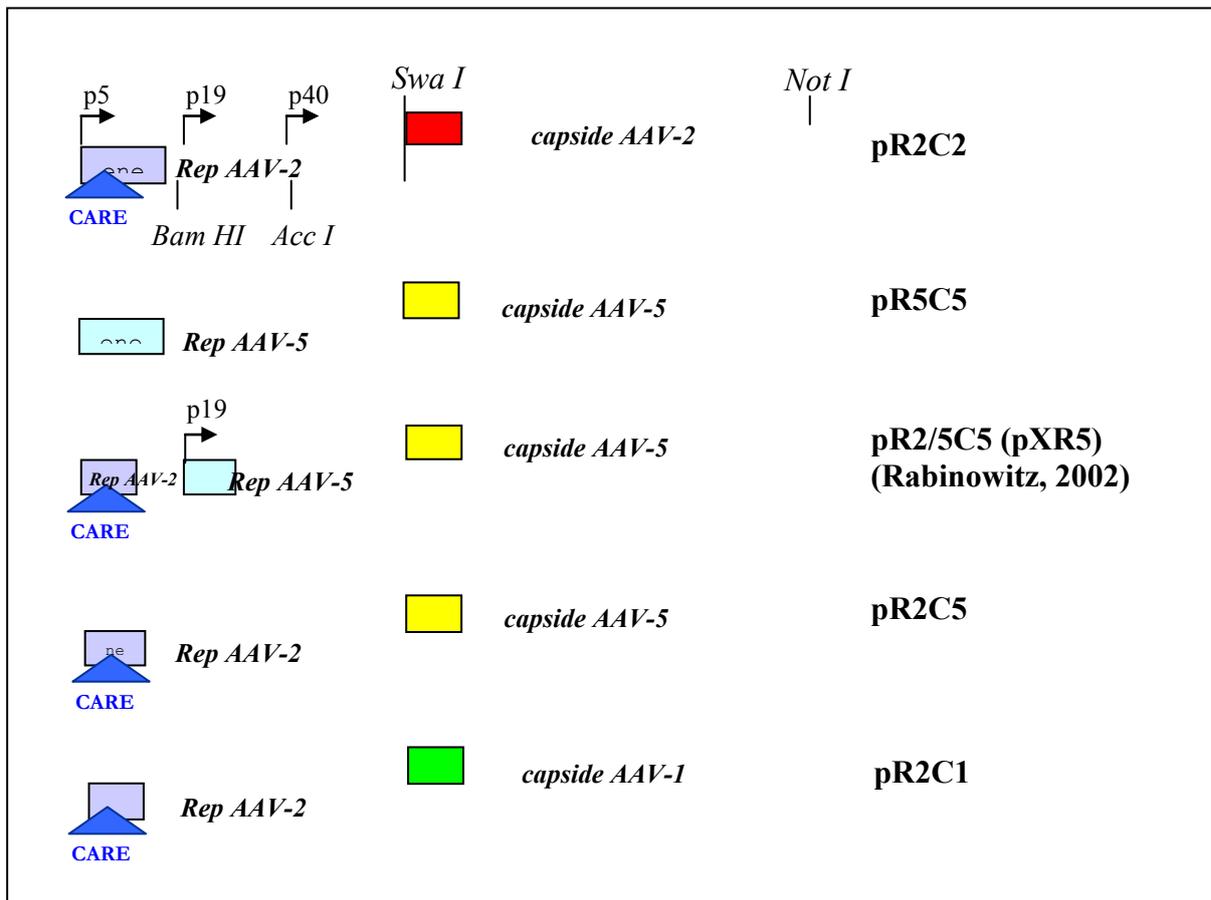


Figure 4 : Plasmides transfectés pour générer des lignées stables de sérotype-1 et -5.

3- Sélection des clones stables hybrides.

La sélection des clones s'est faite selon un schéma précis. Les clones résistants sont d'abord testés en PCR pour la recherche du gène *rep-2*. Puis les clones PCR, positifs pour le gène *rep-2*, sont infectés ou non par de l'adénovirus. Pour une partie des cellules, l'ADN génomique est extrait et analysé en Southern-blot. Les clones retenus sont ceux qui montrent une amplification de l'ordre de 100 fois du gène *rep* en présence d'adénovirus. Parallèlement, les protéines sont extraites à partir de l'autre moitié des clones cellulaires et analysées par Western-blot. Le marquage par des anticorps anti-Rep et anti-Cap montre que la synthèse des protéines Rep et Cap en présence d'adénovirus est corrélée à l'amplification du génome *rep-cap*. Ainsi les clones pour lesquels le génome *rep-cap* est amplifié en présence d'adénovirus, expriment aussi les protéines Rep et Cap. Ci-contre, un clone de chaque lignée hybride établie HeR2/5C2, HeR2C5 et HeR2C1 est représenté avec pour référence les lignées cellulaires HeR2C2 et HeR5C5 (contrôles positif et négatif d'amplification).

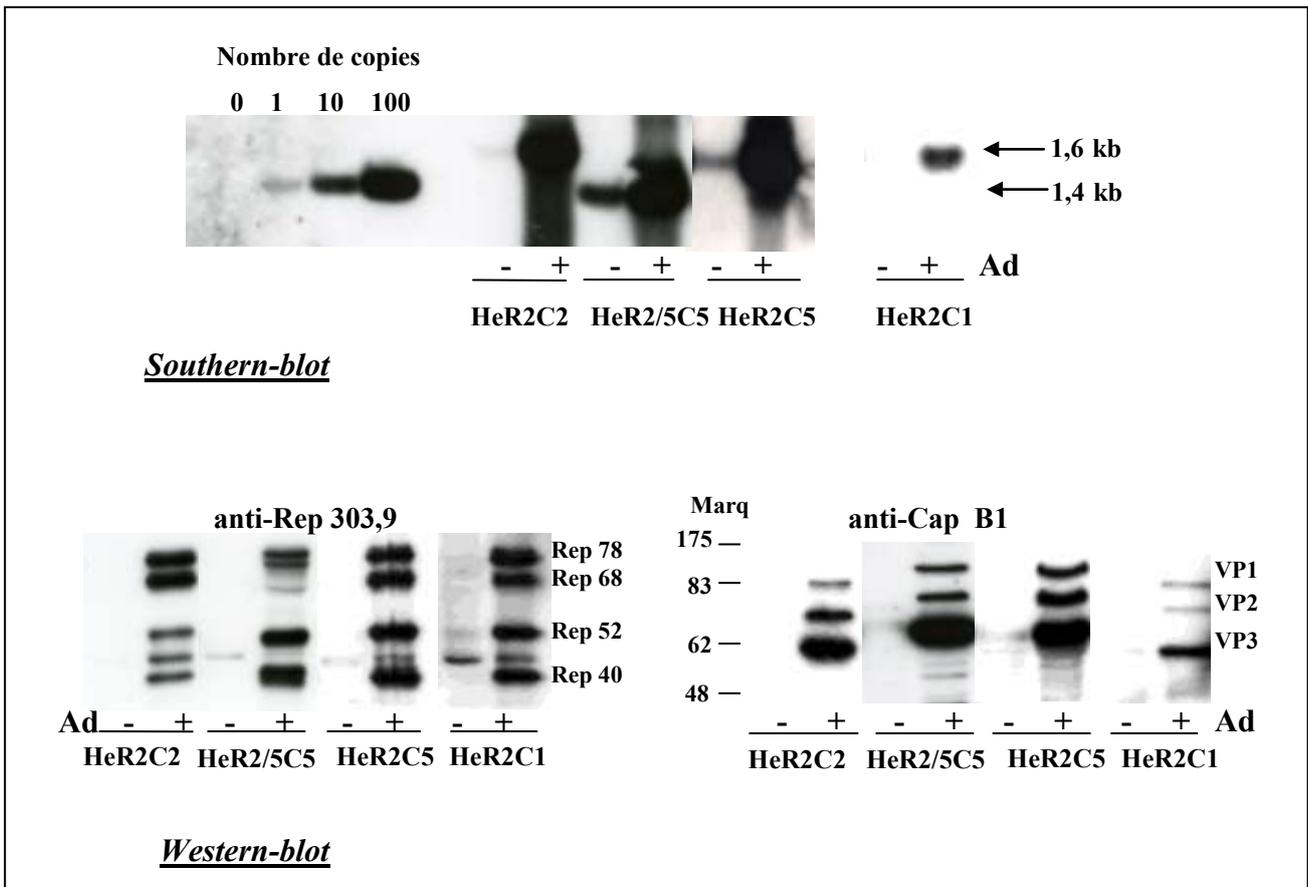


Figure 5 : Analyse des clones par Southern blot et western blot.

Pour le clonage cellulaire HeR2/5C5, le profil de synthèse des protéines Rep ne correspond pas à celui du sérotype-2. Cette différence n'est pas surprenante puisque que le plasmide transfecté correspond à un hybride des gènes *rep* de l'AAV-2 et de l'AAV-5. C'est-à-dire que les protéines Rep78/68 sont initiées par le promoteur p5 de l'AAV-2, alors que les petites Rep52/40 sont initiées par le promoteur p19 de l'AAV-5. Sur le Southern blot, la protéine Rep68 ne migre pas à la taille attendue et on observe au niveau de la protéine Rep78, la présence d'un doublet.

4- Evaluation des clones sélectionnés.

4-1- Test de production des vecteurs AAVr.

Nous avons retenu plusieurs clones issus du clonage cellulaire de chaque lignée hybride. Nous les avons alors testés pour connaître leur capacité à produire des vecteurs AAVr. Tous ne produisent pas efficacement des particules d'AAVr, malgré une forte amplification des gènes *rep-cap* après infection adénovirale.

Dans le tableau ci dessous, sont représentées les productions de vecteurs d'AAVr à partir de chaque lignée hybride. Nous considérons la lignée HeR2C2 correspondant au sérotype-2, comme la lignée de référence capable de produire efficacement des vecteurs, elle sera notre contrôle positif. A l'inverse, pour la lignée homologue AAV-5, nommée HeR5C5 aucune particule AAVr n'est détectée, elle sera notre contrôle négatif. Nous avons exprimé les productions en particules par cellule pour nous affranchir de l'étape limitante de transfection apportant le plasmide vecteur. En effet, les cellules HeLa se transfectent très mal (de l'ordre de quelques pourcents). Ce qui entraîne une faible production de vecteurs AAVr. L'estimation la plus juste est d'exprimer le titre par cellule transfectée.

Le titre exprimé en particules génome par cellule (dot blot) est la seule valeur qui peut être retenue pour comparer la production de vecteurs AAVr d'une lignée cellulaire à l'autre. Car cette valeur ne tient pas compte des différences d'infectabilité des cellules qui servent à la titration des particules infectieuses (titres en RCA ou T.U.) produites pour chaque sérotype.

Lignées cellulaires d'encapsulation	HeR2C2	HeR5C5	HeR2/5C5	HeR2C5	HeR2C1
DOT (part/cell)	2,5.10 ⁴	N.D.	4,6.10 ³	6,7.10 ⁴	10 ⁴
RCA (P.I./cell)	17	N.D.	0,325	17	4,5
GFU (T.U./cell)	33	N.D.	0,56	2,5	55

Tableau 1 : Résultats de production des différentes lignées d'encapsulation.

4-2- Etude de la stabilité des clones en culture cellulaire.

Les clones de chaque lignée hybride sélectionnés pour leur capacité à assembler efficacement les particules AAVr, sont maintenus en culture pour étudier leur stabilité au cours des différents passages. Dans le tableau 2 ci-dessous, sont représentées les productions d'AAVGFP aux passages 3, 10, 20 et 30 pour deux clones correspondant aux deux lignées HeR2C1 et HeR2C5. En même temps, la lignée antérieurement caractérisée HeR2C2 est cultivée et sert de référence. Les productions sont titrées en particules totales (P) ou *viral genome* (vg). Les clones des deux sérotypes rapportés dans le tableau suivant sont stables jusqu'à passage 30, avec une faible baisse à P30 pour le clone HeR2C5. L'obtention de lignée hybride d'encapsulation n'est pas un système optimisé puisque pour produire les vecteurs, il reste toujours une étape limitante de transfection du plasmide vecteur. Cette étape aléatoire peut expliquer les variations de productions d'un passage à l'autre. C'est pourquoi lors de l'évaluation des productions, il est important d'avoir une production d'AAVr contrôle obtenue par transfection transitoire et infection adénovirale à partir de la même lignée cellulaire (HeLa).

Clones	Nombre de passages	DOT BLOT P/ml
HeR2C2	3	$1,5 \cdot 10^{10}$
	10	$5,9 \cdot 10^{10}$
	20	$7 \cdot 10^{10}$
	30	$1 \cdot 10^{10}$
HeR2C5	3	$3,5 \cdot 10^{10}$
	10	$1,5 \cdot 10^{10}$
	20	$6 \cdot 10^{10}$
	30	$4,3 \cdot 10^9$
HeR2C1	3	$3,7 \cdot 10^9$
	10	$1 \cdot 10^9$
	20	$8,6 \cdot 10^9$
	30	$2 \cdot 10^{10}$

Tableau 2 : Stabilité de production des clones.

4-3- Evaluation *in vivo* chez la souris.

Pour évaluer *in vivo* les vecteurs produits, un clone stable issu de chacune des lignées cellulaires HeR2C1 et HeR2C5, est amplifié jusqu'à environ $5 \cdot 10^8$ cellules (20 boîtes Ø150mm), puis les cellules sont transfectées par le plasmide vecteur pAAVCMVnlsLacZ, et infectées 6H plus tard par de l'adénovirus à MOI de 50. Les cellules sont récoltées 48 H post transfection. Chaque production est purifiée par ultracentrifugation sur deux gradients successifs de Chlorure de Césium et dialysée contre un tampon PBS 1X supplémenté en Magnésium et en Calcium. Nous avons choisi de tester l'efficacité des vecteurs produits, *in vivo* chez la souris immunocompétente C57Bl/6, en injectant le vecteur dans le muscle tibial

antérieur. Les vecteurs injectés sont des AAV-2/1CMVnlsLacZ et AAV2/5CMVnlsLacZ et en contrôle des AAV2CMVnlsLacZ produits sur la lignée HeR2C2.

Nous avons injecté 25 μ l de préparation virale par muscle tibial antérieur en sous-cutané. Les titres produits par les lignées cellulaires d'encapsulation ne sont pas élevés et cette faible production dépend en partie de l'étape intermédiaire de transfection du plasmide vecteur. En effet, l'efficacité de transfection dans des cellules HeLa est faible et reste de l'ordre de quelques pourcents, ce qui explique les faibles titres de vecteurs produits. En conséquence, la charge virale injectée a été différente pour chaque lignée hybride puisque nous avons injectée le volume maximal.

► Les lots de vecteurs produits par la lignée hybride HeR2C1 ont les titres les plus bas. En conséquence, 5.10^7 particules seulement ont été injectées par muscle. L'analyse des coupes de muscles injectés par l'AAV2/1CMVnlsLacZ n'a pas permis de mettre en évidence de cellules transduites.

► Pour la lignée hybride HeR2C5, plusieurs clones Hela *rep2-cap5* isolés, caractérisés, ont produit de façon efficace. La production d'AAV2/5CMVnlsLacZ a permis d'injecter 3.10^8 particules par muscle, conduisant à une transduction de quelques pourcents de fibres musculaires. L'injection du même nombre de particules d'AAV2CMVnlsLacZ par muscle transduit aussi quelques fibres musculaires (moins de 10%). Au laboratoire, des travaux antérieurs ont montré qu'il fallait injecter au moins 2.10^{10} particules d'AAV2CMVnlsLacZ pour atteindre une transduction maximale du muscle squelettique de souris.

Le titre de vecteurs AAVr-2/1 produits à partir des lignées hybrides stables était en dessous du seuil minimal nécessaire pour détecter un signal de transduction dans le muscle de souris. Ce résultat négatif n'a pas permis de conclure sur l'efficacité *in vivo* de ces systèmes cellulaires hybrides de sérotype-1 comparés au sérotype-5.

D- Discussion des problèmes liés à l'utilisation des lignées cellulaires hybrides pour une application clinique:

Comme nous l'avons vu précédemment, les particules AAVr-2/1 recombinantes dérivées du sérotype-1 transduisent préférentiellement des organes comme le muscle squelettique. Toutefois, pour toucher efficacement ces organes, il faut injecter de vecteurs dont les titres sont supérieurs à ceux que nous avons obtenus avec les lignées HeR2C1. Dans notre étude, nous avons vu que les productions de vecteurs issues de la lignée HeR2C1 n'étaient pas exploitables. Il apparaît donc clairement que si nous voulons toucher des organes comme le muscle ou le cerveau, les clones cellulaires hybrides de sérotypes-1 ou -5 qui seront nouvellement générés doivent produire des titres de particules AAVr encore plus élevés. Les critères de sélection des clones devront tenir compte de ces données.

Le développement de lignées stables d'encapsidation pour produire efficacement des particules d'AAVr a été largement démontré. Sur le même principe, nous venons d'exposer qu'il est possible de produire des vecteurs hybrides entre le sérotype-2 et d'autres sérotypes, à partir de lignées cellulaires stables.

Pour sélectionner des clones cellulaires susceptibles d'être compétents pour la production de particules d'AAVr, nous avons retenu les critères suivants :

- ⇒ Un nombre de copies du génome *rep-cap* supérieur à un;
- ⇒ Le génome *rep-cap* doit s'amplifier d'au moins 100 fois après induction par un virus auxiliaire, le plus souvent l'adénovirus ou l'herpès virus;
- ⇒ Cette amplification doit être corrélée à une expression correcte et détectable des protéines Rep et Cap ;
- ⇒ Les clones sélectionnés doivent assembler efficacement des particules d'AAVr, de l'ordre de 10^4 à 10^5 particules par cellule ;
- ⇒ Enfin, l'insert *rep-cap* doit rester intégré stablement dans le génome cellulaire au cours des passages en culture cellulaire.

1- Le choix des cellules HeLa :

Les lignées stables que nous avons développées sont issues des cellules HeLa provenant d'un carcinome humain du col de l'utérus. Les cellules HeLa ont un caryotype totalement remanié et les gènes E6 et E7 du papillomavirus HPV18 sont retrouvés dans leur génome cellulaire. Sachant que le développement des lignées stables représente une alternative à la production de vecteurs AAVr dans un but d'applications cliniques, les lignées cellulaires doivent être établies dans des conditions dites GMP et répondre aux exigences des agences réglementaires. Aujourd'hui, il apparaît très probable que ces cellules ne seront pas acceptées pour la production de vecteurs pour des essais cliniques.

Nous avons donc choisi de continuer de développer des lignées stables hybrides d'encapsulation à partir des cellules A549, issues d'un carcinome bronchique humain, dont le caryotype est moins remanié. Ces cellules présentent les mêmes propriétés pour la production de vecteurs AAVr que les cellules HeLa (Gao *et al.*, 2002b) (Farson *et al.*, 2004). A savoir, que les gènes *rep* et *cap* intégrés dans le génome des cellules A549 sous le contrôle de leur promoteur natif sont naturellement silencieux en absence de virus auxiliaire, et qu'en sa présence ces cellules assemblent efficacement des particules AAVr après amplification des séquences *rep-cap*.

2- La détection de séquences intégrées de façon aspécifique dans les capsides

AAVr.

Au laboratoire, une étude récente a montré qu'au cours de la production d'AAVr, des séquences plasmidiques, correspondant au gène de résistance à l'ampicilline, sont encapsidées quelque soit la méthode de production employée (Chadeuf *et al.*, 2005). En effet, l'analyse de stocks d'AAVr produits par les méthodes classiques de transfection transitoire ou à partir des lignées stables d'encapsulation dérivées des cellules HeLa a révélé que des séquences plasmidiques correspondant au gène de résistance à l'ampicilline étaient encapsidées. Cette encapsidation inattendue est majoritairement liée à la présence des ITR, et aussi à d'autres origines de répllication. Des séquences amplicilline ont aussi été détectées dans différents tissus injectés par des préparations d'AAVr de différents sérotypes-2, -1 et -5. Ces séquences non virales sont sous une forme qui peut-être mobilisée par la transformation bactérienne (Chadeuf *et al.*, 2005).

Ces résultats montrent qu'au cours de la production d'AAVr, il existe une encapsidation aspécifique de séquences plasmidiques quelle que soit la méthode de production et le sérotype. En conséquence, pour répondre aux exigences réglementaires et face à la recrudescence des problèmes de résistance aux antibiotiques, nous avons choisi de remplacer le gène de résistance à l'ampicilline par le gène de résistance à la kanamycine (antibiotique qui inhibe la synthèse des protéines bactériennes) sur tous les plasmides servant à la production de vecteurs viraux. De la même façon, pour établir les lignes stables hybrides, les plasmides qui sont intégrés en stable dans le génome cellulaire portent le gène de résistance à la kanamycine. Actuellement, pour le gène de résistance à la kanamycine, antibiotique qui n'est pratiquement plus utilisé en médecine humaine et vétérinaire, rien ne semble s'opposer à son éventuelle utilisation.

Premier article

A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5.

Nicole Brument, Robert Morenweiser, Véronique Blouin, Estelle Toublanc, Isabelle Raimbaud, Yan Cherel, Sébastien Folliot, Florence Gaden, Pierre Boulanger, Gabrielle Kroner-Lux, Philippe Moullier, Fabienne Rolling, Anna Salvetti. 2002, *Molecular Therapy*, 6: 678-686

II. Discussion du premier article :

Les méthodes de purification et la production restent des étapes critiques pour l'évaluation des vecteurs AAVr dans les essais pré-cliniques, particulièrement dans les modèles gros animaux et par conséquent en clinique. Nous cherchons à développer une méthode alternative à la purification sur gradient de Chlorure de Césium ou aux systèmes intermédiaires similaires comprenant une étape sur gradient de densité suivie d'une étape par chromatographie en phase liquide. Ces méthodes ne permettent pas d'éliminer complètement les contaminants. Des méthodes plus spécifiques d'un sérotype donné comme la chromatographie par affinité sur une colonne héparine pour le sérotype-2 (Clark *et al.*, 1999) (Anderson *et al.*, 2000) ou une résine de mucine pour le sérotype-5 (Auricchio *et al.*, 2001) améliorent très significativement les rendements et la pureté des stocks. Cependant ces procédures ne sont pas applicables à tous les sérotypes, et ne permettant pas la comparaison directe *in vivo* de différents sérotypes purifiés par la même procédure.

Il était donc légitime de développer une méthode permettant de purifier de grande quantité de particules d'AAVr qui puisse être transposable à tous les sérotypes d'AAVr.

La chromatographie liquide sur colonne échangeuse d'ions repose sur le principe de la séparation des protéines en fonction de leur pI. Le pI d'une protéine varie selon deux paramètres, la salinité et le pH. Les paramètres déterminés pour purifier un lot d'AAVr à petite échelle sont directement transposables à grande échelle. La pureté des lots d'AAVr purifiés est bien supérieure à toutes les méthodes de purification basées sur la densité et l'affinité.

La méthode de purification que nous avons mise au point s'adresse aux sérotypes-2 et -5.

Un élément décisif pour le choix des colonnes échangeuses d'ions est la procédure d'extraction choisie au préalable. Lors de la phase de pré-purification, les particules d'AAVr assemblées dans le noyau, peuvent être extraites des cellules par différents moyens. La technique d'extraction la plus ancienne consiste en une série de congélations et décongélations successives pour casser grossièrement les cellules. Une autre extraction est possible par l'action d'un détergent associé à une DNase, la Benzonase. L'ajout de détergent ou de DNase et même quelquefois de protéases implique son élimination totale au cours des étapes de purification. Or

les méthodes actuelles de purification chromatographique par colonnes échangeuses d'ions ne les éliminent pas efficacement (Qu *et al.*, 2007).

Nous avons décrit une procédure de chromatographie liquide en deux étapes basée sur des résines échangeuses d'ions.

Notre objectif était d'avoir idéalement une procédure qui puisse être appliquée à tous les sérotypes et aussi bien pour des productions à petites et à grandes échelles.

Cette méthode permet d'obtenir des lots de vecteurs AAVr-2 et AAVr-5 très purs sans passer par une étape de pré-purification en plus de l'extraction des vecteurs par une série de congélations et décongélations. Cette procédure de purification s'adresse au sérotype-5 qui possède la séquence en acides aminés de sa capsidie la plus divergente de celle de la capsidie de l'AAV-2. On peut donc s'attendre à pouvoir appliquer facilement cette procédure aux autres sérotypes. Les particules AAVr ont été produites à partir des cellules 293 par transfection transitoire ou à partir de lignées stables productrices dérivées des cellules HeLa infectées par l'adénovirus. De ce fait, le lysat cellulaire avant purification était différent selon la méthode employée. Dans le cas des lignées productrices, l'inactivation de l'adénovirus par chauffage à 56°C conduit à la formation d'agrégats cellulaires avant les centrifugations. Ces étapes d'extraction et de centrifugations pour éliminer les débris cellulaires ne sont pas optimisées et ne peuvent être appliquées en conditions GMP. Toutefois, elles ont permis une purification avec un haut niveau de pureté nécessaire pour des essais précliniques chez le gros animal. L'analyse de la pureté des préparations AAVr purifiées par FPLC sur gel de polyacrylamide dénaturant coloré au Nitrate d'argent donne une pureté estimée à 98,5%.

L'analyse des différents lots d'AAVr par microscopie électronique montre que les préparations de capsides AAVr obtenues par FPLC sont plus homogènes et présentent peu d'agrégats, contrairement aux préparations issues de la purification sur gradients de ClCs. Nous avons aussi remarqué que la purification par FPLC des vecteurs AAVr-5 éliminait les particules vides de façon très efficace, alors que les vecteurs de sérotype-2 présentent encore beaucoup de particules vides. Nous savons que la purification par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions n'a pas pour caractéristique de séparer les capsides vides des pleines. En effet, la méthode reconnue pour éliminer les capsides vides des stocks de vecteurs AAVr est l'ultracentrifugation sur gradient de densité utilisant du Chlorure de Césium ou de l'iodixanol, fondée sur la différence de densité entre les particules vides et celles contenant le génome

vecteur. Cette information signifie que les critères de séparation des particules vides des pleines pourraient être différents pour les AAVr-5 et les AAVr-2.

Ce n'est que récemment, que deux équipes ont montré qu'il est possible d'éliminer les particules vides des particules contenant un génome vecteur en utilisant des colonnes POROS HQ échangeuses d'anions et équilibrées par des tampons ammoniums quaternaires (Urabe *et al.*, 2006b) (Qu *et al.*, 2007). Dans les deux cas, les particules vides ont pu être éliminées efficacement grâce à l'utilisation d'une nucléase digérant les liaisons formées entre les acides nucléiques et les protéines de la capsidie qui sont à l'origine des agrégations (Wright *et al.*, 2005). En effet, les agrégats viennent interférer avec les charges des acides aminés à la surface des capsides AAVr et masquent alors les faibles différences de charges qui existent entre les particules vides et pleines. L'élimination des agrégats à la surface des capsides virales permet de séparer les capsides en fonction de leur charge globale (Qu *et al.*, 2007).

Cette procédure de purification de lots d'AAVr élimine la majorité des contaminants, nous avons voulu vérifier ensuite que les préparations d'AAV ainsi obtenues transduisaient toujours efficacement les tissus cibles. Pour cela nous avons d'une part, testé l'AAV-2 CMVnlsLacZ purifiés par FPLC, dans le muscle tibial antérieur de souris Balb/c, et nous l'avons comparée à des injections d'une préparation du même vecteur purifiée sur gradient d'iodixanol suivi d'une colonne d'héparine. D'autre part, l'injection subrétinale chez le rat Wistar d'une préparation d'AAV-5 GFP purifiée par FPLC comparé à une préparation du même vecteur purifiée sur gradient de CICs.

Que ce soit dans le muscle squelettique ou dans la rétine, les préparations d'AAVr purifiées par FPLC montrent une transduction du muscle pour l'AAV-2CMVnlsLacZ et de la rétine pour l'AAV-5 GFP aussi efficace que par les méthodes conventionnelles de purification. De plus, les coupes de muscles injectés par des lots de vecteurs purifiés par FPLC, ne montrent pas d'infiltrats inflammatoires. A l'inverse, les coupes de muscles injectés par des préparations virales purifiées sur gradient d'iodixanol/héparine montrent la présence d'infiltrats inflammatoires localisés dans les zones où les cellules sont transduites.

Nous avons donc montré que cette procédure de purification uniquement basée sur une chromatographie sur résines échangeuses d'ions, peut être appliquée directement à partir d'un lysat cellulaire sans aucun détergent, ni nucléases pour les AAVr-2 et AAVr-5. Cette procédure simplifiée délivre des stocks de vecteurs viraux qui sont purs, avec un rendement moyen de

40% et qui gardent les mêmes caractéristiques infectieuses que des particules purifiées par les méthodes traditionnelles.

Deuxième article

Proteolytic mapping of the AAV capsid.

Kim VanVliet, Véronique Blouin, Mavis Agbandje-McKenna and Richard Snyder.
2006, *Molecular Therapy*, **14**: 809-821

III. Discussion du deuxième article :

Les structures tri-dimensionnelles des capsides virales des sérotypes-2, -4, -5 d'AAV ont été déterminées par cristallographie aux rayons X ou microscopie électronique (Kronenberg *et al.*, 2001) (Xie *et al.*, 2002) (Padron *et al.*, 2005) (Walters *et al.*, 2004).

Les analyses de structures et de mutations des capsides d'AAV montrent clairement que le tropisme pour l'hôte et les différences antigéniques des parvovirus proviennent de variations d'acides aminés à la surface de la capside. Ces acides aminés sont en majorité situés, au niveau des boucles à la surface des régions variables, à proximité des axes de symétrie d'ordre 2 et 3. Cependant, toutes ces informations structurales correspondent à des virions dans des conformations basses énergies qui s'éloignent des conditions physiologiques.

Aujourd'hui la digestion protéolytique propose une nouvelle approche pour caractériser les différents sérotypes d'AAV. De sorte qu'à chaque sérotype, un profil de digestion lui est associé, représentant une sorte « d'empreinte protéolytique ». Ces données sont complémentaires des informations sur la structure en trois dimensions des capsides, permettant de visualiser la localisation des sites de coupure et des sites antigéniques à la surface des virions.

Notre étude a permis de mieux caractériser les virions en solution, c'est-à-dire dans les conditions physiologiques par des digestions protéolytiques. Le produit de digestion a pu être cartographié grâce à des approches complémentaires incluant l'utilisation d'anticorps spécifiques, le séquençage protéique, la spectrométrie de masse et enfin une modélisation de la structure en 3 dimensions de la région au niveau des boucles de surface communes aux trois protéines VP de la capside.

Les AAV-2 avaient été décrits comme résistants à la protéolyse par la trypsine bien qu'il existe 69 sites de coupure théoriques sur la séquence protéique primaire de la protéine VP1 (Berns and, 1970). A contrario, nous avons montré que la digestion par la trypsine de virions AAVr-2 génère un profil unique de digestion. Le site de coupure localisé en C-terminal des différentes protéines VP, est situé au niveau de l'acide aminé basique arginine en position 588, qui avec l'arginine 585 sont les deux acides aminés impliqués dans la liaison à l'héparine.

En effet, la digestion par la trypsine entraîne une perte de l'affinité au groupement héparan sulfate. Toutefois, les analyses par microscopie électronique et sur gel de polyacrylamide semi-natif montrent que les particules virales restent intactes.

Cette digestion protéolytique distingue les particules AAVr-2 vides des pleines. Ainsi, les particules vides sont plus sensibles à la digestion par la trypsine avec une dégradation totale de la protéine VP2. La cinétique de digestion met en évidence une digestion plus rapide des particules vides par la trypsine, cette sensibilité des particules vides est encore plus marquée pour la digestion par la protéase chymotrypsine, comparée aux particules pleines.

Les digestions protéolytiques par la trypsine et la chymotrypsine permettent de différencier les AAVr de sérotype-1 qui sont très proches des AAVr de sérotype-2, mais ne possèdent pas les acides aminés basiques R585 et R588 impliqués dans la liaison à l'héparine et, les AAVr de sérotype-5 qui à l'inverse sont les plus éloignés de l'AAV-2.

Les sites de coupure potentiels des protéases sur la séquence protéique de VP1, l'alignement des séquences protéiques des sérotypes identifiés, la localisation des acides aminés impliqués dans la liaison aux membranes cellulaires, et leur position dans les boucles à la surface des capsides sont autant de critères pour choisir de nouvelles protéases à tester.

A partir de ces critères, nous avons choisi de tester une nouvelle protéase, la protéinase K pour élargir notre étude à d'autres sérotypes. Les premiers résultats montrent que la digestion ménagée par la protéinase K donne un profil de digestion propre aux différents sérotypes d'AAVr -1, -2, -4, -5 et -8, avec une cinétique de digestion différente permettant de les classer dans l'ordre décroissant de sensibilité à la protéinase K suivant: AAV-8> AAV-2> AAV-1> AAV-4> AAV-5.

Un des projets en développement au laboratoire est de produire et purifier le vecteur hybride AAV2/4 hRPE65 dans les conditions dites GMP pour traiter l'Amaurose Congénitale de Leber. Le sérotype-4 a été déterminé comme le sérotype de choix pour traiter cette pathologie car il transduit spécifiquement l'épithélium pigmentaire (Weber *et al.*, 2003). Je me suis donc intéressée au vecteur AAVr-4. Les digestions protéolytiques par les protéases trypsine et chymotrypsine, utilisées sur les sérotypes-2, -1 et -5 montrent que les capsides AAVr-4 sont résistantes à ces protéases. En effet, pour toutes les protéases testées, les produits obtenus correspondent à des digestions partielles même pour de fortes concentrations de protéases.

Sur la base des critères énumérés précédemment, d'autres protéases sont à l'étude pour rechercher la ou les protéases pour lesquelles le sérotype-4 serait plus sensible. Actuellement, cette étude qui est menée en collaboration avec le laboratoire de Richard Snyder s'intéresse aussi aux capsides de sérotype-8. Notre but étant d'élargir cette étude à tous les sérotypes.

Cette nouvelle approche, au-delà de la définition d'un profil de digestion protéolytique pour chaque sérotype, pourra apporter des informations complémentaires sur la structure des capsides des AAVr en solution. Ces informations seront importantes pour la compréhension de la stabilité des capsides dans la cellule transduite. Les différences de sensibilité aux digestions protéolytiques génèrent des profils de digestion différents selon les sérotypes qui permettront sans doute de mieux comprendre les mécanismes de transduction caractéristiques de chaque sérotype (Akache *et al.*, 2007).

Discussion Générale

Depuis quelques années, les avancées scientifiques dans le domaine du transfert de gène progressent à un rythme enthousiasmant. En effet, il a été intéressant de constater que les vecteurs AAVr transduisent efficacement de nombreux organes entraînant alors un essor considérable des essais de transfert de gènes chez les gros animaux.

Cependant, plusieurs défis persistent parmi ceux qui pourraient être les plus importants: 1) la présence de contaminants résiduels dans les productions d'AAVr, 2) le contrôle de la réponse immunitaire de l'hôte, 3) la dissémination et la bio-distribution du vecteur AAVr.

Parmi les travaux auxquels j'ai participé, une étude de transfert du gène dans le muscle squelettique de rat normal comparé au muscle en régénération a permis de mettre en évidence la présence de réactions inflammatoires localisées au niveau des sites d'injection de l'AAVr, plus particulièrement au niveau des cellules transduites (Abadie *et al.*, 2002). Dans ces expériences, les lots de vecteurs AAVr injectés étaient purifiés sur un gradient de chlorure de césium (CICs). Nous avons aussi observé une réaction inflammatoire sur des coupes de muscle squelettique de souris Balb/c injectés par des lots d'AAVr purifiés sur un gradient d'iodixanol suivi d'une colonne d'héparine (Brument *et al.*, 2002). Ces résultats montrent que dès l'instant où les vecteurs AAVr sont directement administrés *in situ*, la présence de contaminants résiduels dans les stocks d'AAVr peut être une source potentielle d'effets délétères. Ces contaminants résiduels peuvent provenir du support de purification comme le CICs, qui est connu pour être inflammatoire, mais aussi du lysat cellulaire de production (ADN résiduel cellulaire ou plasmidique, protéines cellulaires). De plus, le fait que les vecteurs AAVr puissent se retrouver fortement concentrés au niveau du site d'injection dans certains tissus (cerveau, muscle squelettique) et selon le sérotype utilisé peut alors favoriser la concentration locale élevée d'un composant non identifié présent dans le stock viral et pouvant agir comme un adjuvant (Herzog *et al.*, 2002). De façon encourageante, nous avons montré que la

purification par chromatographie liquide sur résine échangeuse d'ions permet une meilleure élimination des contaminants, délivrant des lots d'AAVr qui continuent à transduire efficacement les tissus cibles (Brument *et al.*, 2002).

Si les vecteurs AAVr ont longtemps été considérés comme des vecteurs peu immunogènes, plusieurs études effectuées chez les animaux (Sabatino *et al.*, 2005) et chez l'homme (Manno *et al.*, 2006) ont mis en évidence le développement de réponses immunitaires humorales et cellulaires dirigées contre des épitopes de la capsid de l'AAV et/ou le produit du transgène.

Aujourd'hui, l'amélioration des titres des productions d'AAVr conduit à des transductions plus fortes des organes cibles, pouvant être responsable de phénomènes immunitaires différents et nouveaux. Nous avons montré qu'un vecteur AAV-2 Epo/rtTA (transgène Epo, transactivateur rtTA sensible à la tétracycline) transduit efficacement le muscle de primate non humain et que le système tétracycline est capable de réguler l'expression du transgène à long terme. Cependant, une réaction immunitaire est apparue contre la protéine transactivatrice rtTA (Favre *et al.*, 2002). Les facteurs potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire, sont la voie d'administration (Brockstedt *et al.*, 1999), la nature du transgène (Brockstedt *et al.*, 1999) (Jooss *et al.*, 1998), l'état physiologique du tissu cible au moment de l'injection de l'AAVr (Cordier *et al.*, 2001), la transcription du transgène de façon ubiquitaire ou restreinte (Cordier *et al.*, 2001). D'autres équipes ont décrit ces problèmes liés aux réponses immunitaires contre les produits du transgène (Wang *et al.*, 2005) (Herzog *et al.*, 2002) et/ou contre la capsid AAVr (Manno *et al.*, 2006) (Herzog, 2007) (Mingozzi *et al.*, 2007) et par la suite la survenue d'effets secondaires sévères tels que le développement d'une anémie auto-immune chez les primates non humains (Gao *et al.*, 2004a) (Chenuaud *et al.*, 2004).

Outre ces réponses immunes contre le produit du transgène, des réponses T lymphocytaires spécifiques des épitopes de la capsid d'AAV ont été mises en évidence dans des études précliniques et un essai clinique visant à traiter l'hémophilie de type B. Ces réponses immunes anti-AAV limitent la durée de l'expression thérapeutique du transgène (Chen *et al.*, 2006) (Sabatino *et al.*, 2005) (Manno *et al.*, 2006).

Il semble que la présence en grand nombre de capsides vides, suite à l'administration de fortes doses de vecteurs AAVr, inhibe la transduction *in vivo* des hépatocytes (Manno *et al.*, 2006). Ainsi, au même titre que les contaminants résiduels, la présence de capsides vides dans les préparations d'AAVr est à éliminer ou réduire au minimum des lots de vecteurs destinés aux études cliniques. L'analyse par microscopie électronique a montré que la méthode de purification que nous avons développée éliminait efficacement les particules vides des lots d'AAVr-5, contrairement à la majorité des techniques de purification par chromatographie liquide (Brument *et al.*, 2002). En général, ce sont plutôt les techniques de purification en fonction de la densité qui permettent d'éliminer des particules vides. Ce n'est que très récemment que de nouvelles méthodes de purification par chromatographie ont montré qu'il est possible de séparer les particules vides des particules contenant un génome vecteur sur des colonnes échangeuses d'anions, et ceci pour les sérotypes-2 et -1 (Urabe *et al.*, 2006b) (Qu *et al.*, 2007).

Si l'on considère que des résidus peuvent être co-purifiés ou rester physiquement attachés aux particules d'AAVr, d'autres paramètres sont aussi à évaluer, notamment la méthode de production et les séquences d'ADN utilisées. Lors de la production des vecteurs AAVr par transfection transitoire, plusieurs microgrammes de plasmides ADN sont apportés dans les cellules. Dans le but de diminuer la présence de ces contaminants ADN dans le lysat cellulaire, une alternative consiste à établir des lignées stables d'encapsidation. Outre la simplification et la reproductibilité du système, les lignées stables ont l'avantage de diminuer considérablement voir d'éliminer l'ADN plasmidique. Toutefois, un autre problème persiste : la présence de séquences encapsidées dans les particules virales autres que le vecteur. En effet, cet évènement indésirable a lieu aussi bien pour les productions obtenues par transfection transitoire qu'à partir de lignées stables productrices (Chadeuf *et al.*, 2005). Devant ces résultats, il serait souhaitable d'examiner dans tous les lots d'AAVr produits à partir de systèmes baculovirus (Urabe *et al.*, 2002) et adénoviraux (Gao *et al.*, 1998) pour détecter la présence éventuelle de séquences « non-vecteur », c'est-à-dire d'origine bactérienne, cellulaire, baculovirale ou adénovirale.

L'existence d'anticorps neutralisants pré-existants contre la capsidite provenant d'une première exposition au virus peut également impacter négativement sur l'expression du transgène et/ou présenter un risque délétère pour le patient (Halbert *et al.*, 2006) (Manno *et al.*, 2006). Une évaluation complète de l'immunité innée et acquise contre les sérotypes disponibles

est également à envisager, de même pour les vecteurs modifiés par mutations d'acides aminés au niveau de la capsid.

La compréhension des facteurs multiples impliqués dans la réponse immunitaire contre le transgène et/ou les capsides AAV est évidemment un défi majeur, dès l'instant où il est reconnu que l'AAVr n'est pas un vecteur « non-immunogène ». Une alternative serait de pouvoir contrôler le système immunitaire ou de le rendre tolérant.

L'isolement de nouveaux sérotypes testés *in vivo* dans de nombreux essais précliniques a montré que chaque sérotype possède un tropisme unique aboutissant à la transduction d'organes peu ou pas transduits par le sérotype-2. Cette efficacité de transduction des vecteurs AAVr, parfois de 10 à 1000 fois supérieure à l'AAVr-2, aussi parce qu'ils sont administrés directement *in situ*, entraîne une dissémination différente dans l'organisme pour chaque sérotype. Ainsi, des résultats récents montrent que selon le sérotype, l'AAV peut diffuser loin des sites d'injection. Cette biodistribution distante des sites d'injection a été observé dans la rétine (Provost, 2005) (Jacobson *et al.*, 2006), le muscle squelettique (Favre *et al.*, 2001) (Flotte *et al.*, 2007), le système nerveux central et périphérique (Lu *et al.*, 2003) (Burger *et al.*, 2004) (Burger *et al.*, 2005), le foie (Manno *et al.*, 2006). Des travaux récents ont montré que le fait que le tropisme et la diffusion diffèrent *in vivo* entre certains sérotypes AAVr comme l'AAVr-8 comparé à l'AAVr-2 résulte de différences au niveau de l'entrée dans la cellule, du transport intra-cellulaire et de la stabilité de la capsid jusqu'au noyau (Akache *et al.*, 2007).

La bio-distribution et la dissémination sont des questions critiques qui restent partiellement explorées. Cela suppose qu'il faut renforcer les études de dissémination en évaluant la diffusion d'un organe à l'autre pour en particulier contrôler les risques de transmissions aux lignées cellulaires germinales.

De la même façon, avant de développer une stratégie de thérapie génique qui utilise l'AAVr, le sérotype devrait être soigneusement considéré. Cette différence de tropisme associée à la nature des acides aminés à la surface des capsides est un composant essentiel impliqué dans la liaison à la cellule, l'internalisation, le transport dans la cellule transduite. Notre connaissance au sujet de la structure de la capsid virale d'AAVr en solution reste encore limitée. La caractérisation des capsides des différents sérotypes AAV en solution par des protéases et des anticorps spécifiques peut fournir une technique de cartographie puissante pour

identifier et confirmer le sérotype des capsides AAVr. Cette méthode représente une information supplémentaire sur la stabilité des particules AAVr dans la cellule transduite et les mécanismes de transduction des sérotypes AAVr (Van Vliet *et al.*, 2006) (Akache *et al.*, 2007).

Bibliographie

- ABADIE, J., BLOUIN, V., GUIGAND, L., WYERS, M., and CHEREL, Y. (2002). Recombinant adeno-associated virus type 2 mediates highly efficient gene transfer in regenerating rat skeletal muscle. *Gene Ther* **9**, 1037-1043.
- AFIONE, S.A., CONRAD, C.K., KEARNS, W.G., CHUNDURU, S., ADAMS, R., REYNOLDS, T.C., GUGGINO, W.B., CUTTING, G.R., CARTER, B.J., and FLOTTE, T.R. (1996). In vivo model of Adeno-Associated Virus vector persistence and rescue. *J. Virol.* **70**, 3235-3241.
- AITKEN, M.L., MOSS, R.B., WALTZ, D.A., DOVEY, M.E., TONELLI, M.R., MCNAMARA, S.C., GIBSON, R.L., RAMSEY, B.W., CARTER, B.J., and REYNOLDS, T.C. (2001). A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther* **12**, 1907-1916.
- AKACHE, B., GRIMM, D., PANDEY, K., YANT, S.R., XU, H., and KAY, M.A. (2006). The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol* **80**, 9831-9836.
- AKACHE, B., GRIMM, D., SHEN, X., FUESS, S., YANT, S.R., GLAZER, D.S., PARK, J., and KAY, M.A. (2007). A two-hybrid screen identifies cathepsins B and L as uncoating factors for adeno-associated virus 2 and 8. *Mol Ther* **15**, 330-339.
- ANDERSON, R., MACDONALD, I., CORBETT, T., WHITEWAY, A., and PRENTICE, H.G. (2000). A method for the preparation of highly purified adeno-associated virus using affinity column chromatography, protease digestion and solvent extraction. *J. Virol. Methods* **85**, 23-34.
- ANTONI, B.A., RABSON, A.B., MILLER, I.L., TREMPER, J.P., CHEJANOVSKY, N., and CARTER, B.J. (1991). Adeno-associated virus Rep protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in human cells. *Journal of Virology* **65**, 396-404.
- ASOKAN, A., HAMRA, J.B., GOVINDASAMY, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., and SAMULSKI, R.J. (2006). Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *J Virol* **80**, 8961-8969.
- ATCHISON, R.W. (1970). The role of herpesviruses in adenovirus-associated virus replication in vitro. *Virology* **42**, 155-162.
- ATCHISON, R.W., CASTO, B.C., and HAMMON, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**, 754-756.
- ATCHISON, R.W., CASTO, B.C., and HAMMON, W.M. (1966). Electron microscopy of adenovirus-associated virus (AAV) in cell cultures. *Virology* **29**, 353-357.
- AUCOIN, M.G., PERRIER, M., and KAMEN, A.A. (2007). Improving AAV vector yield in insect cells by modulating the temperature after infection. *Biotechnol Bioeng.*
- AURICCHIO, A., O'CONNOR, E., HILDINGER, M., and WILSON, J.M. (2001). A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors. *Mol. Ther.* **4**, 372-374.
- AURICCHIO, A., and ROLLING, F. (2005). Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases. *Curr Gene Ther.* **5**, 339-348.
- BACHMANN, P., HOGGAN, M., KURSTAK, E., MELNICK, J., PEREIRA, H., TATTERSALL, P., and VAGO, C. (1979). Parvoviridae: second report. *Intervirology* **11**, 248-254.
- BALAGUÉ, C., KALLA, M., and ZHANG, W.-W. (1997). Adeno-associated virus Rep 78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J. Virol.* **71**, 3299-3306.

- BANTEL-SCHAAL, U., HUB, B., and KARTENBECK, J. (2002). Endocytosis of Adeno-Associated Virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J. Virol.* **76**, 2340-2349.
- BARTLETT, J.S., KLEINSCHMIDT, J., BOUCHER, R.C., and SAMULSKI, R.J. (1999). Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab' γ)₂ antibody [In Process Citation]. *Nat Biotechnol* **17**, 181-186.
- BARTLETT, J.S., WILCHER, R., and SAMULSKI, R.J. (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors [In Process Citation]. *J Virol* **74**, 2777-2785.
- BATCHU, R.B., KOTIN, R.M., and HERMONAT, P.L. (1994). The regulatory rep protein of adeno-associated virus binds to sequences within the c-H-ras promoter. *Cancer Letters* **86**, 23-31.
- BEATON, A., PALUMBO, P., and BERNS, K.I. (1989). Expression from the Adeno-Associated Virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J. Virol.* **63**, 4450-4454.
- BERNS, K. (1996). Parvoviridae: the viruses and their replication. In *Virology*. N.B. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, and e. al., eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia) pp. 2173-2197.
- BERNS, K.I., and R., J.A. (1970). Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: isolation and separation of complementary single strands. *J Virol* **5**, 693-699.
- BERNS, K.I., and GIRAUD, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **218**, 1-23.
- BERNS, K.I., PINKERTON, T.C., THOMAS, G.F., and HOGGAN, M.D. (1975). Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* **68**, 556-560.
- BLACKBURN, S.D., STEADMAN, R.A., and JOHNSON, F.B. (2006). Attachment of adeno-associated virus type 3H to fibroblast growth factor receptor 1. *Arch Virol* **151**, 617-623.
- BLACKLOW, N.R., HOGGAN, M.D., and MCCLANAHAN, M.S. (1970). Adenovirus-associated viruses: enhancement by human herpesviruses. *Proc Soc Exp Biol Med* **134**, 952-954.
- BLEKER, S., SONNTAG, F., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2005). Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *J Virol* **79**, 2528-2540.
- BLOUIN, V., BRUMENT, N., TOUBLANC, E., RAIMBAUD, I., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2004). Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process. *J Gene Med* **6**, S223-228.
- BOTTARO, D.P., RUBIN, J.S., FALETTO, D.L., CHAN, A.M., KMIECIK, T.E., VANDE WOUDE, G.F., and AARONSON, S.A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251**, 802-804.
- BOUSSIF, O., LEZOUALCH, F., ZANTA, M.A., MERGNY, M.D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., and BEHR, J. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, 7297-7301.
- BOUSSIF, O., ZANTA, M.A., and BEHR, J.P. (1996). Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther* **3**, 1074-1080.
- BOWLES, D.E., RABINOWITZ, J.E., and SAMULSKI, R.J. (2003). Marker rescue of adeno-associated virus (AAV) capsid mutants: a novel approach for chimeric AAV production. *J Virol* **77**, 423-432.
- BRANTLY, M.L., SPENCER, L.T., HUMPHRIES, M., CONLON, T.J., SPENCER, C.T., POIRIER, A., GARLINGTON, W., BAKER, D., SONG, S., BERNS, K.I., MUZYCZKA, N., SNYDER, R.O., BYRNE, B.J., and FLOTTE, T.R. (2006). Phase I Trial of Intramuscular Injection of a Recombinant Adeno-associated Virus Serotype 2 alpha(1)-Antitrypsin (AAT) Vector in AAT-Deficient Adults. *Hum Gene Ther.*
- BRISTER, J.R., and MUZYCZKA, N. (1999). Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification. *J. Virol.* **73**, 9325-9336.
- BROCKSTEDT, D.G., PODSAKOFF, G.M., FONG, L., KURTZMAN, G., MUELLER-RUCHHOLTZ, W., and ENGLEMAN, E.G. (1999). Induction of immunity to antigens

- expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin Immunol* **92**, 67-75.
- BRUMENT, N., MORENWEISER, R., BLOUIN, V., TOUBLANC, V., RAIMBAUD, I., CHÉREL, Y., FOLLIOT, S., GADEN, F., BOULANGER, P., KRONER-LUX, G., MOULLIER, P., ROLLING, F., and SALVETTI, A. (2002). A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes - 2 and -5. *Mol. Ther.* **6**, 678-686.
- BULLER, R.M., JANIK, J.E., SEBRING, E.D., and ROSE, J.A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* **40**, 241-247.
- BURGER, C., GORBATYUK, O.S., VELARDO, M.J., PEDEN, C.S., WILLIAMS, P., ZOLOTUKHIN, S., REIER, P.J., MANDEL, R.J., and MUZYCZKA, N. (2004). Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* **10**, 302-317.
- BURGER, C., NASH, K., and MANDEL, R.J. (2005). Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system. *Hum Gene Ther* **16**, 781-791.
- BUROVA, E., and IOFFE, E. (2005). Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications. *Gene Ther* **12 Suppl 1**, S5-17.
- CARTER, B.J. (2004). Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: a historical perspective. *Mol Ther* **10**, 981-989.
- CHADEUF, G., CIRON, C., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2005). Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adeno-associated virus production and their in vivo persistence after vector delivery. *Mol Ther.* **12**, 744-753.
- CHADEUF, G., FAVRE, D., TESSIER, J., PROVOST, N., NONY, P., KLEINSCHMIDT, J., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2000). Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *J. Gene Med.* **2**, 260-268.
- CHAHAL, P.S., AUCOIN, M.G., and KAMEN, A. (2007). Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system. *J Virol Methods* **139**, 61-70.
- CHANDRAN, K., SULLIVAN, N.J., FELBOR, U., WHELAN, S.P., and CUNNINGHAM, J.M. (2005). Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**, 1643-1645.
- CHANG, L.-S., SHI, Y., and SHENK, T. (1989). Adeno-associated virus p5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J. Virol.* **63**, 3479-3488.
- CHAO, H., LIU, Y., RABINOWITZ, J., LI, C., SAMULSKI, R.J., and WALSH, C.E. (2000). Several Log Increase in Therapeutic Transgene Delivery by Distinct Adeno-Associated Viral Serotype Vectors. *Mol. Ther.* **2**, 619-623.
- CHAO, H., MONAHAN, P.E., LIU, Y., SAMULSKI, R.J., and WALSH, C.E. (2001). Sustained and complete phenotype correction of hemophilia B mice following intramuscular injection of AAV1 serotype vectors. *Mol Ther* **4**, 217-222.
- CHAO, H., and WALSH, C.E. (2001). Induction of tolerance to human factor VIII in mice. *Blood* **97**, 3311-3312.
- CHAPMAN, M.S., and ROSSMANN, M.G. (1993). Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology* **194**, 491-508.
- CHEJANOVSKY, N., and CARTER, B.J. (1989). Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral replication. *Virology* **173**, 120-128.
- CHEN, J., WU, Q., YANG, P., HSU, H.C., and MOUNTZ, J.D. (2006). Determination of specific CD4 and CD8 T cell epitopes after AAV2- and AAV8-hF.IX gene therapy. *Mol Ther* **13**, 260-269.
- CHEN, Z.Y., YANT, S.R., HE, C.Y., MEUSE, L., SHEN, S., and KAY, M.A. (2001). Linear DNAs concatemerize in vivo and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol Ther* **3**, 403-410.

- CHENUAUD, P., LARCHER, T., RABINOWITZ, J.E., PROVOST, N., CHEREL, Y., CASADEVALL, N., SAMULSKI, R.J., and MOULLIER, P. (2004). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* **103**, 3303-3304. Epub 2004 Jan 3322.
- CHEUNG, A.K., HOGGAN, M.D., HAUSWIRTH, W.W., and BERNS, K.I. (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J. Virol.* **33**, 739-748.
- CHIORINI, J.A., AFIONE, S., and KOTIN, R.M. (1999a). Adeno-associated virus (AAV) type 5 Rep protein cleaves a unique terminal resolution site compared with other AAV serotypes. *J Virol* **73**, 4293-4298.
- CHIORINI, J.A., KIM, F., YANG, L., and KOTIN, R.M. (1999b). Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J. Virol.* **73**, 1309-1319.
- CHIORINI, J.A., WEITZMAN, M.D., OWENS, R.A., URCELAY, E., SAFER, B., and KOTIN, R.M. (1994). Biologically active Rep proteins of adeno-associated virus type 2 produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **68**, 797-804.
- CHIORINI, J.A., YANG, L., SAFER, B., and KOTIN, R.M. (1995). Determination of adeno-associated virus Rep78 and Rep68 binding sites by random sequence oligonucleotide selection. *J. Virol.* **69**, 7334-7338.
- CHIRMULE, N., PROPERT, K., MAGOSIN, S., QIAN, Y., QIAN, R., and WILSON, J. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* **6**, 1574-1583.
- CHON, S.K., RIM, B.M., and IM, D.S. (1999). Adeno-associated virus Rep78 binds to E2-responsive element 1 of bovine papillomavirus type 1. *IUBMB Life* **48**, 397-404.
- CLARK, K.R., LIU, X., MCGRATH, J.P., and JOHNSON, P.R. (1999). Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1031-1039.
- CLARK, K.R., VOULGAROPOULOU, F., FRALEY, D.M., and JOHNSON, P.R. (1995). Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* **6**, 1329-1341.
- CONWAY, J.E., AP RHYS, C.M.J., ZOLOTUKHIN, I., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., HAYWARD, G.S., and BYRNE, B.J. (1999). High-titer recombinant adeno-associated virus production utilizing a recombinant herpes simplex virus type I expressing AAV-2 rep and cap. *Gene Ther.* **6**, 986-993.
- CORDIER, L., GAO, G.P., HACK, A.A., MCNALLY, E.M., WILSON, J.M., CHIRMULE, N., and SWEENEY, H.L. (2001). Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther* **12**, 205-215.
- COSTELLO, E., SAUDAN, P., WINOCOUR, E., PIZER, L., and BEARD, P. (1997). High mobility group chromosomal protein 1 binds to the adeno-associated virus replication protein (Rep) and promotes Rep-mediated site-specific cleavage of DNA, ATPase activity and transcriptional repression. *Embo J* **16**, 5943-5954.
- COTMORE, S.F., D'ABRAMO, A.M., JR., TICKNOR, C.M., and TATTERSALL, P. (1999). Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology* **254**, 169-181.
- CROYLE, M.A., CHENG, X., and WILSON, J.M. (2001). Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy. *Gene Ther* **8**, 1281-1290.
- DAVIDOFF, A.M., NG, C.Y., SLEEP, S., GRAY, J., AZAM, S., ZHAO, Y., MCINTOSH, J.H., KARIMPOOR, M., and NATHWANI, A.C. (2004). Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. *J Virol Methods* **121**, 209-215.
- DAVIDSON, B.L., STEIN, C.S., HETH, J.A., MARTINS, I., KOTIN, R.M., DERKSEN, T.A., ZABNER, J., GHODSI, A., and CHIORINI, J.A. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 3428-3432.
- DAVIS, M.D., WU, J., and OWENS, R.A. (2000). Mutational analysis of adeno-associated virus type 2 Rep68 protein endonuclease activity on partially single-stranded substrates. *J Virol* **74**, 2936-2942.

- DE LA MAZA, L.M., and CARTER, B.J. (1980). Molecular structure of adeno-associated virus variant DNA. *J Biol Chem* **255**, 3194-3203.
- DI PASQUALE, G., and STACEY, S.N. (1998). Adeno-associated virus Rep78 protein interacts with protein kinase A and its homolog PRKX and inhibits CREB-dependent transcriptional activation. *J Virol* **72**, 7916-7925.
- DIMATTIA, M., GOVINDASAMY, L., LEVY, H.C., GURDA-WHITAKER, B., KALINA, A., KOHLBRENNER, E., CHIORINI, J.A., MCKENNA, R., MUZYCZKA, N., ZOLOTUKHIN, S., and AGBANDJE-MCKENNA, M. (2005). Production, purification, crystallization and preliminary X-ray structural studies of adeno-associated virus serotype 5. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 917-921.
- DING, W., YAN, Z., ZAK, R., SAAVEDRA, M., RODMAN, D.M., and ENGELHARDT, J.F. (2003). Second-strand genome conversion of adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and AAV-5 is not rate limiting following apical infection of polarized human airway epithelia. *J Virol* **77**, 7361-7366.
- DING, W., ZHANG, L., YAN, Z., and ENGELHARDT, J.F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* **12**, 873-880.
- DONG, J.Y., FAN, P.D., and FRIZZELL, R.A. (1996). Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* **7**, 2101-2112.
- DORSCH, S., LIEBISCH, G., KAUFMANN, B., VON LANDENBERG, P., HOFFMANN, J.H., DROBNIK, W., and MODROW, S. (2002). The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. *J Virol* **76**, 2014-2018.
- DOUAR, A.M., POULARD, K., STOCKHOLM, D., and DANOS, O. (2001). Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* **75**, 1824-1833.
- DREW, H.R., LOCKETT, L.J., and BOTH, G.W. (2007). Increased complexity of wild-type adeno-associated virus-chromosomal junctions as determined by analysis of unselected cellular genomes. *J Gen Virol* **88**, 1722-1732.
- DRITTANTI, L., JENNY, C., POULARD, K., SAMBA, A., MANCEAU, P., SORIA, N., VINCENT, N., DANOS, O., and VEGA, M. (2001). Optimised helper virus-free production of high-quality Adeno-Associated virus vectors. In *J. Gene Med.* pp. 59-71.
- DUAN, D., LI, Q., KAO, A.W., YUE, Y., PESSIN, J.E., and ENGELHARDT, J.F. (1999). Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **73**, 10371-10376.
- DUAN, D., YUE, Y., and ENGELHARDT, J.F. (2001). Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Mol Ther* **4**, 383-391.
- DUAN, D., YUE, Y., YAN, Z., YANG, J., and ENGELHARDT, J.F. (2000). Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* **105**, 1573-1587.
- DUBIELZIG, R., KING, J.A., WEGER, S., KERN, A., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1999). Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsidation complexes. *J. Virol.* **73**, 8989-8998.
- DURING, M.J., XU, R., YOUNG, D., KAPLITT, M.G., SHERWIN, R.S., and LEONE, P. (1998). Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector [In Process Citation]. *Nat Med* **4**, 1131-1135.
- DUTHEIL, N., SHI, F., DUPRESSOIR, T., and LINDEN, R.M. (2000). Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4862-4866.
- DUTHEIL, N., YOON-ROBARTS, M., WARD, P., HENCKAERTS, E., SKRABANEK, L., BERNIS, K.I., CAMPAGNE, F., and LINDEN, R.M. (2004). Characterization of the mouse adeno-associated virus AAVS1 ortholog. *J Virol* **78**, 8917-8921.
- EBERT, D.H., DEUSSING, J., PETERS, C., and DERMODY, T.S. (2002). Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J Biol Chem* **277**, 24609-24617.
- ENSINGER, M.J., and GINSBERG, H.S. (1972). Selection and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus. *J. Virol.* **10**, 328-339.
- FAN, P.-D., and DONG, J.-Y. (1997). Replication of rep-cap genes is essential for the high-efficiency production of recombinant AAV. *Hum. Gene Ther.* **8**, 87-98.

- FARSON, D., HARDING, T.C., TAO, L., LIU, J., POWELL, S., VIMAL, V., YENDLURI, S., KOPRIVNIKAR, K., HO, K., TWITTY, C., HUSAK, P., LIN, A., SNYDER, R.O., and DONAHUE, B.A. (2004). Development and characterization of a cell line for large-scale, serum-free production of recombinant adeno-associated viral vectors. *J Gene Med* **6**, 1369-1381.
- FAVRE, D., BLOUIN, V., PROVOST, N., SPISEK, R., PORROT, F., BOHL, D., MARMÉ, F., CHEREL, Y., SALVETTI, A., HURTREL, B., HEARD, J., RIVIÈRE, Y., and MOULLIER, P. (2002). Lack of immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant Adeno-Associated Virus. *J. Virol.* **76**, 11605-11611.
- FAVRE, D., CHEREL, Y., PROVOST, N., BLOUIN, V., FERRY, N., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2000). Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle. *Gene Ther.* **7**, 1417-1420.
- FAVRE, D., PROVOST, N., BLOUIN, V., BLANCHO, G., CHEREL, Y., SALVETTI, A., and MOULLIER, P. (2001). Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol. Ther.* **4**, 559-566.
- FERRARI, F.K., SAMULSKI, T., SHENK, T., and SAMULSKI, R.J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant Adeno-Associated Virus vectors. *J. Virol.* **70**, 3227-3234.
- FISCHER, A.C., BECK, S.E., SMITH, C.I., LAUBE, B.L., ASKIN, F.B., GUGGINO, S.E., ADAMS, R.J., FLOTTE, T.R., and GUGGINO, W.B. (2003). Successful transgene expression with serial doses of aerosolized rAAV2 vectors in rhesus macaques. *Mol Ther* **8**, 918-926.
- FISHER, K.J., GAO, G.P., WEITZMAN, M.D., DEMATTEO, R., BURDA, J.F., and WILSON, J.M. (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading strand synthesis. *Journal of Virology* **70**, 520-532.
- FLANNERY, J.G., ZOLOTUKHIN, S., VAGUERO, M.I., LA VAIL, M.M., MUZYCZKA, N., and HAUSWIRTH, W.W. (1997). Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6916-6921.
- FLOTTE, T., CARTER, B., CONRAD, C., GUGGINO, W., REYNOLDS, T., ROSENSTEIN, B., TAYLOR, G., WALDEN, S., and WETZEL, R. (1996). A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* **7**, 1145-1159.
- FLOTTE, T.R. (2004). Immune responses to recombinant adeno-associated virus vectors: putting preclinical findings into perspective. *Hum Gene Ther* **15**, 716-717.
- FLOTTE, T.R. (2005). Adeno-associated virus-based gene therapy for inherited disorders. *Pediatr Res* **58**, 1143-1147.
- FLOTTE, T.R., AFIONE, S.A., CONRAD, C., MCGRATH, S.A., SOLOW, R., OKA, H., ZEITLIN, P.L., GUGGINO, W.B., and CARTER, B.J. (1993). Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 10613-10617.
- FLOTTE, T.R., CONLON, T.J., POIRIER, A., CAMPBELL-THOMPSON, M., and BYRNE, B.J. (2007). Preclinical characterization of a recombinant adeno-associated virus type 1-pseudotyped vector demonstrates dose-dependent injection site inflammation and dissemination of vector genomes to distant sites. *Hum Gene Ther* **18**, 245-256.
- FRAEFEL, C., SONG, S., LIM, F., LANG, P., YU, L., WANG, Y., WILD, P., and GELLER, A.I. (1996). Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J Virol* **70**, 7190-7197.
- FRANCOIS, A., GUILBAUD, M., AWEDIKIAN, R., CHADEUF, G., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2005). The cellular TATA binding protein is required for rep-dependent replication of a minimal adeno-associated virus type 2 p5 element. *J Virol.* **79**, 11082-11094.
- GAO, G., ALVIRA, M.R., SOMANATHAN, S., LU, Y., VANDENBERGHE, L.H., RUX, J.J., CALCEDO, R., SANMIGUEL, J., ABBAS, Z., and WILSON, J.M. (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6081-6086.

- GAO, G., ALVIRA, M.R., WANG, L., CALCEDO, R., JOHNSTON, J., and WILSON, J.M. (2002a). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11854-11859.
- GAO, G., LEBHERZ, C., WEINER, D.J., GRANT, R., CALCEDO, R., MCCULLOUGH, B., BAGG, A., ZHANG, Y., and WILSON, J.M. (2004a). Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* **103**, 3300-3302. Epub 2003 Dec 3324.
- GAO, G., VANDENBERGHE, L.H., ALVIRA, M.R., LU, Y., CALCEDO, R., ZHOU, X., and WILSON, J.M. (2004b). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* **78**, 6381-6388.
- GAO, G.P., LU, F., SANMIGUEL, J.C., TRAN, P.T., ABBAS, Z., LYND, K.S., MARSH, J., SPINNER, N.B., and WILSON, J.M. (2002b). Rep/Cap Gene Amplification and High-Yield Production of AAV in an A549 Cell Line Expressing Rep/Cap. *Mol. Ther.* **5**, 644-649.
- GAO, G.P., QU, G., BURNHAM, M.S., HUANG, J., CHIRMULE, N., JOSHI, B., YU, Q.C., MARSH, J.A., CONCEICAO, C.M., and WILSON, J.M. (2000). Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo. *Hum. Gene Ther.* **11**, 2079-2091.
- GAO, G.P., QU, G., FAUST, L.Z., ENGDAHL, R.K., XIAO, W., HUGHES, J.V., ZOLTICK, P.W., and WILSON, J.M. (1998). High-titer Adeno-Associated Viral vectors from a rep/cap cell line and hybrid shuttle virus. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2353-2362.
- GEOFFROY, M.C., EPSTEIN, A.L., TOUBLANC, E., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2004). Herpes simplex virus type 1 ICP0 protein mediates activation of adeno-associated virus type 2 rep gene expression from a latent integrated form. *J Virol* **78**, 10977-10986.
- GIGOUT, L., REBOLLO, P., CLEMENT, N., WARRINGTON, K.H., JR., MUZYCZKA, N., LINDEN, R.M., and WEBER, T. (2005). Altering AAV tropism with mosaic viral capsids. *Mol Ther* **11**, 856-865.
- GIRAUD, C., WINOCOUR, E., and BERNS, K.I. (1995). Recombinants junctions formed by site-specific integration of adeno-associated virus into an episome. *J. Virol.* **69**, 6917-6924.
- GIROD, A., RIED, M., WOBUS, C., LAHM, H., LEIKE, K., KLEINSCHMIDT, J., DELEAGE, G., and HALLEK, M. (1999). Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2 [published erratum appears in *Nat Med* 1999 Dec;5(12):1438]. *Nat Med* **5**, 1052-1056.
- GIROD, A., WOBUS, C.E., ZADORI, Z., RIED, M., LEIKE, K., TIJSSEN, P., KLEINSCHMIDT, J.A., and HALLEK, M. (2002). The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* **83**, 973-978.
- GOTTLIEB, J., and MUZYCZKA, N. (1988). In vitro excision of adeno-associated virus DNA from recombinant plasmids: isolation of an enzyme fraction from HeLa cells that cleaves DNA at poly(G) sequences. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2513-2522.
- GOULA, D., BENOIST, C., MANTERO, S., MERLO, G., LEVI, G., and DEMENEIX, B.A. (1998). Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther* **5**, 1291-1295.
- GOVINDASAMY, L., PADRON, E., MCKENNA, R., MUZYCZKA, N., KALUDOV, N., CHIORINI, J.A., and AGBANDJE-MCKENNA, M. (2006). Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4. *J Virol* **80**, 11556-11570.
- GREBER, U.F., and FASSATI, A. (2003). Nuclear import of viral DNA genomes. *Traffic* **4**, 136-143.
- GRIEGER, J.C., SNOWDY, S., and SAMULSKI, R.J. (2006). Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly. *J Virol* **80**, 5199-5210.
- GRIFMAN, M., TREPPEL, M., SPEECE, P., GILBERT, L.B., ARAP, W., PASQUALINI, R., and WEITZMAN, M.D. (2001). Incorporation of Tumor-Targeting Peptides into Recombinant Adeno-associated Virus Capsids. *Mol Ther* **3**, 964-975.
- GRIMM, D., KAY, M.A., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2003a). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther* **7**, 839-850.

- GRIMM, D., KERN, A., PAWLITA, M., FERRARI, F.K., SAMULSKI, R.J., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1999). Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Ther.* **6**, 1322-1330.
- GRIMM, D., KERN, A., RITTNER, K., and KLEINSCHMIDT, J. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2745-2760.
- GRIMM, D., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1999). Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2445-2450.
- GRIMM, D., ZHOU, S., NAKAI, H., THOMAS, C.E., STORM, T.A., FUESS, S., MATSUSHITA, T., ALLEN, J., SUROSKY, R., LOCHRIE, M., MEUSE, L., MCCLELLAND, A., COLOSI, P., and KAY, M.A. (2003b). Pre-clinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus (AAV) vectors for liver gene therapy. *Blood* **5**, 5.
- HABERMAN, R.P., MCCOWN, T.J., and SAMULSKI, R.J. (2000). Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol* **74**, 8732-8739.
- HALBERT, C.L., ALLEN, J.M., and MILLER, A.D. (2001). Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J Virol* **75**, 6615-6624.
- HALBERT, C.L., MILLER, A.D., MCNAMARA, S., EMERSON, J., GIBSON, R.L., RAMSEY, B., and AITKEN, M.L. (2006). Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* **17**, 440-447.
- HANDA, A., MURAMATSU, S., QIU, J., MIZUKAMI, H., and BROWN, K.E. (2000). Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. *J Gen Virol* **81**, 2077-2084.
- HANDA, H., and CARTER, B.J. (1979). Adeno-associated virus DNA replication complexes in herpes simplex virus or adenovirus-infected cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 6603-6610.
- HANDA, H., SHIROKI, K., and SHIMOJO, H. (1977). Establishment and characterization of KB cell lines latently infected with adeno-associated virus type 1. *Virology* **82**, 84-92.
- HANSEN, J., QING, K., KWON, H.J., MAH, C., and SRIVASTAVA, A. (2000). Impaired intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2 vectors limits efficient transduction of murine fibroblasts. *J Virol* **74**, 992-996.
- HANSEN, J., QING, K., and SRIVASTAVA, A. (2001a). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol* **75**, 4080-4090.
- HANSEN, J., QING, K., and SRIVASTAVA, A. (2001b). Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2. *Mol Ther* **4**, 289-296.
- HAUCK, B., CHEN, L., and XIAO, W. (2003). Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol Ther* **7**, 419-425.
- HERMONAT, P.L. (1994). Adeno-associated virus inhibits human papillomavirus type 16: a viral interaction implicated in cervical cancer. *Cancer Research* **54**, 2278-2281.
- HERMONAT, P.L., LABOW, M.A., WRIGHT, K.I., and MUZYCZKA, N. (1984). Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J. Virol.* **51**, 329-339.
- HERMONAT, P.L., and MUZYCZKA, N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *PPproceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **81**, 6466-64470.
- HERMONAT, P.L., SANTIN, A.D., BATCHU, R.B., and ZHAN, D. (1998). The adeno-associated virus Rep78 major regulatory protein binds the cellular TATA-binding protein in vitro and in vivo. *Virology* **245**, 120-127.
- HERZOG, R.W. (2007). Immune Responses to AAV Capsid: Are Mice Not Humans After All? *Mol Ther* **15**, 649-650.
- HERZOG, R.W., FIELDS, P.A., ARRUDA, V.R., BRUBAKER, J.O., ARMSTRONG, E., MCCLINTOCK, D., BELLINGER, D.A., COUTO, L.B., NICHOLS, T.C., and HIGH, K.A.

- (2002). Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther* **13**, 1281-1291.
- HICKMAN, A.B., RONNING, D.R., PEREZ, Z.N., KOTIN, R.M., and DYDA, F. (2004). The nuclease domain of adeno-associated virus rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces. *Mol Cell* **13**, 403-414.
- HIGH, K.A. (2004). Clinical gene transfer studies for hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* **30**, 257-267.
- HILEMAN, R.E., FROMM, J.R., WEILER, J.M., and LINHARDT, R.J. (1998). Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioessays* **20**, 156-167.
- HOGGAN, M.D., BLACKLOW, N.R., and ROWE, W.P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 1467-1474.
- HONG, G., WARD, P., and BERNS, K.I. (1992). In vitro replication of adeno-associated virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4673-4677.
- HORER, M., WEGER, S., BUTZ, K., HOPPE-SEYLER, F., GEISEN, C., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1995). Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *Journal of Virology* **69**, 5485-5496.
- HUANG, J. (2000). Aggregation of AAV vectors, its impact on liver directed gene transfer and development of vector formulations to prevent and dissolve aggregation and enhance gene transfer efficiency. *Molecular Therapy* **1**, S286.
- IM, D.S., and MUZYCZKA, N. (1989). Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats. *J. Virol.* **63**, 3095-3104.
- IM, D.S., and MUZYCZKA, N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* **61**, 447-457.
- INAGAKI, K., FUESS, S., STORM, T.A., GIBSON, G.A., MCTIERNAN, C.F., KAY, M.A., and NAKAI, H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther* **14**, 45-53.
- INOUE, N., and RUSSEL, D.W. (1998). Packaging cells based on inducible gene amplification for the production of adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **72**, 7024-7031.
- JACOBSON, S.G., BOYE, S.L., ALEMAN, T.S., CONLON, T.J., ZEISS, C.J., ROMAN, A.J., CIDECIYAN, A.V., SCHWARTZ, S.B., KOMAROMY, A.M., DOOBRAJH, M., CHEUNG, A.Y., SUMAROKA, A., PEARCE-KELLING, S.E., AGUIRRE, G.D., KAUSHAL, S., MAGUIRE, A.M., FLOTTE, T.R., and HAUSWIRTH, W.W. (2006). Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis. *Hum Gene Ther* **17**, 845-858.
- JANIK, J.E., HUSTON, M.M., CHO, K., and ROSE, J.A. (1989). Efficient synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both adenovirus DNA binding protein and VA I RNA. *Virology* **168**, 320-329.
- JANIK, J.E., HUSTON, M.M., and ROSE, J.A. (1981). Locations of adenovirus genes required for the replication of adenovirus-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1925-1929.
- JOHNSON, F., THOMSON, T., TAYLOR, P., and VLAZNY, D. (1977). Molecular similarities among the adenovirus-associated virus polypeptides and evidence for a precursor protein. *Virology* **82**, 1-13.
- JOOSS, K., YANG, Y., FISHER, K.J., and WILSON, J.M. (1998). Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* **72**, 4212-4223.
- KALUDOV, N., BROWN, K.E., WALTERS, R.W., ZABNER, J., and CHIORINI, J.A. (2001). Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J. Virol.* **75**, 6884-6893.
- KALUDOV, N., HANDELMAN, B., and CHIORINI, J.A. (2002). Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1235-1243.

- KASHIWAKURA, Y., TAMAYOSE, K., IWABUCHI, K., HIRAI, Y., SHIMADA, T., MATSUMOTO, K., NAKAMURA, T., WATANABE, M., OSHIMI, K., and DAIDA, H. (2005). Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **79**, 609-614.
- KATANO, H., AFIONE, S., SCHMIDT, M., and CHIORINI, J.A. (2004). Identification of adeno-associated virus contamination in cell and virus stocks by PCR. *Biotechniques* **36**, 676-680.
- KAY, M.A., MANNO, C.S., RAGNI, M.V., LARSON, P.J., COUTO, L.B., MCCLELLAND, A., GLADER, B., CHEW, A.J., S, J.T., HERZOG, R.W., ARRUDA, V., JOHNSON, F., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W., and HIGH, K.A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* **24**, 257-261.
- KERN, A., SCHMIDT, K., LEDER, C., MULLER, O.J., WOBUS, C.E., BETTINGER, K., VON DER LIETH, C.W., KING, J.A., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2003). Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol* **77**, 11072-11081.
- KHLEIF, S.N., MYERS, T., CARTER, B.J., and TREMPER, J.P. (1991). Inhibition of cellular transformation by the adeno-associated virus rep gene. *Virology* **181**, 738-741.
- KING, J.A., DUBIELZIG, R., GRIMM, D., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2001). DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.* **20**, 3282-3291.
- KITTS, P. (1996). Construction of baculovirus recombinants. *Cytechnology* **20**, 111-123.
- KITTS, P.A., and POSSEE, R.D. (1993). A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques* **14**, 810-817.
- KOHLBRENNER, E., ASLANIDI, G., NASH, K., SHKLYAEV, S., CAMPBELL-THOMPSON, M., BYRNE, B.J., SNYDER, R.O., MUZYCZKA, N., WARRINGTON, K.H., JR., and ZOLOTUKHIN, S. (2005). Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system. *Mol Ther* **12**, 1217-1225.
- KOKORINA, N.A., SANTIN, A.D., LI, C., and HERMONAT, P.L. (1998). Involvement of protein-DNA interaction in adeno-associated virus Rep78-mediated inhibition of HIV-1. *J Hum Virol* **1**, 441-450.
- KOTIN, R.M. (1994). Prospects for the Use of Adeno-Associated Virus as a Vector for Human Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* **5**, 793-801.
- KOTIN, R.M., and BERNS, K.I. (1989). Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology* **170**, 460-467.
- KOTIN, R.M., LINDEN, R.M., and BERNS, K.I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* **11**, 5071-5078.
- KOTIN, R.M., SINISCALCO, M., SAMULSKI, R.J., ZHU, X., HUNTER, L., LAUGHLIN, C.A., MCLAUGHLIN, S., MUZYCZKA, N., ROCCHI, M., and BERNS, K.I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2211-2215.
- KRONENBERG, S., KLEINSCHMIDT, J.A., and BOTTCHE, B. (2001). Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO Rep* **2**, 997-1002.
- KUCK, D., LAU, T., LEUCHS, B., KERN, A., MULLER, M., GISSMANN, L., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2006). Intranasal vaccination with recombinant adeno-associated virus type 5 against human papillomavirus type 16 L1. *J Virol* **80**, 2621-2630.
- KYOSTIO, S.R., OWENS, R.A., WEITZMAN, M.D., ANTONI, B.A., CHEJANOVSKY, N., and CARTER, B.J. (1994). Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels. *Journal of Virology* **68**, 2947-2957.
- LABOW, M.A., GRAF, L.H., and BERNS, K.I. (1987). Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1320-1325.
- LAI, Y., YUE, Y., LIU, M., GHOSH, A., ENGELHARDT, J.F., CHAMBERLAIN, J.S., and DUAN, D. (2005). Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat Biotechnol* **23**, 1435-1439.

- LANE, M.D., NAM, H.J., PADRON, E., GURDA-WHITAKER, B., KOHLBRENNER, E., ASLANIDI, G., BYRNE, B., MCKENNA, R., MUZYCZKA, N., ZOLOTUKHIN, S., and AGBANDJE-MCKENNA, M. (2005). Production, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of adeno-associated virus serotype 8. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 558-561.
- LAUGHLIN, C.A., CARDELLICCHIO, C.B., and COON, H.C. (1986). Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J. Virol.* **60**, 515-524.
- LE MEUR, G., STIEGER, K., SMITH, A.J., WEBER, M., DESCHAMPS, J.Y., NIVARD, D., MENDES-MADEIRA, A., PROVOST, N., PEREON, Y., CHEREL, Y., ALI, R.R., HAMEL, C., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* **14**, 292-303.
- LEHMAN, I.R., and BOEHMER, P.E. (1999). Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem* **274**, 28059-28062.
- LEWIS, B.A., TULLIS, G., SETO, E., HORIKOSHI, N., WEINMANN, R., and SHENK, T. (1995). Adenovirus E1A proteins interact with the cellular YY1 transcription factor. *Journal of Virology* **69**, 1628-1636.
- LI, J., SAMULSKI, R.J., and XIAO, X. (1997). Role for highly regulated rep gene expression in Adeno-Associated Virus vector production. *J.Virol.* **71**, 5236-5243.
- LIM, F., HARTLEY, D., STARR, P., LANG, P., SONG, S., YU, L., WANG, Y., and GELLER, A.I. (1996). Generation of high-titer defective HSV-1 vectors using an IE 2 deletion mutant and quantitative study of expression in cultured cortical cells. *Biotechniques* **20**, 460-469.
- LINDEN, M.R., WARD, P., GIRAUD, C., WINOCOUR, E., and BERNS, K.I. (1996a). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11288-11294.
- LINDEN, R.M., WINOCOUR, E., and BERNS, K.I. (1996b). The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 7966-7972.
- LIU, L., CLARK, K.R., and JOHNSON, P.R. (1999). Production of recombinant Adeno-Associated Virus vectors using a packaging cell line and a hybrid recombinant adenovirus. *Gene Ther.* **6**, 293-299.
- LIU, X., LUO, M., ZHANG, L.N., YAN, Z., ZAK, R., DING, W., MANSFIELD, S.G., MITCHELL, L.G., and ENGELHARDT, J.F. (2005). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther* **16**, 1116-1123.
- LIU, X., VOULGAROPOULOU, F., CHEN, R., JOHNSON, P., and CLARK, K.R. (2000). Selective Rep-Cap gene amplification as a mechanism for a high-titer recombinant AAV production from stable cell lines. *Mol Ther* **4**, 394-403.
- LOGVINOFF, C., and EPSTEIN, A.L. (2001). A novel approach for herpes simplex virus type 1 amplicon vector production, using the Cre-loxP recombination system to remove helper virus. *Hum Gene Ther* **12**, 161-167.
- LOMBARDO, E., RAMIREZ, J.C., GARCIA, J., and ALMENDRAL, J.M. (2002). Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* **76**, 7049-7059.
- LU, Y.Y., WANG, L.J., MURAMATSU, S., IKEGUCHI, K., FUJIMOTO, K., OKADA, T., MIZUKAMI, H., MATSUSHITA, T., HANAZONO, Y., KUME, A., NAGATSU, T., OZAWA, K., and NAKANO, I. (2003). Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res* **45**, 33-40.
- LUKONIS, C.J., and WELLER, S.K. (1997). Formation of herpes simplex virus type 1 replication compartments by transfection: requirements and localization to nuclear domain 10. *J Virol* **71**, 2390-2399.
- MALIK, A.K., MARTINEZ, R., MUNCY, L., CARMICHAEL, E.P., and WELLER, S.K. (1992). Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL9 gene: isolation of a lacZ insertion mutant and expression in eukaryotic cells. *Virology* **190**, 702-715.

- MANNO, C.S., PIERCE, G.F., ARRUDA, V.R., GLADER, B., RAGNI, M., RASKO, J.J., OZELO, M.C., HOOTS, K., BLATT, P., KONKLE, B., DAKE, M., KAYE, R., RAZAVI, M., ZAJKO, A., ZEHNDER, J., RUSTAGI, P.K., NAKAI, H., CHEW, A., LEONARD, D., WRIGHT, J.F., LESSARD, R.R., SOMMER, J.M., TIGGES, M., SABATINO, D., LUK, A., JIANG, H., MINGOZZI, F., COUTO, L., ERTL, H.C., HIGH, K.A., and KAY, M.A. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* **12**, 342-347. Epub 2006 Feb 2012.
- MARANGA, L., CRUZ, P., AUNINS, J., and CARRONDO, M. (2002). Production of core and virus-like particles with baculovirus infected insect cells. *Adv Biochem Eng Biotechnology.* **74**, 183-206.
- MARCY, A.I., YAGER, D.R., and COEN, D.M. (1990). Isolation and characterization of herpes simplex virus mutants containing engineered mutations at the DNA polymerase locus. *J. Virol.* **64**, 2208-2216.
- MARKS, B., STOWELL, M.H., VALLIS, Y., MILLS, I.G., GIBSON, A., HOPKINS, C.R., and MCMAHON, H.T. (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**, 231-235.
- MATHEWS, L.C., GRAY, J.T., GALLAGHER, M.R., and SNYDER, R.O. (2002). Recombinant Adeno-Associated viral vector production using stable packaging and producer cell lines. *Methods Enzymol.* **346**, 393-413.
- MATSUSHITA, T., ELLIGER, S., ELLIGER, C., PODSAKOFF, G., VILLARREAL, L., KURTZMAN, G.J., IWAKI, Y., and COLOSI, P. (1998). Adeno-Associated Virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther.* **5**, 938-945.
- MCCARTY, D.M., CHRISTENSEN, M., and MUZYCZKA, N. (1991). Sequences required for coordinate induction of adeno-associated virus p19 and p40 promoters by Rep protein. *Journal of Virology* **65**, 2936-2945.
- MCCARTY, D.M., FU, H., MONAHAN, P.E., TOULSON, C.E., NAIK, P., and SAMULSKI, R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* **10**, 2112-2118.
- MCCARTY, D.M., MONAHAN, P.E., and SAMULSKI, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* **8**, 1248-1254.
- MCCARTY, D.M., PEREIRA, D.J., ZOLOTUKHIN, I., ZHOU, X., RYAN, J.H., and MUZYCZKA, N. (1994). Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* **68**, 4988-4997.
- MCLAUGHLIN, S.K., COLLIS, P., HERMONAT, P.L., and MUZYCZKA, N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* **62**, 1963-1973.
- MENESES, P., BERNS, K.I., and WINOCOUR, E. (2000). DNA sequence motifs which direct adeno-associated virus site-specific integration in a model system [In Process Citation]. *J Virol* **74**, 6213-6216.
- MERTEN, O.W., GENY-FIAMMA, C., and DOUAR, A.M. (2005). Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther* **12 Suppl 1**, S51-61.
- MILLER, E.B., GURDA-WHITAKER, B., GOVINDASAMY, L., MCKENNA, R., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., and AGBANDJE-MCKENNA, M. (2006). Production, purification and preliminary X-ray crystallographic studies of adeno-associated virus serotype 1. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**, 1271-1274.
- MINGOZZI, F., MAUS, M.V., HUI, D.J., SABATINO, D.E., MURPHY, S.L., RASKO, J.E., RAGNI, M.V., MANNO, C.S., SOMMER, J., JIANG, H., PIERCE, G.F., ERTL, H.C., and HIGH, K.A. (2007). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* **13**, 419-422.
- MONAHAN, P.E., and SAMULSKI, R.J. (2000). AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* **7**, 24-30.
- MONAHAN, P.E., SAMULSKI, R.J., TAZELAAR, J., XIAO, X., NICHOLS, T.C., BELLINGER, D.A., READ, M.S., and WALSH, C.E. (1998). Direct intramuscular injection with

- recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther.* **5**, 40-49.
- MORI, S., WANG, L., TAKEUCHI, T., and KANDA, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* **330**, 375-383.
- MOSKALENKO, M., CHEN, L., VAN ROEY, M., DONAHUE, B.A., SNYDER, R.O., MCARTHUR, J.G., and PATEL, S.D. (2000). Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* **74**, 1761-1766.
- MULLER, O.J., KAUL, F., WEITZMAN, M.D., PASQUALINI, R., ARAP, W., KLEINSCHMIDT, J.A., and TREPEL, M. (2003). Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* **21**, 1040-1046.
- MUSATOV, S., ROBERTS, J., PFAFF, D., and KAPLITT, M. (2002). A cis-Acting Element That Directs Circular Adeno-Associated Virus Replication and Packaging. *J Virol* **76**, 12792-12802.
- MYERS, M.W., LAUGHLIN, C.A., JAY, F.T., and CARTER, B.J. (1980). Adenovirus helper function for growth of Adeno-Associated Virus: effect of temperature-sensitive mutations in adenovirus early gene region 2. *J. Virol.* **35**, 65-75.
- NAHREINI, P., LARSEN, S.H., and SRIVASTAVA, A. (1992). Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome. *Gene* **119**, 265-272.
- NAKAI, H., STORM, T.A., and KAY, M.A. (2000a). Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors [see comments]. *Nat Biotechnol* **18**, 527-532.
- NAKAI, H., STORM, T.A., and KAY, M.A. (2000b). Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol* **74**, 9451-9463.
- NAKAMURA, T., NISHIZAWA, T., HAGIYA, M., SEKI, T., SHIMONISHI, M., SUGIMURA, A., TASHIRO, K., and SHIMIZU, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**, 440-443.
- NEGISHI, A., CHEN, J., MCCARTY, D.M., SAMULSKI, R.J., LIU, J., and SUPERFINE, R. (2004). Analysis of the interaction between adeno-associated virus and heparan sulfate using atomic force microscopy. *Glycobiology* **14**, 969-977.
- NI, T.H., MCDONALD, W.F., ZOLOTUKHIN, I., MELENDY, T., WAGA, S., STILLMAN, B., and MUZYCZKA, N. (1998). Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J. Virol.* **72**, 2777-2787.
- NI, T.H., ZHOU, X., MCCARTY, D.M., ZOLOTUKHIN, I., and MUZYCZKA, N. (1994). In vitro replication of adeno-associated virus DNA. *Journal of Virology* **68**, 1128-1138.
- NICKLIN, S.A., BUENING, H., DISHART, K.L., DE ALWIS, M., GIROD, A., HACKER, U., THRASHER, A.J., ALI, R.R., HALLEK, M., and BAKER, A.H. (2001). Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther* **4**, 174-181.
- NONY, P., CHADEUF, G., TESSIER, J., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2003). Evidence for packaging rep-cap sequences into AAV-2 capsids in the absence of the Inverted Terminal Repeat: a model for the generation of rep+ AAV particles. *J. Virol.* **77**, 776-781.
- NONY, P., TESSIER, J., CHADEUF, G., WARD, P., GIRAUD, A., DUGAST, M., LINDEN, R.M., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2001). Novel cis-Acting Replication Element in the Adeno-Associated Virus Type 2 Genome Is Involved in Amplification of Integrated rep-cap Sequences. *J. Virol.* **75**, 9991-9994.
- O'RIORDAN, C.R., LACHAPPELLE, A.L., VINCENT, K.A., and WADSWORTH, S.C. (2000). Scaleable chromatographic purification process for recombinant adeno-associated virus (rAAV). *J. Gene Med.* **2**, 444-454.
- OEHMIG, A., FRAEFEL, C., BREAKEFIELD, X.O., and ACKERMANN, M. (2004). Herpes simplex virus type 1 amplicons and their hybrid virus partners, EBV, AAV, and retrovirus. *Curr Gene Ther* **4**, 385-408.

- OELZE, I., RITTNER, K., and SCZAKIEL, G. (1994). Adeno-associated virus type 2 rep gene-mediated inhibition of basal gene expression of human immunodeficiency virus type 1 involves its negative regulatory functions. *Journal of Virology* **68**, 1229-1233.
- OPIE, S.R., WARRINGTON, K.H., JR., AGBANDJE-MCKENNA, M., ZOLOTUKHIN, S., and MUZYCZKA, N. (2003). Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol* **77**, 6995-7006.
- OWENS, R.A., WEITZMAN, M.D., KYOSTIO, S.R., and CARTER, B.J. (1993). Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J. Virol.* **67**, 997-1005.
- PACAK, C.A., MAH, C.S., THATTALIYATH, B.D., CONLON, T.J., LEWIS, M.A., CLOUTIER, D.E., ZOLOTUKHIN, I., TARANTAL, A.F., and BYRNE, B.J. (2006). Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res* **99**, e3-9.
- PADRON, E., BOWMAN, V., KALUDOV, N., GOVINDASAMY, L., LEVY, H., NICK, P., MCKENNA, R., MUZYCZKA, N., CHIORINI, J.A., BAKER, T.S., and AGBANDJE-MCKENNA, M. (2005). Structure of adeno-associated virus type 4. *J Virol* **79**, 5047-5058.
- PANTE, N., and KANN, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**, 425-434.
- PARKER, J.S., and PARRISH, C.R. (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* **74**, 1919-1930.
- PASQUALE, G.D., DAVIDSON, B.L., STEIN, C.S., MARTINS, I., SCUDIERO, D., MONKS, A., and CHIORINI, J.A. (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* **9**, 1306-1312.
- PERABO, L., BUNING, H., KOFLER, D.M., RIED, M.U., GIROD, A., WENDTNER, C.M., ENSSLE, J., and HALLEK, M. (2003). In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Mol Ther* **8**, 151-157.
- PEREIRA, D.J., MCCARTY, D.M., and MUZYCZKA, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol* **71**, 1079-1088.
- PEREIRA, D.J., and MUZYCZKA, N. (1997). The cellular transcription factor SP1 and an unknown cellular protein are required to mediate rep protein activation of the Adeno-Associated Virus p19 promoter. *J. Virol.* **71**, 1747-1756.
- PHILPOTT, N.J., GOMOS, J., BERNS, K.I., and FALCK-PEDERSEN, E. (2002). A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12381-12385.
- PONNAZHAGAN, S., MAHENDRA, G., KUMAR, S., THOMPSON, J.A., and CASTILLAS, M., JR. (2002). Conjugate-based targeting of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors by using avidin-linked ligands. *J Virol* **76**, 12900-12907.
- POTTER, M., CHESNUT, K., MUZYCZKA, N., FLOTTE, T., and ZOLOTUKHIN, S. (2002). Streamlined large-scale production of recombinant Adeno-Associated virus (rAAV) vectors. *Methods Enzymol.* **346**, 413-430.
- PROVOST, N.L.M., G. WEBER, M. MENDES-MADEIRA, A. PODEVIN, G. CHEREL, Y. COLLE, M.A. DESCHAMPS, J-Y.MOULLIER, P. ROLLING, F. (2005). Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol.Ther.* **11**, 275-283.
- QIAO, C., LI, J., SKOLD, A., ZHANG, X., and XIAO, X. (2002). Feasibility of generating adeno-associated virus packaging cell lines containing inducible adenovirus helper genes. *J Virol* **76**, 1904-1913.
- QING, K., MAH, C., HANSEN, J., ZHOU, S., DWARKI, V., and SRIVASTAVA, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature Med.* **5**, 71-77.
- QIU, J., and BROWN, K.E. (1999). Integrin alphaVbeta5 is not involved in adeno-associated virus type 2 (AAV2) infection. *Virology* **264**, 436-440.

- QIU, J., NAYAK, R., and PINTEL, D.J. (2004). Alternative polyadenylation of adeno-associated virus type 5 RNA within an internal intron is governed by both a downstream element within the intron 3' splice acceptor and an element upstream of the P41 initiation site. *J Virol* **78**, 83-93.
- QIU, J., NAYAK, R., TULLIS, G.E., and PINTEL, D.J. (2002). Characterization of the transcription profile of adeno-associated virus type 5 reveals a number of unique features compared to previously characterized adeno-associated viruses. *J Virol* **76**, 12435-12447.
- QU, G., BAHR-DAVIDSON, J., PRADO, J., TAI, A., CATANIAG, F., MCDONNELL, J., ZHOU, J., HAUCK, B., LUNA, J., SOMMER, J.M., SMITH, P., ZHOU, S., COLOSI, P., HIGH, K.A., PIERCE, G.F., and WRIGHT, J.F. (2007). Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography. *J Virol Methods* **140**, 183-192.
- RABINOWITZ, J.E., BOWLES, D.E., FAUST, S.M., LEDFORD, J.G., CUNNINGHAM, S.E., and SAMULSKI, R.J. (2004). Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups. *J Virol* **78**, 4421-4432.
- RABINOWITZ, J.E., ROLLING, F., LI, C., CONRATH, H., XIAO, W., XIAO, X., and SAMULSKI, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* **76**, 791-801.
- RABINOWITZ, J.E., XIAO, W., and SAMULSKI, R.J. (1999). Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology* **265**, 274-285.
- REED, S.E., STALEY, E.M., MAYGINNES, J.P., PINTEL, D.J., and TULLIS, G.E. (2006). Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Methods* **138**, 85-98.
- REICH, S.J., AURICCHIO, A., HILDINGER, M., GLOVER, E., MAGUIRE, A.M., WILSON, J.M., and BENNETT, J. (2003). Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* **14**, 37-44.
- RIED, M.U., GIROD, A., LEIKE, K., BUNING, H., and HALLEK, M. (2002). Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol* **76**, 4559-4566.
- RITTNER, K., HEILBRONN, R., KLEINSCHMIDT, J.A., and SCZAKIEL, G. (1992). Adeno-associated virus type 2-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: involvement of p78rep/p68rep and the HIV-1 long terminal repeat. *Journal of General Virology* **73**, 2977-2981.
- ROSE, J., MAIZEL, J., and SHATKIN, A. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J. Virol.* **8**, 766-770.
- RUFFING, M., HEID, H., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1994). Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif. *Journal of General Virology* **75**, 3385-3392.
- RUFFING, M., ZENTGRAF, H., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1992). Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J. Virol.* **66**, 6922-6930.
- RUTLEDGE, E.A., HALBERT, C.L., and RUSSELL, D.W. (1998). Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* **72**, 309-319.
- SABATINO, D.E., MINGOZZI, F., HUI, D.J., CHEN, H., COLOSI, P., ERTL, H.C., and HIGH, K.A. (2005). Identification of mouse AAV capsid-specific CD8⁺ T cell epitopes. *Mol Ther* **12**, 1023-1033.
- SAEKI, Y., FRAEFEL, C., ICHIKAWA, T., BREAKFIELD, X.O., and CHIOCCA, E.A. (2001). Improved Helper Virus-Free Packaging System for HSV Amplicon Vectors Using an ICP27-Deleted, Oversized HSV-1 DNA in a Bacterial Artificial Chromosome. *Mol Ther* **3**, 591-601.
- SAEKI, Y., ICHIKAWA, T., SAEKI, A., CHIOCCA, E.A., TOBLER, K., ACKERMANN, M., BREAKFIELD, X.O., and FRAEFEL, C. (1998). Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 2787-2794.

- SALVETTI, A., ORÈVE, S., CHADEFU, G., FAVRE, D., CHEREL, Y., CHAMPION-ARNAUD, P., DAVID-AMELINE, J., and MOULLIER, P. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Gene Ther.* **9**, 695-706.
- SAMULSKI, R.J. (1993). Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr. Opin. Biotech.* **3**, 74-80.
- SAMULSKI, R.J., BERNS, K.I., TAM, M., and MUZYCZKA, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2077-2081.
- SAMULSKI, R.J., CHANG, L.S., and SHENK, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* **63**, 3822-3828.
- SAMULSKI, R.J., SRIVASTAVA, A., BERNS, K.I., and MUZYCZKA, N. (1983). Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell* **33**, 135-143.
- SANLIOGLU, S., BENSON, P.K., YANG, J., ATKINSON, E.M., REYNOLDS, T., and ENGELHARDT, J.F. (2000). Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* **74**, 9184-9196.
- SAUDAN, P., VLACH, J., and BEARD, P. (2000). Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb. *EMBO J.* **19**, 4351-4361.
- SCHMID, G. (1996). Insect cell cultivation: growth and kinetics. *Cytechnology* **20**, 43-55.
- SCHMIDT, M., AFIONE, S., and KOTIN, R.M. (2000). Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *J. Virol.* **74**, 9441-9450.
- SCHMIDT, M., and CHIORINI, J.A. (2006). Gangliosides are essential for bovine adeno-associated virus entry. *J Virol* **80**, 5516-5522.
- SCHMIDT, M., GROT, E., CERVENKA, P., WAINER, S., BUCK, C., and CHIORINI, J.A. (2006). Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol* **80**, 5082-5085.
- SCHMIDT, M., KATANO, H., BOSSIS, I., and CHIORINI, J.A. (2004). Cloning and characterization of a bovine adeno-associated virus. *J Virol* **78**, 6509-6516.
- SCHNEPP, B.C., CLARK, K.R., KLEMANSKI, D.L., PACAK, C.A., and JOHNSON, P.R. (2003). Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* **77**, 3495-3504.
- SCHNEPP, B.C., JENSEN, R.L., CHEN, C.L., JOHNSON, P.R., and CLARK, K.R. (2005). Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* **79**, 14793-14803.
- SEISENBERGER, G., RIED, M.U., ENDRESS, T., BUNING, H., HALLEK, M., and BRAUCHLE, C. (2001). Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* **294**, 1929-1932.
- SEVER, S., DAMKE, H., and SCHMID, S.L. (2000). Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **150**, 1137-1148.
- SHI, X., FANG, G., SHI, W., and BARTLETT, J.S. (2006). Insertional mutagenesis at positions 520 and 584 of adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors with eliminated heparin-binding ability and introduced novel tropism. *Hum Gene Ther* **17**, 353-361.
- SHI, Y., SETO, E., CHANG, L.S., and SHENK, T. (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* **67**, 377-388.
- SIECZKARSKI, S.B., and WHITTAKER, G.R. (2003). Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic* **4**, 333-343.
- SIMPSON, A.A., CHIPMAN, P.R., BAKER, T.S., TIJSSSEN, P., and ROSSMANN, M.G. (1998). The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution. *Structure* **6**, 1355-1367.

- SMITH, R.H., DING, C., and KOTIN, R.M. (2003). Serum-free production and column purification of adeno-associated virus type 5. *J Virol Methods* **114**, 115-124.
- SMITH, R.H., and KOTIN, R.M. (1998). The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *J. Virol.* **72**, 4874-4881.
- SMITH, R.H., and KOTIN, R.M. (2000). An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV ori DNA. *J Virol* **74**, 3122-3129.
- SNYDER, R., XIAO, S., and SAMULSKI, R.J. (1996). Production of recombinant adeno-associated viral vectors. In *Current Protocols in Human Genetics*. N. Dracopoli, J. Haines, B. Krof, D. Moir, C. Morton, C. Seidman, J. Seidman, and D. Smith, eds. (John Wiley and Sons Publisher, New York, NJ) pp. 12.11.11-12.11.23.
- SNYDER, R.O., and FRANCIS, J. (2005). Adeno-associated viral vectors for clinical gene transfer studies. *Curr Gene Ther* **5**, 311-321.
- SNYDER, R.O., IM, D.S., and MUZYCZKA, N. (1990). Evidence for covalent attachment of the adeno-associated virus (AAV) Rep protein to the ends of the AAV genome. *J. Virol.* **64**, 6204-6213.
- SNYDER, R.O., IM, D.S., NI, T., XIAO, X., SAMULSKI, R.J., and MUZYCZKA, N. (1993). Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral Rep protein. *J. Virol.* **67**, 6096-6104.
- SNYDER, R.O., MIAO, C., MEUSE, L., TUBB, J., DONAHUE, B.A., LIN, H.F., STAFFORD, W., PATEL, S., THOMPSON, A.R., NICHOLS, T., READ, M.S., BELLINGER, D.A., BRINKHOUS, K.M., and KAY, M.A. (1999). Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant Adeno-Associated viral vectors. *Nature Med.* **5**, 64-70.
- SNYDER, R.O., MIAO, C.H., PATIJN, G.A., SPRATT, S.K., DANOS, O., NAGY, D., GOWN, A.M., WINTHER, B., MEUSE, L., COHEN, L.K., THOMPSON, A.R., and KAY, M.A. (1997). Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nature Genet.* **16**, 270-276.
- SOLLERBRANT, K., ELMEN, J., WAHLESTEDT, C., ACKER, J., LEBLOIS-PREHAUD, H., LATTA-MAHIEU, M., YEH, P., and PERRICAUDET, M. (2001). A novel method using baculovirus-mediated gene transfer for production of recombinant adeno-associated virus vectors. *J Gen Virol* **82**, 2051-2060.
- SONNTAG, F., BLEKER, S., LEUCHS, B., FISCHER, R., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2006). Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol* **80**, 11040-11054.
- SRIVASTAVA, A., LUSBY, E.W., and BERNS, K.I. (1983). Nucleotide sequence and genomic organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* **45**, 555-564.
- STACHLER, M.D., and BARTLETT, J.S. (2006). Mosaic vectors comprised of modified AAV1 capsid proteins for efficient vector purification and targeting to vascular endothelial cells. *Gene Ther* **13**, 926-931.
- STAVROPOULOS, T.A., and STRATHDEE, C.A. (1998). An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J Virol* **72**, 7137-7143.
- STRACKER, T.H., CASSELL, G.D., WARD, P., LOO, Y.M., VAN BREUKELEN, B., CARRINGTON-LAWRENCE, S.D., HAMATAKE, R.K., VAN DER VLIET, P.C., WELLER, S.K., MELENDY, T., and WEITZMAN, M.D. (2004). The Rep protein of adeno-associated virus type 2 interacts with single-stranded DNA-binding proteins that enhance viral replication. *J Virol* **78**, 441-453.
- SUMMERFORD, C., BARTLETT, J.S., and SAMULSKI, R.J. (1999). aVb5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature Med.* **5**, 78-82.
- SUMMERFORD, C., and SAMULSKI, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72**, 1438-1445.
- SUN, L., LI, J., and XIAO, X. (2000). Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat Med* **6**, 599-602.

- SUROSKY, R.T., YRABE, M., GODWIN, S.G., MCQUISTON, S.A., KURTZMAN, G.J., OZAWA, K., and NATSOULIS, G. (1997). Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J. Virol.* **71**, 7951-7959.
- TAMAYOSE, K., HIRAI, Y., and SHIMADA, T. (1996). A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant Adeno-Associated Virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography. *Hum. Gene Ther.* **7**, 507-513.
- TESSIER, J., CHADEUF, G., NONY, P., AVET-LOISEAU, H., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2001). Characterization of adenovirus-induced inverted terminal repeat-independent amplification of integrated adeno-associated virus rep-cap sequences. *J. Virol.* **75**, 375-383.
- THOMAS, C.E., STORM, T.A., HUANG, Z., and KAY, M.A. (2004). Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* **78**, 3110-3122.
- TILLEY, R., and MAYOR, H. (1984). Identification of a region of the HSV-1 genome with helper activity for AAV. *Virus Res.* **1**, 631-647.
- TOUBLANC, E., BENRAISS, A., BONNIN, D., BLOUIN, V., CARTIER, N., EPSTEIN, A.L., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2004). Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines. *J. Gene Med.* **6**, 555-564.
- TRATSCHIN, J.-D., TAL, J., and CARTER, B.J. (1986). Negative and positive regulation in trans of gene expression from adeno-associated virus vectors in mammalian cells by a viral Rep gene product. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2884-2894.
- TRATSCHIN, J.D., MILLER, I.L., and CARTER, B.J. (1984). Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol* **51**, 611-619.
- TRATSCHIN, J.D., MILLER, I.L., SMITH, M.G., and CARTER, B.J. (1985). Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **5**, 3251-3260.
- TREMPE, J.P., and CARTER, B.J. (1988). Regulation of Adeno-Associated Virus gene expression in 293 cells: control of mRNA abundance and translation. *J. Virol.* **62**, 68-74.
- TSAO, J., CHAPMAN, M.S., AGBANDJE, M., KELLER, W., SMITH, K., WU, H., LUO, M., SMITH, T.J., ROSSMANN, M.G., COMPANS, R.W., and ET AL. (1991). The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**, 1456-1464.
- TULLIS, G.E., and SHENK, T. (2000). Efficient replication of adeno-associated virus type 2 vectors: a cis-acting element outside of the terminal repeats and a minimal size. *J. Virol.* **74**, 11511-11521.
- URABE, M., DING, C., and KOTIN, R.M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* **13**, 1935-1943.
- URABE, M., NAKAKURA, T., XIN, K.Q., OBARA, Y., MIZUKAMI, H., KUME, A., KOTIN, R.M., and OZAWA, K. (2006a). Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* **80**, 1874-1885.
- URABE, M., XIN, K.Q., OBARA, Y., NAKAKURA, T., MIZUKAMI, H., KUME, A., OKUDA, K., and OZAWA, K. (2006b). Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther* **13**, 823-828.
- URCELAY, E., WARD, P., WIENER, S.M., SAFER, B., and KOTIN, R.M. (1995). Asymmetric replication in vitro from a human sequence element is dependent on adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* **69**, 2038-2046.
- VAN VLIET, K., BLOUIN, V., AGBANDJE-MCKENNA, M., and SNYDER, R.O. (2006). Proteolytic Mapping of the Adeno-associated Virus Capsid. *Mol Ther.* **14**, 809-821. Epub 2006 Sep 2027.
- VIHINEN-RANTA, M., KALELA, A., MAKINEN, P., KAKKOLA, L., MARJOMAKI, V., and VUENTO, M. (1998). Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol* **72**, 802-806.

- VIHINEN-RANTA, M., WANG, D., WEICHERT, W.S., and PARRISH, C.R. (2002). The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol* **76**, 1884-1891.
- VIHINEN-RANTA, M., YUAN, W., and PARRISH, C.R. (2000). Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J Virol* **74**, 4853-4859.
- WAGNER, J.A., MORAN, M.L., MESSNER, A.H., DAIFUKU, R., CONRAD, C.K., REYNOLDS, T., GUGGINO, W.B., MOSS, R.B., CARTER, B.J., WINE, J.J., FLOTTE, T.R., and GARDNER, P. (1998). A phase I/II study of tgAAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* **9**, 889-909.
- WAGNER, J.A., NEPOMUCENO, I.B., MESSNER, A.H., MORAN, M.L., BATSON, E.P., DIMICELI, S., BROWN, B.W., DESCH, J.K., NORBASH, A.M., CONRAD, C.K., GUGGINO, W.B., FLOTTE, T.R., WINE, J.J., CARTER, B.J., REYNOLDS, T.C., MOSS, R.B., and GARDNER, P. (2002). A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther* **13**, 1349-1359.
- WALTERS, R.W., AGBANDJE-MCKENNA, M., BOWMAN, V.D., MONINGER, T.O., OLSON, N.H., SEILER, M., CHIORINI, J.A., BAKER, T.S., and ZABNER, J. (2004). Structure of adeno-associated virus serotype 5. *J Virol* **78**, 3361-3371.
- WALTERS, R.W., YI, S.M., KESHAVJEE, S., BROWN, K.E., WELSH, M.J., CHIORINI, J.A., and ZABNER, J. (2001). Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* **276**, 20610-20616.
- WANG, B., LI, J., and XIAO, X. (2000). From the cover: adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13714-13719.
- WANG, L., CAO, O., SWALM, B., DOBRZYNSKI, E., MINGOZZI, F., and HERZOG, R.W. (2005). Major role of local immune responses in antibody formation to factor IX in AAV gene transfer. *Gene Ther.* **12**, 1453-1464.
- WANG, X.S., PONNAZHAGAN, S., and SRIVASTAVA, A. (1995). Rescue and replication signals of the adeno-associated virus 2 genome. *J Mol Biol* **250**, 573-580.
- WANG, X.S., PONNAZHAGAN, S., and SRIVASTAVA, A. (1996). Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. *J Virol* **70**, 1668-1677.
- WARD, P., DEAN, F.B., O'DONNELL, M.E., and BERNS, K.I. (1998). Role of the adenovirus DNA-binding protein in in vitro adeno-associated virus DNA replication. *J. Virol.* **72**, 420-427.
- WARRINGTON, K.H., JR., and HERZOG, R.W. (2006). Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* **119**, 571-603.
- WEBER, M., RABINOWITZ, J., PROVOST, N., CONRATH, H., FOLLIOU, S., BRIOT, D., CHÉREL, Y., CHENUAUD, P., SAMULSKI, J., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2003). Recombinant Adeno-associated Virus Serotype 4 Mediates Unique and Exclusive Long-Term Transduction of Retinal Pigmented Epithelium In Rat, Dog, and Nonhuman Primate after Subretinal Delivery. *Mol. Ther.* **7**, 774-781.
- WEGER, S., WENDLAND, M., KLEINSCHMIDT, J.A., and HEILBRONN, R. (1999). The adeno-associated virus type 2 regulatory proteins rep78 and rep68 interact with the transcriptional coactivator PC4. *J Virol* **73**, 260-269.
- WEINDLER, F.W., and HEILBRONN, R. (1991). A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication. *J. Virol.* **65**, 2476-2483.
- WEITZMAN, M.D., KYOSTIO, S.R., KOTIN, R.M., and OWENS, R.A. (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5808-5812.
- WICKHAM, T.J., MATHIAS, P., CHERESH, D.A., and NEMEROW, G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**, 309-319.

- WILLIAMS, L.T. (1989). Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science* **243**, 1564-1570.
- WISTUBA, A., KERN, A., WEGER, S., GRIMM, D., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1997). Subcellular compartmentalization of Adeno-Associated Virus type 2 assembly. *J. Virol.* **71**, 1341-1352.
- WOBUS, C.E., HUGLE-DORR, B., GIROD, A., PETERSEN, G., HALLEK, M., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2000). Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J. Virol.* **74**, 9281-9293.
- WONDERLING, R.S., and OWENS, R.A. (1996). The Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 stimulates expression of the platelet-derived growth factor B c-sis proto-oncogene. *J Virol* **70**, 4783-4786.
- WONDERLING, R.S., and OWENS, R.A. (1997). Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome. *J. Virol.* **71**, 2528-2534.
- WRIGHT, J.F., LE, T., PRADO, J., BAHR-DAVIDSON, J., SMITH, P.H., ZHEN, Z., SOMMER, J.M., PIERCE, G.F., and QU, G. (2005). Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation. *Mol Ther* **12**, 171-178.
- WRIGHT, J.F., QU, G., TANG, C., and SOMMER, J.M. (2003). Recombinant adeno-associated virus: formulation challenges and strategies for a gene therapy vector. *Curr Opin Drug Discov Devel* **6**, 174-178.
- WU, J., ZHAO, W., ZHONG, L., HAN, Z., LI, B., MA, W., WEIGEL-KELLEY, K.A., WARRINGTON, K.H., and SRIVASTAVA, A. (2007). Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Hum Gene Ther* **18**, 171-182.
- WU, P., XIAO, W., CONLON, T., HUGHES, J., AGBANDJE-MCKENNA, M., FERKOL, T., FLOTTE, T., and MUZYCZKA, N. (2000). Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol* **74**, 8635-8647.
- WU, Z., ASOKAN, A., GRIEGER, J.C., GOVINDASAMY, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., and SAMULSKI, R.J. (2006a). Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. *J Virol* **80**, 11393-11397.
- WU, Z., ASOKAN, A., and SAMULSKI, R.J. (2006b). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* **14**, 316-327.
- WU, Z., MILLER, E., AGBANDJE-MCKENNA, M., and SAMULSKI, R.J. (2006c). α _{2,3} and α _{2,6} N-Linked Sialic Acids Facilitate Efficient Binding and Transduction by Adeno-Associated Virus Types 1 and 6. *J Virol.* **80**, 9093-9103.
- WUSTNER, J.T., ARNOLD, S., LOCK, M., RICHARDSON, J.C., HIMES, V.B., KURTZMAN, G., and PELUSO, R.W. (2002). Production of recombinant adeno-associated type 5 (rAAV5) vectors using recombinant herpes simplex viruses containing rep and cap. *Mol Ther* **6**, 510-518.
- XIAO, W., CHIRMULE, N., BERTA, S.C., MCCULLOUGH, B., GAO, G., and WILSON, J.M. (1999). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol.* **73**, 3994-4003.
- XIAO, W., WARRINGTON, K.H., JR., HEARING, P., HUGHES, J., and MUZYCZKA, N. (2002). Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol* **76**, 11505-11517.
- XIAO, X., LI, J., and SAMULSKI, R.J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J. Virol.* **70**, 8098-8108.
- XIAO, X., LI, J., and SAMULSKI, R.J. (1998). Production of high-titer recombinant Adeno-Associated Virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* **72**, 2224-2232.
- XIAO, X., XIAO, W., LI, J., and SAMULSKI, R.J. (1997). A novel 165-base-pair terminal repeat sequence is the sole cis requirement for the adeno-associated virus life cycle. *J. Virol.* **71**, 941-948.

- XIE, Q., BU, W., BHATIA, S., HARE, J., SOMASUNDARAM, T., AZZI, A., and CHAPMAN, M.S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10405-10410.
- XIE, Q., HARE, J., TURNIGAN, J., and CHAPMAN, M.S. (2004). Large-scale production, purification and crystallization of wild-type adeno-associated virus-2. *J Virol Methods* **122**, 17-27.
- YAN, Z., LEI-BUTTERS, D.C., LIU, X., ZHANG, Y., ZHANG, L., LUO, M., ZAK, R., and ENGELHARDT, J.F. (2006). Unique biologic properties of recombinant AAV1 transduction in polarized human airway epithelia. *J Biol Chem* **281**, 29684-29692.
- YAN, Z., ZAK, R., LUXTON, G.W., RITCHIE, T.C., BANTEL-SCHAAL, U., and ENGELHARDT, J.F. (2002). Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol* **76**, 2043-2053.
- YAN, Z., ZAK, R., ZHANG, Y., and ENGELHARDT, J.F. (2005). Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. *J Virol* **79**, 364-379.
- YANG, C.C., XIAO, X., ZHU, X., ANSARDI, D.C., EPSTEIN, N.D., FREY, M.R., MATERA, A.G., and SAMULSKI, R.J. (1997). Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* **71**, 9231-9247.
- YANG, G.S., SCHMIDT, M., YAN, Z., LINDBLOOM, J.D., HARDING, T.C., DONAHUE, B.A., ENGELHARDT, J.F., KOTIN, R., and DAVIDSON, B.L. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* **76**, 7651-7660.
- YANG, J., ZHOU, W., ZHANG, Y., ZIDON, T., RITCHIE, T., and ENGELHARDT, J.F. (1999). Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J Virol* **73**, 9468-9477.
- YANG, Q., CHEN, F., and TREMPPE, J.P. (1994). Characterization of cell lines that inducibly express the Adeno-Associated Virus Rep proteins. *J. Virol.* **68**, 4847-4856.
- YARDEN, Y., and ULLRICH, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* **57**, 443-478.
- YOUNG, S.M., JR., and SAMULSKI, R.J. (2001). Adeno-associated virus (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13525-13530.
- YOUNG, S.M., MCCARTY, D.M., DEGTYAREVA, N., and SAMULSKI, R.J. (2000a). Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J Virol* **74**, 3953-3966.
- YOUNG, S.M.J., MCCARTY, D.M., DEGTYAREVA, N., and SAMULSKI, R.J. (2000b). Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site specific recombination. *J. Virol.* **74**, 3953-3966.
- ZABNER, J., SEILER, M., WALTERS, R., KOTIN, R.M., FULGERAS, W., DAVIDSON, B.L., and CHIORINI, J.A. (2000). Adeno-Associated Virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J. Virol.* **74**, 3852-3858.
- ZADORI, Z., SZELEI, J., LACOSTE, M.C., LI, Y., GARIEPY, S., RAYMOND, P., ALLAIRE, M., NABI, I.R., and TIJSEN, P. (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* **1**, 291-302.
- ZANTA, M.A., BOUSSIF, O., ADIB, A., and BEHR, J.P. (1997). In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjug Chem* **8**, 839-844.
- ZAUPA, C., REVOL-GUYOT, V., and EPSTEIN, A.L. (2003). Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. *Hum Gene Ther* **14**, 1049-1063.
- ZEN, Z., ESPINOZA, Y., BLEU, T., SOMMER, J.M., and WRIGHT, J.F. (2004). Infectious titer assay for adeno-associated virus vectors with sensitivity sufficient to detect single infectious events. *Hum Gene Ther* **15**, 709-715.

- ZHAN, D., SANTIN, A.D., LIU, Y., PARHAM, G.P., LI, C., MEYERS, C., and HERMONAT, P.L. (1999). Binding of the human papillomavirus type 16 p97 promoter by the adeno-associated virus Rep78 major regulatory protein correlates with inhibition. *J Biol Chem* **274**, 31619-31624.
- ZHANG, H.G., XIE, J., DMITRIEV, I., KASHENTSEVA, E., CURIEL, D.T., HSU, H.C., and MOUNTZ, J.D. (2002). Addition of six-His-tagged peptide to the C terminus of adeno-associated virus VP3 does not affect viral tropism or production. *J Virol* **76**, 12023-12031.
- ZHOU, X., ZOLOTUKHIN, I., IM, D.S., and MUZYCZKA, N. (1999). Biochemical characterization of adeno-associated virus Rep68 DNA helicase and ATPase activities. *J. Virol.* **73**, 1580-1590.
- ZOLOTUKHIN, S. (2005). Production of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* **16**, 551-557.
- ZOLOTUKHIN, S., BYRNE, B.J., MASON, E., ZOLOTUKHIN, I., SUMMERFORD, C., SAMULSKI, R.J., and MUZYCZKA, N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* **6**, 973-985.
- ZOLOTUKHIN, S., POTTER, M., ZOLOTUKHIN, I., SAKAI, Y., LOILER, S., FRAITES, T.J., JR., CHIDO, V.A., PHILLIPSBERG, T., MUZYCZKA, N., HAUSWIRTH, W.W., FLOTTE, T.R., BYRNE, B.J., and SNYDER, R.O. (2002). Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* **28**, 158-167.

Articles annexes:

1- Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process.

J Gene Med. 2004 Feb; 6 Suppl 1:S223-8. Review.

Blouin V, Brument N, Toublanc E, Raimbaud I, Moullier P, Salvetti A.

2- Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus.

J Virol. 2002 Nov; 76 (22): 11605-11.

Favre D, Blouin V, Provost N, Spisek R, Porrot F, Bohl D, Marme F, Cherel Y, Salvetti A, Hurtrel B, Heard JM, Riviere Y, Moullier P.

3- Identification of a replication-defective herpes simplew virus for recombinant adeno-associated virus type (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines.

J Gene Med. 2004 May;6(5):555-64.

Toublanc E, Benraiss A, Bonnin D, Blouin V, Brument N, Cartier N, Epstein AL, Moullier P, Salvetti A.

4- Recombinant adeno-associated virus type 2 mediates highly efficient gene transfer in regenerating rat skeletal muscle.

Gene Therapy 2002; 9 1037-1043.

J Abadie, V Blouin, L Guigand, M Wyers, Y Cherel

5- Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle.

Mol Ther. 2001 Dec;4(6):559-66.

Favre D, Provost N, Blouin V, Blancho G, Cherel Y, Salvetti A, Moullier P.

6- Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle.

Gene Ther. 2000 Aug;7(16):1417-20.

Favre D, Cherel Y, Provost N, Blouin V, Ferry N, Moullier P, Salvetti A.

Développement de méthodes de production et d'analyse de vecteurs recombinants dérivés de l'adéno-associated virus.

Résumé :

De nombreuses études in vivo ont montré que les vecteurs recombinants dérivés de l'adéno-associated virus (AAVr) peuvent transduire efficacement de nombreux organes et conduisent à une expression stable et à long terme du gène. Ces résultats encourageants ont conduit au développement rapide des essais cliniques utilisant les vecteurs AAVr-2. Cependant ces essais chez l'homme nécessitent de grandes quantités de vecteurs AAVr. Les techniques conventionnelles de production et purification montrent alors leurs limites. Nous avons donc développé des méthodes de productions alternatives plus simples et reproductibles, en établissant des lignées stables, d'encapsidation, contenant intégré dans leur génome les gènes rep-cap hybrides pour les sérotypes-1 et -5. Nous avons aussi décrit une procédure de purification par chromatographie liquide basée sur des résines échangeuses d'ions. Cette procédure a l'avantage d'être directement applicable à grande échelle, et pourrait s'adapter à différents sérotypes. Cette méthode permet de purifier le sérotype-5, le plus divergent au niveau de la séquence protéique de la capsid comparée à l'AAVr-2. Les stocks d'AAVr obtenus présentent une pureté supérieure aux méthodes traditionnelles et transduisent aussi efficacement les organes cibles. Afin de mieux caractériser et différencier les capsides AAVr des différents sérotypes de plus en plus nombreux, nous avons montré que la digestion protéolytique des virions AAVr-2, donne un profil de digestion unique. Cette analyse protéolytique des capsides AAVr permet de distinguer les AAVr-2 des AAV-1 et -5.

Mots-clés : AAVr, production, lignée stable d'encapsidation, hybride, purification, chromatographie, structure, capsid, sérotype, protéolyse.

Development of analysis and production methods for adeno-associated virus recombinant vectors.

Abstract :

Numerous *in vivo* studies have demonstrated that rAAV vectors can efficiently transduce many tissues and lead to stable gene expression. These encouraging results have led to a rapid development of clinical trials involving the use of rAAV-2 vectors. However, the obtainment of large-scale rAAV-2 vector stocks for clinical assay is still hampered by the conventional production methods that are not efficient and difficult to scale-up. We develop a simple and reproducible alternative method based on stable packaging hybrid cell lines containing integrated into their genome the rep-cap genes of serotypes -1 and -5. Another critical step for the assessment of these vectors in clinical trials is the method used for purification of rAAV particles. We developed a purification method, which comprises two-step chromatography process based on the use of ion- exchange resins. This process can be easily scaled up and could be applied to different AAV serotypes. We purified the serotype-5, the most divergent in terms of capsid composition compared to AAV-2. The rAAV stocks obtained are pure and transduced efficiently target tissues. To characterize rAAV capsid from different serotype, we have shown that proteolytic digestion of rAAV virions is able to generate a characteristic cleavage pattern that can be use to distinguish AAV-2 from AAV-1 and -5.

Key words : AAVr, production, stable cell line, hybrid, purification, chromatography, structure, capsid, serotype, proteolysis.

BLOUIN Veronique
LTG, INSERM U649
30, Bd J. Monnet 44035 Nantes