

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Année 2014

n° attribué par la bibliothèque

46

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Mise au point de stratégies d'édition de gène  
à l'aide d'endonucléases artificielles  
pour le traitement des hépatopathies héréditaires :  
application à la maladie de Crigler Najjar de type I

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, santé  
Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Cécilia, Laure, Marie, ABARRATEGUI-PONTES**

*Le 21 mars 2014, devant le jury ci-dessous*

Rapporteuses : Dr. Anne Dubart Kupperschmitt  
Dr. Carine Giovannangeli  
Examineurs : Pr. Philippe Labrune  
Pr. Jean-Christophe Pagès  
Directeur de thèse : Pr. Guillaume Podevin  
Co-directeur de thèse : Dr. Tuan Huy Nguyen

# Sommaire

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>IX</b>
<b>AVANT PROPOS .....</b>	<b>X</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I- LA THERAPIE GENIQUE.....</b>	<b>2</b>
<i>I.1 Trois modalités de transfert de gène .....</i>	<i>4</i>
I-1.1 Thérapie génique d'addition .....	4
I-1.2 Modification de l'expression génique .....	5
I-1.3 Modification d'un gène <i>in situ</i> .....	7
<i>I-2 Voies de transfert de gène : stratégies ex vivo et in vivo .....</i>	<i>9</i>
<i>I-3 Vecteurs de thérapie génique.....</i>	<i>11</i>
I-3.1 Transfert de gène à l'aide de vecteurs non viraux ou de méthodes physiques .....	11
I-3.2 Les vecteurs viraux .....	14
I-3.2.1 Les vecteurs lentiviraux .....	16
Lentivirus sauvages.....	16
Caractéristiques des lentivirus recombinants .....	18
I-3.2.2 Les virus associés aux adénovirus .....	22
AAV sauvages .....	22
AAV recombinants : caractéristiques.....	24
<i>I-4 Choix du vecteur .....</i>	<i>30</i>
<i>I-5 Enjeux actuels pour la thérapie génique.....</i>	<i>31</i>
I-5.1 Des essais cliniques de thérapie génique aux autorisations de mise sur le marché .....	33
Essais cliniques de thérapie génique avec des vecteurs lentiviraux .....	33
Essais cliniques avec des AAVr.....	35
Premières autorisation de mise sur le marché en thérapie génique .....	37
I-5.2.1 Risques liés aux formes compétentes pour la réplication .....	38
I-5.2.2 Eviter les réponses immunitaires .....	39
I-5.2.3 Ciblage et réduction de la dissémination.....	43
I-5.2.4 Vers une meilleure gestion de l'intégration et une diminution du risque de mutagenèse insertionnelle .....	44
<b>II- LA THERAPIE GENIQUE CIBLEE : DE NOUVELLES STRATEGIES POUR MODIFIER LE GENOME A FAÇON .....</b>	<b>46</b>
<i>II 1- Approches d'intégration ciblée du transgène.....</i>	<i>47</i>
<i>II-2 Utilisation de la réparation des cassures double brin de l'ADN pour des applications thérapeutiques .</i>	<i>49</i>
II-2.1 La recombinaison homologue.....	50
II-2.2 Ligature d'extrémités non homologues .....	53
II-2.3 Choix de la voie de réparation .....	54
II-2.3.1. Rôle des phases du cycle cellulaire .....	55
II-2.3.2. Rôle de la résection .....	56
<i>II-3 Favoriser la recombinaison homologue pour une application thérapeutique en induisant des cassures double brin de l'ADN par l'utilisation d'endonucléases artificielles .....</i>	<i>58</i>
II-3.1 Les méganucléases .....	58
II-3.2 Les nucléases à doigts de zinc .....	60
II-3.3 Les <i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i> .....	65
II-3.4 Le système CRISPR/Cas9 .....	67
II-3.5 Stratégies d'amélioration des endonucléases protéiques .....	70
II-3.6 Eléments de comparaison des différentes familles de nucléases artificielles .....	71
Efficacité de coupure et d'édition du génome .....	71
Capacités de ciblage de nouveaux loci.....	73
Toxicité et spécificité des endonucléases artificielles .....	73
Eventail d'applications.....	77
<i>II-4 Utilisations des nucléases artificielles en thérapie génique .....</i>	<i>79</i>
II-4.1 De nouvelles stratégies de thérapie génique utilisant les endonucléases artificielles.....	79
II-4.1.1 Knock-out.....	80
II-4.1.2 Knock-in.....	81
II-4.1.3 Réparation génique.....	82

II-4.2	Vectorisation des nucléases et de l'ADN donneur.....	83
II-4.2.1	Vectorisation des nucléases à façon .....	83
II-4.2.2	Choix du donneur pour la recombinaison homologue et de sa vectorisation.....	84
II-1.4.3	Voies d'amélioration de la fréquence de la recombinaison homologue.....	87
Modulations de l'expression de facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN .....	87	
Modification du cycle cellulaire.....	88	
<b>III-</b>	<b>APPLICATIONS DES STRATEGIES DE THERAPIE GENIQUE UTILISANT DES</b>	
	<b>NUCLEASES ARTIFICIELLES ET LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE AU TRAITEMENT DE</b>	
	<b>MALADIES METABOLIQUES DU FOIE .....</b>	<b>89</b>
III-1	<i>Le foie comme organe cible de la thérapie génique .....</i>	89
III-1.1	Eléments d'anatomie, d'histologie et de métabolisme du foie nécessaires à la compréhension des approches de thérapie génique des maladies hépatiques .....	89
Eléments d'anatomie du foie.....	89	
Eléments d'histologie du foie.....	90	
Eléments du métabolisme du foie.....	91	
III-1.2	Caractéristiques du foie utilisées dans les stratégies de thérapie génique.....	92
III-1.3	Maladies hépatiques candidates à la thérapie génique.....	95
III-1.3.1	Exemples de maladies hépatiques candidates à la thérapie génique non associées à des atteintes hépatiques .....	97
L'hypercholestérolémie familiale de type Ia.....	97	
Les hémophilies A et B.....	99	
III-1.3.2	Exemples de maladies hépatiques candidates à la thérapie génique associées à des atteintes hépatiques .....	100
Le déficit en alpha-1-antitrypsine .....	100	
III-2	<i>La maladie de Crigler Najjar : une maladie modèle pour la thérapie génique des hépatopathies héréditaires.....</i>	102
III-2.1	Description clinique et traitements existants .....	102
III-2.2	Le gène de l'UGT1A1 .....	105
III-2.3	Le rat Gunn : modèle spontané de la maladie de Crigler Najjar de type I .....	107
III-2.4	Approches chez d'autres modèles animaux .....	112
III-3	<i>Faisabilité de stratégies de thérapie génique ciblée utilisant des nucléases artificielles et la recombinaison homologue pour le traitement de maladies métaboliques du foie .....</i>	114
<b>IV-</b>	<b>OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>117</b>
<b>V-</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>118</b>
V-1	<i>Vectorisation d'une paire de zinc finger nucléases dans des vecteurs lentiviraux .....</i>	118
V-2	<i>Faisabilité d'une stratégie de thérapie génique des maladies métaboliques du foie utilisant des nucléases artificielles pour favoriser la RH : réparation génique in vivo du gène de l'UGT1A1 dans le modèle du rat Gunn.....</i>	156
<b>VI-</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>186</b>
<b>VII-</b>	<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>197</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>198</b>	
ANNEXE I -	TABLEAU DES MALADIES GENETIQUES A TRANSMISSION MENDELIENNES MENTIONNEES DANS CE MANUSCRIT .....	198
ANNEXE II -	SURGICAL DELIVERY OF HDAD VECTORS IMPROVES CORRECTION OF HYPERBILIRUBINEMIA IN GUNN RATS.....	199
<b>SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>220</b>	

## Liste des abreviations

A1AT : Alpha-1-Antitrypsine

aa : acides aminés

AD : Domaine d'Activation de la transcription

AAV(r) : (recombinant) *Adeno-associated virus*, Virus Associés aux Adénovirus recombinant

ADA-SCID : Déficit en Adénosine Désaminase

ADCC : Décarboxylase de l'Acide L-Aminé Aromatique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADN c, db, sb : ADN complémentaire, double brin, simple brin

ADNccc : ADN circulaire clos de façon covalente

AdR : Vecteurs adénoviraux, Adénovirus recombinants

ALAT : Alanine Aminotransférase

ALDP : *Adrenoleucodystrophy Protein*

alt-NHEJ : alternative NHEJ

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN(m) : Acide désoxyRiboNucléique (messenger)

ASAT : Aspartate Aminotransférase

ATLANS : *Artificial Targeted Light-Activated Nanoscissors*

*att* : région contenant les sites d'attachement des LTRs

**BER** : *Base Excision Repair*

**BIR** : *Break Induced Replication*

BIV : Virus de l'Immunodéficience Bovine

BRCA1 : protéine suppresseur des cancers du sein et des ovaires chez l'homme, *Human Breast and ovarian Cancer tumor suppressor protein 1*

BSA : Albumine Sérique Bovine

**C-NHEJ** : *canonical NHEJ*

c/gh : copie par génome haploïde

CAEV : Virus de l'Arthrite-Encéphalite Caprine

**CAR** : *Constitutive Androstane Receptor*, Récepteur Constitutif des Androstanes

CDB : Cassure Double Brin (de l'ADN)

CdK : Cyclines dépendante des Kinases

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNI/II : Syndrome/Maladie de Crigler Najjar de type I/II

cPPT : *Central polypurine tract*

CRISPR/Cas9 : (système) *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated Cas9*

Ct : *Cycle threshold*, "cycle seuil de détection"

CtIP : *Carboxy-terminal binding Protein Interacting Protein*, Protéine Interagissant avec la protéine CtBP

DDR : *DNA Damage Response*, Réponse aux Dommages de l'ADN

DNA-PK : Protéine Kinase Dépendante de l'ADN

DO : Densité Optique

EIAV : Virus de l'Anémie Infectieuse Equine

EMA : *European Medicine Agency*, Agence Européenne du médicament

ES (*cells*) : *embryonic stem cells*, cellules Souches Embryonnaires

F : Amorces sens (*Forward*)

(h)FVII/FIX : Facteur VII/IX (humain) de la coagulation

FAH : FumarylAcétoacétate Hydrolase

FCEV : Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF)

FCN : Facteur de Croissance Nerveuse (*Nerve Growth Factor*, NGF)

FDA : *Food and Drug Administration*

FIV : Virus de l'Immunodéficience Féline

GABA : Acide Gamma-AminoButyrique

GAD : Décarboxylase de l'Acide Glutamique

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GS : syndrome/maladie de Gilbert

HDL : *High Density Lipoproteins*, Lipoprotéines de Haute Densité

HdR : *Homology directed Repair*

HF Ia : Hypercholestérolémie Familiale de type Ia

HO : *homing endonucleases*

hPGK : PhosphoGlycérate Kinase humaine

HRM : *High Resolution Melting curve*, courbe de fusion à haute résolution

HSPG : ProtéoGlycanes à Héparanes Sulfates

IDLVs : *Integration Deficient Lentiviral Vectors*, Vecteurs Lentiviraux Déficients pour l'Intégration

IEE : Integration Efficiency Element

ip : intrapéritonéale

iPS (*cells*) : *induced Pluripotent Stem cells*, cellules Souches Pluripotentes induites

IRES : *Ribosomes Entry Internal Site*, Séquence d'Entrée Interne des Ribosomes

ITR : *Inverted Terminal Repeats*, Régions Répétées Inversées

iv : intraveineuse

JDV : Virus de la Maladie de Jembrana

KD : *Knock-Down*

KI : *Knock-In*

KO : *Knock-Out*

LDLR : *Low Density Lipoproteins Receptor*, Récepteur des Lipoprotéines de Haute Densité

LTRs : *Long Terminal Repeat sequences*

LV/LVr : (vecteurs) LentiViraux / LentiVirus recombinants

miR : micro ARN

MMR : *Mismatch Repair*

MPS VII : Mucopolysaccharidose de type VII

mTTR : Promoteur de la TransThyrétine murine fusionné à des sites synthétiques liant des facteurs de transcription hépatique

MVV : Virus de Maedi-Visna

NER : *Nucleotide Excision Repair*

nls : signal de localisation nucléaire

NGF *Nerve Growth Factor* (Facteur de Croissance Nerveuse, FCN)

NHEJ : *Non Homologous End Joining*, ligature d'extrémités non homologues

OFT : Oligonucléotides Formant des Triplex (*Triplex Forming Oligonucleotides*, TFO)

ORF : *Open Reading Frame*, cadre de lecture ouvert

PAM : *Protospacer Adjacent Motif*, Motif Adjacent au Protoespaceur

PARP : Poly-ADP-Ribose Polymérase

pv : particules virales

Pb : paire(s) de bases

PB : *PiggyBac*

PBREM : *PhenoBarbital-Responsive Enhancer Module*, module de réponse au phénobarbital

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PI : Particules Infectieuses

PPAR  $\alpha$  : Récepteur  $\alpha$  Activé par les Proliférateurs de Peroxysomes

PPT : *PolyPurine Tract*

PXR : *Pregnane X Receptor*, Récepteur X des Prégnanes

qPCR : *quantitative Polymerase Chain Reaction*

R : Amorce antisens (*Reverse*)

RBS : *Rep Binding Site*

RH : Recombinaison Homologue

RI : Réponse Immune/Immunitaire

RPA : *Replication Protein A*, protéine de réplication A

Rpm : Rotation par minute

RT-qPCR : *Reverse Transcription quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*

RVD : *Repeat Variable Diresidue*, région hypervariable

**SB** : *Sleeping Beauty*

sc : *self complementary*, double brin

SCID (X1) : Déficit Immunitaire Combiné Sévère (lié à l'X)

SDSA : *Single Strand Dependant Annealing*

SELEX : *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*

SFDA : *China State Food and Drug Administration*

sgRNA : *synthetic guide RNA*, ARN guide synthétique

shRNA : *short hairpin RNA*

sida : syndrome d'immunodéficience acquise

SIN : *Self INactivated*

ss : *single strand*, simple brin

siRNA : *small interfering RNA*

SIV : Virus de l'Immunodéficience Simienne

SMRT *sequencing* : *Single Molecule Real Time sequencing*, Séquençage en Temps Réel sur Molécule isolée

SNC : Système Nerveux Central

SSA : *Single Strand Annealing*

TALE : *Transcription Activator-Like Effectors*

TCR : *Transcription Coupled Repair*

TD : *Translocation Domain*

TFO : *Triplex Forming Oligonucleotides*, ou oligonucléotides formant des triplex (OFT)

tracrRNA : crRNA transactivateur

TRS : *Terminal Resolution Site*

TU/mL : *Transduction Unit*/Unités de Transduction par mL

Ubx : homéodomaine ultrabithorax de la drosophile

UGT : Uridine diphosphate Glucuronosyl Transférase

UPDRS : *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor* (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, FCEV)

vg : *viral genome*, génomes viraux

VIH (-1 ou 2) : Virus de l'Immunodéficience Humaine (de type 1 ou 2)

VSV-G : Protéine G du Virus de la Stomatite Vésiculeuse

WPRE : *Woodchuck Post-Responsive Element*, Elément Régulateur Post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de la marmotte

X-ALD : AdrénoLeucoDystrophie liée à l'X

XPC : *Xeroderma pigmentosum complementation group C*

ZFNs : *Zinc Finger Nucleases*, Nucléases à doigts de Zinc

ZFs : *Zinc Finger (domains)*, (domaines à) doigts de zinc

## Table des illustrations

Figure 1 : Transfert d'ADN nu ou d'ADN complexé à des vecteurs synthétiques :.....	11
Figure 2 : Lipides cationiques et polymères cationiques .....	12
Figure 3 : Du virus sauvage au vecteur viral de thérapie génique.....	15
Figure 4 : Du lentivirus sauvage au lentivirus recombinant : comparaison des génomes .....	17
Figure 5 : Schéma du cycle de réplication des lentivirus sauvages .....	18
Figure 6 : Comparaison des vecteurs lentiviraux intégratifs et déficients pour l'intégration .....	21
Figure 7 : Génome des virus associés aux adénovirus.....	23
Figure 8 : Etapes du cycle des AAVr.....	26
Figure 9 : Des vecteurs simple brin (ssAAV) aux vecteurs double brin (scAAV).....	27
Figure 10 : Nombre d'essais cliniques de thérapie génique par an depuis 1989 .....	31
Figure 11 : Caractéristiques des essais cliniques de thérapie génique jusqu'à nos jours. ....	32
Figure 12 : Utilisation du miR-142 pour limiter la RI contre le produit du transgène.....	41
Figure 13 : Les cassures double brin de l'ADN : causes d'apparition et réparation par ligature d'extrémités non homologues (NHEJ) et la réparation basée sur l'homologie (HdR).....	50
Figure 14 : Réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue. ....	52
Tiré de .....	52
Figure 15 : Réparation des cassures double brin de l'ADN par ligature d'extrémités non homologues canonique,.....	53
Figure 16 : Choix de la voie de réparation en fonction de la phase du cycle cellulaire.....	55
Figure 17 : Influence de la résection dans le choix de la voie de réparation .....	56
Figure 18 : Méganucléases et reconnaissance de l'ADN.....	59
Figure 19 : Interaction entre les domaines protéiques à doigts de zinc et l'ADN.....	62
Figure 20 : Assemblage de domaines à doigts de zinc pour l'obtention de nucléases à doigts de zinc avec de nouvelles spécificités .....	63
Figure 21 : Code de reconnaissance de l'ADN par les domaines TALE.....	65
Figure 22 : Interférence à l'aide du système CRISPR de type II .....	68
Figure 23 : Reconnaissance d'un motif d'acides nucléique par le complexe Cas9-crRNA- tracrRNA et par son équivalent synthétique sgRNA.....	68
Figure 24 : Méthodes de recherche des effets <i>off-target</i> des nucléases : exemple des ZFNs. ....	74
Figure 25 : Développement des applications d'édition de génome grâce aux travaux sur les endonucléases artificielles.....	77
Figure 26: Stratégies d'utilisation d'endonucléases artificielles pour des applications de thérapie génique : exemple des ZFNs .....	79
Figure 28 : Histologie du lobule hépatique.....	91
Figure 29 : Protocole du premier essai de thérapie génique du foie : traitement de l'hypercholestérolémie familiale par transduction d'hépatocytes <i>ex vivo</i> par des vecteurs oncorétroviraux. ....	98
Figure 30 : Catabolisme de l'hème lors de l'hémolyse : de l'hème à la bilirubine conjuguée .	102
Figure 31 : Traitement par photothérapie sous lumière bleue chez un patient atteint du syndrome de Crigler Najjar de type I. ....	103
Figure 32 : Locus contenant les gènes codant les treize isoformes d'UGT1A .....	105
Figure 33 : Localisation du gène de l'UGT1A1 chez l'homme. ....	106
Figure 34 : Localisation du gène de l'UGT1A1 chez le rat .....	107
Figure 35 : Comparaison des séquences nucléotidiques du gène de l'UGT1A1 des souches de rats Gunn et Wistar.....	108
Figure 36 : Rats Gunn nouveau-nés. ....	109



## Table des tableaux

Tableau 1 : Méthodes physiques et chimiques de transfert de gène .....	13
Tableau 2 : Propriétés des principales familles de virus utilisés comme vecteurs en thérapie génique. ....	15
Tableau 3 : Tropismes des AAVr utilisés en thérapie génique .....	27
Tableau 4 : Stratégies à mettre en place pour éviter une réponse immunitaire humorale (A) ou cytotoxique (B) lors d'utilisation d'AAVr. ....	42
Tableau 5 : Eléments de comparaison des caractéristiques essentielles des endonucléases artificielles les plus utilisées.....	78
Tableau 6 : Maladies métaboliques du foie candidates à la thérapie génique.....	96

## Avant propos

Ces travaux de thèse ont été démarrés dans l'unité Inserm U948 de Biothérapies Hépatiques, dirigée par le Dr Nicolas Ferry pour être ensuite poursuivis dans l'unité Inserm U1064, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, dirigée par le Dr Ignacio Anegón.

Le laboratoire de Biothérapies Hépatiques a mené de nombreux travaux de thérapie génique par transfert de gène *in vivo* et *ex vivo* pour le traitement des maladies métaboliques du foie. Ces projets ont été développés pour le traitement de la maladie modèle de Crigler Najjar de type I dans le modèle animal spontané du rat Gunn. Le transfert de gène était effectué via des vecteurs viraux dérivés des oncorétrovirus, des lentivirus et des virus associés aux adénovirus. Le Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie a fortement contribué au développement de récents outils appliqués à la transgénèse pour l'obtention de nouveaux modèles animaux pour la recherche biomédicale : les nucléases à doigts de zinc, les *Transcription Activator-Like Effector* nucléases et le système CRISPR/Cas9.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans la dynamique de ces deux laboratoires.

En contribuant au développement des nouvelles approches de thérapie génique ciblée, notre but a été de mettre au point une stratégie de correction génique dans le modèle du rat Gunn à partir d'endonucléases artificielles vectorisées par des vecteurs viraux. En parallèle de ce projet pré-clinique, nous avons également travaillé sur des aspects plus fondamentaux de vectorisation des nucléases.

Nous présenterons en introduction dans ce manuscrit un état des lieux des approches de thérapie génique. Ensuite, nous développerons plus précisément les stratégies de thérapie génique ciblée et en particulier l'utilisation de nucléases artificielles pour induire des cassures double brin de l'ADN dont la réparation est employée pour de l'édition de gène. Nous présenterons ainsi les principales familles de nucléases disponibles et les voies de réparation des cassures double brin de l'ADN qui sont ici utilisées comme un outil thérapeutique à part entière. Enfin, nous expliquerons les possibles applications de ces stratégies à la thérapie génique des maladies métaboliques du foie, comme la maladie de Crigler Najjar de type I, étudiée grâce au modèle animal du rat Gunn.

Nous présenterons dans un premier temps les résultats de mise au point d'un vecteur lentiviral pour la vectorisation des nucléases à doigts de zinc. Nous développerons ensuite les résultats liés à la mise au point et à l'application de notre stratégie de réparation génique *in vivo* chez le rat Gunn.

## **Introduction**

## I- La thérapie génique

La thérapie génique est une stratégie qui consiste à transférer un matériel génétique sous forme d'acides nucléiques dans des cellules d'un individu pour guérir une maladie ou améliorer l'état clinique des patients.

La thérapie génique regroupe une famille d'approches thérapeutiques très récente en comparaison à d'autres familles pharmaceutiques. Elle a été développée grâce aux avancées importantes dans les domaines de la génétique et de la biologie moléculaire du vingtième siècle (Wirth *et al.*, 2013). Par exemple, l'expérience de F. Griffith en 1928 est la première description d'échange d'information génétique entre deux types de souches de pneumocoques expliquant la transformation bactérienne (Griffith, 1928). Une autre découverte capitale est celle de la structure de l'ADN sous la forme de la double hélice, décrite en 1953 par J. Watson et F. Crick, marquant un tournant dans la compréhension du support de l'information génétique (Watson and Crick, 1953).

La thérapie génique a initialement été envisagée pour traiter des maladies génétiques. Il s'agit de l'ensemble des maladies dues à une ou plusieurs anomalies génétiques : le but du traitement est de remplacer le gène muté. Dans un premier temps, les efforts se concentrent sur le traitement des maladies monogéniques, impliquant un seul gène muté, avant de pouvoir envisager le traitement de maladies causées par des mutations portées par plusieurs gènes, ou maladies polygéniques.

Ces maladies sont très diverses et peuvent avoir différentes conséquences selon les gènes porteurs de l'anomalie.

Par exemple, dans le cas de la myopathie de Duchenne (OMIM#310200), la mutation génétique concerne une protéine structurelle du muscle : la dystrophine. La synthèse d'une dystrophine anormale entraîne une destruction progressive du tissu musculaire et une diminution des capacités locomotrices.

L'anomalie peut aussi concerner des protéines enzymatiques ; les modifications sont alors d'ordre fonctionnel. Pour la maladie de Crigler Najjar de type I (CNI, OMIM#218800), utilisée comme maladie modèle pour la stratégie de réparation génique mise au point dans ce travail de thèse, l'enzyme concernée est totalement absente et la fonction qu'elle réalise chez les individus sains n'est plus assurée.

Selon le type de maladie cible, deux stratégies sont envisageables.

Dans le cas de conséquences initialement structurelles, il est essentiel de cibler et de guérir les cellules présentant l'anomalie, comme les cellules musculaires pour la myopathie de Duchenne.

Au contraire, pour une anomalie fonctionnelle, il est possible de restaurer la fonction dans l'organisme et de la faire réaliser soit par les cellules qui l'assurent chez l'individu sain, soit de façon ectopique, par un autre type cellulaire voire un autre organe. Par exemple, pour restaurer l'expression de facteurs de la coagulation dans le traitement des hémophilies, il est possible de faire exprimer ces protéines plasmatiques par le foie, où ils sont naturellement exprimés, ou par le muscle (Brunetti-Pierri *et al.*, 2012; H. Li *et al.*, 2011; Nathwani *et al.*, 2011; Herzog *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 1992).

Des maladies acquises, comme les cancers ou l'insuffisance hépatique, ou des maladies infectieuses comme le sida ou l'hépatite C, peuvent aussi être traitées par thérapie génique. Il s'agit alors principalement de bloquer la progression de la maladie en ciblant l'agent infectieux ou des gènes impliqués dans la cancérogenèse, ou encore de déclencher la mort des cellules atteintes ou d'induire une réponse immunitaire (RI).

## I.I Trois modalités de transfert de gène

La technique de transfert de gène la plus classique consiste à apporter un gène thérapeutique dans des cellules cibles : on parle de thérapie génique d'addition. Des approches complémentaires plus récentes visent à modifier l'expression de gènes dans les tissus ciblés, voire à modifier des gènes et à corriger des mutations *in situ*.

### I-1.1 Thérapie génique d'addition

La thérapie génique d'addition consiste à apporter à l'organisme des acides nucléiques thérapeutiques.

Le matériel transporté peut être de l'ADN, sous forme d'une cassette d'expression contenant un promoteur, une séquence codante correspondant à la version sauvage de l'ADN et des éléments de régulation, ou encore un promoteur et un ADN complémentaire (ADNc).

Il est également possible de transporter un ARN messager (ARNm), ce qui permet d'éviter la contrainte de l'entrée dans le noyau des cellules cibles et accélère l'obtention du produit du transgène.

D'autres approches reposent sur le transfert d'oligonucléotides d'ADN ou d'ARN.

De nouvelles stratégies visent à apporter directement une protéine plutôt que les acides nucléiques correspondants. Cette approche reste encore limitée à des études de modèles *in vitro*. Bien qu'apparentée à du transfert de gène *stricto sensu*, il s'agit de transfert de protéines (Cervera *et al.*, 2013; X. Zhang *et al.*, 2011).

Le premier essai clinique de thérapie génique officiellement approuvé, démarré en 1989 par l'équipe de S.A. Rosenberg, a consisté en une addition de gène *ex vivo* dans des lymphocytes infiltrants des tumeurs avec un gène rapporteur (Rosenberg *et al.*, 1990).

Ensuite, le premier essai dans le cadre du traitement d'une maladie génétique a été conduit par les docteurs W.F. Anderson, M. Blaese et K. Culver et date du début des années 1990 (Kohn *et al.*, 1998). Il visait à restaurer l'expression du gène muté dans une maladie génétique héréditaire du système immunitaire, le Déficit Immunitaire Combiné Sévère dû à un déficit en Adénosine Désaminase (ADA-SCID, OMIM#102700).

Un des premiers essais cliniques à avoir démontré un succès de la thérapie génique par transfert de gène est celui dit des "bébés bulles", mené par l'équipe des professeurs A. Fisher et M. Cavazzana-Calvo, chez des patients atteints de Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié à l'X (SCIDX1, OMIM#300400) (Fischer *et al.*, 2010).

La thérapie génique d'addition est aussi utilisée pour des maladies infectieuses, comme le sida, ou des maladies acquises, comme les cancers. On peut ainsi transférer un "gène suicide" dans les cellules cancéreuses, conduisant à leur mort par apoptose, un gène stimulant la RI contre la tumeur, ou encore un anti-oncogène (C. Zhang *et al.*, 2011; Prieto *et al.*, 2004; Vassaux and Martin-Duque, 2004; Ferry, 2003).

## **I-1.2 Modification de l'expression génique**

L'augmentation ou la diminution de l'expression d'un gène peut être une cause de maladie. Par exemple, certains micro ARN naturels (miR) peuvent être surexprimés lors de cancers, ou l'expression de gènes peut être dérégulée en cas d'anomalies chromosomiques telles que des trisomies. Les miR sont de courts ARN simple brin (sb) endogènes qui jouent un rôle dans la régulation de l'expression génique par interférence avec des ARNm.

La modification de l'expression génique, en modulant le niveau de l'expression d'un gène représente une stratégie thérapeutique adaptée à ces maladies. Cela peut consister à augmenter, diminuer ou inhiber complètement l'expression d'un gène dès sa transcription de l'ADN en ARNm, ou lors de sa traduction, de l'ARNm à la protéine.

L'interférence à ARN utilise des petites molécules d'ARN qui se fixent sur des ARNm par complémentarité et réduisent ou empêchent leur traduction. Ces molécules sont soit des miR, soit des petits ARN interférants (*small interfering RNA*, siRNA) ou des petits ARN en épingle à cheveux (*small hairpin RNA*, shRNA) qui sont leurs équivalents synthétiques (Angaji *et al.*, 2010).

Des shRNA ont été utilisés dans un modèle murin de trisomie 21 (OMIM#190685), ou syndrome de Down, pour restaurer une expression physiologique de Dyrk1A (Altafaj *et al.*, 2013). Cette stratégie a permis d'améliorer le phénotype des souris trisomiques.

Dans le déficit en alpha-1-anti-trypsine (Déficit en A1AT, OMIM# 613490), il peut y avoir surexpression d'une isoforme toxique de l'enzyme. La réduction de son expression par *Knock-Down* (KD) grâce à des miR permet d'améliorer le phénotype de modèles animaux (Mueller *et al.*, 2012; C. Li *et al.*, 2011). Enfin, l'augmentation de l'expression de certains gènes peut améliorer un phénotype pathologique comme évoqué ci-dessous dans l'ischémie des membres inférieurs.

Ces petits ARN peuvent également être dirigés contre des miR, on parle alors d'éponges à ARN (Brown and Naldini, 2009). Des phénotypes cancéreux sont parfois associés à une surexpression de miR, l'interférence avec ces molécules pourrait donc être une nouvelle stratégie thérapeutique (Gentner *et al.*, 2009).

Il est possible d'utiliser des molécules se fixant directement sur l'ADN par le même principe, en modifiant l'expression génique dès la transcription.

Ainsi, les oligonucléotides formant des triplex (OFT, ou *Triplex Forming Oligonucleotides*, TFO), forment une structure en triple hélice avec l'ADN cellulaire, qui peut par exemple empêcher l'expression du gène ciblé (Besch *et al.*, 2004; Guntaka *et al.*, 2003).

Enfin, il est possible d'utiliser des protéines avec un domaine de fixation spécifique d'une région donnée du génome et de moduler l'expression d'un gène par l'association à des domaines protéiques catalytiques. Les méthyl-transférases, les acétyl-transférases ou les facteurs de transcription, associés à des domaines de fixation de l'ADN tels que des TFO ou des doigts de zinc (*zinc finger*, ZF), font quant à eux varier le niveau d'expression (F. Zhang *et al.*, 2011; Meister *et al.*, 2009; Carroll, 2008; F. Li *et al.*, 2007; Minczuk *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2003a). Sangamo BioSciences Inc. a été la première compagnie à travailler sur les ZFs : leurs premiers travaux ont consisté à mettre au point un répresseur de l'oncogène p190-bcr-abl (Choo *et al.*, 1994). Une stratégie de répression de la transcription, en ciblant le promoteur de certains gènes, peut être envisagée comme cela a été fait pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) : cela a permis de réduire son niveau de réplication (Segal *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2003b).

Il est aussi possible d'utiliser un domaine activateur de la transcription. Par exemple, l'utilisation de ZFs associés à un domaine activateur de la transcription pour cibler le gène codant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (FCEV, ou *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) a permis d'améliorer la circulation sanguine dans des modèles animaux d'ischémie des membres inférieurs (Y. Li *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2006; Klug, 2005; Dai *et al.*, 2004).

La modification de l'expression génique peut aussi consister en la restauration de l'expression d'une protéine tronquée mais fonctionnelle.

Ainsi, pour la myopathie de Duchenne, le saut d'exon utilisant des oligonucléotides complémentaires de la région mutée permet de s'affranchir de la mutation lors de la maturation de l'ARNm. Il est alors possible de conserver un cadre de lecture permettant



d'aboutir à la synthèse d'une protéine fonctionnelle. L'expression d'une protéine tronquée, par rapport à la dystrophine des individus sains, permet de restaurer la fonction musculaire. Il a été démontré que cette stratégie entraîne une amélioration clinique dans des modèles animaux (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Nakamura and Takeda, 2009). Cela a conduit à la mise en place d'essais qui ont démontré les bénéfices cliniques de ces approches chez des patients (Koo and Wood, 2013; Cirak *et al.*, 2011; Kinali *et al.*, 2009).

### **I-1.3 Modification d'un gène *in situ***

La modification d'un gène *in situ* peut viser à inactiver un gène, à réparer une mutation, ou à réaliser l'insertion ciblée (*Knock-In*, KI) d'une construction thérapeutique.

Des nucléases artificielles, les méganucléases, les nucléases à doigts de zinc (*Zinc Finger Nucleases*, ZFNs), les *Transcription Activator-Like Effectors Nucleases* (TALE nucléases), ou le système *clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated Cas9* (CRISPR/Cas9), coupent l'ADN au niveau de leur séquence cible, inhibant l'expression du gène correspondant. La modification *in situ* du gène ciblé peut ainsi viser son inactivation par *Knock-Out* (KO) ou par délétion d'un fragment de chromosome lors de l'utilisation de deux nucléases. Il serait par exemple possible d'utiliser ces nucléases pour inhiber l'expression de la forme toxique de l'enzyme mutée dans le déficit en A1AT comme cité ci-dessus.

Lorsqu'une mutation est responsable d'une maladie, la stratégie la plus physiologique pourrait être de la corriger *in situ*, ce qui correspondrait à un traitement étiologique. Cependant, aucune stratégie de thérapie génique n'a encore été capable de faire disparaître l'anomalie génétique responsable d'une maladie. La correction d'une mutation *in situ*, ou réparation génique, est la stratégie utilisée dans ce travail de thèse dans le contexte du traitement des maladies héréditaires du foie. Cette approche a été appliquée à la maladie modèle de CNI.

En apportant une version corrigée d'un gène, la cellule cible peut spontanément l'intégrer à la place de la région mutée par recombinaison homologue (RH). De même, une construction entourée de régions d'homologie à un locus donné peut y être intégrée spécifiquement. La RH est un système de réparation de l'ADN qui, lorsqu'une cassure double brin (CDB) de l'ADN est détectée, permet de la réparer grâce à une matrice d'ADN servant de modèle à la réparation si elle est entourée de régions d'homologie à la région endommagée. Cette séquence peut être

endogène, une chromatide sœur pouvant servir de matrice de réparation, ou exogène, comme un transgène (Miller *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2006; Russell and Hirata, 1998). La fréquence spontanée de la RH, de  $10^{-6}$ , est insuffisante pour obtenir un effet thérapeutique pour de nombreuses maladies. Elle ne peut avoir une efficacité thérapeutique que dans des modèles de maladies dans lesquels les cellules corrigées présentent un avantage sélectif (Paulk *et al.*, 2012, 2010).

Cependant, la récente utilisation de nucléases artificielles, induisant une CDB dans un locus ciblé, augmente la fréquence de ces réparations et offre la possibilité d'addition d'un gène fonctionnel dans un site donné du génome, voire la correction *in situ* d'une mutation (Porteus, 2006; Porteus and Carroll, 2005). Les nucléases artificielles sont donc aussi utilisées pour la modification de gènes *in situ* pour une réparation génique ou un KI thérapeutique en utilisant la RH pour réparer des cassures induites par des ZFNs (Carroll, 2011; Chen *et al.*, 2011; Lombardo *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2011; Radecke *et al.*, 2010; Carroll, 2008), des TALE nucléases (Clark *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011; Mussolino *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010) ou le système CRISPR/Cas9 (Cho *et al.*, 2013; Mussolino and Cathomen, 2013; Jinek *et al.*, 2012). Les ZFNs permettent par exemple d'augmenter la fréquence de la RH au niveau de leur cible jusqu'à cinq mille fois en réalisant une CDB (Klug, 2010). Elles permettent également l'insertion ciblée d'une construction par capture d'un donneur lors d'évènements de ligature d'extrémités non homologues (*non homologous end joining*, NHEJ). De plus, leur spécificité permet d'assurer que ces évènements n'aient lieu que dans un locus unique du génome.

## I-2 Voies de transfert de gène : stratégies *ex vivo* et *in vivo*

Pour envisager des applications cliniques, les acides nucléiques thérapeutiques doivent parvenir jusqu'aux cellules cibles sans être dégradés, et en quantité suffisante pour obtenir un effet thérapeutique. Deux stratégies complémentaires peuvent alors être utilisées : le transfert de gène *ex vivo* ou *in vivo*.

Il est possible de prélever les cellules cibles et de les modifier génétiquement lors d'étapes *in vitro* en laboratoire avant leur transplantation au patient : c'est le cas des approches *ex vivo*.

Au contraire, dans les approches *in vivo*, les acides nucléiques thérapeutiques peuvent être apportés directement à l'organisme du patient sans étape préalable *in vitro*.

Le choix entre ces deux possibilités dépend notamment de l'organe à atteindre. Ainsi, il est plus simple de récupérer des cellules circulantes du sang et de les modifier *ex vivo* que de récupérer des hépatocytes.

Dans le cas des stratégies *ex vivo*, les cellules à traiter sont prélevées chez le patient ou chez un donneur. Les cellules sont mises en culture afin de permettre le transfert de gène *in vitro*.

Les cellules contenant le gène thérapeutique et l'exprimant correctement peuvent être sélectionnées. Il est possible d'ajouter un gène rapporteur pour ne transplanter que les cellules transduites : cela a été mis en évidence lors de la transduction de cellules hématopoïétiques progénitrices avec le gène marqueur du récepteur au facteur de croissance nerveuse (FCN ou *Nerve Growth Factor, NGF*) tronqué (Bonini *et al.*, 2003). Cette stratégie permet d'augmenter le niveau d'efficacité du traitement en n'amplifiant et/ou en ne transplantant que des cellules transduites.

Actuellement, les essais cliniques *ex vivo* concernent surtout les cellules du sang ou de la moelle osseuse, dont les protocoles de prélèvement et de culture sont bien établis (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2010; Cartier *et al.*, 2009).

Malgré des techniques de prélèvement plus invasives, il est également possible d'envisager des approches *ex vivo* pour d'autres organes. Par exemple, il est possible de prélever des hépatocytes par perfusion du foie, de réaliser le transfert de gène sur ces cellules alors qualifiées de primaires, et de les transplanter chez les patients (Dagher *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009; Parouchev *et al.*, 2006).

L'approche *ex vivo* permet également de ne modifier que les cellules prélevées : cela limite les risques de dissémination et d'effet délétère sur des organes non ciblés.

Pour les approches *in vivo*, le gène thérapeutique est apporté directement à l'organisme du patient, le plus souvent par injection. Il peut être injecté dans le sang, administré dans les voies respiratoires, ou directement dans le tissu cible comme dans le muscle ou dans le système nerveux par exemple.

Toutes les techniques d'administration sont envisageables et à adapter à l'organe et à la maladie ciblées. Néanmoins, selon la technique choisie, il peut y avoir un risque plus ou moins important de dissémination. Le choix du mode d'administration est donc déterminant : il doit permettre l'apport de l'ADN thérapeutique dans l'organe cible en limitant au maximum sa dissémination à d'autres organes pour limiter les effets secondaires.

Par exemple, pour la mucoviscidose, des administrations sous forme d'aérosol ont été réalisées pour accéder plus facilement aux cellules à corriger dans les voies respiratoires (Alton *et al.*, 2013; Bellon *et al.*, 1997).

Pour des maladies du foie, il est possible d'injecter les gènes thérapeutiques dans un foie isolé, parfois associé à une injection sous hyperpression pour cibler au mieux l'organe (Brunetti-Pierri *et al.*, 2012; Kinoshita *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2010a; Kamimura *et al.*, 2009). Un exemple d'injection en foie isolé de vecteurs adénoviraux est présenté en annexe (Schmitt *et al.*, ). Il s'agit d'un travail réalisé par notre équipe en collaboration avec l'équipe de N. Brunetti.

### I-3 Vecteurs de thérapie génique

Afin d'apporter les gènes thérapeutiques aux cellules cibles, il est nécessaire d'utiliser des outils pour transporter les acides nucléiques, supports de cette information. Ces outils sont appelés vecteurs. Ils sont habituellement classés en deux grandes catégories : les vecteurs non viraux et les vecteurs viraux.

#### I-3.1 Transfert de gène à l'aide de vecteurs non viraux ou de méthodes physiques

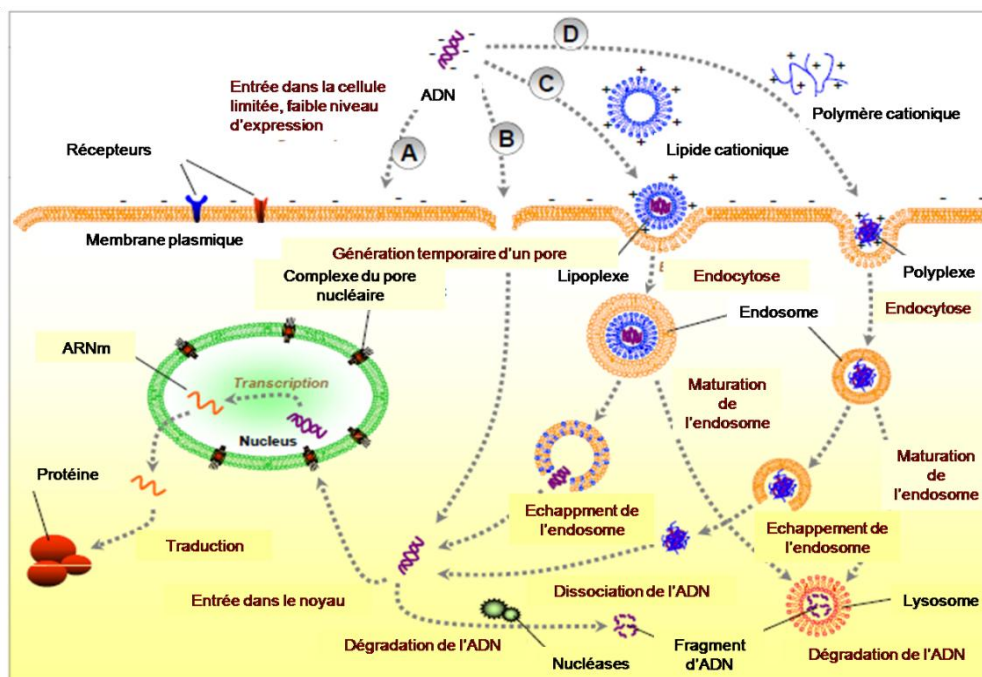


Figure 1 : Transfert d'ADN nu ou d'ADN complexé à des vecteurs synthétiques : de l'ADN thérapeutique à son arrivée au noyau des cellules cibles. D'après (W. Wang *et al.*, 2013).

L'ADN peut être injecté tel quel pour réaliser une transfection de cellules, on parle alors d'ADN nu, ou d'ADN plasmidique s'il s'agit d'une forme circulaire.

On appelle transfection l'ensemble des mécanismes conduisant à l'introduction d'acides nucléiques et à leur expression dans les cellules à traiter en l'absence de vecteurs viraux.

Cependant, l'ADN nu ne franchit pas efficacement les barrières naturelles et est dégradé dans l'organisme. En effet, préalablement à l'expression dans les cellules cibles, les acides nucléiques thérapeutiques doivent résister au passage par la circulation sanguine, éviter une internalisation par les cellules du système réticulo-endothélial, passer les matrices

extracellulaires et la membrane plasmique, être libérés dans le cytoplasme après passage éventuel par les compartiments endosomaux et parvenir jusqu'au noyau (figure 1).

Pour pallier ces inconvénients, des vecteurs synthétiques ont été mis au point. Il s'agit majoritairement de lipides cationiques ou de polymères cationiques (figures 1 et 2, tableau 1) (W. Wang *et al.*, 2013; Pichon *et al.*, 2010). Ils permettent de complexer l'ADN à des molécules pour former respectivement des lipoplexes ou des polyplexes qui facilitent le passage de ces obstacles.

Les lipides cationiques, ou liposomes, contiennent une tête hydrophile, un peptide de liaison et une queue hydrophobe. Les lipoplexes sont formés par mélange de ces lipides avec l'ADN, via des interactions électrostatiques.

Les polymères cationiques comportent de nombreuses fonctions amines qui peuvent se charger positivement dans un environnement au pH neutre. La formation des complexes se fait également via des interactions électrostatiques.

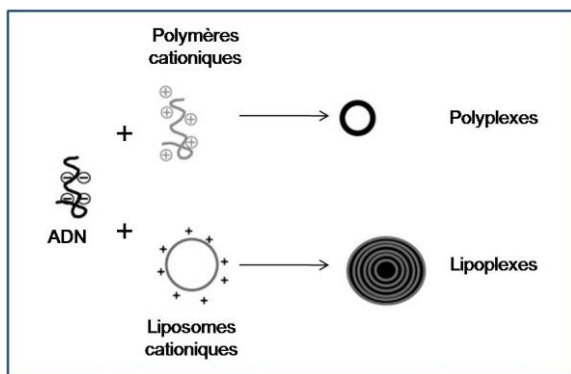


Figure 2 : Lipides cationiques et polymères cationiques : vecteurs synthétiques de thérapie génique. D'après (Pichon *et al.*, 2010).

L'ADN ainsi complexé doit être apporté jusqu'aux cellules en quantité suffisante. Ces agents doivent également protéger l'ADN de la dégradation avant qu'il n'atteigne le noyau des cellules ciblées. Lorsque cela est possible, le transport de l'ADN thérapeutique est orienté vers ces cellules cibles.

La membrane plasmique et les acides nucléiques étant chargés négativement, il est nécessaire de neutraliser la répulsion entre ces deux éléments. Les complexes sont chargés positivement, cela permet de présenter une structure portant des charges positives facilitant l'endocytose. Les complexes permettent également une condensation des acides nucléiques, limitant la taille des particules à transférer et l'accès des nucléases.

Si un passage par les endosomes a lieu, il est possible d'en influencer le pH pour en favoriser la rupture et faciliter ainsi la libération des molécules thérapeutiques dans le cytoplasme.

L'étape suivante consiste à passer l'enveloppe nucléaire. Il est parfois décrit que les lipides ou les polymères cationiques peuvent encore être sous forme de complexes lors de cette étape. Cela permet d'éviter la dégradation par les nucléases cytoplasmiques.

Méthode	Avantages principaux	Inconvénients principaux
Microinjection	Simple, efficace, reproductible, non toxique, transfert de longues séquences d'ADN	Inadapté pour le ciblage d'un grand nombre de cellules
Injection à l'aiguille	Simple, sûr	Efficacité limitée
Injection sous pression	Système facile à contrôler, sans aiguille, sûr	Efficacité. Limitée, lésions au site d'injection
'Pistolet à gène'	Efficace, sûr	Lésions tissulaires
Electroporation	Très efficace, reproductible, permet un transfert de gène localisé, transfert de longues séquences d'ADN	Zone ciblée limitée. Nécessité d'une intervention chirurgicale pour cibler des organes internes. La stabilité de l'ADN peut être modifiée par les courants de haut voltage.
Sonoporation	Sûr, non invasive, possibilité de transfert de gène à des organes internes sans intervention chirurgicale, possibilité de traverser la barrière hémato-encéphalique	Faible efficacité
Injection hydrodynamique	Simple, reproductible, très efficace (surtout pour le foie)	Nécessité d'un volume d'injection élevé limitant les applications cliniques
Massage mécanique	Simple, sûr	Faible efficacité, n'a été utilisé que pour le ciblage du foie
Lipides cationiques	Faciles à préparer, faible coût, très efficace <i>in vitro</i>	Toxicité, faible efficacité <i>in vivo</i>
Polymères cationiques	Faciles à préparer, faible coût, très efficace	Toxicité, certains polymères ne sont pas biodégradables

**Tableau 1 : Méthodes physiques et chimiques de transfert de gène** : résumé des principaux avantages et inconvénients. D'après (W. Wang *et al.*, 2013)

Afin d'améliorer l'efficacité du transfert, des techniques physiques utilisées seules ou en complément des techniques précédemment décrites ont été mises au point (tableau 1).

De l'ADN nu peut être injecté *in vivo* avec une aiguille, pour un transfert de gène dans le muscle par exemple (Danko *et al.*, 1997).

L'ADN nu peut être injecté en hyperpression pour forcer son extravasation vers les tissus cibles. Ainsi, des études ont été faites avec des injections intraveineuses (iv) dans la veine de la queue de souris. Grâce à sa vascularisation particulière, le foie peut ainsi être transfecté préférentiellement (Sebestyén *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999). Cependant, ce type d'approche est peu envisageable en clinique et reste donc réservé à des étapes précliniques.

La méthode du "pistolet à gènes" (*gene gun*) consiste à injecter de l'ADN complexé avec des petites particules métalliques, le plus souvent en or (Chang *et al.*, 2008; Kuriyama *et al.*, 2000).

L'électroporation utilise du courant électrique pour générer des pores dans la membrane plasmique, voire également dans la membrane nucléaire par nucléofection (Park *et al.*, 2013).

La sonoporation remplace le courant électrique par des ultra-sons (Liao *et al.*, 2012; Hauff *et al.*, 2005).

Un massage du foie a également permis d'améliorer un transfert de gène après injection iv (Liu *et al.*, 2004).

L'utilisation de vecteurs synthétiques est suffisante *in vitro* pour transfecter des cellules en culture ou mettre en place des modèles animaux de petite taille comme la souris (Cany *et al.*, 2011). La préparation de ces vecteurs est assez facile à mettre au point en comparaison avec les vecteurs viraux décrits par la suite. Le coût de fabrication des vecteurs synthétiques est moindre et ils ne présentent pas les mêmes limites d'encapsulation ou de biosécurité.

Ces vecteurs peuvent être associés à des molécules pour un meilleur ciblage d'une population cellulaire donnée. Ainsi le galactose et le lactose, le folate, et le peptide MC1SP permettent d'améliorer le ciblage d'hépatocytes, de cellules porteuses du récepteur au folate et des mélanocytes respectivement (Ong *et al.*, 2013; Urbiola *et al.*, 2013; Durymanov *et al.*, 2012; Oishi *et al.*, 2007).

Cependant, l'efficacité de transfection et d'expression des transgènes de ces systèmes de vectorisation non virale restent faibles *in vivo* pour des applications de thérapie génique à des modèles de gros animaux ou en phase clinique chez l'homme (Viola *et al.*, 2010). L'utilisation d'une autre catégorie d'agents est alors nécessaire à ces applications : il s'agit des vecteurs viraux.

### **I-3.2 Les vecteurs viraux**

Le détournement des agents infectieux naturels que sont les virus pour en faire des vecteurs de transfert de gène est une voie privilégiée de thérapie génique (Bouard *et al.*, 2009; Howarth *et al.*, 2010; Kay *et al.*, 2001; Vannucci *et al.*, 2013). Leur capacité naturelle à infecter des cellules est utilisée pour y apporter du matériel génétique qui s'y exprime.

On appelle transduction l'ensemble des mécanismes conduisant à l'introduction du vecteur viral et à l'expression du transgène dans les cellules à traiter.

Pour permettre leur utilisation thérapeutique, différentes générations de vecteurs ont été conçues en retirant un maximum des gènes impliqués dans la pathogénicité du virus sauvage (figure 3). En parallèle, les gènes essentiels pour l'entrée dans la cellule et à l'expression du



transgène doivent être conservés. On qualifie ces virus modifiés de virus ou de vecteurs recombinants.

Plusieurs familles de virus ont été modifiées pour créer des vecteurs viraux aux caractéristiques variées utilisables en thérapie génique. Parmi les plus utilisés, on retrouve les vecteurs oncorétroviraux, lentiviraux (vecteurs LV ou LVr), adénoviraux (vecteurs Ad ou AdR) et les virus associés aux adénovirus recombinants (vecteurs AAV ou AAVr) dont les principales propriétés sont résumées dans le tableau 2. Dans ce manuscrit, seuls seront développés les exemples des vecteurs lentiviraux et des AAVr, utilisés comme vecteurs dans ce travail de thèse.

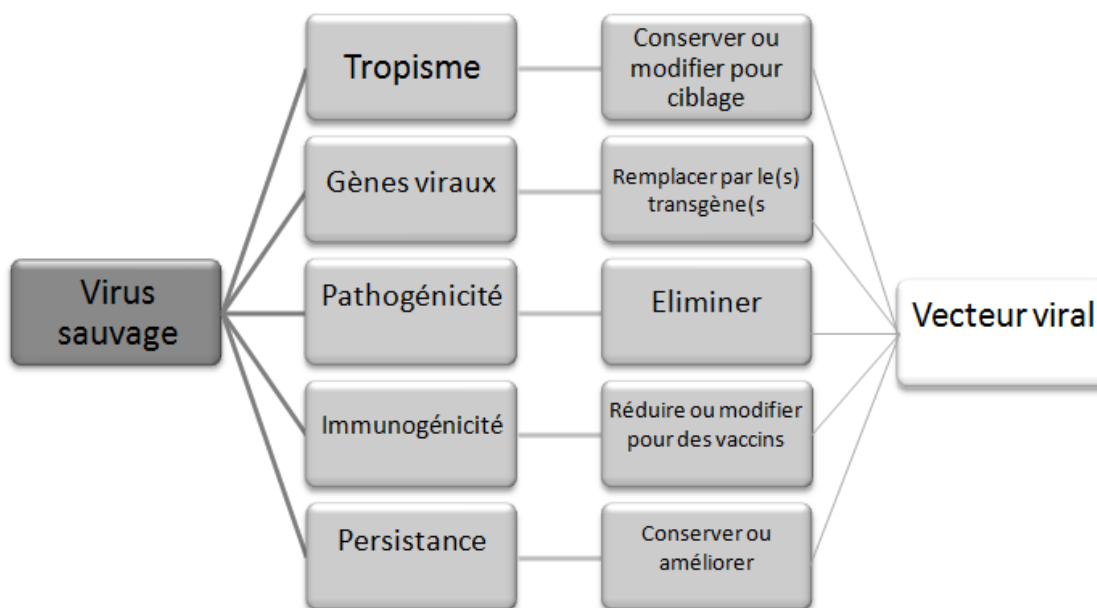


Figure 3 : Du virus sauvage au vecteur viral de thérapie génique.

D'après (Bouard *et al.*, 2009).

Vecteurs	Rendement de production	Propriétés inflammatoires	Tropisme	Forme du génome	Expression du transgène	Génotoxicité
Vecteurs oncorétroviraux	Modéré	Faibles	Large (dont cellules en division)	Intégrée	Long terme	Risque d'oncogenèse
Vecteurs lentiviraux (*déficients pour l'intégration)	Elevé	Faibles	Large	Intégrée (*épissomale)	Long terme (*court terme si cellules en division)	Faible
Vecteurs adénoviraux	Elevé	Fortes	Large	Episomale	Court terme	Faible
Vecteurs AAV	Elevé	Faibles	Large	Episomale (90%), intégrée (10%)	Moyen à long terme (court terme si cellules en division)	Très faible

Tableau 2 : Propriétés des principales familles de virus utilisés comme vecteurs en thérapie génique.

D'après (Bouard *et al.*, 2009).

### ***I-3.2.1 Les vecteurs lentiviraux***

#### **Lentivirus sauvages**

Les lentivirus appartiennent au genre des *Lentivirinae* et font partie de la famille des *Retroviridae*, qui sont des virus à ARN positif, enveloppés, possédant une rétrotranscriptase (Sakuma *et al.*, 2012; Pluta and Kacprzak, 2009). D'une taille d'environ 100 nm de diamètre, ils possèdent un génome diploïde, constitué de deux molécules d'ARN positif monocaténares.

Le génome du VIH-1 contient neuf cadres de lecture ouverts (*open reading frame*, ORF) dont Gag, Pol et Env communs aux rétrovirus (figure 4). La région Gag code les antigènes de la capsid, et Pol code des enzymes parmi lesquelles une ADN polymérase ARN dépendante, l'intégrase et la rétrotranscriptase, ainsi qu'une protéase essentielle pour cliver les protéines Gag et Gag-Pol. La région Env code les glycoprotéines d'enveloppe. La protéine d'enveloppe initialement obtenue, la Gp160, est clivée en Gp120 et Gp41 qui sont présentes dans l'enveloppe des virions.

En plus de ces trois ORFs communs aux *Retroviridae*, les lentivirus possèdent des gènes de régulation de l'expression de gènes cellulaires et viraux : Tat, Rev, et des protéines accessoires : Vif, Vpr et Vpu et Nef. Tat active la transcription des gènes viraux. Rev est essentielle pour le transport post-transcriptionnel des ARNm viraux partiellement ou non épissés vers le cytoplasme.

Les régions riches en purine, appelées *central polypurine tract* (cPPT) et *polypurine tract* (PPT), sont des zones d'amorces d'ARN pour initier la synthèse de l'ADNc par la rétrotranscriptase virale ; elles interviennent dans l'encapsidation.

L'expression des gènes des lentivirus est contrôlée par des activateurs de promoteurs puissants encadrant les régions codantes : les *Long Terminal Repeat sequences* (LTRs) 5' et 3'. Ils sont composés des régions uniques U3 et U5 entourant une région de séquences répétées (R). Ceux-ci jouent un rôle dans la rétrotranscription, l'intégration de l'ADNc dans le génome des cellules hôtes et la transcription.

Un signal d'empaquetage Psi ( $\Psi$ ) est situé entre le LTR 5' et le gène gag.

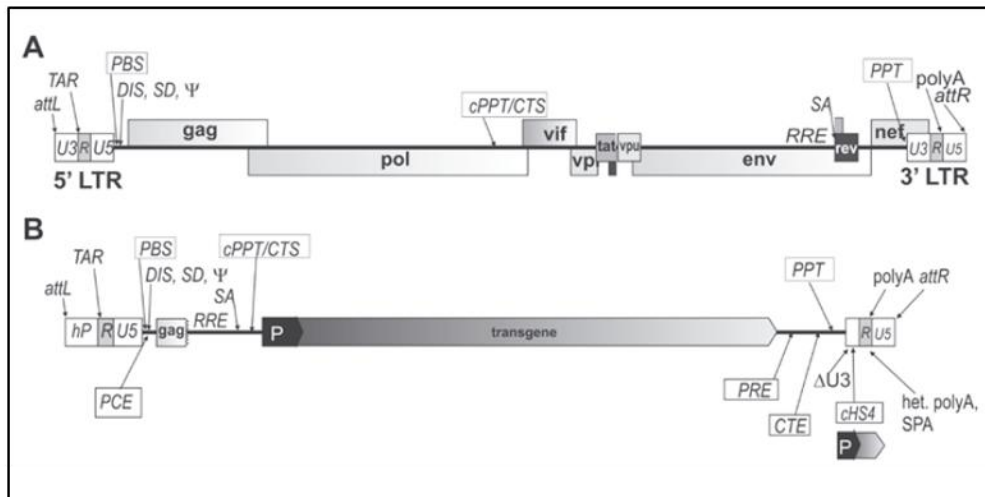


Figure 4 : Du lentivirus sauvage au lentivirus recombinant : comparaison des génomes  
 D'après (Pluta and Kacprzak, 2009).

Le cycle de réplication des lentivirus commence par l'entrée dans la cellule par l'intermédiaire de récepteurs reconnaissant les protéines d'enveloppe (figure 5, A). L'enveloppe du virus et la membrane plasmique de la cellule cible fusionnent alors (B) et conduisent à la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme. Le cycle se poursuit par la rétrotranscription du génome viral, soit la formation d'ADN double brin (db) à partir de l'ARN viral (C). L'ADNc est ensuite importé dans le noyau et intégré au génome sous forme d'un provirus grâce à l'intégrase virale (D et E). L'intégration permet, comme pour les gènes cellulaires, la transcription du provirus (F) en ARNm et en ARN viraux nécessaires à la formation de nouvelles particules infectieuses. Le provirus possède ses propres éléments de régulation de la transcription et utilise la machinerie de transcription de la cellule hôte. Les ARNm viraux obtenus sont exportés dans le cytoplasme où ils sont traduits ou encapsidés (G). Cela permet l'assemblage des nouvelles particules virales avant leur bourgeonnement à partir de la membrane plasmique et leur maturation, puis, l'infection de nouvelles cellules cibles (H, I et J). Les oncorétrovirus ne peuvent pas entrer dans le noyau en dehors de la mitose lorsque celui-ci est désorganisé. A l'inverse, les lentivirus ont l'avantage de pouvoir infecter aussi bien des cellules mitotiquement quiescentes que des cellules en division.

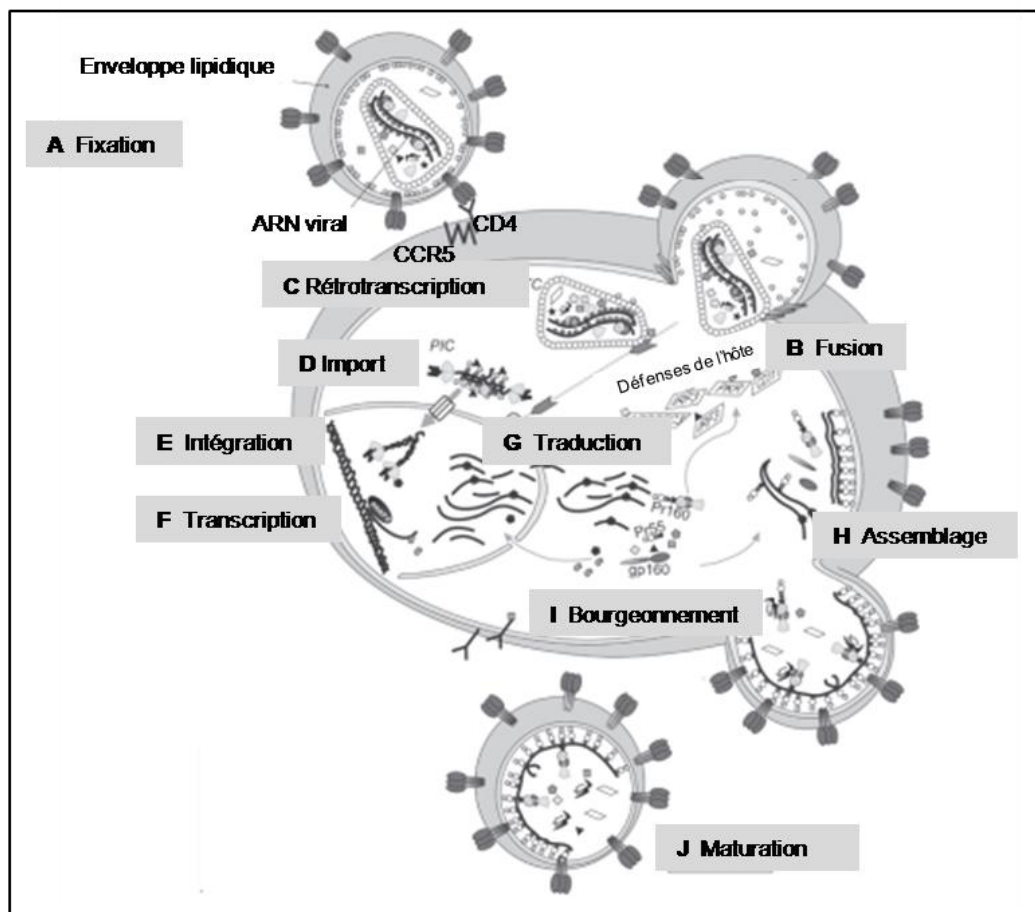


Figure 5 : Schéma du cycle de réplication des lentivirus sauvages. D'après (Pluta and Kacprzak, 2009).

### Caractéristiques des lentivirus recombinants

Les vecteurs lentiviraux sont dérivés de virus sauvages de différentes espèces comme les virus : de l'immunodéficience simienne (SIV) (Mangeot *et al.*, 2002; Nègre *et al.*, 2002; Gilbert and Wong-Staal, 2001), de l'immunodéficience féline (FIV) (Loewen *et al.*, 2004, 2003a; Wang *et al.*, 1999; Poeschla *et al.*, 1998), de l'immunodéficience bovine (BIV) (Matukonis *et al.*, 2002; Berkowitz *et al.*, 2001), de l'arthrite-encéphalite caprine (CAEV) (Olsen, 2001; Mselli-Lakhal *et al.*, 2000), de l'anémie infectieuse équine (EIAV) (Olsen, 2001, 1998), de la maladie de Jembrana (JDV) (Metharom *et al.*, 2000), de Maedi-Visna (MVV) ou les VIH de types I et II (Pluta and Kacprzak, 2009; Condiotti *et al.*, 2004; Olsen, 1998). Les formes sauvages de ces virus sont à l'origine de maladies chez les espèces hôtes. La majorité des projets de thérapie génique utilisant les vecteurs LV sont conduits avec des vecteurs dérivés du VIH-I.

Pour faire de virus sauvages des outils thérapeutiques, leurs gènes responsables de la réplication sont retirés. Les gènes permettant l'entrée dans la cellule cible, la rétrotranscription, son entrée dans le noyau et son intégration sont conservés. Ainsi, le vecteur n'effectue qu'une partie du cycle des virus sauvages : il entre dans la cellule cible, la rétrotranscription a lieu et l'ADN codant le transgène est transcrit puis traduit. Il n'y a pas de formation de nouvelles particules qui permettrait la poursuite de l'infection lors d'un cycle lytique de virus sauvage.

Capables de transduire des cellules mitotiquement quiescentes, la popularité des lentivirus a augmenté grâce à cet avantage par rapport aux vecteurs oncorétroviraux. Ils offrent ainsi de nouvelles possibilités pour la transduction d'hépatocytes adultes, de neurones ou de lymphocytes non activés par exemple (Dagher *et al.*, 2009; Zufferey *et al.*, 1997; Naldini *et al.*, 1996a).

Ils peuvent transporter des constructions allant jusqu'à 7 à 8 kb, voire 9 à 10 kb avec des titres réduits. Ils sont capables d'encapsider une grande diversité de constructions : des cassettes d'expression, des constructions bidirectionnelles à plusieurs cassettes, des éléments de régulation, des shARN ou encore des séquences cibles de miR (Hutson *et al.*, 2013; Koldej *et al.*, 2013; Pichard *et al.*, 2012; Schmitt *et al.*, 2010b; Kordower *et al.*, 2000).

Contrairement aux vecteurs oncorétroviraux, les vecteurs LV ont tendance à s'intégrer dans des régions actives du génome, mais non préférentiellement dans des sites d'initiation de la transcription. Ces caractéristiques seraient associées à une moindre génotoxicité (Mitchell *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2003; Schröder *et al.*, 2002). Néanmoins, des études au cas par cas sont nécessaires, telles que celles réalisées pour les essais cliniques, car l'intégration dépend notamment de la construction et de la dose de vecteur employées (Charrier *et al.*, 2011).

Les vecteurs utilisés actuellement sont dits *Self-INactivated* (SIN) ou  $\Delta$ U3 car la région LTR 3' est déléetée des séquences activatrices (Iwakuma *et al.*, 1999; Zufferey *et al.*, 1998). Lors de la rétrotranscription, cette délétion est dupliquée dans le LTR5' et conduit à l'inactivation des deux LTRs. Cela limite les effets du vecteur sur l'environnement génomique et réduit ainsi les risques de mutagenèse insertionnelle comme démontré lors d'une comparaison de vecteurs LV avec et sans délétion  $\Delta$ U3 (Bokhoven *et al.*, 2009).

Par opposition aux vecteurs oncorétroviraux, les vecteurs LV présentent un risque de tumorigenèse réduit (Montini *et al.*, 2006; Woods *et al.*, 2006). Ainsi, dans un modèle de souris développant des tumeurs, les vecteurs LV n'ont pas été impliqués dans une accélération de la tumorigenèse contrairement aux vecteurs oncorétroviraux (Woods *et al.*, 2006). De plus,

une étude *in vitro* a montré que leur capacité à transformer des cellules hématopoïétiques primaires était trois fois plus faible que celle des vecteurs gammarétroviraux (Modlich *et al.*, 2009). Dans un modèle de transplantations sériées d'hépatocytes après l'injection de vecteurs lentiviraux *in vivo*, seul un développement polyclonal des hépatocytes transduits a été observé dans un contexte favorable à la prolifération (Rittelmeyer *et al.*, 2013). Aucune association à une tumorigenèse n'a été mise en évidence.

La séquence élément régulateur post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de la marmotte (*woodchuck post-responsive element*, WPRE) a été ajoutée aux vecteurs pour améliorer le niveau d'expression du transgène en augmentant la quantité d'ARNm et son export dans le cytoplasme (Zufferey *et al.*, 1999).

Enfin, le pseudotypage de ces vecteurs, par l'intégration de molécules de ciblage dans leur enveloppe, a permis d'augmenter l'efficacité de transduction de certains types cellulaires. La plupart des vecteurs possèdent comme protéine d'enveloppe la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) en raison de la grande stabilité qu'elle confère aux virions, des titres élevés obtenus et d'un large spectre de cellules hôtes présentant des récepteurs à cette protéine (Akkina *et al.*, 1996; Naldini *et al.*, 1996b; Reiser *et al.*, 1996). De plus, des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite C permettent le ciblage des hépatocytes, et celles du virus de la rougeole permettent de transduire des lymphocytes quiescents alors que seuls des lymphocytes activés pouvaient l'être avec des virus pseudotypés VSV-G (Bischof and Cornetta, 2010; Frecha *et al.*, 2010, 2008a, 2008b).

La production de LVr permet l'assemblage de particules virales enveloppées contenant les protéines non structurales du virus et un génome contenant les acides nucléiques thérapeutiques sous forme d'ARN (Salmon and Trono, 2006). La particule ainsi produite est libérée dans le surnageant après bourgeonnement. Des titres de  $10^6$  à  $10^8$  unités de transduction par mL (TU/mL) sont souvent obtenus dans le surnageant brut. Ils peuvent être utilisés tels quels pour des applications *in vitro*, mais ils requièrent le plus souvent une étape de concentration pour les utilisations *in vivo*.

Récemment, une nouvelle génération de lentivirus recombinants a été mise au point : les vecteurs lentiviraux déficients pour l'intégration (*Integration Deficient Lentiviral Vectors*, IDLVs) (figure 6) (Banasik and McCray, 2010; Wanisch and Yáñez-Muñoz, 2009; Sarkis *et al.*, 2008). Pour certaines applications de thérapie génique, ils permettent d'augmenter la biosécurité des vecteurs LV, en réduisant notamment les inconvénients de l'intégration

comme le risque de mutagenèse insertionnelle. L'intégration résiduelle est trois à quatre logs moins fréquente que celle des vecteurs intégratifs (Leavitt *et al.*, 1996).

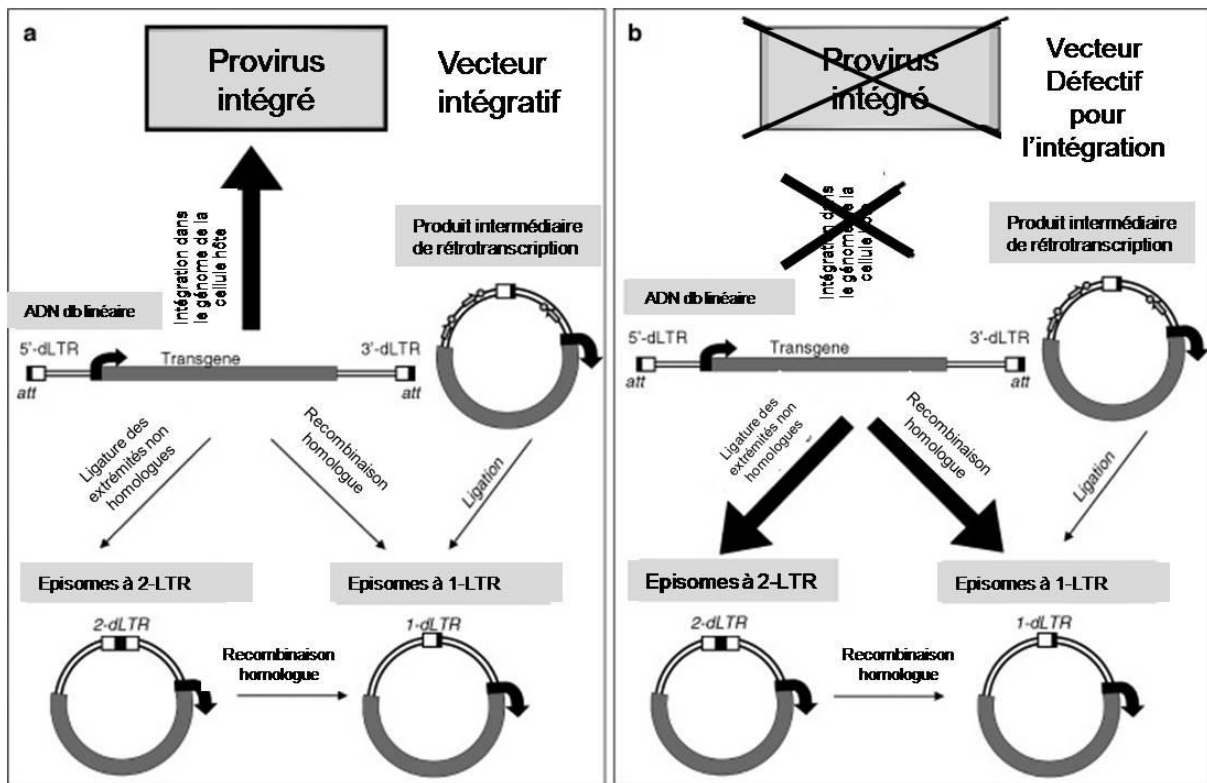


Figure 6 : Comparaison des vecteurs lentiviraux intégratifs et déficients pour l'intégration  
D'après (Wanisch and Yáñez-Muñoz, 2009).

Il existe deux classes de mutations de l'intégrase : la classe I qui laisse persister une synthèse d'ADN normale mais qui empêche l'intégration et conduit à l'accumulation de formes épisomales contenant un ou deux LTR dans le noyau, et la classe II qui affecte également d'autres aspects du cycle viral (Engelman, 1999). La mutation la plus répandue est la D64V : c'est une mutation ponctuelle dans le domaine catalytique inhibant l'expression de l'intégrase.

Il a été également démontré qu'une mutation de la région contenant les sites d'attachement *att* des LTRs peut conduire à la production d'IDLVs, mais de manière moins efficace que les mutations de l'intégrase (Masuda *et al.*, 1998).

Les titres obtenus lors de la production des IDLVs sont généralement inférieurs à ceux des vecteurs intégratifs. De même, les efficacités de transduction et d'expression du transgène sont souvent moindres (Bayer *et al.*, 2008; Mátrai *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2009).

En raison de leur état épisomal, les IDLVs sont dilués dans des cellules en division. Cela peut être un avantage si une expression à court terme est souhaitée, comme pour des nucléases.

Au contraire, les IDLVs sont adaptés pour une expression à long terme dans des tissus quiescents. Ainsi, ces vecteurs ont permis de transduire des cellules de la rétine, du système nerveux ou du muscle (Hutson *et al.*, 2012; Rahim *et al.*, 2009; Apolonia *et al.*, 2007; Philippe *et al.*, 2006; Loewen *et al.*, 2003b). De plus, leur état épisomal leur permet d'être moins sujets au *silencing*.

### ***I-3.2.2 Les virus associés aux adénovirus***

#### **AAV sauvages**

Les virus associés aux adénovirus (*Adenoviral Associated Virus*, AAV), sont des virus à ADN sb de la famille des *Parvoviridae* et de la sous-famille des *Parvovirinae* appartenant au genre *Dependovirus*. Les AAVs sont non enveloppés, possèdent une capsidie icosaédrale et mesurent environ 22 nm de diamètre. Ils ont été découverts en 1965 dans une préparation d'adénovirus (Atchison *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966; Mayor *et al.*, 1965). A l'état sauvage, la présence d'un autre type de virus, dit auxiliaire, est nécessaire à la réalisation d'un cycle lytique par des AAV. Cela a d'abord été décrit pour les adénovirus, d'où le nom donné à ces vecteurs (Blacklow *et al.*, 1967). Plus récemment, d'autres familles de virus ont été décrites comme pouvant jouer ce rôle, tels que les herpèsvirus, les papillomavirus ou le virus de la vaccine (Alazard-Dany *et al.*, 2009).

Les AAVs sont réputés non pathogènes. La majorité de la population a cependant déjà été en contact avec certains sérotypes (Chirmule *et al.*, 1999; Blacklow *et al.*, 1968). Plus d'une centaine de sérotypes ont été décrits (Gao *et al.*, 2005). Environ 80% de la population est séropositive pour l'AAV2, mais les anticorps dirigés contre un sérotype donné ne sont pas nécessairement neutralisants.

L'AAV possède un génome sb linéaire de 4,7 kb. Celui-ci est encadré de régions répétées inversées (*Inverted Terminal Repeats*, ITR), dont les 125 nucléotides distaux forment une structure secondaire en épingle à cheveux en T (Bohenzky *et al.*, 1988). Le génome des AAVs comporte deux ORFs encadrés par les ITR (figure 7).

L'ORF en 5' correspond au gène Rep et code les protéines Rep40, 52, 68 et 78 ; elles présentent toutes un rôle catalytique d'hélicase et d'ATPase. Rep68 et 78 peuvent être obtenues à partir du promoteur p5, avec et sans épissage alternatif respectivement. Ces



protéines interviennent notamment dans la réplication, l'intégration dans le locus AAVS1, ont un rôle d'endonucléase ciblant le site de clivage (*Terminal Resolution Site*, TRS) et ont un site de liaison à l'ADN du site de fixation à la protéine Rep (*Rep Binding Site*, RBS). Rep40 et 52 sont exprimées sous contrôle du promoteur p19 avec ou sans épissage respectivement, elles interviennent dans l'accumulation de l'ADN viral sb avant formation de nouveaux virions.

L'ORF en 3' du génome correspond au gène Cap codant les protéines de capsid VP1, 2 et 3. Sous le contrôle du promoteur p40, elles sont obtenues avec épissage alternatif pour VP2 et 3 et sans épissage alternatif pour VP1. Ces trois protéines sont présentes au ratio 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) dans la capsid.

Les ITR servent d'origine à la réplication virale et comportent la région RBS, et un site TRS.

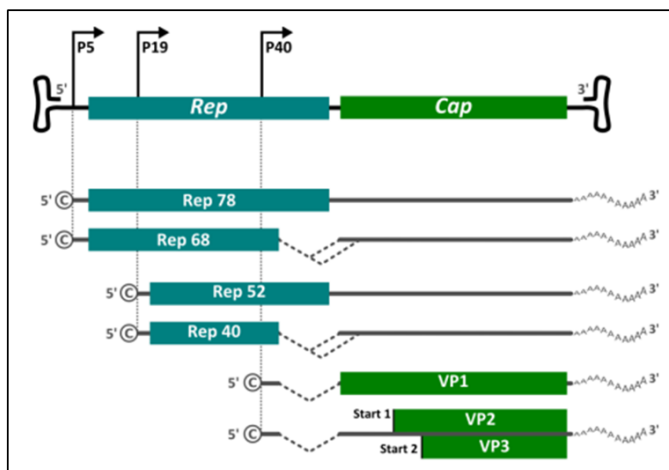


Figure 7 : Génome des virus associés aux adénovirus.  
D'après (Léger, 2012)

Lorsqu'un AAV infecte une cellule, en l'absence de virus auxiliaire, il peut entrer dans un état de latence qui peut passer par une intégration préférentielle sur le chromosome 19 chez l'homme, en région q13.4, dans un locus nommé AAVS1 (Lamartina *et al.*, 2000; Samulski *et al.*, 1991; Kotin *et al.*, 1990). Cette région présente des homologies aux ITR, dont un site de fixation des protéines Rep et un site de clivage TRS. Les ITR, REP 68 ou 78 et la séquence *Integration Efficiency Element* (IEE) contenue dans le promoteur p5 interviennent dans cette intégration. Elle peut être réversible dans le cas d'une co-infection par un virus auxiliaire : l'AAV peut alors réaliser un cycle lytique. Il est à noter que l'insertion des AAVs dans le locus AAVS1 n'est associé à aucun effet délétère (Tay *et al.*, 2013; van Rensburg *et al.*, 2012; Händel and Cathomen, 2011).

La première étape du cycle lytique des AAVs consiste en l'entrée du virus dans ses cellules cibles (figure 8). L'entrée du sérotype 2 est notamment permise par une liaison aux protéoglycanes à héparane sulfates (HSPG) (Summerford and Samulski, 1998).

L'internalisation peut se faire par endocytose en puits de clathrine ou médiée par la cavéoline selon le sérotype (Bantel-Schaal *et al.*, 2009, 2002; Bartlett *et al.*, 2000). Cela précède la libération des endosomes dans le cytoplasme, avant l'entrée dans le noyau. Ensuite, à partir d'ADN sb de polarité positive ou négative, un ADN db est néosynthétisé soit par hybridation d'ADN sb de polarités inverses, soit par l'action d'une polymérase de la cellule hôte. La transcription ne peut être réalisée qu'à partir des formes db.

Par RH entre les ITR, les AAVs peuvent former des concatémères : ils stabilisent les molécules d'ADN dans le cytoplasme, ou donnent lieu à des intégrations dans le génome. Les AAV peuvent également persister sous une forme chromatine-like et être associés aux histones (Penaud-Budloo *et al.*, 2008).

La majorité des AAVs persistent sous forme épisomale dans la cellule ; c'est pourquoi ils sont qualifiés de non intégratifs.

### **AAV recombinants : caractéristiques**

Ces virus ont été modifiés pour leur utilisation comme vecteurs de transfert de gène, on parle alors d'AAV recombinants (AAVr). Seuls les ITR sont conservés en *cis*, tandis que les gènes Rep et Cap sont remplacés par le ou les transgènes et apportés en *trans* lors de la production. Afin d'assurer les fonctions auxiliaires nécessaires à la production de nouveaux vecteurs, les séquences adénovirales essentielles E1, E2, E4 et VA RNA sont également apportées en *trans* par co-transfection ou en utilisant une lignée productrice les exprimant de façon constitutionnelle. La première génération de vecteurs AAVr était porteuse d'un ADN sb (*single strand*, ss), capable d'encapsider jusqu'à 4,7 kb (figures 8 et 9). A partir de cette molécule d'ADN sb, la partie centrale est répliquée : cela donne lieu à des molécules db. C'est à partir de cette seconde forme qu'il est possible d'obtenir une expression du transgène.

Le premier sérotype à avoir été utilisé est le sérotype 2. Les protéines HSPG étant présentes à la surface de nombreux types cellulaires, ce sérotype a un large tropisme (Summerford and Samulski, 1998).

Au fur et à mesure de la connaissance des autres sérotypes, il a été envisagé de tirer profit de leurs tropismes spécifiques (Asokan *et al.*, 2012b; Schmidt *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2005). Les capsides ont ainsi été modifiées pour un ciblage plus efficace de certains types cellulaires (tableau 3). On parle alors de vecteur pseudotypé 2/8 ou d'AAVr 8 par exemple. Les sérotypes utilisés actuellement en thérapie génique sont numérotés de 1 à 12 (Asokan *et al.*, 2012a). Certains types cellulaires n'étaient que peu ou pas transduits par le sérotype 2 en

raison d'une faible quantité de récepteurs, d'un mauvais "*trafficking*", d'une mauvaise décapsidation ou d'un faible rendement du passage de la forme sb aux structures db ; le pseudotypage peut alors s'avérer essentiel. Dans une étude sur un modèle murin, l'AAVr 2/8 a permis d'augmenter de cent fois le niveau de transduction du foie (Chao *et al.*, 2000).

Le changement de sérotype est également envisageable pour une seconde administration d'AAV à un même patient : cela permet d'éviter la RI dirigée contre le premier sérotype utilisé.

Afin d'améliorer le ciblage, des stratégies analogues peuvent être employées.

Des AAVr chimériques ou mosaïques peuvent être produits pour obtenir des particules avec des protéines VP de plusieurs sérotypes. Les virus ainsi produits présentent des caractéristiques uniques (Hickey *et al.*, 2011). Par exemple, l'association de protéines de capsides de trois sérotypes naturels a conduit à une efficacité de KO supérieure à celle obtenue avec chacun des sérotypes naturels dans un modèle de fibroblastes porcins pour le déficit en fumarylacétoacétate hydrolase (FAH, OMIM#613871) (Bowles *et al.*, 2003). La combinaison de protéines VP de sérotypes distincts augmente cependant la probabilité de la reconnaissance du nouvel AAV par le système immunitaire de l'hôte en présence d'anticorps dirigés contre des protéines des capsides de chacun des sérotypes.

Enfin, la modification de ligands présents dans la particule virale permet d'orienter le tropisme vers un type cellulaire donné ou, à l'inverse, de supprimer une partie du tropisme attendu. L'ajout du motif 585-QQNTAP-590 au récepteur à l'héparane sulfate à un AAVr de sérotype 8 a ainsi permis de réorienter le tropisme vers le muscle, plutôt que vers les hépatocytes, et de diminuer la dose injectée dans un modèle de dystrophie chez le hamster (Rotundo *et al.*, 2013).

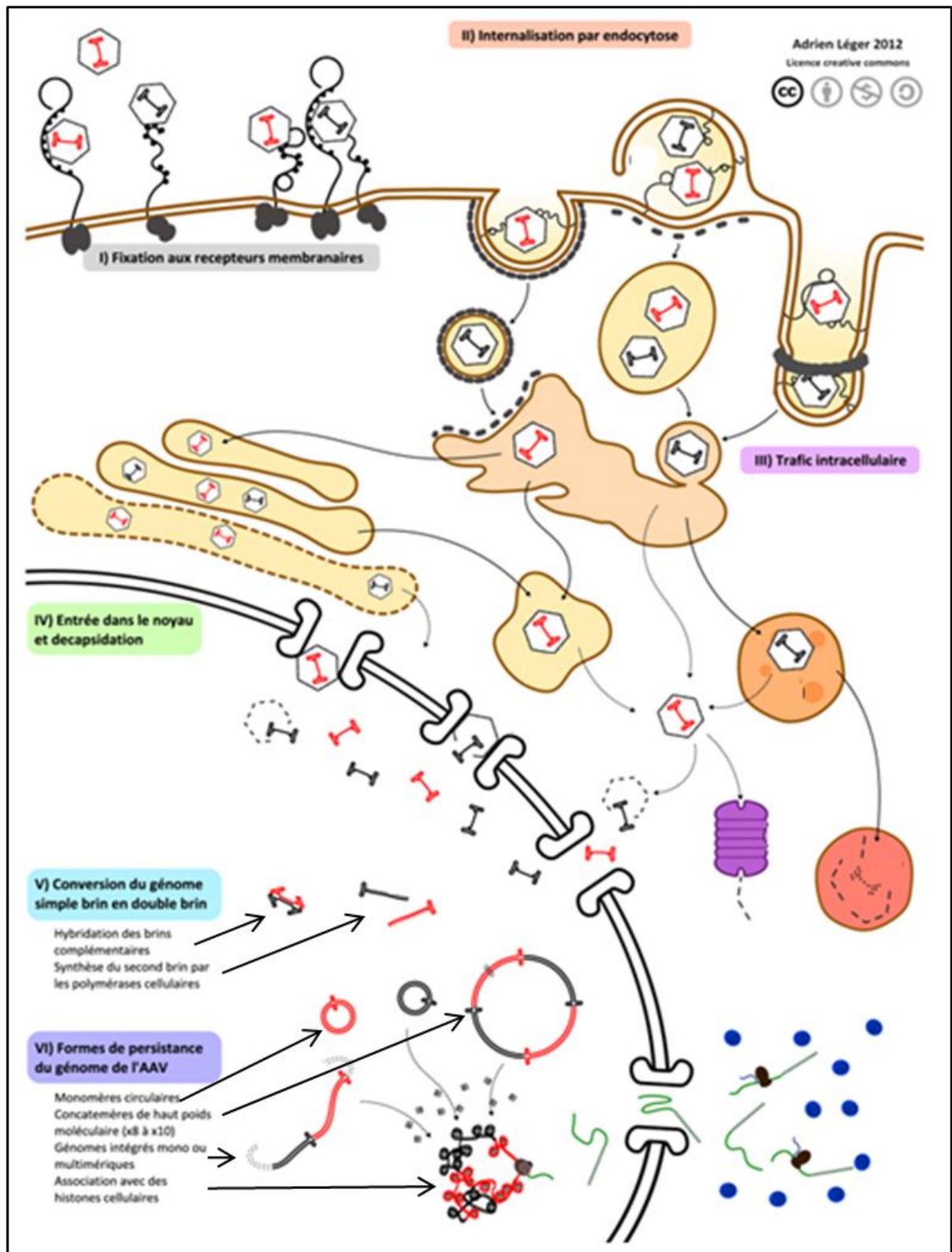


Figure 8 : Etapes du cycle des AAVr. D'après (Léger, 2012).

Sérotypage d'AAV	Tropisme préférentiel
1	Coeur, vaisseaux, foie, muscle, pancréas, système nerveux central (SNC)
2	Foie, muscle squelettique
3	Oreille interne, hépatocarcinome et hépatoblastome
4	Oeil, SNC
5	Foie, oeil, poumon, SNC
6	Coeur, muscle squelettique, poumon
7	Foie, muscle squelettique, oeil
8	Coeur, foie, muscle squelettique, pancréas
9	Coeur, foie, muscle squelettique, poumon, oeil, SNC
10	SNC
11	Non décrit
12	Non décrit

Tableau 3 : Tropismes des AAVr utilisés en thérapie génique

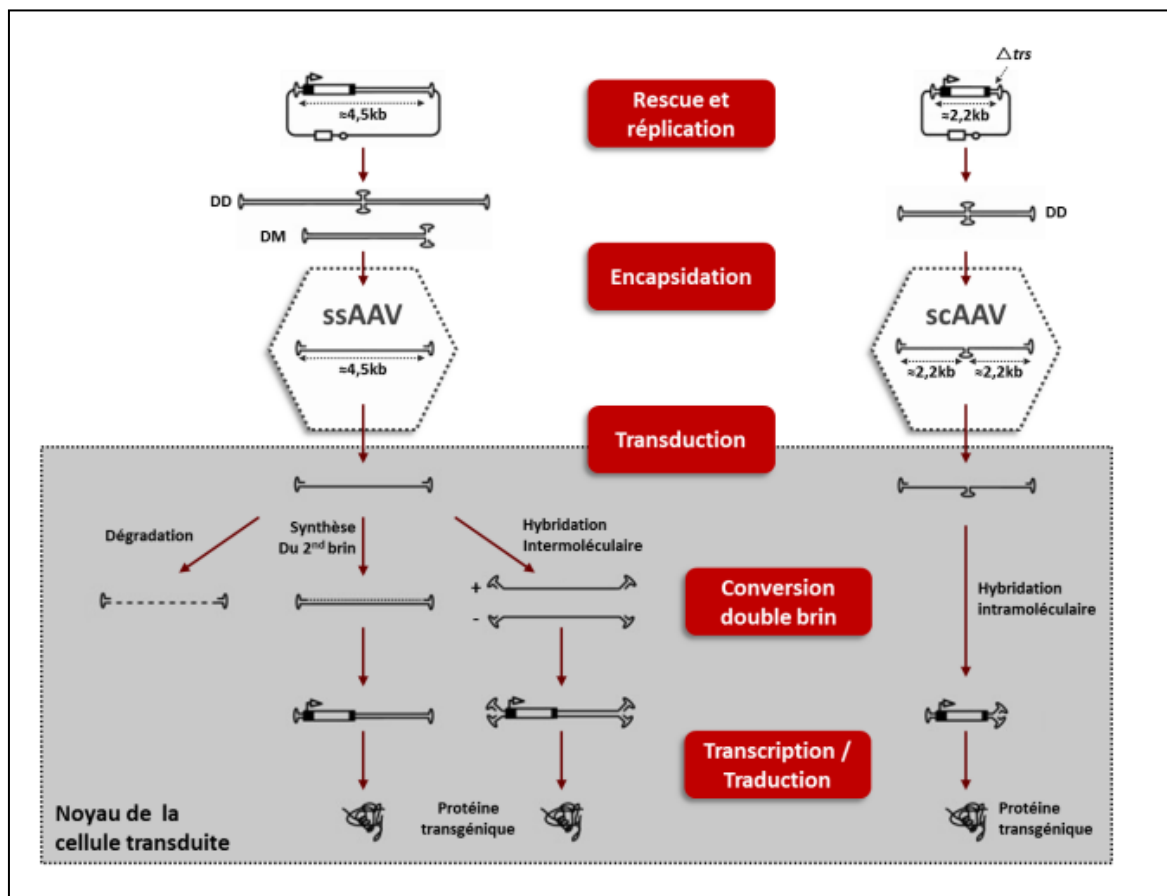


Figure 9 : Des vecteurs simple brin (ssAAV) aux vecteurs double brin (scAAV). A gauche : synthèse d'un ADN double brin (ssAAV) à partir de la forme simple brin. A droite : structure du génome des AAVr double brin (scAAV). D'après (Léger, 2012).

Afin d'éviter cette étape de synthèse d'un néobrin, une nouvelle génération d'AAVr double brin (*self complementary*, sc) présentant un meilleur niveau de transduction a été développée (figure 9). Une mutation de la région TRS empêche sa coupure par Rep68 et Rep78. Cela permet aussi d'obtenir une expression plus rapide et d'éviter la dégradation de molécules sb, aboutissant à une expression plus faible (McCarty *et al.*, 2003, 2001). L'ADN db des scAAVr persiste longtemps dans la cellule.

La comparaison de l'expression de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) dans le cerveau à partir de ss ou scAAVr2 a montré que celle-ci n'était détectable, un à deux mois post-transduction, que dans le cas des vecteurs sc. Cela en fait un bon candidat pour le traitement de maladies affectant le système nerveux central (SNC), telles que les maladies de surcharge lysosomale (Fu *et al.*, 2003).

L'inconvénient majeur des scAAVr est leur limite d'encapsidation : elle n'est que d'environ 2,2 kb. Certaines applications nécessitent une taille d'encapsidation supérieure à celle des AAVr, sc et ss, pour exprimer la dystrophine pour traiter la myopathie de Duchenne par exemple.

C'est pourquoi certaines équipes ont recours au trans-épissage. Cela consiste à répartir la construction thérapeutique sur plusieurs AAVr, en introduisant des sites donneurs et accepteurs d'épissage. Cela entraîne une expression du transgène complet lors de la transduction d'une cellule par les différents vecteurs nécessaires (Trapani *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2007, 2005). Dans ces stratégies, l'utilisation d'ITR de sérotypes différents dans un même AAV favorise l'efficacité du trans-épissage en limitant les recombinaisons entre ITR.

La RH entre des régions réparties sur deux AAV peut aussi être utilisée pour s'affranchir des limites d'encapsidation. Cependant, une étude comparant ces deux stratégies, utilisant la bêta-galactosidase comme transgène, a démontré une meilleure efficacité du trans-épissage (Duan *et al.*, 2001).

Ces vecteurs persistant majoritairement sous forme épisomale, l'expression du transgène dans des cellules en division est limitée car les épisomes sont dilués comme c'est le cas pour les IDLVs. Ainsi, une correction à court terme a pu être mise en évidence dans un modèle de la maladie de CNI après injection d'AAVr dans le foie de rats nouveau-nés dont les hépatocytes sont en division (Flageul *et al.*, 2009). Comme évoqué pour les IDLVs, selon l'application souhaitée, le caractère épisomal peut être soit un avantage, soit une limite.

Bien qu'habituellement décrits comme non intégratifs, des formes intégrées d'AAVr ont été mises en évidence après des injections dans le foie par exemple (Cunningham *et al.*, 2008; Inagaki *et al.*, 2008). Il existe donc un risque de mutagenèse insertionnelle malgré la rareté de ces intégrations en comparaison aux vecteurs dits intégratifs.

Donsante *et al.* ont montré la formation de tumeurs hépatiques dans un modèle murin de mucopolysaccharidose de type VII (MPS VII, OMIM#253220) chez des nouveau-nés par mutagenèse insertionnelle suite à l'injection d'AAVr (Donsante *et al.*, 2007). L'association entre tumorigenèse et intégration des AAVr n'a pas été mise en évidence dans d'autres études. Par exemple, l'injection d'AAVr dans un modèle de carcinome hépatique chez le rat n'a pas modifié l'incidence des phénomènes de tumorigenèse (Gauttier *et al.*, 2013). De même, dans deux études chez la souris, l'AAVr n'a pas pu être associé à un risque accru de tumorigenèse (Bell *et al.*, 2006, 2005).

Si des CDB de l'ADN sont présentes dans la cellule, les AAVr ont tendance à s'y intégrer de façon préférentielle (Gellhaus *et al.*, 2010). Cela pourrait conduire à une mutagenèse insertionnelle.

## I-4 Choix du vecteur

Pour choisir le vecteur le mieux adapté à un protocole donné, les principaux paramètres à prendre en compte sont :

- la nature et la taille du matériel génétique à transférer, avec la nécessité d'utiliser un vecteur de taille suffisante présentant une capacité d'encapsulation adaptée,
- le tropisme du vecteur, qui doit être compatible avec l'organe et les cellules cibles,
- la toxicité et l'immunogénicité, qui doivent être minimales,
- la persistance et le maintien de l'expression du vecteur dans la cellule cible qui orientent le choix vers des vecteurs intégratifs ou non.

Dans le cadre de cette thèse, des vecteurs ssAAVr 2/8 ont été utilisés. Leur taille permet d'encapsider la séquence codant les deux ZFNs et/ou l'ADN donneur, et de passer les fenestrations des capillaires du foie. Ils ont un tropisme préférentiel pour les hépatocytes et peuvent infecter des hépatocytes jeunes ou adultes. Leurs toxicité et immunogénicité sont suffisamment réduites pour une application en transfert de gène. Enfin, ne s'intégrant que peu ou pas dans le génome de la cellule hôte, dans le cas de l'injection dans un foie en prolifération, les épisomes sont dilués au cours du temps. Les AAVr offrent ainsi une expression à court terme des ZFNs, autorisant une fenêtre thérapeutique pendant laquelle la RH peut avoir lieu et évitant une expression prolongée des nucléases qui pourrait être délétère.



## I-5 Enjeux actuels pour la thérapie génique

Les premiers essais cliniques de thérapie génique ont débuté dans les années 1990 ; plus de 1800 essais ont été conduits depuis (Ginn *et al.*, 2013, “Gene Therapy Clinical Trials Worldwide”n.d). Le nombre d’essais a augmenté pendant une dizaine d’années, puis a fluctué jusqu’à être très restreint depuis quelques années (figure 10). Cette évolution s’explique par le fait que certains essais ont mis en évidence des effets secondaires majeurs qui n’avaient pas été envisagés dans de telles proportions lors des étapes précliniques. Cela a posé des problèmes d’Ethique et de biosécurité majeurs expliquant le ralentissement du rythme des essais. Les indications de ces essais et les techniques de vectorisation de l’ADN sont très variées (figure 11).

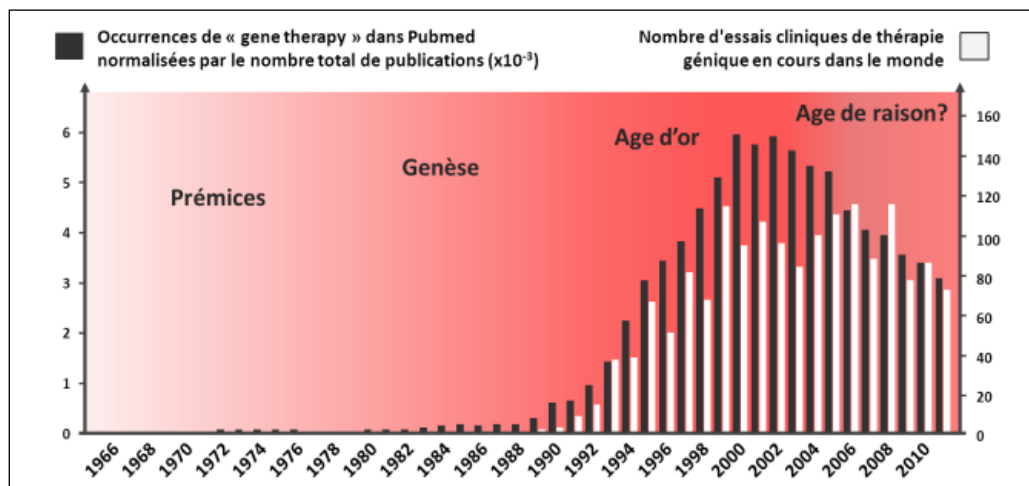


Figure 10 : Nombre d’essais cliniques de thérapie génique par an depuis 1989.

D’après (Léger, 2012)., (Edelstein *et al.*, 2007; “Gene Therapy Clinical Trials Worldwide”).

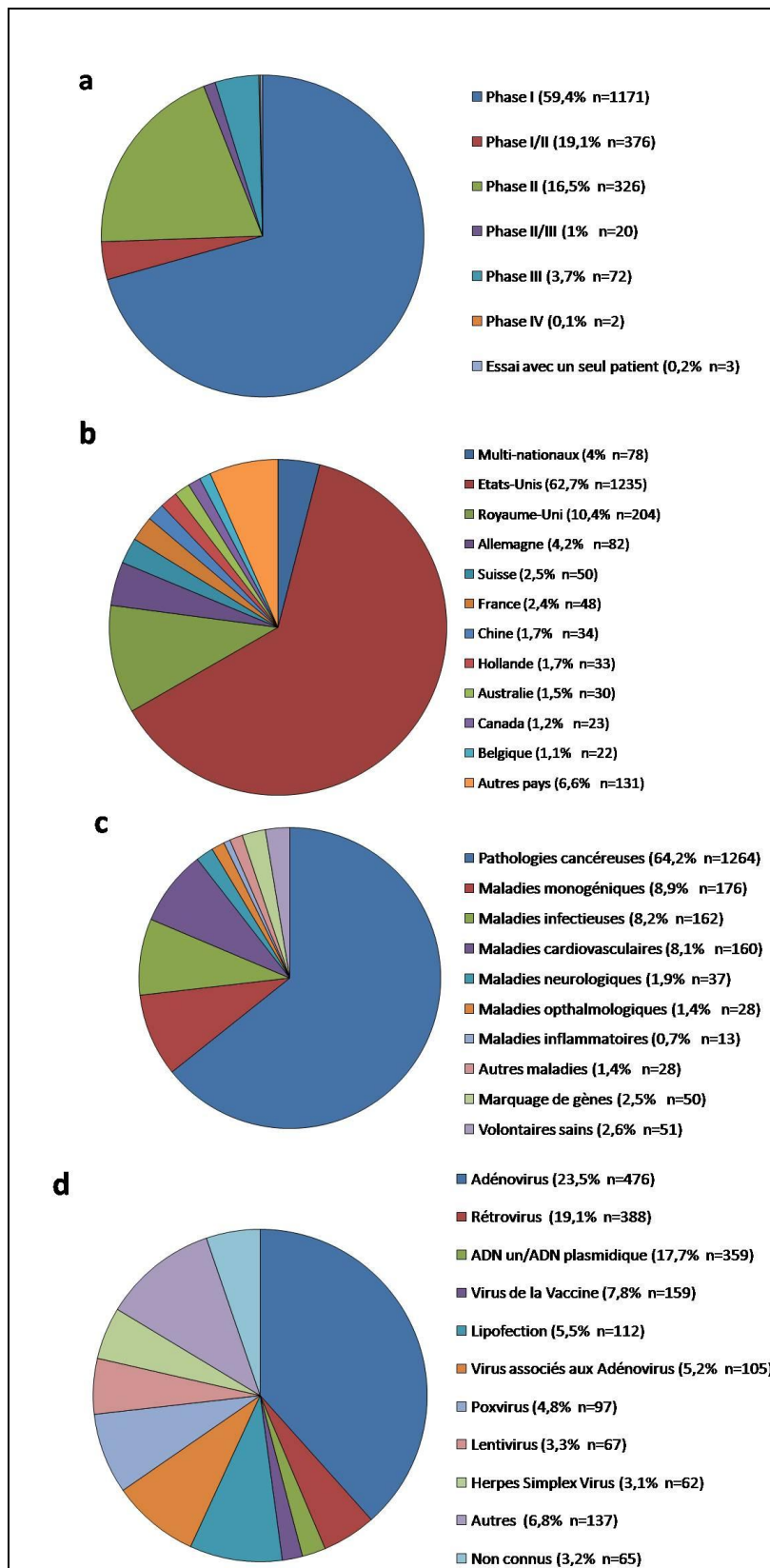


Figure 11 : Caractéristiques des essais cliniques de thérapie génique jusqu'à nos jours.

(a) Phases des essais, (b) localisation des essais, (c) indications (d) vecteurs utilisés D'après. ("Gene Therapy Clinical Trials Worldwide"; Ginn *et al.*, 2013)

## **I-5.1 Des essais cliniques de thérapie génique aux autorisations de mise sur le marché**

Des exemples d'essais cliniques réalisés avec des vecteurs lentiviraux et des AAVr seront décrits dans ce paragraphe avant d'évoquer les premières autorisations de mise sur le marché (AMM) obtenues en thérapie génique.

### **Essais cliniques de thérapie génique avec des vecteurs lentiviraux**

Les vecteurs lentiviraux sont utilisés dans environ 3 % des essais cliniques de thérapie (figure 11) génique ("Gene Therapy Clinical Trials Worldwide"; Ginn *et al.*, 2013). Ils ont été principalement utilisés dans des applications *ex vivo*, permettant un ciblage de la population de cellules à traiter ainsi que la limitation de la dissémination du vecteur.

Le premier essai clinique de thérapie génique avec des vecteurs lentiviraux a été mis en place en 2001 chez des patients atteints du sida (MacGregor, 2001). Il s'agissait d'un essai de sécurité et d'efficacité d'un vecteur dérivé du VIH-1 vectorisant un ARN antisens ciblant l'ARN viral de la protéine d'enveloppe. Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> autologues ont ainsi été transduits *ex vivo*. Soixante-cinq patients ont été inclus dans les phases I et II des essais de ce médicament.

En 2009, le premier succès concret de thérapie génique pour une maladie génétique rare touchant le cerveau, l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD, OMIM#300100), a ouvert de nouvelles perspectives à l'utilisation des vecteurs lentiviraux dans des protocoles cliniques (Cartier *et al.*, 2012; Cartier and Aubourg, 2010; Cartier *et al.*, 2010, 2009). Cette maladie est caractérisée par une démyélinisation progressive du SNC à cause de mutations du gène ABCD1. Ce gène code une protéine transmembranaire du peroxyosome, l'*Adrenoleucodystrophy Protein* (ALDP), jouant un rôle dans le transport des esters de l'acétylcoenzyme A à très longue chaîne du cytoplasme vers le peroxyosome. La démyélination est due au déficit en ALDP dans les cellules gliales. Certains patients ont été traités avec succès par des greffes de moelle osseuse.

L'essai consiste à apporter le gène ABCD1 *ex vivo* dans des cellules CD34<sup>+</sup> autologues. Les CD34<sup>+</sup> obtenues à partir de cellules mononuclées du sang périphérique ont été transduites à une MOI de 30. Des doses de  $4,6 \times 10^6$  à  $7,2 \times 10^6$  cellules/kg ont été transplantées chez les patients. Deux semaines après transplantation, une reconstitution polyclonale des populations sanguines a été observée. Entre neuf et douze mois après injection, la majeure partie des

fonctions immunitaires avaient été retrouvées en association avec des ponctions de moelle normales. Une restauration de l'expression de l'ALD a été retrouvée dans différentes populations de cellules sanguines : des granulocytes, des monocytes et des lymphocytes B et T. Dans cette étude, il n'y a pas eu de mise en évidence du développement d'un clone majoritaire. Chez les deux patients traités, la progression des lésions de démyélinisation s'est arrêtée entre quatorze et seize mois après l'injection.

La bêta-thalassémie (OMIM#613985) et la drépanocytose (OMIM#603903) sont des maladies dues à des mutations du gène de la bêta-globine. Les premiers résultats d'essais cliniques sont encourageants (Payen *et al.*, 2012; Cavazzana-Calvo *et al.*, 2010; Persons, 2009). L'essai LentiGlobin® (HGB-205) utilise un vecteur lentiviral SIN codant une version mutée du gène de la bêta-globine,  $\beta A-T87Q$ , permettant d'empêcher la formation d'hématies falciformes, pathognomoniques de la drépanocytose. Ce vecteur est utilisé pour la transduction *ex vivo* de cellules CD34+. Une dose de  $3 \times 10^6$  cellules/kg a été injectée aux patients en vingt minutes. Après transduction, 0,6 copie de vecteur par cellules CD34+ a été détectée chez le premier patient. Ce patient, atteint de bêta-thalassémie, a pu s'affranchir des transfusions qui lui étaient nécessaires grâce à la restauration d'une hémoglobémie dans les valeurs usuelles et la restauration de l'expression de la  $\beta$ -globine. Néanmoins, une proportion notable de cellules modifiées, représentant environ 10 % des cellules du sang, présentent une insertion près du gène HMGA-2 (Kaiser, 2009). Cela a conduit à l'activation de ce gène. A ce jour, cet évènement n'est pas associé à une oncogenèse, mais ce paramètre sera évalué grâce au suivi rapproché de ce patient.

La maladie de Wiscott-Aldrich (OMIM#301000) est un déficit immunitaire primaire dû à des mutations du gène WAS. Des vecteurs lentiviraux SIN codant WAS sous le contrôle de son promoteur physiologique ont été développés pour la transduction de progéniteurs CD34+ (Aiuti *et al.*, 2013; Merten *et al.*, 2011; Galy *et al.*, 2008). Les doses de vecteurs ont été choisies pour atteindre 1 à 2 copies de vecteur par cellule après transduction. Une dose de  $11,07 \pm 2,70 \times 10^6$  cellules/kg a été transplantée chez les patients. Trois patients ont été traités : leur nombre de plaquettes a augmenté avec la restauration de cellules de taille normale associée à l'amélioration de leur fonction, comme lors d'un traitement conventionnel de transplantation de moelle osseuse. Ces trois patients présentent une amélioration clinique et une amélioration de la fonction immunitaire. Dans cet essai, la proportion de cellules transduites retrouvée *in vivo* était plus élevée que dans ceux décrits ci-dessus. Cet essai a permis des comparaisons avec un essai similaire réalisé avec des vecteurs oncorétroviraux. Le risque réduit de transformation et une plus grande diversité de sites d'intégration sont

cohérents avec un meilleur niveau de biosécurité lors de l'emploi de vecteurs lentiviraux. Le suivi prolongé des patients permettra de renforcer les données nécessaires pour affiner ces conclusions.

### **Essais cliniques avec des AAVr**

Les vecteurs AAVr ont été utilisés dans de nombreux essais cliniques *in vivo* (High and Aubourg, 2011). Ces vecteurs ont été employés dans environ 5 % des essais cliniques de thérapie génique (figure 11) (Ginn *et al.*, 2013). Les premiers essais de thérapie génique avec des AAVr ont démarré dans le milieu des années 1990 par un protocole de traitement de la mucoviscidose (Aitken *et al.*, 2001).

Un haut niveau de biosécurité est souvent mis en évidence dans les différents essais conduits avec des AAVr, sans pour autant être toujours associé à une efficacité suffisante.

Les AAVr représentent les premiers vecteurs viraux ayant reçu une AMM dans le cadre de la thérapie génique en Europe comme développé dans la suite de ce paragraphe.

Une des maladies pour laquelle les avancées en clinique avec des AAVr ont été conséquentes est l'amaurose congénitale de Leber (OMIM#204100). Il s'agit d'une cécité progressive, due à une dysplasie et/ou une dystrophie rétinienne congénitale précoce monogénique dont la mutation responsable peut se trouver sur l'un des gènes suivants : *AIPL1*, *CRB1*, *CRX*, *GUCY2D*, *RPE65* et *RPGRIP1*. Les essais cliniques ont visé le transfert de gène *in vivo* à l'aide d'AAVr codant RPE65 injectés sous la rétine.

Un essai comportant une escalade de dose (NCT00516477) a été conduit en utilisant une dose faible de  $1,5 \times 10^{10}$  génomes viraux (*viral genome*, vg), une dose intermédiaire de  $4,8 \times 10^{10}$  vg et une dose maximale de  $1,5 \times 10^{11}$  vg (Maguire *et al.*, 2009). Douze patients âgés de huit à quarante-quatre ans ont ainsi été traités. Tous ont présenté une amélioration clinique sur plusieurs critères d'évaluation, d'autant plus marquée que les patients étaient jeunes. Un an et demi après une injection d'AAVr 2 codant le gène RPE65 humain sous la rétine à une dose de  $1,5 \times 10^{10}$  particules virales par œil, les fonctions rétinienne et visuelle des patients ont été améliorées (Simonelli *et al.*, 2010). Dans cet essai, des anticorps neutralisants dirigés contre la capsidite ont été détectés sans mise en évidence d'anticorps dirigés contre le produit du transgène. Sur trois des patients traités au niveau d'un seul œil, il a été possible de réaliser une seconde injection plus tardive de  $1,5 \times 10^{11}$  vg du même sérotype d'AAV dans l'œil non traité, sans effet délétère et avec une bonne efficacité (Bennett *et al.*, 2012).

Un essai de phase I/II utilisant un vecteur AAVr-2/4.hrpe65 est également en cours au CHU de Nantes (“Site web du CHU de Nantes - ophtalmologie - études cliniques - essai de thérapie génique dans l’amaurose congénitale de Leber (RPE65)”).

La maladie de Parkinson, maladie neurodégénérative affectant le SNC, a été traitée avec succès dans des essais reposant sur l’utilisation d’AAVr codant le gène humain de la décarboxylase de l’acide L-aminé aromatique (ADCC), enzyme impliquée dans la synthèse de la dopamine, ou le gène de la décarboxylase de l’acide glutamique (GAD) aidant à la synthèse de l’acide gamma-aminobutyrique (GABA) injecté en région sous-thalamique.

Des AAVr codant GAD65 et 67, au ratio 1:1, ont été utilisés aux doses de  $1 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$  et  $1 \times 10^{12}$  vg/mL dilués dans 45uL (NCT00195143) (Kapfitt *et al.*, 2007). Dix des douze patients traités ont montré une amélioration du score *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS), utilisé pour évaluer l’évolution de la maladie, sans apparition d’évènements indésirables. Cette même équipe a ensuite traité vingt-deux patients (NCT00643890) dans une étude d’efficacité : une amélioration de ce score a également été mise en évidence, démontrant ainsi le potentiel thérapeutique de ces approches (LeWitt *et al.*, 2011).

De façon complémentaire, l’essai AAV2-CMV-hADCC (NCT00229736) a permis l’amélioration du score UPDRS chez les patients traités avec des doses de  $9 \times 10^{10}$  et  $3 \times 10^{11}$  vg. Quelques évènements indésirables ont été relevés, mais sans lien direct avec le produit thérapeutique.

Des essais cliniques concernant les hémophilies seront évoqués en partie III.

Ces différents exemples d’avancées dans les essais cliniques démontrent l’intérêt de l’utilisation des vecteurs LV et des AAVr, *ex vivo* et *in vivo* respectivement, pour le traitement d’un grand nombre de maladies par thérapie génique. Ils ont également permis la mise en évidence de certaines limites et des optimisations nécessaires aux futures avancées comme discuté ci-dessous.

## Premières autorisation de mise sur le marché en thérapie génique

Les phases cliniques I et II constituent la majorité des essais (figure 11). De rares produits de thérapie génique sont tout de même entrés dans le parcours d'évaluation pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Les pionniers dans ces étapes ont essuyé des refus de la part des autorités. Ainsi, Advexin, un adénovirus codant p53 pour le traitement de cancers de la tête et du cou, Cerepro, un adénovirus codant le gène de la thymidine kinase de l'herpes simplex virus pour le traitement de cancers et du syndrome de Li-Fraumeni, ou TNFerade, un adénovirus codant le TNF $\alpha$  pour des cancers avancés du pancréas, n'ont pas été approuvés et les sociétés responsables de leur développement ont été mises en difficulté ("European Medicines Agency - Human medicines - Cerepro", "Introgen files for bankruptcy, sees exit in 2009"2008, "Latest Gene Therapy Disapproval Points to Confusion over Regulatory Setup").

Le 16 octobre 2003, le premier produit de thérapie génique à recevoir une AMM a été commercialisé en Chine. Il s'agit d'un vecteur adénoviral de type V codant le gène suppresseur de tumeur p53 (Tazawa *et al.*, 2013; Shi and Zheng, 2009; Wilson, 2005). Ce produit appelé Gendicine est commercialisé par l'entreprise Shenzhen SiBiono Gentech Co. Ltd. pour une application dans le traitement des carcinomes squameux de la tête et du cou. Il a été approuvé par la *China State Food and Drug Administration* (SFDA). Son approbation sans phase III a été à l'origine de nombreuses discussions sur la preuve de son efficacité ("Gene dreams troubled by market realities").

Deux années plus tard, la Chine approuvait un nouveau produit de thérapie génique, Oncorine, commercialisé par Sunway Biotech Co. Ltd. (Shi and Zheng, 2009; Rätty *et al.*, 2008). Il est indiqué pour le traitement des cancers nasopharyngés de dernier stade réfractaires aux thérapies conventionnelles, en association avec la chimiothérapie. Il s'agit d'un adénovirus à répllication conditionnelle contenant une délétion l'empêchant de se fixer à la protéine p53 sauvage. Sa répllication ne peut avoir lieu que dans des cellules déficientes en p53, soit des cellules tumorales, dont elle entraîne la lyse.

En 2012 le premier médicament de thérapie génique approuvé par l'agence européenne du médicament (*European Medicine Agency*, EMA) a été mis sur le marché. Il s'agit du produit Glybera, commercialisé par Uniqure. C'est un AAVr 1 codant l'apolipoprotéine pour le traitement du déficit en lipoprotéine lipase (OMIM#609708) après administration par voie intra-musculaire ("European Medicines Agency - News and Events - European Medicines Agency recommends first gene therapy for approval"; Gaudet *et al.*, 2012; Miller, 2012). Les

premières demandes d'évaluation de ce produit ont été faites en 2010. Plusieurs refus émanant des autorités compétentes ont été émis : ce n'est qu'au prix de réévaluations et de la restriction de l'indication à des patients présentant des épisodes de pancréatites sévères et/ou multiples que l'AMM a été obtenue ("European Medicines Agency - News and Events - European Medicines Agency recommends first gene therapy for approval", "Latest Gene Therapy Disapproval Points to Confusion over Regulatory Setup").

Ces premières obtentions d'AMM de produits de thérapie génique ont été à l'origine de nombreux débats sur leur évaluation (Jazwa *et al.*, 2013; Melchiorri *et al.*, 2013; Wilson, 2005; Ylä-Herttuala, 2012a, 2012b). Nul doute cependant que cela ouvre la voie à de prochaines AMM et que cela favorise un meilleur système d'évaluation compatible avec les règles fondamentales de la mise sur le marché de nouveaux médicaments. Les produits de thérapie génique resteront encore longtemps en dehors de l'arsenal pharmaceutique classique, mais de plus en plus de compagnies industrielles investissent dans de futurs produits de ce type, notamment pour le traitement de cancers, représentant l'indication majoritaire des essais de thérapie génique (figure 11). Le faible nombre de patients disponibles par définition pour les essais concernant les maladies rares est un frein à l'avancée vers des AMM. Néanmoins, les institutions essayent de mutualiser leurs moyens, ce qui se traduit notamment par des essais cliniques internationaux (figure 11) permettant de rassembler plus de patients et plus de preuves de l'efficacité et de la sécurité de ces produits (Tremblay *et al.*, 2013).

Les questions de biosécurité et d'efficacité représentent aujourd'hui les enjeux majeurs du développement clinique de la thérapie génique. Les paragraphes suivants insistent sur ces aspects en évoquant certains axes d'amélioration.

### **I-5.2.1 Risques liés aux formes compétentes pour la réplication**

Les vecteurs viraux étant issus d'agents infectieux potentiellement pathogènes, il existe un risque d'apparition de nouvelles entités pathogènes lié à leur utilisation.

Par exemple, un vecteur lentiviral pourrait théoriquement donner lieu à une nouvelle particule virale compétente pour la réplication par recombinaison avec des séquences rétrovirales intégrées dans le génome, ou avec des virus dans les systèmes de production ou les cellules hôtes.

Une étude sur des primates a montré qu'une contamination par des particules compétentes pour la réplication pouvait entraîner des lymphomes même s'il s'agissait de virus murins



(Donahue *et al.*, 1992). Les tumeurs contenaient des génomes de virus compétents pour la réplication, mais pas de génome du vecteur. Ces risques ont fait augmenter les niveaux d'exigence pour les essais cliniques et la production de vecteurs recombinants. Ces formes compétentes sont systématiquement recherchées dans les essais cliniques et les dernières générations de vecteurs réduisent le risque de leur apparition.

### **I-5.2.2 Eviter les réponses immunitaires**

Une réponse immunitaire (RI) dirigée contre le produit du transgène ou le vecteur peut se mettre en place : cela réduit voire annule les effets thérapeutiques par l'élimination des cellules transduites ou du produit du transgène (Annoni *et al.*, 2013; Mingozzi and High, 2013; Zaiss and Muruve, 2008; Follenzi *et al.*, 2007). Ces RIs peuvent être humorales ou cellulaires et médiées respectivement par des anticorps ou des lymphocytes T cytotoxiques.

Un essai clinique de phase I pour traiter le déficit en ornithine-transcarbamylase (OTC) (OMIM#311250) a été réalisé chez dix-huit patients injectés avec des vecteurs Ad ne comportant pas les gènes E1 et E4, à des doses allant de  $2 \times 10^9$  à  $6 \times 10^{11}$  particules virales (pv)/kg. Des signes de fièvre ont été observés chez tous les patients ainsi qu'une élévation des transaminases hépatiques chez certains. Un jeune patient, traité avec la plus haute dose, est décédé dans les heures suivant l'injection (Raper *et al.*, 2003). L'équipe qui a dirigé cet essai a émis l'hypothèse d'une RI contre la capsidite ou d'une sensibilité accrue de ce patient puisqu'une patiente injectée avec la même dose n'a pas montré de réaction inflammatoire si importante. Il pourrait s'agir d'une prédisposition génétique ou d'une mémoire immunologique plus développée : ce patient avait en effet plus d'anticorps neutralisants que la patiente. Cela a hâté l'arrêt de cet essai et d'autres essais en cours avec des vecteurs Ad et le développement de nouveaux AdR en supprimant plus de gènes viraux jusqu'à obtenir des vecteurs dits "*helper dependent*" ou "*gutless*" (Józkowicz and Dulak, 2005). Cet événement a également favorisé l'étude des RIs en thérapie génique.

Les modèles animaux étudiés ont souvent montré une RI contre le produit du transgène s'opposant à une efficacité médicale durable (Follenzi *et al.*, 2007; J Seppen *et al.*, 2006). Le produit du transgène peut lui-même être neutralisé s'il est circulant. Les cellules l'exprimant peuvent être détruites si elles le présentent à leur surface ou via la présentation croisée par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Une RI peut également se mettre en place contre le vecteur. Par exemple, une partie de la population ayant déjà été en contact avec certains sérotypes d'AAV présente des anticorps

dirigés contre leur capsid (Vandenberghe *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2008; Scallan *et al.*, 2006). Cela a été mis en évidence dans des modèles animaux et des essais cliniques, contribuant aujourd'hui à une meilleure définition des critères d'inclusion (Nathwani *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010b, 2010a; Manno *et al.*, 2006). Il est donc nécessaire de vérifier l'absence d'anticorps anti-capsid avant d'utiliser un sérotype donné. Cet inconvénient a notamment été mis en évidence lors d'un essai pour traiter l'hémophilie avec un AAVr 2 : cela a favorisé le développement de nouveaux sérotypes (Manno *et al.*, 2006).

Les particules lentivirales sont peu immunogènes en elles-mêmes, contrairement aux particules adénovirales. Cependant, elles peuvent transduire les CPA et sont ainsi de bons vecteurs d'immunisation développés en vaccinologie (B. Hu *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010). Dans une étude de thérapie génique du foie, une RI contre le produit du transgène a été observée malgré l'utilisation d'un vecteur LV contenant un promoteur hépato-spécifique (Matsui *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2006).

Des protéines du sérum peuvent inhiber la transduction de vecteurs LV ou d'AAVr (Trobridge *et al.*, 2010; Sandrin *et al.*, 2002; DePolo *et al.*, 2000). On peut considérer ce phénomène comme une RI innée. Le ciblage par pseudotypage permet de pallier ces inconvénients.

Des stratégies ont été mises au point pour limiter les RIs : quelques exemples sont décrits ci-dessous.

Les tableaux 4A et B présentent de façon plus développée des stratégies pour pallier les RIs lors d'utilisation d'AAVr.

Certains organes et certaines voies d'injections sont réputés pour être tolérogènes. Ainsi, le foie est souvent décrit comme capable d'induire une tolérance contre le produit d'un transgène exprimé dans les hépatocytes (Herzog, 2010; Somanathan *et al.*, 2010; Breous *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2009; Martino *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Herzog, 2005). Cette particularité sera développée en partie III : elle constitue un avantage essentiel pour l'application de la thérapie génique aux maladies du foie.

D'autres organes comme le cerveau ou l'œil ne sont que très rarement les sièges de RI : ils sont considérés comme des organes immunoprivilégiés.

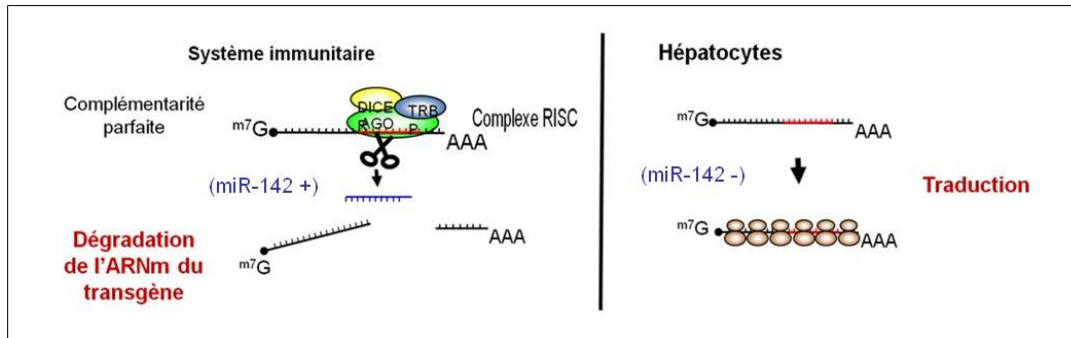


Figure 12 : Utilisation du miR-142 pour limiter la RI contre le produit du transgène.

De manière analogue au ciblage, il est possible de “décibler” l’expression du transgène dans des cellules qui pourraient être à l’origine d’effets délétères.

Pour éviter une RI conduisant à l’élimination des hépatocytes transduits, un vecteur contenant, en aval de la cassette d’expression, des séquences cibles du miR-142-3p, spécifiquement exprimé dans la lignée hématopoïétique, a été utilisé pour réprimer l’expression des transgènes dans les CPA (figure 12). Lorsqu’une cellule de cette lignée est transduite, s’il y a transcription du vecteur, son ARNm est dégradé par interférence à ARN suite à la fixation du miR-142 3p sur ses cibles. En dehors de cette lignée, comme dans les hépatocytes, l’ARNm est traduit : le transgène peut être exprimé. Cette stratégie a permis de réprimer une RI contre le produit du transgène et d’obtenir une expression à long terme chez la souris, dans un modèle d’hémophilie B (Matsui *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2006). Elle a également permis la guérison à long terme du modèle du rat Gunn de la maladie de CNI lors d’un traitement avec des vecteurs LV (Gonzalez-Aseguinolaza and Prieto, 2010; Schmitt *et al.*, 2010b). Ce modèle animal est utilisé dans la stratégie de réparation génique *in vivo* de ce projet de thèse, il sera présenté en détail en partie III-2.3.

A

Stratégie	Avantages	Inconvénients
Inclusion de sujets avec peu ou pas d'anticorps neutralisants anti-capside	A permis une bonne efficacité de transfert de gène.	Faible sensibilité des tests de détection de ces anticorps. Plus de 50 % de la population développe des anticorps anti-AAV après l'âge de 3 ans.
Utiliser des fortes doses de vecteur	Stratégie simple qui peut être efficace si les titres en anticorps neutralisants sont faibles.	Peut favoriser une réponse cytotoxique contre la capsid. De faibles titres en anticorps peuvent neutraliser des fortes doses de vecteur.
Utiliser des capsides vides comme leurre	Permet de shunter efficacement les anticorps anti-AAV. Pas de nécessité d'utilisation d'autre médicament. Les capsides vides sont facilement obtenues comme co-produits lors de la production d'AAVr.	Augmente la charge en antigènes : pourrait favoriser une réponse cytotoxique contre la capsid
Utiliser un traitement immunosuppresseur	Disponibilité de médicaments ciblant les lymphocytes B avec AMM. Cette approche a déjà montré son efficacité.	Risques associés aux traitements immunosuppresseurs. Risques associés aux blocages de réponses impliquant des lymphocytes T régulateurs. De nombreux immunosuppresseurs sont inefficaces dans les modèles animaux de transfert de gènes : difficulté à mettre en place un modèle préclinique. Inefficace pour éradiquer des anticorps neutralisants préexistants.
Changer de sérotype d'AAVr ou créer des capsides résistantes aux anticorps neutralisants	Cette approche a montré son efficacité dans quelques exemples.	Cela peut changer le tropisme du vecteur. Les anticorps neutralisants conduisent souvent à des réactions croisées entre sérotypes.
Plasmaphérèses répétées pour adsorber les anticorps existants et réduire leur titre	Pas de nécessité d'immunosuppression. Diminue efficacement le titre en anticorps.	Plusieurs plasmaphérèses sont nécessaires pour une bonne efficacité. Ne suffit pas pour éradiquer les forts titres en anticorps.
Techniques d'injection pour éviter la recirculation du vecteur dans l'organisme (exemple : utilisation de cathéters à ballon pour isoler l'organe cible et lavage avec un soluté de perfusion pour limiter la dissémination après retrait du cathéter)	Réduit l'exposition au vecteur à l'échelle de l'organisme.	Relativement invasif : nécessité d'évaluer la biosécurité dans les différents organes cibles. Pas envisageable si un transfert de gène systémique est nécessaire : non adaptable à tous les organes.

B

Stratégie	Avantages	Inconvénients
Sélectionner des patients n'ayant pas eu de contact avec des AAV	Permet de shunter la réponse mémoire.	Difficultés de sélectionner de tels patients avec les méthodes disponibles.
Diminution de la dose de vecteur en améliorant leur efficacité ou en utilisant des variants de transgène hyperactif	Cette approche serait faisable et permettrait d'éviter l'élimination des cellules transduites par une réponse cytotoxique.	Non applicable si une très forte dose est nécessaire. Nécessité de développer des variants hyperactifs qui ne sont disponibles que pour peu de transgènes actuellement.
Utilisation de traitements immunosuppresseurs	Les stéroïdes bloquent la réponse T contre les AAVr aux doses testées à ce jour. Les traitements sont inspirés des protocoles utilisés en transplantation : possibilité de traitement sur de longues périodes.	Risques associés à l'utilisation d'immunosuppresseurs. Risques associés au blocage de réponses avec des lymphocytes T régulateurs. De nombreux immunosuppresseurs sont inefficaces dans les modèles animaux de transfert de gène : difficulté à mettre en place un modèle préclinique.
Changer de sérotype d'AAVr ou créer des capsides sans épitope présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I	Théoriquement envisageable.	Risque de réactions croisées entre les différents sérotypes. Le tropisme du vecteur peut être modifié. La présence d'épitopes sous-dominants non décrits reste un obstacle à cette approche.
Utilisation d'inhibiteurs de protéasome ou de versions mutées de capsides résistant à l'ubiquitination	Les deux stratégies réduisent efficacement la présentation d'antigènes de capsid par le CMH de classe I.	L'effet peut être partiel : nécessité d'ajouter un traitement pharmacologique complémentaire.

Tableau 4 : Stratégies à mettre en place pour éviter une réponse immunitaire humorale (A) ou cytotoxique (B) lors d'utilisation d'AAVr. D'après (Mingozzi and High, 2013).

### I-5.2.3 Ciblage et réduction de la dissémination

L'évolution des méthodes d'injection permet d'améliorer l'efficacité thérapeutique et de réduire les conséquences d'une dissémination du vecteur dans l'organisme. Cela permet de mieux cibler les cellules à traiter, de diminuer la dose de vecteur et de réduire ainsi les effets secondaires potentiels.

Par exemple, une injection d'AAVr loco-régionale dans un membre isolé pour atteindre le muscle a permis d'éviter une RI, contrairement à une injection par voie intra-musculaire (Toromanoff *et al.*, 2010).

Une étude avec injection de vecteur rétroviraux en foie isolé a permis d'augmenter la durée d'expression du transgène avec une moindre détection d'anticorps dirigés contre le produit du transgène par rapport à une injection par voie périphérique (Podevin *et al.*, 2002).

Le ciblage d'un vecteur vers un type cellulaire donné par pseudotypage, grâce à des promoteurs ou des éléments de régulation de la transcription spécifiques d'un tissu, et le déciblage de la transduction des cellules du système immunitaire sont des clés de l'amélioration de l'efficacité et de la sécurité des protocoles de thérapie génique.

Le ciblage du foie peut être amélioré par l'utilisation de promoteurs foie-spécifiques. Ainsi, le promoteur de l'albumine (Follenzi *et al.*, 2004), les promoteurs synthétiques ET (Brown *et al.*, 2007), LP1 (Nathwani *et al.*, 2007) et mTTR associé à des facteurs de transcriptions (Schmitt *et al.*, 2010b), le promoteur de l'apolipoprotéine AII humaine (Dagher *et al.*, 2009) et le promoteur de l' A1AT (Duan *et al.*, 2007) ont été efficacement utilisés dans ce but.

Afin de limiter l'internalisation des vecteurs par les cellules de Kupffer, des modifications de l'enveloppe ou de la capsid ont permis d'augmenter la transduction des hépatocytes (van Dijk *et al.*, 2013; Markusic *et al.*, 2009). En utilisant l'acide polyinosinique, interagissant avec le récepteur SR-A des cellules de Kupffer, il a été possible d'inhiber l'internalisation des scAAV8 *in vitro* et chez le rat Gunn *in vivo*.

En utilisant un vecteur LV pseudotypé avec la protéine d'enveloppe hépatospécifique du virus de Sendai et la protéine GP64 avec ou sans peptide signal, il a été possible de réduire la transduction des cellules non parenchymales dont les macrophages représentent la population majoritairement transduite.

L'utilisation conjointe de ces différentes stratégies permet d'obtenir des effets synergiques. En effet, dans un modèle murin d'hémophilie A avec transfert du FVIII par un vecteur LV, seule l'association du miR142-3p à un pseudotypage avec la protéine d'enveloppe GP64, l'utilisation d'un promoteur foie spécifique et une déplétion en

macrophages ont pu conduire à une expression spécifique dans le foie à long terme (Matsui *et al.*, 2011).

Seule la thérapie génique somatique est autorisée ; pour des raisons éthiques, il est interdit de modifier des cellules germinale en raison du risque de transmission à la descendance d'une modification génétique induite artificiellement (Harrison, 2001; *LOI no 94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain*, 1994). La dissémination du produit de thérapie génique dans les cellules germinales est contrôlée aux étapes précliniques et cliniques. Une contamination du sperme par des AAVr a été démontrée chez le lapin (Favaro *et al.*, 2011, 2009; Schuettrumpf *et al.*, 2006). Néanmoins, seule une purification des cellules germinales permet de valider leur transduction comme cela a été fait chez des primates. La purification des ovocytes a prouvé qu'ils ne correspondaient pas au type cellulaire transduit dans le tissu ovarien (Mattar *et al.*, 2011). Lors d'un essai clinique chez des patients hémophiles, du génome d'AAVr a été retrouvé dans le sperme jusqu'à quatre mois après injection (Manno *et al.*, 2006).

#### **I-5.2.4 Vers une meilleure gestion de l'intégration et une diminution du risque de mutagenèse insertionnelle**

Certains patients SCIDX1 dans l'essai clinique des Professeurs A. Fischer et M. Cavazzana-Calvo ont développé une leucémie dont la cause a été attribuée à l'insertion du vecteur oncorétroviral près d'oncogènes et à la présence de LTRs dans le vecteur. On qualifie cet événement de mutagenèse insertionnelle. Dans cet essai, cinq cas de leucémies ont été observés notamment à cause de l'activation du gène LMO2 par les LTRs (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008; Davé *et al.*, 2004; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Cet essai représente à la fois un succès essentiel en thérapie génique et un avertissement en matière de biosécurité. Il a permis de développer de nombreux outils d'évaluation de la génotoxicité et d'augmenter le niveau d'exigence en termes de données de biosécurité à fournir dès les étapes précliniques. Par la suite, d'autres essais ont été conduits avec des vecteurs rétroviraux de nouvelles générations avec succès, notamment dans le traitement de patients ADA-SCID (Aiuti *et al.*, 2013).

Chez deux patients atteints de granulomatose chronique, des insertions proches des oncogènes EVI1-MDS1, PRDEM16 et SETBP1 ont été responsables de syndromes myélodysplasiques entraînant un décès par sepsis d'un patient et une greffe de moelle chez le second (Stein *et al.*, 2010; Ott *et al.*, 2006) .

Une expansion clonale de sous-populations transduites a été mise en évidence dans d'autres essais. Néanmoins, comme cela a été décrit dans des modèles de gros animaux, cela n'est pas toujours lié à une génotoxicité (Trobridge, 2011). Cela suggère une influence du contexte pathologique sur les conséquences de l'intégration.

Une étude sur des biopsies de patients injectés avec le Glybera a décrit des sites d'intégration des AAVr (Kaeppl *et al.*, 2013). Des intégrations aléatoires dans le noyau et au niveau de points chauds dans le génome mitochondrial ont été mis en évidence. Il n'y a pas eu d'effet délétère associé connu à ce jour, mais l'originalité de la découverte d'intégration dans des sites préférentiels du génome mitochondrial souligne l'importance de ce type d'étude dès les étapes précliniques.

Afin de réduire les risques d'activation de gènes voisins du site d'insertion, de nouveaux vecteurs ont été développés tels que les vecteurs SIN (Zychlinski *et al.*, 2008). L'ajout de séquences insultrices, isolant les séquences exogènes du génome hôte, permet également de réduire les effets du vecteur sur son environnement (Groth *et al.*, 2013; Koldej *et al.*, 2013; Uchida *et al.*, 2013).

De nombreuses équipes ont orienté leurs efforts pour améliorer le ciblage ainsi que le contrôle de l'intégration du transgène.

En effet, il semblerait avantageux de pouvoir contrôler les effets délétères potentiels d'une intégration du vecteur en ciblant la région du génome où elle a lieu, avec des outils comme les ZFNs ou les méganucléases (Carroll, 2008; Rahman *et al.*, 2011).

La stratégie opposée consiste à créer des outils pour empêcher l'intégration. C'est pourquoi de nouvelles générations de vecteurs, comme les IDLVs, ont été mises au point pour éviter l'intégration tout en conservant un effet thérapeutique (Banasik and McCray, 2010; Sarkis *et al.*, 2008; Wanisch and Yáñez-Muñoz, 2009; Yáñez-Muñoz *et al.*, 2006). De même, les AAVr sont souvent utilisés pour cette raison. Comme décrit dans les paragraphes sur ces vecteurs, l'utilisation de ces formes épisomales est limitée à certaines applications.

Les approches de thérapie génique ciblée, visant le contrôle de l'insertion du transgène font l'objet du travail de thèse présenté dans ce manuscrit. Le développement de ces approches s'inscrit dans les objectifs de l'augmentation de la biosécurité par le contrôle des risques liés à l'insertion, et de l'amélioration de l'efficacité notamment en augmentant la spécificité des stratégies de thérapie génique.

## **II- La thérapie génique ciblée : de nouvelles stratégies pour modifier le génome à façon**

La thérapie génique ciblée désigne l'ensemble des stratégies destinées à modifier de façon précise un endroit unique du génome, désigné comme cible. Elle s'oppose par exemple à la thérapie génique d'addition où le vecteur persiste sous la forme d'un épisode ou d'un provirus intégré de façon aléatoire (Hendrie and Russell, 2005).

L'intégration ciblée du transgène thérapeutique présente différents avantages :

- la correction obtenue peut être plus précise en ciblant la région mutée que par transfert de gène classique,
- la correction est permanente, que les cellules soient quiescentes ou en division, et peut aboutir à l'élimination de la mutation pour la réparation génique,
- ces approches sont applicables aux maladies dominantes et récessives,
- seule une courte région, dite thérapeutique, et des bras d'homologie sont à vectoriser pour la réparation génique ; cela limite la taille du matériel génétique à transporter et élargit ainsi l'éventail des vecteurs utilisables. Néanmoins, cela est à nuancer lorsqu'il est également nécessaire de transférer un gène codant une enzyme.

La thérapie génique ciblée présente également des avantages en matière de biosécurité (Lombardo *et al.*, 2011; Pessach and Notarangelo, 2011; Lombardo *et al.*, 2007). En effet, le contrôle de l'intégration dans un site choisi devrait permettre de limiter voire de s'affranchir des risques de mutagenèse insertionnelle. Cependant, l'environnement génomique devra être étudié pour chaque locus choisi. Par exemple, la proximité d'oncogènes ou la "fuite" de l'expression des transgènes et ses conséquences sur des cellules non ciblées doivent être renseignées. De même, il est essentiel de vérifier que seul le locus choisi est modifié.

Grâce au caractère modulable de ces stratégies, il est possible d'envisager une médecine personnalisée. Une maladie peut être causée par différentes mutations ; chacune d'entre elle pourrait être ciblée par un nouvel outil. Cependant, cela reste utopique dans la mesure où chaque patient aurait besoin d'un produit de thérapie génique spécifique avec les efforts et les coûts de développement associés. Il est plus facilement envisageable de cibler une région concernée par plusieurs mutations avec un donneur plus universel, ou un locus non muté du génome dont la modification ne serait que pas ou peu délétère. D'après les différentes études d'édition du génome les loci CCR5 et AAVS1 pourraient correspondre à cette définition de



cible utilisable pour de nombreuses applications (Tay *et al.*, 2013; van Rensburg *et al.*, 2012; Händel and Cathomen, 2011).

## II 1- Approches d'intégration ciblée du transgène

Plusieurs stratégies de modification thérapeutique ciblée du génome ont déjà été envisagées grâce à des outils permettant le ciblage de l'intégration de constructions thérapeutiques tels que les transposons, les intégrases ou les nucléases.

Les transposons sont des éléments géniques sauteurs qui existent dans la nature. Ils sont capables de se déplacer dans le génome par auto-excision et de s'intégrer dans un locus contenant des homologies de séquence avec l'élément mobile (Chaparro and Sabot, 2012; Di Matteo *et al.*, 2012; Staunstrup and Mikkelsen, 2011). La coupure du transposon intégré est réalisée par une transposase. Les systèmes *PiggyBac* (PB), *SleepingBeauty* (SB) et Tol2 sont les transposons les plus utilisés. Ils permettent de réaliser des intégrations localisées avec un effet prolongé sans utilisation de vecteurs viraux (Grabundzija *et al.*, 2010). Les systèmes PB et SB sont plus efficaces que Tol2, probablement en raison de la moindre quantité de cibles de ce dernier. Par exemple, une version de SB hyperactive, SB100x a permis une expression physiologique de FIX *in vivo* chez des souris hémophiles pendant plus d'un an (Mátés *et al.*, 2009). Pour améliorer le ciblage de l'intégration, le transposon SB a été couplé à des ZFs pour choisir le locus d'intégration dans les sites LINE1, fréquents dans le génome (Voigt *et al.*, 2012). Ainsi, 45 % des intégrations sont redirigées vers ces cibles. Par de tels couplages, il est théoriquement possible de réaliser l'intégration au niveau de toute cible potentielle de ZFs.

Des intégrases permettent l'intégration contrôlée d'un transgène, plutôt que celui-ci ne soit conservé sous une forme épisomale diluée lors des divisions des cellules transduites, ou intégré dans une région sensible du génome. Les intégrases orientent l'intégration vers leurs cibles préférentielles. Par exemple, l'intégrase phiC31 est une recombinase de phage qui réalise une recombinaison entre une construction contenant des sites *attB* et des pseudo-sites *attP* se trouvant dans le génome, notamment dans les cellules humaines. Elle a ainsi été efficacement utilisée *in vivo* et sans vecteur viral dans des modèles de tyrosinémie, d'épidermolyse bulleuse ou d'hémophilie (Held *et al.*, 2005; Ortiz-Urda *et al.*, 2003; Olivares *et al.*, 2002). Des effets délétères sont observés lorsqu'une dose trop élevée est employée (Liu *et al.*, 2006; Held *et al.*, 2005). Avec ce type d'outils, l'intégration n'a pas lieu en un site unique du génome : elle peut avoir lieu au niveau de toute séquence pseudo-attP.

Des ZF-recombinases ont été créées en associant des ZFs et des sérines recombinases (Gaj *et al.*, 2013; Gersbach *et al.*, 2011; Gordley *et al.*, 2009; Prorocic *et al.*, 2011; Proudfoot *et al.*, 2011). Elles permettent de diriger l'intégration ciblée par les recombinases vers des cibles de ZFs proches de cibles de la partie catalytique des recombinases. En effet, en ne gardant que le domaine catalytique de ces enzymes, une spécificité de substrat partielle persiste.

Comme indiqué en I-1.3, il est possible d'utiliser une intégration ciblée par RH mais la fréquence de ces événements reste limitée. L'alternative consiste à utiliser des nucléases artificielles pour une insertion ciblée en favorisant la RH si le donneur comporte des bras d'homologie ou la NHEJ. Ce type d'approche, qui fait l'objet du travail de recherche de cette thèse sera développé en détail dans la suite de cette partie.

## **II-2 Utilisation de la réparation des cassures double brin de l'ADN pour des applications thérapeutiques**

Les lésions de l'ADN peuvent être générées par différents agents tels que des agents chimiques (tabac, radicaux libres dérivés de l'oxygène) ou physiques (rayons UV, radioactivité).

Les lésions peuvent être de plusieurs types comme l'introduction d'une base uracile, l'absence d'une base, l'alkylation, la présence d'adduits ou de dimères de pyrimidines, des pontages intra et inter brins, une CDB, un mésappariement ou la présence d'une méthyl-guanosine. Certaines lésions ne modifient que la structure chimique de l'hélice d'ADN sans la déformer, tandis que des lésions de grande taille sont aussi à l'origine d'une déformation.

Les CDB de l'ADN peuvent être physiologiques, comme lors de la recombinaison V(D)J, de la commutation isotypique et de la méiose (figure 13). Elles contribuent alors à une variabilité génétique : la commutation de classe est responsable de l'amplitude du répertoire immunitaire. Elles peuvent aussi être d'origine accidentelle, lors de la réplication par exemple. Enfin, elles peuvent être dues à des agents exogènes physiques, comme des irradiations, ou des agents chimiques, comme des agents radiomimétiques ou des inhibiteurs de topoisomérases. Les CDB peuvent entraîner des pathologies telles que des cancers. Il est essentiel qu'elles soient réparées pour le bon fonctionnement des cellules. La réparation peut être fidèle et favoriser la conservation de l'intégrité du génome, ou conduire à sa diversification par l'introduction de mutations. Si l'ADN n'est pas réparé, cela peut induire l'apoptose.

On distingue deux principaux mécanismes de réparation des CDB : la RH au sens large (*Homology directed Repair*, HDR), intégrant la RH *stricto sensu* et l'hybridation simple brin (*Single Strand Annealing*, SSA), et la NHEJ (figure 13).

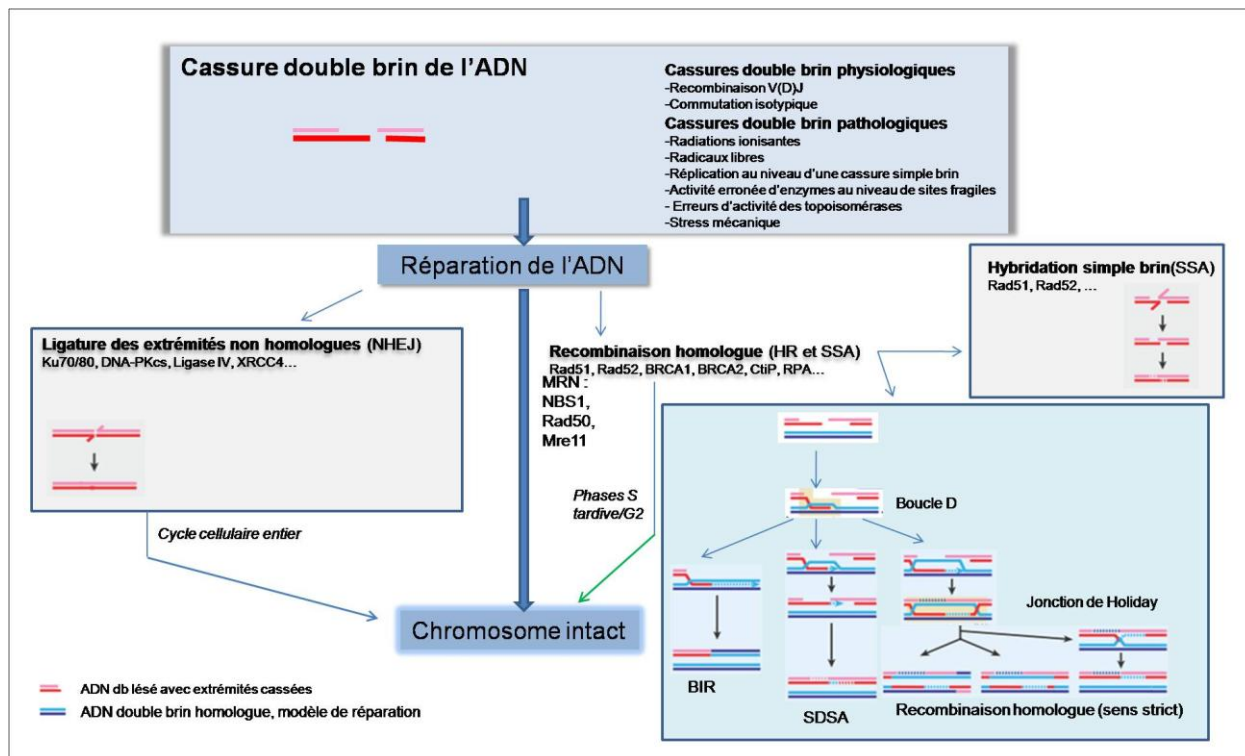


Figure 13 : Les cassures double brin de l'ADN : causes d'apparition et réparation par ligature d'extrémités non homologues (NHEJ) et la réparation basée sur l'homologie (HdR)

D'après (Lieber, 2010) et (Heyer *et al.*, 2010).

## II-2.1 La recombinaison homologue

La recombinaison homologue (RH) intervient dans la réparation des CDB, des télomères incomplets, dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées et pendant la méiose lors de la séparation des chromosomes homologues (San Filippo *et al.*, 2008).

Elle a lieu principalement en phases S et G2 du cycle cellulaire dans les cellules eucaryotes. En effet, elle s'appuie sur une homologie de séquence entre la région endommagée et un substrat qui sert de modèle à la synthèse d'ADN essentielle à la réparation de la lésion. En phases S et G2, la chromatide sœur est disponible et peut servir de matrice de réparation. La matrice peut également être un fragment d'ADN exogène s'il présente un niveau suffisant d'homologie à la zone de coupure. Les protéines nécessaires à la RH sont également exprimées majoritairement pendant ces phases, mais elles peuvent être présentes pendant d'autres phases du cycle comme indiqué dans la suite de ce paragraphe.

La RH est précédée par la détection d'une CDB lors de la mise en place de la réponse aux dommages de l'ADN (*DNA Damage Response*, DDR) qui permet ensuite de mettre en place une voie de réparation. La RH se déroule ensuite en plusieurs étapes (figures 13 et 14). Les

extrémités d'ADN endommagées sont remaniées par des nucléases lors d'une étape de résection qui conduit à la libération d'extrémités 3' sortantes. Puis, des protéines s'accumulent sur l'ADN, en protégeant les extrémités et déclenchent le recrutement des acteurs de la réparation. Après recherche d'homologie, une des extrémités envahit une région homologue : ceci mène à la formation d'un intermédiaire appelé "boucle D". L'activité d'une polymérase conduit alors à l'obtention d'une molécule double-brin. Ensuite, une hybridation se produit entre la boucle D et la seconde extrémité. Ce croisement de brins conduit à la formation d'une structure appelée jonction de Holiday. La RH se termine par la résolution ou par la dissolution de cette jonction qui donne lieu à un produit issu de crossing-over ou non.

La réparation peut aussi avoir lieu sans capture de la seconde extrémité. Dans ce cas, il n'y a pas formation de jonction de Holiday : cela aboutit uniquement à des produits non issus de crossing-over. Ce mécanisme est appelé hybridation de brins dépendante de la synthèse (*Single Strand Dependant annealing, SDSA*) (San Filippo *et al.*, 2008).

Des CDB peuvent survenir au niveau de télomères ou de fourches de réplication, elles ne présentent alors qu'une seule extrémité. Dans ces cas, la réparation par le mécanisme dit de réplication induite par cassure (*break-induced replication, BIR*) a lieu. La seconde extrémité de la boucle D est alors absente. L'hybridation se produit avec la chromatide sœur ou un chromosome homologue, ce qui conduit à une réparation fidèle, ou avec un chromosome non homologue donnant lieu à une translocation non réciproque. Certains événements de BIR peuvent survenir pour réparer des télomères raccourcis ou cassés.

Parfois, une région répétée est présente à proximité du site de cassure. La SSA peut alors avoir lieu par hybridation à cette région, entraînant une perte d'information génétique par délétion (Kass and Jasin, 2010). Ce type de réparation peut avoir lieu si les régions "*direct repeats*" sont distantes de moins de 100 pb ; cette distance influe sur l'efficacité de la réparation (Gouble *et al.*, 2006). La SSA peut ne pas être considérée comme une issue de RH au sens strict, mais elle met néanmoins des mécanismes d'homologie en jeu.

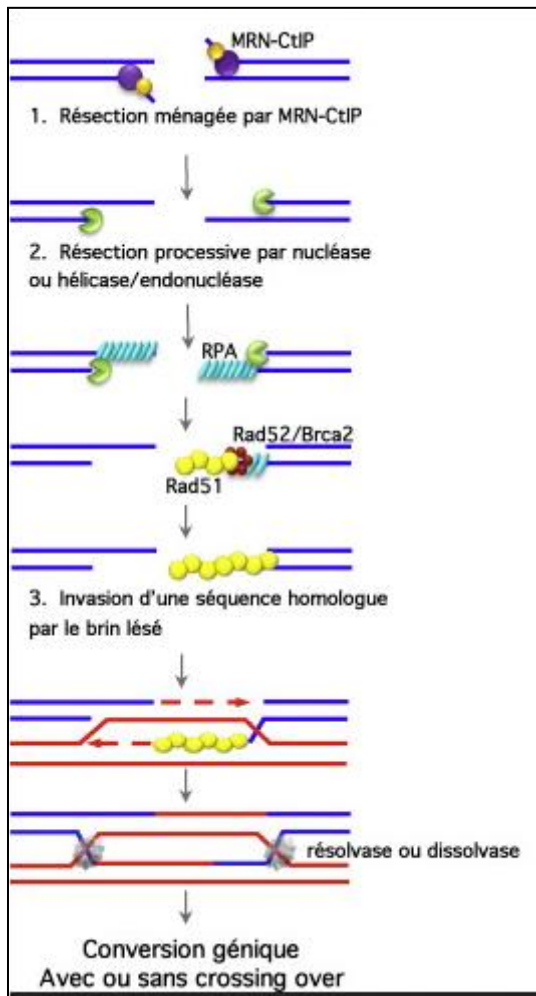


Figure 14 : Réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue.

Tiré de (Rass *et al.*, 2012).

De nombreuses protéines sont impliquées dans la RH (figure 14), seules celles jouant un rôle majeur sont décrites dans la suite de ce paragraphe.

La protéine interagissant avec la protéine CtBP (*Carboxy-terminal binding protein Interacting Protein*, CtIP) est capable d'interagir avec une protéine de régulation du cycle cellulaire, la protéine suppresseur des cancers du sein et des ovaires chez l'homme (BRCA1, *Human breast and ovarian cancer tumor suppressor protein 1*) (You and Bailis, 2010). Elle joue un rôle essentiel dans la réparation de l'ADN, notamment dans le choix entre RH et NHEJ (Yun and Hiom, 2009). Elle est nécessaire

à la résection au niveau des CDB.

La protéine Mre11 détecte les CDB et joue un rôle essentiel dans l'initiation de la résection et donc dans la création d'extrémités sb en interaction avec la CtIP. Favorisant la RH, elle intervient aussi dans la NHEJ (Adelman and Petrini, 2009). Il semblerait que son rôle soit plus important pendant la réplication, voire en G2, où la matrice de réparation est la chromatide sœur. La Mre11 fait partie du complexe MRN, essentiel à la NHEJ et à la RH : il est composé de la Mre11, de la Rad50 et de la Nbs1. Ce complexe intervient dans la reconnaissance des CDB et permet la RH notamment en interagissant avec la BRCA1. L'activité nucléasique 3'-5' du complexe MRN est stimulée par la CtIP. Elle intervient dans l'initiation de la RH et dans des événements infidèles de NHEJ alternative (alt-NHEJ) (voir paragraphe suivant) (Rass 2009, Xie 2009, Buis 2009, Cheng 2009).

La protéine de réplication A (*replication protein A*, RPA), est une protéine qui se lie aux extrémités sb de l'ADN au niveau des CDB. La RPA peut être phosphorylée. Grâce à la pRPA, les structures secondaires au niveau de l'ADN sb sont éliminées : cela permet la fixation de la protéine de Mammifère Rad51.

La Rad51 forme des foyers au niveau des CDB et s'organise sous forme de filaments au niveau des extrémités sb protégées par la pRPA (Heyer *et al.*, 2010). Elle est impliquée dans la recherche d'homologie avec une matrice de réparation, jusqu'à la formation de l'intermédiaire boucle D avec le déclenchement de la synthèse d'ADN, et dans l'invasion du brin d'ADN.

La protéine Rad52 intervient comme médiateur en formant un complexe avec la Rad51 jusqu'à son arrivée sur les extrémités sb (Heyer *et al.*, 2010). La Rad52 peut également jouer un rôle dans la SDSA.

La protéine BRCA1 est une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la RH et la NHEJ. Lorsque l'ADN est endommagé, BRCA1 intervient pour faciliter une réparation fidèle et une stabilité du génome.

La protéine BRCA2, intervient dès la formation du filament composé de la protéine Rad51. Elle possède des domaines de liaison à l'ADN sb et db et interviendrait au niveau de l'ADN db en limite de résection (Heyer *et al.*, 2010).

## II-2.2 Ligature d'extrémités non homologues

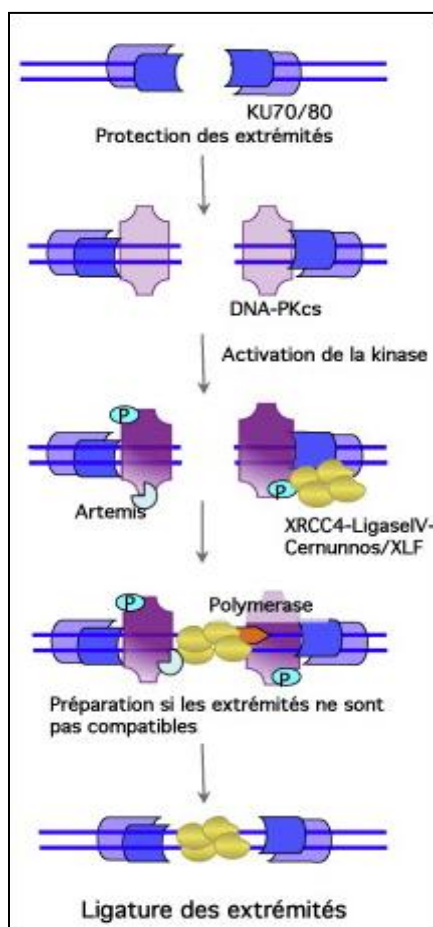


Figure 15: Réparation des cassures double brin de l'ADN par ligature d'extrémités non homologues canonique.

Tiré de (Rass *et al.*, 2012).

La ligature d'extrémités non homologues (NHEJ), peut intervenir quelle que soit la phase du cycle cellulaire pendant laquelle la cassure survient. Elle ne nécessite pas de matrice pour la réparation : seul le recrutement des protéines impliquées sur le lieu de la cassure est essentiel. Comme la RH, elle est précédée de la détection de la CDB. La NHEJ démarre par un remaniement des extrémités (figure 15). La résection est plus courte que celle nécessaire à la RH. Les protéines Ku70 et Ku80 se fixent sur les extrémités : on parle alors du complexe Ku-ADN. Cela permet le recrutement d'autres protéines nécessaires. Ces étapes sont suivies de l'intervention de polymérases et de l'action d'une ligase

qui termine la réparation (Lieber, 2010).

Il existe deux formes de NHEJ : la NHEJ classique (C-NHEJ) et la alt-NHEJ (Bennardo *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2012). La C-NHEJ a lieu en présence du complexe Ku70/80, des DNA-PKcs, de XRCC4 et de la ligase IV. A l'inverse, l'alt-NHEJ est indépendante de ces facteurs et fait le plus souvent apparaître de courtes délétions entre des zones de microhomologie. Il convient donc de préciser que la C-NHEJ est un mécanisme plutôt conservateur, alors que l'alt-NHEJ est mutagène.

### **II-2.3 Choix de la voie de réparation**

On peut considérer que le choix de la voie de réparation des CDB correspond à l'orientation vers la alt ou la C-NHEJ, la RH ou la SSA (Heyer *et al.*, 2010). Les voies de la NHEJ et de la RH ne s'excluent pas. Les mutants KO pour des protéines de la RH et de la NHEJ ont un phénotype plus sévère que des mutants de protéines d'une seule voie. Cela suppose une coopération entre les deux systèmes de réparation, notamment à travers des étapes communes (Kass and Jasin, 2010).

Le choix de la voie de réparation dépend notamment de la phase du cycle pendant laquelle a lieu la cassure, de la nature de la lésion, du type cellulaire et de l'espèce concernés.

De nombreux facteurs impliqués dans la réparation peuvent s'avérer des éléments régulateurs (Brandsma and Gent, 2012; Shibata *et al.*, 2011; Huertas and Jackson, 2009; Shrivastav *et al.*, 2008; Aylon and Kupiec, 2005). Par exemple, contrairement à la RH, la SSA implique la fixation de la Rad52 sur les extrémités sb protégées par la pRPA et est indépendante de la Rad51 : la présence de la Rad51 et/ou la Rad52 est donc un élément de choix entre ces voies (Heyer *et al.*, 2010).

Au-delà du choix entre RH et NHEJ, une orientation de la réparation entre les trois types de RH – SDSA, BIR et HR avec jonction de Holiday – a lieu. Par exemple, la BIR est moins fréquente que la SDSA pendant la mitose car la SDSA est plus rapide à se mettre en place (Heyer *et al.*, 2010). Les produits de ces réparations ont des conséquences différentes sur l'information génétique qui peut ainsi être conservée ou modifiée par délétion.

Pour les applications de KI ou de réparation génique thérapeutique impliquant des bras d'homologie, il est essentiel que les CDB soient réparées par RH avec jonction de Holiday. A l'inverse, pour un KO ou une capture de donneur sans bras d'homologie, il est nécessaire de favoriser la NHEJ.



Dans le paragraphe suivant, seuls quelques exemples liés aux phases du cycle cellulaire et à la résection seront évoqués. Ces éléments de choix entre HR et NHEJ sont séparés pour des raisons de description.

### II-2.3.1. Rôle des phases du cycle cellulaire

Les phases du cycle cellulaire ont une influence majeure sur la régulation de la réparation de l'ADN (figure 16).

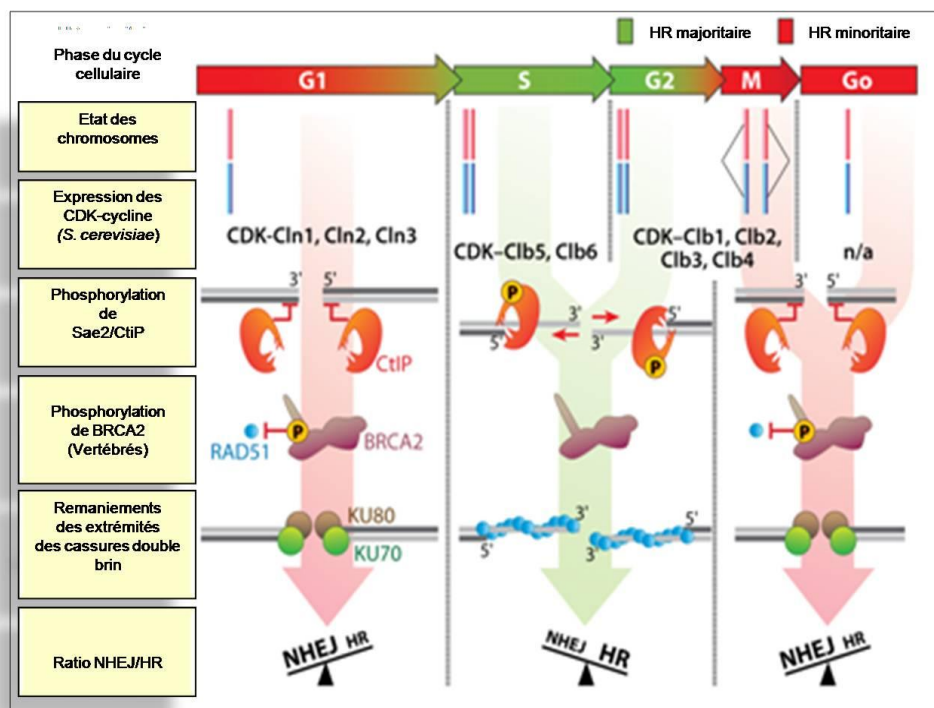


Figure 16 : Choix de la voie de réparation en fonction de la phase du cycle cellulaire  
D'après (Heyer *et al.*, 2010).

La SSA et la NHEJ ne nécessitent qu'une seule molécule d'ADN alors que la RH nécessite la présence d'une seconde molécule qui sert de matrice.

Dans des cellules de Mammifères diploïdes, la NHEJ peut se dérouler pendant toutes les phases du cycle cellulaire.

Au contraire, la nécessité d'ADN matrice suggère que la RH est plutôt restreinte aux phases S tardive et G2, lorsqu'une chromatide sœur est présente. Cependant, il a été démontré que la RH pouvait avoir lieu en phase G1 chez la levure (Fabre, 1978). Seules les espèces diploïdes pourraient réaliser cette réparation en G1 à l'aide du chromosome homologue. Une étude a démontrée que la RH avec des vecteurs AAVr donneurs peut avoir lieu si les cellules

sont bloquées dans le cycle par privation de sérum ou si la synthèse d'ADN est bloquée par l'hydroxyurée. Cependant, cela n'est observé pour ces cellules bloquées dans le cycle qu'à hauteur de 0,15 à 1,1 % du taux observé dans des cellules non bloquées et se divisant donc en culture (Trobridge *et al.*, 2005)

Lorsque la NHEJ est déficiente, les CDB non réparées en phase G1 peuvent être réparées par RH mais seulement lors du passage en phases G2 et S (Parvin *et al.*, 2011).

Le niveau d'expression des cyclines dépendantes des kinases (CdK) intervient également dans le choix de la voie de réparation et l'initiation de la résection. En G1, une faible quantité de CdK inhibe la résection alors que leur activation en phases G2 et S favorise la RH (Heyer *et al.*, 2010).

### II-2.3.2. Rôle de la résection

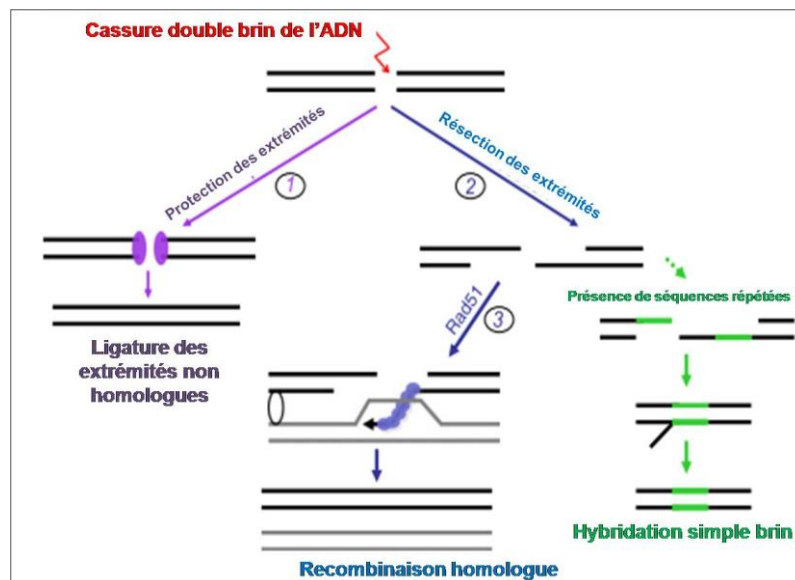


Figure 17 : Influence de la résection dans le choix de la voie de réparation

D'après (Kass and Jasin, 2010).

La résection est nécessaire pour la RH et la SSA qui comprennent une étape avec un intermédiaire d'ADN aux extrémités sb (figure 17) (Heyer *et al.*, 2010). Pour que la RH se mette en place, une résection suffisante est indispensable ; cela empêche l'intervention des acteurs de la NHEJ.

La SSA nécessitant une résection suffisante pour mettre en évidence des régions répétées homologues, la longueur de la résection intervient largement dans le choix entre RH et SSA, de même que le site de la CDB en fonction de la présence ou non de telles régions homologues dans la zone sb qui apparaît après résection.

La résection nécessaire à la génération de l'ADN sb lors de la RH se déroulerait en deux étapes (Grabarz *et al.*, 2012). La Mre11 interviendrait avec CtiP pour réséquer environ 50 à 100 nucléotides (Malkova *et al.*, 2005). La CtiP et le complexe MRN (étude *S. pombe*) sont co-localisés sur environ 200 pb au niveau de la CDB. Grâce à cette association à NBS1, Ctp1 (homologue fonctionnel de CtiP chez la levure), est retenue près du complexe MRN et la résection se limite aux régions proches de la cassure. *In vitro*, la CtiP stimulerait l'activité endonucléasique de la Mre11 sans en stimuler l'activité exonucléasique. La Mre11 a une activité nucléasique 3'-5' et agirait donc plutôt en tant qu'endonucléase dans ce procédé. L'initiation de la résection est suivie de l'activité d'hélicases et de nucléases permettant l'apparition de longues zones d'ADN sb, avec extrémités 3' sortantes, nécessaires à la réparation par RH.

En phases S et G2, la CtiP subit une phosphorylation par les CdK sur la sérine 327 qui favorise sa fixation à la BRCA1 et au complexe MRN (figure 16) (Yun and Hiom, 2009). Cela permet le recrutement de la CtiP sur les sites de cassures et la résection. La CtiP subit une phosphorylation supplémentaire par l'ATM en réponse à la CDB : ceci conduirait à l'inhibition de la transcription de gènes de régulation du cycle cellulaire. La CtiP favorise la signalisation d'un *checkpoint* et l'arrêt du cycle cellulaire par la protéine Chk1. L'interaction avec la Chk1 requiert la présence de la pRPA sur l'ADN sb.

L'élimination de la 53BP1 des cassures en phase S est dépendante de l'action de la BRCA1 en association à la CtiP : cela permet l'initiation de la résection et favorise ainsi la RH.

L'ampleur de la résection est notamment contrôlée par l'association de la BRCA1 et de la RAP80 limitant l'accès des nucléases à l'ADN. Cette association serait plus forte en phase G1 alors que les complexes BRCA1/CtiP et BACH1-BRCA1 prédominent en phases G2 et S (Y. Hu *et al.*, 2011). La résection est plutôt inhibée en phase G1 : ceci favorise la NHEJ. Le complexe Ku70/Ku80 initiateur de la NHEJ inhibe la résection en protégeant les extrémités. Cependant, la résection peut avoir lieu en G1, même si une variabilité entre des lignées cellulaires et des cellules primaires est observée (Yajima *et al.*, 2013).

## **II-3 Favoriser la recombinaison homologue pour une application thérapeutique en induisant des cassures double brin de l'ADN par l'utilisation d'endonucléases artificielles**

La RH spontanée n'a lieu qu'à de faibles fréquences d'environ  $10^{-6}$ . Ainsi, des effets thérapeutiques ne sont envisageables que si le niveau de réparation requis est faible, comme évoqué en II.1. Pour étendre cette stratégie à de nombreuses applications thérapeutiques, la découverte de l'augmentation de la fréquence de RH grâce à des CDB a été capitale (Porteus and Baltimore, 2003; Donoho *et al.*, 1998; Jasin, 1996; Choulika *et al.*, 1995; Rouet *et al.*, 1994a; Jasin and Berg, 1988). Elle a favorisé le développement d'outils capables d'induire une CDB ciblée pour déclencher une réparation de l'ADN par RH. Ces outils que sont les endonucléases artificielles résultent de l'association de deux types de domaines. Elles comportent des domaines de liaison à l'ADN, qui leur confèrent leur spécificité, et un domaine enzymatique catalytique aspécifique responsable de l'induction d'une CDB. Les nucléases présentées ci-dessous sont décrites dans l'ordre chronologique de leur découverte.

### **II-3.1 Les méganucléases**

Les méganucléases (*homing endonucleases*, HO) sont les premières nucléases qui ont été étudiées à partir des années 1980 (Marcaida *et al.*, 2010; Pâques and Duchateau, 2007). Il s'agit à l'état sauvage de protéines capables de réaliser l'auto-excision du gène responsable de leur expression et d'en contrôler l'intégration dans une région présentant des zones d'homologie avec ce gène. Plusieurs centaines de méganucléases ont été décrites depuis leur découverte.

Elles contiennent une partie endonucléasique capable de réaliser une CDB et une région de reconnaissance d'une séquence d'ADN donnée longue de 12 à 40 pb (figure 18).

La méganucléase I-SceI, issue de la famille LAGLIDADG, a été le modèle le plus étudié (Plessis *et al.*, 1992; Jacquier and Dujon, 1985). Elle est issue du génome mitochondrial de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle reconnaît une séquence cible de 18 pb : 5'-TAGGGATAA^CAGGGTAAT-3' et réalise une CDB qui laisse apparaître des extrémités cohésives 3' sortantes. Les travaux de M. Jasin (Jasin, 1996; Jasin and Berg, 1988) ont permis une meilleure connaissance des méganucléases de cette famille et des mécanismes de réparation des CDB. I-SceI a été utilisée dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, avec une efficacité variable. Ainsi, un même ciblage a permis d'obtenir une fréquence de coupure de

$4.10^{-4}$  dans des cellules NIH3T3, de  $10^{-2}$  dans des cellules souches embryonnaires murines ou de 1,3 % dans le foie de souris transgéniques *in vivo* (Gouble *et al.*, 2006; Donoho *et al.*, 1998; Rouet *et al.*, 1994b). Cette différence de coupure peut être due à une différence de vectorisation et d'expression de la méganucléase ou d'accessibilité de la cible, à cause de méthylations par exemple.

La limite majeure à l'utilisation des méganucléases est que leur séquence cible est longue et le plus souvent absente du génome des organismes modèles. Il a ainsi été nécessaire d'insérer la séquence cible dans leurs génomes. Afin de pallier cet inconvénient, l'ingénierie de nouvelles nucléases à façon a été développée pour leur utilisation à des fins thérapeutiques (Arnould *et al.*, 2011; Stoddard, 2011; Takeuchi *et al.*, 2011).

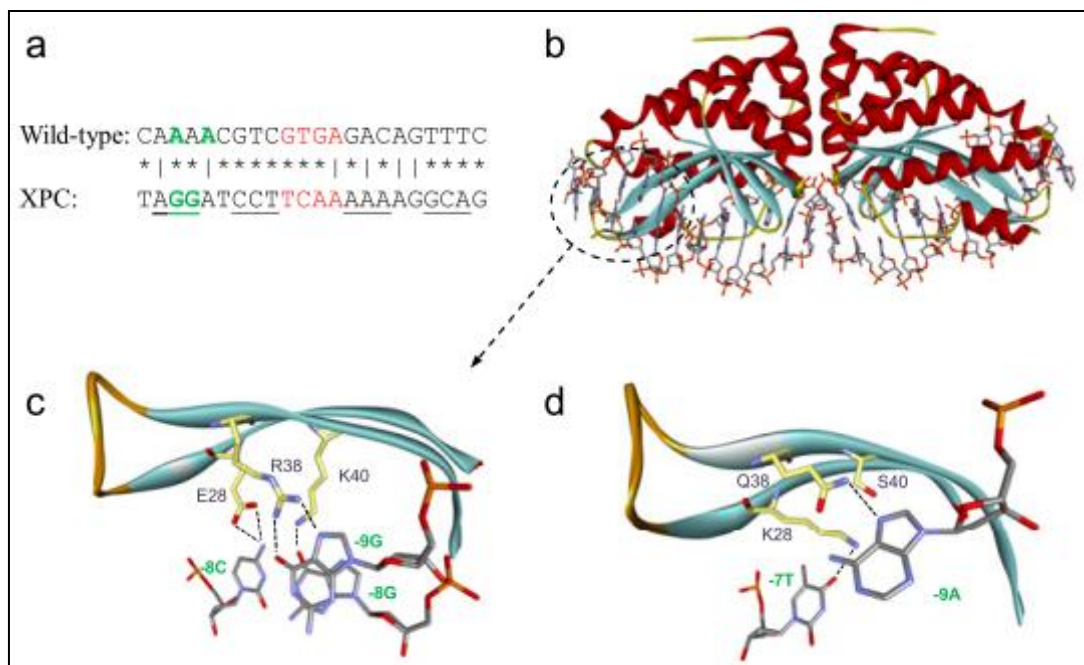


Figure 18 : Méganucléases et reconnaissance de l'ADN.

Exemple de l'obtention d'une méganucléase ciblant le gene XPC à partir d'une méganucléase naturelle, I-CreI. (a) : comparaison de la cible originelle et de la cible thérapeutique (b) structure cristalline de la méganucléase I-CreI modifiée fixée sur l'ADN cible (c) interaction entre la nouvelle méganucléase et sa cible et (d) interaction entre la forme I-CreI native et sa cible. D'après (Silva *et al.*, 2011; Redondo *et al.*, 2008)

Une meilleure caractérisation et l'obtention de méganucléases avec de nouvelles spécificités ont ouvert la voie à l'édition de génome sur mesure. En effet, en les modifiant pour le ciblage d'un locus donné, elles peuvent y introduire une CDB qui favorise une réparation par RH si un ADN donneur est présent. Des efforts conséquents de mutagenèse

dirigée suivie du criblage des nouvelles protéines obtenues ont été faits. Cette ingénierie a permis de développer des méganucléases contre des cibles thérapeutiques potentielles. L'entreprise Collectis a développé commercialement ce type d'endonucléases.

Des travaux ont par exemple été conduits avec des méganucléases dirigées contre le gène *Rag1* : cela peut aussi bien servir à l'obtention d'animaux transgéniques qu'au développement de stratégies thérapeutiques pour le traitement de déficits immunitaires touchant ce gène (Smith *et al.*, 2006). Dans un contexte de thérapie génique, le gène codant la *Xeroderma pigmentosum complementation group C* (XPC), muté chez les patients atteints de xeroderma pigmentosum (OMIM#278700), a été ciblé avec de nouvelles méganucléases. Cette maladie est due à un déficit de réparation de l'ADN entraînant une sensibilité accrue aux rayons UV. Le locus XPC étant méthylé, l'utilisation d'agents déméthylants a permis une correction génique dans 0,4 % des populations cellulaires testées (Dupuy *et al.*, 2013). Une correction génique de la dystrophine a été réalisée dans un modèle de myoblastes de patients atteints de la myopathie de Duchenne à l'aide d'une méganucléase vectorisée dans un vecteur LV et d'un donneur apporté dans un IDLV (Popplewell *et al.*, 2013).

Malgré ces avancées, les méganucléases restent difficiles à modifier et l'absence d'un code de reconnaissance simple entre les domaines de fixation à l'ADN et une séquence de nucléotides a limité leur diffusion.

### **II-3.2 Les nucléases à doigts de zinc**

Les nucléases à doigts de zinc (*Zinc Finger Nucleases*, ZFNs) ont été mises au point à partir des travaux de l'équipe de S. Chandrasegaran sur l'enzyme FokI. FokI est une enzyme de restriction obtenue à partir de la bactérie *Flavobacterium okeanoikoites*. Elle fait partie des enzymes de restriction de type II : ce sont des endonucléases capables de réaliser une CDB et des méthylases reconnaissant des séquences de 4 à 8 pb, fonctionnant par homodimérisation (Pingoud and Jeltsch, 2001). La séquence cible de FokI est : 5'-GGATG-3'/5'-CATCC-3, elle réalise une coupure à 9 et 13 nucléotides de distance de sa cible donnant lieu à l'apparition d'extrémités cohésives 5' sortantes. Des études ont permis de définir les régions du gène codant FokI responsables de la spécificité de reconnaissance d'une part et de l'activité catalytique d'autre part (Li *et al.*, 1992). En modifiant cette dernière, il a été possible de changer l'activité catalytique en conservant la spécificité de reconnaissance (Li and Chandrasegaran, 1993). A l'inverse, sa coupure a été redirigée vers d'autres sites en associant le domaine catalytique à un nouveau domaine de reconnaissance de l'ADN en créant ainsi une

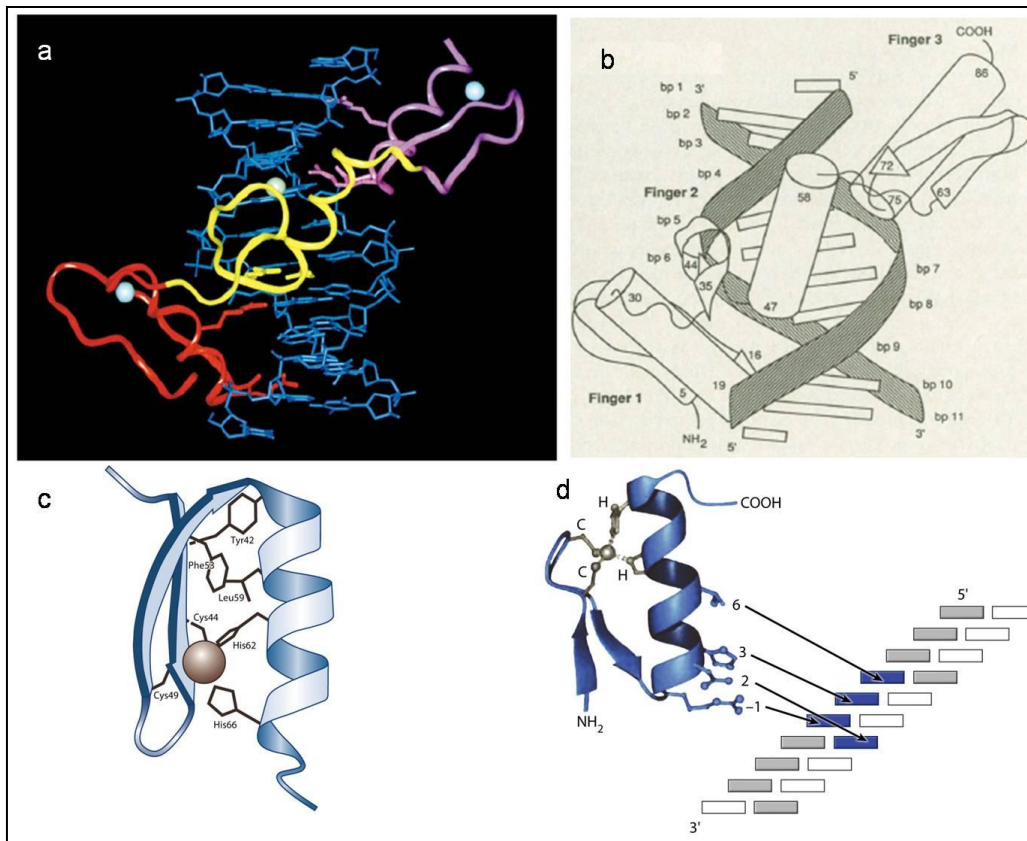
endonucléase artificielle. La première endonucléase créée avec la partie catalytique de FokI comportait l'homéodomaine ultrabithorax de la drosophile (Ubx) en tant que domaine de reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN (Kim and Chandrasegaran, 1994).

Les ZFNs sont des protéines chimériques issues de l'association de domaines protéiques en ZFs et de la partie endonucléasique spécifique de FokI. Ces outils ont été développés à partir de 1996 (Kim *et al.*, 1996).

Il existe de nombreux ZFs naturels qui ont souvent un rôle de facteur de transcription. La structure en ZFs Cys2His2 des domaines de reconnaissance de l'ADN est due à la présence d'ions  $Zn^{2+}$  interagissant avec les acides aminés (aa) cystidine (Cys, C) et histidine (His, H) (figure 19). Le premier domaine en ZFs a été décrit en 1982 par l'équipe d'A. Klug : il s'agit du domaine TFIIIA de *Xenopus laevi* (Klug, 2010; Miller *et al.*, 1985). En 1982, A. Klug obtenait le Prix Nobel de Chimie "*Pour sa contribution au développement de la microscopie électronique cristallographique et ses découvertes sur la structure des complexes protéines-acides nucléiques biologiquement importants*". Chaque ZF est constitué de deux feuillets  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$  ( $\beta\beta\alpha$ ), comprenant les aa responsables de l'interaction spécifique avec les nucléotides de la cible. Des avancées notables dans l'étude de l'interaction de ZFs avec l'ADN ont également été possibles grâce à l'étude du facteur de transcription murin Zif268 en cristallographie (N P Pavletich and Pabo, 1991). Des trente deux aa de chaque ZF, ceux ayant une importance majeure dans les interactions avec la séquence cible sont numérotés relativement à leur situation sur l'hélice  $\alpha$  ("1" correspondant au premier aa de l'hélice  $\alpha$ ) : -1, 3 et 6 pour ceux interagissant avec le brin codant, 2 pour l'interaction avec le brin non codant. Ces domaines se placent dans le sillon majeur de l'ADN.

Comme les méganucléases, les ZFNs se fixent spécifiquement sur une région donnée du génome et y provoquent une CDB. Celle-ci peut être réparée par NHEJ ou par RH lorsqu'un donneur présentant des régions d'homologie au site de coupure est présent.

Les deux monomères d'une paire de ZFNs se positionnent en orientation opposée sur des sites inversés : cela facilite l'orientation de FokI et son hétérodimérisation (Smith *et al.*, 2000). Il a été démontré que la cinétique de coupure des ZFNs n'est pas de premier ordre : elle ne dépend donc pas de façon linéaire de la quantité de cibles présentes (Mani *et al.*, 2005). Au contraire, plus il y a de substrat, plus la proportion de séquences coupées est faible.



**Figure 19 : Interaction entre les domaines protéiques à doigts de zinc et l'ADN**

(a) et (b) Interaction entre des doigts de zinc et l'ADN (c) structure d'un doigt de zinc (d) Acides aminés et bases impliquées dans la reconnaissance entre les doigts de zinc et l'ADN. D'après (Elrod-Erickson *et al.*, 1996; Klug, 2010; N. P. Pavletich and Pabo, 1991).

Pour élargir leur utilisation à un plus grand éventail d'applications et de cibles, il a été essentiel de développer des modules avec de nouvelles spécificités pour pouvoir théoriquement cibler toute séquence du génome (figure 20). La majorité de ces travaux s'est concentrée sur l'obtention de nouveaux ZFs pour cibler un maximum des soixante-quatre triplets de nucléotides existants.

La plateforme académique OPEN a développé de nombreux triplets de ZFs (Foley *et al.*, 2009; Maeder *et al.*, 2008). En utilisant des archives de ZFs, l'assemblage puis la sélection par double hybride bactérien a permis de définir de nouveaux triplets de ZFs.

L'assemblage modulaire puis la sélection par double hybride désigne l'assemblage de trois ou quatre ZFs d'après leur séquence cible sans tenir compte de la localisation de chaque ZF.

La stratégie CoDa d'assemblage dépendante du contexte a ensuite permis d'assembler des sous-unités à partir de deux triplets partageant le même ZF central (Sander *et al.*, 2011). Cette technique conduit à l'obtention d'une cible théorique toutes les 500 pb.



L'assemblage biparti consiste à associer deux ZFs et demi de deux libraires. La méthode "2+2" a permis l'obtention de ZFNs contenant quatre ZFs. Des efforts de mise à disposition de tels outils à la communauté scientifique ont été faits en rendant accessibles les plasmides nécessaires et des plateformes de création de ZFNs telles que ZifBase ou Zif-Predict (Molparia *et al.*, 2010; Jayakanthan *et al.*, 2009).

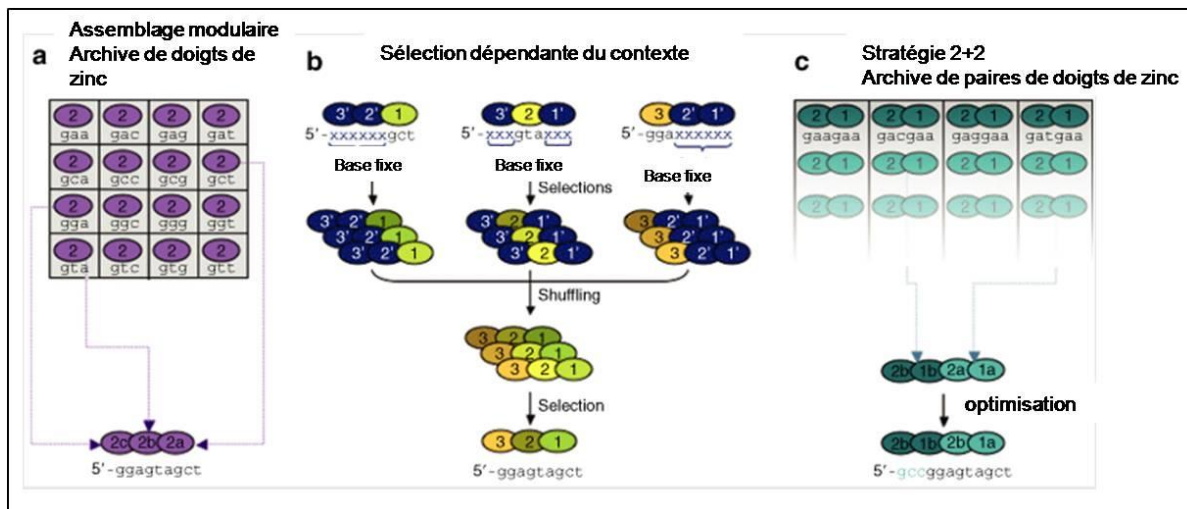


Figure 20 : Assemblage de domaines à doigts de zinc pour l'obtention de nucléases à doigts de zinc avec de nouvelles spécificités (a) assemblage modulaire, (b) sélection dépendante du contexte, (c) association de 2 + 2 modules. D'après (Cathomen and Joung, 2008).

Malgré la possibilité théorique du ciblage de toute séquence, d'après les liaisons mises en jeu dans la reconnaissance de l'ADN et les modules disponibles, il est plus facile de cibler des régions riches en guanine (Isalan, 2012). En effet, l'interaction guanine-arginine est la plus forte des interactions ZF/nucléotide connues, et la juxtaposition de ZFs stabilise les interactions avec les guanines reconnues aux positions 1 et 3 d'un triplet (Isalan *et al.*, 1997; Seeman *et al.*, 1976).

Plusieurs séquences de liaison entre FokI et les ZFs ont été testées telles que la séquence TGEKP de six aa qui confère au monomère une affinité picomolaire, ou la séquence (GSG)*n* qui réduit l'affinité mais augmente la spécificité. Shimizu *et al.* ont fait varier les longueurs des séquences de liaison et des espaceurs séparant les cibles de chaque monomère : pour une séquence de liaison de vingt-deux aa, la coupure est optimale avec une séquence espaceur de 8 pb contre une coupure efficace avec un espaceur de 5, 6, 7, 14 ou 16 pb pour une séquence de liaison de quatre aa (Shimizu *et al.*, 2009).

Pour améliorer la spécificité, de nouvelles paires ont été créées avec un plus grand nombre de ZFs. Ainsi, une meilleure spécificité et une moindre toxicité en passant de trois à quatre ZFs a été décrite (Urnov *et al.*, 2005). Cependant, une étude a montré une meilleure efficacité de coupure avec trois ou quatre ZFs plutôt que cinq ou six (Shimizu *et al.*, 2011).

Le groupe de D. Carroll a développé les premières applications des ZFNs et l'étude des conditions propices à leur association à la RH chez la drosophile (Beumer *et al.*, 2006; Bibikova *et al.*, 2002, 2001). Sangamo a été la première entreprise à commercialiser des ZFNs. Leur plateforme CompozR® a été développée pour obtenir des paires avec de nouvelles spécificités. Sangamo a également racheté la jeune compagnie Gendaq du prix Nobel A. Klug et de Y. Choo. En parallèle, des laboratoires académiques se sont associés pour la mise en place du Zinc Finger Consortium pour faciliter la mise à disposition de ces outils ("The Zinc Finger Consortium").

Les ZFNs ont été utilisées dans une grande variété d'organismes modèles et de cellules : rats et souris transgéniques, poisson zèbre, Arthropodes, cellules souches, lignées humaines et autres modèles (Chen *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2012; Carroll, 2011; Yusa *et al.*, 2011; Foley *et al.*, 2009; Geurts *et al.*, 2009; Porteus and Carroll, 2005). Elles ont servi au ciblage de multiples gènes tels que : CCR5 dans des lymphocytes T humains, DHFR dans des cellules CHO ou VEGFA, HOXB13 et CFTR dans des cellules HEK (Maeder *et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2008; Lombardo *et al.*, 2007). Les succès se sont rapidement enchaînés avec l'obtention de 6% de KO chez la drosophile en 2002, 1.5 % de KI en 2003, 3 à 5 % de KI dans des cellules de Mammifères en 2003, puis plus de 11 % de KI du gène IL2RG (Carroll *et al.*, 2008; Urnov *et al.*, 2005; Bibikova *et al.*, 2003).

L'efficacité d'édition du génome est très variable qu'il s'agisse de réaliser un KO ou un KI. Cela peut varier pour des KI de moins de 1 % à plus de 80 % lors de sélection grâce à des cassettes de résistance aux antibiotiques.

Il semble que l'efficacité d'édition soit au maximum lorsque le site à modifier est à moins de 100 pb du site de coupure. L'efficacité semble fortement réduite au-delà d'une distance de 500 pb du DSB (Porteus, 2006).

### II-3.3 Les *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*

Les *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALE nucléases) fonctionnent de manière analogue aux ZFNs. La partie protéique impliquée dans la reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN est constituée de domaines TALE ou *TALE repeats*. Ces domaines sont impliqués dans la pathogénicité de bactéries de plantes du genre *Xanthomonas spp.* (Scholze and Boch, 2011; Bogdanove *et al.*, 2010). Ces protéines sont injectées dans les plantes par un système de sécrétion de type III. Par la reconnaissance de séquences cibles dans des régions promotrices chez l'hôte, ils jouent un rôle de facteur de transcription de gènes impliqués dans la résistance ou la susceptibilité des plantes aux pathogènes (Gu *et al.*, 2005; Kay *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006). Il s'agit de domaines protéiques de trente-deux à trente-cinq aa issus de bactéries. Parmi ces aa, les aa 12 et 13 constituent une région hypervariable (*repeat variable diresidue*, RVD). Le reste de la structure protéique est constituée de régions répétées. Chaque RVD reconnaît spécifiquement un unique nucléotide d'après des règles décrites en 2009 (Boch *et al.*, 2009; Moscou and Bogdanove, 2009). En général, 15,5 à 19,5 domaines TALE sont associés ; le dernier domaine ne contient qu'un demi module.

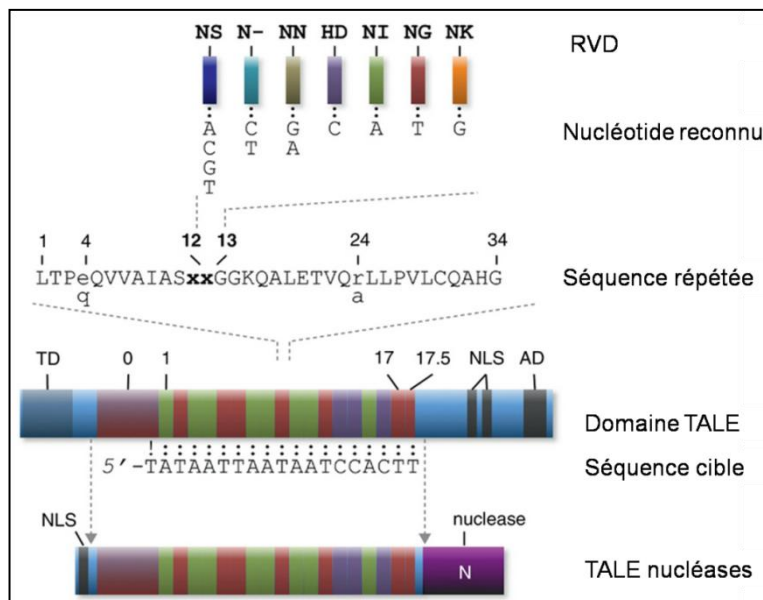


Figure 21 : Code de reconnaissance de l'ADN par les domaines TALE

Les domaines TALE contiennent généralement un domaine de translocation N-terminal (*translocation domain*, TD), des domaines centraux répétés (0 à 17,5) qui interviennent dans la fixation à l'ADN et une région C-terminale contenant un signal de

localisation nucléaire (nls) et un domaine d'activation de la transcription (AD). La spécificité de reconnaissance de l'ADN est portée par les résidus hypervariables aux positions 12 et 13 de chaque module. D'après (Mussolino and Cathomen, 2012).

Comme pour les ZFNs, les TALE nucléases ont été développées par l'association de ce type de domaines à la partie endonucléasique de l'enzyme FokI. Les premières études

reposaient sur l'association de TAL effecteurs naturels AvrXa7 et PhtXo1 à FokI. Une première étude les a désignées par le terme TALNs et a suggéré le potentiel de ces outils pour la modification du génome (Li *et al.*, 2010). En parallèle, une équipe a utilisé des TAL sauvages et des TALEs artificielles pour de nouvelles cibles en étudiant les longueurs optimales des espaceurs entre les deux parties de la cible des TALE nucléases (Christian *et al.*, 2010).

De même que pour les ZFNs, il existe des restrictions dans leurs cibles potentielles. Les cibles des TALE nucléases sont classiquement précédées par une thymidine (Boch and Bonas, 2010). Il existe également une permissivité de certains RVDs qui peuvent reconnaître des nucléotides autres que celui associé dans la reconnaissance un RVD/un nucléotide (Scholze and Boch, 2011).

Miller *et al.* ont démontré l'importance de la longueur des monomères et de la séquence espaceuse entre les cibles de chaque monomère (Miller *et al.*, 2011). L'efficacité de ciblage pouvant varier, en fonction de la taille des espaceurs, de 0 à 15 % pour un variant court, et de 0 à 20 % pour un variant long. Avec différentes structures, ils ont pu obtenir jusqu'à 25 % de modification ciblée des loci NTF3 et CCR5 sans sélection. En général, par rapport à des TALE naturelles, cent cinquante et vingt aa sont conservés aux extrémités N et C-terminales respectivement (Miller *et al.*, 2011; Mussolino *et al.*, 2011).

Le ZFN Consortium et d'autres laboratoires ont développées des plateformes académiques de création de TALE nucléases (Heigwer *et al.*, 2013; Reyon *et al.*, 2012; Uhde-Stone *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). En parallèle, les entreprises Life Technologies grâce à leur service GeneArt® Precision TALs et Collectis ont développé ces outils commercialement.

Bénéficiant des connaissances acquises depuis dix ans dans le domaine des ZFNs et étant plus modulables grâce à la simplicité du code gouvernant leur reconnaissance de l'ADN, des avancées plus rapides ont pu être conduites sur les TALE nucléases.

Les premières modifications génétiques avec des TALE nucléases ont été faites dans des cellules humaines : une équipe a réalisé des KI ciblant cinq loci différents dans des cellules souches embryonnaires (*embryonic stems cells*, ES) et des cellules souches pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cells*, iPS) (Hockemeyer *et al.*, 2011). Comme cela a été démontré pour les ZFNs, ils ont également ciblé des loci de gènes non exprimés tels que PITX3 dans des iPS avec un KI précis dans 6 % de clones après sélection aux antibiotiques.

Selon les gènes ciblés, 2 à 100 % des constructions étaient insérées spécifiquement au niveau de la cible.

Leur application a très vite été étendue à de nombreux modèles et de nombreux gènes notamment dans des modèles de Mammifères, d'Arthropodes et de Poissons (Liu *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013; Takasu *et al.*, 2013; Tesson *et al.*, 2011; H. Wang *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2013).

### **II-3.4 Le système CRISPR/Cas9**

Le système *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated Cas9* (CRISPR/Cas9) a été décrit grâce à l'étude des mécanismes de défenses immunes adaptatives de bactéries et d'archées contre des acides nucléiques de pathogènes tels que des virus (Deltcheva *et al.*, 2011; Wiedenheft *et al.*, 2012). Cela met en jeu des petits ARN interférents capables de reconnaître de courtes séquences de pathogènes.

Les gènes Cas contiennent des opérons et des régions CRISPR correspondantes à des séquences nucléotidiques de pathogènes, ou espaceurs, entrecoupées de séquences répétées (figure 22). Dans une première phase, appelée phase adaptative, la réponse se met en place en intégrant des séquences nucléiques de pathogènes appelées proto-espaceurs en 3' de la région CRISPR. Au cours de l'expression génique de la région CRISPR et de l'interférence, la formation d'ARN précurseurs, pre-crRNA, est suivie de leur clivage. Cela donne lieu à des crRNA interférents capables de se fixer sur les séquences de pathogènes correspondant à celles intégrées en fin de région CRISPR (figures 22 et 23). Le crRNA interagit avec un crRNA transactivateur (tracrRNA). Cet ensemble oriente ensuite l'action des protéines Cas.

Les études de ces systèmes ont été menées majoritairement dans l'espèce bactérienne *Streptococcus pyogenes*. Des études du système CRISPR/Cas9 d'autres espèces bactériennes devraient permettre d'élargir les possibilités d'édition du génome à partir de cette famille d'endonucléases (Fonfara *et al.*, 2013).

Il existe trois types de systèmes CRISPR. Le système de type II, ne fait intervenir que quatre gènes dont celui codant la protéine Cas9. La transcription de ces gènes et le remaniement des transcrits donne lieu à la synthèse du pre-crRNA. Le tracrRNA est complémentaire des séquences répétées du pre-crRNA et déclenche l'action de la ribonucléase RNase III spécifique d'ARN db en présence de la Cas 9. Ce clivage des pre-crRNA est nécessaire à l'obtention du crRNA.

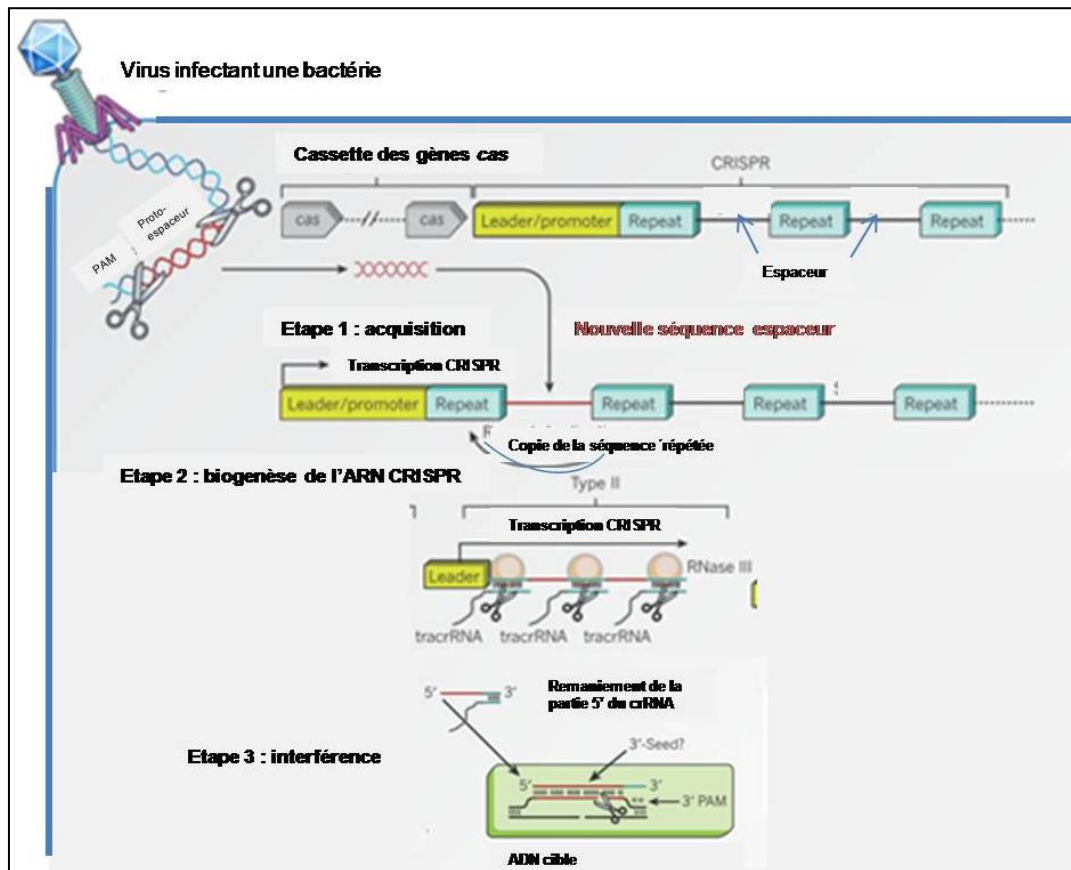


Figure 22 : Interférence à l'aide du système CRISPR de type II : défenses immunes des bactéries et des Archées contre les pathogènes. D'après (Wiedenheft *et al.*, 2012).

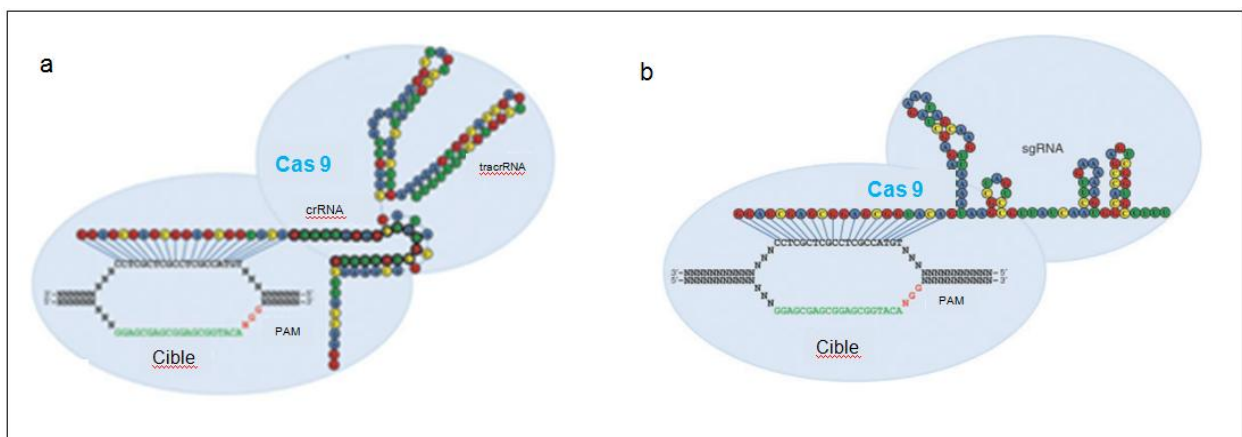


Figure 23 : Reconnaissance d'un motif d'acides nucléique par le complexe Cas9-crRNA-tracrRNA et par son équivalent synthétique sgRNA.

D'après (Hwang *et al.*, 2013).

La protéine Cas9 est une endonucléase aspécifique de l'ADN (Jinek *et al.*, 2012). Elle contient un domaine de type RuvC-like nucléase et un domaine nucléase HNH. La cible de la

Cas9 de *S. pyogenes* est constituée de vingt acides nucléiques suivi du motif "NGG" en 3'. La CDB se produit trois nucléotides en amont du motif NGG. Deux domaines endonucléasiques interviennent dans la CDB : chacun coupe un brin d'ADN.

L'association de la Cas9 avec le tracrRNA et le crRNA forme une endonucléase spécifique d'une cible définie par la séquence de ces deux ARN.

Les travaux de Jinek *et al.* constituent la preuve de principe de l'utilisation possible de la Cas9 pour réaliser une CDB dont la spécificité est orientée grâce à un court ARN artificiel chez la bactérie (Jinek *et al.*, 2012). Cet ARN est appelé ARN guide synthétique (*synthetic guide RNA*, sgRNA) : il contient les domaines essentiels du tracrRNA et du crRNA et est capable d'orienter l'activité de Cas9 vers un locus choisi (figures 22 et 23).

Du fait de la reconnaissance de l'ADN par une courte séquence d'ARN, le système CRISPR/Cas9 semble plus modulable et plus facile à mettre au point pour cibler de nouvelles séquences que le travail correspondant pour la création de nouvelles paires de ZFNs ou de TALE nucléases. La partie protéique ne concerne que le domaine nucléasique ; elle reste inchangée quelque soit la cible.

Néanmoins, il reste des limitations de cibles potentielles. Par exemple, la nécessité que le motif ciblé contienne NGG restreint la densité de cibles à une cible toutes les huit paires de bases dans le génome humain (Cong *et al.*, 2013a). L'utilisation de systèmes CRISPR/Cas issus d'autres espèces bactériennes, telle que *Streptococcus thermophilus*, pourrait permettre d'élargir la quantité de cibles envisageables en faisant varier la nucléase impliquée.

L'utilisation de ce type d'endonucléases a initialement été développée par des laboratoires académiques et elles ont récemment été intégrées à la boîte à outils de modification du génome de Sigma Aldrich.

Ce nouvel outil a permis de réaliser des CDB réparées par NHEJ dans des cellules humaines avec une efficacité allant jusqu'à 33 % (Cho *et al.*, 2013). Il a été montré que la Cas9 recombinante pouvait se lier *in vitro* à un sgRNA : il en résulte un complexe qui a permis de réaliser un KO en transgénése chez le poisson zèbre (Sung *et al.*, 2013). Elle a également permis le ciblage d'un ou plusieurs gènes à la fois de modèles tels que le poisson zèbre, des bactéries et des lignées humaines (Hwang *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013a).

### II-3.5 Stratégies d'amélioration des endonucléases protéiques

Par définition, les endonucléases artificielles peuvent offrir une variété très étendue d'outils en modifiant la partie catalytique et/ou les domaines de reconnaissance de l'ADN. Dans ce paragraphe, quelques exemples supplémentaires de nucléases dérivées de celles précédemment décrites ou utilisant de nouveaux domaines endonucléasiques ou de reconnaissance de l'ADN sont décrits.

Inspirées par les ZFNs et TALENs, des équipes ont remplacé la partie catalytique de FokI par une autre enzyme telle que PvuII (Schierling *et al.*, 2011). Le domaine PvuII possède une partie de reconnaissance de l'ADN en plus de sa partie catalytique. Ce nouvel outil est utilisable pour cibler une région contenant des cibles de PvuII associées aux séquences reconnues par les ZFs. L'optimisation de ce couplage permet d'éviter la coupure de séquences ne contenant que la cible de PvuII. En associant cette partie de PvuII à d'autres domaines à ZF, il serait possible de cibler chaque site PvuII : cela représenterait une cible toutes les 4000 pb. Ce domaine de PvuII a également été associé à des TFO (Eisenschmidt *et al.*, 2005) et à des domaines TALE (Yanik *et al.*, 2013) pour faire varier les cibles potentielles.

Des TFO ont également été associées à un domaine catalytique de topoisomérase générant une CDB de l'ADN (Duca *et al.*, 2006). Il en résulte de nouvelles possibilités d'endonucléases artificielles en faisant varier la spécificité de reconnaissance de l'ADN par les TFOs.

Le caractère modulable des TFOs a été aussi utilisé dans des structures appelées *artificial targeted light-activated nanoscissor* (ATLANs) (Tsai *et al.*, 2010). Il s'agit d'endonucléases artificielles associée à des nanoparticules d'or dont la reconnaissance de l'ADN dépend de la séquence de TFOs et dont l'activité catalytique est déclenchée par photoillumination. Ces outils ont pour avantages leur petite taille et la possibilité d'utiliser conjointement des particules de spécificités différentes. Leur activité est finement contrôlée via leur activation, puis leur inactivation après coupure. Cela offre une toxicité réduite par rapport à une activité de coupure prolongée d'autres nucléases à façon.

Des modifications de paires de ZFNs ont également été réalisées. L'équipe de A. Klug a ainsi supprimé un des monomères en fusionnant la seconde unité catalytique de FokI à une seule ZFN (Minczuk *et al.*, 2008). Ils ont développé cette structure pour cibler des gènes mitochondriaux, ouvrant ainsi la voie au traitement de maladies mitochondriales. Dans cette étude, la forme classique des ZFNs s'est avérée inefficace à cause de coupures non



spécifiques. L'utilisation d'un seul monomère ciblant une région mutée d'un nucléotide sur neuf ou douze a permis d'augmenter la spécificité du système et d'obtenir la coupure ciblée.

De même, une TALE nucléase monomérique a été créée en utilisant le domaine catalytique de la méganucléase I-TevI (Beurdeley *et al.*, 2013). De plus, si celle-ci est fusionnée à l'extrémité carboxyterminale, cette protéine de fusion agit comme une nickase. Une autre équipe a utilisé ce type de fusion pour générer des megaTALs vectorisées dans des LVr ou des IDLV (Boissel *et al.*, 2013).

Les travaux de Delacôte *et al.* ont démontré l'intérêt de l'ajout d'enzymes de modification de l'ADN à des endonucléases artificielles (Delacôte *et al.*, 2013). La fusion de Trex, une exonucléase qui intervient en 3' lors de la réparation de l'ADN, a permis d'augmenter l'efficacité de ciblage de plusieurs nucléases. Par exemple, cela a permis de couper un substrat GFP avec une efficacité allant jusqu'à 6,8 % contre 0,6 % sans cette enzyme. Cela pourrait être étendu à d'autres enzymes de modification de l'ADN et à d'autres types d'endonucléases.

### **II-3.6 Eléments de comparaison des différentes familles de nucléases artificielles**

La comparaison des différentes nucléases ou de paires d'un même type de nucléases est complexe. En effet, les outils de vectorisation sont souvent distincts et responsables d'efficacités de transduction, de transfection et/ou d'expression variables. De même, un gène donné peut être ciblé en différents endroits et certaines zones peuvent être méthylées et plus difficiles d'accès. Les lignées cellulaires répondent de façon très variable aux nucléases, tant dans l'efficacité de coupure et sa réparation par NHEJ qu'en ce qui concerne la toxicité ou l'édition de génome par RH. Certaines études utilisent des techniques de sélection pour enrichir les populations en cellules modifiées, les rendant difficiles à comparer avec des expériences sans sélection. Certains points de comparaison seront évoqués dans ce paragraphe à la lumière de ces restrictions.

#### **Efficacité de coupure et d'édition du génome**

Une étude a démontré une efficacité supérieure d'édition de génome avec le système CRISPR/Cas9 qu'avec les TALE nucléases sur les mêmes gènes dans des iPS humaines (Ding *et al.*, 2013). Cela est lié à une expression différentielle des deux types de nucléases et

pourrait être amplifié par un accès limité aux cibles des TALE nucléases lorsque celles-ci sont méthylées.

La majorité des études ayant comparé les différentes nucléases démontre une meilleure efficacité de coupure pour le système CRISPR/Cas9 par rapport aux autres nucléases, et des TALE nucléases par rapport aux ZFNs (Beumer *et al.*, 2013a).

Dans tous les cas, l'efficacité de coupure dépend des paires et des cibles considérées. Dans une étude d'édition de génome sur des cellules ES et des iPS, une efficacité de coupure supérieure ou égale a été décrite pour les TALE nucléases en comparaison à des ZFNs ciblant la même région du locus AAVS1 (Hockemeyer *et al.*, 2011).

Une équipe a amélioré l'efficacité de coupure en utilisant des paires hybrides avec un monomère TALE nucléase et un monomère ZFN (Yan *et al.*, 2013). Cela a augmenté le niveau de coupure par rapport aux paires de TALE nucléases et de ZFNs correspondantes.

L'équipe de C. Barbas a développé un variant hyperactif de FokI, *Sharkey* qui a permis d'augmenter l'efficacité de coupure de ZFNs et de TALE nucléases (Guo *et al.*, 2010). Des mutations complémentaires du variant *Sharkey* et de l'architecture hétérodimérique forcée ELD/KKR ont également amélioré l'efficacité de coupure (Doyon *et al.*, 2011).

Une équipe a démontré qu'une température de 30°C augmente l'efficacité de coupure par rapport à une température de 37°C (Doyon *et al.*, 2010). A l'inverse, des variants ont été développés pour restreindre l'activité de FokI à 37°C et l'inhiber à des températures inférieures pour mieux contrôler les coupures (Doyon *et al.*, 2011).

Enfin, l'utilisation simultanée de plusieurs types de mutations et de traitements de température permet une synergie des améliorations observées indépendamment pour chaque facteur (Doyon *et al.*, 2011).

Les coupures réalisées par les nucléases peuvent faire apparaître, lors de CDB, des extrémités 5' sortantes avec FokI et 3' sortantes avec I-SceI. Les extrémités 3' sont directement compatibles avec la RH : les nucléases produisant ce type d'extrémités sont donc probablement plus efficaces pour favoriser la RH.

## **Capacités de ciblage de nouveaux loci**

En termes de cibles potentielles, la souplesse du système CRISPR/Cas9 en fait celui dont la densité de cibles est théoriquement la plus élevée, suivi des TALE nucléases, des ZFNs et des méganucléases. Plus la cible des nucléases est proche du site où l'on souhaite insérer une mutation, plus l'efficacité de l'édition de gène est élevée (Beumer *et al.*, 2013b; Carroll, 2011). Ainsi, plus la densité de cibles d'un type de nucléases est importante, plus l'édition de gène peut être efficace.

La reconnaissance entre ces outils et leur cible est de mieux en mieux connue. Cela permet de définir plus précisément les cibles et les applications envisageables malgré certaines limitations évoquées ci-dessus.

Bien qu'il ait été possible de cibler des gènes non exprimés, tels que celui codant la laminine A ou XPC, l'état de la chromatine peut limiter l'accessibilité à certaines cibles (Daboussi *et al.*, 2012). Une comparaison de la chromatine des loci CCR5 et AAVS1 dans des iPS et des cellules CD34+ a montré une corrélation entre l'accessibilité des cibles et l'efficacité de coupure de ZFNs, plus élevée en AAVS1 (van Rensburg *et al.*, 2012). Pourtant, cela s'oppose à l'efficacité de coupure de ZFNs en CCR5 d'une autre étude dans ces cellules CD34+ (Holt *et al.*, 2010). L'état de méthylation des cibles influant sur l'efficacité de coupure, il serait possible d'utiliser des agents déméthylants pour favoriser l'accès des nucléases à l'ADN dans des loci méthylés comme cela a été démontré pour les méganucléases (Dupuy *et al.*, 2013).

## **Toxicité et spécificité des endonucléases artificielles**

Les nucléases, par leur capacité à induire une CDB de l'ADN, sont susceptibles d'être toxiques pour la cellule pour plusieurs raisons. Une CDB entraîne un arrêt du cycle cellulaire et l'absence de réparation peut induire l'apoptose (Händel *et al.*, 2011; Olsen *et al.*, 2010; Alwin *et al.*, 2005). Une coupure réparée par NHEJ peut causer des mutations délétères. En fonction de leur spécificité, les endonucléases peuvent couper en dehors de leur cible principale, on parle alors d'évènements "*off-target*".

L'étude de la toxicité des nucléases peut se faire en mesurant la survie cellulaire ou l'apoptose (Cornu *et al.*, 2008; Porteus and Baltimore, 2003), ou en recherchant les foyers caractéristiques de la réparation de l'ADN suite à une CDB (Miller *et al.*, 2007; Szczepek *et al.*, 2007).

- Les nucléases fonctionnant par paires, les coupures peuvent survenir (Cathomen and Joung, 2008) :
- par manque de spécificité de fixation à l'ADN,
  - à cause d'un peptide de liaison réduisant la spécificité de coupure,
  - après fixation d'un seul monomère sur l'ADN associée à l'homo ou l'hétérodimérisation de FokI,
  - par homodimérisation avec fixation de deux monomères sur l'ADN,
  - à cause d'une coupure sans fixation de monomère.

Le risque de coupures *off-target* dépend également de la quantité de nucléases utilisée et de la durée de leur expression (Pattanayak *et al.*, 2011).

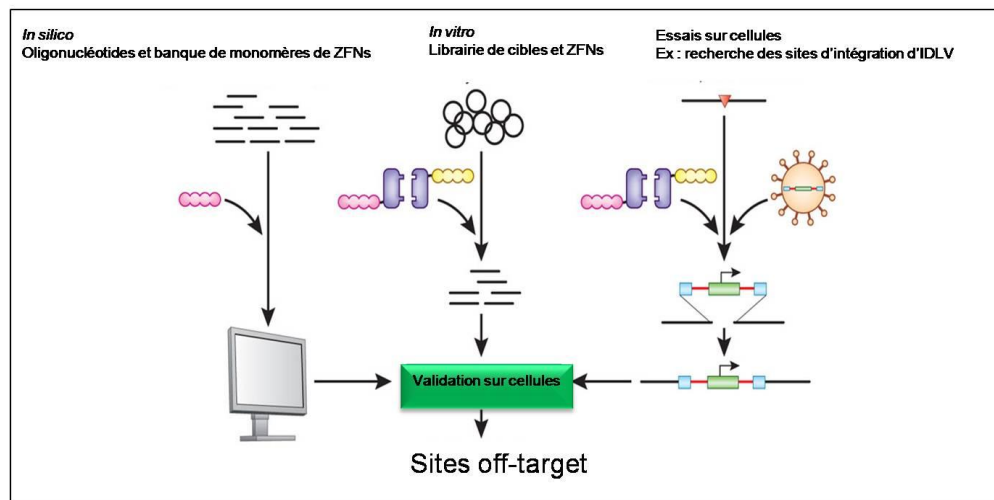


Figure 24 : Méthodes de recherche des effets *off-target* des nucléases : exemple des ZFNs.

D'après (Mussolino and Cathomen, 2011).

Pour chaque monomère et chaque paire, il est nécessaire de définir les sites potentiels de coupures *off-target*.

Les premières recherches de coupures *off-target* ont été faites avec les techniques de *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment* (SELEX). Des programmes de prédiction de sites *off-target* prenant en compte les règles de reconnaissance entre les nucléases et l'ADN et les éventuels mésappariements sont également disponibles sur internet (Fine *et al.*, 2013; Grau *et al.*, 2013; Doyle *et al.*, 2012; Cradick *et al.*, 2011).

Perez *et al.* ont étudié quinze sites potentiels de coupures d'une paire de ZFNs ciblant CCR5 avec la technique du *Surveyor assay*, puis par séquençage haut débit pour un gain de sensibilité (Perez *et al.*, 2008). Avec ces tests, 4,1 à 5,39 % de coupure ont été mis en évidence au locus CCR2. CCR2 est le gène présentant le plus d'homologie avec CCR5 et il est situé sur le même chromosome : cela favorise le risque de coupure *off-target*. Un autre site

*off-target* à été détecté par pyroséquençage (454) avec deux séquences mutées sur quarante-mille séquences lues.

Une étude de coupure *in vitro* sur une librairie de sites présentant 21 % de mésappariements avec la cible, couplée à des étapes de PCR puis de séquençage, a été réalisée avec des paires de ZFNs ciblant CCR5 et VF2468 (Pattanayak *et al.*, 2011). Il a été démontré que les coupures *off-target* augmentent avec la concentration en nucléases, qu'il peut y avoir des coupures avec trois mésappariements pour un monomère, et qu'il est plus probable d'avoir une coupure *off-target* due à la fixation parfaite d'un monomère et de la présence de mésappariements pour le second. De plus, une forte affinité de fixation à l'ADN augmente ce risque de toxicité. Cette étude a comparé les sites *off-target* de CCR5 prédits par cette technique, validés dans des lignées cellulaires, et les travaux ci-dessus. Sur trente-sept sites prédits, neuf ont été validés *in vitro*.

Une étude a été faite en cartographiant les insertions d'IDLVs en dehors de la cible canonique des nucléases en tant qu'évènements rapporteurs des coupures *off-target* (Gabriel *et al.*, 2011). En effet, ces vecteurs sont capturés au niveau des CDB. Ces captures ont été détectées au niveau de sept loci dont quatre ont été associés à des coupures *off-target* grâce à une confirmation par séquençage haut débit. Ces travaux ont montré le risque de coupure de sites présentant jusque huit mésappariements.

Cette étude a également démontré que tous les sites présentant une forte homologie avec la cible canonique ne sont pas nécessairement coupés. Ainsi, d'autres paramètres tels que la teneur en guanine peuvent être importants. Hormis les coupures de CCR2, ces deux études ont détecté des sites *off-target* différents, confirmant ainsi la complémentarité des méthodes disponibles. Ces techniques ont permis de mettre en évidence des sites qui n'avaient pas été prédits par la méthode SELEX, mais la plupart des sites prédits dans ces trois méthodes étaient semblables en termes d'homologie de séquence (Mussolino and Cathomen, 2011).

Sur le même principe, une étude a été réalisée sur la base de la capture d'AAVr aux sites de coupure (Petek *et al.*, 2010). Il a également été démontré que des ZFNs pouvaient couper un site ne présentant que 66 % d'homologie avec leur cible canonique (Mussolino and Cathomen, 2011).

Etant donné que FokI fonctionne par dimérisation, chaque paire de ZFNs ou de TALE nucléases présente au moins trois cibles potentielles dont deux liées à des coupures *off-target*. Afin de limiter ces évènements délétères, des équipes ont modifié l'interface entre les deux sous-unités catalytiques de FokI pour en favoriser l'hétérodimérisation (Mani *et al.*, 2005;

Miller *et al.*, 2007; Ramalingam *et al.*, 2011; Szczepek *et al.*, 2007). Plusieurs dimères de FokI ont ainsi été obtenus pour réduire la toxicité des coupures *off-target* et augmenter l'efficacité de coupure de la cible. Parmi ces dimères, on retrouve les variants RV/DA, ELD/KKR, KV/EA et le variant DD/RR qui a une bonne activité de coupure mais une spécificité limitée (Doyon *et al.*, 2011; "EENdb - FokI variants"; Guo *et al.*, 2010).

En modifiant la partie catalytique de nucléases, il est possible de réaliser des coupures sb, ou *nicking* : on parle alors de nickases. Bien qu'elles soient moins efficaces pour l'induction de coupure et le déclenchement d'une réparation par RH, elles font augmenter la proportion d'évènements de RH en limitant la NHEJ, et sont moins toxiques d'après une étude de ciblage des gènes HOXB13, VEGF-A et CCR5 par six ZF nickases (Ramirez *et al.*, 2012). Ces observations ont été confirmées par l'étude de Wang *et al.* ciblant CCR5 avec l'observation de 1 à 8 % de RH dans différents modèles comportant des lignées et des cellules primaires (Wang *et al.*, 2012). Dans le système CRISPR/Cas9, il est possible d'introduire la mutation D10A pour en faire une nickase (Cong *et al.*, 2013b; Mali *et al.*, 2013b; Ran *et al.*, 2013).

Une autre technique pour réduire la toxicité consiste à déstabiliser les ZFNs pour limiter la durée de leur expression. Cela peut être obtenu en les couplant à de l'ubiquitine et en autorisant leur expression grâce à un inhibiteur du protéasome (Pruett-Miller *et al.*, 2009). La seconde stratégie développée dans ces travaux consiste à fusionner à la région N-terminale des ZFNs un domaine de la protéine FKBP12 qui est rapidement dégradée chez les Mammifères. Cette fusion fait produire des ZFNs déstabilisées à demi-vie réduite ; le ligand synthétique Shield1 se lie à ce domaine et protège alors les ZFNs de leur dégradation pendant sa fixation (Banaszynski *et al.*, 2006).

La spécificité des nucléases est liée à la longueur de la cible. Ainsi, le fait que les TALE nucléases reconnaissent des séquences plus longues que les ZFNs est souvent désigné comme la raison principale de leur moindre toxicité. Dans l'étude du système CRISPR/Cas9 de Fu *et al.*, des coupures dans des sites présentant jusque cinq mésappariements ont été observées avec une efficacité parfois supérieure à celle observée au niveau de la cible principale (Fu *et al.*, 2013). D'autres études ont également souligné cette tolérance, surtout au niveau du motif adjacent au protoespaceur (*protospacer adjacent motif*, PAM) (Carroll, 2013; Cradick *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013a; Pattanayak *et al.*, 2013). La tolérance d'autant de mésappariements sur la courte séquence responsable de la spécificité de ce système et l'influence de la teneur en GC, qui stabilise les complexes ARN/ADN, soulignent la nécessité d'études approfondies des effets *off-target* pour développer des stratégies d'optimisation.

## Eventail d'applications

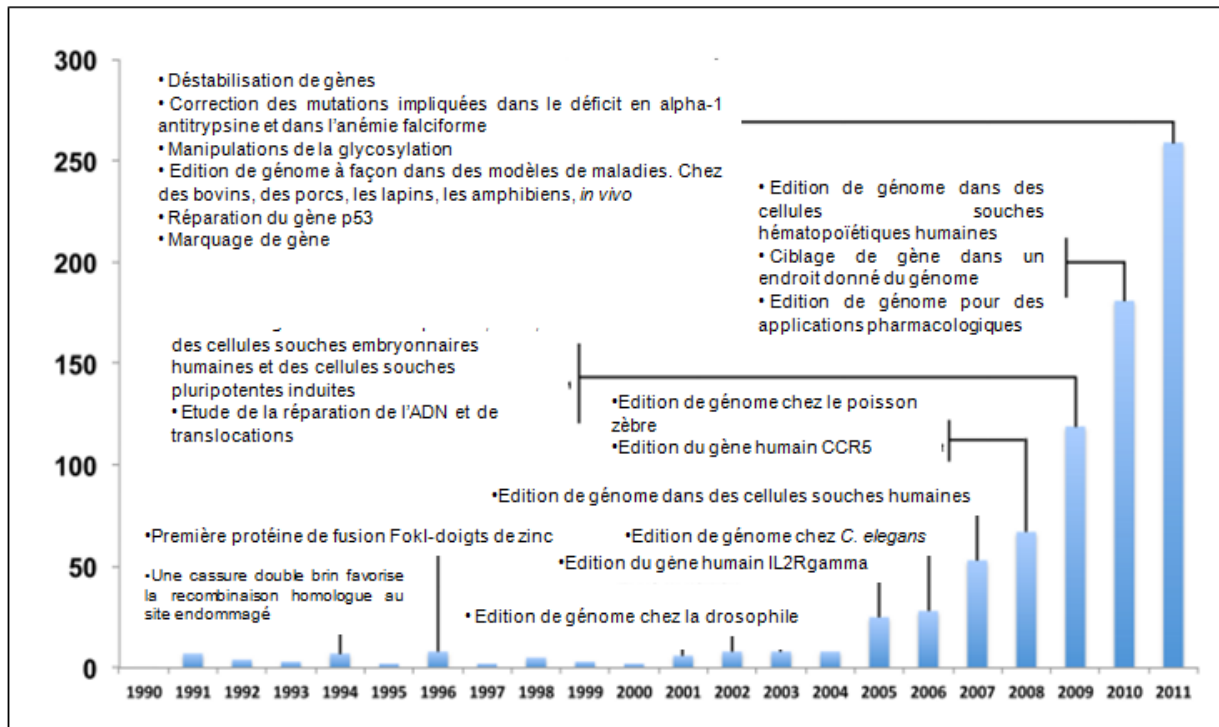


Figure 25 : Développement des applications d'édition de génome grâce aux travaux sur les endonucléases artificielles. D'après (Perez-Pinera *et al.*, 2012).

Les différentes familles d'endonucléases ont été utilisées dans de nombreuses applications dont certains exemples sont donnés dans les paragraphes correspondants, en figure 25 et au tableau 5. Les actuelles limitations à leur emploi sont majoritairement dues aux limitations de cibles et de vectorisation. Elles sont toutes potentiellement utilisables pour les différentes applications liées à l'édition du génome à façon.

Afin de pouvoir utiliser des nucléases pour des applications thérapeutiques, il est nécessaire d'associer : une bonne spécificité de reconnaissance et une bonne efficacité de coupure, des possibilités de régulation de leur activité pour éviter les effets *off-target*, des méthodes de prédiction et de détection des effets sur la cible et *off-target*, des outils de vectorisation adaptés et des techniques d'étude de potentielles RI (Cathomen and Joung, 2008). A ce jour, aucune étude de RI dans de telles approches n'a été publiée.

Parmi ces technologies, les ZFNs sont les seules utilisées dans des essais cliniques à ce jour.

Un ensemble de trois essais consiste à cibler le locus CCR5, co-récepteur du VIH, dans des lymphocytes T modifiés *ex vivo* en apportant des ZFNs via des vecteurs adénoviraux (NCT00842634, NCT01044654 – phase I, escalade de dose, NCT01252641) (Maier *et al.*, 2013; Stone *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2008). La coupure de CCR5 empêche l'entrée du virus dans les cellules corrigées et ralentit ainsi la progression de la maladie tout en restaurant des fonctions immunitaires. Malgré la description de coupures *off-target in vitro*, il n'y a pas eu d'effet secondaire grave déclaré dans ces essais à ce jour.

Un essai de phase I pour traiter le glioblastome multiforme récurrent ou chronique, une tumeur du cerveau, a été conduit en utilisant des ZFNs pour cibler un récepteur aux glucocorticoïdes en association à l'administration d'IL2 (NCT01082926) (“SB-313 - Sangamo BioSciences”)

	Densité de cibles	Facilité d'obtention de nouvelles spécificités	Exemples de vectorisation	Toxicité/Spécificité	Utilisation en phases cliniques
<b>Méganucléases</b>	-	-	Plasmide, AAVr, AdR	Faible toxicité Peu d'études d'activité off-target disponibles	Non utilisées
<b>ZFNs</b>	+	+	Plasmide, AAVr, LVr, IDLVr	Plus toxiques que les TALE nucléases dans la majorité des études comparatives	Quatre essais cliniques en cours : traitement du VIH par ciblage de CCR5 et traitement du glioblastome multiforme en ciblant un récepteur aux glucocorticoïdes
<b>TALE nucléases</b>	++	++	Plasmide, AdR	Moins toxiques que les ZFNs dans la majorité des études comparatives	Non utilisées
<b>CRISPR/Cas9</b>	+++	+++	Plasmide, LVr	Parfois activité <i>off-target</i> supérieure à l'activité au niveau de la cible	Non utilisé

Tableau 5 : Eléments de comparaison des caractéristiques essentielles des endonucléases artificielles les plus utilisées



## II-4 Utilisations des nucléases artificielles en thérapie génique

### II-4.1 De nouvelles stratégies de thérapie génique utilisant les endonucléases artificielles

Les endonucléases artificielles peuvent être utilisées en thérapie génique grâce à leur faculté à induire des CDBs dans un locus donné et à la possibilité d'utiliser les voies de réparation de ces lésions (figure 26).

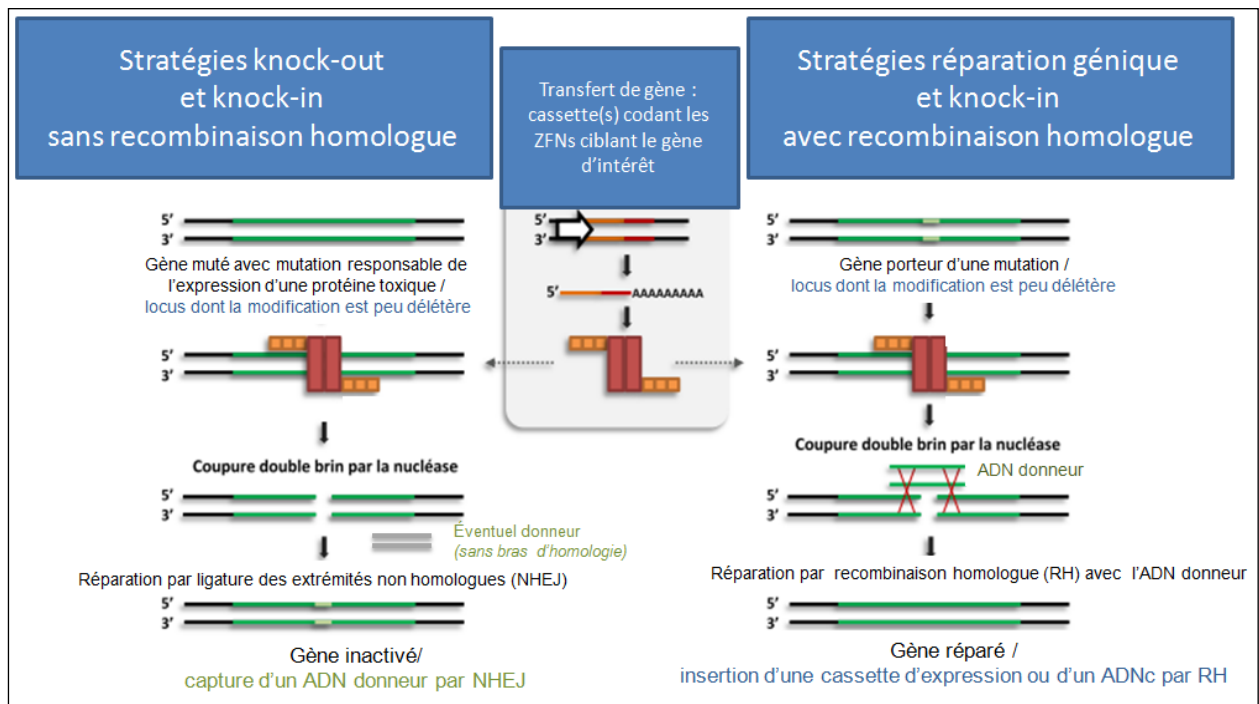


Figure 26: Stratégies d'utilisation d'endonucléases artificielles pour des applications de thérapie génique : exemple des ZFNs

D'après (Léger, 2012).

La réparation d'une CDB provoquée par les nucléases par NHEJ peut conduire à un KO, ou à un KI lors de la capture d'une construction thérapeutique.

En utilisant la RH, il est possible de réaliser un KI d'une cassette d'expression ou d'un ADNc contenant des signaux d'épissage, s'ils sont entourés de régions d'homologie au site de coupure. La RH permet aussi la correction *in situ* d'une mutation, ou réparation génique, avec un donneur non muté entouré de bras d'homologie. Cela pourrait être considéré comme le but ultime de la thérapie génique en corrigeant et en supprimant les mutations à l'origine de maladies génétiques.

Les exemples donnés ci-dessous concernent essentiellement des modèles cellulaires de lignées, de cellules primaires, de cellules souches embryonnaires ou d'iPS. De très rares

travaux ont été conduits *in vivo*. Ces travaux *in vitro* peuvent donc être considérés comme des étapes avancées pour des applications *ex vivo*, ou plus en amont pour des projets *in vivo*.

#### ***II-4.1.1 Knock-out***

L'inactivation d'un gène par KO représente une stratégie de thérapie génique pour certaines maladies.

Par exemple, il peut être intéressant d'inactiver un gène qui exprimerait de façon trop élevée une protéine toxique. Dans le déficit en A1AT, certains patients expriment une forme mutée de l'enzyme, appelée PiZ A1AT entraînant un emphysème des poumons et une maladie hépatique (Brunt *et al.*, 2010; Kaushal *et al.*, 2010). Un KO de cette forme permettrait d'améliorer l'état des patients, tandis que la réparation génique permettrait d'inactiver la production de la protéine mutée et de la remplacer par la protéine fonctionnelle.

La maladie de Huntington est liée à un trop grand nombre de triplets CAG sur le gène de la Huntingtine : la réalisation de coupures dans ces séquences permettrait de réduire la quantité de triplets et d'améliorer l'état des patients (Mittelman *et al.*, 2009).

Pour une application anti-virale, il est possible de réaliser un KO d'un gène essentiel à l'infection par un virus tel que le démontre le ciblage de la forme d'ADN circulaire clos de façon covalente (ADNccc) du virus modèle de l'hépatite B du canard bloquant sa transcription en culture *in vitro* (Zimmerman *et al.*, 2008). L'inactivation de CCR5 par des ZFNs est utilisée dans des essais cliniques pour traiter des patients atteints du sida (Maier *et al.*, 2013; Stone *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2008).

L'emploi de deux paires de ZFNs ciblant des loci proches permet de supprimer la région située entre les deux cibles. Dans une étude utilisant deux paires pour le ciblage du gène humain HoxB13, jusque 10 % des allèles ont été modifiés par délétion chromosomale (Söllü *et al.*, 2010). Deux paires à hétérodimérisation forcée avec incompatibilité entre les monomères des deux paires ont été utilisées dans ce projet. De même, il est possible de provoquer une translocation ou sa réversion en utilisant deux paires de ZFNs (Piganeau *et al.*, 2013).

### ***II-4.1.2 Knock-in***

Pour la réalisation d'un KI thérapeutique, la cible doit être choisie pour que les effets délétères liés à sa modification soient minimisés.

Par exemple, le ciblage d'un gène non exprimé pourrait avoir des effets secondaires limités. Le gène AAVS1, site d'intégration préférentiel des AAVs de type 1 dans le génome humain, a souvent été utilisé comme site d'intégration avec succès (Zou *et al.*, 2011b; DeKolver *et al.*, 2010; Hockemeyer *et al.*, 2009). Une intégration en AAVS1 d'un minigène codant gp91phox dans des iPS modèles de la granulomatose chronique liée à l'X (OMIM#306400) a permis de restaurer la production de dérivés réactifs de l'oxygène améliorant ainsi la fonction des neutrophiles (Zou *et al.*, 2011b). D'autres gènes non exprimés ont pu être ciblés mais leur accessibilité peut être réduite par rapport à des gènes transcrits comme décrit précédemment (Dupuy *et al.*, 2013; Daboussi *et al.*, 2012; Valton *et al.*, 2012).

Le locus AAVS1 semblerait utilisable pour tous les types cellulaires, mais il est également possible de choisir une cible dont la coupure ne serait pas délétère pour un type cellulaire donné. Ainsi, l'équipe de K. High a ciblé le gène de l'albumine pour y insérer un ADNc thérapeutique dans le foie (communication congrès ESGCT 2013). Ce gène est suffisamment exprimé dans le foie pour qu'une modification d'une partie des allèles ait un effet thérapeutique sans conséquence sur les fonctions de l'albumine. De plus, cela permet d'utiliser un promoteur fort et actif en permanence dans les hépatocytes pour assurer une bonne expression du gène thérapeutique. Cela peut être utilisé pour une insertion par RH, ou une insertion d'AAVr ou d'un IDLV entier puisque ces vecteurs ont tendance à s'insérer dans des CDB.

Enfin, un KI peut être envisagé dans un gène muté. Cette stratégie a permis à cette même équipe pour guérir un modèle murin d'hémophilie B en utilisant des ZFNs (Anguela *et al.*, 2013; H. Li *et al.*, 2011). Ces travaux seront détaillés au paragraphe III-1.4.1. Leurs études constituent les seuls exemples à ce jour de KI thérapeutique *in vivo* reposant sur l'utilisation de ZFNs.

### ***II-4.1.3 Réparation génique***

En réalisant une CDB proche d'une mutation et en apportant un ADN donneur portant la version non mutée d'un gène, il est possible de réparer la mutation. En restaurant une séquence non mutée, la réparation génique permet d'obtenir une expression du gène réparé contrôlée par des éléments physiologiques de régulation. C'est la seule approche permettant d'atteindre cet objectif. Cela permet d'éviter les inconvénients du *silencing* à long terme, de l'expression du transgène en dehors des cellules impliquées dans ses fonctions et des potentielles RI pouvant être liées à une expression trop élevée.

Selon l'efficacité des outils utilisés, cela peut conduire à une modification monoallélique ou biallélique. En raison de la difficulté à obtenir des modifications bialléliques, les maladies dominantes seraient plus faciles à traiter que des maladies récessives.

Le premier exemple de la preuve de principe de la faisabilité d'une réparation génique avec des ZFNs a été réalisé dans un modèle de la maladie SCIDX1 en ciblant le gène IL2R-gamma et en y introduisant un site de restriction au locus ciblé grâce à des bras d'homologie d'1kb (Urnov *et al.*, 2005). Des corrections ont également été obtenues dans des modèles cellulaires d'anémie falciforme (Sebastiano *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011a). L'association de ZFNs au système PB a conduit à la réparation de mutations responsables du déficit en A1AT dans des iPS humaines (Yusa *et al.*, 2011). Des mutations de p53 impliquées dans des cancers ont été réparées à 0,1 % (Herrmann *et al.*, 2011).

## II-4.2 Vectorisation des nucléases et de l'ADN donneur

Il est essentiel d'utiliser des méthodes de vectorisation des nucléases et des donneurs garantissant la disponibilité de ces différents éléments dans les cellules cibles avec une cinétique compatible à l'obtention d'une coupure et de sa réparation grâce au donneur, tout en conservant une toxicité minimale.

### II-4.2.1 Vectorisation des nucléases à façon

Les nucléases ont été vectorisées par différentes méthodes selon l'application souhaitée. La transfection a beaucoup été utilisée et reste envisageable pour des thérapies *ex vivo* : (Cornu *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2007; Moehle *et al.*, 2007; Porteus, 2006).

Les vecteurs viraux ont également été largement utilisés : les vecteurs adénoviraux (Li *et al.*, 2013), les LVr dont les IDLV (Joglekar *et al.*, 2013; Gabriel *et al.*, 2011; Lombardo *et al.*, 2011; Santiago *et al.*, 2008; Cornu and Cathomen, 2007; Lombardo *et al.*, 2007), les AAVr (Ellis *et al.*, 2012) et des vecteurs baculoviraux (Tay *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2011) ont permis de vectoriser ces outils.

Les nucléases peuvent également être vectorisées sous forme d'ARN ou de protéines pour limiter leur expression dans le temps (Gaj *et al.*, 2012; Izmiryan *et al.*, 2011; Geurts *et al.*, 2010).

Les ZFNs et TALENs fonctionnant par paires, il est intéressant d'obtenir l'expression des deux monomères à partir d'un seul vecteur et idéalement de manière stochastique. Pour ce faire, de nombreuses équipes ont utilisé des peptides 2A (Tian *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2008; Szymczak and Vignali, 2005). Ils permettent d'éviter l'utilisation d'une séquence d'entrée interne des ribosomes (*Ribosomes Entry Internal Site*, IRES) qui peut entraîner un déséquilibre entre les niveaux d'expression des différents transgènes de la construction (Chan *et al.*, 2011). Ce type de peptides existe chez certains virus, tels que les *Picornavirus*, pour l'expression de polyprotéines avant leur autoclivage conduisant à l'obtention de protéines matures. La séquence peptidique 2A présente un signal et une activité d'autoclivage qui conduit à un saut des ribosomes pendant la traduction. Si cette séquence est placée entre deux ORFs, dix-huit à vingt-et-un aa du peptide, selon le virus dont il est issu, ainsi qu'une proline persistent en régions C- et N-terminales des première et seconde protéines respectivement.

Une des limitations à la vectorisation des ZFNs et des TALE nucléases est la forte proportion de régions répétées. Ainsi, des vecteurs réalisant une rétrotranscription sont

susceptibles de réaliser une RH entre les régions répétées conduisant à l'intégration d'un provirus non fonctionnel. Il a ainsi été démontré qu'un monomère de TALE nucléase ne peut pas être apporté par un vecteur lentiviral, mais peut l'être par un vecteur adénoviral (Holkers *et al.*, 2013). Une stratégie récente d'optimisation de codons, analogue à celle réalisée pendant cette thèse, a permis la vectorisation des deux monomères de ZFNs d'une paire dans un seul vecteur lentiviral (Joglekar *et al.*, 2013) et d'un monomère de TALE nucléase (Yang *et al.*, 2013).

La longueur des constructions codant les nucléases restreint également les possibilités de vectorisation. Ainsi, seul un monomère de TALE nucléase peut entrer dans un ssAAVr, alors que la Cas9 de *S. pyogenes* atteint les limites d'encapsulation par exemple.

Enfin, les origines bactérienne (FokI, les TALE domaines et le système CRISPR/Cas9) et virale (peptides 2A) des éléments de ces stratégies de transfert de gène font craindre une potentielle RI. Il est alors souhaitable d'utiliser des systèmes de vectorisation peu immunogènes.

#### ***II-4.2.2 Choix du donneur pour la recombinaison homologue et de sa vectorisation***

Le donneur est la séquence exogène que l'on souhaite insérer au locus ciblé. Pour favoriser son insertion par RH, il est nécessaire de l'encadrer par des régions d'homologie.

Les donneurs peuvent être de natures très variées : leur longueur peut aller de quelques nucléotides à plusieurs kb ; il peut s'agir d'une courte séquence comme d'une séquence plus complexe tel un ADNc ou une cassette d'expression complète entourée des zones d'homologie.

Différents types de donneurs peuvent être utilisés : de l'ADN sb (Tsuchiya *et al.*, 2005; Colosimo *et al.*, 2001), de l'ADN db (Kunzelmann *et al.*, 1996; Morrison and Wagner, 1996; Deng and Capecchi, 1992a; Hunger-Bertling *et al.*, 1990), des oligonucléotides sb (Chen *et al.*, 2011; Radecke *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 2009; Radecke *et al.*, 2006), des chimères ADN/ARN (Tran *et al.*, 2003; Rando *et al.*, 2000; Cole-Strauss *et al.*, 1999) ou des TFO (Seidman and Glazer, 2003; Vasquez *et al.*, 2000). Les résultats des travaux portant sur l'utilisation de chimères ADN/ARN ont cependant souvent fait l'objet de controverse (Taubes, 2002; Yoon *et al.*, 2002; Albuquerque-Silva *et al.*, 2001; van der Steege *et al.*, 2001; Bandyopadhyay *et al.*, 1999; Kren *et al.*, 1999, 1998).

Les oligonucléotides sb contiennent l'information minimale pour que la RH ait lieu. Dans une étude sur la toxicité des ZFNs, il a été possible d'obtenir jusque 0,16 % de RH ciblée avec des oligonucléotides sb, mais six fois plus de mauvaise insertion et soixante fois plus de

réparation par NHEJ en comparaison à un donneur ADN db (Radecke *et al.*, 2010). L'utilisation d'I-SceI a permis jusque 0,2 % d'insertion ciblée des oligonucléotides sb. Dans le cas de la GFP restaurée, la réparation est fidèle dans 54 à 94 % des cas avec les oligonucléotides sb et 92 à 100 % avec de l'ADN db. Un biais est souvent décrit avec les oligonucléotides sb : le brin antisens est plus efficace pour l'induction de modifications ciblées que le brin sens (Leclerc *et al.*, 2009; Igoucheva *et al.*, 2003, 2001).

De même que pour les nucléases, une grande diversité de vecteurs viraux a été utilisée. Des vecteurs rétroviraux ont permis l'introduction de courtes mutations dans une cassette de résistance à la néomycine (Ellis and Bernstein, 1989).

Des constructions d'ADN donneur ont été vectorisées grâce à des IDLV pour une utilisation avec des ZFNs ou I-SceI (Cornu and Cathomen, 2007; Lombardo *et al.*, 2007).

Des vecteurs adénoviraux ont également été utilisés, parfois sans nucléases comme pour la correction du gène non exprimé codant la LMNA dans un modèle d'iPS (Liu *et al.*, 2011). Ces vecteurs, par leur capacité d'encapsulation allant jusqu'à environ 40kb permettent de vectoriser de longs bras d'homologie et/ou de longues constructions à insérer (Aizawa *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2011).

Les AAVr ont souvent été utilisés pour transporter des donneurs, avec ou sans utilisation de nucléases. Leur structure sb (ssAAVr), la présence d'ITR protégeant le génome et leur capacité à pénétrer dans le noyau en font de bons vecteurs pour délivrer un donneur de RH. D'une part, de nombreuses études ont été faites avec des donneurs AAVr sans utilisation de nucléases. Il est alors possible d'atteindre des fréquences de RH de  $10^{-3}$ . Il est possible de réaliser de la RH avec des AAVs présentant seulement 20 pb d'homologie : cela a permis d'atteindre jusque 30 % d'intégration (Inagaki *et al.*, 2007). Une équipe a démontré qu'en allongeant les bras d'homologie de 1700 à 3000 pb, l'efficacité du ciblage était augmentée (Hirata and Russell, 2000). Les formes d'AAV persistantes présentant deux extrémités sb linéaires peuvent interagir avec la machinerie de réparation des CDB par NHEJ. De même, l'intégration de l'AAV2 sauvage dans le locus AAVS1 prouve une interaction avec la machinerie de réparation de l'ADN. Avec des AAVr, il a été possible d'obtenir jusqu'à 1 % d'intégration dans le site de l'HPRT dans des cellules humaines (Hirata and Russell, 2000). Dans une étude de RH pour corriger le déficit en A1AT, N. Paulk décrit une meilleure efficacité et rapidité de l'AAVr 8 pour de la réparation génique par rapport à l'AAVr 2 (Paulk *et al.*, 2010). De plus, il n'y a pas d'intégration aléatoire plus forte que lors d'un transfert de gène classique lorsque la réparation génique est mise en jeu (0,5 à 1 %).

Le développement des nucléases a permis d'augmenter l'efficacité de la RH lors de l'emploi d'AAVr. En apportant un donneur dans un scAAVr en parallèle d'une coupure par I-SceI, il a été possible d'obtenir 4 % de RH (Hirsch *et al.*, 2010). La construction d'un AAVr "3-en-1" contenant une cassette codant une paire de ZFNs et un donneur a permis d'atteindre 0,4 % de correction d'une séquence de la GFP mutée (Ellis *et al.*, 2012). De plus, l'ajout d'inhibiteur de protéasome et/ou d'histone désacétylase permet d'augmenter ce niveau de RH jusqu'à six fois.

La longueur des bras d'homologie varie fortement. Il est souvent considéré que plus ils sont longs, plus la probabilité de RH est forte. Chez les Mammifères, on parle de régions de conversion (*conversion tracts*) pour désigner les zones impliquées dans la RH au niveau du donneur et du locus ciblé. Un minimum de 300 pb serait adapté pour une RH dans des cellules de Mammifères. Les travaux de M. R. Capecchi ont également posé les bases des approches de modification ciblée du génome. Ses études montrent l'importance de longues régions d'homologie ininterrompues avec une efficacité de ciblage augmentant exponentiellement avec la longueur d'homologie jusqu'à atteindre un plateau avec 14 kb d'homologie (Deng and Capecchi, 1992b). En 2007, M.R. Capecchi a obtenu le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine, en même temps que M.J. Evans et O. Smithies "*pour leurs découvertes des principes nécessaires à l'introduction de modifications génétiques spécifiques chez la souris en utilisant des cellules souches embryonnaires*".

Il est à noter que des molécules linéaires, des AAVr et des IDLVs s'intègrent facilement au niveau de CDB en l'absence d'homologie (Gabriel *et al.*, 2011; Gellhaus *et al.*, 2010; Haviv-Chesner *et al.*, 2007; Lin and Waldman, 2001a, 2001b; Miller *et al.*, 2003). Il est donc possible de les utiliser comme donneurs sans bras d'homologie : le ciblage se fait alors via leur capture par NHEJ. Si la construction à insérer comporte des sites accepteurs d'épissage, il est possible de faire exprimer le transgène à partir du promoteur du locus ciblé, voire d'utiliser ses premiers exons avant ceux de l'ADNc donneur (Anguela *et al.*, 2013; H. Li *et al.*, 2011).

Lorsque la modification ne concerne qu'une très courte séquence, il est probable que le donneur contienne la cible des nucléases. Or, cela peut conduire à la coupure du donneur ou de la séquence réparée. L'insertion de mutations silencieuses dans le donneur permet d'empêcher ces coupures délétères. Cela revient à une stratégie d'optimisation de codons du donneur. Cependant, il a été montré que le niveau d'homologie est un élément essentiel : il est



nécessaire que les différences de séquences entre le donneur et la cible soient minimales (Scheerer and Adair, 1994; Deng and Capecchi, 1992a).

L'efficacité de la RH dépend aussi du type de mutation. Ainsi, il semble plus complexe de corriger une courte insertion qu'une courte délétion dès un nucléotide de différence. De plus, la nature des nucléotides impliqués dans les mutations à corriger influe également sur l'efficacité de réparation (Inoue *et al.*, 2001). Il est recommandé de centrer la mutation à introduire sur le donneur pour une bonne efficacité.

Les donneurs comportent parfois des éléments de sélection des cellules modifiées. Cela peut être une cassette de résistance à un antibiotique par exemple, et elle peut être excisée si elle est entourée de sites Lox (Hockemeyer *et al.*, 2011).

De même que la comparaison des nucléases est complexe, celles des donneurs l'est pour les mêmes raisons (Leclerc *et al.*, 2009). Cela souligne l'importance de l'adaptation du donneur en fonction de différentes caractéristiques telles que le locus ciblé, les modifications à apporter, les possibilités de sélection et de vectorisation.

### ***II-1.4.3 Voies d'amélioration de la fréquence de la recombinaison homologue***

Le niveau de RH spontané ou après CDB peut suffire à atteindre une efficacité thérapeutique dans de nombreuses applications. En complément des paramètres d'optimisation décrits ci-dessus, il est possible de moduler directement la réparation de l'ADN par différentes techniques. Celles-ci seront décrites dans un contexte de thérapie génique du foie qui est l'organe cible des stratégies développées dans ce projet de thèse.

#### **Modulations de l'expression de facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN**

Pour augmenter la fréquence de RH dans un système, il est possible d'influer sur l'expression des facteurs nécessaires à la RH et à la NHEJ.

Des équipes ont essayé d'augmenter de niveau de RH en modulant l'expression de protéines impliquées lorsque celui-ci est trop faible pour obtenir un effet thérapeutique.

Des travaux ont démontré l'intérêt de la surexpression de la hRAD51 *in vitro* : cela a permis de multiplier par deux le taux de RH observé dans un modèle cellulaire (Yáñez and Porter, 1999). La surexpression de la protéine bactérienne RecA, homologue de la Rad51, a permis d'augmenter le niveau de RH dans des cellules murines de dix fois (Shcherbakova *et al.*,

2000). Une étude de S. Vispe *et al.* a permis d'augmenter ces phénomènes de vingt fois en surexprimant la Rad51 dans des cellules CHO (Vispe *et al.*, 1998).

La surexpression de Rad52 a permis d'augmenter le taux de RH de vingt fois dans des cellules de singe en culture. Au contraire de ce qui est observé avec la surexpression de Rad51, l'expression de Rad52 réduit l'intégration ciblée et favorise la RH extrachromosomique (Yáñez and Porter, 2002). Le niveau d'inhibition par la surexpression de Rad52 est équivalent au niveau d'augmentation lors de la surexpression de Rad51.

Une seconde possibilité pour favoriser la RH consiste à inhiber les autres voies de réparation et d'intégration non ciblée d'ADN exogène. La NHEJ et la RH étant fortement liés, le but est d'augmenter la proportion de RH en diminuant la proportion de NHEJ.

Certaines molécules telles que les inhibiteurs de la poly-ADP-ribose polymérase (PARP) permettent de réduire le niveau d'intégration aléatoire dans le génome et d'augmenter d'autant la proportion d'intégration ciblée (Waldman *et al.*, 1996).

Un ciblage de l'intégration d'ADN thérapeutique a été testé dans des hépatocytes avec l'utilisation d'oligonucléotides complémentaires de la zone mutée, mais cela entrerait en compétition avec d'autres mécanismes telle que la MMR (Igoucheva *et al.*, 2008). Lorsque ces phénomènes sont inhibés, la RH peut être augmentée de soixante fois.

Dans un modèle de souris FAH, l'efficacité de RH a été augmentée de dix fois jusqu'à environ 1 % en utilisant de la vanilline comme inhibiteur de la NHEJ (Paulk *et al.*, 2012). Dans ce modèle, les cellules corrigées ont un avantage sélectif et une correction moindre peut suffire, mais ce traitement peut être une solution pour des maladies nécessitant un niveau de correction supérieur. La vanilline agit comme inhibiteur de la NHEJ grâce à sa fixation à la Protéine Kinase Dépendante de l'ADN (DNA-PK) (Durant and Karran, 2003).

### **Modification du cycle cellulaire**

Une stratégie alternative consiste à permettre l'entrée des cellules cibles dans les phases G2 et S du cycle cellulaire qui sont favorables à la RH.

C'est pourquoi, afin d'établir des preuves de principes de la faisabilité d'approches utilisant la RH dans le foie, beaucoup d'études ont été menées dans un contexte de foie en prolifération ou de lignées cellulaires telles que les HepG2. Dans un foie en division, chez des animaux jeunes ou lors de régénération, le taux de RH peut-être augmenté jusqu'à trente-cinq fois (Thyagarajan *et al.*, 1996a)

### **III- Applications des stratégies de thérapie génique utilisant des nucléases artificielles et la recombinaison homologue au traitement de maladies métaboliques du foie**

#### **III-1 Le foie comme organe cible de la thérapie génique**

Le foie est un carrefour de voies métaboliques qui correspondent à autant de maladies génétiques potentielles. De par son rôle central dans l'organisme, il n'est pas rare qu'une maladie affectant le foie ait des répercussions extra-hépatiques.

De nombreuses maladies métaboliques héréditaires du foie sont actuellement traitées de façon palliative. Les solutions curatives sont rares et la transplantation hépatique est souvent la seule possibilité (Levi *et al.*, 2001; Lysy *et al.*, 2008). Il s'agit d'une intervention lourde qui nécessite un suivi rapproché des patients et une immunosuppression à vie. De plus, le manque de greffons disponibles reste encore aujourd'hui un frein conséquent à ce choix.

La thérapie génique représenterait donc une nouvelle option thérapeutique pour les maladies métaboliques héréditaires du foie. Cela est d'autant plus vrai que des maladies comme la maladie de CNI, la maladie de Wilson ou des déficits en facteurs de la coagulation sont des maladies monogéniques. Il est donc possible d'apporter un seul gène thérapeutique, soit dans les hépatocytes, soit dans une cellule cible en dehors du foie (Jia and Dankó, 2005; Dankó *et al.*, 2004a).

#### **III-1.1 Eléments d'anatomie, d'histologie et de métabolisme du foie nécessaires à la compréhension des approches de thérapie génique des maladies hépatiques**

##### ***Eléments d'anatomie du foie***

Le foie est un organe situé dans l'abdomen en arrière du diaphragme. Cet organe impair et asymétrique pèse environ 2 kg chez l'adulte, dont 800 g représentent la masse sanguine qu'il contient. Cet organe présente une face diaphragmatique où se trouve le ligament falciforme et une face viscérale en contact avec la vésicule biliaire où pénètre le hile du foie (figure 27). Le foie est entouré de la capsule de Glisson. Il dispose d'un système de vascularisation unique dans l'organisme : le système porte. Il reçoit 70 % du sang à partir de la veine porte qui draine les intestins avant d'être lui-même drainé par les veines sus-hépatiques qui se jettent dans la

veine cave inférieure. Du sang oxygéné en provenance du cœur gauche est également apporté au foie par l'artère hépatique. Chez l'homme, on décrit deux lobes : le lobe droit et le lobe gauche, séparés par le ligament falciforme. On désigne parfois deux autres lobes de taille inférieure : le lobe carré et le lobe caudé, ou lobe de Spiegel. La bile s'accumule dans les canaux hépatiques qui se rejoignent en un canal hépatique commun. Ce dernier est rejoint par le canal cystique sortant de la vésicule biliaire pour former le canal cholédoque qui débouche sur le duodénum.

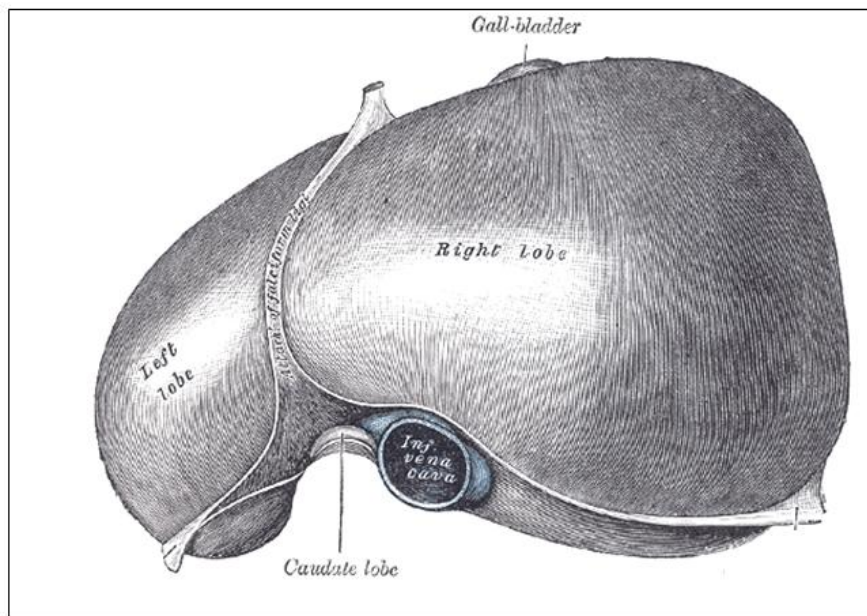


Figure \_\_\_\_\_ 27 : Anatomie du foie (vue crâniale). D'après (Rhimes, 2005; Henry Gray and Lewis, 1918) *Left lobe* : Lobe gauche ; *Right lobe* : Lobe droit ; *Caudate lobe* : lobe caudé ; *falciforme lig* : ligament falciforme, *Gall bladder* : vésicule biliaire ; *Inf vena cava* : veine cave inférieure

### ***Eléments d'histologie du foie***

Le parenchyme hépatique est subdivisé en unités histologiques et fonctionnelles appelés lobules hépatiques (figure 28). Chaque lobule hexagonal est organisé autour d'une veine centrolobulaire et est entouré de tissu conjonctif contenant six espaces portes de Kiernan. Dans chaque espace porte débouchent des branches de l'artère hépatique, de la veine porte, un canal biliaire interlobulaire et des vaisseaux lymphatiques. Les veines centrolobulaires se rejoignent pour former les veines sus-hépatiques.

Les hépatocytes constituent environ deux tiers des cellules du foie, ils sont organisés en travées de Remak autour de la veine centrolobulaire.

Les cellules sinusoidales sont des cellules endothéliales tapissant les capillaires sinusoides qui séparent les travées de Remak. Les capillaires du foie ont la particularité d'être fenestrés. Les pores ont un diamètre d'environ 100 nm facilitant les échanges entre le sang et les hépatocytes.

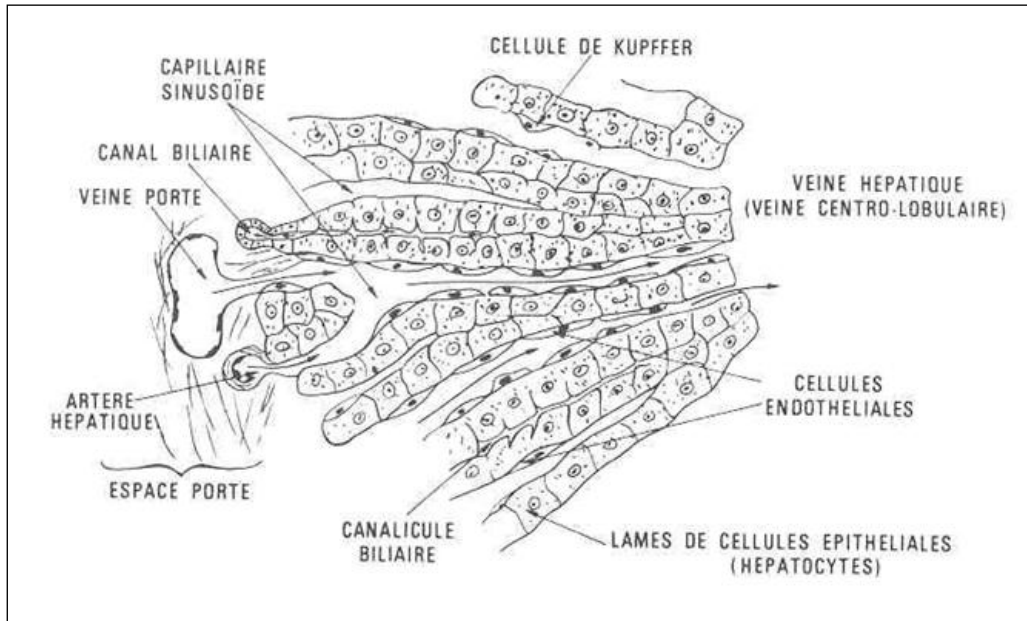


Figure 28 : Histologie du lobule hépatique. Les flèches indiquent le sens des circulations sanguine et biliaire. D'après ("Prise en charge anesthésique d'un enfant")

La bile est sécrétée dans les canalicules biliaires, orientés perpendiculairement aux sinusoides et tapissés des cellules des canaux biliaires. Ces canalicules rejoignent les canaux de Hering, les canaux biliaires puis les canaux hépatiques.

Les autres types cellulaires sont : les cellules de Kupffer qui sont les macrophages du foie, les cellules stellaires ou cellules de Ito situées dans l'espace de Disse, entre les hépatocytes et les cellules sinusoidales, et des lymphocytes.

### ***Eléments du métabolisme du foie***

Le foie est un organe impliqué dans de nombreuses voies métaboliques assurant trois fonctions principales de stockage, de synthèse et de détoxification.

En ce qui concerne le métabolisme des glucides, c'est un organe de synthèse et de catabolisme du glycogène, via la glycolyse et la néoglucogenèse. Il contribue ainsi au maintien de la glycémie. Il intervient dans le métabolisme des lipides notamment via la production des triglycérides et la  $\beta$ -oxydation des acides gras, les synthèse et dégradation du cholestérol et la synthèse des lipoprotéines. Dans le métabolisme des protéines et des acides aminés, il intervient dans le cycle de l'urée et la synthèse de protéines plasmatiques dont des facteurs de la coagulation.

Il réalise le stockage du fer et du cuivre et des vitamines A, D, E, K et B12.

C'est un organe essentiel dans la détoxification de substances endogènes, via la conjugaison de la bilirubine par exemple, et de xénobiotiques tels que des dérivés de la morphine, des oestromimétiques ou l'alcool.

Il réalise également la synthèse de la bile stockée dans la vésicule biliaire qui est apportée au duodénum via le canal cholédoque.

### **III-1.2 Caractéristiques du foie utilisées dans les stratégies de thérapie génique**

Le foie présente différentes caractéristiques avantageuses pour la thérapie génique (Ferry, 2003; Nguyen and Ferry, 2004; Prieto *et al.*, 2004).

Le foie est un organe impair : cela restreint le ciblage à un parenchyme unique relativement homogène et localisé.

Ces organe est abondamment vascularisé : cela le rend facile d'accès par des injections périphériques ou en veine porte. D'autre part, cet organe est irrigué par un système porte dont le deuxième réseau capillaire hépatique a la particularité d'être constitué d'un épithélium fenestré. Ses ouvertures facilitent l'accès de vecteurs thérapeutiques aux cellules cibles en diminuant le nombre de barrières naturelles à franchir (Wisse *et al.*, 2008). La taille des pores est compatible avec celles des LV et des Ad recombinants par exemple.

Enfin, ses capacités uniques de régénération permettent d'envisager facilement la transplantation d'hépatocytes corrigés et leur multiplication, ou la stimulation de la régénération pour permettre la multiplication de cellules corrigées par transfert de gène *in vivo* (Ferry *et al.*, 1991).

Pour la thérapie génique du foie, il est possible d'envisager des stratégies *ex vivo* ou *in vivo*.

Des techniques de prélèvement des hépatocytes par perfusion du foie ont été mises au point et l'utilisation de vecteurs viraux permet de réaliser un transfert de gène sur des hépatocytes primaires en culture, avant de les transplanter chez les patients (Dagher *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009; Parouchev *et al.*, 2006). C'est ainsi que le premier essai clinique de thérapie génique du foie a été mis en place pour le traitement *ex vivo* de l'hypercholestérolémie familiale (voir paragraphe III-1.3.1, figure 29) (Grossman *et al.*, 1994).

Pour les approches *in vivo*, il est possible d'injecter les vecteurs par voie veineuse ou artérielle. Il est souhaitable d'apporter suffisamment d'ADN thérapeutique aux cellules cibles

en évitant la dissémination aux autres cellules et organes. Suite aux techniques initiales d'injection par voie veineuse périphérique, l'injection locale en veine porte a été beaucoup utilisée. Puis, des techniques chirurgicales plus spécifiques ont permis d'améliorer le ciblage des hépatocytes : des injections en foie isolé, voire en lobe isolé, parfois associées à une injection en hyperpression et un lavage avant injection et/ou avant le déclampage ont été testées (Schmitt *et al.*, 2010a; Dariel *et al.*, 2009; Kamimura *et al.*, 2009; Suda *et al.*, 2008). Il est à noter qu'en termes de dissémination, ces injections sont préférables aux injections par voies intrapéritonéale ou veineuse périphérique par exemple.

L'injection par hyperpression en veine de la queue ou l'injection intraparenchymale, associée ou non à un massage mécanique ont été utilisées pour apporter l'ADN thérapeutique sous forme de plasmide en l'absence de vecteurs viraux.

Le foie a des propriétés immunologiques particulières. L'observation clinique de rejets de greffe moins fréquents lors de transplantation de foie par rapport à d'autres organes représente le point de départ de sa reconnaissance en tant qu'organe capable d'induire une tolérance (Calne, 2000; Calne *et al.*, 1969). Dans les protocoles de transfert de gène, le foie est souvent décrit comme capable d'induire une tolérance immunologique aux produits des transgènes (Herzog, 2010).

Les cellules de Kupffer sont les macrophages du foie, ils ont notamment un rôle de CPA. Des cellules dendritiques conventionnelles et plasmacytoïdes, les cellules sinusoidales et différents types de lymphocytes tels que les cellules NK, les CD4+ et les CD8+ peuvent aussi intervenir dans les RI qui ont lieu dans le foie. Etant très vascularisé, cet organe représente un carrefour de contact entre l'organisme, les antigènes circulants et les CPA (Crispe, 2009). Les CPA du foie peuvent être tolérogènes ou favoriser les RI. Ces cellules et les hépatocytes peuvent présenter les antigènes via les CMH de classe I et II, mettre en place des signaux de co-stimulation pour les lymphocytes et provoquer la synthèse de cytokines immunorégulatrices.

Le potentiel tolérogénique du foie peut être dû à un déficit d'activation ou la délétion en lymphocytes T cytotoxiques, à des propriétés immunosuppressives des cellules de Kupffer ou une sensibilité réduite du foie aux réponses cytotoxiques (Annoni *et al.*, 2013).

Lors d'une présentation d'antigène conduisant à l'induction d'une tolérance, des lymphocytes T CD4+ CD25+ FoxP3+ régulateurs prolifèrent (LoDuca *et al.*, 2009). C'est le cas dans un traitement de modèle murin d'hémophilie B : le transfert d'IDLV codant le facteur IX a entraîné l'induction de Tregs spécifiques du FIX comme démontré par leur transfert adoptif à des souris naïves (Mátrai *et al.*, 2011). Ces cellules ont un effet suppressif sur les lymphocytes

cytotoxiques CD8+ et sur le déclenchement de réponses humorales. Ces conséquences portant sur des éléments circulants du système immunitaire, la tolérance dont le foie est le siège est généralisée à l'organisme (Crispe, 2009; LoDuca *et al.*, 2009).

Malgré de nombreux exemples d'effets tolérogéniques, certains protocoles ont mis en évidence des RI contre le produit du transgène lors d'un transfert de gène dans le foie ou contre les capsides d'AAVr par exemple (Gao *et al.*, 2009; Manno *et al.*, 2006; Nathwani *et al.*, 2011). Néanmoins, les effets tolérogènes ont été retrouvés dans des modèles de gros animaux tels que des primates (Mingozzi *et al.*, 2007). De plus, il existe des différences dans l'induction de la tolérance entre les sérotypes d'AAVr. Ainsi, l'AAVr 8 est peu susceptible de provoquer une réponse cytotoxique contre sa capside chez la souris ou les primates non humains, probablement à cause d'une interaction limitée avec les cellules dendritiques (Vandenberghe *et al.*, 2006). Il est également réputé comme un bon inducteur de tolérance dans le transfert de gène dans le foie (LoDuca *et al.*, 2009).

La tolérance induite dans les protocoles de transfert de gène dépend du type de vecteur. La dose de vecteur utilisée influe également comme démontré lors de l'essai chez les patients hémophiles avec une plus forte réponse contre la capside de l'AAVr lors d'injection des doses moyenne ou élevée (Nathwani *et al.*, 2011).

Des études montrent également l'effet synergique de cette tolérance et de techniques de ciblage telles que le pseudotypage ou l'utilisation de miR pour favoriser l'efficacité et la biosécurité du transfert de gène dans le foie (Annoni *et al.*, 2009; Matsui *et al.*, 2011).

Enfin, l'âge auquel le transfert de gène a lieu détermine également les possibilités d'induction de la tolérance immune. Ainsi, une injection de vecteurs AAVr *in utero*, soit chez des animaux avec un système immunitaire immature, a induit une tolérance permettant de réinjecter du FIX humain ou le vecteur à l'âge adulte (Waddington *et al.*, 2003). A l'inverse, des souris adultes non injectées *in utero* développent une RI contre le hFIX. Au-delà de la maturité du système immunitaire, la transduction varie en fonction de l'âge. L'efficacité de transduction et les cellules atteintes sont des facteurs qui pourraient faire pencher la balance entre la tolérance et l'immunogénicité. Par exemple, il a été décrit que des AAVr transduisaient la rate de façon différentielle en fonction de l'âge des animaux (Cotugno *et al.*, 2012). Une forte transduction de cet organe, ou d'organes ou cellules impliqués dans la RI, pourrait donc favoriser une RI. Au contraire, la transduction réduite de tels organes favoriserait la tolérance.



### **III-1.3 Maladies hépatiques candidates à la thérapie génique**

Dans ce paragraphe, des exemples de maladies hépatiques considérées comme des candidates privilégiées à la thérapie génique seront présentés. Ce paragraphe n'a pas pour but de dresser une liste exhaustive de ces maladies, les exemples choisis concernent des maladies bien représentées dans les travaux de thérapie génique (pour une liste plus complète, voir tableau 6). Ces maladies sont classées en deux catégories en fonction de leur association ou non à des atteintes hépatiques. La maladie de CNI, maladie modèle utilisée dans notre projet de thèse, sera décrite en détail au paragraphe III-2.

Pour certaines des maladies citées dans le tableau 6, il existe des traitements dits conventionnels. Ainsi, pour la maladie de Wilson, les patients sont traités par des chélateurs de cuivre. Cependant, il existe des patients présentant une résistance à ce type de traitement comme ceux ayant une atteinte neurologique. Une stratégie de thérapie génique peut alors représenter une nouvelle alternative également applicable aux patients tolérant les traitements classiques si la balance bénéfique/risque penche en faveur de ces thérapies innovantes.

Dans le cas des maladies ayant des répercussions au niveau du foie, les cellules corrigées ont souvent un avantage sélectif sur les cellules atteintes : une correction d'un faible nombre de cellules suffit alors à atteindre un effet thérapeutique.

Lorsque les patients présentent des atteintes hépatiques, l'histologie du foie est généralement modifiée. Les patients atteints de la maladie de Wilson présentent par exemple des nodules de prolifération cellulaire. Il est alors nécessaire d'adapter notamment les techniques de vectorisation et les doses à utiliser pour obtenir des effets thérapeutiques. De plus, le foie peut alors présenter un niveau d'inflammation favorisant une réponse inflammatoire ou immunitaire supérieure à celle qui peut se mettre en place en dehors de ce type de contexte.

Les hémophilies A et B et la maladie de CNI représentent par exemple de bonnes candidates à la thérapie génique. En effet, dans ces maladies, l'histologie du foie est conservée, il est donc relativement plus simple de cibler les hépatocytes dans ce contexte, et seule la correction d'une faible proportion de cellules permet d'obtenir un effet thérapeutique même en absence d'avantage sélectif des cellules corrigées.

Maladie hépatique	Modèle animal
Maladies avec atteintes extra-hépatiques	
Afibrinogénémié	Souris déficiente en fibrinogène
Analbuminémie	Rat nagase déficient en albumine
Maladie de Crigler Najjar de type I	Rat Gunn déficient en UGT1A1 (modèle spontané) et souris déficiente en UGT1A1
Hypercholestérolémie familiale de type IIa	Souris déficiente en LDLR et lapin Watanabe présentant une hyperlipidémie héréditaire
Galactosémie	Souris déficiente en galactose-1-phosphate uridyl transférase
Hémophilie A	Souris et chien déficients en facteur VIII
Hémophilie B	Souris et chien déficients en facteur IX
Déficit en ornithine-transcarbamylyase	Souris sparse-fur (SPF), déficient en ornithine transcarbamylyase
Phénylcétonurie	Souris déficiente en phénylalanine hydroxylase
Maladies avec atteintes hépatiques	
Déficit en alpha-1 antitrypsine	Souris transgénique porteuse de la version mutée du gène de l'alpha-1-antitrypsine, allèle PiZ
Protoporphirie érythropoïétique	Souris déficiente en ferrocélatase
Maladie de Gaucher	Souris déficiente en glucocérebrosidase
Maladie de stockage du glycogène de type Ia	Souris déficiente en glucose-6-phosphatase
Maladie de stockage du glycogène de type II	Souris déficiente en acide-alpha-glucosidase
Mucopolysaccharidose de type I	Souris déficiente en alpha-L-iduronidase
Mucopolysaccharidose de type VII	Souris, chat et chien déficients en bêta-glucuronidase
Maladie de Niemann-Pick de type C	Souris déficiente en Niemann Pick 1
Cholestase intrahépatique progressive familiale de type II	Souris déficiente en transporteurs des sels biliaires
Cholestase intrahépatique progressive familiale de type 3	Souris déficiente en mdr2
Tyrosinémie de type I	Souris déficiente en fumarylacétoacétate
Maladie de Wilson	Rat Long Evans Cinnamon, déficient en ATPase ATP7B

Tableau 6 : Maladies métaboliques du foie candidates à la thérapie génique

Ce tableau contient des exemples de maladies métaboliques monogéniques du foie susceptibles de faire l'objet d'approches de thérapie génique. Elles sont classées en fonction de leur association ou non à des atteintes hépatiques.

### ***III-1.3.1 Exemples de maladies hépatiques candidates à la thérapie génique non associées à des atteintes hépatiques***

#### **L'hypercholestérolémie familiale de type Ia**

L'hypercholestérolémie familiale de type Ia (HF Ia OMIM#143890) est une maladie autosomale dominante due à une mutation du gène codant le LDLR ("Hypercholestérolémie Familiale (HF) : définition, comprendre l'hypercholestérolémie, prévenir et traiter", "Orphanet: Hypercholestérolémie familiale"). Les mutations décrites sont à l'origine d'une élévation isolée des LDL circulantes et d'une synthèse excessive de cholestérol dont la durée de vie dans le sang est augmentée. Cela entraîne une hypercholestérolémie avec des dépôts de cholestérol dans des tissus et notamment une atteinte liée aux dépôts vasculaires.

Les patients sont traités grâce à un régime hypocholestérolémiant et des inducteurs du LDLR. Ils sont donc amenés à prendre des statines, associées ou non à des inhibiteurs d'absorption du cholestérol, et des résines. Pour les atteintes les plus graves, une aphérese LDL peut être envisagée à intervalles d'une à deux semaines. Il est également possible d'envisager la greffe de foie comme traitement palliatif.

Le principal modèle animal pour l'étude de cette maladie est le lapin Watanabe. Il existe également des modèles murins et porcins.

Cette maladie a fait l'objet du premier essai clinique de thérapie génique du foie (figure 29).

Ce premier essai a été un protocole *ex vivo* de transduction d'hépatocytes avec des vecteurs oncorétroviraux pour traiter l'hypercholestérolémie familiale. Il a été mis en place en 1992, par l'équipe du Dr J.M. Wilson (Grossman *et al.*, 1994). Chez une patiente traitée lors de cet essai, quinze pourcent du foie ont été prélevés avant digestion par la collagénase pour séparer les hépatocytes, puis ceux-ci ont été mis en culture avant transduction et transplantation. La transduction via des vecteurs rétroviraux exprimant le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (*low density lipoproteins receptor*, LDLR) a eu lieu quarante-huit heures après l'isolement d'hépatocytes.

Après un suivi de dix-huit mois, la présence d'hépatocytes transplantés et l'expression du transgène concernaient 0,1 à 0,01 % des cellules. Une amélioration métabolique a été mise en évidence par la baisse du niveau de LDL, l'augmentation du niveau de lipoprotéines de haute densité (*high density lipoproteins*, HDL) et la baisse du ratio LDL/HDL. Ces améliorations ont été amplifiées lors d'un traitement associé à la lovastatine auquel la patiente a mieux

répondu qu'avant la thérapie génique : ces deux traitements ont agi en synergie. Cependant, cette patiente possédait des allèles défectifs responsables d'un niveau d'expression résiduel de LDLR. La seule manipulation chirurgicale du foie a pu augmenter cette expression et pourrait expliquer les changements observés. Par la suite, le traitement de patients présentant l'allèle nul a permis de mettre en évidence une baisse du taux de LDL avec une forte variation d'un patient à l'autre (Grossman *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1994).

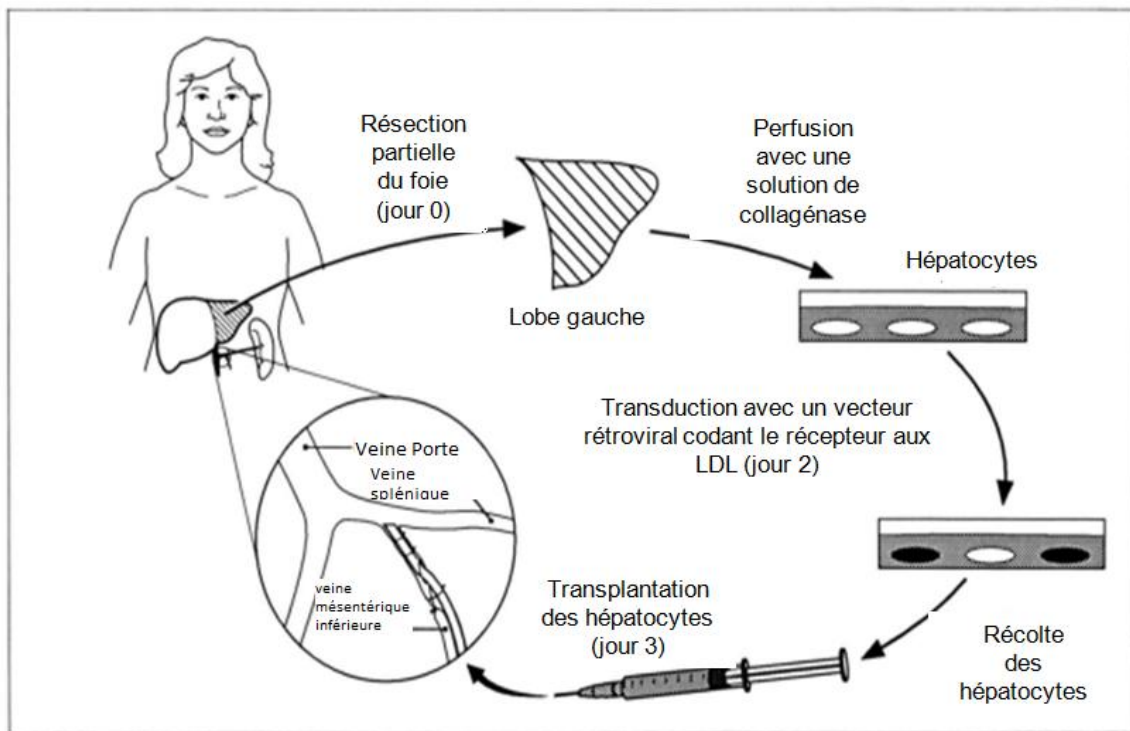


Figure 29 : Protocole du premier essai de thérapie génique du foie : traitement de l'hypercholestérolémie familiale par transduction d'hépatocytes *ex vivo* par des vecteurs oncorétroviraux.

Ce premier essai a démontré la faisabilité et la biosécurité d'une telle approche pour cet organe et a ouvert la voie à de nombreux projets jusqu'à aujourd'hui. Ces travaux pionniers, essentiels scientifiquement, sont également nécessaires pour poser les bases d'une réflexion éthique ; c'est ainsi que cet essai a été commenté dans un article en tant que "chirurgie génétique héroïque" (Weatherall, 1994). Des nouvelles méthodes de transplantation d'hépatocytes devraient permettre d'optimiser ce type d'approche *ex vivo*. Ainsi, l'embolisation de branches de la veine porte chez des primates a permis la transplantation d'hépatocytes primaires transduits, représentant 2 % des hépatocytes dans lesquels l'expression du transgène à long terme permet d'envisager de nouvelles applications

thérapeutiques (Dagher *et al.*, 2009). La même stratégie employée chez le lapin Watanabe a confirmé l'intérêt de cette technique (Goulinet-Mainot *et al.*, 2012).

La diminution du taux de LDL ou l'augmentation du taux de HDL pouvant limiter les atteintes vasculaires, une équipe a comparé le transfert des gènes codant l'apolipoprotéine E3 (ApoE3) et/ou le LDLR via un vecteur adénoviral *helper* dépendant *in vivo*. L'expression d'ApoE3 n'a fait que retarder l'apparition de ces complications. A l'inverse, le transfert du LDLR ou des deux gènes permet la régression des lésions vasculaires. Ces effets sont principalement attribués à l'expression du LDLR : son transfert représente une nouvelle possibilité pour empêcher ou faire régresser les phénomènes d'athérosclérose.

Dans un modèle amélioré de souris humanisées, des animaux mimant les phénotypes des patients hétérozygotes et homozygotes ont été traités avec succès avec des AAVr 2/8 exprimant le LDLR humain avec  $1.5 \times 10^{11}$  et  $5 \times 10^{11}$  vg/kg (Kassim *et al.*, 2013). L'efficacité de cette approche a montré son intérêt dans le traitement des différentes formes de la maladie.

### **Les hémophilies A et B**

Les coagulopathies peuvent être liées à un déficit en un ou plusieurs facteurs des voies extrinsèque et/ou intrinsèque de la coagulation ("Association Française des Hémophiles", "Orphanet: Hémophilie"). Les déficits en facteurs VIII et IX, appelés respectivement hémophilie A (OMIM#306700) et B (OMIM#306900), sont les plus fréquentes. Ce sont des maladies récessives liées à l'X. La gravité clinique dépend du niveau d'expression résiduelle en FVIII et FIX. Les patients présentent des saignements extériorisés prolongés, des hématomes et des hémarthroses. La maladie peut être qualifiée de sévère, modérée ou mineure si l'expression du FIX est de moins de 1 %, de 1 à 5 % ou de 6 à 25 % des niveaux usuels respectivement.

Les patients sont traités avec des dérivés plasmatiques ou des facteurs recombinants pour restaurer un niveau de facteur de la coagulation correct. L'efficacité de ces traitements est réduite en présence d'anticorps dirigés contre ces facteurs, appelés inhibiteurs.

Les hémophilies A et B sont les maladies les plus étudiées des études précliniques et cliniques de thérapie génique du foie (Skinner, 2013; Chuah and Vandendriessche, 2012; High, 2012). Des modèles de souris transgéniques, de chiens hémophiles et de primates ont été développés pour l'étude de traitements de l'hémophilie (Cantore *et al.*, 2012; H. Li *et al.*, 2011; Nichols *et al.*, 2009; Nathwani *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 1993). Des vecteurs

adénoviraux, lentiviraux et AAVr ont été utilisés (Brunetti-Pierri *et al.*, 2012; Follenzi *et al.*, 2004; Nathwani *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2000).

En utilisant une approche chirurgicale d'injection de vecteur AdR *helper dependent* en foie isolé limitant leur dissémination, il a été possible d'obtenir une expression du FIX à long terme aux plus hautes doses utilisées, de  $1 \times 10^{12}$  et  $1 \times 10^{11}$  pv/kg, avec une toxicité réduite par rapport aux générations de vecteurs adénoviraux antérieures (Brunetti-Pierri *et al.*, 2012).

Un des premiers essais chez des patients atteints d'hémophilie B avec un AAVr 2, a conduit à une efficacité limitée dans le temps à cause de l'apparition d'une RI cytotoxique dirigée contre la capsid, responsable de l'élimination d'hépatocytes transduits (Manno *et al.*, 2006).

Récemment, un essai a été conduit avec un scAAV 2/8 LP1-FIX avec codon optimisé injecté par voie veineuse périphérique (Nathwani *et al.*, 2011; Ponder, 2011). Les doses de  $2 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$  et  $2 \times 10^{12}$  vg/kg ont été utilisées chez des patients ne présentant pas d'anticorps anti-AAV8. Une élévation transitoire des transaminases hépatiques a été observée et traitée avec des corticoïdes. Une réponse de type primaire contre la capsid de l'AAVr 8 a été mise en évidence sans réponse contre le FIX. Tous les participants ont exprimé de façon prolongée le FIX avec une correction totale du phénotype chez quatre patients sur six, et l'espaceur des prises du traitement conventionnel chez les deux autres patients.

Comme évoqué précédemment, c'est la seule maladie modèle ayant fait l'objet d'un KI ciblé *in vivo* avec l'utilisation de ZFNs et d'un donneur vectorisés par des AAVr chez des souris hémophiles nouveau-nés et adultes (voir paragraphe III-3) (Anguela *et al.*, 2013; H. Li *et al.*, 2011).

### ***III-1.3.2 Exemples de maladies hépatiques candidates à la thérapie génique associées à des atteintes hépatiques***

#### **Le déficit en alpha-1-antitrypsine**

Le déficit en A1AT (OMIM# 613490), découvert en 1963, est caractérisé par un emphysème pulmonaire, une cirrhose et parfois une panniculite (“index - adaat”, “Orphanet: Deficit en alpha 1 antitrypsine”). Les patients ont des taux réduits d'A1AT, un inhibiteur de protéases. Cette enzyme est codée par le gène polymorphe SERPINA1 présentant l'allèle normal M, les allèles déficients Z et S, et l'allèle nul. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive. La majorité des patients présentant une forme sévère sont homozygotes pour l'allèle Z (PI\*ZZ) Les phénotypes ZZ et SS constituent des facteurs de risques pour le

développement d'atteintes pulmonaires. Le phénotype ZZ est associé aux atteintes hépatiques aiguës ou chroniques avec notamment une hyperbilirubinémie et un dysfonctionnement des enzymes hépatiques. Parfois, une panniculite nécrosante et une vascularite se surajoutent aux signes cliniques classiques.

Pour traiter les atteintes pulmonaires, des perfusions de l'enzyme sont réalisées en association à une vaccination prophylactique contre la grippe et le pneumocoque. Des bronchodilatateurs et des corticoïdes peuvent être employés pour soulager l'essoufflement. Les atteintes hépatiques sont de mauvais pronostic et peuvent nécessiter une transplantation.

Un modèle animal de souris transgéniques exprimant la forme PiZ a permis l'étude de nouvelles approches thérapeutiques (Carlson *et al.*, 1989). Le déficit en A1AT a fait l'objet de transfert de gène avec des vecteurs non viraux et des vecteurs gammarétroviraux, adénoviraux et AAV (Mueller and Flotte, 2013). Cela a permis de mettre en place trois essais de phase I avec des liposomes cationiques (Brigham *et al.*, 2000), des AAVr1 et 2, et un essai de phase II avec des AAVr1.

Les AAVr ont été utilisés à des étapes précliniques pour des injections intra-musculaires ou dans le foie (Song *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1998). Ces projets avaient notamment pour but de limiter les atteintes pulmonaires. L'essai de phase I avec des AAVr2 n'a montré qu'une faible expression transitoire (Brantly *et al.*, 2006). L'essai avec des AAVr1 a permis une expression à long terme, malgré une réponse cytotoxique contre la capsid, mais avec un maximum de 0,1 % du niveau d'expression normal (Brantly *et al.*, 2009). En phase II, un pic d'expression de l'A1AT a été observé un mois après injection avant de décroître jusqu'à atteindre 3 à 5 % des objectifs thérapeutiques. De nouvelles études avec d'autres sérotypes, des doses augmentées ou une administration dans les poumons sont envisagées. Hormis l'addition de gène, un KD ou un KO des formes mutées peut être obtenu par interférence à ARN (Mueller *et al.*, 2012; C. Li *et al.*, 2011). En co-administrant *in vivo* à des souris PiZ des miR et une séquence codant l'enzyme via des AAVr9, 80 % de KD associé à une expression thérapeutique de la forme normale ont été atteints. L'équipe de L. Vallier a utilisé des ZFNs pour corriger la mutation d'iPS de patients atteints de cette maladie (Yusa *et al.*, 2011). Grâce à une étape de sélection à la puromycine des clones corrigés, 54 % de ces clones étaient corrigés au niveau d'un seul allèle alors que 4 % des clones sélectionnés présentaient une correction biallélique.

## III-2 La maladie de Crigler Najjar : une maladie modèle pour la thérapie génique des hépatopathies héréditaires

### III-2.1 Description clinique et traitements existants

Les docteurs J.F. Crigler et V.A. Najjar ont décrit pour la première fois en 1952 un syndrome d'hyperbilirubinémie non conjuguée qui se traduit par un ictère non hémolytique, sévère et chronique (Crigler and Najjar, 1952). La maladie de Crigler Najjar est un déficit enzymatique en uridine diphosphate glucuronosyl transférase ou bilirubine glucuronosyltransférase (UGT1A1, E.C. 2.4.1.17), enzyme responsable de la glucuroconjugaison de la bilirubine. Il s'agit d'une maladie monogénique récessive due à une mutation du gène codant cette enzyme.

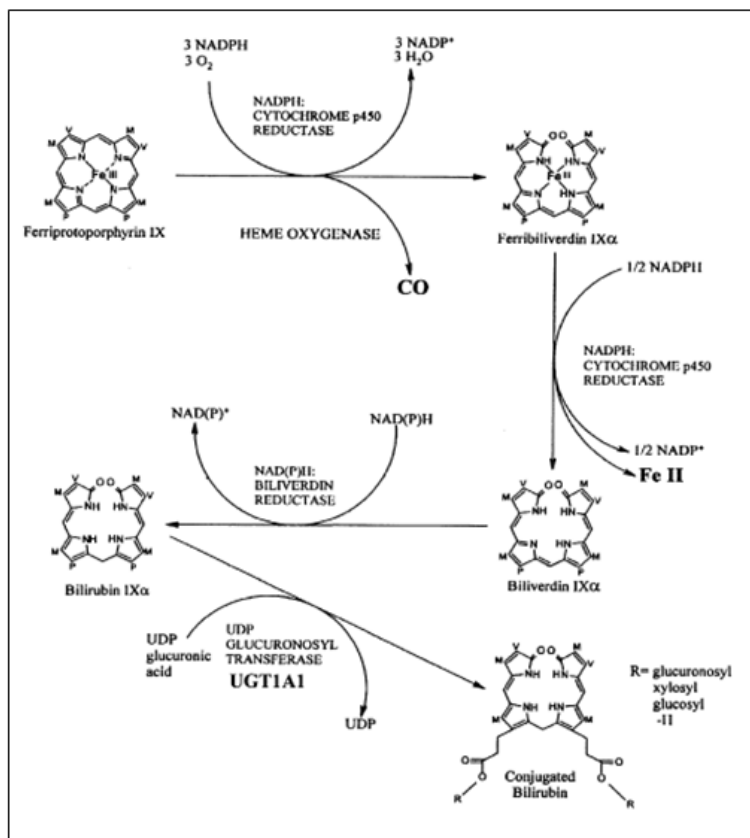


Figure 30 : Catabolisme de l'hème lors de l'hémolyse : de l'hème à la bilirubine conjuguée  
D'après (Bosma, 2003).

La bilirubine non conjuguée est obtenue lors de l'hémolyse à partir de la dégradation de l'hème dans le système réticulo-endothélial (figure 30). Les hématies ont une durée de vie moyenne de cent vingt jours. Lors de l'hémolyse, la globine et l'hème sont séparées. L'hème est dégradé par l'hémoxidase

dans les macrophages pour produire la biliverdine qui est transformée en bilirubine non conjuguée par la NADPH-p450 cytochrome réductase. La bilirubine non conjuguée est une molécule non polaire, soluble dans les lipides et insoluble dans l'eau. Ainsi, elle doit être modifiée pour être éliminée de l'organisme, sinon elle tend à s'accumuler dans les tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine non conjuguée, circulant majoritairement fixée à l'albumine, est captée par le foie pour y être conjuguée avant son élimination dans la



bile. L'UGT1A1 réalise la conjugaison de la bilirubine à l'acide glucuronique dans les hépatocytes. La forme conjuguée est ensuite éliminée après transport par les canalicules biliaires.

Deux syndromes de Crigler Najjar ont été décrits.

Le syndrome de type I (CNI, OMIM#218800) correspond à une absence totale en UGT1A1 responsable d'une concentration en bilirubine sérique supérieure à 340 $\mu$ M. En France, la fréquence de la maladie de CNI correspond à un cas sur un million de naissances. L'actuelle méthode pour finaliser le diagnostic consiste à analyser les mutations du gène UGT1A1.

Chez les patients atteints de ce syndrome, l'enzyme n'assure plus la conjugaison de la bilirubine qui s'accumule alors sous forme non conjuguée dans le sang et dans les tissus jusqu'à atteindre un niveau toxique. En l'absence de traitement, cette maladie peut être mortelle notamment via l'atteinte du cerveau et le risque d'ictère nucléaire, ou kernictère (Schauer *et al.*, 2003; Strauss *et al.*, 2006; Tabarki *et al.*, 2002). Seule la forme non fixée à l'albumine peut circuler jusqu'au cerveau.



Figure 31 : Traitement par photothérapie sous lumière bleue chez un patient atteint du syndrome de Crigler Najjar de type I.

D'après ("Association Française DE CRIGLER-NAJJAR").

Pour les patients atteints de CNI, le traitement consiste en une photothérapie d'environ douze heures par jour sous lumière bleue (figure 31) (Yohannan *et al.*, 1983). En effet, la lumière bleue casse les liaisons hydrogène internes de la bilirubine non conjuguée. Elle permet de convertir la bilirubine non conjuguée en isomères hydrosolubles et éliminables par la bile. La photothérapie telle qu'on l'entend aujourd'hui a été introduite à partir des années 1960. Ce traitement perd de son efficacité à l'adolescence notamment à cause du changement de la structure de la peau qui ne laisse plus suffisamment pénétrer les rayons lumineux. Lorsque l'efficacité n'est plus suffisante, la transplantation devient la seule option envisageable (Ozçay *et al.*, 2009; Lysy *et al.*, 2008).

Le risque de kernictère persiste chez les patients traités lors d'épisodes de jeun, de stress ou d'arrêt de la photothérapie. Ces épisodes peuvent également entraîner une hausse de la

bilirubinémie qui nécessite une prise en charge médicale en urgence avec perfusion de solution d'albumine.

Les caractéristiques des traitements actuels font clairement ressortir l'intérêt de nouvelles approches comme la thérapie génique. De plus, la restauration de 5 % de l'activité enzymatique permettrait d'obtenir une nette amélioration clinique et du confort de vie des patients. De nouveaux traitements ont été essayés chez l'Homme. Des patients ont été traités par transplantation d'hépatocytes hétérologues ce qui a conduit à la détection de l'activité de l'UGT1A1 via une baisse de la bilirubinémie (Ambrosino *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 1998) . Ces traitements restent complexes : la thérapie génique apparaît alors comme une option thérapeutique prometteuse. Elle permettrait notamment de s'affranchir de traitements immunosuppresseurs à long terme.

Les patients atteints du syndrome de type II, décrit par I.M. Arias en 1969 (CNII, OMIM#606785) présentent une faible expression de l'UGT1A1 entraînant une bilirubinémie sérique de 60 à 340  $\mu\text{M}$  (Arias *et al.*, 1969). Pour ces patients, un traitement par le phénobarbital, activateur enzymatique, permet de rétablir un niveau suffisant d'activité enzymatique pour maintenir la bilirubinémie à des niveaux inférieurs à ceux responsables de la neurotoxicité.

Le syndrome de Gilbert (GS, OMIM#143500) décrit en 1901 par les docteurs Gilbert et Lereboullet est apparenté à la maladie de CN. Il se traduit par une hyperbilirubinémie non conjuguée moins sévère : la bilirubinémie sérique est inférieure ou égale à 60  $\mu\text{M}$  (A Gilbert and Lereboullet, 1901). Cette maladie touche environ 5 % de la population (Bartlett and Gourley, 2011).

La maladie de CNII a fait l'objet de différentes approches en recherche parmi lesquelles la thérapie cellulaire, avec la transplantation d'hépatocytes fonctionnels ou l'utilisation de cellules souches pluripotentes différenciées en hépatocytes, et la thérapie génique.

Cette maladie représente un paradigme pour la thérapie génique des maladies héréditaires du foie. Elle est une bonne candidate à ces approches pour les raisons suivantes :

- c'est une maladie monogénique
- un contrôle précis de l'expression de l'UGT1A1 n'est pas nécessaire,
- l'histologie du foie reste normale et les hépatocytes sont facilement accessibles par une injection classique de vecteurs, *in vivo* ou *ex vivo*,

- des bénéfices thérapeutiques peuvent être atteints dès la restauration de 5 à 10 % de l'activité de l'enzyme,
- il existe un modèle animal spontané de cette maladie, le rat Gunn, ce qui facilite la mise en place des stratégies de recherche (voir paragraphe III-2.3).

### III-2.2 Le gène de l'UGT1A1

Le gène de l'UGT1A1 appartient à la famille des gènes codant les uridyl-glucuronotransférases de type 1 ou UGT1. Il s'agit d'enzymes de phase II impliquées dans la glucuroconjugaison de molécules toxiques endogènes et de xénobiotiques comme la bilirubine, les hormones stéroïdes et thyroïdiennes, des opioïdes, des flavonoïdes, des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des carcinogènes (Sim *et al.*, 2012; Sugatani, 2012). La glucuroconjugaison augmente la solubilité de ces molécules dans l'eau et facilite leur élimination. Les UGT1A sont principalement exprimées dans le foie et dans le tractus gastro-intestinal.

La caractérisation des UGT chez l'homme a démarré dans les années 90 (Ritter *et al.*, 1991). Treize isoformes d'UGT1 ont été décrites : les UGT1A1, 1A2p, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 1A11p, 1A12p et 1A13p (figure 32) (Gong *et al.*, 2001). Elles diffèrent uniquement par la séquence de leur premier exon ; elles ont en commun les quatre exons suivants. Neuf des exons en région N-terminale de ce locus codent le premier exon de neuf isoformes fonctionnelles. L'expression de ces isoformes est contrôlée par un promoteur spécifique situé en amont de leur premier exon : chacune peut être régulée indépendamment. Les autres exons en région N-terminale contiennent une mutation responsable d'un décalage du cadre de lecture et ne sont pas liés à l'expression d'une protéine fonctionnelle. Les isoformes 12p et 13p n'ont pas de promoteur fonctionnel et l'isoforme 11p contient une mutation qui empêche sa transcription.

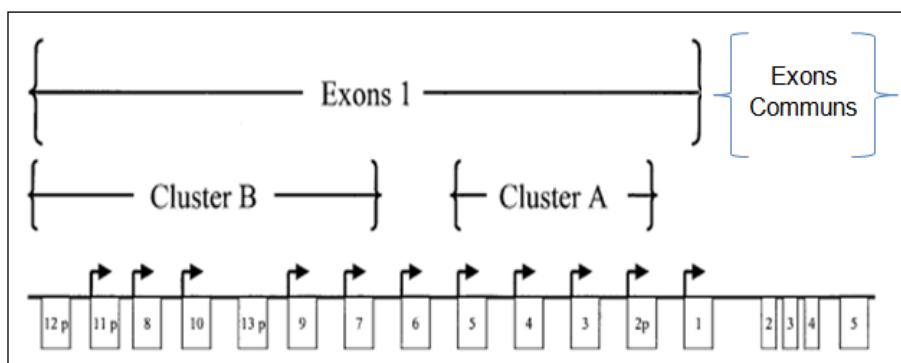


Figure 32 : Locus contenant les gènes codant les treize isoformes d'UGT1A

Le premier exon ainsi que le promoteur sont spécifiques de chaque isoforme. Les exons 2

à 5 sont communs à ces différentes protéines. D'après (Bosma, 2003).

Chez l'homme, le gène de l'UGT1A1 est porté par le bras long du chromosome 2 (figure 33). Ce gène contient 2357 nucléotides, dont 1602 dans la séquence codante.

A ce jour, plus de cent-treize mutations du gène codant l'UGT1A1 ont été décrites chez les patients atteints de CN ou de GS ("Nomenclature"; Ritter *et al.*, 1991; Sneitz *et al.*, 2010; Strassburg, 2010; Sugatani, 2012). Les mutations sont représentées dans des proportions différentes selon la zone géographique et la population étudiée (Marschall *et al.*, 2013; Petit *et al.*, 2008a, 2008b; Sneitz *et al.*, 2010). Les patients atteints de CNII présentent des mutations dans l'exon 1, spécifique de l'UGT1A1, et/ou dans les exons communs aux différentes isoformes. Les individus atteints de GS présentent une mutation de type insertion homozygote d'un dinucléotide TA dans la boîte TATA située en amont du premier exon de l'UGT1A1, ou une mutation hétérozygote faux-sens dans la région codante. Ainsi, le type de mutation et sa localisation déterminent la forme de syndrome qui en découle.

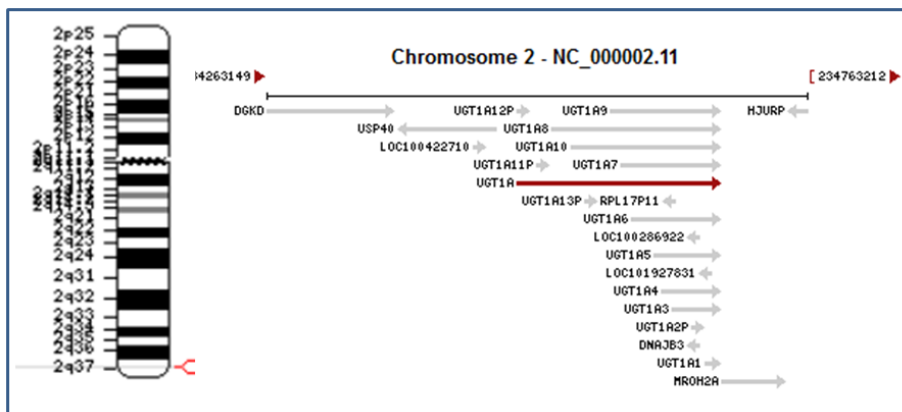


Figure 33 : Localisation du gène de l'UGT1A1 chez l'homme.

D'après ("GenBank Home").

L'UGT1A1 possède des substrats endogènes autres que la bilirubine tels que les hormones thyroïdiennes T3 et T4, le 17B œstradiol, l'estriol et le 2-hydroxyestriol et des substrats exogènes comme l'éthynyloestradiol ou la quercitine.

Il est possible d'augmenter l'expression de l'UGT1A1 grâce à certains xénobiotiques souvent décrits comme faisant partie des inducteurs enzymatiques, agissant notamment sur des enzymes microsomiales (Sugatani, 2012). Ainsi, le phénobarbital peut jouer ce rôle : c'est pourquoi il est utilisé dans le traitement des patients atteints de CNII. Le phénobarbital peut réguler l'expression de l'UGT1A1 chez l'homme grâce à la présence en amont du promoteur d'une séquence activatrice sensible à ce xénobiotique (*phenobarbital-responsive enhancer module*, PBREM) (Sugatani, 2012).

Deux types de molécules de la famille des récepteurs nucléaires à des facteurs de transcription inductibles par des ligands, le récepteur constitutif des androstanes (CAR) et le récepteur X des prégnanes (PXR), peuvent induire l'expression de l'UGT1A1 (Shelby and Klaassen, 2006). CAR peut être activé par le phénobarbital (Mäkinen *et al.*, 2002; Masahiko and Honkakoski, 2000). De même, le récepteur  $\alpha$  activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR  $\alpha$ ) peut induire la surexpression d'enzymes de détoxification via des molécules telles que le clofibrate (Soars *et al.*, 2004).

### III-2.3 Le rat Gunn : modèle spontané de la maladie de Crigler Najjar de type I

La recherche de nouveaux traitements pour la maladie de CNI est facilitée par l'existence d'un modèle animal spontané : le rat Gunn, décrit pour la première fois en 1938 comme présentant une hyperbilirubinémie (Cornelius and Arias, 1972; Gunn, 1944, 1938). Cette souche est dérivée de la souche de rats de laboratoire Wistar.

Une expérience d'injection de bilirubine conjuguée a permis de mieux caractériser ce modèle en prouvant qu'il était capable d'éliminer normalement la bilirubine, orientant la cause de l'hyperbilirubinémie vers une autre voie que celle du transport de la bilirubine conjuguée (Axelrod *et al.*, 1957).

Chez le rat, le gène de l'UGT1A1 est situé sur le bras long du chromosome 9 (figure 34). La séquence de l'UGT1A6 du rat a été élucidée à partir du clonage de l'ADNc correspondant par l'équipe d'Iyanagi en 1986 (Iyanagi *et al.*, 1986).

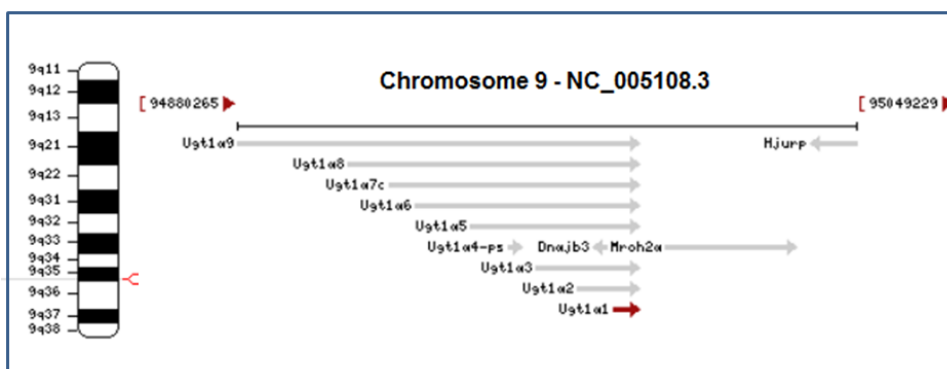


Figure 34 : Localisation du gène de l'UGT1A1 chez le rat D'après ("GenBank Home").

En comparant l'ADNc des souches de rat Gunn et Wistar, une délétion d'un nucléotide a été mise en évidence dans l'exon 4 du gène UGT1A1 (figure 35) (Iyanagi *et al.*, 1989). Il s'agit d'une délétion du G alors numéroté 1239, ou 1240 car la séquence des rats Wistar comporte deux G consécutifs. Les transcrits de l'UGT1A1 sont détectables chez les rats Gunn

et Wistar et ne présentent que la différence de séquence décrite ci-dessus sur l'ADN. Cette délétion entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré en position 415 donnant lieu à l'expression d'une protéine tronquée, non fonctionnelle et à demi-vie réduite. Une protéine de 43 kDa, au lieu de 53 kDa pour la forme sauvage, existe donc chez ces animaux ; elle est plus rapidement dégradée par le protéasome.

Les autres isoformes d'UGT1A partageant cet exon sont aussi affectées par la mutation. L'étude des différentes isoformes dans les microsomes de foie de rats a ainsi permis de mettre en évidence l'absence de toute UGT1 chez les rats Gunn mutants homozygotes (Ikushiro *et al.*, 1995).

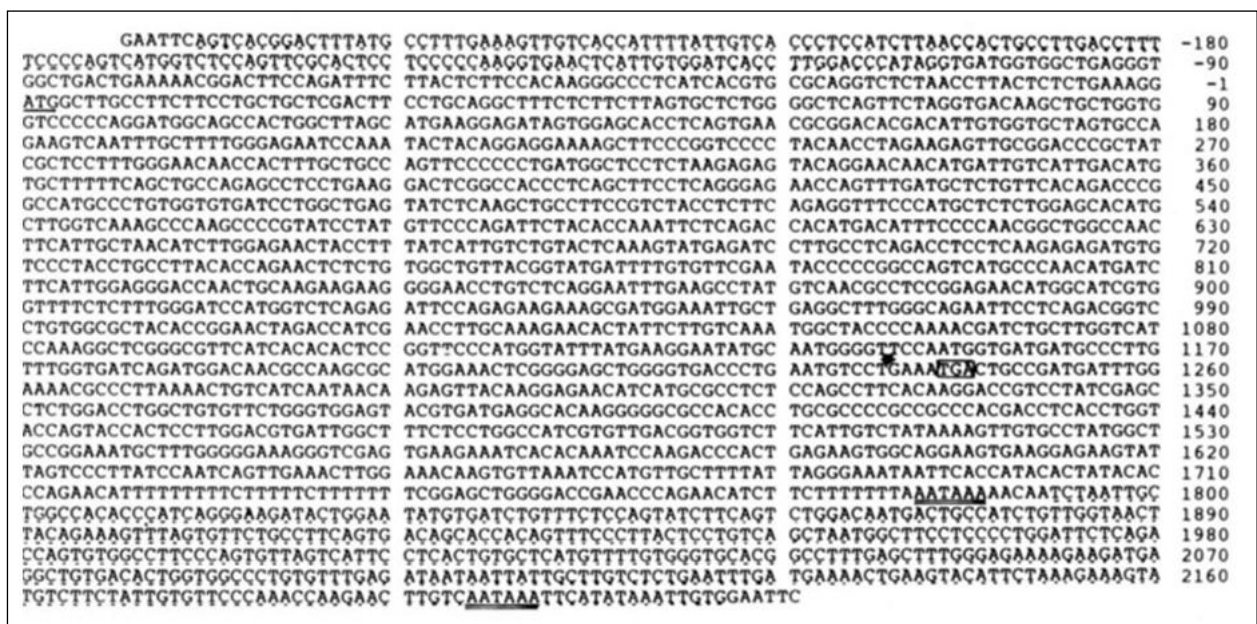


Figure 35 : Comparaison des séquences nucléotidiques du gène de l'UGT1A1 des souches de rats Gunn et Wistar.

Séquence nucléotidique du gène de l'UGT1A1 du rat Gunn homozygote. Le nucléotide 1 correspond au A du codon ATG (souligné). Les nucléotides numérotés avec des nombres négatifs appartiennent à la région 5'UTR. La mutation entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré (TGA, encadré) à cause de la délétion d'une guanosine en position 1239 (ou 1240) indiqué par un point. Les signaux de polyadénylation (AATAAA) contenus dans la région 3' UTR sont soulignés. D'après (Iyanagi *et al.*, 1989).



**Figure 36 : Rats Gunn nouveau-nés.** (-/- : homozygotes porteurs de la mutation et présentant un ictère, +/- : hétérozygotes porteurs de la mutation) Photographie U948.

Les rats Gunn homozygotes pour cette mutation sont reconnaissables par leur ictère présent à la naissance (figure 36). Le taux plasmatique de bilirubine de ces animaux est très élevé, comme chez les patients atteints de CN-I.

Il est possible d'augmenter l'expression de l'UGT1A1 chez le rat lors d'utilisation de xénobiotiques tels que le phénobarbital (Shelby and Klaassen, 2006; Webb *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2005; Coffman *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1985). Les rats Gunn mutés répondent différemment à ce type de traitement que les rats Wistar.

Ce modèle spontané est à la fois pertinent et accessible pour des projets de recherche. En effet, un simple suivi de la bilirubinémie, la détection des formes conjuguées de bilirubine dans la bile et le dosage de l'activité de l'UGT1A1 fournissent des critères suffisants pour évaluer une stratégie thérapeutique.

La maladie de CN-I a fait l'objet de plusieurs stratégies de transfert de gène dans ce modèle. Les approches ont été très diverses, incluant aussi bien des projets *ex vivo* qu'*in vivo*.

Pour les projets de thérapie génique *ex vivo*, des hépatocytes de rats Gunn, humains et de patients atteints de CN-I ont été transduits ainsi que des fibroblastes (Birraux *et al.*, 2009; Kawashita *et al.*, 2008; Parouchev *et al.*, 2006; Tada *et al.*, 1998; Wilke *et al.*, 1997; Askari *et al.*, 1995). Des lipides cationiques ont été utilisés pour vectoriser l'ADNc via un plasmide. De même, des vecteurs rétroviraux et lentiviraux ont été utilisés dans ce but. Des corrections à long terme ont été obtenues, malgré un risque tumorigène potentiel lorsque le foie du receveur est irradié avant transplantation pour favoriser la prolifération des cellules transplantées.

Dans le cadre de la thérapie génique *in vivo*, de l'ADN nu codant l'ADNc, des transposons et des oligonucléotides ont été utilisés (Wang *et al.*, 2009; Dankó *et al.*, 2004b; Kren *et al.*, 1999; Danko *et al.*, 1997; Wilke *et al.*, 1997). Néanmoins, l'approche de correction à l'aide d'oligonucléotides chimériques est controversée comme évoqué en II-4.2.2.

La plupart des projets *in vivo* utilisent des vecteurs viraux pour apporter l'ADNc de l'UGT1A1 : des vecteurs Ad (Pastore *et al.*, 2013; Dimmock *et al.*, 2010; Toietta *et al.*, 2005; Thummala *et al.*, 2002), des AAVr (Flageul *et al.*, 2009; Jurgen Seppen *et al.*, 2006), des oncorétrovirus recombinants (Nguyen *et al.*, 2007; Bellodi-Privato *et al.*, 2005; Puppi *et al.*,

2004; Aubert *et al.*, 2002) et des vecteurs LV (Schmitt *et al.*, 2010a, 2010b; Dariel *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2007; J Seppen *et al.*, 2006; Wegen *et al.*, 2006).

La première démonstration d'une correction complète et durable *in vivo* a été faite en 2005 avec des AdR (Toietta *et al.*, 2005). Cependant, en raison des caractéristiques évoquées précédemment, ce type de vecteur a des perspectives cliniques limitées.

L'équipe de Seppen a comparé des ssAAVr 1, 2, 6 et 8 chez des rats Gunn adultes de 6 à 8 semaines, injectés avec des doses de 2,5 à  $5 \times 10^{12}$  vg/kg en veine porte (Jurgen Seppen *et al.*, 2006). Tous ces sérotypes ont permis une baisse de la bilirubinémie à long terme avec une efficacité supérieure pour le sérotype 1 suivi des sérotypes 8, 6 et 2. Un marquage des foies transduits avec des AAVr-GFP a confirmé cette tendance. Cependant, le taux d'hépatocytes transduits, inférieur à 1 %, reste limité. Les sérotypes 2 et 8 ont montré une transduction plus ciblée du foie d'après l'étude de la dissémination. Des anticorps anti-UGT1A1 ont été détectés chez tous les animaux lorsque le promoteur CMV était utilisé, au contraire de ce qui est observé lors de l'utilisation du promoteur foie spécifique de l'albumine.

L'AAVr 8 est apparu comme un bon sérotype pour cibler le foie : il a permis de transduire la quasi-totalité du foie de souris alors que le sérotype 2 ne permettait de transduire que de 5 à 10 % des hépatocytes murins (Nakai *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2002; Nakai *et al.*, 2002). Cependant, il est possible que l'espèce influe sur le tropisme car l'étude de Seppen *et al.* montre une supériorité du sérotype 1 pour la transduction du foie chez le rat. A l'inverse, l'étude de Montenegro Miranda *et al.*, a démontré l'efficacité thérapeutique de scAAV 1 et 8 avec une meilleure efficacité pour ce dernier pour la transduction du foie chez le rat Gunn (Montenegro-Miranda *et al.*, 2013).

Des travaux de notre équipe ont également étudié le potentiel thérapeutique des ssAAVr 8 (Flageul *et al.*, 2009). Des rats Gunn nouveau-nés ont été injectés par voie iv avec  $10^{13}$  vg/kg de ssAAV8 codant l'UGT1A1. Les animaux ont été injectés à deux jours en veine temporale ou à quatorze jours en veine porte. Dans ces deux groupes, une baisse de la bilirubinémie a été observée avec une meilleure efficacité chez les animaux injectés à quatorze jours. Les promoteurs ubiquitaire CMV et foie spécifique mTTR ont été utilisés. Dans les deux cas, la correction n'a été que transitoire : cela est cohérent avec le maintien des AAVr sous forme épisomale. Les hépatocytes proliférant dans le foie des jeunes animaux, les épisomes sont dilués au cours de leurs divisions. En utilisant la  $\beta$ -galactosidase, son expression a pu être suivie *in situ* dans le foie. Une semaine après l'injection, une moyenne de  $25,3 \pm 11,8$  % d'hépatocytes transduits ont été détectés. Chez les animaux ayant perdu l'expression de ce transgène au cours du temps, des anticorps dirigés contre celui-ci ont été mis en évidence.



Cette étude a confirmé la possibilité de transduire efficacement le foie de rat avec un AAVr 8. Cependant, la perte d'expression à court terme exclut la possibilité de cette stratégie pour des traitements en période néonatale ou chez le jeune.

D'après les résultats encourageants avec des vecteurs AAV chez le rat Gunn obtenus au laboratoire et en collaboration P. Bosma (données non publiées), un projet d'essai clinique chez des patients a été envisagé ; il est actuellement mené en collaboration avec le Généthon (Flageul *et al.*, 2009; Jurgen Seppen *et al.*, 2006). Les premières étapes précliniques chez le gros animal ont été faites sur le macaque en utilisant la GFP comme gène rapporteur. L'essai clinique repose sur le transfert du gène codant l'UGT1A1 sous promoteur foie spécifique par un vecteur scAAV2/8.

Ce projet s'ajoute aux essais cliniques de thérapie génique de cinq autres maladies héréditaires du foie ("Gene Therapy Clinical Trials Worldwide") : le déficit en A1AT, les hémophilies A et B, l'hypercholestérolémie familiale et le déficit en OTC.

Les travaux réalisés précédemment par notre équipe ont permis de guérir le rat Gunn à long terme.

Des rats Gunn nouveau-nés ont été injectés à deux jours par voie iv avec des vecteurs lentiviraux ou oncorétroviraux codant l'UGT1A1 sous contrôle du promoteur foie spécifique mTTR et ayant pour protéine d'enveloppe la VSV-G. Le retour de la bilirubinémie à des valeurs usuelles de deux à quarante-deux semaines après l'injection et la présence de formes conjuguées de la bilirubine prouvent que cette stratégie a permis d'obtenir une correction complète et durable des rats traités (Nguyen *et al.*, 2007).

Après la preuve de principe de transfert du gène codant l'UGT1A1 et de son expression détectable, les efforts se sont concentrés sur d'autres aspects.

Notre équipe a employé avec succès des protocoles d'injection en foie isolé-perfusé en hyperpression pour guérir les rats Gunn adultes (Schmitt *et al.*, 2010a, 2010b; Dariel *et al.*, 2009). L'injection a été réalisée en veine cave infra-hépatique pendant l'exclusion du foie entier de la circulation générale. Le vecteur est injecté en hyperpression : cela facilite le passage des fenestrations, favorisant ainsi l'accès des vecteurs aux hépatocytes. Après un temps d'incubation dans l'organe isolé augmentant le temps de contact avec les cellules cibles, les clamps sont enlevés et le foie est à nouveau perfusé de façon physiologique. Cette technique originale a permis d'améliorer la biosécurité, notamment en diminuant d'un facteur dix la dose de vecteur nécessaire à un effet thérapeutique et en réduisant sa circulation dans l'organisme après injection. Cependant, les premiers essais n'ont permis qu'une correction

temporaire à cause d'une RI apparue dès deux mois post-injection. En effet, contrairement au nouveau-né, le rat adulte est plus enclin à déclencher une RI, dirigée dans ce cas contre le produit du transgène. De même, une réponse contre l'UGT1A1 a été mise en évidence dans un essai de thérapie génique sur des rats *in utero* et à la naissance montrant le potentiel immunogène de cette protéine (J Seppen *et al.*, 2006).

Des travaux ont ensuite visé la réduction voire la suppression de la RI contre le vecteur ou le produit du transgène. Comme décrit au paragraphe I-5.2.2, l'utilisation de vecteurs lentiviraux régulés par le miR-142 est efficace pour guérir à long terme le rat Gunn : elle permet s'affranchir de la RI responsable de l'efficacité temporaire des stratégies de thérapie génique (Schmitt *et al.*, 2010b).

Une amélioration du ciblage par des enveloppes et des promoteurs spécifiques du foie est également réalisable (Frecha *et al.*, 2008b).

La plupart des projets de thérapie génique de la maladie de CN-I a consisté à transférer l'ADNc dans les hépatocytes, mais d'autres organes, comme le muscle, ont été considérés avec succès comme des cibles thérapeutiques ectopiques capables d'exprimer l'UGT1A1 et de restaurer son activité (Pastore *et al.*, 2012; Jia and Dankó, 2005; Dankó *et al.*, 2004a).

Les projets ont été menés aussi bien sur des animaux *in utero*, que des animaux nouveau-nés ou adultes. L'importance des essais sur les animaux jeunes et adultes est majeure, car peu de diagnostics et d'essais de thérapie génique sont envisageables dès la naissance, ni même avant pour des raisons éthiques.

### **III-2.4 Approches chez d'autres modèles animaux**

Il existe deux modèles murins transgéniques. Une équipe a récemment mis au point des souris transgéniques KO pour l'UGT1A1, ou *Ugt1a1* *-/-*, pour mieux étudier le rôle de cette enzyme dans le métabolisme et l'impact de son déficit chez l'homme (Nguyen *et al.*, 2008). De même, l'équipe de Bortolussi a créé un autre modèle de souris KO (Bortolussi *et al.*, 2012). Ce modèle présente une mortalité dans les onze jours suivant la naissance ou après vingt jours sous photothérapie et il présente des atteintes neurologiques. Après traitement par un AAVr9 codant l'UGT1A1 injecté par voie intrapéritonéale, les souris survivent à long terme grâce à une expression uniquement détectée dans le muscle.

Il n'existe pas à ce jour de modèle de gros animaux pour la maladie de CNI. C'est pourquoi l'obtention de nouveaux modèles animaux est intéressante notamment pour faire apparaître des éléments de la maladie humaine qui n'existent pas chez le rat Gunn telle que le risque de toxicité sur le SNC et la mortalité précoce qui en découle, comme cela a été fait dans les modèles murins.

Au-delà des différences de signes cliniques présentés ou de support de l'information génétique (Miyake *et al.*, 2013), il existe des différences de niveau de transduction entre espèces ou de RI par exemple. Il est essentiel de prendre en compte ces aspects au plus tôt dans une démarche de recherche translationnelle.

### **III-3 Faisabilité de stratégies de thérapie génique ciblée utilisant des nucléases artificielles et la recombinaison homologue pour le traitement de maladies métaboliques du foie**

Chez l'adulte, les hépatocytes sont dits quiescents car ils sont majoritairement en phase G0 et ils ne se divisent plus que très rarement *in vivo*. Ainsi, chez le rat de quatre semaines, l'index de prolifération Ki67 est à 20 % et il chute à 2 % à 8 semaines (données non publiées, U948). Les hépatocytes primaires cultivés *in vitro* restent en phase G1.

Des études ont montré que différents mécanismes de réparation de l'ADN existent dans des cellules quiescentes (Nospikel, 2007). De plus, bien qu'étant des cellules différenciées en phase G0, les hépatocytes sont capables de proliférer lors de la régénération hépatique, soit de ré-entrer dans le cycle cellulaire et ces cellules sont transcriptionnellement actives. Il est important qu'elles conservent l'intégrité de leur génome. Or, la RH a principalement lieu pendant les phases S et G2, lorsque la cellule possède une matrice de réparation.

Dans ce contexte, la RH peut-elle être considérée comme une voie de réparation utilisable pour la thérapie génique du foie ? Peut-elle s'appliquer aux jeunes et aux adultes ? Des stratégies pour induire l'entrée des hépatocytes en phases S et G2 sont-elles nécessaires ? L'utilisation d'éléments régulateurs de la réparation de l'ADN permettrait-elle de favoriser la RH en phase G0 et/ou G1 ?

Des équipes ont démontré qu'il était possible de mettre en évidence des phénomènes de RH dans les hépatocytes *in vitro* et *in vivo* (H. Li *et al.*, 2011; Gouble *et al.*, 2006; Thyagarajan *et al.*, 1996b).

Par exemple, il a été possible de réaliser une modification du gène de l'apolipoprotéine B par RH dans des cellules HepG2, mais cela reste un événement rare (Farese *et al.*, 1992).

Lorsque les hépatocytes de souris FAH *-/-* nouveau-nés et adultes sont transduits *in vivo* par des AAVr 2 et 8, il est possible d'observer 0,1 % de RH dans le foie (Paulk *et al.*, 2010). Dans cette étude, l'AAVr 8 semble présenter une meilleure efficacité de RH que l'AAVr 2, peut-être à cause d'une libération plus rapide du génome. L'équipe de M. Grompe a également obtenu une correction par RH du modèle FAH chez des nouveau-nés et des adultes grâce à des AAVr 2/8 (Wursthorn *et al.*, 2006).

Comme décrit précédemment, l'induction de CDB a été utilisée pour favoriser la RH dans le foie.

En transduisant des hépatocytes avec un vecteur Ad codant la méganucléase I-SceI chez des souris de trois semaines dont les hépatocytes sont encore en division, 1,3 % de réparation par SSA ont été observés (Gouble *et al.*, 2006).

A ce jour, seule l'équipe de K. High a publié des travaux de thérapie génique du foie *in vivo* reposant sur l'utilisation de ZFNs (Anguela *et al.*, 2013; H. Li *et al.*, 2011). Leur équipe a créé un modèle murin humanisé d'hémophilie B en introduisant un minigène humain muté du FIX, sous contrôle d'un promoteur hépatique, dans le locus Rosa26 et en croisant ces animaux transgéniques avec des souris hémophiles. Ils ont utilisés des AAVr 8 pour apporter la paire de ZFNs et un donneur. Cette paire de ZFNs ciblant l'intron 1 du minigène humain contenait le variant hétérodimérique de FokI ELD/KKR. Des souris adultes ont été injectées avec  $5 \times 10^{10}$  vg d'AAV-ZFNs en veine de la queue : cela a permis d'obtenir 34 à 47 % d'allèles modifiés par NHEJ dix jours après injection (H. Li *et al.*, 2011). Ce vecteur a été co-injecté avec  $2,5 \times 10^{11}$  vg d'AAV-donneur chez des souriceaux par voie intra-péritonéale. Le donneur consistait en l'ADNc du FIX contenant les exons 2 à 8 précédés d'un site accepteur d'épissage, suivis d'une séquence polyA et entourés de bras d'homologie. Cela a conduit à une réparation de 1 à 3 % du minigène du hFIX, suffisante pour restaurer de façon permanente un phénotype normal de coagulation. Les injections ont été faites sur des souriceaux de deux jours ayant un foie en prolifération. Le niveau de réparation est corrélé à la dose de donneur injectée. Une hépatectomie a permis de confirmer le caractère permanent de cette correction en excluant une possible influence d'épisomes d'AAVr persistants. Cette équipe a également confirmé la capture des AAVr entiers au niveau de la cible par NHEJ. Parmi les vingt sites prédits comme potentiels sites *off-target* par SELEX, des coupures *in vivo* on été détectées au niveau d'un seul site lors du test *Surveyor*. Les autres sites sont donc associés à moins de 1 % de NHEJ, soit la limite de détection de ce test.

Dans cette approche, la capture des AAVr entiers par NHEJ peut également avoir un effet thérapeutique comme cela a été décrit par la même équipe chez l'adulte (Anguela *et al.*, 2013). Des souris adultes ont été injectées avec  $1 \times 10^{11}$  d'AAV-ZFNs et  $5 \times 10^{11}$  vg et d'AAV-donneur. Cette stratégie a efficacement restauré une coagulation normale avec une efficacité supérieure à celle obtenue chez les souriceaux, même en l'absence de bras d'homologie. La détection de quatre sites *off-target* lors de l'utilisation d'une FokI homodimérique a orienté ce projet vers l'utilisation de l'architecture hétérodimérique obligatoire ELD/KKR. Cela a permis de conserver l'efficacité thérapeutique en réduisant les coupures *off-target*. Ainsi, l'intégration dans un des sites *off-target* compatible avec la transcription d'un ARNm hybride contenant les exons 2 à 8 du FIX conduisant à une

expression résiduelle de ce facteur a été réduite à des niveaux indétectables lors de l'emploi de l'architecture ELD/KKR. Les deux formes de FokI sont bien tolérées par le foie d'après les mesures de transaminases hépatiques.

Cette étude a donc montré la possibilité d'édition du génome dans des cellules ne proliférant que peu ou pas, présentant un contexte défavorable à la RH, en utilisant la simple capture de vecteurs au niveau de la cible des ZFNs. Cela ouvre donc la voie à l'application de telles stratégies pour un large éventail de maladies.

## IV- Objectifs de la thèse

Les approches de thérapie génique ont fait de grandes avancées de leur avènement aux actuels essais cliniques. Néanmoins, la mise en évidence de certaines limites encourage le développement d'approches offrant un meilleur niveau d'efficacité et de biosécurité.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans la mise au point des approches d'édition du génome à l'aide de nucléases pour des applications de thérapie génique. Ce type d'approche vise à améliorer la biosécurité en contrôlant l'insertion de l'ADN thérapeutique, à augmenter la spécificité des protocoles par le ciblage d'un locus unique et à augmenter l'efficacité thérapeutique en supprimant une mutation délétère et en restaurant une expression physiologique du gène réparé.

En raison du caractère récent du développement des nucléases, de nombreux aspects tels que la vectorisation sont à étudier avant d'élargir leur champ d'application. C'est pourquoi nous avons développé une stratégie de vectorisation d'une paire de ZFNs dans un vecteur lentiviral qui sera présenté sous la forme d'un article dans la première partie des résultats. Ces travaux font actuellement l'objet d'une procédure de dépôt de brevet.

Nous avons également développé une approche de réparation génique d'une mutation appliquée à la maladie modèle de Crigler Najjar de type I en utilisant des endonucléases artificielles pour étudier la faisabilité de ces approches. Cette étude préclinique a été réalisée en utilisant le modèle animal spontané du rat Gunn afin d'en corriger la mutation portée par le gène UGT1A1. Dans la seconde partie des résultats, nous présenterons la mise au point de cette stratégie de réparation génique *in vivo* à l'aide de ZFNs et d'un donneur vectorisés dans des AAVr sous la forme d'un article.

## V- Résultats

### V-1 Vectorisation d'une paire de zinc finger nucléases dans des vecteurs lentiviraux

Lorsque ce travail de thèse a démarré, nous envisagions de développer une approche de KI dans le locus de l'IgM car la paire de ZFNs correspondante avait été utilisée au laboratoire U1064 pour l'obtention des premiers rats transgéniques KO à l'aide de ZFNs (Geurts *et al.*, 2009). De plus, l'IgM n'étant pas exprimé dans le foie, son invalidation ne serait pas délétère pour le foie. Les expériences réalisées avec ces nucléases nous ont permis de mettre au point les différents outils et techniques nécessaires pour mener à bien ce projet de thèse. Nous avons vectorisé cette paire de ZFNs dans un vecteur lentiviral sous la forme d'une polyprotéine avec le peptide 2A comme signal d'autoclivage pour permettre l'expression des deux monomères de ZFN de façon stœchiométrique. Ce vecteur n'était pas fonctionnel, malgré l'activité de coupure des ZFNs détectée lors de la transfection du plasmide lentiviral ayant servi à la production des vecteurs.

Afin de pouvoir utiliser les avantages des vecteurs lentiviraux et des ZFNs, nous avons développé un système d'optimisation de codon permettant de pallier les obstacles à la vectorisation d'une paire de ZFNs dans un seul vecteur lentiviral. Dans un contexte d'application à la stratégie complémentaire de thérapie génique que représente la réparation d'une mutation, ces travaux de vectorisation ont été réalisés avec la paire de ZFNs ciblant l'exon 4 de l'UGT1A1 de rat employée dans la stratégie présentée dans la seconde partie des résultats.

Ce projet est présenté ci-dessous sous la forme d'un article qui a servi de support à une procédure de dépôt de brevet.



**Codon swapping strategy for ZFNs delivery by a single lentiviral vector  
in primary cells and *in vivo***

Abarrategui-Pontes Cécilia<sup>1</sup>, Créneguy Alison<sup>1</sup>, Thinard Reynald<sup>1</sup>, Fine Eli J.<sup>3</sup>, Thepenier Virginie<sup>1</sup>, Fournier Laure<sup>1</sup>, Cradick Thomas J.<sup>3</sup>, Bao Gang<sup>3</sup>, Podevin Guillaume<sup>2</sup>, Anegon Ignacio<sup>1</sup>, Nguyen Tuan Huy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMRS 1064, ITUN, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France

<sup>2</sup> Pediatric hepatogastroenterology - HIFIH laboratory, UPRES 3859, SFR 4038, Angers, France

<sup>3</sup> Department of Biomedical Engineering, Georgia Institute of Technology and Emory University, Atlanta, GA 30332, USA

**\*Correspondance to:** Tuan Huy Nguyen, Ph.D.  
INSERM  
UMRS 1064, CHU Hôtel Dieu,  
Nantes, France  
Phone: 33 (0)2 40 08 74 14  
Fax: 33 (0)2 40 08 74 11  
E-mail: [tuan.nguyen@univ-nantes.fr](mailto:tuan.nguyen@univ-nantes.fr)

Short Title: 2-in-1 ZFN lentiviral vector

## **Abstract**

Zinc finger nucleases appeared in the last few years as promising tools for genome editing for biotechnological as well as therapeutic purposes. They have been used for targeted gene modification in a wide range of targets such as embryos, cell lines, iPS, primary cells and for *in vivo* applications. Desired modifications are often obtained at a very low frequency. Delivery is a main issue for the improvement of targeted genome modification. In this article, we provide a codon swapping strategy to deliver ZFNs by a single lentiviral vector to benefit from the advantages of this viral vector platform for numerous targets and applications. This strategy allowed targeted indels to be introduced in the rat UGT1A1 gene in primary hepatocytes and in newborn rats after administration of integration-deficient vectors.

## Introduction

Since the very beginning of molecular biology, targeted genome modification has always been an important goal. To do so, artificial endonuclease development and understanding of DNA repair mechanisms have been essential<sup>1-6</sup>. In the last few years, artificial endonucleases have appeared as promising tools to perform precise genome editing<sup>7-9</sup>. Four main endonuclease families are now available: Zinc finger nucleases (ZFNs), TALE nucleases, meganucleases and the CRISPR/CAS system.

ZFNs were created by associating zinc finger domains (ZFs) to target a specific DNA sequence and the endonucleasic aspecific moiety of the FokI restriction enzyme<sup>10</sup>. Each ZF DNA binding domain is made of 30 amino acids and recognizes a specific 3-bp sequence. Associating 6 ZFs is statistically sufficient to target a unique locus into the human genome. FokI cuts within a 5-6bp spacer sequence. As FokI is only active upon dimerization, two ZFNs monomers are necessary to perform a DNA double strand break (DSB). ZFNs can be used to knock-out a gene, to mutate it or to promote a chromosomal deletion. If a DNA donor is provided with homologous regions to the target site, it can be inserted into a chosen locus in the genome. Theoretically, it would be possible to create ZFNs for any genomic locus.

The high potency of ZFNs for genome engineering has been demonstrated in many models: cell lines, primary cells, embryos, and for many species such as rats, mice, *C. elegans*, mosquitos, zebrafish and humans. ZFNs hold great promise for treating genetic diseases, paving the way to personalized medicine<sup>11,12</sup>. For instance, they allowed precise insertion of a therapeutic transgene expression cassette in the AAVS1 safe harbor locus, gene correction of ILR2Rgamma gene, mutated in X-SCID disease, and of A1AT gene, mutated in alpha-1-antitrypsine deficiency<sup>13-17</sup>.

Whatever the application, one of the major hurdles is to deliver ZFNs to the target cells<sup>18</sup>. Transfection of mRNA or plasmid DNA encoding ZFNs is inefficient in most primary cells,

in non mitotically quiescent cells and in animals. Viral vectors could offer new delivery possibilities for ZFNs. Lentiviral vectors are very potent tools able to deliver transgenes in both quiescent and dividing cells with high efficiency<sup>19-21</sup>. Both integrative and integration-deficient lentiviral vectors (IDLV) are potent platforms to deliver a ZFN monomer<sup>22-24,14,25</sup>. For instance, co-transduction of human cells with IDLVs encoding one ZFN monomer resulted in up to 39% of gene editing of the IL2RG gene in K-562 cells whereas haematopoietic progenitors and ES cells were modified at only 0.1% and 5%, respectively<sup>14</sup>. Stimulating monomeric ZFN expression from IDLVs by a histone desacetylase, such as trichostatin A, improved targeted gene invalidation<sup>23</sup>.

However, the preferred method to deliver ZFNs into target cells is to express both ZFN monomers from a single IDLV vector, since cell co-transduction is rate limiting. A major limitation for lentiviral delivery of ZFN monomers is their high sequence homology. Indeed, it is known that retroviruses recombine homologous sequences at high frequency during the reverse transcription step. Recently, Joglekar *et al.* decreased the total DNA sequence identity between two ZFN monomers down to 85% after codon-optimization of one monomer<sup>22</sup>. They reported significant ZFNs activity after delivery of the optimized pair of ZFNs in a single IDLV vector into cell lines. However, they failed to induce targeted gene mutation in primary cells.

In the present study, we investigated whether a codon swapping strategy to disrupt sequence homology between two ZFN monomers can rescue targeted gene mutation into cell lines, into primary cells and *in vivo* into the liver using lentiviral vectors. As a proof-of-principle study, we constructed a single lentiviral vector encoding ZFNs targeting rat UGT1A1 gene whose mutation is responsible for Crigler-Najjar disease, an inherited liver disorder. We reported high levels of ZFNs activity on the UGT1A1 gene in lentivirally-transduced cell lines, which also allowed detection of secondary off-target effects, and gene

editing in primary hepatocytes and in the liver *in vivo*. To our knowledge, this study represents the first targeted gene mutation into primary hepatocytes and into the liver after administration of IDLVs.

## Results

### Zinc Finger Nucleases codon swapping

We used the redundancy of the genetic code to swap codons of the ZFN Right (ZFNR) to synonymous codons, to destroy homologous regions between ZFN Left (ZFNL) and ZFNR and we chose optimized codons for expression in rodent cells. In addition, we removed large stretches of consecutive homologous sequences between both ZFN monomers. We therefore reduced their length down to 5bp-long stretches or less. Only one 8bp-long stretch was conserved. We chose a pair of ZFNs targeting the rat UGT1A1 exon 4, which is mutated in the Gunn rat strain, a spontaneous animal model for Crigler Najjar disease type I (CNI) (Fig. 1a)<sup>26</sup>. This pair contains 5 fingers in each monomer and the obligate heterodimeric ELD/KKR variant of FokI<sup>27</sup>. Table 1 shows the homology between ZFNL and ZFNR before and after codon swapping (Table 1 and Fig. S1). Homology between ZFNL and swapped ZFNR (swZFNR) and between ZFNR and swZFNR was reduced from 90.7 to 61.4% and 100% to 67.7%, respectively. We then constructed a single lentiviral vector encoding ZFNL and swZFNR (LV-swZFNs) or encoding the pair of unmodified ZFNs (LV-wtZFNs) as a T2A polyprotein under the control of the SFFV ubiquitous promoter (*Fig. 1b*)<sup>28,29</sup>. After transfection of C6 rat cells with the lentiviral plasmids, we quantified ZFN-driven gene disruption by T7EI assay. This assay reveals imprecise repair by ZFN-induced Non Homologous End Joining (NHEJ) leading to small insertions or deletions, called indels.

Transfection efficacy was about 60% with GFP-encoding plasmid (Fig. S2). Both wt and swZFN-encoding plasmids induced 5 to 12% of indels, showing that both plasmid constructs are functional for UGT1A1 targeted DSB induction (Fig.2). The wtZFN-encoding plasmid was more efficient than the swapped one at promoting NHEJ events ( $p=0.025$ ).

### **Lentiviral delivery of a pair of ZFNs into cell lines**

To determine whether lentiviral mediated delivery of ZFNs could induce mutations in the targeted UGT1A1 gene, we first produced integrative lentiviral vectors. C6 and FAO cells were transduced at different multiplicities of infection (MOI) from 25 to 200, and gDNA was extracted from cells harvested 3 days after transduction for T7EI assay. LV-swZFNs were highly efficient at promoting indels events in C6 cells (up to 60%), while LV-ZFNs induced a maximum of 15% (Fig. 3). This level was close to the one obtained after transfection. LV-swZFNs was more efficient at promoting NHEJ events than its wild-type counterpart for all MOI in C6 cells ( $p$  between 0.0003 and 0.0115). The difference between LV-swZFNs and LV-wtZFNs was more pronounced at a low MOI, with a 7-fold difference in efficacy between both LV. In FAO cells, we also observed a 7-fold higher level of indels after transduction with LV-swZFN as compared to LV-wtZFNs transduction ( $p=0.0088$  at MOI 100), albeit maximal indels level was much lower than that observed in C6 cells. As previously described, ZFNs activity is highly dependent on cell line susceptibility to DNA DSB<sup>30-33</sup>. Therefore, codon swapping allowed to significantly improve the delivery of a pair of ZFNs using transduction with a single lentiviral vector.

We hypothesized that this difference in ZFNs activity between the LV-wtZFNs and the LV-swZFNs was due to sequence rearrangements during reverse transcription. PCR analysis on genomic DNA from transduced C6 cells showed the presence of rearranged proviral sequences after LV-wtZFNs transduction (Fig. 4).

We detected a 1500bp deletion between the SFFV promoter and the WPRE sequence using p1 and p4 primers in LV-wtZFNs transduced cells. As we detected predicted PCR products with p1 and p2 primers and barely no signal with p3 and p4 primers, this suggested that ZFNR sequence was rearranged. By contrast, PCR analyses confirmed the proviral DNA integrity after LV-swZFNs transduction.

We then assessed the expression of ZFNs at a protein level. Because the pair of ZFNs is expressed as a 2A-polyprotein, ZFNs migrate as a doublet because of the presence of 20 extra amino acids at the C-terminal end of ZFNL and only one extra amino acid (Proline) at the N-terminal end of ZFNR<sup>34,35</sup>. In LV-swZFNs transduced cells, we observed the expected ZFNs protein doublet (46.3 and 44.2 kDa) (Fig. 5). In LV-wtZFNs transduced cells, we detected only the upper band and additional bands of lower molecular weights (37 kDa). Altogether PCR and western blot analyses showed that after LV-wtZFNs transduction, ZFNs sequences are rearranged, probably leading to a deletion in ZFNR sequence, while codon-swapping allowed maintaining DNA and protein integrities.

### **Off-target effects after lentiviral delivered of a pair of ZFNs**

The high levels of indels observed after C6 cells transduction with LV-swZFNs (up to 60%, Fig. 3b) gave the opportunity to look for potential off-target effects, which may not be easily detectable with a low ZFNs activity, as observed after transfection (Fig.2b).

To look for hotspots of off-target activity, an analysis of 21 *in silico* predicted off-target sites was performed using the previously described PROGNOS method<sup>36</sup>. T7EI assay confirmed the high level of on-target activity after LV-swZFNs transduction of C6 cells (Table 2). Off-target sites were found in an intronic region of the Tarsl2 gene at a frequency of about 10% and in five other sites at lower frequency. Tarsl2 and Gbas off-target sites share 80% of sequence homology with the canonical target.

### **IDLV-mediated delivery of a pair of ZFNs into primary cells and in the liver *in vivo***

Primary rat hepatocytes cultured in non stimulating growth conditions, in absence of serum and growth factors, were transduced with LV-swZFNs or IDLV-swZFNs. We detected significant levels of indels after transduction of the primary hepatocytes with IDLV-swZFNs (about 2%), while a higher ZFNs activity was observed after transduction with their integrative counterparts (5-15%) (Fig. 6). We then investigated whether IDLV-swZFNs were active *in vivo*. After neonatal delivery of IDLV-swZFNs, about 1% of indels was detected in 4 out of 5 injected animals (Fig. 7).



## Discussion

We investigated the feasibility of a single lentiviral driven expression of a pair of ZFNs using a codon swapping strategy. These vectors are able to transduce a wide range of cells, and mitotically-quiescent cells in particular. The use of integration-deficient lentiviral vectors allows transient transgene expression in dividing cells, and prolonged transgene expression in slowly or non-dividing cells, such as retina, adult liver and muscle cells<sup>37-42</sup>. For gene editing using nucleases, the preferable scenario would be a transient targeted DSB activity in transduced cells to minimize off-target effects and cytotoxicity in the long term.

LV and IDLV were able to drive single ZFN monomer expression into cell lines and primary cells<sup>14,22-24</sup>. Because ZFN monomers are highly homologous, it is expected that a single retroviral vector is not adequate to co-express two monomers. Indeed, Holkers *et al.* showed that a TALE nuclease monomer, which contains highly repeated regions, is rearranged during reverse transcription leading to mutated TALE nucleases<sup>43</sup>. Using codon-optimization to disrupt repeated sequences within a TALE nuclease monomer, Yang *et al.* demonstrated the feasibility of lentiviral delivery of a TALE nuclease monomer<sup>44</sup>. Recently, codon-optimization also allowed a single IDLV to be used to deliver a pair of ZFNs targeting the human adenosine desacetylase gene<sup>22</sup>. However, while gene targeting was obtained in K652 cell line, IDLV failed at promoting targeted indels in primary cells such as T lymphocytes or CD34+ cells.

In the present study, we modified the sequence of ZFNR to destroy sequence homology to ZFNL using a codon swapping method. We therefore delivered ZFNs into two cell lines to induce up to about 60% of NHEJ-induced indels at the targeted site in C6 cells. Although we transduced almost all the C6 (Fig. S1 A) and FAO cells (data not shown), we observed that FAO cells are less sensitive to gene mutation. As previously described, indels levels and sensitivity to ZFNs are different between cell types<sup>30-33</sup>. It may be due to differences in

transduction and consecutive expression efficiencies, and/or to differences in homologous-directed recombination activity. We showed that recombination events occur in the ZFNR sequence in LV-wtZFNs transduced cells leading to proteins with reduced molecular weights. In contrast, we observed DNA sequence and protein integrities after transduction with LV-swZFNs. Altogether, our results confirmed that high homology between ZFNR and ZFNL is a major hurdle when using lentiviral vectors as a delivery platform. Our results are in agreement with the study of Joglekar *et al.*, in which recombination between triple flag tag and nuclear localisation signal sequences was detected<sup>22</sup>. Of note, we detected ZFNs proteins of the expected size with LV-wtZFNs, but it is possible that either they were short rearrangements at the nucleotide level making them inactive or there was a low expression of wtZFNs accounting for the residual activity in LV-wtZFNs transduced cells.

Our results confirmed that LV-swZFNs transduction induces indels more efficiently than transfection in C6 cells. It reflects a high transduction rate (almost 100% efficiency) leading to high transgene expression as compared to a low transfection efficiency (60%) (Fig. S1 A, Fig. S1 B). Of note, lentiviral vectors allowed to induce ZFN-targeted DSB, while transfection failed to induce detectable levels of indels because of the very low transfection efficiency of FAO cells (data not shown).

Because of high indels levels in C6, we investigated off-target effects of the pair of ZFNs using PROGNOS algorithm in these cells<sup>36</sup>. When the nucleases cut at other locations in the genome than their intended target, it creates the potential for unwanted gene disruption, destabilization of the cell's genome, or possibly transform the cell into a cancerous phenotype. Given that only 21 potential off-target sites were interrogated, finding six *bona fide* locations of off-target activity, validated as having a statistically significant mutation frequency higher than untreated cells, was higher than expected. Based on off-target studies of other 3- and 4-finger ZFNs, an analysis of this size would be expected to yield perhaps

four *bona fide* off-target sites<sup>36,45-48</sup>. Thus, this study is the first report of *bona fide* off-target activity discovered for 5-finger ZFNs with heterodimeric FokI.

In our study, the levels of on-target activity after lentiviral transduction were much higher than in previous studies<sup>36</sup>. Thus, it is probable that delivering more ZFNs into cells using a single lentiviral vector allowed to reveal off-target sites that wouldn't have been detected otherwise. Our data highlight the impact of the nucleases design and of the efficacy of delivery methods on off-target effects.

The liver is a favoured target organ for gene therapy, both *ex vivo* and *in vivo*. For such a purpose, IDLV are the preferable ZFN-delivery platform as compared to LV as they allow a short-term efficient expression of ZFNs. In primary rat hepatocytes, cultured using serum-free and growth-factor free conditions, we observed indels at levels of about 2.5% and 5-15% after transduction with IDLV and LV, respectively. The lower indels frequency induced by IDLV is consistent with a lower transgene expression from IDLV as compared to LV<sup>42,49,50</sup>. It has been reported that lowering the temperature to 30°C after ZFNs delivery was responsible for an increase in indels frequency, and that TSA or sodium butyrate improved transgene expression from IDLV<sup>23,30</sup>. We observed that in primary rat hepatocytes cultured at 30°C after 24 hours of IDLV transduction or treated with sodium butyrate, there was no increase in indels frequency and that TSA (10 µM) was toxic (data not shown). Based on the encouraging *in vitro* results with IDLV, we evaluated the *in vivo* performance of IDLV-swZFNs in the liver of rat neonates. ZFNs expression is expected to be transient because of the highly proliferative status of newborn livers. In all but one injected animals, we detected indels events at a level of about 1%. This level is close to the one observed in primary rat hepatocytes.

To our knowledge, our data represent the first description of effective ZFN-mediated gene editing using a single IDLV vector as a delivery platform in primary cells and *in vivo* in the liver.

In contrast to the study of Joklegar *et al.*, in which ZFN homology was reduced to 85%, we drastically reduced ZFN homology to about 61% and we removed stretches of homologous sequences larger than 6 bp, except one 8bp-remaining stretch of homology. Thus we may have less recombinogenic events occurring during reverse transcription in our study. We also used SFFV promoter to drive ZFNs expression: it may be stronger than the intronless EFS and MND promoter used by Joklegar *et al.*. Finally, another explanation could be the non-proliferative status of our target cells, i.e. primary hepatocytes, as compared to primary T and CD34+ cells, but we also induced indels events in neonate proliferating livers.

In conclusion, our study provides a codon-swapping strategy that allowed efficient delivery of a pair of ZFNs by a single lentiviral vector and highlights the potency of this viral delivery platform. Either integrative or non integrative lentiviral vectors can be used, depending on the application. They could be used for cell lines, primary cells or *in vivo* transduction. As an example, integrative lentiviral vectors could be used to drive ZFNs expression using regulable Tet-On or Tet-Off gene expression systems or using destabilized ZFNs<sup>51</sup>.

Applications for which a low level of gene editing is sufficient can already be considered. For instance, we previously showed that as few as 0.03 vector copy/haploid genome of retroviral vectors encoding UGT1A1 was sufficient to normalize the bilirubinemia of the Gunn rat, which is the spontaneous model of Crigler Najjar disease type I<sup>52</sup>. The target of the pair of ZFNs used in this study is located in the rat UGT1A1 exon 4, 114bp away from the mutation responsible for the hyperbilirubinemia in this model. Thus, the level of *in vivo* ZFN-mediated targeted DSB reported here could be sufficient to correct the metabolic defect of the Gunn rat

by genome editing co-delivering a DNA donor template for gene repair or gene targeting of a therapeutic expression cassette in context favorable for homology-directed repair. Such a level of ZFN-mediated DSB could also be useful to study tumor suppressor genes as their inactivation could be monitored through tumor growth follow-up. A study described less than 1% of gene targeting of myoblasts and myotubes with ZFNs <sup>33</sup>. It could be sufficient for DMD treatment for example, or could be improved through several rounds of *ex vivo* transduction. Further studies and improved targeting strategies should help to reach higher levels of IDLV-mediated gene editing, allowing their efficient use for a wide range of applications.

## **Material and Methods**

### ***ZFN reagents and plasmid constructs***

A pair of custom CompoZr ZFNs targeting the rat UGT1A1 exon 4 (NM\_012683.2) was generated by Sigma Aldrich (Saint Louis, MO). This pair contains 5 fingers in each monomer and the obligate heterodimeric ELK/DDR FokI<sup>27</sup>. The coding sequence for ZFN Right (ZFNR) was modified according to the following rules: (i) destroying homologous sequences to ZFN Left (ZFNL), tolerating homologous regions of 5-10 nucleotide-long stretches, (ii) codon optimization for codons mostly used in rodent cells and (iii) removing consecutive stretches of homologous sequences longer than 5 nucleotides. Codon swapped ZFNR and wild-type ZFNL (sw-ZFNL-2A-ZFNR), as well as wild-type ZFNL and ZFNR encoding cassettes (wt-ZFNL-2A-ZFNR), were synthesized by Gene Cust (Dudelange, Luxembourg) to express a self-processing T2A polyprotein to obtain a stochastic expression of both monomers<sup>28,29</sup>. These 2-in-1 constructs were subcloned into a HIV-derived self-inactivating lentiviral vector RRLSIN.cPPT.SFFV.GFP.WPRE (kindly provided by Els Verhoyen, INSERM U758, France) in place of GFP to generate the lentiviral constructs. The integrase defective packaging plasmid PsPax2-D64V was generated by directed mutagenesis of psPAX2 to introduce D64V mutation into the integrase coding sequence. Plasmids were amplified using Nucleobond Xtra Maxi (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

### ***Lentiviral production***

Lentiviral vectors were produced as previously described using calcium phosphate-mediated transient transfection of 293T cells with the vector transfer plasmid, the packaging plasmid (psPAX2, psPAX2 D64V) and the vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) envelop protein encoding plasmid (pMD2G)<sup>53</sup>. Viral supernatant was harvested 24 and 48 hours after

transfection and concentrated by ultracentrifugation at 50,000g for 90 minutes at 4°C in SW48 rotor. The viral pellet was resuspended in 100µL of advanced Dubelcco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stored at -80°C until use. Vector titers were determined by real-time quantitative PCR on Hela cells after transduction with serial dilution of virus supernatants. The primers used were as follows: GAG-F GGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTA, GAG-R GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC. For normalization of the amount of genomic DNA, human beta actin primers were used: HB2-F TCCCGTGTGGATCGGCGGCTCCA and H2B-R: CTGCTTGCTGATCCACATCG. A standard curve was generated using dilutions of lentiviral vector plasmid in genomic DNA from Hela cells. Vector titers were calculated as follow: Titer =  $1 \times 10^5$  (number of target Hela cells)  $\times$  (number of copies per cell of the sample)  $\times$  (dilution-fold of viral stock for titration) / volume of viral supernatant (in ml). Vector titers were routinely  $0.5-1 \times 10^9$  TU/ml and  $3-5 \times 10^7$  TU/ml for LV and IDLV vectors, respectively

### ***Cell line culture***

The C6 glioma and FAO hepatoma rat cell lines were maintained in Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (Lonza, Bâle, Switzerland), 2mM glutamine (Sigma Aldrich, St Louis, MO), and antibiotics (100UI/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY). The 293T cells were maintained in DMEM containing 10% of FCS, 10mM Hepes Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY), 2mM glutamine (Sigma Aldrich, St Louis, MO), and antibiotics (100UI/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin) Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY). All cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### ***Cell line transfection***

C6 cells were transfected at 80-90% of confluency using lipofectamine LTX following the manufacturer's instructions (Life Technologies, Grand Island, NY). Each well of a 24-well plate was transfected using 0.5 µg of plasmid DNA.

### ***Cell line transduction***

For transduction,  $5 \cdot 10^4$  cells were seeded in each well of a 6-well plate one day before transduction. On the day of transduction, the medium was changed before addition of the viral particles. Cells were kept at 37°C for three days before harvesting.

### ***Animal experiments***

Wistar rats (Janvier Labs, St Berthevin, France) were maintained on standard laboratory chow and kept in 12-hour light/dark cycles. All animal experiments were performed according to institutional guidelines and after approval of the experimental protocols CEEA PdL 2012.50, 51 and 52 by the Comité d'Éthique des Pays de Loire. Two-day-old rats were injected with IDLV using a dose of  $5 \times 10^6$  TU in 100 µl of PBS via the temporal vein.

### ***Primary rat hepatocytes***

Primary rat hepatocytes were isolated from twelve-day-old Wistar pups by a three-step collagenase perfusion. Pups were anaesthetized with in 1,5L/min of 3% isoflurane in air. A median laparotomy was performed before clamping the upper vena cavae and before the cannulation of the portal vein. The liver was perfused by two washing solutions, the first one containing EGTA, before perfusion by a collagenase IV (Sigma, Saint Louis MO) solution for 10 minutes. The vena cavae was cut after the beginning of the perfusion. The perfusion rate was maintained at 2,5ml/min and solutions were heated at 37°C. At the end of the perfusion, the liver was excised and was mechanically disrupted. Cells were resuspended in



DMEM supplemented with 10% FCS. Isolated hepatocytes were purified from non-parenchymal cells by low-speed sedimentation (900 rpm, 3 min) on 30% Percoll solution (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Cells were resuspended and seeded in DMEM/F-12 Gibco medium (Life Technologies, Grand Island, NY) containing 10% FBS, 15 mM HEPES Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY), glutamine (Sigma Aldrich, St Louis, MO), antibiotics (100UI/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin) Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY). Final cell viability was determined by trypan blue exclusion. For primary culture, hepatocytes were seeded on 24-well collagen IV coated BD Biocoat™ plates (BD Bioscience, Billerica, MA) at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well. Two hours after seeding, cells were incubated in DMEM/F-12 medium containing  $1 \times 10^{-6}$  M dexamethasone,  $1 \times 10^{-8}$  M 3,3'-triiodo-L-thyronine, 5 µg/ml bovine insulin (Sigma Aldrich, St Louis, MO), 5 µg/ml apotransferrin (Sigma Aldrich, St Louis, MO), glutamine (Sigma Aldrich, St Louis, MO), antibiotics (100UI/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin) Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY). The medium was changed daily throughout the culture period.

#### ***Primary hepatocytes transduction***

$2 \times 10^5$  hepatocytes were transduced two hours after plating by a twelve-hour exposure to the vector at a multiplicity of infection (MOI) of 60. Cells were kept at 37°C for three days before harvesting. Three days later, hepatocytes were harvested with a trypsin-EDTA solution Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY).

#### ***DNA extraction***

C6 and FAO cells genomic DNA was extracted 3 days after transfection or transduction using the Nucleospin Tissue DNA purification kit following manufacturer's instructions (Macherey Nagel, Düren, Germany). Liver genomic DNA was extracted using Blood and Tissue Kit following manufacturer's instructions (Qiagen, Valencia, Spain). Primary

hepatocytes genomic DNA was extracted with a phenol-chloroform protocol. The total gDNA amount was evaluated with a spectrophotometer (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Ottawa, Canada*) and quality and contamination were controlled using A260/A280 and A260/A230 ratios.

### ***T7 endonuclease assay (T7EI)***

The percentage of UGT1A1 targeted NHEJ-induced indels was measured by a T7EI assay. The purified cell lines gDNA was subjected to amplification by PCR with Taq Platinum Hifi (Invitrogen, Carlsbad, CA) using the following primers: T7UGT1A1 F 5'- tcattctctctcccctccc -3' and T7UGT1A1 5'- tttccaggacattcagggtc -3' specific for rat UGT1A1 targeted region. The PCR program was as follows: 94°C for 2 minutes, 40 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 57°C, 30 seconds at 68°C and 30 seconds at 57°C and 68°C for 10 minutes. Liver and primary hepatocyte genomic DNA was subjected to amplification by PCR with *AmpliTaq Gold®Fast* PCR Master Mix (Applied Biosystems, Lifetechnologies, Grand Island, NY) using the same primers. The PCR program was as follow: 95°C for 10 minutes, 35 cycles of 3 seconds at 96°C, 3 seconds at 57°C and 5 seconds at 68°C and 72°C for 10 seconds. The 296-bp amplicons were denatured through heating and slow re-annealing allowing heteroduplex formation using the following parameters: 2 minutes at 95°C, a decrease from 95 to 85°C (-2°C /second) and a decrease from 85 to 25°C (-0.1°C /second). In case of NHEJ-induced indels, bands of about 182 and 114bp are expected. For cell lines, a final volume of 19µL of PCR product was digested by 5 units of T7EI (NEB, Beverly, MA, USA) for 30 minutes at 37°C and run on 2%-agarose gel. The ratio of cleaved to uncleaved products was used to calculate NHEJ frequency as previously described using ImageJ software<sup>54</sup>. For liver and primary hepatocytes gDNA, a final volume of 15µL of PCR product was digested by 4 units of T7EI (NEB, Beverly, MA, USA) for 30 minutes at 37°C and run using capillary gel electrophoresis on Caliper (Perkin Elmer, Waltham, MA) as

previously described <sup>54</sup>. Labchip GX DNA quantitative software (Perkin Elmer, Waltham, MA) was used for indels frequency calculation.

### ***Western blotting***

Transduced cells were rinsed, trypsinized and pelleted before resuspension in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS]) containing Complete protease inhibitor (Roche, Mannheim, Germany). After incubation at 4°C for 30 minutes, cells were centrifuged (30 min, 13.000 rpm, 4°C). Supernatants were recovered and proteins were quantified by a bicinchonic acid quantification assay using kit BC assay following manufacturer's instructions (Interchim, Montluçon, France). Equal amounts of proteins (40µg) in Laemmli buffer were run on a 7.5% -sodium-dodecyl-sulfate–polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked for two hours with 5% dry milk in 20 mM Tris–HCl (pH 7.4) containing 0.45 M NaCl and 0.1% Tween 20 (TBST). Immunoblotting was performed using murine M2 anti-flag HRP coupled antibody (Sigma, Saint Louis, MO) at 1/500 and murine anti-GAPDH antibody at 1/1000 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) in TBST containing 1% non fat dry milk, overnight at 4°C. Anti-GAPDH incubation was followed by anti-murine HRP-coupled antibody incubation. Signal was visualized using an enhanced chemiluminescence detection kit, Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (*Thermo Scientific*, Ottawa, Canada). Aquisition was done on Fuji LAS-4000 (Fuji HealthScience, USA). Rainbow Precision Plus Protein Dual Color Standard was used as a protein ladder (Biorad, Hercules, CA).

### ***Proviral integrity assay***

To detect the modified part of the provirus from the wild-type vector, PCR were performed as follow with Herculase II High Fidelity Taq (Stratagene, santa Clara, CA): 95°C

for 2 minutes, 62°C for 5 minutes, 35 cycles of 3,5 minutes at 72°C, 30 seconds at 95°C and 30 seconds at 57°C and 72°C for 10 minutes. Primers p1, p2, p3 and p4 were used. Their sequences and localization are indicated in figure 4 and Supplementary Table 2. PCR products were run on a 2%-agarose gel. A 100-bp and a 1-kb bp ladder were used.

### ***Off-target effects analysis***

21 potential off-target sites were chosen based on a mixture of the top ‘Homology’ and ‘Conserved G’s’ PROGNOS rankings for the ZFNs with their standard target sequence. Two additional potential off-target sites were chosen based on the top PROGNOS results for a gapped alignment based on the flexible linker between the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> fingers and a ‘rational design’ analysis of the zinc finger binding helices allowing base degeneracy at some positions with no binding penalty. PCR and SMRT sequencing analysis of potential off-target sites was performed exactly as previously described<sup>36</sup>. Briefly, AccuPrime Taq Hi-Fidelity polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used to amplify the sites, then samples were purified using MagBind EZ-Pure (Omega Biotek, Norcross, GA), pooled in roughly equimolar ratios, and sequenced on the PacBio RS using C2/C2 chemistry and consensus sequencing mode (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA). Specific PCR amplification was not achieved for two of the potential off-target sites and they were discarded from further analysis.

### ***Statistical analysis***

Data sets were analyzed using Graph-Pad Prism Software for statistical analysis using two-tailed Student’s t test. P<0.05 was considered significant.

### ***Acknowledgments***

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Association Francophone des Glycogénoses (to NTH), and from the “Agence Nationale de la Recherche”.

## References

1. Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B. & Nicolas, J. F. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1968–1973 (1995).
2. Donoho, G., Jasin, M. & Berg, P. Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4070–4078 (1998).
3. Jasin, M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet. TIG* 12, 224–228 (1996).
4. Jasin, M. & Berg, P. Homologous integration in mammalian cells without target gene selection. *Genes Dev.* 2, 1353–1363 (1988).
5. Porteus, M. H. & Baltimore, D. Chimeric Nucleases Stimulate Gene Targeting in Human Cells. *Science* 300, 763–763 (2003).
6. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6064–6068 (1994).
7. Mashimo, T. Gene targeting technologies in rats: Zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Dev. Growth Differ.* (2013). doi:10.1111/dgd.12110
8. Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F., 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* (2013). doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004
9. Perez-Pinera, P., Ousterout, D. G. & Gersbach, C. A. Advances in targeted genome editing. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 268–277 (2012).
10. Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1156–1160 (1996).
11. Rahman, S. H., Maeder, M. L., Joung, J. K. & Cathomen, T. Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier. *Hum. Gene Ther.* 22, 925–933 (2011).
12. Carroll, D. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther.* 15, 1463–1468 (2008).
13. Urnov, F. D. et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435, 646–651 (2005).
14. Lombardo, A. et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat. Biotechnol.* 25, 1298–1306 (2007).
15. Tay, F. C. et al. Targeted transgene insertion into the AAVS1 locus driven by baculoviral vector-mediated zinc finger nuclease expression in human-induced pluripotent stem cells. *J. Gene Med.* 15, 384–395 (2013).
16. Hockemeyer, D. et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 27, 851–857 (2009).
17. Yusa, K. et al. Targeted gene correction of [agr]1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature advance online publication*, (2011).
18. Chuah, M. K. & Vandendriessche, T. Optimizing delivery and expression of designer nucleases for genome engineering. *Hum. Gene Ther. Methods* 24, 329–332 (2013).
19. Schmitt, F. et al. Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* 139, 999–1007, 1007.e1–2 (2010).
20. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. & Trono, D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* 15, 871–875 (1997).

21. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267 (1996).
22. Joglekar, A. V. et al. Integrase-defective lentiviral vectors as a delivery platform for targeted modification of adenosine deaminase locus. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 1705–1717 (2013).
23. Pelascini, L. P. et al. Histone Deacetylase Inhibition Rescues Gene Knockout Levels Achieved with Integrase-defective Lentiviral Vectors Encoding Zinc-finger Nucleases. *Hum. Gene Ther. Methods* (2013). doi:10.1089/hgtb.2013.107
24. Lombardo, A. et al. Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nat. Methods* (2011). doi:10.1038/nmeth.1674
25. Cornu, T. I. & Cathomen, T. Targeted genome modifications using integrase-deficient lentiviral vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 2107–2113 (2007).
26. Ikushiro, S. Takashi Iyanagi: UGT1 gene complex: from Gunn rat to human. *Drug Metab. Rev.* 42, 14–22 (2010).
27. Doyon, Y. et al. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat. Methods* 8, 74–79 (2011).
28. Yang, S. et al. Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther.* 15, 1411–1423 (2008).
29. Szymczak, A. L. & Vignali, D. A. A. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 627–638 (2005).
30. Doyon, Y. et al. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nat. Methods* 7, 459–460 (2010).
31. Connelly, J. P., Barker, J. C., Pruett-Miller, S. & Porteus, M. H. Gene Correction by Homologous Recombination With Zinc Finger Nucleases in Primary Cells From a Mouse Model of a Generic Recessive Genetic Disease. *Mol. Ther.* 18, 1103–1110 (2010).
32. Herrmann, F. et al. p53 Gene repair with zinc finger nucleases optimised by yeast 1-hybrid and validated by Solexa sequencing. *PloS One* 6, e20913 (2011).
33. Rousseau, J. et al. Endonucleases: tools to correct the dystrophin gene. *J. Gene Med.* 13, 522–537 (2011).
34. Li, H. et al. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475, 217–221 (2011).
35. Miller, J. C. et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 25, 778–785 (2007).
36. Fine, E. J., Cradick, T. J., Zhao, C. L., Lin, Y. & Bao, G. An online bioinformatics tool predicts zinc finger and TALE nuclease off-target cleavage. *Nucleic Acids Res.* (2013). doi:10.1093/nar/gkt1326
37. Hutson, T. H., Verhaagen, J., Yáñez-Muñoz, R. J. & Moon, L. D. F. Corticospinal tract transduction: a comparison of seven adeno-associated viral vector serotypes and a non-integrating lentiviral vector. *Gene Ther.* 19, 49–60 (2012).
38. Rahim, A. A. et al. Efficient gene delivery to the adult and fetal CNS using pseudotyped non-integrating lentiviral vectors. *Gene Ther.* 16, 509–520 (2009).
39. Apolonia, L. et al. Stable gene transfer to muscle using non-integrating lentiviral vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 1947–1954 (2007).
40. Philippe, S. et al. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17684–17689 (2006).
41. Loewen, N. et al. Comparison of wild-type and class I integrase mutant-FIV vectors in retina demonstrates sustained expression of integrated transgenes in retinal pigment epithelium. *J. Gene Med.* 5, 1009–1017 (2003).

42. Mátrai, J. et al. Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. *Hepatology*. Baltimore Md 53, 1696–1707 (2011).
43. Holkers, M. et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* 41, e63 (2013).
44. Yang, L. et al. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res.* 41, 9049–9061 (2013).
45. Sander, J. D. et al. In silico abstraction of zinc finger nuclease cleavage profiles reveals an expanded landscape of off-target sites. *Nucleic Acids Res.* (2013). doi:10.1093/nar/gkt716
46. Gabriel, R. et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* (2011). doi:10.1038/nbt.1948
47. Gupta, A., Meng, X., Zhu, L. J., Lawson, N. D. & Wolfe, S. A. Zinc finger protein-dependent and -independent contributions to the in vivo off-target activity of zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res.* 39, 381–392 (2011).
48. Pattanayak, V., Ramirez, C. L., Joung, J. K. & Liu, D. R. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat. Methods* 8, 765–770 (2011).
49. Bayer, M. et al. A large U3 deletion causes increased in vivo expression from a nonintegrating lentiviral vector. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 1968–1976 (2008).
50. Okada, Y. et al. Targeted gene modification in mouse ES cells using integrase-defective lentiviral vectors. *Genes*. N. Y. N 2000 47, 217–223 (2009).
51. Pruett-Miller, S. M., Reading, D. W., Porter, S. N. & Porteus, M. H. Attenuation of zinc finger nuclease toxicity by small-molecule regulation of protein levels. *PLoS Genet.* 5, e1000376 (2009).
52. Nguyen, T. H. et al. Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer. *Gene Ther.* 14, 1270–1277 (2007).
53. Bovia, F. et al. Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood* 101, 1727–1733 (2003).
54. Guschin, D. Y. et al. A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 649, 247–256 (2010).

## Tables

ZFN	Alignment to	Homology level (%)
wtZFNL	wtZFNR	90.7
wtZFNL	wtZFNR	61.5
wtZFNR	wtZFNR	61.7

**Table 1.** Sequence homology after alignment between ZFNs monomers without optimization (wt) and after codon sawpping (sw).



Nuclease	Closest Gene	Match Type	Mutations per half-site			PROGNOS Rankings			C6 Cell Line Modification Frequency	
			(+)	(-)	(-) half-site	(+) half-site	(-) half-site	Homology		Conserved G's
Ugt1a1	L-5-R	0	0	0	C'TCCGGTTC'CCA	TGG	GCA	1	1	64.469%
Tars12	L-5-R	3	3	3	C'TCCtaTc'CCCA	TGG	ATGAAGGAAgcT'	9	2	10.464%
Gbas	L-6-R	2	4	4	C'TCaGGTTC'CCcg	TGG	ATGgAGGAA'TAT'	4	22	1.282%
Il1rap1	L-5-R	5	2	2	a'TCCGGTg'CCct	Ttt	c'TGcAGGAA'TAT'	29	9	0.229%
Myo16	R-6-L	5	3	3	T'tCAa tg'CCCT'	CAT	CCTTGGGtACTg	205	12	0.157%
Ssr1	R-6-L	2	4	4	TGCATATTC'CTT'	gcT'	gCATGGGAcCaG	3	20	0.117%
Ftcd	R-6-L	5	4	4	gtCAcAaTCCaT'	CAT	atgTGGGAAcCaG	240	13	0.051%
								Total Sites Interrogated:	22	

**Table 2. ZFN off-target activity.**

Using SMRT sequencing, we interrogated 22 genomic loci that were highly ranked for cleavage in the rat genome by the Ugt1a1 ZFNs (the intended target site and 21 potential "off-target" sites). High levels of modification at the intended target were observed as well as off-target activity at 6 additional loci. The 'match type' indicates the orientation of the left (l) and right (r) nucleases at the site and the length of the spacer—(+) half-site—3'. Therefore, the (+) positive half-site is listed in the reverse anti-sense orientation compared to the DNA sequences are listed as 5'—(+) half-site—spacer—(-) half-site—3'. Off-target sites were chosen for investigation based on a mixture of the top-ranked sites by the PROGNOS 'Homology' and 'Conserved G's' algorithms. C6 cell line modification frequency is the percentage of observed sequences showing evidence of non-homologous end-joining repair. For all sites shown, significantly higher ( $p < 0.05$ ) frequencies of indels were observed in cells expressing active nuclease compared to mock treated cells. In the C6 cell line, our analysis revealed that the locus near the Ftcd gene contains a homozygous C>T SNP at the second position of the (-) half-site, introducing an additional mutation in that ZFN binding site relative to the reference genome.

## Legends

**Figure 1. Codon swapping of a pair of Zinc Finger Nucleases (ZFNs) targeting rat UGT1A1** (a) ZFNs binding site on Rat UGT1A1 exon 4. Bold letters indicate ZFN Left and ZFN Right target sites. Primers pair used for T7 endonuclease I assay are indicated with arrows (T7UGT1A1-F and T7UGT1A1-R). (b) Lentiviral constructs encoding UGT1A1-ZFNs pair as a self-processing polyprotein in their wild type (wt) or swapped form (sw).

**Figure 2. Functionality of wild-type and swapped lentiviral plasmids encoding a pair of ZFNs.**

Rat C6 cells were transfected by lentiviral plasmids encoding UGT1A1-wtZFNs or UGT1A1-swZFNs using Lipofectamine LTX. Non-transfected cells served as negative control (NT). Three days after transfection, genomic DNA was isolated and subjected to T7 endonuclease I assay to detect gene modification at targeted UGT1A locus site using previously indicated T7UGT1A1-F and T7UGT1A1-R primers flanking the target site. PCR products were denatured and slowly re-annealed to allow heteroduplex formation between wild-type and mutated products before T7 endonuclease I digest. As it selectively cleaves DNA heteroduplexes, only the products of re-annealing between wild-type and mutant alleles, carrying mutations due to ZFNs activity, are digested. (a) The products were run on 2%-agarose gel. a,b). Level of gene modification: asterisk indicates about 296bp-long uncleaved products and arrows indicate both about 182 and 114bp-long cleaved products. The frequency of gene modification was calculated according to the ratio of cleaved to uncleaved DNA products from 3 independent experiments. Y-axis shows frequency of allelic disruption. Bars indicate mean  $\pm$  SEM.

**Figure 3. T7 endonuclease I mismatch assay on lentiviral vector transduced cells.**

FAO and C6 cells were transduced with LV-swZFNs or LV-wtZFNs at the indicated MOI. Non-transduced cells served as negative control (NT). Three days post-transduction, genomic DNA was isolated and subjected to T7 endonuclease I assay to detect gene modification using previously indicated T7UGT1A1-F and T7UGT1A1-R primers flanking the target site. PCR products were denatured and slowly re-annealed to allow the heteroduplexes formation between wild-type and mutated products before T7 endonuclease I digest. As it selectively cleaves DNA heteroduplexes, only the products of re-annealing between wild-type and mutant alleles, carrying mutations due to ZFNs activity, are digested. a,b). Level of gene modification: asterisk indicates about 296bp-long uncleaved products and arrows indicate both about 182 and 114bp-long cleaved products. The frequency of gene modification was calculated according to the ratio of cleaved to uncleaved DNA products from 3 independent experiments. (a) PCR products were separated on ethidium bromide stained 2%-agarose gel. (b) Left panel: FAO transduction. Right panel: C6 transduction. Y-axis shows frequency of gene modification. Bars indicate mean  $\pm$  SEM; experiments have been repeated in duplicata three times.

**Figure 4. PCR to assess proviral integrity.**

C6 cells were transduced with LV-swZFNs or LV-wtZFNs vector at an MOI of 200. Non transduced cells, NT, and sw and wt plasmids serve as controls for the PCR. Three days after transduction, PCR were performed on C6 gDNA with (b) P1-P4, (c) P1-P2 and (d) P3-P4 primers pairs as shown in (a). (b) The products were separated on ethidium bromide stained 2%-agarose gel. Arrows indicate the expected length of PCR products in absence of recombination. 1000bp ladder (L) was used.

**Figure 5. Western blot assessment of zinc finger nucleases integrity.**

C6 cells were transduced with LV-swZFNs or LV-wtZFNs. Proteins were extracted three days after transduction. C6 protein samples were separated on 7.5% SDS-PAGE and stained with anti-Flag and anti-calnexin antibodies.”46 and 42-kDa bands are expected using anti-flag staining. As indicated by asterisks, ZFNs migrate as a doublet.

**Figure 6. T7 endonuclease I mismatch assay on lentiviral vector transduced primary hepatocytes**

Primary hepatocytes from five rats (R1 to R5) were isolated and transduced with LV-swZFNs or IDLV-swZFNs at an MOI of 60. Three days after transduction, genomic DNA was isolated and subjected to T7 endonuclease I assay to detect gene modification using previously indicated T7 endonuclease assay with T7UGT1A1-F and T7UGT1A1-R primers flanking the target site. The products were separated using capillary gel electrophoresis. Representative graph of capillary gel electrophoresis running was shown for (a) control non-transduced hepatocytes, (b) IDLV transduced hepatocytes and (c) LV transduced hepatocytes. Asterisks and arrows indicate uncleaved and cleaved products, respectively. (d) Gene modification was shown for individual rats transduced with IDLV (R1-R4 IDLV) and LV (R4,R5-LV); Bars indicate mean  $\pm$  SEM. The frequency of gene modification was calculated as previously indicated, using the area under the curve corresponding to cleaved and uncleaved DNA products.

**Figure 7. T7 endonuclease I mismatch assay on liver from Gunn rats injected with IDLVs.**

Two-day-old Gunn rats were injected with 100 $\mu$ L of IDLV-swZFNs preparation into the temporal vein. Ten days after injection, genomic DNA was isolated and subjected to T7 endonuclease I assay to detect gene modification using previously indicated T7 endonuclease assay with T7UGT1A1-F and T7UGT1A1-R primers flanking the target site. The products were separated using capillary gel electrophoresis. Representative graph of capillary gel electrophoresis running was shown for (a) a non-injected control rat and (b) an IDLV injected rat. Asterisks and arrows indicate uncleaved and cleaved products, respectively. (c) Gene modification was shown for individual animals. The frequency of gene modification was calculated as previously indicated, using the area under the curve corresponding to cleaved and uncleaved DNA products.

Figures

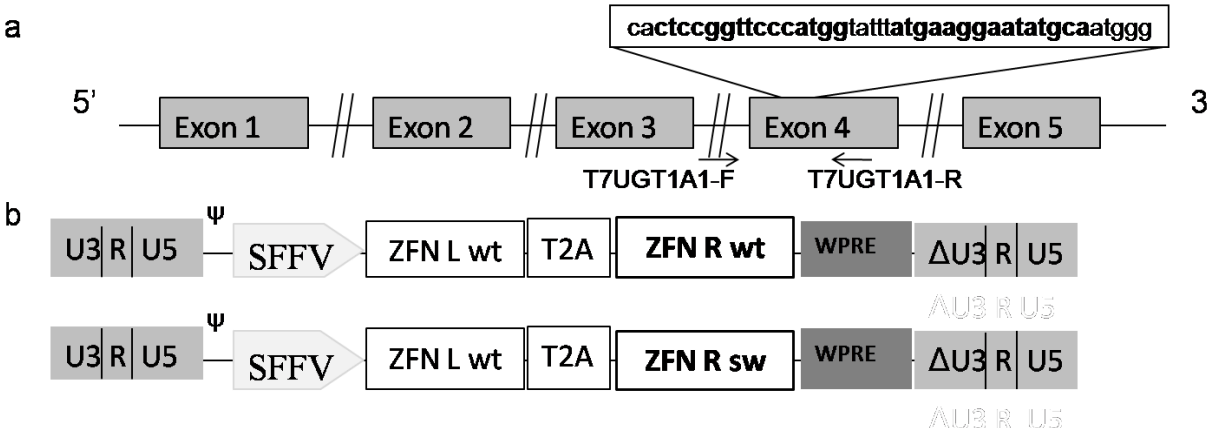


Figure 1

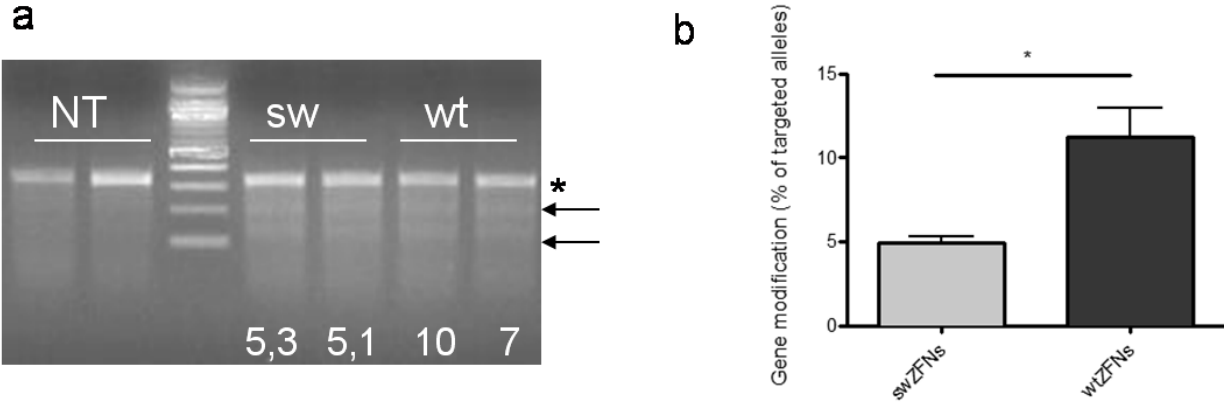
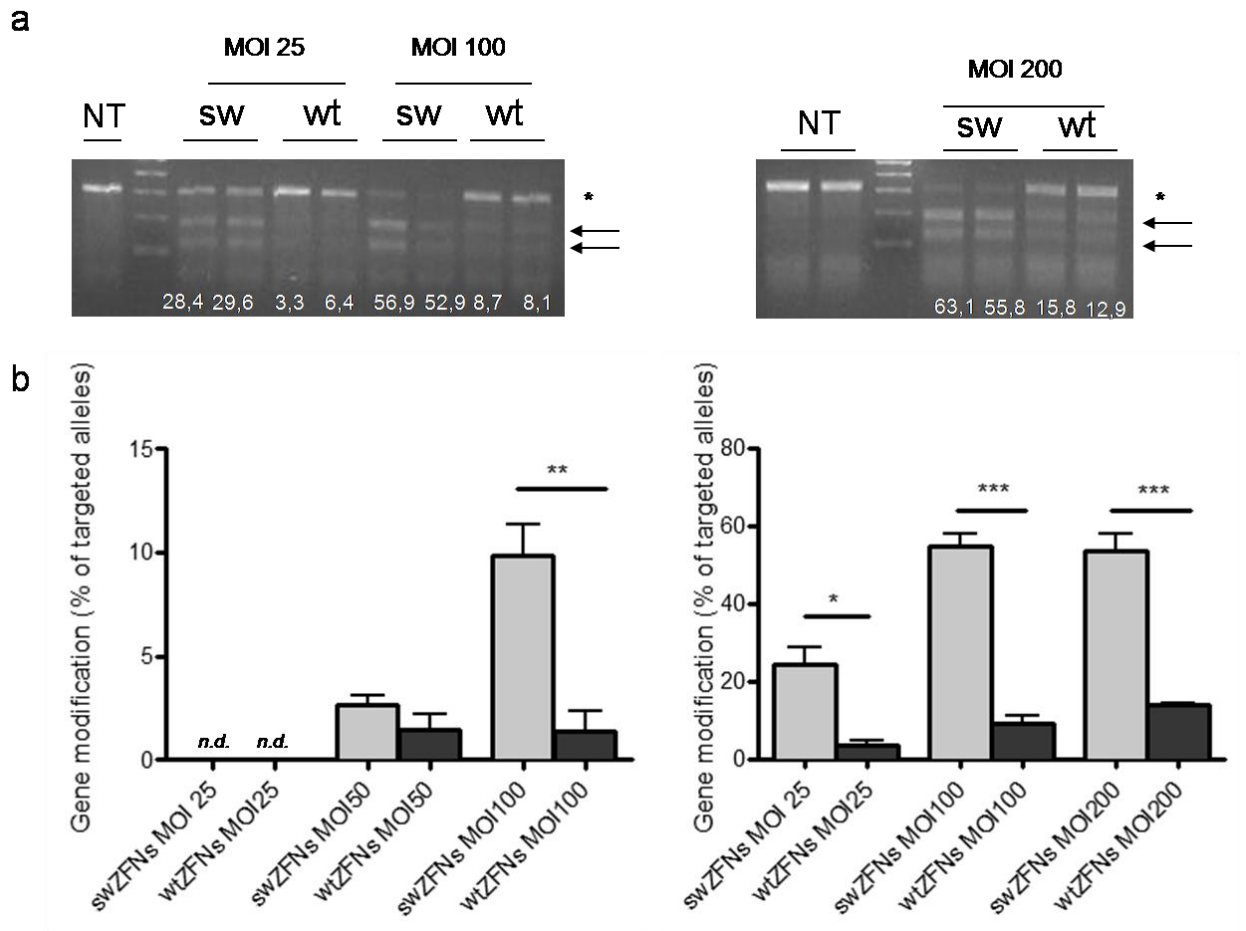
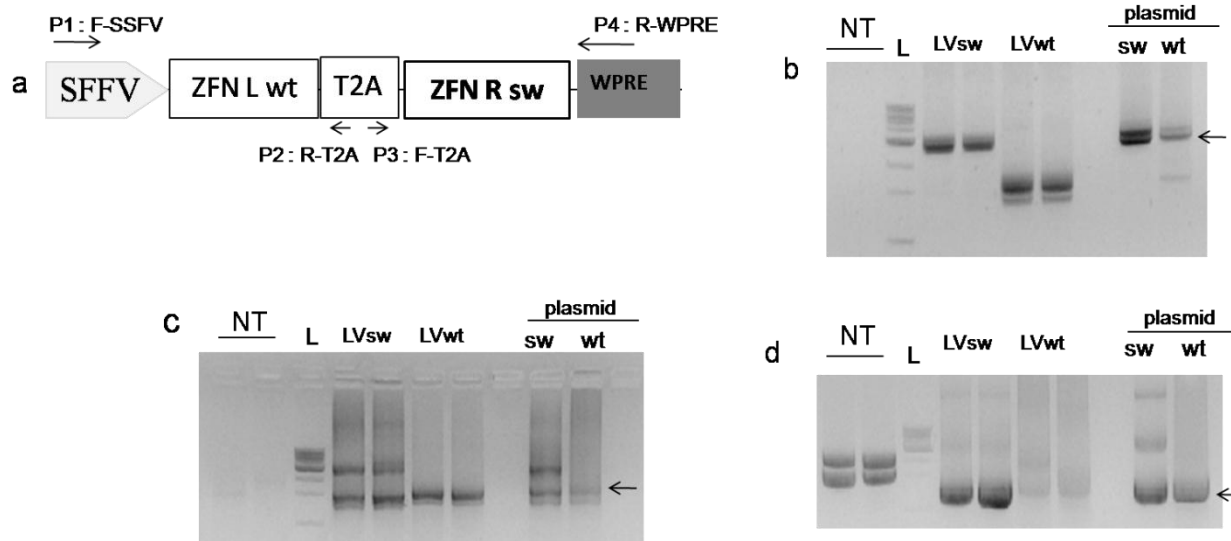


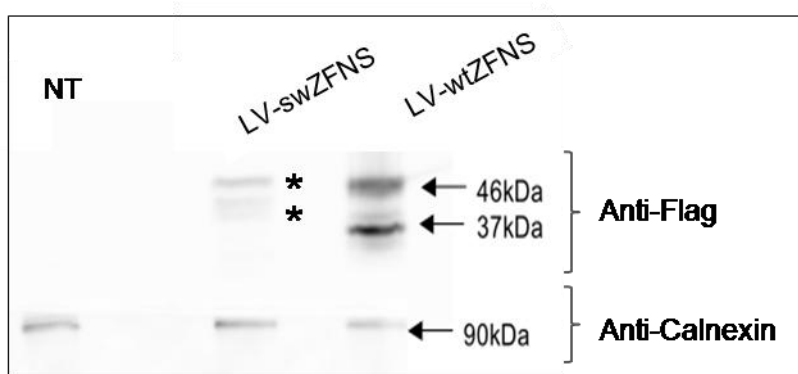
Figure 2



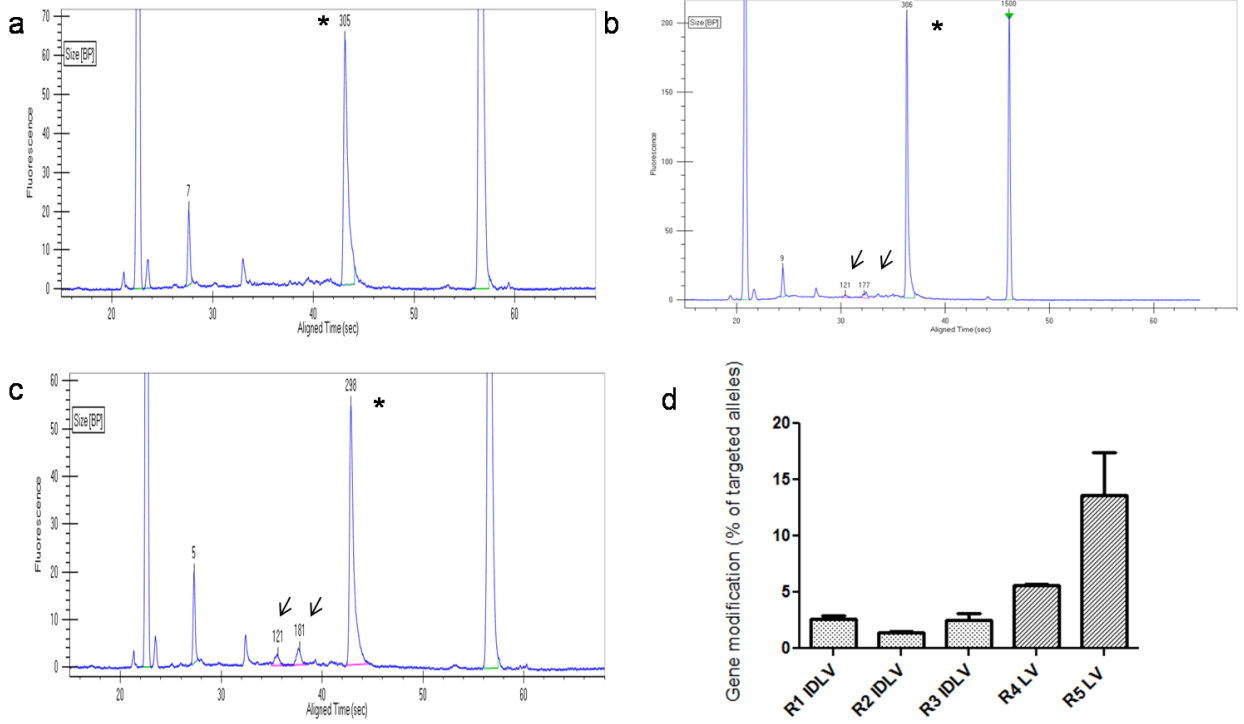
**Figure 3**



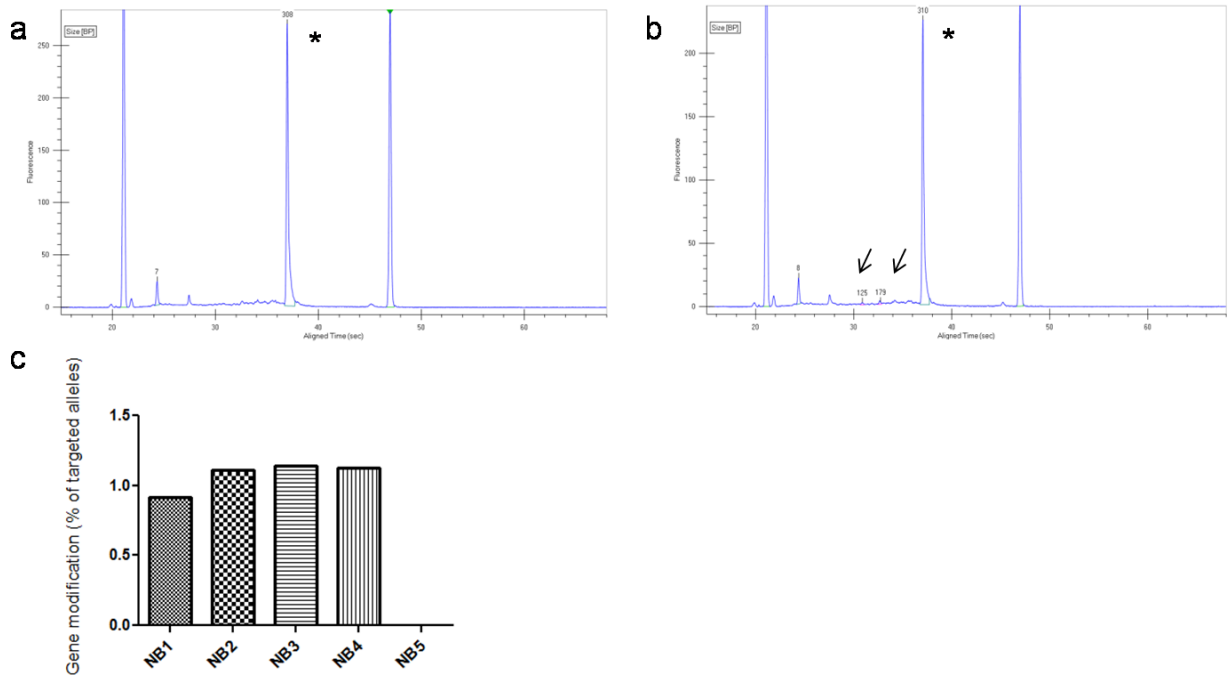
**Figure 4**





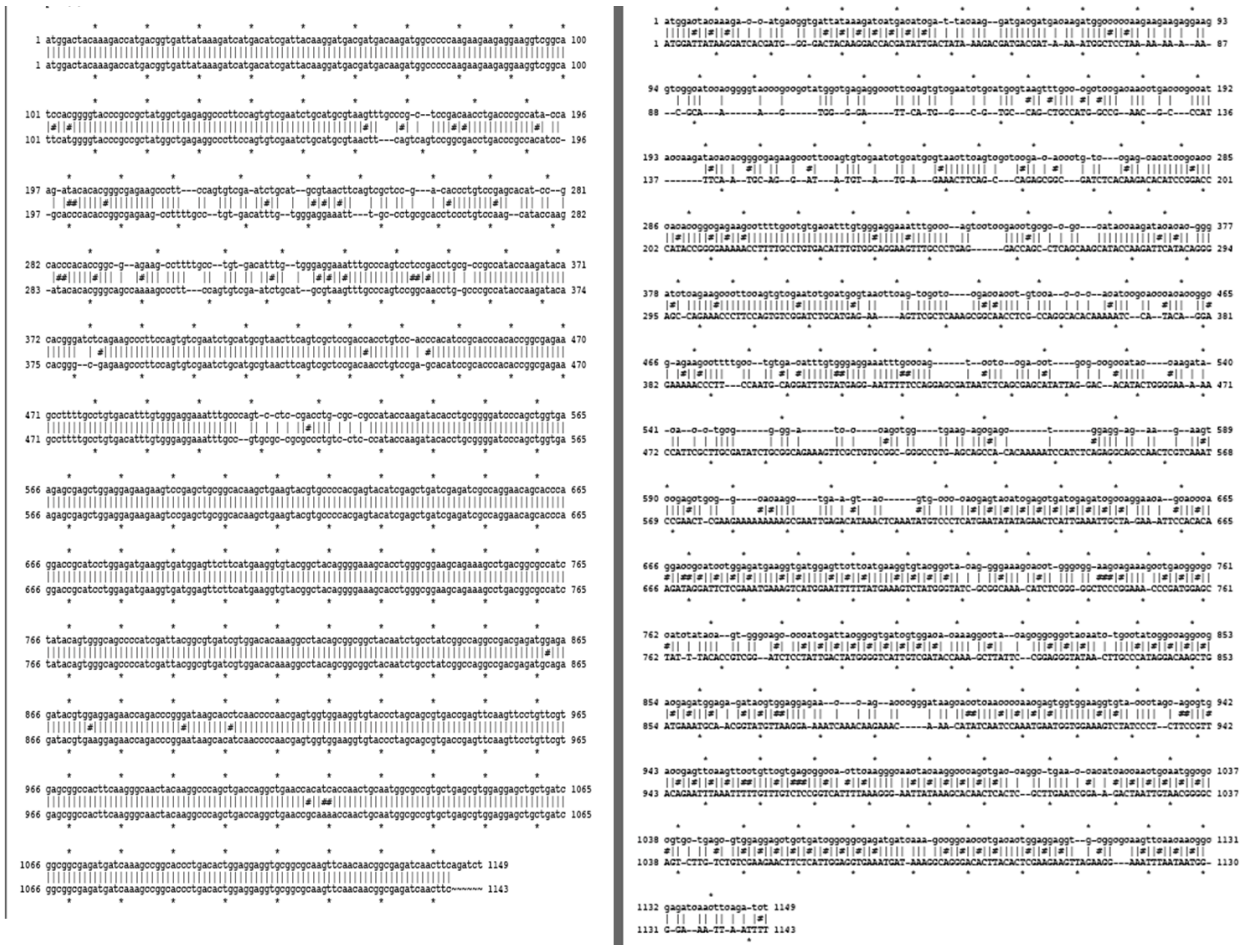


**Figure 6**

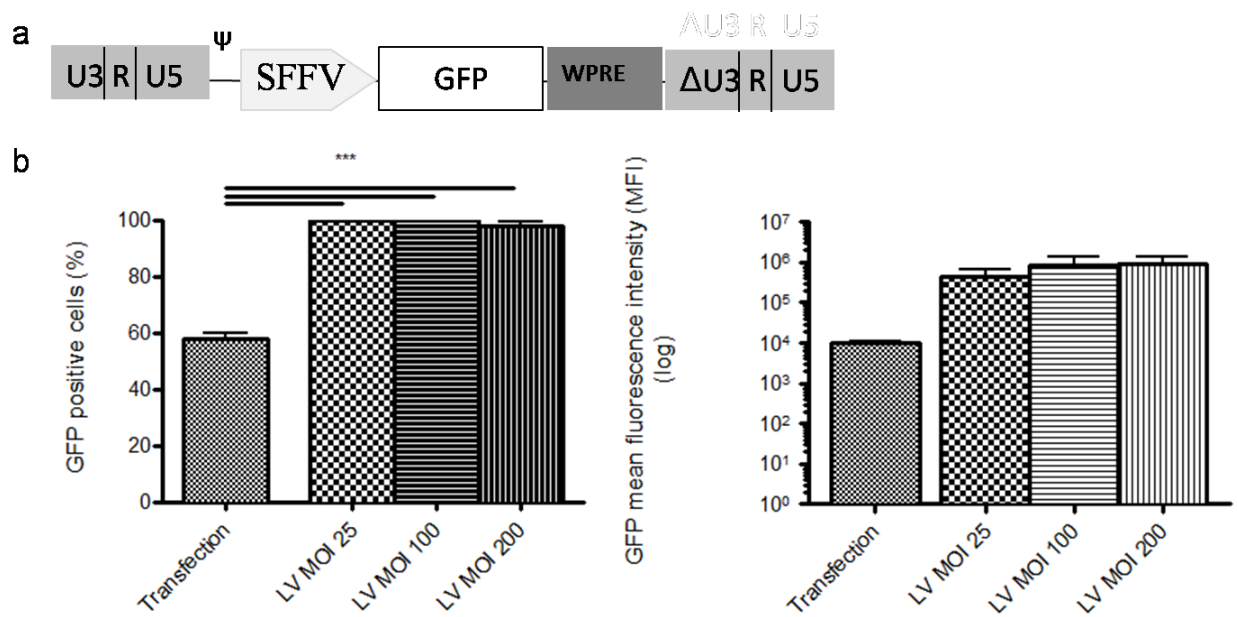


**Figure 7**

## Supplementary materials



**Figure S1.** Sequence alignment between ZFN Left (upper sequence) and wild-type ZFN Right (lower sequence, left panel) or swapped ZFN Right (lower sequence, right panel). Bars and stars indicate identities and mismatches, respectively.



**Figure S2. Assessment of SFFV promoter efficacy in C6 cells after transfection or after transduction.** (a) C6 cells were transduced with LV-SFFV-GFP at the indicated MOI, or transfected with SFFV-GFP plasmid. (b) Three days later, proportion of GFP expressing cells (left panel) and GFP mean fluorescence intensity (MFI, right panel) were assessed by flow cytometry. Non transfected and non transduced cells were used to assess C6 background fluorescence. Results were obtained from 2 and 3 independent experiments for transfection and transduction respectively. Percentage of GFP-positive cells and MFI are indicated. Bars indicate mean  $\pm$  SEM.

Primer Name	Sequence (5'-3')
P1 – F SFFV	GCAGCGTATCCACATAGCG
P2 – R T2A	GGATTCTCCTCCACGTCACC
P3 – F T2A	CTTCTAACATGCGGTGACGTG
P4 – R WPRE	GGATATCTGCGGTGAGCAG
Gag F	GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA
Gag R	GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC
HB2 - F	TCCCGTGTGGATCGGCGGCTCCA
HB2 - R	CTGCTTGCTGATCCACATCG
T7UGT1A1-F	TCACTTCTCTCTCCCCTCCC
T7UGT1A1-R	TTCCAGGACATTCAGGGTC

**Supplementary Table 1.** Primers used in the study.

## **Supplementary Materials and methods**

### ***Flow Cytometry***

Three days after transfection and four days after transduction, C6 cells were collected for flow cytometry analysis on a LSRII device to evaluate GFP expression using BDFacsDiva Software for data acquisition (BD Bioscience, Billerica, MA). Data analysis was done with FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR).

## **V-2 Faisabilité d'une stratégie de thérapie génique des maladies métaboliques du foie utilisant des nucléases artificielles pour favoriser la RH : réparation génique *in vivo* du gène de l'UGT1A1 dans le modèle du rat Gunn**

La mise au point d'une stratégie de réparation génique *in vivo* à l'aide de ZFNs dans le modèle du rat Gunn est présenté ci-dessous sous la forme d'un article en préparation.

**Correction of the UDP-glucuronosyltransferase genetic mutation in the Gunn rat model of  
Crigler–Najjar syndrome type I using ZFN-mediated genome editing**

Abarrategui-Pontes Cécilia<sup>1</sup>, Thinarth Reynald<sup>1</sup>, Fine Eli J.<sup>3</sup>, Thepenier Virginie<sup>1</sup>, Severine Remy<sup>1</sup>, Severine Menoret<sup>1</sup>, Laurent Tesson<sup>1</sup>, Frédéric Delbos<sup>1</sup>, Anne Myara<sup>4</sup>, Sophie Laplanche<sup>4</sup>, Philippe Labrune<sup>5</sup>, Orlane Pineau<sup>1</sup>, Cradick Thomas J.<sup>3</sup>, Bao Gang<sup>3</sup>, Podevin Guillaume<sup>2</sup>, Anegon Ignacio<sup>1</sup>, Nguyen Tuan Huy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMRS 1064, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France;

<sup>2</sup>Pediatric hepatogastroenterology - HIFIH laboratory, UPRES 3859, SFR 4038, Angers, France

<sup>3</sup> Department of Biomedical Engineering, Georgia Institute of Technology and Emory University, Atlanta, GA 30332, USA

<sup>4</sup> Service de Biologie, Groupe Hospitalier Saint Joseph, Paris, France

<sup>5</sup> Service de Pédiatrie, Hôpital Antoine Béclère (AP-HP), Clamart, France

**\*Correspondance to:** Tuan Huy Nguyen, PhD,  
INSERM UMRS 1064,  
CHU Hotel Dieu,  
44093 Nantes Cedex, France  
E-mail: [tuan.nguyen@univ-nantes.fr](mailto:tuan.nguyen@univ-nantes.fr)  
Phone: +33 2 40 08 74 14  
Fax: +33 2 40 08 74 11

Short title: ZFN-directed gene repair in Gunn rats

## Abstract

Crigler Najjar disease type I (CNI) is an inherited monogenic liver disorder caused by mutations in the UGT1A1 gene. This disease is a paradigm for the treatment of liver metabolic diseases. The Gunn rat model is a spontaneous animal model for CNI, in which a single guanosine base deletion in UGT1A1 exon 4 causes hyperbilirubinemia. We co-delivered zinc finger nucleases targeting Gunn rat exon 4 and an exogenous donor containing 2.2 kb wild-type part of the rat UGT1A1 sequence to newborn Gunn rats using AAV 2/8 to promote gene repair *in vivo*. In the treated rats injected with AAV-ZFNs and AAV-donor, gene repair of UGT1A1 was detected in the liver by SMRT sequencing. Gene correction level was low but was sufficient to decrease bilirubinemia by up to 50% 15 weeks after injection. Bilirubin conjugates were detected in the bile, confirming unequivocal evidence of the restoration of UGT1A1 activity. However, therapeutic efficacy was only transiently maintained as bilirubinemia increased over time to reach the levels of the control Gunn rats (ZFNs alone, PBS-injected). At the time of sacrifice at week 27, we still detected the expression of repaired UGT1A1 mRNA at levels similar to the levels of the short-term cohort. This showed the long-term persistence of the corrected hepatocytes but their amount was insufficient to maintain metabolic effect in adult Gunn rats.

In conclusion, to our knowledge, our study is the first to demonstrate *in vivo* gene repair of an endogenous genetic mutation using ZFN-mediated genome engineering. It shows the feasibility of such targeted approaches in the treatment of liver inherited diseases.

Key words: Crigler Najjar syndrome type I, Gunn rat, gene therapy, ZFNs, gene repair, AAV



## Introduction

As the liver is involved in many metabolic pathways, it can be affected by numerous inherited disorders. Crigler Najjar disease type I (CNI) is a paradigm for inherited liver disorders. Indeed, classical gene therapy approaches have been successfully carried out in its spontaneous animal model, the Gunn rat, using viral vectors allowing long-term cure.

Oncoretroviral vectors have been used to cure Gunn rats following a 70% hepatectomy to stimulate hepatocytes proliferation to allow their transduction<sup>1,2</sup>. Long-term correction has also been obtained with integrative lentiviral vectors after neonatal delivery<sup>3</sup>. UGT1A1 expression was maintained in the long term in adult Gunn rats using miR142-3p targets to detarget transgene expression in antigen presenting cells of the haematopoietic lineage<sup>4</sup>. However, there are some concerns regarding the potential risk of insertional mutagenesis due to uncontrolled retroviral integration<sup>5</sup>. Integration Deficient Lentiviral Vectors (IDLV) are promising tools to avoid these drawbacks. However, transduction efficiency and transgene expression from IDLV is relatively low compared to LV, and transgene expression is lost in dividing cells<sup>6,7</sup>. AAV vectors mainly remain in an episomal status, but some integration events can occur and tumorigenesis was described after AAVr delivery in a model of MPSVII mice<sup>8</sup>. Therapeutic efficacy of AAV was rapidly obtained but it was lost overtime after delivery in newborn and young rats, which is consistent with the loss of AAV episomes due to hepatocytes division<sup>9</sup>. A long-term correction has been obtained after AAVr delivery in adult rats<sup>10</sup>. Finally, adenoviral vectors have also been used but are still associated with a risk of immune response although it has been reduced with new generations of so-called gutless adenoviral vectors<sup>11-14</sup>.

Although current vectors are promising and are already used in clinical trials, there are remaining issues and limitations that call for the development of fundamental and new preclinical approaches.

Targeted genome modification is now a major goal for gene therapy to improve both its efficacy and biosafety. Homologous recombination (HR) can be used for targeted gene therapy but its spontaneous frequency is quite low ranging between  $10^{-6}$  and  $10^{-8}$  in mammalian cells<sup>15</sup>. Over the last few years, Zinc Finger Nucleases (ZFNs) have been used as efficient tools to target endogenous loci. ZFNs have been created by associating zinc finger domains (ZFs) to bind a specific DNA sequence and the aspecific endonucleasic domain of the FokI restriction enzyme, which is functional upon dimerization<sup>16-19</sup>. Each ZF of 30 amino acids recognizes a specific 3-bp sequence. Consequently, the association of 6 ZFs is statistically sufficient to target a unique locus in the human genome. FokI exists as homodimeric or heterodimeric forms. The obligate heterodimeric variants have improved the biosafety of these tools by reducing off-target effects<sup>19-23</sup>. ZFNs promote targeted DNA double strand break (DSB), which can then be repaired through Non Homologous End Joining (NHEJ) or HR if a donor containing homologous regions to the cutting site is available. As a DSB can increase HR level up to 1000 fold, ZFNs could be used in gene therapy to efficiently promote targeted genome modification through HR. So far, the correction of an haemophilic murine model using a knock-in strategy to introduce a wild-type cDNA to correct a mutated human FIX minigene integrated into the ROSA26 genomic locus is the only demonstration of *in vivo* gene editing using ZFNs<sup>20,21</sup>.

Concerning CN-I, it has been shown that therapeutic effect was obtained with the restoration of as few as 5% of UGT1A1 enzymatic activity<sup>22</sup>. In the present study, we investigated whether ZFNs technology is efficient to stimulate gene repair of a single mutation in the UGT1A1 gene responsible for the disease in the Gunn rat. We demonstrated the feasibility of this targeted gene therapy approach by allowing to obtain a level of UGT1A1 gene correction sufficient to reduce bilirubinemia.

## Results

### Construction of the AAV-ZFNs targeting UGT1A1 exon 4

Gene repair strategy is depicted in Figure 1. The pair of ZFNs targets a genomic locus located 114 nt away from the Gunn rat UGT1A1 mutation. This pair contains 5 ZFs per monomer and the obligate heterodimeric ELD/KKR variant of FokI<sup>23</sup>. A donor construct was designed to repair the single guanosine base deletion carried found in the UGT1A1 exon 4 of the Gunn rat. This construct contains the wild-type sequence of UGT1A1 exon 4 flanked by 1kb-homology arms (Fig. 1). The pair of ZFNs was cloned into an AAV backbone as a 2A self-processing polyprotein under the control of the LP1 liver specific promoter<sup>24</sup>. ZFN-driven gene modification was quantified by T7EI assay in C6 rat cells transfected with the AAV plasmid. This assay detects imprecise repair of ZFN-mediated DSB leading to gene modifications, consisting of short insertions or deletions called indels. Transfection efficiency was about 60% with GFP-encoding plasmid (data not shown). We detected 8.6% of indels, showing that our vector is functional for targeted DSB induction in the UGT1A1 rat gene (Fig. 1).

### Short-term follow-up of bilirubinemia correction in treated Gunn rats

Two-day-old Gunn pups were co-injected with the AAV-ZFNs at a dose of  $1.10^{13}$  vg/kg and AAV-donor at 1:1 and 1:5 ratio (ZFNs:Donor), or with the AAV-ZFNs alone. Of note, we observed that a dose of  $1.10^{13}$ vg/kg of AAV-ZFNs was equivalent to a dose of  $4.10^{13}$  vg/kg to deliver AAV vector genomes in the liver, as assessed by qPCR (Fig. S1). There was no difference in ALAT activity between all AAV-injected groups and the PBS-injected control group, showing that the procedure was well tolerated (Fig. 2). In the 1:1 ratio group, there was no significant decrease in bilirubinemia, except on days 60 and 70 after injection (Fig. 3). Rats treated with the 1:5 ratio, showed a 40-50% significant decrease in bilirubinemia at all time points but at day 90 after injection until the time of sacrifice compared to control groups injected

with AAV-ZFNs only or co-injected with AAV-GFP and AAV-donor at a 1:5 ratio. At the end of the short-term study, fifteen weeks after injection, bile samples were collected for detection of bilirubin conjugates using HPLC analysis (Fig. 4). As homozygous Gunn rats have no UGT1A1 activity and therefore no bilirubin conjugates can be detected in their bile, the presence of bilirubin mono- and di-conjugates in the bile samples from animals injected at the 1:5 ratio showed unequivocal restoration of UGT1A1 activity. Proportions of bilirubin conjugates varied between treated rats, but they were lower than the ones observed in a bile sample from a heterozygous Gunn rat. Of note, we did not observe a correlation between the proportions of bilirubin conjugates and the decrease in bilirubinemia. For instance, rats #42 and #44 had serum levels of bilirubin of 38  $\mu$ M and 50  $\mu$ M, respectively although rat #42 had a lower proportion of bilirubin conjugates than rat #44. It is probable that bile analyses were only representative of bilirubin pigment proportions at the time of collection.

Of note, we did not detect AAV-ZFNs vector genomes (data not shown) nor ZFNs expression 15 weeks after injection, while ZFNs expression was detected 10 days after injection (Fig. 5).

Altogether, these data showed successful *in vivo* gene repair of the UGT1A1 gene in the liver of Gunn rats, resulting in a significant correction of bilirubinemia.

### **Long-term assessment of bilirubin metabolism**

One critical issue for clinical development is the persistence of the therapeutic effect. A second cohort two-day-old animals was injected with AAV-ZFNs and AAV-donor at a 1:5 ratio for long-term follow-up of bilirubinemia. We observed a significant decrease in bilirubinemia compared to AAV-ZFNs control group at early time points after injection, confirming the results of our short-term study (Table 1). However from week 15, bilirubinemia increased and was not statistically different from the control group.

### **Evaluation of genome editing efficacy**

At the time of sacrifice of the short-term (week 15) and the long-term (week 27) cohorts co-injected with AAV-ZFNs and AAV-donor at the 1:5 ratio, we assessed the level of gene correction of UGT1A1 mutation, that is to say the restoration of the deleted G, and the level of on-target ZFNs activity on UGT1A1 transcripts in the liver using SMRT sequencing. Gene correction was detected at levels of 0.16% and 0.22% in the short-term and the long-term animal cohorts, respectively (Fig. 6). There was no statistically significant difference between both groups. These levels were significantly higher than the levels observed in the control group co-injected with AAV-GFP and AAV-donor at the 1:5 ratio. We also detected significant NHEJ-induced indels at the ZFN-targeted site at similar levels in both short-term and long-term animal cohort (about 0.25%).

## Discussion

Precise genome editing would represent a significant breakthrough for gene therapy offering advantages for *in vivo* approaches regarding biosafety and specificity.

HR can be used to promote locus specific therapeutic gene editing. Paulk's team treated a mice model of tyrosinemia with AAV vectors carrying a promoterless FAH transgene and showed that AAV vectors alone were sufficient to promote homology-directed gene repair<sup>25-27</sup>. Thanks to the selective advantage of the treated cells, a level as low as 0.1% of HR was sufficient to correct the phenotype. Unfortunately, this cannot be applied to all diseases. The development of artificial endonucleases, such as ZFNs or TALE nucleases, to promote targeted DSB allowed the increase in HR frequency at their target site. These nucleases are highly efficient to promote gene invalidation both *in vitro* and in embryos to generate knock-out animals<sup>28,28-31</sup>. The first clinical trials with ZFNs consist in *ex vivo* protocols to invalidate CCR5 gene for AIDS treatment<sup>32</sup>.

Recently, K. High's group efficiently cured haemophilic mice by *in vivo* ZFN-mediated genome editing using AAV as a viral platform to deliver both ZFNs and the DNA donor template for homology-directed gene repair<sup>20,21</sup>. These haemophilic mice had been engineered to harbour a human mutated FIX minigene containing the ZFNs target site at the ROSA26 locus. This humanized murine model makes their strategy prone to be translated to clinical trials.

Concerning CNI patients and the Gunn rat model, only a few percent of corrected cells can be sufficient to obtain a therapeutic effect. Although long-term cure of this model has been obtained through gene addition strategies using viral vectors, this has been done in adult animals, in which hepatocytes turnover is slow. AAV vectors only provide short-term expression of a transgene when injected into a proliferating liver<sup>9</sup>. In the present study, we aimed at correcting the UGT1A1 mutation in Gunn rat neonates using ZFNs technology to evaluate whether targeted gene repair of an endogenous gene is efficient enough to treat an inherited liver disease, in which

corrected cells have no proliferative advantage. We also aimed at assessing whether the corrected gene is maintained throughout hepatocyte divisions. For these purposes, we used AAV vectors as a viral delivery platform because they have been successfully tested to deliver ZFNs *in vitro* and *in vivo*<sup>33,21,20</sup>.

To ensure a good specificity of the strategy, we used the liver-specific vectors LP1 promoter<sup>34-36</sup>. In treated rats injected with AAV-ZFNs and AAV-donor at the 1:5 ratio, UGT1A1 gene repair was detected at the molecular level by SMRT sequencing. This molecular correction resulted in the presence of bilirubin conjugates in the bile. The level of gene correction was very low (0.16 %) but sufficient to have a major impact by decreasing the hyperbilirubinemia by up to 50% at 15 weeks after injection. However, therapeutic efficiency was not maintained as bilirubinemia increased over time to reach control Gunn rats values (injected with AAV-ZFNs alone, AAV-GFP and AAV-donor or PBS-injected). At the time of sacrifice of the long-term cohort (27 weeks after the injection), we still detected expression of repaired UGT1A1 mRNA at similar levels as in the short-term cohort (15 weeks after the injection), as assessed by SMRT sequencing. It showed that the hepatocytes expressing UGT1A1 were still present, suggesting that no cytotoxic immune response led to the elimination of corrected hepatocytes. The loss of therapeutic effect may be due to an increase in erythrocytes turnover leading to an increased rate of bilirubin production, which is a waste product of heme degradation.

We also detected NHEJ-induced indels which confirms ZFNs activity at the target site leading to error-prone repair. Interestingly, the levels of indels were similar to those of gene repair events, suggesting a relatively good efficacy of homology-directed gene repaired versus NHEJ-induced error prone events. As HR efficiency is higher in G2/S phases and as we injected newborn rats, we were probably in highly favourable conditions for HR in the liver<sup>37-40</sup>. Noteworthy, unlike Li *et al.* who used ZFNs targeting a human FIX minigene integrated into the Rosa26 locus, we target an endogenous gene<sup>20,21</sup>. The chromatin state of the target and its localization being critical for

HR, we hypothesize that *in vivo* ZFN-mediated genome editing of an endogenous rat locus would be more representative of what could happen in a human endogenous locus<sup>41</sup>. Furthermore, precise mutation repair through HR is the only event that could restore UGT1A1 production in our model. On the contrary, in a gene targeting approach in which therapeutic cDNA integration is targeted into an intron, as used by Li *et al.* to treat humanized haemophilic mice using ZFNs technology, both NHEJ-mediated capture of the donor construct and HR events at the ZFN-induced DSB site could lead to a phenotypic correction<sup>20,21</sup>.

A major concern for therapeutic applications of engineered nucleases is the potential for off-target effects. When nucleases cut at locations in the genome other than their intended target, it creates the potential for unwanted gene disruption, destabilization of the cell's genome, or malignant transformation of the cell. To ensure biosafety of gene therapy using nucleases, the level of DSB has to be regulated controlling ZFNs expression, using short term expression systems such as AAV injected in proliferating liver. An *in silico* prediction of off-target sites was performed using the previously described PROGNOS method to look for potential hotspots of off-target activity (data not shown)<sup>42</sup>. We found a major secondary target in *tarsl2* locus with the detection of 10% indels in this locus *in vitro* in rat cultured cells (data not shown). This high level of off-target activity may be related to the high level of on-target activity of 60% that we observed in this *in vitro* model. Off-target effects frequency and localization have to be considered in the risk/benefit ratio of such approaches. In this study, as both on-target ZFNs activity and gene repair levels were very low, off-target effects would be below the limit of detection, even with the sensitive SMRT sequencing method.

Other artificial endonucleases such as TALE nucleases or the CRISPR/Cas9 system may be more efficient to promote a targeted DSB, thus improving gene repair level. Of note, TALEN and CRISPR/Cas9 could allow targeting a region closer to the Gunn rat mutation, and therefore could



improve gene repair efficacy. Indeed, it has been shown that the closer the target is from the mutation, the most efficient HR is <sup>43,44</sup>.

As a conclusion, our results obtained in the spontaneous animal model of CNI confirm the feasibility of targeted gene therapy for inherited liver disorders. Of note, the level of gene repair obtained should be sufficient for the treatment of diseases in which corrected cells have a selective advantage as demonstrated by Paulk's group using AAV-mediated HR <sup>45</sup>. Complementary studies in young and adult animals will be necessary to consider candidate diseases and patients for HR-based gene therapy. As proliferation of their liver is much lower than in newborns, it could be necessary to make the hepatocytes re-enter the cell cycle using drugs or a partial hepatectomy <sup>46-48</sup>. It could also be useful to use an approach in which NHEJ-mediated donor capture or precise knock-in through HR would be compatible with a therapeutic correction <sup>20,21</sup>. Immune response studies in adults would also be of great interest. Indeed, such projects raise the question of immune responses towards the FokI endonucleasic domain, the ZF DNA recognition domain and the peptide 2A. Clinical trials using ZFNs should also begin to address these issues.

## **Material and Methods**

### ***In vivo experiments***

Gunn pups and mothers of our colony, bred in Nantes University hospital animal facilities, were maintained on standard laboratory chow and kept in 12-hour light/dark cycles. All animal studies were performed according to institutional guidelines and after approval of the experimental protocols CEEA PdL 2012.52 and 53 by the Comité d'Éthique des Pays de Loire. The homozygous Gunn pups were differentiated at birth from the heterozygous pups by the overall yellow color of the body.

Two-day-old homozygous Gunn pups were injected intraperitoneally with  $10^{13}$  or  $4 \cdot 10^{13}$  vg/kg of AAV-ZFNs or AAV-GFP (ssAAV2/8 LP1-ZFNR-p2A-ZFNL-BGHpA or ssAAV2/8 -RSV-GFP) in phosphate-buffered saline in a total volume of 100  $\mu$ L. When indicated, this vector was co-administered with  $10^{13}$  or  $5 \cdot 10^{13}$  vg/kg of ssAAV2/8-UGT1A1 donor vector.

### ***Blood analysis and bilirubin conjugates detection***

Throughout the follow-up, blood collection was taken from the retro-orbital sinus under anaesthesia every 10 to 15 days. Blood was centrifuged at 5000 rpm for 10 min after 30 min clotting to obtain serum. Bilirubin level and liver transaminases activities were assessed at the Routine Biochemistry Department of Nantes University Hospital.

Bile was collected through a 30-gauge needle on an insulin syringe inserted into the bile duct and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyses. Biliary bilirubin conjugates content was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) after methanolysis as previously described<sup>49</sup>.

### ***ZFNs and targeting vectors***

The 2.5 kb region surrounding the exon 4 was sequenced to avoid targeting a SNP. A pair of custom CompoZr ZFNs targeting rat UGT1A1 (NM\_012683.2) was generated by Sigma Aldrich (Saint Louis, MO) to target exon 4 in our Gunn rat strain. This pair contains 5 ZFs in each

monomer and the heterodimeric ELK/DDR FokI<sup>23</sup>. A single strand AAV serotype 2 plasmid was obtained by introducing a cassette containing the LP1 liver specific promoter and a two-in-one ZFN construct in which right ZFN and left ZFN are separated by a self-processing 2A polyprotein allowing stochastic expression of both monomers<sup>50</sup>. This construct was subcloned in a single strand AAV2 plasmid pSSV9 (kindly provided by P. Moullier, Inserm U1089, France), used as a backbone containing AAV2 ITRs after removal of the coding sequence by SmaI. The donor plasmid was constructed by gene synthesis of wild-type rat UGT1A1 exon 4 surrounded by 1kb-long homology arms (Genecust, Dudelange, Luxembourg) and subcloned into the pSSV9 plasmid.

Plasmids were amplified using Nucleobond Xtra Maxi (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

AAV8 encoding GFP under the control of RSV promoter (AAV-GFP) was used as a control. The AAV encoding the ZFNs and delivering the donor are referred to as AAV-ZFNs and AAV-donor. AAV2/8 vectors were produced by Nantes Viral Vectors core facility (Inserm U1089, Nantes, France).

### ***Cell line culture and transfection and gDNA extraction***

The C6 glioma rat cell line was maintained in Dubelcco's Modified Eagle Medium (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% foetal calf serum (Lonza, Bâle, Switzerland), 2mM glutamine (Sigma Aldrich, St Louis, MO), and antibiotics (100UI/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY). Cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

C6 cells were transfected at 80-90% of confluency using lipofectamine LTX following the manufacturer's instructions (Life Technologies, Grand Island, NY). Each well of a 24-well plate was transfected using 0,5 µg of plasmid DNA. C6 cells gDNA was extracted 3 days after transfection using the Nucleospin Tissue DNA purification kit following manufacturer's

instructions (Macherey Nagel, Düren, Germany). The total gDNA was quantified using ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) and quality and contamination were controlled using A260/A280 and A260/A230 ratios.

The percentage of UGT1A1 gene modification induced by ZFNs was measured by a T7EI assay. The purified genomic DNA was subjected to amplification by PCR with Taq Platinum Hifi (Invitrogen, Carlsbad, CA) using the following primers: T7UGT1A1 F 5'-tcacttctctctcccctccc -3' and T7UGT1A1 5'-ttccaggacattcagggtc -3' specific for rat UGT1A1 targeted region. The PCR program was as follow: 94°C for 2 minutes, 40 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 57°C, 30s at 68°C and 30s at 57°C and 68°C for 10 minutes and 4°C. The 296-bp amplicons were denatured through heating and slowly reannealed allowing heteroduplex formation using the following parameters: 2 minutes at 95°C, decrease from 95 to 85°C (-2C/second), decrease from 85 to 25°C (-0.1°C/second) and 4°C. A final volume of 19µL of PCR product was digested by 5 units of T7EI (NEB, Beverly, MA, USA) for 30 minutes at 37°C and run on a 2%-agarose gel. In case of NHEJ-induced gene modification, bands of about 182 and 114bp are expected. The ratio of cleaved to uncleaved products was used to calculate gene modification frequency as previously described using ImageJ software (N.I.H) <sup>51</sup>.

### ***RTqPCR***

To extract Total RNA, tissues were disrupted in 1mL of TRIzol® (Lifetechnology, Carlsbad, CA) and homogenized using ULTRA-TURRAX T25 (IKA, Staufen, Germany). RNAs were then extracted on NucleoSpin® RNAII columns (Macherey Nagel, Düren,Germany) according to the manufacturer's specifications. RNA was quantified using ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) and RNA integrity was controlled on agarose gels. cDNA was synthesized from 10 µg of RNA with Moloney Murine Leukemia Virus reverse-transcriptase kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) using combination

of pdT24 and Random Primers (Life Technologies, Carlsbad, CA) and diluted to a final concentration of 100 ng cDNA/ $\mu$ l.

Analyses of transcripts were performed with a ViiA7 sequence detection system (Lifetechnology, Carlsbad, CA) using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Lifetechnology, Carlsbad, CA). Primers sequences are merged into Table S1. The PCR method and the analysis of relative gene expression data using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  quantification method, after normalization to GAPDH values, was performed as previously described<sup>52</sup>. The mRNA expression level is defined as the fold change in mRNA levels in a given sample relative to levels in a calibrator (CB). The mRNA expression level is calculated as follows: mRNA expression level =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  where  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{Target} - Ct_{HPRT})_{sample} - (Ct_{Target} - Ct_{HPRT})_{CB}$ . Specific amplifications were checked by amplicon melting curves.

### **On-target SMRT analysis**

cDNA were synthesized as described for RT-qPCR. Exon-spanning primers were designed to ensure specific amplification from cDNA only. Primers sequences are merged into Table S1. The obtained PCR product contains both the ZFNs target site and the expected 1G deletion or the repaired site. PCR and SMRT sequencing analysis of on target events was performed exactly as previously described on liver gDNA from Wistar, heterozygous and homozygous Gunn rats and from experimental cohorts<sup>42</sup>. Briefly, AccuPrime Taq Hi-Fidelity polymerase (Life Technologies, Carlsbad, CA) was used to amplify the sites, then samples were purified using MagBind EZ-Pure (Omega Biotek, Norcross, GA), pooled in roughly equimolar ratios, and sequenced on the PacBio RS using C2/C2 chemistry and consensus sequencing mode (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA). Simultaneous measurement of the rates of NHEJ and HR occurring in the transcripts was conducted using the sequence analysis pipeline described by Hendel *et al.* (manuscript submitted). Additionally, due to the corrective template introducing

only a single SNP to repair the allele, a more stringent sequence quality filter was applied in order to reduce background noise (minimum Phred score of 60 in the +/- 2 bp region flanking the site of the SNP).

### ***Statistical analysis***

All data set shown as bar graphs represent the average of two or three independent experiments. Values are expressed as mean +/- SEM or SD. P<0,05 was considered significant. Graph-Pad Prism Software was used for statistical analysis using Student's t test and Mann Whitney test.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Association Francophone des Glycogénoses (to NTH), the Association Française pour l'étude du foie (AFEF) and the "Agence Nationale de la Recherche".

## References

1. Nguyen, T. H. et al. Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer. *Gene Ther.* 14, 1270–1277 (2007).
2. Bellodi-Privato, M. et al. Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors. *Hepatology*. Baltimore, Md 42, 431–438 (2005).
3. Nguyen, T. H. et al. Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 852–859 (2005).
4. Brown, B. D., Venneri, M. A., Zingale, A., Sergi, L. & Naldini, L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat. Med.* 12, 585–591 (2006).
5. Cavazza, A., Moiani, A. & Mavilio, F. Mechanisms of Retroviral Integration and Mutagenesis. *Hum. Gene Ther.* 24, 119–131 (2013).
6. Suwanmanee, T. et al. Integration-deficient lentiviral vectors expressing codon-optimized R338LhFIX restore normal hemostasis in hemophilia B mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* (2013). doi:10.1038/mt.2013.188
7. Mátrai, J. et al. Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. *Hepatology*. Baltimore, Md 53, 1696–1707 (2011).
8. Donsante, A. et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317, 477 (2007).
9. Flageul, M. et al. Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors. *J. Gene Med.* 11, 689–696 (2009).
10. Seppen, J. et al. Adeno-associated virus vector serotypes mediate sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 13, 1085–1092 (2006).
11. Askari, F. K., Hitomi, Y., Mao, M. & Wilson, J. M. Complete correction of hyperbilirubinemia in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I following transient in vivo adenovirus-mediated expression of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *Gene Ther.* 3, 381–388 (1996).
12. Takahashi, M. et al. Long Term Correction of Bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase Deficiency in Gunn Rats by Administration of a Recombinant Adenovirus during the Neonatal Period. *J. Biol. Chem.* 271, 26536–26542 (1996).
13. Toietta, G. et al. Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3930–3935 (2005).
14. Dimmock, D., Brunetti-Pierri, N., Palmer, D., Beaudet, A. & Ng, P. Correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats using clinically relevant low doses of helper-dependent adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* (2010). doi:10.1089/hum.2010.167
15. San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 229–257 (2008).
16. Smith, J. et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res.* 28, 3361–3369 (2000).
17. Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1156–1160 (1996).
18. Kim, Y. G. & Chandrasegaran, S. Chimeric restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 883–887 (1994).
19. Li, L. & Chandrasegaran, S. Alteration of the cleavage distance of Fok I restriction endonuclease by insertion mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2764–2768 (1993).
20. Anguela, X. M. et al. Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood* 121, 4973–4975 (2013). doi:10.1182/blood-2013-04-497354
21. Li, H. et al. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475, 217–221 (2011).
22. Fox, I. J. et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 338, 1422–1426 (1998).
23. Doyon, Y. et al. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat. Methods* 8, 74–79 (2011).

24. Szymczak, A. L. & Vignali, D. A. A. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 627–638 (2005).
25. Miller, D. G. AAV-Mediated Gene Targeting. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 807, 301–315 (2011).
26. Miller, D. G. et al. Gene targeting in vivo by adeno-associated virus vectors. *Nat. Biotechnol.* 24, 1022–1026 (2006).
27. Vasileva, A., Linden, R. M. & Jessberger, R. Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting. *Nucleic Acids Res.* 34, 3345–3360 (2006).
28. Meyer, M., Ortiz, O., Hrabé de Angelis, M., Wurst, W. & Kühn, R. Modeling disease mutations by gene targeting in one-cell mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2012). doi:10.1073/pnas.1121203109
29. Fahrenkrug, S. C. et al. Gene inactivation and nonmeiotic allele introgression in livestock species using talens. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 318 (2012).
30. Bedell, V. M. et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature11537
31. Geurts, A. M. et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325, 433 (2009).
32. Maier, D. et al. Efficient Clinical Scale Gene Modification via Zinc Finger Nuclease Targeted Disruption of the HIV Co-Receptor CCR5. *Hum. Gene Ther.* (2013). doi:10.1089/hum.2012.172
33. Händel, E.-M. et al. Versatile and Efficient Genome Editing in Human Cells by Combining Zinc-Finger Nucleases With Adeno-Associated Viral Vectors. *Hum. Gene Ther.* (2011). doi:10.1089/hum.2011.140
34. Schmitt, F. et al. Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* 139, 999–1007, 1007.e1–2 (2010).
35. Graham, T., McIntosh, J., Work, L. M., Nathwani, A. & Baker, A. H. Performance of AAV8 vectors expressing human factor IX from a hepatic-selective promoter following intravenous injection into rats. *Genet. Vaccines Ther.* 6, 9 (2008).
36. Wu, Z. et al. Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 280–289 (2008).
37. Eva-Maria Handel, Toni Cathomen. Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity.
38. Brandsma, I. & Gent, D. C. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr.* 3, 9 (2012).
39. Shibata, A. et al. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* 30, 1079–1092 (2011).
40. Yun, M. H. & Hiom, K. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 459, 460–463 (2009).
41. Valton, J. et al. CpG Methylation Impacts the Activity of Natural and Engineered Meganucleases. *J. Biol. Chem.* (2012). doi:10.1074/jbc.M112.379966
42. Fine, E. J., Cradick, T. J., Zhao, C. L., Lin, Y. & Bao, G. An online bioinformatics tool predicts zinc finger and TALE nuclease off-target cleavage. *Nucleic Acids Res.* (2013). doi:10.1093/nar/gkt1326
43. Beumer, K. J., Trautman, J. K., Mukherjee, K. & Carroll, D. Donor DNA Utilization during Gene Targeting with Zinc-finger Nucleases. *G3 Bethesda Md* (2013). doi:10.1534/g3.112.005439
44. Carroll, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188, 773–782 (2011).
45. Paulk, N. K., Marquez Loza, L., Finegold, M. & Grompe, M. AAV-mediated gene targeting is significantly enhance by transient inhibition of NHEJ or the proteasome in vivo. *Hum. Gene Ther.* (2012). doi:10.1089/hum.2012.038
46. Dominguez-Avila, N. et al. Over, and Underexpression of Endothelin 1 and TGF-Beta Family Ligands and Receptors in Lung Tissue of Broilers with Pulmonary Hypertension. *BioMed Res. Int.* 2013, 1–7 (2013).
47. Pichard, V., Boni, S., Baron, W., Nguyen, T. H. & Ferry, N. Priming of Hepatocytes Enhances In Vivo Liver Transduction with Lentiviral Vectors in Adult Mice. *Hum. Gene Ther.* (2011). doi:10.1089/hum.2011.010



48. Webber, E. M., Godowski, P. J. & Fausto, N. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology*. Baltimore, Md 19, 489–497 (1994).
49. Muraca, M. & Blanckaert, N. Liquid-chromatographic assay and identification of mono- and diester conjugates of bilirubin in normal serum. *Clin. Chem.* 29, 1767–1771 (1983).
50. Yang, S. et al. Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther.* 15, 1411–1423 (2008).
51. Guschin, D. Y. et al. A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 649, 247–256 (2010).
52. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408 (2001).

**Tables**

Time after injection	AAV-ZFNs group (n=6)	AAV-ZFNs:AAV-Donor, ratio 1:5 long-term group (n=7)
week 6	103.8 +/- 16.2	63.4+/-8.3*
week 8	86.9 +/- 26.9	50.9 +/- 9.9*
week 12	110.2 +/- 7.8	85.1 +/- 13.5*
week 15	106.5 +/- 18.9	96.6 +/-24.8
week 18	106.5 +/-16.7	87 +/-17.7
week 20	108.6+/-36.5	105.1+/-26.3
week 27	93.6+/-19.1	110+/-33

**Table 1.** Bilirubinemia follow-up in the long-term 1:5 ratio cohort. Bilirubinemia is indicated in  $\mu\text{mol/L}$ . \*  $p < 0.05$

## Legends

**Figure 1. Zinc Finger Nucleases and donor constructs design and functionality for rat UGT1A1 gene repair.** (a) ZFNs target site and AAV-ZFNs. (a1) ZFNs binding site on rat UGT1A1 exon 4, bold letters indicate Left and Right ZFN targets. Primers pair used for T7 endonuclease I assay are indicated with arrows (T7UGT1A1-F and T7UGT1A1-R). (a2) ZFNs encoding AAV (b) Strategy of rat UGT1A1 exon 4 repair. A pair of ZFNs targeting UGT1A1 rat exon 4 was used concomitantly with an exogenous donor carrying wild-type exon 4 flanked by 1-kb homology arms to perform homologous recombination mediated gene repair of the Gunn 1-G deletion (c) Functionality of the AAV-ZFN plasmid. Rat C6 cells were transfected with an AAV plasmid encoding UGT1A1-ZFNs. Non-transfected cells served as negative control (NT). Three days after transfection, genomic DNA was isolated and subjected to T7 endonuclease I assay to detect gene modification at the targeted UGT1A locus. (c1) The products were separated on 2%-agarose gel. \* indicates about 296bp-long uncleaved products and arrows indicate both about 182 and 114bp-long cleaved products. (c1) and (c2) Gene modification frequency was calculated according to the ratio of cleaved to uncleaved DNA products from 3 independent experiments. Y-axis shows gene modification frequency. Bars indicate mean  $\pm$  SEM

**Figure 2: Liver tolerance to the AAV injection.** Gunn newborns were injected intraperitoneally with alone AAV-ZFNs ( $10^{13}$ vg/kg, n=5), or with AAV-ZFNs ( $10^{13}$ vg/kg) and AAV-donor ( $10^{13}$ vg/kg or  $5 \cdot 10^{13}$ vg/kg for the 1:1 ratio (n=5) and for the 1:5 ratio (n=14), respectively). Alanine aminotransferases were monitored at different time points of the survey, up to 90 days after injection. Animals injected with PBS served as control groups. Each plotted value represents the mean + SED.

**Figure 3. Bilirubinemia follow-up.** Gunn newborns were injected intraperitoneally with AAV-ZFNs ( $10^{13}$ vg/kg) and AAV-donor ( $10^{13}$ vg/kg or  $5.10^{13}$ vg/kg for the 1:1 (n=5) and the 1:5 ratio (n=7), respectively). Animals injected with AAV- ZFNs ( $10^{13}$ vg/kg, n=5) alone or AAV-RSV-GFP ( $10^{13}$ vg/kg) and AAV-donor ( $5.10^{13}$ vg/kg) (n=4) served as control groups. Each plotted value represents the mean + SED. \* $p < 0,05$  for 1:5 VS ZFNs alone, #  $p < 0,05$  for 1:1 VS ZFNs alone.

**Figure 4. HPLC analysis of Gunn rat bile.** Gunn newborns were injected intraperitoneally with AAV- ZFNs ( $10^{13}$ vg/kg) and AAV-donor ( $5.10^{13}$ vg/kg) (n=7). 3 months after the injection, rats were sacrificed and bile samples were successfully taken from 6 out of 7 animals. (a) Proportions of biliary non conjugated (grey) bilirubin and mono- (white) and di-glucuronides (black) determined by HPLC. NT: non treated homozygous Gunn rat, WT: heterozygous Gunn rat. Rat #41 to #47: individual treated rats. (b) Representative results of bile pigments analysis by HPLC of a heterozygous Gunn rat, (c) a homozygous Gunn rat, and (c) of treated rat #44.

**Figure 5. Relative ZFNs mRNA levels in the liver of Gunn rats at the time of killing 10 and 105 days after vector injection.** Gunn newborns were injected intraperitoneally with AAV-ZFNs alone and sacrificed 10 days after injection (D10) (n=5) or co-injected with AAV-ZFNs and AAV-donor at the 1:5 ratio ( $10^{13}$ vg/kg and  $5.10^{13}$ vg/kg, respectively) and sacrificed 105 days after injection (D105) (n=7). Analysis of transcripts were performed via RTqPCR using AAV-ZFNs specific primers. The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  quantification method was used after normalization to GAPDH transcripts amplification. Whenever possible, three samples from different lobes were analyzed for each animal. Y-axis shows relative ZFNs UGT1A1 mRNA level. Bars indicate mean  $\pm$  SEM.

**Figure 6. Gene editing efficiency.** SMRT sequencing was performed on cDNA to detect (a) UGT1A1 gene repair events and (b) indels at the ZFN target site in the liver of animals injected with AAV-ZFNs and AAV-Donor at the 1:5 ratio and sacrificed at week 15 (short-term, n=7) and week 27 (long-term, n=7) after injection. Animals injected with AAV-GFP and AAV-donor at the ratio 1:5 (GFP:Donor, n=3) served as control. \*  $p < 0.05$ .

Figures

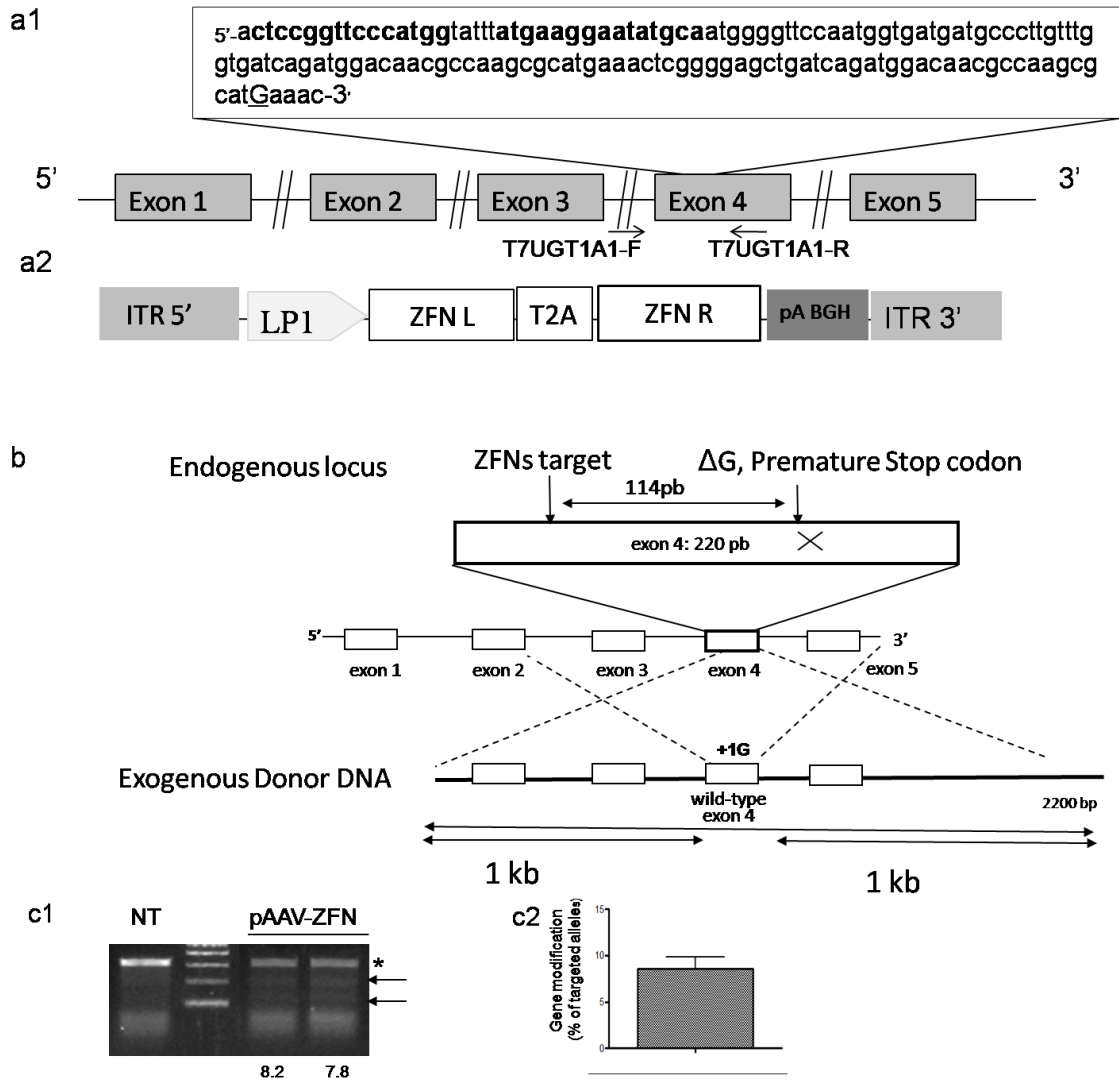


Figure 1

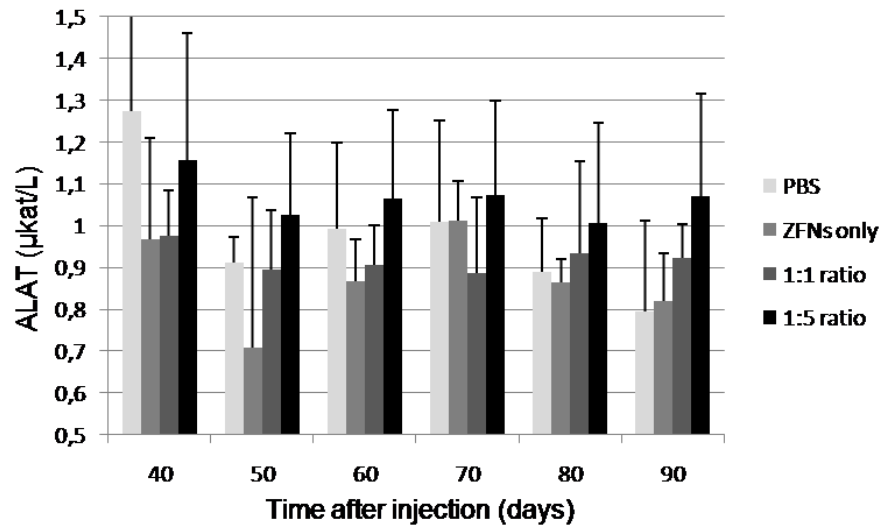


Figure 2

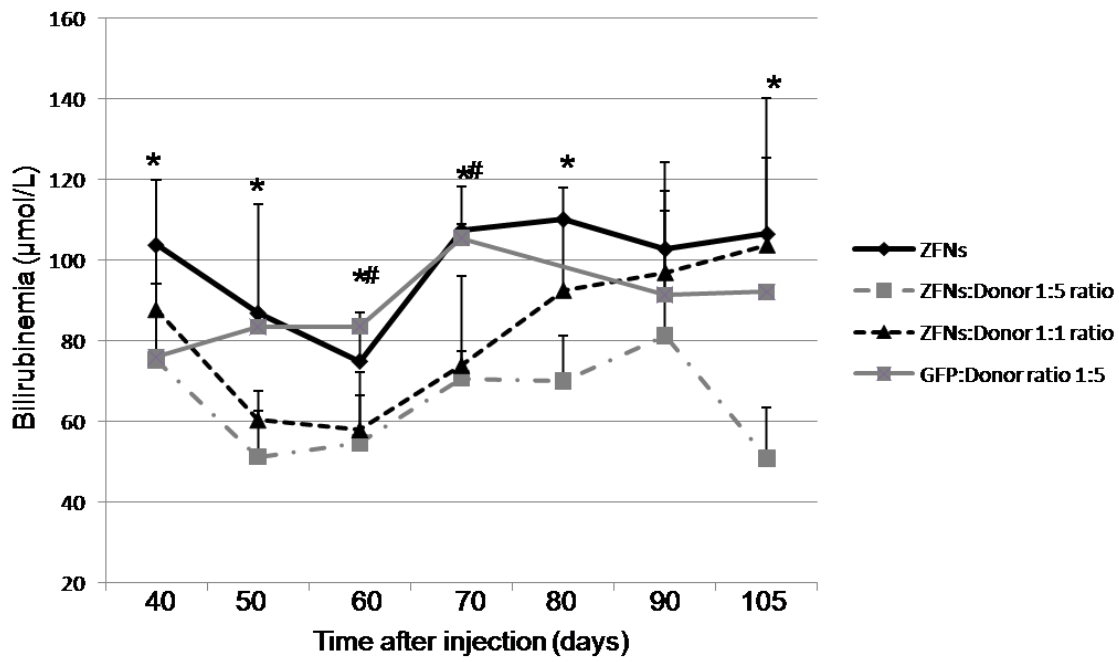


Figure 3

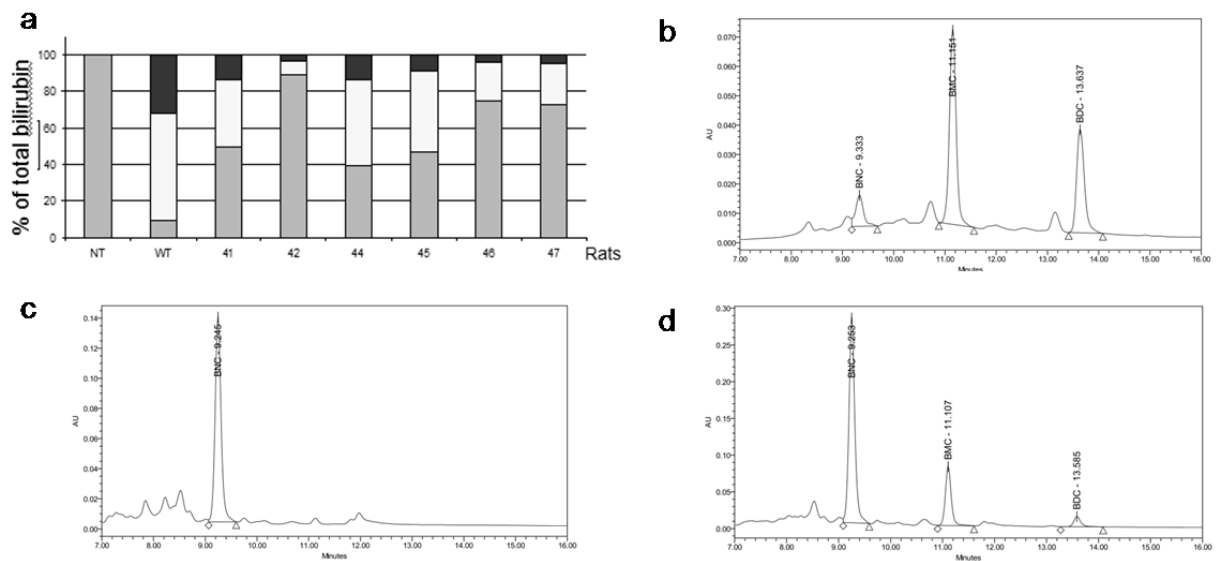


Figure 4



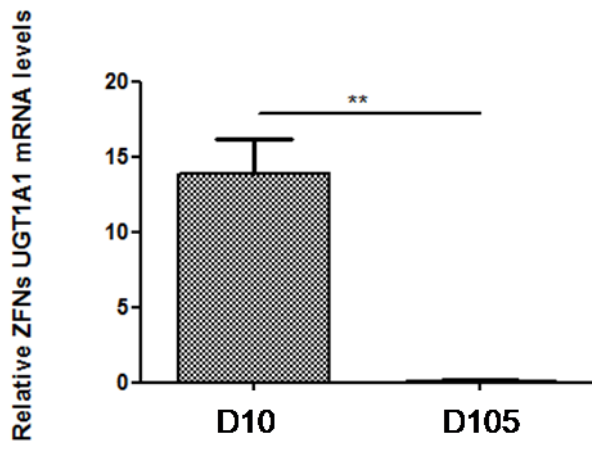


Figure 5

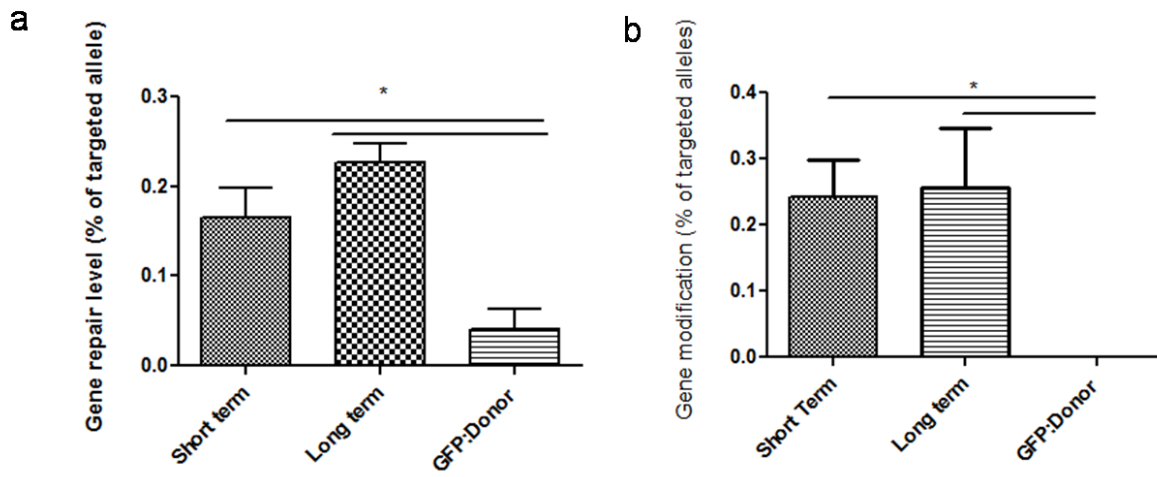
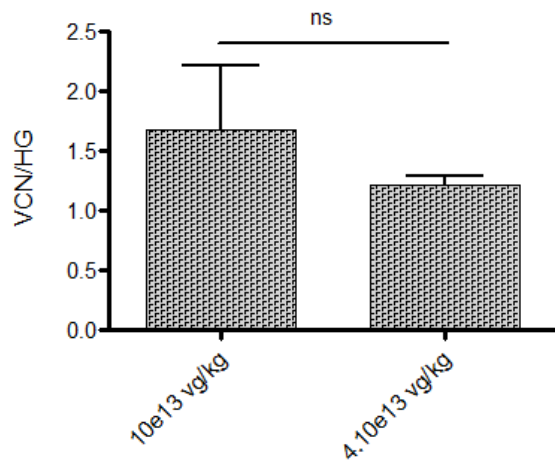


Figure 6

## Supplementary materials



**Figure S1.** Vector copy number in the liver of Gunn rats at the time of killing 10 days after vector injection. Bars represent average +SEM. There was no significant difference between both doses of  $10 \times 10^{13}$  (n=5) and  $4.10 \times 10^{13}$  (n=5) ( $p > 0.05$ ).

Primers	Sequence 5'-3'
F pA BGH	TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
R pA BGH	TGGGAGTGGCACCTTCCA
F B-actin	AGCCATGTACGTAGCCATCCA
R B-actin	TCTCCGGAGTCCATCACAATG
F RT Exon4-5	CTGCTTGGTCATCAAAGGC
R RT Exon 4-5	GCGCATGATGTTCTCCTTGT
F-SMRT	GAATTCCTCAGACGGTCCTGT
R-SMRT	CGCATGATGTTCTCCTT
F-RT-AAVZFNs	GATCAACTTCAGATCTGGCGGC
R-RT-AAVZFNs	GTCCATCCTAGGGCCGGGA

**Supplementary table 1.** Primers used in the study.

## Supplementary Materials and methods

### *qPCR*

QPCR was performed on genomic DNA isolated from rat liver using Blood and Tissue Kit following manufacturer's instructions (Qiagen, Valencia, Spain). The copy number of BGH pA was quantified with a standard curve generated with a pssAAV2-LP1-ZFNL-p2A-ZFNR-BGHpA plasmid serial dilution in pooled genomic DNA from untreated Gunn rats, from 100 to 0.01 copy/haploid genome. Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Lifetechnologies, Carlsbad, CA) was use as qPCR mix. Each reaction was performed in duplicate on 50ng of gDNA. Primers sequences are merged into Table S1. The Q-PCR reactions were performed on 7900HT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA ), as follows: 50°C for 2, minutes 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute before a step at 95°C for 15 seconds, 60°C for 15 seconds and 95°C for 15 seconds. All samples were normalized using rat  $\beta$ -actin amplification.

## VI- Discussion et perspectives

La thérapie génique ciblée bénéficie des connaissances acquises à travers les approches d'addition ou de modulation de l'expression génique. Néanmoins, l'apparition de nouveaux outils nécessite des mises au point pour choisir les méthodes de vectorisation des nucléases et des donneurs, la voie d'injection, la cinétique d'expression et le contexte de RH les plus adaptés, et pour réaliser des études de toxicité et de RI.

Préalablement à notre étude, des équipes ont démontré la faisabilité d'un ciblage génétique dans des lignées d'hépatomes ou dans le foie *in vivo*.

Les premières études de modification de gènes *in situ* pour la thérapie génique du foie *in vivo* ont été réalisées par l'équipe de K. High (Anguela *et al.*, 2013; H. Li *et al.*, 2011). Des ZFNs et un donneur vectorisés dans des AAVr ont été utilisés pour insérer un ADNc du hFIX dans un modèle murin transgénique d'hémophilie B contenant un minigène du hFIX. Ces travaux représentent la première correction complète d'une maladie *in vivo* grâce à des endonucléases artificielles chez des souris nouveau-nés et adultes. Dans cette stratégie, les voies de RH et de NHEJ peuvent conduire à un effet thérapeutique.

Dans ce projet de thèse, nous avons développé une nouvelle méthode de vectorisation des nucléases dans un vecteur lentiviral. Nous avons ensuite mis au point une stratégie de réparation génique *in vivo* par édition de gène avec des ZFNs vectorisées dans des AAVr dans la souche du rat Gunn, modèle de la maladie de CNI. Le caractère innovant de notre approche repose sur l'utilisation d'un modèle animal spontané dans lequel nous ciblons un locus endogène.

En traitant des rats Gunn nouveau-nés avec des AAVr codant des ZFNs ciblant l'exon 4 muté de l'UGT1A1 et vectorisant un donneur composé de l'exon 4 sauvage entouré de bras d'homologie d'un kb, il a été possible d'obtenir une réparation génique au locus ciblé. Une diminution de la bilirubinémie, la présence de bilirubine mono et diconjugée dans la bile et la détection d'ARNm réparé par séquençage pendant les six mois de suivi après l'injection, sont la preuve de cette correction. Nous avons donc démontré la faisabilité d'une approche de réparation génique *in vivo* dans un modèle de maladie métabolique du foie en utilisant des ZFNs et la RH. De plus, le suivi de l'activité des transaminases hépatiques prouve que cette procédure est bien tolérée au niveau du foie.

Cependant, le niveau de correction obtenu dans ce projet reste faible. En effet, un maximum de 0,2 % d'ARNm corrigé a été détecté et le niveau minimal de bilirubinémie atteint était supérieur au seuil thérapeutique de 30  $\mu$ M.

Le taux de correction des ARNm persiste dans le temps d'après les niveaux observés sur les animaux suivis jusqu'à six mois après l'injection. Etant donné que les génomes et l'expression des AAV-ZFNs ne sont pas détectables à long terme, ces modifications seraient essentiellement dues à l'expression des ZFNs pendant une courte fenêtre thérapeutique avant dilution des épisomes d'AAVr. En effet, aucune réparation génique n'a été mise en évidence chez les animaux injectés avec l'AAV-donneur et un AAVr codant la GFP pour remplacer l'AAV-ZFNs. L'étude moléculaire de la réparation génique a été réalisée sur l'ARNm afin d'obtenir une information la plus en aval de l'expression génique et de s'affranchir d'une potentielle contamination par de l'ADN d'AAVr donneurs résiduels. Le faible taux de modification de la cible par NHEJ, de 0,2 % à environ 100 pb de la mutation à réparer, est cohérent avec le faible taux de réparation. Cependant, il pourrait y avoir une plus forte modification de l'ADN au niveau de la cible des ZFNs ou de la mutation sans que cela ne se répercute sur les transcrits. Par exemple, il y a pu avoir des événements de capture des AAV-donneurs entiers au site de coupure. Cela empêcherait un effet thérapeutique et pourrait également empêcher la transcription.

Notre projet préclinique a été développé dans le modèle du rat Gunn. Ce modèle animal a été essentiel au développement de nombreuses approches pour le traitement des maladies métaboliques du foie. Il a notamment permis l'avancée de projets de thérapie génique d'addition, ce qui a conduit à la mise en place d'un essai clinique.

Lors de stratégies d'addition, il est possible de suivre la bilirubinémie, l'activité de l'UGT1A1, l'expression de l'UGT1A1 humaine en histologie ou la détection des formes conjuguées de la bile. De plus, une faible correction peut facilement être mise en évidence dans ce modèle. Ainsi, pour une preuve de principe de la faisabilité de nouvelles approches, le rat Gunn semble adapté car il n'est pas indispensable d'obtenir une forte correction.

Dans notre projet, la réparation génique consistait à rajouter une guanine. Tant par nature de la séquence restaurée que par la faible longueur de la modification induite et le faible niveau de mutation, la détection de la réparation génique a été techniquement complexe.

Parmi les techniques de détection que nous avons criblées, une PCR suivie de l'obtention d'une courbe de fusion à haute résolution (*High Resolution Melting curve*, HRM – en collaboration avec J.-C. Pagès et C. Collin, Inserm U966, Tours), une qPCR avec des amorces allèle-spécifiques, la recherche de polymorphisme de longueur de fragments de restriction (*Restriction*

*Fragments Length Polymorphism*, RFLP) et le séquençage en temps réel sur molécule isolée (*Single Molecule Real Time sequencing*, SMRT – en collaboration avec E.J. Fine, T.J. Cradick et G. Bao, Georgia Institute of Technology and Emory University) ont permis de détecter la présence des allèles sauvage et mutés dans des gammes lors d'étapes de mise au point. Néanmoins, la sensibilité des techniques varie et seul le séquençage par SMRT a été efficace pour détecter le faible niveau d'édition de gène obtenu *in vivo*. En revanche, pour des taux de mutation plus élevés, les autres techniques criblées pourraient aussi être employées. D'autres études ont également montré qu'il est essentiel d'avoir des techniques de détection de mutations suffisamment sensibles en l'absence d'avantage sélectif. Le séquençage haut débit, par Illumina par exemple ou par SMRT dans notre cas, permet d'atteindre les niveaux de sensibilité requis (Herrmann *et al.*, 2011; Rousseau *et al.*, 2011).

Pour le développement de stratégies de thérapie génique ciblée, en raison de la nécessité d'analyse à l'échelle moléculaire, il aurait donc été préférable de travailler dans un premier temps avec un modèle dans lequel la réparation induit une plus forte différence entre les séquences mutée et réparée, d'atteindre un plus fort niveau de correction, ou de disposer d'une technique de sélection des cellules corrigées. Par exemple, il est possible que la souris soit une espèce pour laquelle la fréquence de RH atteint des niveaux plus élevés que le rat. En effet, en transgénèse, il semble plus facile d'obtenir des événements de RH chez la souris que chez le rat. Ainsi, il serait plus simple de réaliser des premières études de faisabilité d'approches de thérapie génique ciblée dans des modèles murins.

Pour atteindre un niveau thérapeutique pour la maladie de CNI et envisager l'application d'approches de thérapie génique ciblée à d'autres maladies, il est nécessaire d'augmenter le niveau de correction. En effet, malgré la preuve de principe de la faisabilité de la réparation génique *in vivo*, seule une correction subthérapeutique a été obtenue.

La dose de nucléases injectée a été choisie sur la base de la quantification des copies du vecteur par qPCR dans le foie. En l'absence de différence entre les doses de  $10^{13}$  et  $4.10^{13}$  vg/kg, la plus faible dose a été choisie comme référence. En revanche, le niveau d'expression était plus élevé pour la forte dose, mais la quantité de vecteurs donneur et ZFNs à injecter en utilisant cette référence aurait été trop élevée.

En comparant les injections par voies ip et iv, un plus grand nombre de copies détecté après injection iv a permis d'envisager d'autres techniques d'injection. Pour optimiser le niveau de réparation, nous avons utilisé trois techniques : (1) la co-injection d'un vecteur AAVr-ZFNs et d'un vecteur AAVr-donneur aux ratio 1:1 et 1:5 par voie ip chez des animaux de deux jours, (2)

la co-injection de ces vecteurs par voie ip chez des rats de deux jours puis une seconde injection iv intra-portale à quatorze jours, (3) l'injection iv d'un vecteur 3-en-1 chez des rats de deux jours, en conservant une dose de  $10^{13}$ vg/kg. Le ratio 1:5 a été choisi comme référence car la correction était plus importante qu'au ratio 1:1. Le ratio entre les molécules de donneur et de nucléases est donc à prendre en compte pour ce type de stratégie.

Le changement de technique d'injection n'a pas permis d'augmenter l'efficacité de ce traitement. De plus, l'expression des ZFNs après injection iv était plus faible que lors d'une injection en ip. Le transfert de la cassette d'expression des ZFNs et du donneur dans un vecteur AAV « 3-en-1 », à la dose de  $10^{13}$ vg/kg pour conserver la dose de ZFNs de référence, n'a pas permis d'augmenter le niveau de réparation (Ellis *et al.*, 2012).

Il est possible que la présence du site de coupure des ZFNs dans le donneur ait limité l'efficacité de notre approche. En effet, le donneur et la version réparée du gène sont susceptibles d'être coupés pendant la durée de l'expression des ZFNs. Les molécules extra-chromosomiques étant plus accessibles, il est probable que l'AAV-donneur soit plus coupé que les séquences réparées. Pour éviter ces coupures délétères, nous avons récemment construit un plasmide AAV 3-en-1 après avoir introduit des mutations silencieuses au niveau de la cible des ZFNs. Il sera donc possible de l'utiliser *in vivo* pour combiner l'avantage d'un vecteur 3-en-1 et du blocage de la coupure du donneur ou des séquences réparées.

Puisque la réparation génique vise la restauration d'une séquence sauvage d'un gène, cette dernière devrait être à nouveau sensible aux éléments de régulations endogènes. Ainsi, l'utilisation de phénobarbital chez des animaux traités pourrait à la fois valider la fiabilité de la réparation ainsi qu'augmenter ses conséquences phénotypiques et améliorer la correction obtenue en terme d'activité enzymatique. Un groupe de rats injecté avec le ratio 1:5 a ainsi récemment été traité pendant cinq jour avec du phénobarbital. L'analyse des échantillons prélevés sur ces animaux est en cours. Ces animaux sont traités avec une dose de 80mg/kg/j, supérieure aux doses de moins de 10mg/kg/j utilisées chez les patients (Younossi and Foroozan, 1995; Ertel and Newton, 1969).

L'utilisation d'autres familles de nucléases pourrait permettre d'augmenter le taux de réparation génique en conservant une faible toxicité.

Des étapes préliminaires *in vitro* nous ont permis de comparer des ZFNs et des TALE nucléases ciblant le même locus du gène UGT1A1 avec un recouvrement partiel des cibles des deux nucléases. Cette seconde paire de nucléases a été obtenue grâce à une collaboraton avec T. Cathomen et C. Mussolino (*Center for Chronic Immunodeficiency*, Fribourg, Allemagne). Ces TALE nucléases, bien que comportant la version sans homodimérisation forcée de FokI,

permettent également le ciblage de l'UGT1A1 de rat et sont moins toxiques que les ZFNs. L'utilisation de cette autre famille de nucléases pourrait donc permettre d'améliorer l'efficacité de la réparation génique. Cependant, aucune étude n'a démontré la vectorisation d'une paire de TALE nucléases dans un seul vecteur utilisable *in vivo*, ni leur utilisation *in vivo* autrement que pour une application de transgénèse. La question de la vectorisation de ces nucléases pour la thérapie génique *in vivo* demeure donc entière. Il est par exemple possible de vectoriser une paire de TALE nucléases en séparant les monomères sur deux vecteurs adénoviraux pour des étapes précliniques (Holkers *et al.*, 2013). En revanche, l'utilisation de ces vecteurs pour la thérapie génique des maladies monogéniques *in vivo* chez l'homme demeure controversée.

Il est également possible d'utiliser des nucléases du système CRISPR/Cas9 qui seraient plus efficaces pour l'induction de CDB, offrant ainsi une possibilité d'augmenter le niveau de réparation génique. Cependant, le niveau de CDB *off-target* décrit dans les études *in vitro* fait craindre une toxicité plus marquée avec parfois plus de CDB en dehors de la cible canonique. L'optimisation de ce système a permis de développer des nickases : cela devrait permettre de limiter les risques de coupures *off-target* et favoriser la RH au niveau de la cible (Ran *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013b; Cong *et al.*, 2013b).

Une stratégie complémentaire consiste à augmenter la RH et/ou à inhiber la NHEJ pendant la fenêtre thérapeutique pendant laquelle la réparation peut avoir lieu. Cela est envisageable au niveau du foie, comme décrit en II-4.3, en utilisant des inhibiteurs de la NHEJ telles que la vanilline, ou en surexprimant des facteurs impliqués dans la RH par exemple.

Des expériences préliminaires réalisées lors d'un stage de collaboration avec l'équipe de B. Lopez (A. Grabartz, B. Lopez, Laboratoire d'étude des mécanismes de la régulation et de la recombinaison génétique (LMR), C.E.A., Fontenay-aux-roses) permettent d'envisager la possibilité de favoriser la RH en surexprimant des facteurs tels que la Mre11, la CtIP ou la BRCA1.

L'inhibition de gènes essentiels à la NHEJ tels que 53BP, BLM et KU par des siRNA pourrait aussi permettre d'orienter la réparation vers la RH plutôt que vers la NHEJ.

Il serait également possible de faire entrer les hépatocytes dans le cycle cellulaire par *priming*, voire de les bloquer en phase G2 pendant un intervalle de temps suffisant pour permettre la réparation par RH. Le *priming* a été défini par l'équipe de N. Fausto comme un état spécifique et réversible des hépatocytes soumis à des facteurs de croissance ou à des cytokines stimulant l'entrée dans le cycle cellulaire (Webber *et al.*, 1994). Le phénobarbital a ainsi été utilisé pour le *priming* d'hépatocytes murins *in vivo* : sa capacité à induire l'entrée dans le cycle cellulaire et à augmenter l'index mitotique pourrait contribuer à favoriser le passage des hépatocytes dans des



phases compatibles avec la RH (Pichard *et al.*, 2011). Une hépatectomie favoriserait également des phases du cycle cellulaire adaptées à la RH. La cyclophiline A pourrait être utilisée pour un blocage en phase G2 (Zhang *et al.*, 2006). De même, des triterpènes de *G. lucidum* ont permis de rallonger la phase G2 sur des cellules de la lignée d'hépatome Huh7 (Lin *et al.*, 2003).

Dans la présente étude, les animaux injectés ont un foie en prolifération. Cela est donc favorable à la RH. Malgré cela, le niveau de correction atteint est limité. Le fait que la RH puisse avoir lieu apparaît donc comme un élément nécessaire mais non suffisant pour favoriser la réparation génique.

Il est possible que l'état de la chromatine lors de l'arrivée des nucléases dans le noyau soit défavorable à l'accessibilité du locus ciblé. Il serait par exemple intéressant d'étudier le niveau de méthylation des îlots CpG de la région ciblée. Si la méthylation est importante, il est possible d'utiliser des agents déméthylants, ou d'envisager le ciblage d'une autre région plus accessible du même gène. Ces études sont d'autant plus importantes que pour le traitement de certaines maladies il est nécessaire de cibler des gènes non exprimés comme le gène XPC dans le xeroderma pigmentosum.

Nos résultats prouvent la faisabilité d'une approche de réparation génique pour le traitement *in vivo* de la maladie de CNI. Bien que l'efficacité de ces approches dépende des nucléases utilisées et du donneur, ces résultats sont prometteurs pour la thérapie génique ciblée des maladies métaboliques du foie. Cela est d'autant plus vrai pour les maladies pour lesquelles seule une faible correction suffit à obtenir un effet thérapeutique comme c'est le cas pour la maladie de CNI ou les hémophilies A et B. Cela pourrait même être appliqué à des maladies monogéniques d'autres organes dès lors que la RH peut y avoir lieu, avec ou sans traitement complémentaire.

Le niveau de correction obtenu ici peut être suffisant pour des maladies dans lesquelles les cellules corrigées présentent un avantage sélectif. Ainsi, il serait possible d'envisager ces techniques pour traiter le déficit en FAH ou la maladie de Wilson. En effet, il semblerait que des hépatocytes corrigés dans la maladie de Wilson puissent avoir un avantage sélectif car ils ne seraient plus soumis au risque d'hépatite.

Le faible niveau de correction peut aussi être considéré comme un avantage dès lors qu'il est suffisant pour obtenir un bénéfice thérapeutique. En effet, la fréquence des coupures *off-target* augmente avec celle des coupures de la cible. Il est donc nécessaire de mettre en place une activité de coupure équilibrant la modification de la cible en limitant le risque d'effet *off-target*.

Les techniques de modification de gènes *in situ* développées dans ce manuscrit peuvent également être utilisées pour d'autres applications biomédicales. Il est ainsi possible de les utiliser pour créer de nouveaux modèles cellulaires ou de nouveaux modèles d'animaux transgéniques. Cela peut ensuite servir à des études de génétique, de physiopathologie ou de pharmacologie. En ce sens, nous développons actuellement un nouveau modèle de rat transgénique KO pour l'UGT1A1 dans notre équipe en utilisant le système CRISPR/Cas9 pour cibler l'exon 1, spécifique de cette isoforme.

Le transfert de gène pour la modification de gènes *in situ* avec des nucléases comporte généralement plus d'éléments que des stratégies plus classiques. En effet, il est nécessaire de vectoriser des nucléases, soit une ou plusieurs protéines, associées ou non à des oligonucléotides. Cela représente d'emblée plusieurs éléments susceptibles de correspondre à de longues séquences pouvant contenir des régions répétées et nécessitant l'utilisation de plusieurs promoteurs, voire d'IRES ou de peptides 2A. Il est également nécessaire de vectoriser le donneur dont la séquence peut être plus ou moins longue et complexe.

Ce type de transfert de gène pourrait donc être associé à des RI contre le vecteur, les produits du transgène, les peptides 2A voire les ARN ou ADN transférés ou obtenus après transcription des gènes thérapeutiques. En effet, les domaines TALE, FokI et la Cas9 sont d'origine bactérienne, de même qu'une partie des ARN impliqués dans le système CRISPR/Cas9. Enfin, les séquences 2A et les peptides qui en sont issus ont une origine virale : il y a donc un risque de mise en place d'une RI adaptative, voire innée en raison de l'origine pathogénique de ces éléments.

A ce jour, aucun résultat concernant l'étude de la RI dans ce type de système n'a été publié. En effet, il manque des outils pour sa caractérisation. Néanmoins, l'efficacité thérapeutique à long terme chez les souris adultes et nouveau-nés d'un modèle d'hémophilie B font supposer que si une RI se développe, elle est suffisamment limitée pour ne pas empêcher l'efficacité thérapeutique du système (Anguela *et al.*, 2013; H. Li *et al.*, 2011).

Dans notre projet, la détection d'un niveau constant de correction des ARNm trois et six mois après l'injection laisse envisager le même type de situation. Cependant, cela reste à confirmer par l'étude des RI *in vivo* en recherchant la présence d'anticorps ou de cellules immunitaires dirigés contre les cellules transduites, les transgènes, les produits des transgènes ou l'UGT1A1 sauvage. Dans ce système de transfert de gène, les seuls antigènes disponibles pour des expériences sont l'enzyme FokI telle qu'elle est commercialisée pour une utilisation en biologie moléculaire et l'UGT1A1 sauvage contenue dans des microsomes de foie de rat. En utilisant ces antigènes,

nous n'avons pas réussi à mettre en place de test de détection de la réponse cytotoxique en raison d'un manque de spécificité de la technique de stimulation de splénocytes. Nous avons effectué les premières étapes de mise au point de la recherche d'anticorps dirigés contre ces antigènes par ELISA. Nous utiliserons prochainement cette technique pour la recherche d'anticorps anti-FokI et anti-UGT1A1 sauvage dans le sérum des animaux injectés.

Chez les animaux suivis, la bilirubinémie tend à augmenter au cours du temps. La faible probabilité d'une RI dans la stratégie que nous avons utilisée d'après la persistance de la correction, l'âge des animaux traités et l'emploi de vecteurs AAV dans le foie, ne suffirait pas à expliquer ces variations. De plus, cette évolution est également observée chez les groupes non traités. Cela pourrait être dû à une baisse du rendement de l'activité de conjugaison de l'UGT1A1 à cause de l'augmentation de la quantité de substrat par une augmentation du renouvellement des érythrocytes ou d'une baisse de l'activité de l'enzyme. Ces variations étant observées dans les différents groupes, injectés ou non, elles ne sont pas inhérentes à la stratégie de réparation génique. Néanmoins, cela s'oppose à long terme à l'efficacité thérapeutique et souligne l'intérêt de l'optimisation de ces approches pour garantir la persistance des effets obtenus.

Pour optimiser l'efficacité de ces stratégies en permettant un apport suffisant en nucléases, spécifiques des cellules cibles, en favorisant la persistance des corrections obtenues et en limitant les RI, les systèmes de vectorisation doivent être adaptés à ces nouveaux transgènes. Ainsi, nous avons vectorisé une paire de ZFNs dans des vecteurs LV et IDLV. Cela a été possible après optimisation de codons, par *codon swapping*, pour obtenir une paire de ZFNs fonctionnelle. En effet, en l'absence d'optimisation, les séquences sauvages codant les ZFNs contiennent de nombreuses régions répétées intra et inter-nucléases à l'origine de recombinaison lors de la rétrotranscription. Le *codon swapping* permet donc de transduire l'éventail des types cellulaires pouvant être transduits *in vitro* et *in vivo* par des vecteurs lentiviraux codant des ZFNs fonctionnelles.

Dans notre étude, nous avons ainsi pu cibler le gène de l'UGT1A1 dans des lignées de gliome, d'hépatome et des hépatocytes primaires de rats, et dans le foie de rats nouveau-nés après injection iv. La détection d'évènements de NHEJ a confirmé que cette stratégie a permis de cibler le gène de l'UGT1A1 dans ces différents modèles.

Ces vecteurs lentiviraux étant peu immunogènes, leur utilisation limiterait le risque de mise en place d'une RI. De plus, les AAVr ne transduisent pas aussi efficacement le foie de rat que le foie de souris.

Pour d'autres étapes d'établissement de preuve de principe, il peut être préférable d'utiliser des vecteurs dont on estime qu'ils puissent transduire un plus grand nombre de cellules cibles dans le modèle animal choisi. Les vecteurs lentiviraux optimisés pourraient permettre de transduire d'emblée plus d'hépatocytes et permettre une réparation génique dans plus de cellules cibles sans provoquer de RI.

Pour rechercher les sites *off-target* des ZFNs utilisées, l'algorithme PROGNOS a permis de prédire *in silico* une liste de sites *off-target* potentiels (Fine *et al.*, 2013). La liste des vingt-deux sites *off-target* les plus probables pour les ZFNs a été utilisée pour une validation de ces prédictions *in vitro* sur des cellules C6 transduites avec le vecteur lentiviral optimisé par SMRT. Ce travail représente la première caractérisation de sites *off-target* de ZFNs contenant cinq domaines à ZF. Dans cette étude, 64 % de NHEJ sont détectés au niveau de la cible. Deux sites avec un même niveau d'homologie, le plus élevé parmi les sites testés, présentent un niveau de coupure de 10,5 et 1,3 % pour Tarsl2 et Gbas, respectivement. Une CDB *off-target* de 10,5 % représente un niveau très élevé de toxicité potentielle. Cependant, le niveau de coupure atteint un maximum lorsque l'on augmente la quantité de nucléases. Lorsque celui-ci est atteint, l'augmentation de la quantité de nucléases se répercute par l'amplification des coupures *off-target* comme cela a probablement été le cas dans cette analyse. Ces sites devraient également être étudiés *in vivo* car leur coupure *in vitro* n'est pas forcément suffisamment prédictive. Néanmoins, ces étapes sont nécessaires au choix d'une paire de nucléases et à l'évaluation des risques potentiels de son utilisation *in vivo*. Mis à part un contexte de développement clonal d'une sous-population de cellules transduites, il est peu probable d'atteindre de tels niveaux de coupure de sites *off-target* par des ZFNs *in vivo*.

Pour évaluer les conséquences de tels événements délétères, les fonctions des gènes susceptibles d'être coupés doivent être replacées dans le contexte de l'organe ciblé. Si un gène n'ayant pas de fonction essentielle dans le foie, ni de rôle d'oncogène est coupé en tant que site *off-target*, les conséquences de sa coupure seraient limitées. La coupure d'un gène essentiel ou de régions régulatrices aurait des répercussions en fonction du niveau de coupure ou de la conséquence de celle-ci. Par exemple, une coupure d'un anti-oncogène pourrait favoriser la transformation des cellules concernées. L'insertion d'ADN exogène dans un site *off-target* peut avoir le même type de conséquences.

Lors du suivi réalisé dans notre étude, l'expression des ZFNs a été bien tolérée au niveau du foie et aucune toxicité n'a été mise en évidence lors de l'observation macroscopique des différents organes réalisée au moment du sacrifice. Un suivi prolongé au-delà de six mois permettrait de compléter ces observations.

Ce travail de thèse représente une contribution aux études précliniques des stratégies d'édition thérapeutique du génome. Nous n'en sommes qu'aux prémices de leur application en thérapie génique. Les techniques de vectorisation, de réduction de la RI et de ciblage restent à optimiser pour cette application. Néanmoins, il est possible d'imaginer que les progrès sur les nucléases permettront d'avancer vers des perspectives cliniques.

Par exemple, alors qu'il était compliqué et cher d'obtenir de nouvelles nucléases il y a quelques années, des plateformes ont permis de les rendre beaucoup plus abordables et plus rapides à obtenir.

Comme le suggèrent les premières étapes cliniques pour d'autres stratégies de thérapie génique, il est probable que les premiers essais concernent des approches *ex vivo* notamment pour des raisons de ciblage des cellules à traiter. De plus, des maladies pour lesquelles un avantage sélectif des cellules corrigées est connu seront certainement favorisées.

Ce type d'approche de thérapie génique ciblée pourrait correspondre à la vision idéale d'une médecine adaptée à chaque patient. En ce cas, il est possible d'imaginer "une approche pour une mutation". La complexité du développement d'autant de produits de thérapie génique *in vivo* rend cette vision utopique. Dans le cas de l'utilisation de nucléases, il sera nécessaire d'orienter les priorités vers une réparation génique précise d'une mutation, vers l'insertion ciblée d'un ADNc ou celle d'une cassette d'expression complète dans un locus donné, muté ou non.

Pour la réparation génique, il est possible de cibler la ou les mutations majoritaires responsables d'une maladie. Comme une réparation par RH peut être envisagée dans une région de quelques centaines de pb de part et d'autre de la CDB, une même paire de nucléases peut être utilisée pour le ciblage de plusieurs mutations voisines.

De même, l'utilisation d'un donneur long peut être compatible avec plusieurs mutations et être utilisé pour un grand nombre de patients pour la réparation génique ou pour un KI ciblé. Ainsi, un KI peut servir à insérer un ADNc contenant la version sauvage de plusieurs exons susceptibles d'être mutés. Ce type de stratégie pourrait également être développée chez le rat Gunn.

Des stratégies où les événements de RH et de NHEJ sont mutuellement compatibles avec une efficacité thérapeutique seraient aussi plus accessibles et il est plus facile d'envisager leur

transposition chez l'adulte (Anguela *et al.*, 2013; H. Li *et al.*, 2011), communication ESGCT 2013). Ainsi, l'utilisation d'une cassette d'expression de l'UGT1A1, sous contrôle d'un promoteur suffisamment fort pour obtenir un effet thérapeutique, entourée de bras d'homologie pourrait permettre d'atteindre un meilleur niveau de correction chez le rat Gunn. Dans une telle approche, la capture du vecteur par NHEJ peut également conduire à une correction. Un KI d'une cassette d'expression pourrait donc conduire à une plus forte correction phénotypique que la réparation génique, applicable chez le jeune et chez l'adulte.

D'un point de vue réglementaire, le développement de produits pour la thérapie génique ciblée est compatible avec les textes réglementaires de l'EMA et de la *Food and Drug Administration* (FDA), autorité équivalente aux USA.

En parallèle des aspects réglementaires, il existe des questions d'Éthique spécifiques des approches ciblées. Dans quelle mesure pouvons-nous modifier un locus précisément et de façon volontaire ? Quelles sont les modifications qui peuvent y être apportées ? Il est par exemple essentiel de préciser la finalité exclusivement thérapeutique d'une telle manipulation volontaire du génome et la seule manipulation possible des cellules somatiques. Ainsi, il sera nécessaire de vérifier l'absence de modification des cellules germinales lors d'édition de gène afin d'en éviter la transmission à la descendance.

Les essais cliniques en cours pour le traitement du sida et du glioblastome multiforme apporteront des premiers éléments de réponse qui permettront d'envisager plus précisément les prochaines étapes du développement des stratégies de thérapie génique ciblée.

## VII- Conclusion générale

Ce travail de thèse nous a permis de mettre au point une méthode d'optimisation de codons des séquences codant une paire de ZFNs pour permettre sa vectorisation par des vecteurs lentiviraux intégratifs et déficients pour l'intégration. Ces outils sont utilisables pour des applications thérapeutiques et biotechnologiques : ils permettent d'associer les avantages des ZFNs et des vecteurs lentiviraux.

En parallèle, nous avons développé une étude préclinique de réparation génique *in vivo* pour le traitement des maladies métaboliques du foie. L'utilisation de ZFNs et d'un donneur vectorisés par des AAVr injectés *in vivo* chez des rats Gunn nouveau-nés nous a permis de démontrer la faisabilité d'une stratégie de thérapie génique ciblée avec la modification de gène *in situ* reposant sur l'utilisation de nucléases et de la RH. Il est désormais nécessaire d'optimiser cette stratégie pour pouvoir envisager des applications thérapeutiques non limitées à des maladies pour lesquelles les cellules corrigées présentent un avantage sélectif.

## Annexes

### ***Annexe I - Tableau des maladies génétiques à transmission mendéliennes mentionnées dans ce manuscrit***

Nom de la maladie	Numéro OMIM
$\beta$ -thalassémie	OMIM#613985
Adrénoleucodystrophie liée à l'X	OMIM#300100
Amaurose congénitale de Leber	OMIM#204100
Déficit en Adénosine Désaminase	OMIM#102700
Déficit en fumarylacétoacétate hydrolase	OMIM#613871
Déficit en lipoprotéine lipase	OMIM#609708
Déficit en ornithine-transcarbamylase	OMIM#311250
<b>Déficit en <math>\alpha</math>1-antitrypsine</b>	OMIM# 613490
Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié à l'X	OMIM#300400
Drépanocytose	OMIM#603903
Hémophilies A et B	OMIM#306700 et OMIM#306900
Hypercholestérolémie familiale de type Ia	OMIM#143890
Maladie de Crigler Najjar de type I et II	OMIM#218800 et OMIM#606785
Maladie de Gilbert	OMIM#143500
Maladie de Wiscott-Aldrich	OMIM#301000
Muccopolysaccharidose de type VII	OMIM#253220
Myopathie de Duchenne	OMIM#310200
Trisomie 21, syndrome de Down	OMIM#190685
Xeroderma pigmentosum	OMIM#278700



***Annexe II - Surgical delivery of HDAd vectors improves correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats***

Article soumis au journal *Human Gene Therapy Methods* le 23/12/2013 sous la forme d'un *Brief Report*.

**Title:** Surgical delivery of low doses of HDAd vectors improves correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats

**Authors:** Françoise Schmitt<sup>1,2</sup>, Nunzia Pastore<sup>3</sup>, Cecilia Abarategui-Pontes<sup>1</sup>, Maude Flageul<sup>1</sup>, Anne Myara<sup>4</sup>, Sophie Laplanche<sup>4</sup>, Philippe Labrune<sup>5</sup>, Guillaume Podevin<sup>2</sup>, Tuan Huy Nguyen<sup>1\*</sup>, Nicola Brunetti-Pierri<sup>3,6\*</sup>

**Institutions:** <sup>1</sup>INSERM UMRS 1064, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France; <sup>2</sup>Pediatric hepatogastroenterology - HIFIH laboratory, UPRES 3859, SFR 4038, Angers, France, <sup>3</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine, Napoli, Italy; <sup>4</sup>Service de Biologie, Groupe Hospitalier Saint Joseph, Paris, France; <sup>5</sup>Service de Pédiatrie, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart, France; <sup>6</sup>Department of Translational Medicine, Federico II University, Napoli, Italy.

**\*Correspondance to:** Nicola Brunetti-Pierri, M.D., F.A.C.M.G.  
Telethon Institute of Genetics and Medicine  
Via P. Castellino, 111  
80131 Napoli, ITALY  
Phone: +39 081 6132361  
Fax: +39 081 5609877  
E-mail: [brunetti@tigem.it](mailto:brunetti@tigem.it)  
&  
Tuan Huy Nguyen, Ph.D.  
INSERM  
UMRS 1064, CHU Hôtel Dieu,  
Nantes, France  
Phone: 33 (0)2 40 08 74 14  
Fax: 33 (0)2 40 08 74 11  
E-mail: [tuan.nguyen@univ-nantes.fr](mailto:tuan.nguyen@univ-nantes.fr)

**Short title:** Improved HDAd liver transduction by surgical delivery

## Abstract

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

## Introduction

Helper-dependent adenoviral (HDAd) vectors are very attractive for liver-directed gene therapy because they can drive long-term transgene expression from transduced hepatocytes. Following intravascular administration of Adenoviral (Ad) vectors, hepatocytes transduction follows a non-linear dose-response that can have important consequences on both safety and efficacy in rodent and nonhuman primates (Nunes *et al.*, 1999; Morral *et al.*, 2002). In mice, a dose of  $1 \times 10^{11}$  vp/kg resulted in barely detectable transgene expression whereas a dose of  $1 \times 10^{12}$  vp/kg gave a disproportionately high level of transgene expression (Tao *et al.*, 2001). Hydrodynamic injections of HDAd in mice allowed an improved liver transduction efficiency with reduced systemic toxicity (Brunetti-Pierri *et al.*, 2005) and have been successfully recapitulated in rats (Dimmock *et al.*, 2011). These results pave the way for HDAd-mediated liver gene therapy through hyperpressure delivery. Nevertheless, hydrodynamic injections as performed in rodents cannot be performed in humans for safety reasons. Hence, minimally invasive methods of liver occlusion have been successfully developed to mimic hydrodynamic injection of HDAd vector in non-human primates, allowing substantially high levels of hepatocytes transduction (Brunetti-Pierri *et al.*, 2006). Moreover, these results indicated that higher liver transduction efficiency could be achieved with lower vector doses and with reduced systemic vector dissemination by delivering the vector into the surgically isolated liver. In addition, transgene expression has persisted for up to 7 years in nonhuman primates injected with HDAd vector by this delivery method without long-term adverse effects (Brunetti-Pierri *et al.*, 2013). Therefore, this surgical method may be attractive for severe inherited disorders particularly those in which invasive procedures, such as liver transplantation, remains the only therapeutic option available.

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

In this study, we investigated the potential of surgical delivery of clinically-relevant low doses of HDAd vectors in the isolated liver to achieve long-term therapeutic correction of bilirubinemia in the Gunn rat model. Furthermore, to mimic hydrodynamic injections developed in rodents (Brunetti-Pierri *et al.*, 2005; Dimmock *et al.*, 2011), HDAd diluted in a high-volume of saline was delivered in surgically isolated livers.

## **Materials and Methods**

### **Animal studies**

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

### **HDAd vector**

HDAd-UGT1A1 has been previously described (Dimmock *et al.*, 2011) and bears a liver-specific PEPCK-WL expression cassette (Palmer and Ng, 2003; Brunetti-Pierri *et al.*, 2006), driving the expression of human *UGT1A1* gene. HDAd was produced in 116 cells with the helper virus AdNG163 as described elsewhere (Palmer and Ng, 2003). Helper virus contamination was determined as described elsewhere (Palmer and Ng, 2003) and found to be <0.05%. DNA analyses of HDAd genomic structure was confirmed as described elsewhere (Palmer and Ng, 2003).

### **Vector administrations**

All procedures were performed under isoflurane general anesthesia (3% [v/v] in air). Homozygous (j/j) Gunn rats were injected with a vector dose of  $1 \times 10^{11}$  vp/kg. For portal vein injection (PV), 0.3 ml of vector solution was injected intraportally over 1 minute, using a 30-gauge needle and hemostasis was obtained by gentle compression at the site of injection ( $n=6$ ). High-volume injection of HDAd vector in the surgically isolated liver (HIL procedure) was performed as previously described ( $n=6$ ) (Dariel *et al.*, 2009; Schmitt *et al.*, 2010). Briefly, the liver was totally excluded from the systemic blood flow by clamping the hepatic afferent and

efferent vessels. The vector was infused in a large volume (8.9 ml/kg body weight) in the inferior vena cava (IVC) through a 30 gauge needle over 1 minute. We have previously shown that this volume corresponds to an intrahepatic pressure of 10 cm H<sub>2</sub>O by connecting a graduated water column to the catheter ((Dariel *et al.*, 2009). The normal hepatic pressure is below 1 cm H<sub>2</sub>O. After 10 minutes of liver occlusion, blood flow was restored by declamping the suprahepatic IVC, the hepatic artery and PV, and then the infrahepatic IVC. IVC hemostasis was achieved either by compression with Surgicel® (Ethicon, Issy Les Moulineaux, France) or by 10/0 suturing of the vessel. Control animals did not receive any injection or surgical procedure (*n*=4).

### **Serum bilirubin and bilirubin conjugates**

Blood was collected by retro-orbital sampling. Serum total bilirubin was measured in the routine biochemistry department of Nantes University Hospital. Bile was collected by bile duct cannulation after laparotomy at the time of sacrifice. The presence of monoglucuronide and diglucuronide bilirubin conjugates was determined by alkaline methanolysis as previously described (Muraca and Blanckaert, 1983).

### **Hepatic vector genome copy determination**

Total DNA was extracted from tissue samples using phenol-chloroform extraction and quantified by measuring the absorbance at 260 nm. Quantitative real time PCR was performed using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) in a total volume of 20 µl (10 µl master mix, 2 µl primer forward 10 µM, 2 µl primer reverse 10 µM, 6 µl H<sub>2</sub>O) with 100 ng of template DNA using HDAd specific primers: Forward 5'-TCTGAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCG-3' Reverse 5'-CCCATAAGCTCCTTTTAACTTGTTAAAGTC-3'. Cycling conditions consisted in heating at 95°C for 10 minutes followed by 45 cycles at 95° C for 10 seconds, 60° C for 7



seconds, and 72° C for 20 seconds. Serial dilutions ( $10^7$  to  $10^1$  copies) of the plasmid p $\Delta$ 21.7-PWL-hUGT1A1 bearing the PCR target sequence were used as a control to determine the amounts of HDAd and results were analyzed with LightCycler software version 3.5 (Roche).

### **Statistical analysis**

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

### **Results**

The HIL and PV injection procedures were both well tolerated by the rats. None of the treated animals died and they all recovered from the surgical procedure within 24 hours. During the 1st year of observation after vector administration, none of the rats developed appreciable clinical signs of illnesses and there was no evidence of tumor formation on necropsy. Liver histology was normal at sacrifice. ALT increased slightly, albeit not significantly, at 48 hours and 7 days post-injection without reaching values above the normal range in rats undergoing either HIL or PV injection: mean ALT values rose from a pre-operative  $0.68 \pm 0.06 \mu\text{kat/l}$  to  $1.49 \pm 1.26 \mu\text{kat/l}$  at day 7 in the HIL group (non statistically significant, NS), and from  $0.63 \pm 0.30 \mu\text{kat/l}$  to  $2.20 \pm 3.44 \mu\text{kat/l}$  in the PV group.

To investigate the therapeutic efficacy of the injections, serum bilirubin levels were monitored over time. As shown in **Fig. 1**, there was a peak of bilirubin at 48 hours, that might result from the surgical procedure, in both the HIL group as well as in the PV group ( $201.8 \pm$

29.9  $\mu\text{mol/l}$  versus 204.5  $\pm$  77.14  $\mu\text{mol/l}$  respectively, NS). From day 7 up to the end of the study, there was a marked (over 90%) reduction of baseline bilirubin levels in the HIL group, reaching normal levels during the first two months. Thereafter, there was a sustained 70% reduction of baseline serum bilirubinemia at levels just above the threshold of the normal range. In this HIL group, all serum bilirubin measurements post-vector administration were significantly lower than the baseline values ( $p=0.03$ ). Similarly, mean serum bilirubin values in the PV group decreased at day 7 post-injection but never fell below 50  $\mu\text{mol/l}$  (nadir set at 59.3  $\pm$  14.2), which corresponded to a 53% reduction of baseline measurements. They were significantly lower than initial bilirubin values only during the first month post-injection. At the time of sacrifice, serum bilirubin in the HIL group was significantly lower than the PV group ( $p=0.026$ ). In contrast to rats injected with the HDAd, serum bilirubin in the control group always remained elevated with values up to 150  $\mu\text{mol/l}$ . Hence, serum bilirubin levels in both HIL and PV groups were significantly lower than in the control group throughout the entire period of observation ( $p=0.024$ ). We then looked for inter-individual disparities of serum bilirubin levels among the rats of the HIL group. The two rats with serum bilirubin values up to 50  $\mu\text{mol/l}$  at day 360 (respectively 88 and 83  $\mu\text{mol/l}$ ) failed to show a reduction below 20  $\mu\text{mol/l}$  at day 7 and  $\leq$  10  $\mu\text{mol/l}$  at day 14 or 28 post-injection. No correlation could be found between the increase of serum bilirubin levels and the growth of the rats or signs of liver damage: ALT levels at day 360 were not more elevated in these 2 rats than in others of the HIL group, nor different from the ones in the PV group. Taken together, these results suggest that the transduction efficiency was reduced in these two animals.

At the time of sacrifice at day 360 post-vector administration, bile was collected by bile duct cannulation and liver lobes were harvested for the evaluation of transduction efficiency. No significant difference of HDAd genome copies was detected by quantitative PCR between the liver lobes of injected rats and between the different methods of vector delivery (**Fig. 2**). These

results suggest that HIL procedure resulted in higher transduction of hepatocytes compared to PV injection. Bile samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (**Fig. 3A**). Because Gunn rats are homozygous for a frameshift mutation in the *UGT1A1* gene, they lack completely of bilirubin conjugation activity and no bilirubin conjugates can be detected in their bile (**Fig. 3**). Bilirubin mono- and di-conjugates were present in the bile of both HIL and PV groups at a mean proportion of  $70.7\pm 36.7\%$  and  $36.5\pm 37.1\%$ , respectively (**Fig. 3B**). Both were significantly higher than control uninjected Gunn rats, but in contrast to the HIL group, bilirubin conjugates in the PV group remained significantly lower than the  $95.4\pm 0.8\%$  level of the wild-type group ( $p=0.024$ ).

## Discussion

In the present study, we showed that HDAd delivery into surgically isolated livers resulted in an improved correction of hyperbilirubinemia compared to the injection of the same vector at the same dose in the PV. This proceeds from multiple factors. First, injection of HDAd vectors after vascular exclusion of the liver from the systemic circulation increases vector retention in the target organ. Second, increased intrahepatic pressure could force HDAd particles to cross the endothelial barrier (Brunetti-Pierri *et al.*, 2005). Ad vector particles injected into the bloodstream must cross the liver endothelium through liver sinusoids fenestrations, before reaching the hepatocytes in the space of Disse. Liver fenestrations have been previously shown to play an important role in Ad-mediated liver transduction (Brunetti-Pierri *et al.*, 2005; Vetrini *et al.*, 2010). In rodents as in humans, the mean diameter of the fenestrations is about 100 nm, which is also the mean size of Ad particles (Lievens *et al.*, 2004; Snoeys *et al.*, 2007). Injection of HDAd into the liver after complete vascular exclusion results in an increase of intrahepatic pressure that mechanically forces viral particles through the fenestrations, resulting in a higher hepatocyte transduction (Brunetti-Pierri *et al.*, 2005; Brunetti-Pierri *et al.*, 2007).

In the present study, vector injection performed in surgically occluded livers resulted in improved correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats that was sustained for up to 1 year post-vector administration. Our previous studies in nonhuman primates have showed that HDAd delivered by a similar surgical procedure resulted in transgene expression for several years following vector administration but at a higher dose of  $1 \times 10^{12}$  vp/kg (Brunetti-Pierri *et al.*, 2006; Brunetti-Pierri *et al.*, 2013). There is no model of Crigler-Najjar syndrome in nonhuman primates that could be used to assess the therapeutic efficiency of the procedure. In these previous studies, intrahepatic hyper pressure was first achieved before HDAd injection, while in our present method the intrahepatic pressure was directly obtained by injection of high volumes

of saline solution containing the HDAd. Hence, our present study supports the efficacy of HDAd-mediated gene therapy to achieve long-term expression of UGT1A1 that results in sustained correction of hyperbilirubinemia with low and clinically relevant doses of vector that fall below the dose of  $6 \times 10^{11}$  vp/kg which was found to be lethal in one human subject (Raper *et al.*, 2003). Gunn rats tolerated well the HIL procedure. Nevertheless, liver toxicity is expected to be less invasive in humans in whom intra-hepatic vector delivery can be performed through endovascular interventions (van Etten *et al.*, 2004). Thus, our results might pave the way to preclinical studies in nonhuman primates to evaluate liver toxicity of HIL approach with low HDAd dose of  $1 \times 10^{11}$  vp/kg.

Taken together, these studies support the application of such a vector delivery method for Crigler-Najjar syndrome type I. This approach is still less invasive than liver transplantation and may lead to long-term therapeutic levels of transgene expression without chronic toxicity. Moreover, the procedure-related risk may be reduced by the use of a percutaneous occlusion balloon catheter placed in the IVC but this procedure is more difficult to investigate in the rat model (van Etten *et al.*, 2004). Ultimately, this gene therapy approach of HDAd delivery in the occluded liver could find its application in the treatment of hereditary liver diseases not resulting in hepatocytes death.

In conclusion, we have described a simple surgical procedure to improve the therapeutic index of HDAd vectors for Crigler-Najjar syndrome type I gene therapy. Transient blood flow occlusion and increased intrahepatic pressure are both likely to contribute in increasing the efficiency of liver gene transfer.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Italian Telethon Foundation (P37TELC to N.B.-P.), by the Italian Ministry of Health (GR-2009-1594913 to N.B.-P.), by the Association Française contre les Myopathies (AFM) (to NTH), the Association Francophone des Glycogénoses (to NTH), and from the “Agence Nationale de la Recherche”(ANR-07-MRAR\_CRINAGENETHER) (to NTH).

## **Disclosure statement**

No competing financial interests exist.

## References

- Askari, F.K., Hitomi, Y., Mao, M., and Wilson, J.M. (1996). Complete correction of hyperbilirubinemia in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I following transient in vivo adenovirus-mediated expression of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *Gene Ther* **3**, 381-388.
- Brunetti-Pierri, N., Ng, T., Iannitti, D.A., Palmer, D.J., Beaudet, A.L., Finegold, M.J., Carey, K.D., Cioffi, W.G., and NG, P. (2006). Improved hepatic transduction, reduced systemic vector dissemination, and long-term transgene expression by delivering helper-dependent adenoviral vectors into the surgically isolated liver of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* **17**, 391-404.
- Brunetti-Pierri, N., Ng, T., Iannitti, D., Cioffi, W., Stapleton, G., Law, M., Breinholt, J., Palmer, D., Grove, N., Rice, K., Bauer, C., Finegold, M., Beaudet, A., Mullins, C., and NG, P. (2013) Transgene expression up to 7 years in nonhuman primates following hepatic transduction with helper-dependent adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **24**, 761-765
- Brunetti-Pierri, N., Palmer, D.J., Mane, V., Finegold, M., Beaudet, A.L., and NG, P. (2005). Increased hepatic transduction with reduced systemic dissemination and proinflammatory cytokines following hydrodynamic injection of helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* **12**, 99-106.
- Brunetti-Pierri, N., Stapleton, G.E., Palmer, D.J., Zuo, Y., Mane, V.P., Finegold, M.J., Beaudet, A.L., Leland, M.M., Mullins, C.E., and NG, P. (2007). Pseudo-hydrodynamic delivery of helper-dependent adenoviral vectors into non-human primates for liver-directed gene therapy. *Mol Ther* **15**, 732-740.
- Danko, I., Jia, Z., and Zhang, G. (2004). Nonviral gene transfer into liver and muscle for treatment of hyperbilirubinemia in the Gunn rat. *Hum Gene Ther* **15**, 1279-1286.
- Dariel, A., Nguyen, T.H., Pichard, V., Schmitt, F., Aubert, D., Ferry, N., and Podevin, G. (2009). A new surgical approach to improve gene transfer in liver using lentiviral vectors. *J Pediatr Surg* **44**, 517-522.
- Dimmock, D., Brunetti-Pierri, N., Palmer, D.J., Beaudet, A.L., and NG, P. (2011). Correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats using clinically relevant low doses of helper-dependent adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **22**, 483-488.

Fox, I.J., Chowdhury, J.R., Kaufman, S.S., Goertzen, T.C., Chowdhury, N.R., Warkentin, P.I., Dorko, K., Sauter, B.V., and Strom, S.C. (1998). Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* **338**, 1422-1426.

Jia, Z., and Danko, I. (2005). Single hepatic venous injection of liver-specific naked plasmid vector expressing human UGT1A1 leads to long-term correction of hyperbilirubinemia and prevention of chronic bilirubin toxicity in Gunn rats. *Hum Gene Ther* **16**, 985-995.

Lievens, J., Snoeys, J., Vekemans, K., Van Linthout, S., De Zanger, R., Collen, D., Wisse, E., and de Geest, B. (2004). The size of sinusoidal fenestrae is a critical determinant of hepatocyte transduction after adenoviral gene transfer. *Gene Ther* **11**, 1523-1531.

Morral, N., O'neal, W.K., Rice, K., Leland, M.M., Piedra, P.A., Aguilar-Cordova, E., Carey, K.D., Beaudet, A.L., and Langston, C. (2002). Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons. *Hum Gene Ther* **13**, 143-154.

Muraca, M., and Blanckaert, N. (1983). Liquid-chromatographic assay and identification of mono- and diester conjugates of bilirubin in normal serum. *Clin Chem* **29**, 1767-1771.

Nguyen, T.H., Aubert, D., Bellodi-Privato, M., Flageul, M., Pichard, V., Jaidane-Abdelghani, Z., Myara, A., and Ferry, N. (2007). Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer. *Gene Ther* **14**, 1270-1277.

Nunes, F.A., Furth, E.E., Wilson, J.M., and Raper, S.E. (1999). Gene transfer into the liver of nonhuman primates with E1-deleted recombinant adenoviral vectors: safety of readministration. *Hum Gene Ther* **10**, 2515-2526.

Palmer, D., and NG, P. (2003). Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Mol Ther* **8**, 846-852.

Pastore, N., Nusco, E., Piccolo, P., Castaldo, S., Vanikova, J., Vetrini, F., Palmer, D.J., Vitek, L., Ng, P., and Brunetti-Pierri, N. (2013) Improved efficacy and reduced toxicity by ultrasound-guided intrahepatic injections of helper-dependent adenoviral vector in Gunn rats. *Hum Gene Ther Methods* **24**, 321-327.

Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **80**, 148-158.



Sauter, B.V., Parashar, B., Chowdhury, N.R., Kadakol, A., Ilan, Y., Singh, H., Milano, J., Strayer, D.S., and Chowdhury, J.R. (2000). A replication-deficient rSV40 mediates liver-directed gene transfer and a long-term amelioration of jaundice in Gunn rats. *Gastroenterology* **119**, 1348-1357.

Schmitt, F., Remy, S., Dariel, A., Flageul, M., Pichard, V., Boni, S., Usal, C., Myara, A., Laplanche, S., Anegon, I., Labrune, P., Podevin, G., Ferry, N., and Nguyen, T.H. (2010). Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* **139**, 999-1007, 1007 e1001-1002.

Seppen, J., Bakker, C., De Jong, B., Kunne, C., Van Den Oever, K., Vandenberghe, K., De Waart, R., Twisk, J., and Bosma, P. (2006). Adeno-associated virus vector serotypes mediate sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats. *Mol Ther* **13**, 1085-1092.

Snoeys, J., Lievens, J., Wisse, E., Jacobs, F., Duimel, H., Collen, D., Frederik, P., and de Geest, B. (2007). Species differences in transgene DNA uptake in hepatocytes after adenoviral transfer correlate with the size of endothelial fenestrae. *Gene Ther* **14**, 604-612.

Strauss, K.A., Robinson, D.L., Vreman, H.J., Puffenberger, E.G., Hart, G., and Morton, D.H. (2006). Management of hyperbilirubinemia and prevention of kernicterus in 20 patients with Crigler-Najjar disease. *Eur J Pediatr* **165**, 306-319.

Tao, N., Gao, G.P., Parr, M., Johnston, J., Baradet, T., Wilson, J.M., Barsoum, J., and Fawell, S.E. (2001). Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol Ther* **3**, 28-35.

Toietta, G., Mane, V.P., Norona, W.S., Finegold, M.J., Ng, P., McDonagh, A.F., Beaudet, A.L., and Lee, B. (2005). Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3930-3935.

Van Der Wegen, P., Louwen, R., Imam, A.M., Buijs-Offerman, R.M., Sinaasappel, M., Grosveld, F., and Scholte, B.J. (2006). Successful treatment of UGT1A1 deficiency in a rat model of Crigler-Najjar disease by intravenous administration of a liver-specific lentiviral vector. *Mol Ther* **13**, 374-381.

Van Etten, B., Brunstein, F., Van, I.M.G., Marinelli, A.W., Verhoef, C., Van Der Sijp, J.R., Guetens, G., De Boeck, G., De Bruijn, E.A., De Wilt, J.H., and Eggermont, A.M. (2004). Isolated hypoxic hepatic

perfusion with orthograde or retrograde flow in patients with irresectable liver metastases using percutaneous balloon catheter techniques: a phase I and II study. *Ann Surg Oncol* **11**, 598-605.

Vetrini, F., Brunetti-Pierri, N., Palmer, D.J., Bertin, T., Grove, N.C., Finegold, M.J., and NG, P. (2010). Vasoactive intestinal peptide increases hepatic transduction and reduces innate immune response following administration of helper-dependent Ad. *Mol Ther* **18**, 1339-1345.

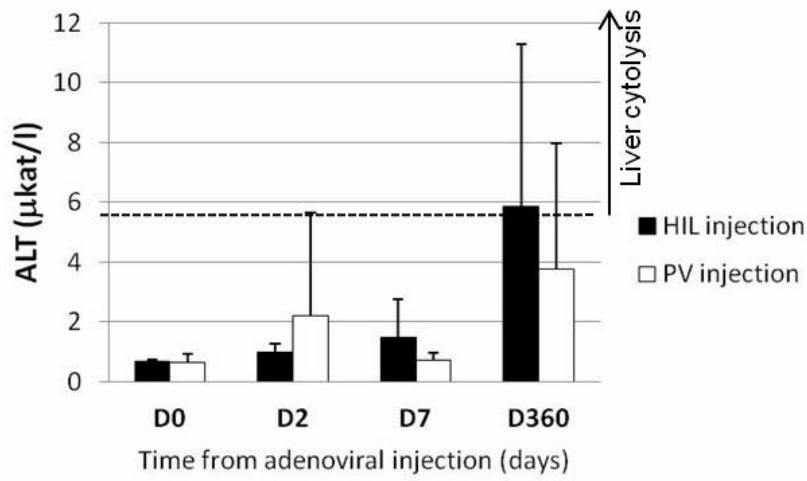
## Figure legends

**Figure 1:** Serum bilirubin levels in injected Gunn rats. Rats received HDAd vectors encoding hUGT1A1 under the control of a liver-specific promoter at a dose of  $1 \times 10^{11}$  vp/kg. Vector solution was injected by the isolated liver surgical procedure (HIL injection,  $n=6$ ) or portal vein injection (PV injection,  $n=6$ ). A control group was composed by uninjected animals not undergoing any injection procedure ( $n=4$ ). Each value plotted represents mean $\pm$ SD. The spotted line represents the therapeutic threshold of bilirubinemia ( $30 \mu\text{M}$ ). Significant disparities in bilirubin values between the HIL and the PV groups are represented by "\*".

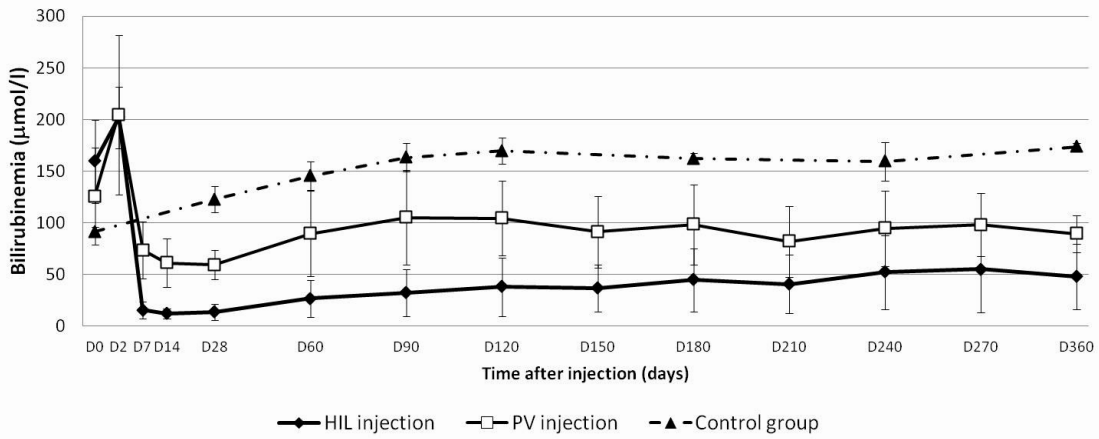
**Figure 2:** Vector genome copy number in the liver determined by quantitative PCR at the time of sacrifice. Values are presented as mean  $\pm$  SD.

**Figure 3:** Analysis of bile derivatives at 1 year post-injection. (A) Representative results of bile pigments by HPLC analysis. (B) The graph represents the proportions of biliary non conjugated (NC) bilirubin and mono (MC) and diglucuronides (DC) determined by HPLC in the different groups of rats compared to controls. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. Control, untreated homozygous jaundiced Gunn rat; WT, wild-type rat; PV, Gunn rat after portal vein injection of HDAd ; HIL, Gunn rat after HIL injection of HDAd.

**Fig 1**



**Fig 2**



**Fig 3**

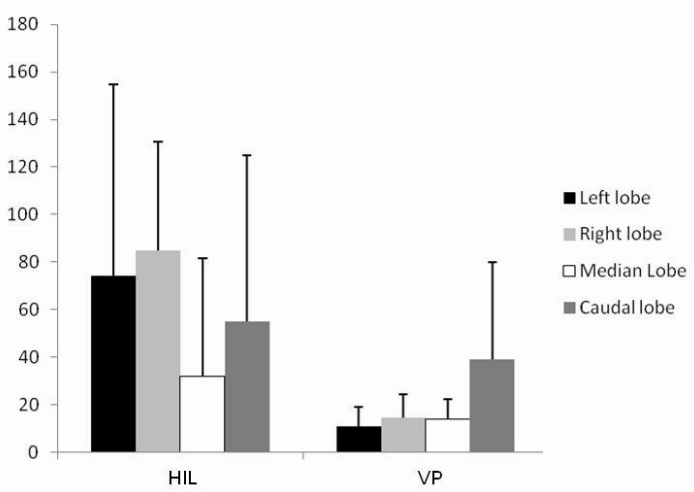
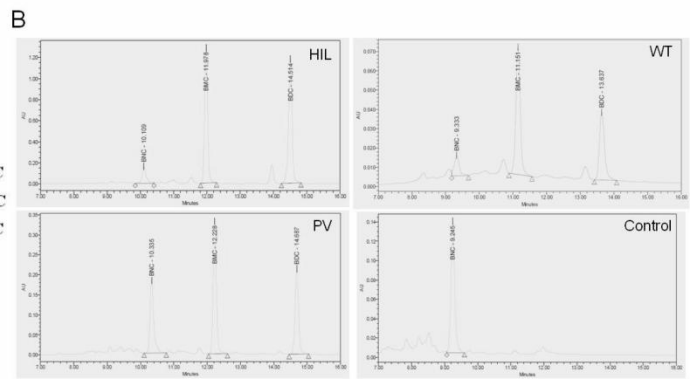
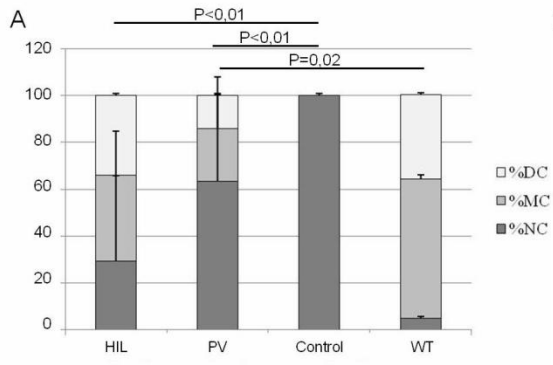


Fig 4



## Sources bibliographiques

- A Gilbert, Lereboullet, P., 1901. La cholémie simple familiale. *Sem Med* 21, 241–243.
- Aartsma-Rus, A., den Dunnen, J.T., van Ommen, G.-J.B., 2010. New insights in gene-derived therapy: the example of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1214, 199–212.
- Adelman, C.A., Petrini, J.H.J., 2009. Division of labor: DNA repair and the cell cycle specific functions of the Mre11 complex. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 1510–1514.
- 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., 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.
- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M.P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M.C., Bosticardo, M., Evangelio, C., Assanelli, A., Casiraghi, M., Di Nunzio, S., Callegaro, L., Benati, C., Rizzardi, P., Pellin, D., Di Serio, C., Schmidt, M., Von Kalle, C., Gardner, J., Mehta, N., Neduva, V., Dow, D.J., Galy, A., Miniero, R., Finocchi, A., Metin, A., Banerjee, P., Orange, J., Galimberti, S., Valsecchi, M.G., Biffi, A., Montini, E., Villa, A., Ciceri, F., Roncarolo, M.G., Naldini, L., 2013. Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science*.
- Aizawa, E., Hirabayashi, Y., Iwanaga, Y., Suzuki, K., Sakurai, K., Shimoji, M., Aiba, K., Wada, T., Tooi, N., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N., Mitani, K., 2012. Efficient and accurate homologous recombination in hESCs and hiPSCs using helper-dependent adenoviral vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 424–431.
- Akina, R.K., Walton, R.M., Chen, M.L., Li, Q.X., Planelles, V., Chen, I.S., 1996. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J. Virol.* 70, 2581–2585.
- Alazard-Dany, N., Nicolas, A., Ploquin, A., Strasser, R., Greco, A., Epstein, A.L., Fraefel, C., Salvetti, A., 2009. Definition of herpes simplex virus type 1 helper activities for adeno-associated virus early replication events. *PLoS Pathog.* 5, e1000340.
- Albuquerque-Silva, J., Vassart, G., Lavinha, J., Abramowicz, M.J., 2001. Chimeraplasty validation. *Nat. Biotechnol.* 19, 1011.
- Altafaj, X., Martín, E.D., Ortiz-Abalia, J., Valderrama, A., Lao-Peregrín, C., Dierssen, M., Fillat, C., 2013. Normalization of Dyrk1A expression by AAV2/1-shDyrk1A attenuates hippocampal-dependent defects in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* 52, 117–127.
- Alton, E.W.F.W., Boyd, A.C., Cheng, S.H., Davies, J.C., Davies, L.A., Dayan, A., Gill, D.R., Griesenbach, U., Higgins, T., Hyde, S.C., Innes, J.A., McLachlan, G., Porteous, D., Pringle, I., Scheule, R.K., Sumner-Jones, S., 2013. Toxicology study assessing efficacy and safety of repeated administration of lipid/DNA complexes to mouse lung. *Gene Ther.*
- Alwin, S., Gere, M.B., Guhl, E., Effertz, K., Barbas, C.F., 3rd, Segal, D.J., Weitzman, M.D., Cathomen, T., 2005. Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 610–617.
- Ambrosino, G., Varotto, S., Strom, S.C., Guariso, G., Franchin, E., Miotto, D., Caenazzo, L., Basso, S., Carraro, P., Valente, M.L., D'Amico, D., Zancan, L., D'Antiga, L., 2005. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell Transplant.* 14, 151–157.
- Angaji, S.A., Hedayati, S.S., Poor, R.H., Madani, S., Poor, S.S., Panahi, S., 2010. Application of RNA interference in treating human diseases. *J. Genet.* 89, 527–537.
- Anguela, X.M., Sharma, R., Doyon, Y., Miller, J.C., Li, H., Haurigot, V., Rohde, M.E., Wong, S.Y., Davidson, R.J., Zhou, S., Gregory, P.D., Holmes, M.C., High, K.A., 2013. Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood* 122, 4973–4975.
- Annoni, A., Brown, B.D., Cantore, A., Sergi, L.S., Naldini, L., Roncarolo, M.-G., 2009. In vivo delivery of a microRNA-regulated transgene induces antigen-specific regulatory T cells and promotes immunologic tolerance. *Blood* 114, 5152–5161.
- Annoni, A., Goudy, K., Akbarpour, M., Naldini, L., Roncarolo, M.G., 2013. Immune responses in liver-directed lentiviral gene therapy. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*

- Apolonia, L., Waddington, S.N., Fernandes, C., Ward, N.J., Bouma, G., Blundell, M.P., Thrasher, A.J., Collins, M.K., Philpott, N.J., 2007. Stable gene transfer to muscle using non-integrating lentiviral vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 1947–1954.
- Arias, I.M., Gartner, L.M., Cohen, M., Ezzer, J.B., Levi, A.J., 1969. Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am. J. Med.* 47, 395–409.
- Arnould, S., Delenda, C., Grizot, S., Desseaux, C., Pâques, F., Silva, G.H., Smith, J., 2011. The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 24, 27–31.
- Askari, F., Hitomi, E., Thiney, M., Wilson, J.M., 1995. Retrovirus-mediated expression of HUG Br1 in Crigler-Najjar syndrome type I human fibroblasts and correction of the genetic defect in Gunn rat hepatocytes. *Gene Ther.* 2, 203–208.
- Asokan, A., Schaffer, D.V., Jude Samulski, R., 2012a. The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads. *Mol Ther.*
- Asokan, A., Schaffer, D.V., Samulski, R.J., 2012b. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 699–708.
- Association Française DE CRIGLER-NAJJAR [WWW Document] URL <http://crigler-najjar.perso.sfr.fr/?page=phototherapie> (accessed 6.19.11).
- Association Française des Hémophiles [WWW Document] URL <http://afh.asso.fr> (accessed 12.12.13).
- Atchison, R.W., Casto, B.C., Hammon, W.M., 1965. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149, 754–756.
- Aubert, D., Ménoret, S., Chiari, E., Pichard, V., Durand, S., Tesson, L., Moullier, P., Anegon, I., Ferry, N., 2002. Cytotoxic immune response blunts long-term transgene expression after efficient retroviral-mediated hepatic gene transfer in rat. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 5, 388–396.
- Axelrod, J., Schmid, R., HAMMAKER, L., 1957. A biochemical lesion in congenital, nonobstructive, non-haemolytic jaundice. *Nature* 180, 1426–1427.
- Aylon, Y., Kupiec, M., 2005. Cell cycle-dependent regulation of double-strand break repair: a role for the CDK. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 259–261.
- Banasik, M.B., McCray, P.B., 2010. Integrase-defective lentiviral vectors: progress and applications. *Gene Ther.* 17, 150–157.
- Banaszynski, L.A., Chen, L.-C., Maynard-Smith, L.A., Ooi, A.G.L., Wandless, T.J., 2006. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell* 126, 995–1004.
- Bandyopadhyay, P., Ma, X., Linehan-Stieers, C., Kren, B.T., Steer, C.J., 1999. Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. Targeted delivery of liposomes and polyethyleneimine to the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 10163–10172.
- Bantel-Schaal, U., Braspenning-Wesch, I., Kartenbeck, J., 2009. Adeno-associated virus type 5 exploits two different entry pathways in human embryo fibroblasts. *J. Gen. Virol.* 90, 317–322.
- Bantel-Schaal, U., Hub, B., 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., Wilcher, R., Samulski, R.J., 2000. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 74, 2777–2785.
- Bartlett, M.G., Gourley, G.R., 2011. Assessment of UGT polymorphisms and neonatal jaundice. *Semin. Perinatol.* 35, 127–133.
- Bayer, M., Kantor, B., Cockrell, A., Ma, H., Zeithaml, B., Li, X., McCown, T., Kafri, T., 2008. A large U3 deletion causes increased in vivo expression from a nonintegrating lentiviral vector. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 1968–1976.
- Bell, P., Moscioni, A.D., McCarter, R.J., Wu, D., Gao, G., Hoang, A., Sanmiguel, J.C., Sun, X., Wivel, N.A., Raper, S.E., Furth, E.E., Batshaw, M.L., Wilson, J.M., 2006. Analysis of tumors arising in male B6C3F1 mice with and without AAV vector delivery to liver. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 14, 34–44.
- Bell, P., Wang, L., Lebherz, C., Flieder, D.B., Bove, M.S., Wu, D., Gao, G.P., Wilson, J.M., Wivel, N.A., 2005. No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 299–306.

- Bellodi-Privato, M., Aubert, D., Pichard, V., Myara, A., Trivin, F., Ferry, N., 2005. Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors. *Hepatology*. Baltimore, Md 42, 431–438.
- Bellon, G., Michel-Calemard, L., Thouvenot, D., Jagneaux, V., Poitevin, F., Malcus, C., Accart, N., Layani, M.P., Aymard, M., Bernon, H., Bienvenu, J., Courtney, M., Döring, G., Gilly, B., Gilly, R., Lamy, D., Levrey, H., Morel, Y., Paulin, C., Perraud, F., Rodillon, L., Sené, C., So, S., Touraine-Moulin, F., Pavirani, A., 1997. Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum. Gene Ther.* 8, 15–25.
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., Stark, J.M., 2008. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.* 4, e1000110.
- Bennett, J., Ashtari, M., Wellman, J., Marshall, K.A., Cyckowski, L.L., Chung, D.C., McCague, S., Pierce, E.A., Chen, Y., Bennicelli, J.L., Zhu, X., Ying, G.-S., Sun, J., Wright, J.F., Auricchio, A., Simonelli, F., Shindler, K.S., Mingozzi, F., High, K.A., Maguire, A.M., 2012. AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci. Transl. Med.* 4, 120ra15.
- Berkowitz, R., Ilves, H., Lin, W.Y., Eckert, K., Coward, A., Tamaki, S., Veres, G., Plavec, I., 2001. Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *J. Virol.* 75, 3371–3382.
- Besch, R., Giovannangeli, C., Degitz, K., 2004. Triplex-forming oligonucleotides - sequence-specific DNA ligands as tools for gene inhibition and for modulation of DNA-associated functions. *Curr. Drug Targets* 5, 691–703.
- Beumer, K., Bhattacharyya, G., Bibikova, M., Trautman, J.K., Carroll, D., 2006. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics* 172, 2391–2403.
- Beumer, K.J., Trautman, J.K., Christian, M., Dahlem, T.J., Lake, C.M., Hawley, R.S., Grunwald, D.J., Voytas, D.F., Carroll, D., 2013a. Comparing ZFNs and TALENs for Gene Targeting in *Drosophila*. G3 Bethesda Md.
- Beumer, K.J., Trautman, J.K., Mukherjee, K., Carroll, D., 2013b. Donor DNA Utilization during Gene Targeting with Zinc-finger Nucleases. G3 Bethesda Md.
- Beurdeley, M., Bietz, F., Li, J., Thomas, S., Stoddard, T., Juillerat, A., Zhang, F., Voytas, D.F., Duchateau, P., Silva, G.H., 2013. Compact designer TALENs for efficient genome engineering. *Nat. Commun.* 4, 1762.
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K., Carroll, D., 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* 300, 764.
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D.J., Trautman, J.K., Smith, J., Kim, Y.G., Chandrasegaran, S., 2001. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol. Cell. Biol.* 21, 289–297.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., Carroll, D., 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161, 1169–1175.
- Birraux, J., Menzel, O., Wildhaber, B., Jond, C., Nguyen, T.H., Chardot, C., 2009. A step toward liver gene therapy: efficient correction of the genetic defect of hepatocytes isolated from a patient with Crigler-Najjar syndrome type 1 with lentiviral vectors. *Transplantation* 87, 1006–1012.
- Bischof, D., Cornetta, K., 2010. Flexibility in cell targeting by pseudotyping lentiviral vectors. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 614, 53–68.
- Blacklow, N.R., Hoggan, M.D., Rowe, W.P., 1967. Immunofluorescent studies of the potentiation of an adenovirus-associated virus by adenovirus 7. *J. Exp. Med.* 125, 755–765.
- Blacklow, N.R., Hoggan, M.D., Rowe, W.P., 1968. Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* 40, 319–327.
- Boch, J., Bonas, U., 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 419–436.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., Bonas, U., 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509–1512.
- Bogdanove, A.J., Schornack, S., Lahaye, T., 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 394–401.



- Bohenzky, R.A., LeFebvre, R.B., Berns, K.I., 1988. Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat. *Virology* 166, 316–327.
- Boissel, S., Jarjour, J., Astrakhan, A., Adey, A., Gouble, A., Duchateau, P., Shendure, J., Stoddard, B.L., Certo, M.T., Baker, D., Scharenberg, A.M., 2013. megaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res.*
- Bokhoven, M., Stephen, S.L., Knight, S., Gevers, E.F., Robinson, I.C., Takeuchi, Y., Collins, M.K., 2009. Insertional Gene Activation by Lentiviral and Gammaretroviral Vectors. *J. Virol.* 83, 283–294.
- Bonini, C., Grez, M., Traversari, C., Ciceri, F., Markt, S., Ferrari, G., Dinauer, M., Sadat, M., Aiuti, A., Deola, S., Radrizzani, M., Hagenbeek, A., Apperley, J., Ebeling, S., Martens, A., Kolb, H.J., Weber, M., Lotti, F., Grande, A., Weissinger, E., Bueren, J.A., Lamana, M., Falkenburg, J.H.F., Heemskerk, M.H.M., Austin, T., Kornblau, S., Marini, F., Benati, C., Magnani, Z., Cazzaniga, S., Toma, S., Gallo-Stampino, C., Introna, M., Slavina, S., Greenberg, P.D., Bregni, M., Mavilio, F., Bordignon, C., 2003. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat. Med.* 9, 367–369.
- Bortolussi, G., Zentilin, L., Baj, G., Giraudi, P., Bellarosa, C., Giacca, M., Tiribelli, C., Muro, A.F., 2012. Rescue of bilirubin-induced neonatal lethality in a mouse model of Crigler-Najjar syndrome type I by AAV9-mediated gene transfer. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 1052–1063.
- Bosma, P.J., 2003. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *J. Hepatol.* 38, 107–117.
- Bouard, D., Alazard-Dany, D., Cosset, F.-L., 2009. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* 157, 153–165.
- Bowles, D.E., Rabinowitz, J.E., 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.
- Brandsma, I., Gent, D.C., 2012. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr.* 3, 9.
- Brantly, M.L., Chulay, J.D., Wang, L., Mueller, C., Humphries, M., Spencer, L.T., Rouhani, F., Conlon, T.J., Calcedo, R., Betts, M.R., Spencer, C., Byrne, B.J., Wilson, J.M., Flotte, T.R., 2009. Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16363–16368.
- 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., Flotte, T.R., 2006. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 alpha1-antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults. *Hum. Gene Ther.* 17, 1177–1186.
- Breous, E., Somanathan, S., Vandenberghe, L.H., Wilson, J.M., 2009. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology* 50, 612–621.
- Brigham, K.L., Lane, K.B., Meyrick, B., Stecenko, A.A., Strack, S., Cannon, D.R., Caudill, M., Canonico, A.E., 2000. Transfection of nasal mucosa with a normal alpha1-antitrypsin gene in alpha1-antitrypsin-deficient subjects: comparison with protein therapy. *Hum. Gene Ther.* 11, 1023–1032.
- Brown, B.D., Cantore, A., Annoni, A., Sergi, L.S., Lombardo, A., Della Valle, P., D'Angelo, A., Naldini, L., 2007. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood* 110, 4144–4152.
- Brown, B.D., Naldini, L., 2009. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat. Rev. Genet.* 10, 578–585.
- Brown, B.D., Venneri, M.A., Zingale, A., Sergi, L., Naldini, L., 2006. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat. Med.* 12, 585–591.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., Havel, R.J., Steinberg, D., 1994. Gene therapy for cholesterol. *Nat. Genet.* 7, 349–350.
- Brunetti-Pierri, N., Liou, A., Patel, P., Palmer, D., Grove, N., Finegold, M., Piccolo, P., Donnachie, E., Rice, K., Beaudet, A., Mullins, C., Ng, P., 2012. Balloon catheter delivery of helper-dependent adenoviral vector results in sustained, therapeutic hFIX expression in rhesus macaques. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 1863–1870.

- Brunt, E.M., Blumenkamp, K., Ahmed, M., Ali, F., Marcus, N., Teckman, J., 2010. Hepatic progenitor cell proliferation and liver injury in  $\alpha$ -1-antitrypsin deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 51, 626–630.
- Calne, R.Y., 2000. Immunological tolerance--the liver effect. *Immunol. Rev.* 174, 280–282.
- Calne, R.Y., Sells, R.A., Pena, J.R., Davis, D.R., Millard, P.R., Herbertson, B.M., Binns, R.M., Davies, D.A., 1969. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223, 472–476.
- Cantore, A., Nair, N., Della Valle, P., Di Matteo, M., Mâtrai, J., Sanvito, F., Brombin, C., Di Serio, C., D'Angelo, A., Chuah, M., Naldini, L., Vandendriessche, T., 2012. Hyperfunctional coagulation factor IX improves the efficacy of gene therapy in hemophilic mice. *Blood* 120, 4517–4520.
- Cany, J., Barteau, B., Tran, L., Gauttier, V., Archambeaud, I., Couty, J.-P., Turlin, B., Pitard, B., Vassaux, G., Ferry, N., Conchon, S., 2011. AFP-specific immunotherapy impairs growth of autochthonous hepatocellular carcinoma in mice. *J. Hepatol.* 54, 115–121.
- Cao, O., Dobrzynski, E., Wang, L., Nayak, S., Mingle, B., Terhorst, C., Herzog, R.W., 2007. Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood* 110, 1132–1140.
- Cao, O., Hoffman, B.E., Moghimi, B., Nayak, S., Cooper, M., Zhou, S., Ertl, H.C.J., High, K.A., Herzog, R.W., 2009. Impact of the underlying mutation and the route of vector administration on immune responses to factor IX in gene therapy for hemophilia B. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1733–1742.
- Carlson, J.A., Rogers, B.B., Sifers, R.N., Finegold, M.J., Clift, S.M., DeMayo, F.J., Bullock, D.W., Woo, S.L., 1989. Accumulation of PiZ alpha 1-antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 83, 1183–1190.
- Carroll, D., 2008. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther.* 15, 1463–1468.
- Carroll, D., 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188, 773–782.
- Carroll, D., 2013. Staying on target with CRISPR-Cas. *Nat. Biotechnol.* 31, 807–809.
- Carroll, D., Beumer, K.J., Morton, J.J., Bozas, A., Trautman, J.K., 2008. Gene targeting in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* with zinc-finger nucleases. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 435, 63–77.
- Cartier, N., Aubourg, P., 2010. Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell gene therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 20, 857–862.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Bougnères, P., Schmidt, M., Kalle, C.V., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., Aubourg, P., 2012. Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol.* 507, 187–198.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Mahlaoui, N., Kiermer, V., Mittelstaedt, D., Bellesme, C., Lahlou, N., Lefrère, F., Blanche, S., Audit, M., Payen, E., Leboulch, P., l'Homme, B., Bougnères, P., Von Kalle, C., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., Aubourg, P., 2009. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818–823.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Bougnères, P., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., Aubourg, P., 2010. [Gene therapy of x-linked adrenoleukodystrophy using hematopoietic stem cells and a lentiviral vector]. *Bull. Académie Natl. Médecine* 194, 255–264; discussion 264–268.
- Cathomen, T., Joung, J.K., 2008. Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 1200–1207.
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., Cavallesco, R., Gillet-Legrand, B., Caccavelli, L., Sgarra, R., Maouche-Chrétien, L., Bernaudin, F., Girot, R., Dorazio, R., Mulder, G.-J., Polack, A., Bank, A., Soulier, J., Larghero, J., Kabbara, N., Dalle, B., Gourmel, B., Socie, G., Chrétien, S., Cartier, N., Aubourg, P., Fischer, A., Cornetta, K., Galacteros, F., Beuzard, Y., Gluckman, E., Bushman, F., Hacein-Bey-Abina, S., Leboulch, P., 2010. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature* 467, 318–322.

- Cervera, L., Gutiérrez, S., Martínez, M., Blanco, J., Gòdia, F., Segura, M.M., 2013. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *J. Biotechnol.*
- Chan, H.Y., V, S., Xing, X., Kraus, P., Yap, S.P., Ng, P., Lim, S.L., Lufkin, T., 2011. Comparison of IRES and F2A-based locus-specific multicistronic expression in stable mouse lines. *PloS One* 6, e28885.
- Chang, M.-L., Chen, J.-C., Yeh, C.-T., Chang, M.-Y., Liang, C.-K., Chiu, C.-T., Lin, D.-Y., Liaw, Y.-F., 2008. Gene gun bombardment with DNA-coated gold particles is a potential alternative to hydrodynamics-based transfection for delivering genes into superficial hepatocytes. *Hum. Gene Ther.* 19, 391–395.
- Chao, H., Liu, Y., Rabinowitz, J., Li, C., Samulski, R.J., Walsh, C.E., 2000. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2, 619–623.
- Chaparro, C., Sabot, F., 2012. Mobile Genetic Elements, in: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, pp. 105–114.
- Charrier, S., Ferrand, M., Zerbato, M., Précigout, G., Viornery, A., Bucher-Laurent, S., Benkhelifa-Ziyyat, S., Merten, O.W., Perea, J., Galy, A., 2011. Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. *Gene Ther.* 18, 479–487.
- Chen, F., Pruett-Miller, S.M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., Collingwood, T.N., Frodin, M., Davis, G.D., 2011. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat. Methods* 8, 753–755.
- Chen, Y.-G., Forsberg, M.H., Khaja, S., Cieccko, A.E., Hessner, M.J., Geurts, A.M., 2013. Gene targeting in NOD mouse embryos using zinc-finger nucleases. *Diabetes*.
- Chirmule, N., Propert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R., Wilson, J., 1999. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* 6, 1574–1583.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., Kim, J.-S., 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.*
- Choo, Y., Sánchez-García, I., Klug, A., 1994. In vivo repression by a site-specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence. *Nature* 372, 642–645.
- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., Nicolas, J.F., 1995. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1968–1973.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F., 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186, 757–761.
- Chuah, M.K., Vandendriessche, T., 2012. Platelet-directed gene therapy overcomes inhibitory antibodies to factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* 10, 1566–1569.
- Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M.E., Bourke, J., Wells, D.J., Dickson, G., Wood, M.J.A., Wilton, S.D., Straub, V., Kole, R., Shrewsbury, S.B., Sewry, C., Morgan, J.E., Bushby, K., Muntoni, F., 2011. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 378, 595–605.
- Clark, K.J., Voytas, D.F., Ekker, S.C., 2011. A TALE of Two Nucleases: Gene Targeting for the Masses? *Zebrafish* 8, 147–149.
- Coffman, B.L., Rios, G.R., Tephly, T.R., 1996. Purification and properties of two rat liver phenobarbital-inducible UDP-glucuronosyltransferases that catalyze the glucuronidation of opioids. *Drug Metab. Dispos.* 24, 329–333.
- Cohen, A.N., Kapitulnik, J., Ostrow, J.D., Zenone, E.A., Cochrane, C., Celic, L., Cheney, H., 1985. Effects of phenobarbital on bilirubin metabolism and its response to phototherapy in the jaundiced Gunn rat. *Hepatol. Baltim. Md* 5, 310–316.
- Cole-Strauss, A., Gamper, H., Holloman, W.K., Muñoz, M., Cheng, N., Kmiec, E.B., 1999. Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract. *Nucleic Acids Res.* 27, 1323–1330.

- Colosimo, A., Goncz, K.K., Novelli, G., Dallapiccola, B., Gruenert, D.C., 2001. Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 3, 178–185.
- Condiotti, R., Curran, M.A., Nolan, G.P., Giladi, H., Ketzinel-Gilad, M., Gross, E., Galun, E., 2004. Prolonged liver-specific transgene expression by a non-primate lentiviral vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 998–1006.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013a. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013b. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339, 819–823.
- Cornelius, C.E., Arias, I.M., 1972. Animal model of human disease. Crigler-Najjar Syndrome. Animal model: hereditary nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Am. J. Pathol.* 69, 369–372.
- Cornu, T.I., Cathomen, T., 2007. Targeted genome modifications using integrase-deficient lentiviral vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 2107–2113.
- Cornu, T.I., Thibodeau-Beganny, S., Guhl, E., Alwin, S., Eichinger, M., Joung, J.K., Joung, J.K., Cathomen, T., 2008. DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 352–358.
- Cotugno, G., Annunziata, P., Barone, M.V., Karali, M., Banfi, S., Auricchio, A., 2012. Impact of age at administration, lysosomal storage, and transgene regulatory elements on AAV2/8-mediated rat liver transduction. *PLoS One* 7, e33286.
- Cradick, T.J., Ambrosini, G., Iseli, C., Bucher, P., McCaffrey, A.P., 2011. ZFN-site searches genomes for zinc finger nuclease target sites and off-target sites. *BMC Bioinformatics* 12, 152.
- Cradick, T.J., Fine, E.J., Antico, C.J., Bao, G., 2013. CRISPR/Cas9 systems targeting  $\beta$ -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* 41, 9584–9592.
- Crigler, J.F., Najjar, V.A., 1952. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus; a new clinical entity. *AMA Am. J. Dis. Child.* 83, 259–260.
- Crispe, I.N., 2009. The liver as a lymphoid organ. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 147–163.
- Cunningham, S.C., Dane, A.P., Spinoulas, A., Alexander, I.E., 2008. Gene Delivery to the Juvenile Mouse Liver Using AAV2/8 Vectors. *Mol. Ther.* 16, 1081–1088.
- Daboussi, F., Zaslavskiy, M., Poirot, L., Loperfido, M., Gouble, A., Guyot, V., Leduc, S., Galetto, R., Grizot, S., Oficjalska, D., Perez, C., Delacôte, F., Dupuy, A., Chion-Sotinel, I., Le Clerre, D., Lebuhotel, C., Danos, O., Lemaire, F., Oussedik, K., Cédronne, F., Epinat, J.-C., Smith, J., Yáñez-Muñoz, R.J., Dickson, G., Popplewell, L., Koo, T., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., Duclert, A., Duchateau, P., Pâques, F., 2012. Chromosomal context and epigenetic mechanisms control the efficacy of genome editing by rare-cutting designer endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 40, 6367–6379.
- Dagher, I., Nguyen, T.H., Groyer-Picard, M.-T., Lainas, P., Mainot, S., Guettier, C., Pariente, D., Franco, D., Weber, A., 2009. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology* 49, 950–959.
- Dai, Q., Huang, J., Klitzman, B., Dong, C., Goldschmidt-Clermont, P.J., March, K.L., Rokovich, J., Johnstone, B., Rebar, E.J., Spratt, S.K., Case, C.C., Kontos, C.D., Annex, B.H., 2004. Engineered zinc finger-activating vascular endothelial growth factor transcription factor plasmid DNA induces therapeutic angiogenesis in rabbits with hindlimb ischemia. *Circulation* 110, 2467–2475.
- Dai, Y., Roman, M., Naviaux, R.K., Verma, I.M., 1992. Gene therapy via primary myoblasts: long-term expression of factor IX protein following transplantation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 10892–10895.
- Dankó, I., Jia, Z., Zhang, G., 2004a. Nonviral gene transfer into liver and muscle for treatment of hyperbilirubinemia in the Gunn rat. *Hum. Gene Ther.* 15, 1279–1286.
- Dankó, I., Jia, Z., Zhang, G., 2004b. Nonviral gene transfer into liver and muscle for treatment of hyperbilirubinemia in the Gunn rat. *Hum. Gene Ther.* 15, 1279–1286.
- Danko, I., Williams, P., Herweijer, H., Zhang, G., Latendresse, J.S., Bock, I., Wolff, J.A., 1997. High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1435–1443.

- Dariel, A., Nguyen, T.H., Pichard, V., Schmitt, F., Aubert, D., Ferry, N., Podevin, G., 2009. A new surgical approach to improve gene transfer in liver using lentiviral vectors. *J. Pediatr. Surg.* 44, 517–522.
- Davé, U.P., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., 2004. Gene Therapy Insertional Mutagenesis Insights. *Science* 303, 333–333.
- DeKever, R.C., Choi, V.M., Moehle, E.A., Paschon, D.E., Hockemeyer, D., Meijnsing, S.H., Sancak, Y., Cui, X., Steine, E.J., Miller, J.C., Tam, P., Bartsevich, V.V., Meng, X., Rupniewski, I., Gopalan, S.M., Sun, H.C., Pitz, K.J., Rock, J.M., Zhang, L., Davis, G.D., Rebar, E.J., Cheeseman, I.M., Yamamoto, K.R., Sabatini, D.M., Jaenisch, R., Gregory, P.D., Urnov, F.D., 2010. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res.* 20, 1133–1142.
- Delacôte, F., Perez, C., Guyot, V., Duhamel, M., Rochon, C., Ollivier, N., Macmaster, R., Silva, G.H., Pâques, F., Daboussi, F., Duchateau, P., 2013. High frequency targeted mutagenesis using engineered endonucleases and DNA-end processing enzymes. *PLoS One* 8, e53217.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., Charpentier, E., 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602–607.
- Deng, C., Capecchi, M.R., 1992a. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3365–3371.
- Deng, C., Capecchi, M.R., 1992b. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3365–3371.
- DePolo, N.J., Reed, J.D., Sheridan, P.L., Townsend, K., Sauter, S.L., Jolly, D.J., Dubensky, T.W., 2000. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2, 218–222.
- Di Matteo, M., Mátrai, J., Belay, E., Firdissa, T., Vandendriessche, T., Chuah, M.K.L., 2012. PiggyBac Toolbox. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 859, 241–254.
- Dimmock, D., Brunetti-Pierri, N., Palmer, D., Beaudet, A., Ng, P., 2010. Correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats using clinically relevant low doses of helper-dependent adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.*
- Ding, Q., Regan, S.N., Xia, Y., Ostrom, L.A., Cowan, C.A., Musunuru, K., 2013. Enhanced Efficiency of Human Pluripotent Stem Cell Genome Editing through Replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* 12, 393–394.
- Donahue, R.E., Kessler, S.W., Bodine, D., McDonagh, K., Dunbar, C., Goodman, S., Agricola, B., Byrne, E., Raffeld, M., Moen, R., 1992. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* 176, 1125–1135.
- Donoho, G., Jasin, M., Berg, P., 1998. Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4070–4078.
- Donsante, A., Miller, D.G., Li, Y., Vogler, C., Brunt, E.M., Russell, D.W., Sands, M.S., 2007. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317, 477.
- Doyle, E.L., Booher, N.J., Standage, D.S., Voytas, D.F., Brendel, V.P., VanDyk, J.K., Bogdanove, A.J., 2012. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res.* 40, W117–W122.
- Doyon, Y., Choi, V.M., Xia, D.F., Vo, T.D., Gregory, P.D., Holmes, M.C., 2010. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nat Meth* 7, 459–460.
- Doyon, Y., Vo, T.D., Mendel, M.C., Greenberg, S.G., Wang, J., Xia, D.F., Miller, J.C., Urnov, F.D., Gregory, P.D., Holmes, M.C., 2011. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat. Methods* 8, 74–79.
- Duan, D., Yue, Y., Engelhardt, J.F., 2001. Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 4, 383–391.
- Duan, Y., Catana, A., Meng, Y., Yamamoto, N., He, S., Gupta, S., Gambhir, S.S., Zern, M.A., 2007. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells Day. Ohio* 25, 3058–3068.

- Duca, M., Guianvarc'h, D., Oussedik, K., Halby, L., Garbesi, A., Dauzonne, D., Monneret, C., Osheroff, N., Giovannangeli, C., Arimondo, P.B., 2006. Molecular basis of the targeting of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by VP16 derivatives conjugated to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 34, 1900–1911.
- Dupuy, A., Valton, J., Leduc, S., Armier, J., Galetto, R., Gouble, A., Lebuhotel, C., Stary, A., Pâques, F., Duchateau, P., Sarasin, A., Daboussi, F., 2013. Targeted Gene Therapy of Xeroderma Pigmentosum Cells Using Meganuclease and TALEN<sup>TM</sup>. *PLoS One* 8, e78678.
- Durant, S., Karran, P., 2003. Vanillins--a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 31, 5501–5512.
- Durymanov, M.O., Beletkaia, E.A., Ulasov, A.V., Khramtsov, Y.V., Trusov, G.A., Rodichenko, N.S., Slastnikova, T.A., Vinogradova, T.V., Uspenskaya, N.Y., Kopantsev, E.P., Rosenkranz, A.A., Sverdlov, E.D., Sobolev, A.S., 2012. Subcellular trafficking and transfection efficacy of polyethylenimine-polyethylene glycol polyplex nanoparticles with a ligand to melanocortin receptor-1. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 163, 211–219.
- Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., 2007. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J. Gene Med.* 9, 833–842.
- EENdb - FokI variants [WWW Document] URL <http://eendb.zfgenetics.org/util-foki.php> (accessed 12.16.13).
- Eisenschmidt, K., Lanio, T., Simoncsits, A., Jeltsch, A., Pingoud, V., Wende, W., Pingoud, A., 2005. Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage. *Nucleic Acids Res.* 33, 7039–7047.
- Ellis, B.L., Hirsch, M.L., Porter, S.N., Samulski, R.J., Porteus, M.H., 2012. Zinc-finger nuclease-mediated gene correction using single AAV vector transduction and enhancement by Food and Drug Administration-approved drugs. *Gene Ther.*
- Ellis, J., Bernstein, A., 1989. Gene targeting with retroviral vectors: recombination by gene conversion into regions of nonhomology. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1621–1627.
- Elrod-Erickson, M., Rould, M.A., Nekludova, L., Pabo, C.O., 1996. Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. *Struct. Lond. Engl.* 1993 4, 1171–1180.
- Engelman, A., 1999. In vivo analysis of retroviral integrase structure and function. *Adv. Virus Res.* 52, 411–426.
- Ertel, I.J., Newton, W.A., 1969. Therapy in Congenital Hyperbilirubinemia: Phenobarbital and Diethylnicotinamide. *Pediatrics* 44, 43–48.
- European Medicines Agency - Human medicines - Cerepro [WWW Document] URL [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001103/wapp/Initial\\_authorisation/human\\_wapp\\_000083.jsp&mid=WC0b01ac058001d128](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001103/wapp/Initial_authorisation/human_wapp_000083.jsp&mid=WC0b01ac058001d128) (accessed 12.10.13).
- European Medicines Agency - News and Events - European Medicines Agency recommends first gene therapy for approval [WWW Document] URL [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2012/07/news\\_detail\\_001574.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2012/07/news_detail_001574.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1) (accessed 11.16.13a).
- European Medicines Agency - News and Events - European Medicines Agency recommends first gene therapy for approval [WWW Document] URL [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2012/07/news\\_detail\\_001574.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2012/07/news_detail_001574.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1) (accessed 12.10.13b).
- Fabre, F., 1978. Induced intragenic recombination in yeast can occur during the G1 mitotic phase. *Nature* 272, 795–798.
- Farese, R.V., Jr, Flynn, L.M., Young, S.G., 1992. Modification of the apolipoprotein B gene in HepG2 cells by gene targeting. *J. Clin. Invest.* 90, 256–261.
- Favaro, P., Downey, H.D., Zhou, J.S., Wright, J.F., Hauck, B., Mingozi, F., High, K.A., Arruda, V.R., 2009. Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1022–1030.
- Favaro, P., Finn, J.D., Siner, J.I., Wright, J.F., High, K.A., Arruda, V.R., 2011. Safety of liver gene transfer following peripheral intravascular delivery of adeno-associated virus (AAV)-5 and AAV-6 in a large animal model. *Hum. Gene Ther.* 22, 843–852.

- Ferry, N., 2003. [Gene therapy and liver diseases]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 288–290.
- Ferry, N., Duplessis, O., Houssin, D., Danos, O., Heard, J.M., 1991. Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8377–8381.
- Fine, E.J., Cradick, T.J., Zhao, C.L., Lin, Y., Bao, G., 2013. An online bioinformatics tool predicts zinc finger and TALE nuclease off-target cleavage. *Nucleic Acids Res.*
- Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M., 2010. 20 years of gene therapy for SCID. *Nat. Immunol.* 11, 457–460.
- Flageul, M., Aubert, D., Pichard, V., Nguyen, T.H., Nowrouzi, A., Schmidt, M., Ferry, N., 2009. Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors. *J. Gene Med.* 11, 689–696.
- Foley, J.E., Yeh, J.-R.J., Maeder, M.L., Reyon, D., Sander, J.D., Peterson, R.T., Joung, J.K., 2009. Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool Engineering (OPEN). *PloS One* 4, e4348.
- Follenzi, A., Battaglia, M., Lombardo, A., Annoni, A., Roncarolo, M.G., Naldini, L., 2004. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 103, 3700–3709.
- Follenzi, A., Santambrogio, L., Annoni, A., 2007. Immune responses to lentiviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 7, 306–315.
- Fonfara, I., Le Rhun, A., Chylinski, K., Makarova, K.S., Lécrivain, A.-L., Bzdrenga, J., Koonin, E.V., Charpentier, E., 2013. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.*
- Fox, I.J., Chowdhury, J.R., Kaufman, S.S., Goertzen, T.C., Chowdhury, N.R., Warkentin, P.I., Dorko, K., Sauter, B.V., Strom, S.C., 1998. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 338, 1422–1426.
- Frecha, C., Costa, C., Nègre, D., Gauthier, E., Russell, S.J., Cosset, F.-L., Verhoeyen, E., 2008a. Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* 112, 4843–4852.
- Frecha, C., Levy, C., Cosset, F.-L., Verhoeyen, E., 2010. Advances in the Field of Lentivector-based Transduction of T and B Lymphocytes for Gene Therapy. *Mol Ther* 18, 1748–1757.
- Frecha, C., Szécsi, J., Cosset, F.-L., Verhoeyen, E., 2008b. Strategies for targeting lentiviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 8, 449–460.
- Fu, H., Muenzer, J., Samulski, R.J., Breese, G., Sifford, J., Zeng, X., McCarty, D.M., 2003. Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 8, 911–917.
- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., Sander, J.D., 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.*
- Gabriel, R., Lombardo, A., Arens, A., Miller, J.C., Genovese, P., Kaepfel, C., Nowrouzi, A., Bartholomae, C.C., Wang, J., Friedman, G., Holmes, M.C., Gregory, P.D., Glimm, H., Schmidt, M., Naldini, L., von Kalle, C., 2011. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.*
- Gaj, T., Guo, J., Kato, Y., Sirk, S.J., Iii, C.F.B., 2012. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat. Methods* 9, 805–807.
- Gaj, T., Mercer, A.C., Sirk, S.J., Smith, H.L., Barbas, C.F., 2013. A comprehensive approach to zinc-finger recombinase customization enables genomic targeting in human cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 3937–3946.
- Galy, A., Roncarolo, M.-G., Thrasher, A.J., 2008. Development of lentiviral gene therapy for Wiskott Aldrich syndrome. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, 181–190.
- Gao, G., Vandenberghe, L.H., Wilson, J.M., 2005. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr. Gene Ther.* 5, 285–297.
- Gao, G., Wang, Q., Calcedo, R., Mays, L., Bell, P., Wang, L., Vandenberghe, L.H., Grant, R., Sanmiguel, J., Furth, E.E., Wilson, J.M., 2009. Adeno-associated virus-mediated gene transfer to nonhuman

- primate liver can elicit destructive transgene-specific T cell responses. *Hum. Gene Ther.* 20, 930–942.
- Gao, G.-P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., Wilson, J.M., 2002. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11854–11859.
- Gaudet, D., Méthot, J., Déry, S., Brisson, D., Essiembre, C., Tremblay, G., Tremblay, K., de Wal, J., Twisk, J., van den Bulk, N., Sier-Ferreira, V., van Deventer, S., 2012. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther.*
- Gauttier, V., Pichard, V., Aubert, D., Kaepfel, C., Schmidt, M., Ferry, N., Conchon, S., 2013. No tumour-initiating risk associated with scAAV transduction in newborn rat liver. *Gene Ther.*
- Gellhaus, K., Cornu, T.I., Heilbronn, R., Cathomen, T., 2010. Fate of recombinant adeno-associated viral vector genomes during DNA double-strand break-induced gene targeting in human cells. *Hum. Gene Ther.* 21, 543–553.
- GenBank Home [WWW Document] URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/genbank/> (accessed 1.28.14).
- Gene dreams troubled by market realities [WWW Document] URL <http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2007/September/GeneDreamsTroubledMarketRealities.asp> (accessed 12.10.13).
- Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [WWW Document] URL <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (accessed 3.14.11a).
- Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [WWW Document] URL <http://www.abedia.com/wiley/> (accessed 12.23.13b).
- Gentner, B., Schira, G., Giustacchini, A., Amendola, M., Brown, B.D., Ponzoni, M., Naldini, L., 2009. Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat. Methods* 6, 63–66.
- Gersbach, C.A., Gaj, T., Gordley, R.M., Mercer, A.C., Barbas, C.F., 2011. Targeted plasmid integration into the human genome by an engineered zinc-finger recombinase. *Nucleic Acids Res.* 39, 7868–7878.
- Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegon, I., Davis, G.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Jacob, H.J., Buelow, R., 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325, 433.
- Geurts, A.M., Cost, G.J., Rémy, S., Cui, X., Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Jacob, H.J., Anegon, I., Buelow, R., 2010. Generation of gene-specific mutated rats using zinc-finger nucleases. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 597, 211–225.
- Gilbert, J.R., Wong-Staal, F., 2001. HIV-2 and SIV vector systems. *Somat. Cell Mol. Genet.* 26, 83–98.
- Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J. Gene Med.* 15, 65–77.
- Gong, Q.H., Cho, J.W., Huang, T., Potter, C., Gholami, N., Basu, N.K., Kubota, S., Carvalho, S., Pennington, M.W., Owens, I.S., Popescu, N.C., 2001. Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* 11, 357–368.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Prieto, J., 2010. Durable correction of inherited metabolic liver disorders requires preventing transgene off-targeting from gene therapy vectors: the value of microRNAs. *Gastroenterology* 139, 726–729.
- Gordley, R.M., Gersbach, C.A., Barbas, C.F., 2009. Synthesis of programmable integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 5053–5058.
- Gouble, A., Smith, J., Bruneau, S., Perez, C., Guyot, V., Cabaniols, J.-P., Leduc, S., Fiette, L., Avé, P., Micheau, B., Duchateau, P., Pâques, F., 2006. Efficient in toto targeted recombination in mouse liver by meganuclease-induced double-strand break. *J. Gene Med.* 8, 616–622.
- Goulinet-Mainot, S., Tranchart, H., Groyer-Picard, M.-T., Lainas, P., Saloum Diop, P., Holopherne, D., Gonin, P., Benihoud, K., Ba, N., Gauthier, O., Franco, D., Guettier, C., Pariente, D., Weber, A., Dagher, I., Huy Nguyen, T., 2012. Improved Hepatocyte Engraftment After Portal Vein Occlusion in LDL Receptor-Deficient WHHL Rabbits and Lentiviral-Mediated Phenotypic Correction In Vitro. *Cell Med.* 4, 85–98.



- Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., Lopez, B.S., 2012. Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am. J. Cancer Res.* 2, 249.
- Grau, J., Boch, J., Posch, S., 2013. TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction. *Bioinformatics* btt501.
- Griffith, F., 1928. The Significance of Pneumococcal Types. *J. Hyg. (Lond.)* 27, 113–159.
- Grossman, M., Rader, D.J., Muller, D.W.M., Kolansky, D.M., Kozarsky, K., Clark, B.J., Stein, E.A., Lupien, P.J., Brewer, H.B., Raper, S.E., Wilson, J.M., 1995. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat. Med.* 1, 1148–1154.
- Grossman, M., Raper, S.E., Kozarsky, K., Stein, E.A., Engelhardt, J.F., Muller, D., Lupien, P.J., Wilson, J.M., 1994. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat. Genet.* 6, 335–341.
- Groth, A.C., Liu, M., Wang, H., Lovelett, E., Emery, D.W., 2013. Identification and Characterization of Enhancer-Blocking Insulators to Reduce Retroviral Vector Genotoxicity. *PloS One* 8, e76528.
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G.-L., White, F.F., Yin, Z., 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* 435, 1122–1125.
- Gunn, C.H., 1938. HEREDITARY ACHOLURIC JAUNDICE in a New Mutant Strain of Rats. *J. Hered.* 29, 137–139.
- Gunn, C.K., 1944. Hereditary Acholuric Jaundice in the Rat. *Can. Med. Assoc. J.* 50, 230–237.
- Guntaka, R.V., Varma, B.R., Weber, K.T., 2003. Triplex-forming oligonucleotides as modulators of gene expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 22–31.
- Guo, J., Gaj, T., Barbas, C.F., 3rd, 2010. Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *J. Mol. Biol.* 400, 96–107.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., Asnafi, V., MacIntyre, E., Dal Cortivo, L., Radford, I., Brousse, N., Sigaux, F., Moshous, D., Hauer, J., Borkhardt, A., Belohradsky, B.H., Wintergerst, U., Velez, M.C., Leiva, L., Sorensen, R., Wulfraat, N., Blanche, S., Bushman, F.D., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., 2008. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 118, 3132–3142.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulfraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J.I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415–419.
- Händel, E.-M., Cathomen, T., 2011. Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity. *Curr. Gene Ther.* 11, 28–37.
- Händel, E.-M., Gellhaus, K., Khan, K., Bednarski, C., Cornu, T.I., Müller-Lerch, F., Kotin, R.M., Heilbronn, R., Cathomen, T., 2011. Versatile and Efficient Genome Editing in Human Cells by Combining Zinc-Finger Nucleases With Adeno-Associated Viral Vectors. *Hum. Gene Ther.*
- Harrison, M.T., 2001. Gene Therapy: Ethics and Regulation, in: eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Hauff, P., Seemann, S., Reszka, R., Schultze-Mosgau, M., Reinhardt, M., Buzasi, T., Plath, T., Rosewicz, S., Schirner, M., 2005. Evaluation of gas-filled microparticles and sonoporation as gene delivery system: feasibility study in rodent tumor models. *Radiology* 236, 572–578.
- Haviv-Chesner, A., Kobayashi, Y., Gabriel, A., Kupiec, M., 2007. Capture of linear fragments at a double-strand break in yeast. *Nucleic Acids Res.* 35, 5192–5202.
- Heigwer, F., Kerr, G., Walther, N., Glaeser, K., Pelz, O., Breinig, M., Boutros, M., 2013. E-TALEN: a web tool to design TALENs for genome engineering. *Nucleic Acids Res.*
- Held, P.K., Olivares, E.C., Aguilar, C.P., Finegold, M., Calos, M.P., Grompe, M., 2005. In vivo correction of murine hereditary tyrosinemia type I by phiC31 integrase-mediated gene delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 11, 399–408.

- Hendrie, P.C., Russell, D.W., 2005. Gene targeting with viral vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 9–17.
- Henry Gray, Lewis, W.H., 1918. *Anatomy of the human body*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Herrmann, F., Garriga-Canut, M., Baumstark, R., Fajardo-Sanchez, E., Cotterell, J., Minoche, A., Himmelbauer, H., Isalan, M., 2011. p53 Gene repair with zinc finger nucleases optimised by yeast 1-hybrid and validated by Solexa sequencing. *PloS One* 6, e20913.
- Herzog, R.W., 2005. Recent advances in hepatic gene transfer: more efficacy and less immunogenicity. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 8, 199–206.
- Herzog, R.W., 2010. Hepatic AAV gene transfer and the immune system: friends or foes? *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 1063–1066.
- Herzog, R.W., Hagstrom, J.N., Kung, S.-H., Tai, S.J., Wilson, J.M., Fisher, K.J., High, K.A., 1997. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5804–5809.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., Liu, J., 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 44, 113–139.
- Hickey, R.D., Lillegard, J.B., Fisher, J.E., McKenzie, T.J., Hofherr, S.E., Finegold, M.J., Nyberg, S.L., Grompe, M., 2011. Efficient production of Fah-null heterozygote pigs by chimeric adeno-associated virus-mediated gene knockout and somatic cell nuclear transfer. *Hepatology* 54, 1351–1359.
- High, K.A., 2012. The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet? *Blood*.
- High, K.A., Aubourg, P., 2011. rAAV human trial experience. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 807, 429–457.
- Hirata, R.K., Russell, D.W., 2000. Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J. Virol.* 74, 4612–4620.
- Hirsch, M.L., Green, L., Porteus, M.H., Samulski, R.J., 2010. Self-complementary AAV mediates gene targeting and enhances endonuclease delivery for double-strand break repair. *Gene Ther.* 17, 1175–1180.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKaveler, R.C., Katibah, G.E., Amora, R., Boydston, E.A., Zeitler, B., Meng, X., Miller, J.C., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Jaenisch, R., 2009. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 27, 851–857.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C.S., Gao, Q., Cassady, J.P., Cost, G.J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J.C., Zeitler, B., Cherone, J.M., Meng, X., Hinkley, S.J., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Jaenisch, R., 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.*
- Hoggan, M.D., Blacklow, N.R., 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.
- Holkers, M., Maggio, I., Liu, J., Janssen, J.M., Miselli, F., Mussolino, C., Recchia, A., Cathomen, T., Gonçalves, M.A.F.V., 2013. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* 41, e63.
- Holt, N., Wang, J., Kim, K., Friedman, G., Wang, X., Taupin, V., Crooks, G.M., Kohn, D.B., Gregory, P.D., Holmes, M.C., Cannon, P.M., 2010. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat. Biotechnol.* 28, 839–847.
- Howarth, J.L., Lee, Y.B., Uney, J.B., 2010. Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biol. Toxicol.* 26, 1–20.
- Hu, B., Dai, B., Wang, P., 2010. Vaccines delivered by integration-deficient lentiviral vectors targeting dendritic cells induces strong antigen-specific immunity. *Vaccine* 28, 6675–6683.
- Hu, B., Tai, A., Wang, P., 2011. Immunization delivered by lentiviral vectors for cancer and infectious diseases. *Immunol. Rev.* 239, 45–61.
- Hu, Y., Scully, R., Sobhian, B., Xie, A., Shestakova, E., Livingston, D.M., 2011. RAP80-directed tuning of BRCA1 homologous recombination function at ionizing radiation-induced nuclear foci. *Genes Dev.* 25, 685–700.

- Huertas, P., Jackson, S.P., 2009. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 284, 9558–9565.
- Hunger-Bertling, K., Harrer, P., Bertling, W., 1990. Short DNA fragments induce site specific recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.* 92, 107–116.
- Hutson, T.H., Foster, E., Moon, L., Yáñez-Muñoz, R.J., 2013. Lentiviral vector-mediated RNA silencing in the CNS. *Hum. Gene Ther. Methods.*
- Hutson, T.H., Verhaagen, J., Yáñez-Muñoz, R.J., Moon, L.D.F., 2012. Corticospinal tract transduction: a comparison of seven adeno-associated viral vector serotypes and a non-integrating lentiviral vector. *Gene Ther.* 19, 49–60.
- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.-R.J., Joung, J.K., 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.*
- Hypercholestérolémie Familiale (HF) : définition, comprendre l'hypercholestérolémie, prévenir et traiter [WWW Document] URL <http://www.hypercholesterolemie-familiale.fr/#> (accessed 12.12.13).
- Igoucheva, O., Alexeev, V., Anni, H., Rubin, E., 2008. Oligonucleotide-mediated gene targeting in human hepatocytes: implications of mismatch repair. *Oligonucleotides* 18, 111–122.
- Igoucheva, O., Alexeev, V., Pryce, M., Yoon, K., 2003. Transcription affects formation and processing of intermediates in oligonucleotide-mediated gene alteration. *Nucleic Acids Res.* 31, 2659.
- Igoucheva, O., Alexeev, V., Yoon, K., 2001. Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. *Gene Ther.* 8, 391–399.
- Ikushiro, S., Emi, Y., Iyanagi, T., 1995. Identification and Analysis of Drug-Responsive Expression of UDP-Glucuronosyltransferase Family 1 (UGT1) Isozyme in Rat Hepatic Microsomes Using Anti-peptide Antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.* 324, 267–272.
- Inagaki, K., Lewis, S.M., Wu, X., Ma, C., Munroe, D.J., Fuess, S., Storm, T.A., Kay, M.A., Nakai, H., 2007. DNA palindromes with a modest arm length of greater, similar 20 base pairs are a significant target for recombinant adeno-associated virus vector integration in the liver, muscles, and heart in mice. *J. Virol.* 81, 11290–11303.
- Inagaki, K., Piao, C., Kotchey, N.M., Wu, X., Nakai, H., 2008. Frequency and Spectrum of Genomic Integration of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vector in Neonatal Mouse Liver. *J. Virol.* 82, 9513–9524.
- index - adaat [WWW Document] URL <http://www.alpha1-france.org/> (accessed 12.12.13).
- Inoue, N., Dong, R., Hirata, R.K., Russell, D.W., 2001. Introduction of single base substitutions at homologous chromosomal sequences by adeno-associated virus vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 3, 526–530.
- Introgen files for bankruptcy, sees exit in 2009, 2008. . Reuters.
- Isalan, M., 2012. Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. *Nat Meth* 9, 32–34.
- Isalan, M., Choo, Y., Klug, A., 1997. Synergy between adjacent zinc fingers in sequence-specific DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5617–5621.
- Iwakuma, T., Cui, Y., Chang, L.J., 1999. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 261, 120–132.
- Iyanagi, T., Haniu, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., Watanabe, S., Shively, J.E., Anan, K.F., 1986. Cloning and characterization of cDNA encoding 3-methylcholanthrene inducible rat mRNA for UDP-glucuronosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 261, 15607–15614.
- Iyanagi, T., Watanabe, T., Uchiyama, Y., 1989. The 3-methylcholanthrene-inducible UDP-glucuronosyltransferase deficiency in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat) is caused by a -1 frameshift mutation. *J. Biol. Chem.* 264, 21302–21307.
- Izmiryan, A., Basmaciogullari, S., Henry, A., Paques, F., Danos, O., 2011. Efficient gene targeting mediated by a lentiviral vector-associated meganuclease. *Nucleic Acids Res.* 39, 7610–7619.
- Jacquier, A., Dujon, B., 1985. An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* 41, 383–394.
- Jasin, M., 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet. TIG* 12, 224–228.
- Jasin, M., Berg, P., 1988. Homologous integration in mammalian cells without target gene selection. *Genes Dev.* 2, 1353–1363.

- Jayakanthan, M., Muthukumar, J., Chandrasekar, S., Chawla, K., Punetha, A., Sundar, D., 2009. ZifBASE: a database of zinc finger proteins and associated resources. *BMC Genomics* 10, 421.
- Jazwa, A., Florczyk, U., Jozkowicz, A., Dulak, J., 2013. Gene therapy on demand: site specific regulation of gene therapy. *Gene* 525, 229–238.
- Jia, Z., Dankó, I., 2005. Long-term correction of hyperbilirubinemia in the Gunn rat by repeated intravenous delivery of naked plasmid DNA into muscle. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 860–866.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., Marraffini, L.A., 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.*
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
- Joglekar, A.V., Hollis, R.P., Kufnec, G., Senadheera, S., Chan, R., Kohn, D.B., 2013. Integrase-defective lentiviral vectors as a delivery platform for targeted modification of adenosine deaminase locus. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 1705–1717.
- Józkowicz, A., Dulak, J., 2005. Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. *Acta Biochim. Pol.* 52, 589.
- Kaepffel, C., Beattie, S.G., Fronza, R., van Logtenstein, R., Salmon, F., Schmidt, S., Wolf, S., Nowrouzi, A., Glimm, H., von Kalle, C., Petry, H., Gaudet, D., Schmidt, M., 2013. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat. Med.* advance online publication.
- Kaiser, J., 2009.  $\beta$ -Thalassemia Treatment Succeeds, With a Caveat. *Science* 326, 1468–1469.
- Kamimura, K., Suda, T., Xu, W., Zhang, G., Liu, D., 2009. Image-guided, lobe-specific hydrodynamic gene delivery to swine liver. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 491–499.
- Kaplitt, M.G., Feigin, A., Tang, C., Fitzsimons, H.L., Mattis, P., Lawlor, P.A., Bland, R.J., Young, D., Strybing, K., Eidelberg, D., Doring, M.J., 2007. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 369, 2097–2105.
- Kass, E.M., Jasin, M., 2010. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett.* 584, 3703–3708.
- Kassim, S.H., Li, H., Bell, P., Somanathan, S., Lagor, W., Jacobs, F., Billheimer, J., Wilson, J.M., Rader, D.J., 2013. Adeno-associated virus serotype 8 gene therapy leads to significant lowering of plasma cholesterol levels in humanized mouse models of homozygous and heterozygous familial hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther.* 24, 19–26.
- Kato, Y., Suzuki, H., Ikushiro, S., Yamada, S., Degawa, M., 2005. Decrease in Serum Thyroxine Level by Phenobarbital in Rats Is Not Necessarily Dependent on Increase in Hepatic Udp-Glucuronosyltransferase. *Drug Metab. Dispos.* 33, 1608–1612.
- Kaushal, S., Annamali, M., Blumenkamp, K., Rudnick, D., Halloran, D., Brunt, E.M., Teckman, J.H., 2010. Rapamycin reduces intrahepatic alpha-1-antitrypsin mutant Z protein polymers and liver injury in a mouse model. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 235, 700–709.
- Kawashita, Y., Guha, C., Moitra, R., Wang, X., Fox, I.J., Roy-Chowdhury, J., Roy-Chowdhury, N., 2008. Hepatic repopulation with stably transduced conditionally immortalized hepatocytes in the Gunn rat. *J. Hepatol.* 49, 99–106.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C., Naldini, L., 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7, 33–40.
- Kay, M.A., Rothenberg, S., Landen, C.N., Bellinger, D.A., Leland, F., Toman, C., Finegold, M., Thompson, A.R., Read, M.S., Brinkhous, K.M., 1993. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* 262, 117–119.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., Bonas, U., 2007. A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science* 318, 648–651.
- Kim, Y.G., Cha, J., Chandrasegaran, S., 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1156–1160.
- Kim, Y.G., Chandrasegaran, S., 1994. Chimeric restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 883–887.
- Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Feng, L., Cirak, S., Hunt, D., Adkin, C., Guglieri, M., Ashton, E., Abbs, S., Nihoyannopoulos, P., Garralda, M.E., Rutherford, M., McCulley, C., Popplewell, L., Graham, I.R., Dickson, G., Wood, M.J.A., Wells, D.J., Wilton, S.D., Kole, R., Straub, V.,

- Bushby, K., Sewry, C., Morgan, J.E., Muntoni, F., 2009. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 8, 918–928.
- Kinoshita, H., Watanabe, A., Hisayasu, S., Suzuki, S., Shimada, T., 2010. Targeted gene delivery to selected liver segments via isolated hepatic perfusion. *J. Surg. Res.* 160, 47–51.
- Klug, A., 2005. Towards therapeutic applications of engineered zinc finger proteins. *FEBS Lett.* 579, 892–894.
- Klug, A., 2010. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 213–231.
- Kobayashi, N., Kuramoto, T., Yamaoka, K., Hashida, M., Takakura, Y., 2001. Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 853–860.
- Kohn, D.B., Hershfield, M.S., Carbonaro, D., Shigeoka, A., Brooks, J., Smogorzewska, E.M., Barsky, L.W., Chan, R., Burotto, F., Annett, G., Nolte, J.A., Crooks, G., Kapoor, N., Elder, M., Wara, D., Bowen, T., Madsen, E., Snyder, F.F., Bastian, J., Muul, L., Blaese, R.M., Weinberg, K., Parkman, R., 1998. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat. Med.* 4, 775–780.
- Koldej, R.M., Carney, G., Wielgosz, M.M., Zhou, S., Zhan, J., Sorrentino, B.P., Nienhuis, A.W., 2013. Comparison of Insulators and Promoters for Expression of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Using Lentiviral Vectors. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*
- Koo, T., Wood, M.J., 2013. Clinical trials using antisense oligonucleotides in duchenne muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 24, 479–488.
- Kordower, J.H., Emborg, M.E., Bloch, J., Ma, S.Y., Chu, Y., Leventhal, L., McBride, J., Chen, E.Y., Palfi, S., Roitberg, B.Z., Brown, W.D., Holden, J.E., Pyzalski, R., Taylor, M.D., Carvey, P., Ling, Z., Trono, D., Hantraye, P., Déglon, N., Aebischer, P., 2000. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290, 767–773.
- Kotin, R.M., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., Berns, K.I., 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2211–2215.
- Kren, B.T., Bandyopadhyay, P., Steer, C.J., 1998. In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat. Med.* 4, 285–290.
- Kren, B.T., Parashar, B., Bandyopadhyay, P., Chowdhury, N.R., Chowdhury, J.R., Steer, C.J., 1999. Correction of the UDP-Glucuronosyltransferase Gene Defect in the Gunn Rat Model of Crigler–Najjar Syndrome Type I with a Chimeric Oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10349–10354.
- Kunzelmann, K., Legendre, J.Y., Knoell, D.L., Escobar, L.C., Xu, Z., Gruenert, D.C., 1996. Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells. *Gene Ther.* 3, 859–867.
- Kuriyama, S., Mitoro, A., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Yoshiji, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, M., Fukui, H., 2000. Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene Ther.* 7, 1132–1136.
- Lamartina, S., Sporeno, E., Fattori, E., Toniatti, C., 2000. Characteristics of the adeno-associated virus preintegration site in human chromosome 19: open chromatin conformation and transcription-competent environment. *J. Virol.* 74, 7671–7677.
- Latest Gene Therapy Disapproval Points to Confusion over Regulatory Setup [WWW Document] URL <http://www.genengnews.com/keywordsandtools/print/3/25046/> (accessed 12.10.13).
- Leavitt, A.D., Robles, G., Alesandro, N., Varmus, H.E., 1996. Human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants retain in vitro integrase activity yet fail to integrate viral DNA efficiently during infection. *J. Virol.* 70, 721–728.
- Leclerc, X., Danos, O., Scherman, D., Kichler, A., 2009. A comparison of synthetic oligodeoxynucleotides, DNA fragments and AAV-1 for targeted episomal and chromosomal gene repair. *BMC Biotechnol.* 9, 35.

- Léger, A., 2012. Pharmacologie moléculaire des vecteurs adéno-associés in situ dans le muscle squelettique : implications de la régulation épigénétique endogène sur l'expression du génome recombinant. Nantes, Faculté de Médecine.
- Lei, Y., Lee, C.-L., Joo, K.-I., Zarzar, J., Liu, Y., Dai, B., Fox, V., Wang, P., 2011. Gene editing of human embryonic stem cells via an engineered baculoviral vector carrying zinc-finger nucleases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 942–950.
- Levi, D., Pefkarou, A., Fort, J.A., DeFaria, W., Tzakis, A.G., 2001. Liver transplantation for factor VII deficiency. *Transplantation* 72, 1836–1837.
- LeWitt, P.A., Rezai, A.R., Leehey, M.A., Ojemann, S.G., Flaherty, A.W., Eskandar, E.N., Kostyk, S.K., Thomas, K., Sarkar, A., Siddiqui, M.S., Tatter, S.B., Schwalb, J.M., Poston, K.L., Henderson, J.M., Kurlan, R.M., Richard, I.H., Van Meter, L., Sapan, C.V., Doring, M.J., Kaplitt, M.G., Feigin, A., 2011. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol.* 10, 309–319.
- Li, C., Xiao, P., Gray, S.J., Weinberg, M.S., Samulski, R.J., 2011. Combination therapy utilizing shRNA knockdown and an optimized resistant transgene for rescue of diseases caused by misfolded proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14258–14263.
- Li, F., Papworth, M., Minczuk, M., Rohde, C., Zhang, Y., Ragozin, S., Jeltsch, A., 2007. Chimeric DNA methyltransferases target DNA methylation to specific DNA sequences and repress expression of target genes. *Nucleic Acids Res.* 35, 100–112.
- Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S.Y., Bhagwat, A.S., Malani, N., Anguela, X.M., Sharma, R., Ivanciu, L., Murphy, S.L., Finn, J.D., Khazi, F.R., Zhou, S., Paschon, D.E., Rebar, E.J., Bushman, F.D., Gregory, P.D., Holmes, M.C., High, K.A., 2011. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475, 217–221.
- Li, L., Chandrasegaran, S., 1993. Alteration of the cleavage distance of Fok I restriction endonuclease by insertion mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2764–2768.
- Li, L., Krymskaya, L., Wang, J., Henley, J., Rao, A., Cao, L.-F., Tran, C.-A., Torres-Coronado, M., Gardner, A., Gonzalez, N., Kim, K., Liu, P.-Q., Hofer, U., Lopez, E., Gregory, P.D., Liu, Q., Holmes, M.C., Cannon, P.M., Zaia, J.A., Digiusto, D.L., 2013. Genomic Editing of the HIV-1 Coreceptor CCR5 in Adult Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Using Zinc Finger Nucleases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*
- Li, L., Wu, L.P., Chandrasegaran, S., 1992. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4275–4279.
- Li, T., Huang, S., Jiang, W.Z., Wright, D., Spalding, M.H., Weeks, D.P., Yang, B., 2010. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res.*
- Li, Y., Hazarika, S., Xie, D., Pippen, A.M., Kontos, C.D., Annex, B.H., 2007. In mice with type 2 diabetes, a vascular endothelial growth factor (VEGF)-activating transcription factor modulates VEGF signaling and induces therapeutic angiogenesis after hindlimb ischemia. *Diabetes* 56, 656–665.
- Liao, Z.-K., Tsai, K.-C., Wang, H.-T., Tseng, S.-H., Deng, W.-P., Chen, W.-S., Hwang, L.-H., 2012. Sonoporation-mediated anti-angiogenic gene transfer into muscle effectively regresses distant orthotopic tumors. *Cancer Gene Ther.* 19, 171–180.
- Lieber, M.R., 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181–211.
- Lin, J., Calcedo, R., Vandenbergh, L.H., Figueredo, J.M., Wilson, J.M., 2008. Impact of Preexisting Vector Immunity on the Efficacy of Adeno-Associated Virus-Based HIV-1 Gag Vaccines. *Hum. Gene Ther.* 19, 663–669.
- Lin, S.-B., Li, C.-H., Lee, S.-S., Kan, L.-S., 2003. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life Sci.* 72, 2381–2390.
- Lin, S.-W., Hensley, S.E., Tatsis, N., Lasaro, M.O., Ertl, H.C.J., 2007. Recombinant adeno-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8<sup>+</sup> T cells in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3958–3970.
- Lin, Y., Waldman, A.S., 2001a. Capture of DNA sequences at double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Genetics* 158, 1665–1674.

- Lin, Y., Waldman, A.S., 2001b. Promiscuous patching of broken chromosomes in mammalian cells with extrachromosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 29, 3975–3981.
- Liu, F., Lei, J., Vollmer, R., Huang, L., 2004. Mechanism of liver gene transfer by mechanical massage. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 9, 452–457.
- Liu, G.-H., Suzuki, K., Qu, J., Sancho-Martinez, I., Yi, F., Li, M., Kumar, S., Nivet, E., Kim, J., Soligalla, R.D., Dubova, I., Goebel, A., Plongthongkum, N., Fung, H.-L., Zhang, K., Loring, J.F., Laurent, L.C., Izpisua Belmonte, J.C., 2011. Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell* 8, 688–694.
- Liu, J., Jeppesen, I., Nielsen, K., Jensen, T.G., 2006. Phi c31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts. *Gene Ther.* 13, 1188–1190.
- Liu, Y., Luo, D., Zhao, H., Zhu, Z., Hu, W., Cheng, C.H.K., 2013. Inheritable and Precise Large Genomic Deletions of Non-Coding RNA Genes in Zebrafish Using TALENs. *PLoS One* 8, e76387.
- LoDuca, P., Hoffman, B., Herzog, R., 2009. Hepatic Gene Transfer as a Means of Tolerance Induction to Transgene Products. *Curr. Gene Ther.* 9, 104–114.
- Loewen, N., Leske, D.A., Cameron, J.D., Chen, Y., Whitwam, T., Simari, R.D., Teo, W.-L., Fautsch, M.P., Poeschla, E.M., Holmes, J.M., 2004. Long-term retinal transgene expression with FIV versus adenoviral vectors. *Mol. Vis.* 10, 272–280.
- Loewen, N., Leske, D.A., Chen, Y., Teo, W.-L., Saenz, D.T., Peretz, M., Holmes, J.M., Poeschla, E.M., 2003a. Comparison of wild-type and class I integrase mutant-FIV vectors in retina demonstrates sustained expression of integrated transgenes in retinal pigment epithelium. *J. Gene Med.* 5, 1009–1017.
- Loewen, N., Leske, D.A., Chen, Y., Teo, W.-L., Saenz, D.T., Peretz, M., Holmes, J.M., Poeschla, E.M., 2003b. Comparison of wild-type and class I integrase mutant-FIV vectors in retina demonstrates sustained expression of integrated transgenes in retinal pigment epithelium. *J. Gene Med.* 5, 1009–1017.
- LOI no 94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain, 1994. , 94-653.
- Lombardo, A., Cesana, D., Genovese, P., Di Stefano, B., Provasi, E., Colombo, D.F., Neri, M., Magnani, Z., Cantore, A., Lo Riso, P., Damo, M., Pello, O.M., Holmes, M.C., Gregory, P.D., Gritti, A., Broccoli, V., Bonini, C., Naldini, L., 2011. Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nat. Methods.*
- Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C.M., Colleoni, S., Lee, Y.-L., Kim, K.A., Ando, D., Urnov, F.D., Galli, C., Gregory, P.D., Holmes, M.C., Naldini, L., 2007. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat. Biotechnol.* 25, 1298–1306.
- Lysy, P.-A., Najimi, M., Stephenne, X., Bourgois, A., Smets, F., Sokal, E.-M., 2008. Liver cell transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I: update and perspectives. *World J. Gastroenterol.* WJG 14, 3464–3470.
- MacGregor, R.R., 2001. Clinical protocol. A phase 1 open-label clinical trial of the safety and tolerability of single escalating doses of autologous CD4 T cells transduced with VRX496 in HIV-positive subjects. *Hum. Gene Ther.* 12, 2028–2029.
- Maeder, M.L., Thibodeau-Beganny, S., Osiak, A., Wright, D.A., Anthony, R.M., Eichinger, M., Jiang, T., Foley, J.E., Winfrey, R.J., Townsend, J.A., Unger-Wallace, E., Sander, J.D., Müller-Lerch, F., Fu, F., Pearlberg, J., Göbel, C., Dassie, J.P., Pruett-Miller, S.M., Porteus, M.H., Sgroi, D.C., Iafrate, A.J., Dobbs, D., McCray, P.B., Cathomen, T., Voytas, D.F., Joung, J.K., 2008. Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol. Cell* 31, 294–301.
- Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bencicelli, J.L., Ying, G., Rossi, S., Fulton, A., Marshall, K.A., Banfi, S., Chung, D.C., Morgan, J.I.W., Hauck, B., Zeleniaia, O., Zhu, X., Raffini, L., Coppieters, F., De Baere, E., Shindler, K.S., Volpe, N.J., Surace, E.M., Acerra, C., Lyubarsky, A., Redmond, T.M., Stone, E., Sun, J., McDonnell, J.W., Leroy, B.P., Simonelli, F., Bennett, J., 2009. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber’s congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374, 1597–1605.
- Mahfouz, M.M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X., Zhu, J.-K., 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2623–2628.

- Maier, D., Brennan, A.L., Jiang, S., Binder-Scholl, G.K., Lee, G., Plesa, G., Zheng, Z., Cotte, J., Carpenito, C., Wood, T., Spratt, S.K., Ando, D., Gregory, P., Holmes, M., Perez, E.E., Riley, J.L., Carroll, R., June, C.H., Levine, B.L., 2013. Efficient Clinical Scale Gene Modification via Zinc Finger Nuclease Targeted Disruption of the HIV Co-Receptor CCR5. *Hum. Gene Ther.*
- Mäkinen, J., Frank, C., Jyrkkärinne, J., Gynther, J., Carlberg, C., Honkakoski, P., 2002. Modulation of mouse and human phenobarbital-responsive enhancer module by nuclear receptors. *Mol. Pharmacol.* 62, 366–378.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Church, G.M., 2013a. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Church, G.M., 2013b. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826.
- Malkova, A., Naylor, M.L., Yamaguchi, M., Ira, G., Haber, J.E., 2005. RAD51-Dependent Break-Induced Replication Differs in Kinetics and Checkpoint Responses from RAD51-Mediated Gene Conversion. *Mol. Cell. Biol.* 25, 933–944.
- Mangeot, P.-E., Duperrier, K., Nègre, D., Boson, B., Rigal, D., Cosset, F.-L., Darlix, J.-L., 2002. High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 5, 283–290.
- Mani, M., Smith, J., Kandavelou, K., Berg, J.M., Chandrasegaran, S., 2005. Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double-strand DNA cleavage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1191–1197.
- Manno, C.S., Glenn F. Pierce, Arruda, V.R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J.E., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Rustagi, P., 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., 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.
- Marcaida, M.J., Muñoz, I.G., Blanco, F.J., Prieto, J., Montoya, G., 2010. Homing endonucleases: from basics to therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 727–748.
- Markusic, D.M., van Til, N.P., Hiralall, J.K., Elferink, R.P.J.O., Seppen, J., 2009. Reduction of liver macrophage transduction by pseudotyping lentiviral vectors with a fusion envelope from *Autographa californica* GP64 and Sendai virus F2 domain. *BMC Biotechnol.* 9, 85.
- Marschall, H.-U., Krawczyk, M., Grünhage, F., Katsika, D., Einarsson, C., Lammert, F., 2013. Gallstone disease in Swedish twins is associated with the Gilbert variant of UGT1A1. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.*
- Martino, A.T., Nayak, S., Hoffman, B.E., Cooper, M., Liao, G., Markusic, D.M., Byrne, B.J., Terhorst, C., Herzog, R.W., 2009. Tolerance induction to cytoplasmic beta-galactosidase by hepatic AAV gene transfer: implications for antigen presentation and immunotoxicity. *PLoS One* 4, e6376.
- Masahiko, N., Honkakoski, P., 2000. Induction of drug metabolism by nuclear receptor CAR: molecular mechanisms and implications for drug research. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 11, 259–264.
- Masuda, T., Kuroda, M.J., Harada, S., 1998. Specific and independent recognition of U3 and U5 att sites by human immunodeficiency virus type 1 integrase in vivo. *J. Virol.* 72, 8396–8402.
- Mátés, L., Chuah, M.K.L., Belay, E., Jerchow, B., Manoj, N., Acosta-Sanchez, A., Grzela, D.P., Schmitt, A., Becker, K., Matrai, J., Ma, L., Samara-Kuko, E., Gysemans, C., Pryputniewicz, D., Miskey, C., Fletcher, B., VandenDriessche, T., Ivics, Z., Izsvák, Z., 2009. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat. Genet.* 41, 753–761.
- Mátrai, J., Cantore, A., Bartholomae, C.C., Annoni, A., Wang, W., Acosta-Sanchez, A., Samara-Kuko, E., De Waele, L., Ma, L., Genovese, P., Damo, M., Arens, A., Goudy, K., Nichols, T.C., von Kalle, C., L Chuah, M.K., Roncarolo, M.G., Schmidt, M., Vandendriessche, T., Naldini, L., 2011. Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. *Hepatology* 53, 1696–1707.
- Matsui, H., Hegadorn, C., Ozelo, M., Burnett, E., Tuttle, A., Labelle, A., McCray Jr, P.B., Naldini, L., Brown, B., Hough, C., Lillicrap, D., 2011. A MicroRNA-regulated and GP64-pseudotyped



- Lentiviral Vector Mediates Stable Expression of FVIII in a Murine Model of Hemophilia A. *Mol Ther.*
- Mattar, C.N., Nathwani, A.C., Waddington, S.N., Dighe, N., Kaeppel, C., Nowrouzi, A., McIntosh, J., Johana, N.B., Ogden, B., Fisk, N.M., Davidoff, A.M., David, A., Peebles, D., Valentine, M.B., Appelt, J.-U., von Kalle, C., Schmidt, M., Biswas, A., Choolani, M., Chan, J.K., 2011. Stable Human FIX Expression After 0.9G Intrauterine Gene Transfer of Self-complementary Adeno-associated Viral Vector 5 and 8 in Macaques. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*
- Matukonis, M., Li, M., Molina, R.P., Paszkiet, B., Kaleko, M., Luo, T., 2002. Development of second- and third-generation bovine immunodeficiency virus-based gene transfer systems. *Hum. Gene Ther.* 13, 1293–1303.
- Mayor, H.D., Jamison, R.M., Jordan, L.E., Melnick, J.L., 1965. Structure and Composition of a Small Particle Prepared from a Simian Adenovirus. *J. Bacteriol.* 90, 235–242.
- McCarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P., 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., Samulski, R.J., 2001. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 8, 1248–1254.
- Meister, G.E., Chandrasegaran, S., Ostermeier, M., 2009. Heterodimeric DNA methyltransferases as a platform for creating designer zinc finger methyltransferases for targeted DNA methylation in cells. *Nucleic Acids Res.* 38, 1749–1759.
- Melchiorri, D., Pani, L., Gasparini, P., Cossu, G., Ancans, J., Borg, J.J., Draï, C., Fiedor, P., Flory, E., Hudson, I., Leufkens, H.G., Müller-Berghaus, J., Narayanan, G., Neugebauer, B., Pokrotnieks, J., Robert, J.-L., Salmonson, T., Schneider, C.K., 2013. Regulatory evaluation of Glybera in Europe - two committees, one mission. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 719.
- Merten, O.-W., Charrier, S., Laroudie, N., Fauchille, S., Dugué, C., Jenny, C., Audit, M., Zanta-Boussif, M.-A., Chautard, H., Radrizzani, M., Vallanti, G., Naldini, L., Noguez-Hellin, P., Galy, A., 2011. Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. *Hum. Gene Ther.* 22, 343–356.
- Metharom, P., Takyar, S., Xia, H.H., Ellem, K.A., Macmillan, J., Shepherd, R.W., Wilcox, G.E., Wei, M.Q., 2000. Novel bovine lentiviral vectors based on Jembrana disease virus. *J. Gene Med.* 2, 176–185.
- Meyer, M., Ortiz, O., Hrabé de Angelis, M., Wurst, W., Kühn, R., 2012. Modeling disease mutations by gene targeting in one-cell mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Miller, D.G., 2011. AAV-Mediated Gene Targeting. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 807, 301–315.
- Miller, D.G., Petek, L.M., Russell, D.W., 2003. Human Gene Targeting by Adeno-Associated Virus Vectors Is Enhanced by DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3550–3557.
- Miller, D.G., Wang, P.-R., Petek, L.M., Hirata, R.K., Sands, M.S., Russell, D.W., 2006. Gene targeting in vivo by adeno-associated virus vectors. *Nat. Biotechnol.* 24, 1022–1026.
- Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A., 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4, 1609–1614.
- Miller, J.C., Holmes, M.C., Wang, J., Guschin, D.Y., Lee, Y.-L., Rupniewski, I., Beausejour, C.M., Waite, A.J., Wang, N.S., Kim, K.A., Gregory, P.D., Pabo, C.O., Rebar, E.J., 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 25, 778–785.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., Dulay, G.P., Hua, K.L., Ankoudinova, I., Cost, G.J., Urnov, F.D., Zhang, H.S., Holmes, M.C., Zhang, L., Gregory, P.D., Rebar, E.J., 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* 29, 143–148.
- Miller, N., 2012. Glybera and the future of gene therapy in the European Union. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 419.
- Minczuk, M., Papworth, M.A., Kolasinska, P., Murphy, M.P., Klug, A., 2006. Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19689–19694.

- Minczuk, M., Papworth, M.A., Miller, J.C., Murphy, M.P., Klug, A., 2008. Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 36, 3926–3938.
- Mingozzi, F., Hasbrouck, N.C., Basner-Tschakarjan, E., Edmonson, S.A., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Zhou, S., Wright, J.F., Jiang, H., Pierce, G.F., Arruda, V.R., High, K.A., 2007. Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* 110, 2334–2341.
- Mingozzi, F., High, K.A., 2013. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*.
- Mitchell, R.S., Beitzel, B.F., Schroder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C.C., Ecker, J.R., Bushman, F.D., 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol.* 2, E234.
- Mittelman, D., Moye, C., Morton, J., Sykoudis, K., Lin, Y., Carroll, D., Wilson, J.H., 2009. Zinc-finger directed double-strand breaks within CAG repeat tracts promote repeat instability in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9607–9612.
- Miyake, Y., Mayumi, K., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Narimatsu, S., Hanioka, N., 2013. cDNA Cloning and Functional Analysis of Minipig Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase 1A1. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 452–461.
- Modlich, U., Navarro, S., Zychlinski, D., Maetzig, T., Knoess, S., Brugman, M.H., Schambach, A., Charrier, S., Galy, A., Thrasher, A.J., Bueren, J., Baum, C., 2009. Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1919–1928.
- Moehle, E.A., Moehle, E.A., Rock, J.M., Rock, J.M., Lee, Y.-L., Lee, Y.L., Jouvenot, Y., Jouvenot, Y., DeKolver, R.C., Dekolver, R.C., Gregory, P.D., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Urnov, F.D., Holmes, M.C., Holmes, M.C., 2007. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3055–3060.
- Molparia, B., Goyal, K., Sarkar, A., Kumar, S., Sundar, D., 2010. ZiF-Predict: a web tool for predicting DNA-binding specificity in C2H2 zinc finger proteins. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 8, 122–126.
- Montenegro-Miranda, P.S., Pichard, V., Aubert, D., Ten Bloemendaal, L., Duijst, S., de Waart, D.R., Ferry, N., Bosma, P.J., 2013. In the rat liver, Adenoviral gene transfer efficiency is comparable to AAV. *Gene Ther.*
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., Doglioni, C., von Kalle, C., Naldini, L., 2006. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat. Biotechnol.* 24, 687–696.
- Morrison, C., Wagner, E., 1996. Extrachromosomal recombination occurs efficiently in cells defective in various DNA repair systems. *Nucleic Acids Res.* 24, 2053–2058.
- Moscou, M.J., Bogdanove, A.J., 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501.
- Mselli-Lakhal, L., Favier, C., Leung, K., Guiguen, F., Grezel, D., Miossec, P., Mornex, J.F., Narayan, O., Querat, G., Chebloune, Y., 2000. Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. *J. Virol.* 74, 8343–8348.
- Mueller, C., Flotte, T.R., 2013. Gene-based therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD* 10 Suppl 1, 44–49.
- Mueller, C., Tang, Q., Gruntman, A., Blomenkamp, K., Teckman, J., Song, L., Zamore, P.D., Flotte, T.R., 2012. Sustained miRNA-mediated knockdown of mutant AAT with simultaneous augmentation of wild-type AAT has minimal effect on global liver miRNA profiles. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 590–600.
- Mussolino, C., Cathomen, T., 2011. On target? Tracing zinc-finger-nuclease specificity. *Nat. Methods* 8, 725–726.
- Mussolino, C., Cathomen, T., 2012. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 644–650.
- Mussolino, C., Cathomen, T., 2013. RNA guides genome engineering. *Nat. Biotechnol.* 31, 208–209.

- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lütge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., Cathomen, T., 2011. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.*
- Nakai, H., Fuess, S., Storm, T.A., Muramatsu, S., Nara, Y., Kay, M.A., 2005. Unrestricted Hepatocyte Transduction with Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vectors in Mice. *J. Virol.* 79, 214–224.
- Nakai, H., Thomas, C.E., Storm, T.A., Fuess, S., Powell, S., Wright, J.F., Kay, M.A., 2002. A Limited Number of Transducible Hepatocytes Restricts a Wide-Range Linear Vector Dose Response in Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Liver Transduction. *J. Virol.* 76, 11343–11349.
- Nakamura, A., Takeda, S., 2009. Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology* 29, 494–501.
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., Trono, D., 1996a. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267.
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., Trono, D., 1996b. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267.
- Nathwani, A.C., Davidoff, A.M., Hanawa, H., Hu, Y., Hoffer, F.A., Nikanorov, A., Slaughter, C., Ng, C.Y.C., Zhou, J., Lozier, J.N., Mandrell, T.D., Vanin, E.F., Nienhuis, A.W., 2002. Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood* 100, 1662–1669.
- Nathwani, A.C., Gray, J.T., McIntosh, J., Ng, C.Y.C., Zhou, J., Spence, Y., Cochrane, M., Gray, E., Tuddenham, E.G.D., Davidoff, A.M., 2007. Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood* 109, 1414–1421.
- Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G.D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., O’Beirne, J., Smith, K., Pasi, J., Glader, B., Rustagi, P., Ng, C.Y.C., Kay, M.A., Zhou, J., Spence, Y., Morton, C.L., Allay, J., Coleman, J., Sleep, S., Cunningham, J.M., Srivastava, D., Basner-Tschakarjan, E., Mingozzi, F., High, K.A., Gray, J.T., Reiss, U.M., Nienhuis, A.W., Davidoff, A.M., 2011. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365, 2357–2365.
- Nègre, D., Duisit, G., Mangeot, P.E., Moullier, P., Darlix, J.L., Cosset, F.L., 2002. Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 261, 53–74.
- Nguyen, N., Bonzo, J.A., Chen, S., Chouinard, S., Kelner, M.J., Hardiman, G., Bélanger, A., Tukey, R.H., 2008. Disruption of the *ugt1* locus in mice resembles human Crigler-Najjar type I disease. *J. Biol. Chem.* 283, 7901–7911.
- Nguyen, T.H., Aubert, D., Bellodi-Privato, M., Flageul, M., Pichard, V., Jaidane-Abdelghani, Z., Myara, A., Ferry, N., 2007. Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer. *Gene Ther.* 14, 1270–1277.
- Nguyen, T.H., Ferry, N., 2004. Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Ther.* 11 Suppl 1, S76–84.
- Nguyen, T.H., Mainot, S., Lainas, P., Groyer-Picard, M.-T., Franco, D., Dagher, I., Weber, A., 2009. Ex vivo liver-directed gene therapy for the treatment of metabolic diseases: advances in hepatocyte transplantation and retroviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 9, 136–149.
- Nichols, T.C., Dillow, A.M., Franck, H.W.G., Merricks, E.P., Raymer, R.A., Bellinger, D.A., Arruda, V.R., High, K.A., 2009. Protein replacement therapy and gene transfer in canine models of hemophilia A, hemophilia B, von willebrand disease, and factor VII deficiency. *ILAR J. Natl. Res. Counc. Inst. Lab. Anim. Resour.* 50, 144–167.
- Nomenclature [WWW Document] URL  
[http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/cms/ugt\\_alleles/lang/en\\_CA](http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/cms/ugt_alleles/lang/en_CA) (accessed 12.16.13).
- Nouspikel, T., 2007. DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions. *Neuroscience* 145, 1213–1221.
- Oishi, M., Nagasaki, Y., Nishiyama, N., Itaka, K., Takagi, M., Shimamoto, A., Furuichi, Y., Kataoka, K., 2007. Enhanced growth inhibition of hepatic multicellular tumor spheroids by lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate formulated in PEGylated polyplexes. *ChemMedChem* 2, 1290–1297.

- Okada, Y., Ueshin, Y., Hasuwa, H., Takumi, K., Okabe, M., Ikawa, M., 2009. Targeted gene modification in mouse ES cells using integrase-defective lentiviral vectors. *Genes*. N. Y. N 2000 47, 217–223.
- Olivares, E.C., Hollis, R.P., Chalberg, T.W., Meuse, L., Kay, M.A., Calos, M.P., 2002. Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat. Biotechnol.* 20, 1124–1128.
- Olsen, J.C., 1998. Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. *Gene Ther.* 5, 1481–1487.
- Olsen, J.C., 2001. EIAV, CAEV and other lentivirus vector systems. *Somat. Cell Mol. Genet.* 26, 131–145.
- Olsen, P.A., Gelazauskaite, M., Randøl, M., Krauss, S., 2010. Analysis of illegitimate genomic integration mediated by zinc-finger nucleases: implications for specificity of targeted gene correction. *BMC Mol. Biol.* 11, 35.
- Olsen, P.A., Solhaug, A., Booth, J.A., Gelazauskaite, M., Krauss, S., 2009. Cellular responses to targeted genomic sequence modification using single-stranded oligonucleotides and zinc-finger nucleases. *DNA Repair* 8, 298–308.
- Ong, Z.Y., Yang, C., Gao, S.J., Ke, X.-Y., Hedrick, J.L., Yan Yang, Y., 2013. Galactose-functionalized cationic polycarbonate diblock copolymer for targeted gene delivery to hepatocytes. *Macromol. Rapid Commun.* 34, 1714–1720.
- Orphanet: Deficit en alpha 1 antitrypsine [WWW Document] URL [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=194&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=deficit-antitrypsine&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Deficit-en-alpha-1-antitrypsine&title=Deficit-en-alpha-1-antitrypsine&search=Disease\\_Search\\_Simple](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=194&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=deficit-antitrypsine&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Deficit-en-alpha-1-antitrypsine&title=Deficit-en-alpha-1-antitrypsine&search=Disease_Search_Simple) (accessed 12.12.13).
- Orphanet: Hémophilie [WWW Document] URL [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=FR&Expert=448](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=448) (accessed 12.12.13).
- Orphanet: Hypercholestérolémie familiale [WWW Document] URL [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=FR&Expert=406.0](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=406.0) (accessed 12.12.13).
- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D.R., Lin, Q., Calos, M.P., Khavari, P.A., 2003.  $\phi$ C31 Integrase-Mediated Nonviral Genetic Correction of Junctional Epidermolysis Bullosa. *Hum. Gene Ther.* 14, 923–928.
- Ott, M.G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kühlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A., Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lüthi, U., Hassan, M., Thrasher, A.J., Hoelzer, D., von Kalle, C., Seger, R., Grez, M., 2006. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* 12, 401–409.
- Ozçay, F., Alehan, F., Sevmiş, S., Karakayali, H., Moray, G., Torgay, A., Arslan, G., Haberal, M., 2009. Living related liver transplantation in Crigler-Najjar syndrome type 1. *Transplant. Proc.* 41, 2875–2877.
- Pâques, F., Duchateau, P., 2007. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 7, 49–66.
- Park, F., Ohashi, K., Kay, M.A., 2000. Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood* 96, 1173–1176.
- Park, J.-S., Kim, B.-H., Park, S.G., Jung, S.Y., Lee, D.H., Son, W.-C., 2013. Induction of rat liver tumor using the Sleeping Beauty transposon and electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 589–593.
- Parouchev, A., Nguyen, T.H., Dagher, I., Mainot, S., Groyer-Picard, M.-T., Branger, J., Gonin, P., Di Santo, J., Franco, D., Gras, G., Weber, A., 2006. Efficient ex vivo gene transfer into non-human primate hepatocytes using HIV-1 derived lentiviral vectors. *J. Hepatol.* 45, 99–107.
- Parvin, J., Chiba, N., Ransburgh, D., 2011. Identifying the Effects of BRCA1 Mutations on Homologous Recombination using Cells that Express Endogenous Wild-type BRCA1. *J. Vis. Exp.*
- Pastore, N., Nusco, E., Piccolo, P., Castaldo, S., Vaníkova, J., Vetrini, F., Palmer, D., Vitek, L., Ng, P., Brunetti-Pierri, N., 2013. Improved efficacy and reduced toxicity by ultrasound-guided

- intrahepatic injections of helper-dependent adenoviral vector in Gunn rats. *Hum. Gene Ther. Methods*.
- Pastore, N., Nusco, E., Vaníková, J., Sepe, R.M., Vetrini, F., McDonagh, A., Auricchio, A., Vitek, L., Brunetti-Pierri, N., 2012. Sustained Reduction of Hyperbilirubinemia in Gunn Rats after Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer of Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase Isozyme 1A1 to Skeletal Muscle. *Hum. Gene Ther.*
- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J.P., Ma, E., Doudna, J.A., Liu, D.R., 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* 31, 839–843.
- Pattanayak, V., Ramirez, C.L., Joung, J.K., Liu, D.R., 2011. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by *in vitro* selection. *Nat. Methods* 8, 765–770.
- Paulk, N.K., Marquez Loza, L., Finegold, M., Grompe, M., 2012. AAV-mediated gene targeting is significantly enhanced by transient inhibition of NHEJ or the proteasome *in vivo*. *Hum. Gene Ther.*
- Paulk, N.K., Wursthorn, K., Wang, Z., Finegold, M.J., Kay, M.A., Grompe, M., 2010. Adeno-associated virus gene repair corrects a mouse model of hereditary tyrosinemia *in vivo*. *Hepatology*. Baltimore, Md 51, 1200–1208.
- Pavletich, N.P., Pabo, C.O., 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252, 809–817.
- Pavletich, N.P., Pabo, C.O., 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252, 809–817.
- Payen, E., Colomb, C., Negre, O., Beuzard, Y., Hehir, K., Leboulch, P., 2012. Lentivirus vectors in  $\beta$ -thalassemia. *Methods Enzymol.* 507, 109–124.
- Penaud-Budloo, M., Le Guiner, C., Nowrouzi, A., Toromanoff, A., Chérel, Y., Chenuaud, P., Schmidt, M., von Kalle, C., Rolling, F., Moullier, P., Snyder, R.O., 2008. Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J. Virol.* 82, 7875–7885.
- Perez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., Jouvenot, Y., Kim, K.A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V.V., Lee, Y.-L., Guschin, D.Y., Rupniewski, I., Waite, A.J., Carpenito, C., Carroll, R.G., Orange, J.S., Urnov, F.D., Rebar, E.J., Ando, D., Gregory, P.D., Riley, J.L., Holmes, M.C., June, C.H., 2008. Establishment of HIV-1 resistance in CD4<sup>+</sup> T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 26, 808–816.
- Perez-Pinera, P., Ousterout, D.G., Gersbach, C.A., 2012. Advances in targeted genome editing. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 268–277.
- Persons, D.A., 2009. Hematopoietic stem cell gene transfer for the treatment of hemoglobin disorders. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 690–697.
- Pessach, I.M., Notarangelo, L.D., 2011. Gene therapy for primary immunodeficiencies: looking ahead, toward gene correction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 1344–1350.
- Petek, L.M., Russell, D.W., Miller, D.G., 2010. Frequent Endonuclease Cleavage at Off-target Locations *In Vivo*. *Mol. Ther.* 18, 983–986.
- Petit, F.M., Bézieau, S., Gajdos, V., Parisot, F., Scoul, C., Capel, L., Stozinic, V., Khrouf, N., M'Rad, R., Koshy, A., Mollet-Boudjemline, A., Francoual, J., Labrune, P., 2008a. The Tunisian population history through the Crigler-Najjar type I syndrome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 16, 848–853.
- Petit, F.M., Hébert, M., Gajdos, V., Capel, L., M'Rad, R., Labrune, P., 2008b. Large deletion in UGT1A1 gene encompassing the promoter and the exon 1 responsible for Crigler-Najjar type I syndrome. *Haematologica* 93, 1590–1591.
- Philippe, S., Sarkis, C., Barkats, M., Mammeri, H., Ladroue, C., Petit, C., Mallet, J., Serguera, C., 2006. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17684–17689.
- Pichard, V., Aubert, D., Boni, S., Battaglia, S., Ivacic, D., Nguyen, T.H., Arbuthnot, P., Ferry, N., 2012. Specific Micro RNA-Regulated TetR-KRAB Transcriptional Control of Transgene Expression in Viral Vector-Transduced Cells. *PLoS One* 7, e51952.
- Pichard, V., Boni, S., Baron, W., Nguyen, T.H., Ferry, N., 2011. Priming of Hepatocytes Enhances *In Vivo* Liver Transduction with Lentiviral Vectors in Adult Mice. *Hum. Gene Ther.*
- Pichon, C., Billiet, L., Midoux, P., 2010. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 640–645.

- Piganeau, M., Ghezraoui, H., De Cian, A., Guittat, L., Tomishima, M., Perrouault, L., Rene, O., Katibah, G., Zhang, L., Holmes, M., Doyon, Y., Concordet, J.-P., Giovannangeli, C., Jasin, M., Brunet, E., 2013. Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Res.*
- Pingoud, A., Jeltsch, A., 2001. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 29, 3705–3727.
- Plessis, A., Perrin, A., Haber, J.E., Dujon, B., 1992. Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics* 130, 451–460.
- Pluta, K., Kacprzak, M.M., 2009. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim. Pol.* 56, 531–595.
- Podevin, G., Pichard, V., Durand, S., Aubert, D., Heloury, Y., Ferry, N., 2002. In-vivo retroviral gene transfer to the liver is cancelled by an immune response against the corrected cells. Can it be avoided? *Pediatr. Surg. Int.* 18, 595–599.
- Poeschla, E.M., Wong-Staal, F., Looney, D.J., 1998. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat. Med.* 4, 354–357.
- Ponder, K.P., 2011. Merry Christmas for Patients with Hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365, 2424–2425.
- Popplewell, L.J., Koo, T., Leclerc, X., Duclert, A., Mamchaoui, K., Gouble, A., Mouly, V., Voit, T., Pacques, F., Cedrone, F., Yáñez-Muñoz, R.J., Dickson, G., 2013. Gene Correction of a Duchenne Muscular Dystrophy Mutation by Meganuclease-Enhanced Exon Knock-in. *Hum. Gene Ther.*
- Porteus, M.H., 2006. Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 13, 438–446.
- Porteus, M.H., Baltimore, D., 2003. Chimeric Nucleases Stimulate Gene Targeting in Human Cells. *Science* 300, 763–763.
- Porteus, M.H., Carroll, D., 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 23, 967–973.
- Prieto, J., Qian, C., Hernandez-Alcoceba, R., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Mazzolini, G., Sangro, B., Kramer, M.G., 2004. Gene therapy of liver diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4, 1073–1091.
- Prise en charge anesthésique d'un enfant [WWW Document] URL <http://www.pediatrie.be/Anesth%E9sie.htm#1> (accessed 12.30.13).
- Prorocic, M.M., Wenlong, D., Olorunniji, F.J., Akopian, A., Schloetel, J.-G., Hannigan, A., McPherson, A.L., Stark, W.M., 2011. Zinc-finger recombinase activities in vitro. *Nucleic Acids Res.* 39, 9316–9328.
- Proudfoot, C., McPherson, A.L., Kolb, A.F., Stark, W.M., 2011. Zinc Finger Recombinases with Adaptable DNA Sequence Specificity. *PLoS ONE* 6.
- Pruett-Miller, S.M., Reading, D.W., Porter, S.N., Porteus, M.H., 2009. Attenuation of zinc finger nuclease toxicity by small-molecule regulation of protein levels. *PLoS Genet.* 5, e1000376.
- Puppi, J., Guillonneau, C., Pichard, V., Bellodi-Privato, M., Cuturi, M.C., Anegon, I., Ferry, N., 2004. Long term transgene expression by hepatocytes transduced with retroviral vectors requires induction of immune tolerance to the transgene. *J. Hepatol.* 41, 222–228.
- Radecke, F., Peter, I., Radecke, S., Gellhaus, K., Schwarz, K., Cathomen, T., 2006. Targeted Chromosomal Gene Modification in Human Cells by Single-Stranded Oligodeoxynucleotides in the Presence of a DNA Double-Strand Break. *Mol Ther* 14, 798–808.
- Radecke, S., Radecke, F., Cathomen, T., Schwarz, K., 2010. Zinc-finger Nuclease-induced Gene Repair With Oligodeoxynucleotides: Wanted and Unwanted Target Locus Modifications. *Mol Ther* 18, 743–753.
- Rahim, A.A., Wong, A.M.S., Howe, S.J., Buckley, S.M.K., Acosta-Saltos, A.D., Elston, K.E., Ward, N.J., Philpott, N.J., Cooper, J.D., Anderson, P.N., Waddington, S.N., Thrasher, A.J., Raivich, G., 2009. Efficient gene delivery to the adult and fetal CNS using pseudotyped non-integrating lentiviral vectors. *Gene Ther.* 16, 509–520.
- Rahman, S.H., Maeder, M.L., Joung, J.K., Cathomen, T., 2011. Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier. *Hum. Gene Ther.* 22, 925–933.
- Ramalingam, S., Kandavelou, K., Rajenderan, R., Chandrasegaran, S., 2011. Creating designed zinc-finger nucleases with minimal cytotoxicity. *J. Mol. Biol.* 405, 630–641.

- Ramirez, C.L., Certo, M.T., Mussolino, C., Goodwin, M.J., Cradick, T.J., McCaffrey, A.P., Cathomen, T., Scharenberg, A.M., Joung, J.K., 2012. Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res.* 40, 5560–5568.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., Zhang, F., 2013. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* 154, 1380–1389.
- Rando, T.A., Disatnik, M.H., Zhou, L.Z., 2000. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5363–5368.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J.M., Batshaw, M.L., 2003. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148–158.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., Lopez, B.-S., 2012. [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* 16, 1–10.
- Räty, J.K., Pikkariainen, J.T., Wirth, T., Ylä-Herttuala, S., 2008. Gene therapy: the first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications. *Curr. Mol. Pharmacol.* 1, 13–23.
- Redondo, P., Prieto, J., Muñoz, I.G., Alibés, A., Stricher, F., Serrano, L., Cabaniols, J.-P., Daboussi, F., Arnould, S., Perez, C., Duchateau, P., Pâques, F., Blanco, F.J., Montoya, G., 2008. Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature* 456, 107–111.
- Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R.O., Karlsson, S., Schubert, M., 1996. Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15266–15271.
- Reynolds, L., Ullman, C., Moore, M., Isalan, M., West, M.J., Clapham, P., Klug, A., Choo, Y., 2003a. Repression of the HIV-1 5' LTR promoter and inhibition of HIV-1 replication by using engineered zinc-finger transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1615–1620.
- Reynolds, L., Ullman, C., Moore, M., Isalan, M., West, M.J., Clapham, P., Klug, A., Choo, Y., 2003b. Repression of the HIV-1 5' LTR promoter and inhibition of HIV-1 replication by using engineered zinc-finger transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 1615–1620.
- Reyon, D., Tsai, S.Q., Khayter, C., Foden, J.A., Sander, J.D., Joung, J.K., 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat. Biotechnol.* 30, 460–465.
- Rhimes, S., 2005. *Grey's Anatomy*.
- Rittelmeyer, I., Rothe, M., Brugman, M.H., Iken, M., Schambach, A., Manns, M.P., Baum, C., Modlich, U., Ott, M., 2013. Hepatic lentiviral gene transfer is associated with clonal selection, but not with tumor formation in serially transplanted rodents. *Hepatology* 58, 397–408.
- Ritter, J.K., Crawford, J.M., Owens, I.S., 1991. Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells. *J. Biol. Chem.* 266, 1043–1047.
- Rosenberg, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., Merino, M.J., Culver, K., Miller, A.D., Blaese, R.M., Anderson, W.F., 1990. Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *N. Engl. J. Med.* 323, 570–578.
- Rotundo, I.L., Lancioni, A., Savarese, M., D'Orsi, L., Iacomino, M., Nigro, G., Piluso, G., Auricchio, A., Nigro, V., 2013. Use of a lower dosage liver-detargeted AAV vector to prevent hamster muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 130221095117007.
- Rouet, P., Smih, F., Jasin, M., 1994a. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6064–6068.
- Rouet, P., Smih, F., Jasin, M., 1994b. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8096–8106.
- Rousseau, J., Chapdelaine, P., Boisvert, S., Almeida, L.P., Corbeil, J., Montpetit, A., Tremblay, J.P., 2011. Endonucleases: tools to correct the dystrophin gene. *J. Gene Med.* 13, 522–537.
- Russell, D.W., Hirata, R.K., 1998. Human gene targeting by viral vectors. *Nat. Genet.* 18, 325–330.
- Sakuma, T., Barry, M.A., Ikeda, Y., 2012. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* 443, 603–618.

- Salmon, P., Trono, D., 2006. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr. Protoc. Neurosci.* Editor. Board Jacqueline N Crawley AI Chapter 4, Unit 4.21.
- Samulski, R.J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J.D., Housman, D.E., Epstein, N., Hunter, L.A., 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 10, 3941–3950.
- San Filippo, J., Sung, P., Klein, H., 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 229–257.
- Sander, J.D., Dahlborg, E.J., Goodwin, M.J., Cade, L., Zhang, F., Cifuentes, D., Curtin, S.J., Blackburn, J.S., Thibodeau-Beganny, S., Qi, Y., Pierick, C.J., Hoffman, E., Maeder, M.L., Khayter, C., Reyon, D., Dobbs, D., Langenau, D.M., Stupar, R.M., Giraldez, A.J., Voytas, D.F., Peterson, R.T., Yeh, J.-R.J., Joung, J.K., 2011. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat. Methods* 8, 67–69.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Nègre, D., Le Grand, R., Trono, D., Cosset, F.-L., 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100, 823–832.
- Santiago, Y., Chan, E., Liu, P.-Q., Orlando, S., Zhang, L., Urnov, F.D., Holmes, M.C., Guschin, D., Waite, A., Miller, J.C., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Klug, A., Collingwood, T.N., 2008. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5809–5814.
- Sarkis, C., Philippe, S., Mallet, J., Serguera, C., 2008. Non-integrating lentiviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 8, 430–437.
- SB-313 - Sangamo BioSciences [WWW Document] URL <http://www.sangamo.com/pipeline/sb-313.html> (accessed 12.11.13).
- Scallan, C.D., Jiang, H., Liu, T., Patarroyo-White, S., Sommer, J.M., Zhou, S., Couto, L.B., Pierce, G.F., 2006. Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* 107, 1810–1817.
- Schauer, R., Stangl, M., Lang, T., Zimmermann, A., Chouker, A., Gerbes, A.L., Schildberg, F.W., Rau, H.G., 2003. Treatment of Crigler-Najjar type 1 disease: relevance of early liver transplantation. *J. Pediatr. Surg.* 38, 1227–1231.
- Scheerer, J.B., Adair, G.M., 1994. Homology dependence of targeted recombination at the Chinese hamster APRT locus. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6663–6673.
- Schierling, B., Dannemann, N., Gabsalilow, L., Wende, W., Cathomen, T., Pingoud, A., 2011. A novel zinc-finger nuclease platform with a sequence-specific cleavage module. *Nucleic Acids Res.*
- Schmidt, M., Voutetakis, A., Afione, S., Zheng, C., Mandikian, D., Chiorini, J.A., 2008. Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J. Virol.* 82, 1399–1406.
- Schmitt, F., Flageul, M., Dariel, A., Pichard, V., Pontes, C.A., Boni, S., Podevin, G., Myara, A., Ferry, N., Nguyen, T.H., 2010a. Transient increase in intrahepatic pressure mediates successful treatment of the Gunn rat with reduced doses of lentiviral vector. *Hum. Gene Ther.* 21, 1349–1356.
- Schmitt, F., Pastore, N., Abarrategui-Pontes, C., Flageul, M., Myara, A., Laplanche, S., Labrune, P., Ferry, N., Podevin, G., Nguyen, T.H., Brunetti-Pierri, N. Surgical delivery of HDAd vectors improves correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats.
- Schmitt, F., Remy, S., Dariel, A., Flageul, M., Pichard, V., Boni, S., Usal, C., Myara, A., Laplanche, S., Anegón, I., Labrune, P., Podevin, G., Ferry, N., Nguyen, T.H., 2010b. Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* 139, 999–1007, 1007.e1–2.
- Scholze, H., Boch, J., 2011. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 47–53.
- Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., Bushman, F., 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521–529.
- Schuettrumpf, J., Liu, J.-H., Couto, L.B., Addya, K., Leonard, D.G.B., Zhen, Z., Sommer, J., Summer, J., Arruda, V.R., 2006. Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit



- model correlate with those in a human clinical trial. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 13, 1064–1073.
- Sebastiano, V., Maeder, M.L., Angstman, J.F., Haddad, B., Khayter, C., Yeo, D.T., Goodwin, M.J., Hawkins, J.S., Ramirez, C.L., Batista, L.F.Z., Artandi, S.E., Wernig, M., Joung, J.K., 2011. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 1717–1726.
- Sebestyén, M.G., Budker, V.G., Budker, T., Subbotin, V.M., Zhang, G., Monahan, S.D., Lewis, D.L., Wong, S.C., Hagstrom, J.E., Wolff, J.A., 2006. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J. Gene Med.* 8, 852–873.
- Seeman, N.C., Rosenberg, J.M., Rich, A., 1976. Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 804–808.
- Segal, D.J., Gonçalves, J., Eberhardy, S., Swan, C.H., Torbett, B.E., Li, X., Barbas, C.F., 2004. Attenuation of HIV-1 Replication in Primary Human Cells with a Designed Zinc Finger Transcription Factor. *J. Biol. Chem.* 279, 14509–14519.
- Seidman, M.M., Glazer, P.M., 2003. The potential for gene repair via triple helix formation. *J. Clin. Invest.* 112, 487–494.
- Seppen, J., Bakker, C., de Jong, B., Kunne, C., van den Oever, K., Vandenberghe, K., de Waart, R., Twisk, J., Bosma, P., 2006. Adeno-associated virus vector serotypes mediate sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 13, 1085–1092.
- Seppen, J., van Til, N.P., van der Rijt, R., Hiralall, J.K., Kunne, C., Elferink, R.P.J.O., 2006. Immune response to lentiviral bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene transfer in fetal and neonatal rats. *Gene Ther.* 13, 672–677.
- Shan, Q., Wang, Y., Chen, K., Liang, Z., Li, J., Zhang, Y., Zhang, K., Liu, J., Voytas, D.F., Zheng, X., Zhang, Y., Gao, C., 2013. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol. Plant.*
- Shcherbakova, O.G., Lanzov, V.A., Ogawa, H., Filatov, M.V., 2000. Overexpression of bacterial RecA protein stimulates homologous recombination in somatic mammalian cells. *Mutat. Res.* 459, 65–71.
- Shelby, M.K., Klaassen, C.D., 2006. Induction of Rat UDP-Glucuronosyltransferases in Liver and Duodenum by Microsomal Enzyme Inducers That Activate Various Transcriptional Pathways. *Drug Metab. Dispos.* 34, 1772–1778.
- Shi, J., Zheng, D., 2009. An update on gene therapy in China. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11, 547–553.
- Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., Kakarougkas, A., Meek, K., Taucher-Scholz, G., Löbrich, M., Jeggo, P.A., 2011. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* 30, 1079–1092.
- Shimizu, Y., Bhakta, M.S., Segal, D.J., 2009. Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 3970–3972.
- Shimizu, Y., Şöllü, C., Meckler, J.F., Adriaenssens, A., Zykovich, A., Cathomen, T., Segal, D.J., 2011. Adding fingers to an engineered zinc finger nuclease can reduce activity. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 5033–5041.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., Nickoloff, J.A., 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 18, 134–147.
- Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P., Pâques, F., 2011. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 11, 11–27.
- Sim, S.C., Kacevska, M., Ingelman-Sundberg, M., 2012. Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *Pharmacogenomics J.*
- Simonelli, F., Maguire, A.M., Testa, F., Pierce, E.A., Mingozzi, F., Bennicelli, J.L., Rossi, S., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E.M., Sun, J., Redmond, T.M., Zhu, X., Shindler, K.S., Ying, G.-S., Ziviello, C., Acerra, C., Wright, J.F., McDonnell, J.W., High, K.A., Bennett, J., Auricchio, A., 2010. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 643–650.
- Site web du CHU de Nantes - ophtalmologie - études cliniques - essai de thérapie génique dans l'amaurose congénitale de Leber (RPE65) [WWW Document] URL <https://www.chu->

- nantes.fr/ophtalmologie-etudes-cliniques-essai-de-therapie-genique-dans-l-amaurose-congenitale-de-leber-rpe65--30627.kjsp (accessed 1.5.14).
- Skinner, M.W., 2013. Gene therapy for hemophilia: addressing the coming challenges of affordability and accessibility. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 1–2.
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F.G., Reddy, A.R., Chandrasegaran, S., Carroll, D., 2000. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res.* 28, 3361–3369.
- Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J.-C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F.J., Bravo, J., Montoya, G., Pâques, F., Duchateau, P., 2006. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, e149.
- Sneitz, N., Bakker, C.T., de Knecht, R.J., Halley, D.J.J., Finel, M., Bosma, P.J., 2010. Crigler-Najjar syndrome in The Netherlands: identification of four novel UGT1A1 alleles, genotype-phenotype correlation, and functional analysis of 10 missense mutants. *Hum. Mutat.* 31, 52–59.
- Soars, M.G., Petullo, D.M., Eckstein, J.A., Kasper, S.C., Wrighton, S.A., 2004. An Assessment of Udp-Glucuronosyltransferase Induction Using Primary Human Hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 32, 140–148.
- Söllü, C., Pars, K., Cornu, T.I., Thibodeau-Beganny, S., Maeder, M.L., Joung, J.K., Heilbronn, R., Cathomen, T., 2010. Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion. *Nucleic Acids Res.*
- Somanathan, S., Breous, E., Bell, P., Wilson, J.M., 2010. AAV vectors avoid inflammatory signals necessary to render transduced hepatocyte targets for destructive T cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 977–982.
- Song, S., Morgan, M., Ellis, T., Poirier, A., Chesnut, K., Wang, J., Brantly, M., Muzyczka, N., Byrne, B.J., Atkinson, M., Flotte, T.R., 1998. Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14384–14388.
- Staunstrup, N.H., Mikkelsen, J.G., 2011. Integrase-defective lentiviral vectors--a stage for nonviral integration machineries. *Curr. Gene Ther.* 11, 350–362.
- Stein, S., Ott, M.G., Schultze-Strasser, S., Jauch, A., Burwinkel, B., Kinner, A., Schmidt, M., Krämer, A., Schwäble, J., Glimm, H., Koehl, U., Preiss, C., Ball, C., Martin, H., Göhring, G., Schwarzwaelder, K., Hofmann, W.-K., Karakaya, K., Tchatchou, S., Yang, R., Reinecke, P., Kühlcke, K., Schlegelberger, B., Thrasher, A.J., Hoelzer, D., Seger, R., von Kalle, C., Grez, M., 2010. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat. Med.* 16, 198–204.
- Stoddard, B.L., 2011. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Struct. Lond. Engl.* 1993 19, 7–15.
- Stone, D., Kiem, H.-P., Jerome, K.R., 2013. Targeted gene disruption to cure HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS.*
- Strassburg, C.P., 2010. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24, 555–571.
- Strauss, K.A., Robinson, D.L., Vreman, H.J., Puffenberger, E.G., Hart, G., Morton, D.H., 2006. Management of hyperbilirubinemia and prevention of kernicterus in 20 patients with Crigler-Najjar disease. *Eur. J. Pediatr.* 165, 306–319.
- Suda, T., Suda, K., Liu, D., 2008. Computer-assisted hydrodynamic gene delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 1098–1104.
- Sugatani, J., 2012. Function, genetic polymorphism, and transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1. *Drug Metab. Pharmacokinet.*
- Summerford, C., Samulski, R.J., 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* 72, 1438–1445.
- Sung, Y.H., Kim, J.M., Kim, H.-T., Lee, J., Jeon, J., Jin, Y., Choi, J.-H., Ban, Y.H., Ha, S.-J., Kim, C.-H., Lee, H.-W., Kim, J.-S., 2013. Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. *Genome Res.*
- Szcepek, M., Brondani, V., Büchel, J., Serrano, L., Segal, D.J., Cathomen, T., 2007. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 25, 786–793.

- Szymczak, A.L., Vignali, D.A.A., 2005. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 627–638.
- Tabarki, B., Khalifa, M., Yacoub, M., Tlili, K., Essoussi, A.S., 2002. Cerebellar symptoms heralding bilirubin encephalopathy in Crigler-Najjar syndrome. *Pediatr. Neurol.* 27, 234–236.
- Tada, K., Roy-Chowdhury, N., Prasad, V., Kim, B.H., Manchikalapudi, P., Fox, I.J., van Duijvendijk, P., Bosma, P.J., Roy-Chowdhury, J., 1998. Long-term amelioration of bilirubin glucuronidation defect in Gunn rats by transplanting genetically modified immortalized autologous hepatocytes. *Cell Transplant.* 7, 607–616.
- Takasu, Y., Sajwan, S., Daimon, T., Osanai-Futahashi, M., Uchino, K., Sezutsu, H., Tamura, T., Zurovec, M., 2013. Efficient TALEN Construction for *Bombyx mori* Gene Targeting. *PLoS One* 8, e73458.
- Takeuchi, R., Lambert, A.R., Mak, A.N.-S., Jacoby, K., Dickson, R.J., Gloor, G.B., Scharenberg, A.M., Edgell, D.R., Stoddard, B.L., 2011. Tapping natural reservoirs of homing endonucleases for targeted gene modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13077–13082.
- Taubes, G., 2002. Gene therapy. The strange case of chimeraplasty. *Science* 298, 2116–2120.
- Tay, F.C., Tan, W.K., Goh, S.-L., Ramachandra, C.J.A., Lau, C.-H., Zhu, H., Chen, C., Du, S., Phang, R.Z., Shahbazi, M., Fan, W., Wang, S., 2013. Targeted transgene insertion into the AAVS1 locus driven by baculoviral vector-mediated zinc finger nuclease expression in human-induced pluripotent stem cells. *J. Gene Med.* 15, 384–395.
- Tazawa, H., Kagawa, S., Fujiwara, T., 2013. Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 13, 1569–1583.
- Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Leung, E., Niles, B.J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A.I., Meng, X., Zhang, L., Gregory, P.D., Anegon, I., Cost, G.J., 2011. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat. Biotechnol.* 29, 695–696.
- The Zinc Finger Consortium [WWW Document] URL <http://www.zincfingers.org/> (accessed 11.30.13).
- Thummala, N.R., Ghosh, S.S., Lee, S.W., Reddy, B., Davidson, A., Horwitz, M.S., Chowdhury, J.R., Chowdhury, N.R., 2002. A non-immunogenic adenoviral vector, coexpressing CTLA4Ig and bilirubin-uridine-diphosphoglucuronateglucuronosyltransferase permits long-term, repeatable transgene expression in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome. *Gene Ther.* 9, 981–990.
- Thyagarajan, B., Cruise, J.L., Campbell, C., 1996a. Elevated levels of homologous DNA recombination activity in the regenerating rat liver. *Somat. Cell Mol. Genet.* 22, 31–39.
- Thyagarajan, B., McCormick-Graham, M., Romero, D.P., Campbell, C., 1996b. Characterization of homologous DNA recombination activity in normal and immortal mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 24, 4084–4091.
- Tian, Y., Wang, L., Lin, J., Zhang, X., Zhang, N., He, S., Huang, J., Jia, B., Liu, M., 2013. Expression of 2A peptide mediated tri-fluorescent protein genes were regulated by epigenetics in transgenic sheep. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Toietta, G., Mane, V.P., Norona, W.S., Finegold, M.J., Ng, P., McDonagh, A.F., Beaudet, A.L., Lee, B., 2005. Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3930–3935.
- Toromanoff, A., Adjali, O., Larcher, T., Hill, M., Guigand, L., Chenuaud, P., Deschamps, J.-Y., Gauthier, O., Blancho, G., Vanhove, B., Rolling, F., Chérel, Y., Moullier, P., Anegon, I., Le Guiner, C., 2010. Lack of immunotoxicity after regional intravenous (RI) delivery of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 151–160.
- Tran, Liu, X., Yan, Z., Abbote, D., Jiang, Q., Kmiec, E.B., Sigmund, C.D., Engelhardt, J.F., 2003. Efficiency of chimeraplast gene targeting by direct nuclear injection using a GFP recovery assay. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 7, 248–253.
- Trapani, I., Colella, P., Sommella, A., Iodice, C., Cesi, G., De Simone, S., Marrocco, E., Rossi, S., Giunti, M., Palfi, A., Jane Farrar, G., Polishchuk, R., Auricchio, A., 2013. Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol. Med.*
- Tremblay, J.P., Xiao, X., Aartsma-Rus, A., Barbas, C., Blau, H.M., Bogdanove, A.J., Boycott, K., Braun, S., Breakefield, X.O., Bueren, J.A., Buschmann, M., Byrne, B.J., Calos, M., Cathomen, T., Chamberlain, J., Chuah, M., Cornetta, K., Davies, K.E., Dickson, J.G., Duchateau, P., Flotte, T.R., Gaudet, D., Gersbach, C.A., Gilbert, R., Glorioso, J., Herzog, R.W., High, K.A., Huang, W., Huard, J., Joung, J.K., Liu, D., Liu, D., Lochmüller, H., Lustig, L., Martens, J., Massie, B., Mavilio, F., Mendell, J.R., Nathwani, A., Ponder, K., Porteus, M., Puymirat, J., Samulski, J.,

- Takeda, S., Thrasher, A., VandenDriessche, T., Wei, Y., Wilson, J.M., Wilton, S.D., Wolfe, J.H., Gao, G., 2013. Translating the Genomics Revolution: The Need for an International Gene Therapy Consortium for Monogenic Diseases. *Mol. Ther.* 21, 266–268.
- Trobridge, G., Hirata, R.K., Russell, D.W., 2005. Gene Targeting by Adeno-Associated Virus Vectors Is Cell-Cycle Dependent. *Hum. Gene Ther.* 16, 522–526.
- Trobridge, G.D., 2011. Genotoxicity of retroviral hematopoietic stem cell gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 581–593.
- Trobridge, G.D., Wu, R.A., Hansen, M., Ironside, C., Watts, K.L., Olsen, P., Beard, B.C., Kiem, H.-P., 2010. Cocal-pseudotyped lentiviral vectors resist inactivation by human serum and efficiently transduce primate hematopoietic repopulating cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 725–733.
- Tsai, T.-L., Shieh, D.-B., Yeh, C.-S., Tzeng, Y., Htet, K., Chuang, K.-S., Hwu, J.R., Su, W.-C., 2010. The down regulation of target genes by photo activated DNA nanoscissors. *Biomaterials* 31, 6545–6554.
- Tsuchiya, H., Harashima, H., Kamiya, H., 2005. Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA. *J. Gene Med.* 7, 486–493.
- Uchida, N., Hanawa, H., Yamamoto, M., Shimada, T., 2013. The chicken HS4 core insulator blocks promoter interference in lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther. Methods.*
- Uhde-Stone, C., Gor, N., Chin, T., Huang, J., Lu, B., 2013. A do-it-yourself protocol for simple transcription activator-like effector assembly. *Biol. Proced. Online* 15, 3.
- Urbiola, K., García, L., Zalba, S., Garrido, M.J., Tros de Ilarduya, C., 2013. Efficient serum-resistant lipopolyplexes targeted to the folate receptor. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV 83*, 358–363.
- Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.-L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D., Holmes, M.C., 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435, 646–651.
- Valton, J., Daboussi, F., Leduc, S., Redondo, P., Molina, R., Macmaster, R., Paques, F., Montoya, G., Duchateau, P., 2012. CpG Methylation Impacts the Activity of Natural and Engineered Meganucleases. *J. Biol. Chem.*
- Van der Steege, G., Schuilenga-Hut, P.H., Buys, C.H., Scheffer, H., Pas, H.H., Jonkman, M.F., 2001. Persistent failures in gene repair. *Nat. Biotechnol.* 19, 305–306.
- Van Dijk, R., Montenegro-Miranda, P., Riviere, C., Schilderink, R., Ten Bloemendaal, L., van Gorp, J., Duijst, S., de Waart, D.R., Beuers, U., Haisma, H.J., Bosma, P.J., 2013. Polyinosinic acid blocks adeno-associated virus macrophage endocytosis in vitro and enhances adeno-associated virus liver directed gene therapy in vivo. *Hum. Gene Ther. Methods.*
- Van Rensburg, R., Beyer, I., Yao, X.-Y., Wang, H., Denisenko, O., Li, Z.-Y., Russell, D.W., Miller, D.G., Gregory, P., Holmes, M., Bomszyk, K., Lieber, A., 2012. Chromatin structure of two genomic sites for targeted transgene integration in induced pluripotent stem cells and hematopoietic stem cells. *Gene Ther.*
- Vandenberghe, L.H., Wang, L., Somanathan, S., Zhi, Y., Figueredo, J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Desai, R.A., Chen, C.S., Johnston, J., Grant, R.L., Gao, G., Wilson, J.M., 2006. Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. *Nat. Med.* 12, 967–971.
- Vandenberghe, L.H., Wilson, J.M., Gao, G., 2009. Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy. *Gene Ther.* 16, 311–319.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiappesi, F., Ceccherini-Nelli, L., Pistello, M., 2013. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* 36, 1–22.
- Vasquez, K.M., Narayanan, L., Glazer, P.M., 2000. Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. *Science* 290, 530–533.
- Vassaux, G., Martin-Duque, P., 2004. Use of suicide genes for cancer gene therapy: study of the different approaches. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4, 519–530.
- Viola, J.R., El-Andaloussi, S., Oprea, I.I., Smith, C.I.E., 2010. Non-viral nanovectors for gene delivery: factors that govern successful therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 721–735.
- Vispe, S., Cazaux, C., Lesca, C., Defais, M., 1998. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* 26, 2859–2864.

- Voigt, K., Gogol-Döring, A., Miskey, C., Chen, W., Cathomen, T., Izsvák, Z., Ivics, Z., 2012. Retargeting sleeping beauty transposon insertions by engineered zinc finger DNA-binding domains. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 1852–1862.
- Waddington, S.N., Buckley, S.M.K., Nivsarkar, M., Jezard, S., Schneider, H., Dahse, T., Kemball-Cook, G., Miah, M., Tucker, N., Dallman, M.J., Themis, M., Coutelle, C., 2003. In utero gene transfer of human factor IX to fetal mice can induce postnatal tolerance of the exogenous clotting factor. *Blood* 101, 1359–1366.
- Waldman, B.C., O’Quinn, J.R., Waldman, A.S., 1996. Enrichment for gene targeting in mammalian cells by inhibition of poly(ADP-ribosylation). *Biochim. Biophys. Acta* 1308, 241–250.
- Wang, G., Slepushkin, V., Zabner, J., Keshavjee, S., Johnston, J.C., Sauter, S.L., Jolly, D.J., Dubensky, T.W., Jr, Davidson, B.L., McCray, P.B., Jr, 1999. Feline immunodeficiency virus vectors persistently transduce nondividing airway epithelia and correct the cystic fibrosis defect. *J. Clin. Invest.* 104, R55–62.
- Wang, H., Hu, Y.-C., Markoulaki, S., Welstead, G.G., Cheng, A.W., Shivalila, C.S., Pyntikova, T., Dadon, D.B., Voytas, D.F., Bogdanove, A.J., Page, D.C., Jaenisch, R., 2013. TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. *Nat. Biotechnol.* advance online publication.
- Wang, J., Friedman, G., Doyon, Y., Wang, N.S., Li, C.J., Miller, J.C., Hua, K.L., Yan, J.J., Babiarz, J.E., Gregory, P.D., Holmes, M.C., 2012. Targeted gene addition to a predetermined site in the human genome using a ZFN-based nicking enzyme. *Genome Res.*
- Wang, L., Calcedo, R., Wang, H., Bell, P., Grant, R., Vandenberghe, L.H., Sanmiguel, J., Morizono, H., Batshaw, M.L., Wilson, J.M., 2010a. The pleiotropic effects of natural AAV infections on liver-directed gene transfer in macaques. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 126–134.
- Wang, L., Wang, H., Bell, P., McCarter, R.J., He, J., Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Morizono, H., Batshaw, M.L., Wilson, J.M., 2010b. Systematic evaluation of AAV vectors for liver directed gene transfer in murine models. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 118–125.
- Wang, W., Li, W., Ma, N., Steinhoff, G., 2013. Non-viral gene delivery methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 14, 46–60.
- Wang, X., Sarkar, D.P., Mani, P., Steer, C.J., Chen, Y., Guha, C., Chandrasekhar, V., Chaudhuri, A., Roy-Chowdhury, N., Kren, B.T., Roy-Chowdhury, J., 2009. Long-term reduction of jaundice in Gunn rats by nonviral liver-targeted delivery of Sleeping Beauty transposon. *Hepatology* 50, 815–824.
- Wanisch, K., Yáñez-Muñoz, R.J., 2009. Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1316–1332.
- Watson, J.D., Crick, F.H., 1953. The structure of DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 18, 123–131.
- Weatherall, D., 1994. Heroic gene surgery. *Nat. Genet.* 6, 325–326.
- Webb, L., Miles, K., Kessler, F., Ritter, J.K., 2006. Activity of rat UGT1A1 towards benzo[a]pyrene phenols and dihydrodiols. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 224–230.
- Webber, E.M., Godowski, P.J., Fausto, N., 1994. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology* 19, 489–497.
- Weber, Stone, D., Jerome, K.R., 2013. TALENs Targeting HBV: Designer Endonuclease Therapies for Viral Infections. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 1819–1820.
- Wegen, P. van der, Louwen, R., Imam, A.M., Buijs-Offerman, R.M., Sinaasappel, M., Grosveld, F., Scholte, B.J., 2006. Successful Treatment of UGT1A1 Deficiency in a Rat Model of Crigler-Najjar Disease by Intravenous Administration of a Liver-Specific Lentiviral Vector. *Mol. Ther.* 13, 374–381.
- Wei, Q., Shen, Y., Chen, X., Shifman, Y., Ellis, R.E., 2013. Rapid creation of forward-genetics tools for *C. briggsae* using TALENs: lessons for non-model organisms. *Mol. Biol. Evol.*
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., Doudna, J.A., 2012. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482, 331–338.
- Wilke, M., Bijma, A., Timmers-Reker, A.J., Scholte, B.J., Sinaasappel, M., 1997. Complementation of the genetic defect in Gunn rat hepatocytes in vitro by highly efficient gene transfer with cationic liposomes. *Gene Ther.* 4, 1305–1312.
- Wilson, J.M., 2005. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum. Gene Ther.* 16, 1014–1015.

- Wirth, T., Parker, N., Ylä-Herttuala, S., 2013. History of gene therapy. *Gene* 525, 162–169.
- Wisse, E., Jacobs, F., Topal, B., Frederik, P., De Geest, B., 2008. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther.* 15, 1193–1199.
- Woods, N.-B., Bottero, V., Schmidt, M., von Kalle, C., Verma, I.M., 2006. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* 440, 1123.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., Burgess, S.M., 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749–1751.
- Wursthorn, K., Storm, T., Kay, M.A., Finegold, M., Grompe, M., 2006. 804. In Vivo Correction of a Metabolic Liver Disease by AAV8-Mediated Homologous Recombination. *Mol. Ther.* 13, S311–S312.
- Xiao, W., Berta, S.C., Lu, M.M., Moscioni, A.D., Tazelaar, J., Wilson, J.M., 1998. Adeno-associated virus as a vector for liver-directed gene therapy. *J. Virol.* 72, 10222–10226.
- Xie, D., Li, Y., Reed, E.A., Odronic, S.I., Kontos, C.D., Annex, B.H., 2006. An engineered vascular endothelial growth factor-activating transcription factor induces therapeutic angiogenesis in ApoE knockout mice with hindlimb ischemia. *J. Vasc. Surg. Off. Publ. Soc. Vasc. Surg. Int. Soc. Cardiovasc. Surg. North Am.* Chapter 44, 166–175.
- Yajima, H., Fujisawa, H., Nakajima, N.I., Hirakawa, H., Jeggo, P.A., Okayasu, R., Fujimori, A., 2013. The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. *DNA Repair.*
- Yan, W., Smith, C., Cheng, L., 2013. Expanded activity of dimer nucleases by combining ZFN and TALEN for genome editing. *Sci. Rep.* 3, 2376.
- Yan, Z., Lei-Butters, D.C.M., Zhang, Y., Zak, R., Engelhardt, J.F., 2007. Hybrid adeno-associated virus bearing nonhomologous inverted terminal repeats enhances dual-vector reconstruction of minigenes in vivo. *Hum. Gene Ther.* 18, 81–87.
- Yan, Z., Zak, R., Zhang, Y., 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.
- Yáñez, R.J., Porter, A.C., 1999. Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRAD51. *Gene Ther.* 6, 1282–1290.
- Yáñez, R.J., Porter, A.C.G., 2002. Differential effects of Rad52p overexpression on gene targeting and extrachromosomal homologous recombination in a human cell line. *Nucleic Acids Res.* 30, 740–748.
- Yáñez-Muñoz, R.J., Balaggan, K.S., MacNeil, A., Howe, S.J., Schmidt, M., Smith, A.J., Buch, P., MacLaren, R.E., Anderson, P.N., Barker, S.E., Duran, Y., Bartholomae, C., von Kalle, C., Heckenlively, J.R., Kinnon, C., Ali, R.R., Thrasher, A.J., 2006. Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat. Med.* 12, 348–353.
- Yang, B., Sugio, A., White, F.F., 2006. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 10503–10508.
- Yang, L., Guell, M., Byrne, S., Yang, J.L., De Los Angeles, A., Mali, P., Aach, J., Kim-Kiselak, C., Briggs, A.W., Rios, X., Huang, P.-Y., Daley, G., Church, G., 2013. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res.* 41, 9049–9061.
- Yang, S., Cohen, C.J., Peng, P.D., Zhao, Y., Cassard, L., Yu, Z., Zheng, Z., Jones, S., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A., Morgan, R.A., 2008. Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther.* 15, 1411–1423.
- Yanik, M., Alzubi, J., Lahaye, T., Cathomen, T., Pingoud, A., Wende, W., 2013. TALE-PvuII Fusion Proteins - Novel Tools for Gene Targeting. *PLoS One* 8, e82539.
- Ylä-Herttuala, S., 2012a. The need for increased clarity and transparency in the regulatory pathway for gene medicines in the European Union. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 471–472.
- Ylä-Herttuala, S., 2012b. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 1831–1832.
- Yohannan, M.D., Terry, H.J., Littlewood, J.M., 1983. Long term phototherapy in Crigler-Najjar syndrome. *Arch. Dis. Child.* 58, 460–462.

- Yoon, K., Igoucheva, O., Alexeev, V., 2002. Expectations and reality in gene repair. *Nat. Biotechnol.* 20, 1197–1198.
- You, Z., Bailis, J.M., 2010. DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol.*
- Younossi, Z.M., Foroozan, P., 1995. Treatment of Crigler-Najjar type II with small-dose phenobarbital. *Dig. Dis. Sci.* 40, 575–575.
- Yu, J., Lei, L., Liang, Y., Hinh, L., Hickey, R.P., Huang, Y., Liu, D., Yeh, J.L., Rebar, E., Case, C., Spratt, K., Sessa, W.C., Giordano, F.J., 2006. An engineered VEGF-activating zinc finger protein transcription factor improves blood flow and limb salvage in advanced-age mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 479–481.
- Yun, M.H., Hiom, K., 2009. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 459, 460–463.
- Yusa, K., Rashid, S.T., Strick-Marchand, H., Varela, I., Liu, P.-Q., Paschon, D.E., Miranda, E., Ordonez, A., Hannan, N.R.F., Rouhani, F.J., Darche, S., Alexander, G., Marciniak, S.J., Fusaki, N., Hasegawa, M., Holmes, M.C., Di Santo, J.P., Lomas, D.A., Bradley, A., Vallier, L., 2011. Targeted gene correction of [agr]1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature advance online publication.*
- Zaiss, A.K., Muruve, D.A., 2008. Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther.* 15, 808–816.
- Zhang, C., Wang, Q.-T., Liu, H., Zhang, Z.-Z., Huang, W.-L., 2011. Advancement and prospects of tumor gene therapy. *Chin. J. Cancer* 30, 182–188.
- Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G.M., Arlotta, P., 2011. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat. Biotechnol.* 29, 149–153.
- Zhang, G., Budker, V., Wolff, J.A., 1999. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* 10, 1735–1737.
- Zhang, S., Joseph, G., Pollok, K., Berthoux, L., Sastry, L., Luban, J., Cornetta, K., 2006. G2 cell cycle arrest and cyclophilin A in lentiviral gene transfer. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 14, 546–554.
- Zhang, X., Wang, X., Zhao, D., Meng, X., Zhao, X., Yu, X., Kong, W., 2011. Design and immunogenicity assessment of HIV-1 virus-like particles as a candidate vaccine. *Sci. China Life Sci.* 54, 1042–1047.
- Zhang, Z., Zhang, S., Huang, X., Orwig, K.E., Sheng, Y., 2013. Rapid Assembly of Customized TALENs into Multiple Delivery Systems. *PloS One* 8, e80281.
- Zimmerman, K.A., Fischer, K.P., Joyce, M.A., Tyrrell, D.L.J., 2008. Zinc finger proteins designed to specifically target duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA inhibit viral transcription in tissue culture. *J. Virol.* 82, 8013–8021.
- Zou, J., Mali, P., Huang, X., Dowey, S.N., Cheng, L., 2011a. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood* 118, 4599–4608.
- Zou, J., Sweeney, C.L., Chou, B.-K., Choi, U., Pan, J., Wang, H., Dowey, S.N., Cheng, L., Malech, H.L., 2011b. Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood* 117, 5561–5572.
- Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D., Hope, T.J., 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* 73, 2886–2892.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., Trono, D., 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72, 9873–9880.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., Trono, D., 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* 15, 871–875.
- Zychlinski, D., Schambach, A., Modlich, U., Maetzig, T., Meyer, J., Grassman, E., Mishra, A., Baum, C., 2008. Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 718–725.

**Mise au point de stratégies d'édition de gène à l'aide d'endonucléases artificielles  
pour le traitement des hépatopathies héréditaires :  
application à la maladie de Crigler Najjar de type I**

La maladie de Crigler Najjar de type I est une maladie métabolique du foie due à un déficit total en UDP-glucuronosyl transférase A1 (UGT1A1). Chez les patients, Dans cette maladie, une mutation du gène codant l'enzyme UGT1A1 entraîne une hyperbilirubinémie non conjuguée responsable d'un ictère. Le traitement actuel repose sur une photothérapie, voire une transplantation hépatique. Cette maladie représente un paradigme pour la thérapie génique des maladies héréditaires du foie. Une guérison du modèle animal spontané de CNI, le rat Gunn, a été obtenue par thérapie génique d'addition avec des vecteurs viraux. Cependant, ces approches présentent notamment le risque potentiel de mutagenèse insertionnelle. Ces inconvénients font apparaître l'intérêt du développement de nouvelles approches de thérapie génique ciblée. Les nucléases à doigts de zinc (ZFNs) et les Transcription Activator-like Effectors Nucleases permettent la modification du génome à façon par correction génique notamment. La première partie de la thèse a consisté à développer un système de vectorisation virale de ZFNs avec des vecteurs lentiviraux et AAV. Dans un second temps, nous avons utilisé les outils développés pour mettre au point une stratégie de réparation génique *in vivo* de l'UGT1A1 chez le rat Gunn. Cette stratégie a permis une correction subthérapeutique de la bilirubinémie. Ce projet a démontré la faisabilité d'une stratégie de thérapie génique ciblée pour les maladies héréditaires du foie. Cela offre de nouvelles possibilités de thérapie génique avec une meilleure spécificité et une amélioration de la biosécurité.

*Mots-clés : thérapie génique, endonucléases artificielles, maladies métaboliques du foie, Zinc Finger Nucléases, Rat Gunn, Crigler Najjar, réparation génique, vecteur viral*

**Development of gene editing strategies using artificial endonucleases  
for the treatment of liver inherited diseases: application to Crigler Najjar type I disease**

Crigler Najjar type 1 (CNI) disease is a liver metabolic inherited disease due to UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) enzyme deficiency. The patients have a mutation into the UGT1A1 gene responsible for an unconjugated hyperbilirubinemia that lead to an icterus. They are treated with phototherapy and liver transplantation. CNI is a paradigm for liver inherited diseases. Gene therapy represents a new hope for the treatment of such diseases. Lifelong cure of the Gunn rat model of CNI has been obtained through gene therapy with viral vectors. However, there are still drawbacks, such as risks of insertional mutagenesis. Thus, it is important to develop strategies of targeted gene therapy. Zinc Finger Nucleases (ZFNs) and Transcription Activator-like Effectors Nucleases (TALENs) allow targeted genome editing, through gene repair for example. They induce a specific DNA double strand break that promotes the insertion of an exogenous custom DNA donor through homologous recombination. The first part of this thesis consisted in the development of lentiviral and AAV vectors to deliver a whole ZFNs pair. The second part consisted in using these tools for *in vivo* gene repair in the Gunn rat. We showed that the endogenous mutation of UGT1A1 gene in the Gunn rat can be repaired *in vivo* at a level sufficient to obtain a subtherapeutic effect. Such recent strategies may offer safer therapeutic options to treat inherited monogenic diseases.

*Keywords: gene therapy, artificial endonucléases, liver inherited diseases, Zinc Finger Nucleases, Gunn rat, Crigler Najjar, gene repair, viral vector*

ABARRATEGUI PONTES Cécilia  
7 route de Tylen  
56400 PLOUGOUMELLEN