

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

Évaluation de vecteurs associés à l'adénovirus  
recombinant (AAVr) pour le traitement par thérapie  
génique de modèles canins de l'amaurose  
congénitale de Leber : le teckel RPGRIP1 déficient  
et le briard RPE65 déficient.

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Biologie Santé  
Discipline : Biologie-Médecine-Santé  
Spécialité : Transfert de gène et thérapie génique

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Elsa MOUGENOT-LHERITEAU**

*le 4/02/2010, devant le jury ci-dessous*

*Président du jury*

*Pr Nicolas Ferry*

*Rapporteurs*

*Dr Aziz El-Amraoui  
Dr Guy Lenaers*

*Directeur de thèse*

*Dr Fabienne Rolling*

# Abréviations

AAV : Adeno-associated virus

AAVr : AAV recombinant

ABCT : ATP-binding cassette transporter

ACL : amaurose congénitale de Leber

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AFK : actine fragmine kinase

AIF : apoptosis inducing factor

AIPL1 : aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1

ARN : acide ribonucléique

BBS : Bardet Biedel syndrome

Bcl : B cell lymphoma

BDNF : brain derived neurotrophic factor

BIR : baculoviral IAP repeat

CC : cil connecteur

CDNF : conserved dopamine neurotrophic factor

CGM : cellule ganglionnaire de Müller

cGPM : GMP cyclique

CHOP : C/EBP homologous protein

CMV : cytomégalovirus

CNE : couche nucléaire externe

CNG : cGMP-gated channel

CNGB3 : cyclic nucleotide gated channel beta-3

CNI : couche nucléaire interne

CNTF : ciliary neurotrophic factor

CPE : couche plexiforme externe

CPFL3 : cone photoreceptor function loss 3

CPI : couche plexiforme interne

CRALBP : cellular retinaldehyde binding protein

CRBP : cellular retinoid binding protein

DD : death domain

DED : death effector domain

DISC : death-inducing signaling complex

DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge



Dox : doxycycline  
EPO : érythropoïétine  
EPR : épithélium pigmentaire rétinien  
FADD : Fas associated death domain  
FGFR : fibroblast growth factor receptor  
FLIP : Flice-inhibitory protein  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GC : guanylate cyclase  
GEF : facteurs d'échange du nucléotide Guanine  
GMP : guanosine monophosphate  
GNAT2 : guanine nucleotide alpha transducin-2  
HEK : human embryonic kidney cells  
HGFR : hepatocyte growth factor receptor  
HSV : herpes simplex virus  
IAP : inhibitor of apoptosis proteins  
IFT : intraflagellar transport  
IGF : insulin-like growth factor  
IMH : isomérohydrolase  
IRBP : interphotoreceptor retinoid binding protein  
ITR : inverted terminal repeats  
JNK : cJun N-terminal kinase  
KAP : kinesin associated polypeptide  
kb : kilo base  
kDa : kilo dalton  
KO : knock-out  
LAV : laboratoire d'amplification des vecteurs  
LRAT : lecithin retinol acyltransferase  
LTG : laboratoire de thérapie génique (INSERM UMR 649)  
MAPK : mitogen activated proteins kinases  
MERTK : C-mer proto-oncogene tyrosine kinase  
MMP : mitochondrial membrane permeabilisation  
MTOC : microtubule organization center  
ND : nuclear domain  
NGF : nerve growth factor  
NLS : nuclear localization signal  
NPC : nuclear pore complex  
NPHP4/6 : nephronocystine-4/6

Oa1 : ocular albinism type 1  
ORF : open reading frame  
pb : paires de bases  
PDE : phosphodiesterase  
PDGFR : platelet-derived growth factor receptor  
PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase  
PR : photorécepteur  
PROML1 : prominin-like 1  
Prph2 : périphérine 2  
RanBP2 : Ran binding protein 2  
RBP : retinoid binding protein  
RCC1 : Regulator of Chromosome Condensation 1  
RCS : Royal College of Surgeons  
RD : rétinopathie diabétique  
R&D : recherche et développement  
RDH : retinol déshydrogénase  
RE : réticulum endoplasmique  
RetGC1/GUCY2D : retinal guanylate cyclase 1  
RGR : RPE-retinal G protein coupled receptor  
RHD : RCC1-homologous domain  
RID : RPGR interacting domain  
Rk : rhodopsine kinase  
ROM1 : retinal outer segment membrane protein 1  
ROS : reactive oxygen species  
RP : rétinite pigmentaire  
RPE65 : Retinal Pigment Epithelium derived protein of 65kDa  
RPGR : retinitis pigmentosa GTPase regulator  
RPGRIP1 : RPGR interacting protein 1  
RPGRIP1-L : RPGRIP1-like  
Rs1h : gène muté dans la rétinopathie juvénile  
Smac1 : second mitochondria-derived activator of caspase 1  
Diablo : Direct IAP Binding protein with Low pI  
SMC/CC : structural maintenance of chromosome/coiled-coil motif  
SNC : système nerveux central  
Tet : tétracycline  
TNF : tumor necrosis factor  
TNFR : TNF receptor

TRADD : TNF receptor associated death domain

TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand

TUBG1 : gamma tubuline

wt : wild type

WPRE : woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element

XLIAP : X-linked IAP

# Illustrations

Figure 1 : Structure de l'œil. ....	7
Figure 2 : Structure de la rétine. ....	9
Figure 3 : Structure des photorécepteurs. ....	13
Figure 4 : Structure du cil connecteur. ....	16
Figure 5 : Les moteurs du transport intraflagellaire. ....	17
Figure 6 : Synthèse de l'axonème. ....	18
Figure 7 : Les complexes polypeptidiques ou particules d'IFT. ....	19
Figure 8 : Le transport intraflagellaire. ....	21
Figure 9 : La cascade de phototransduction. ....	23
Figure 10 : Le cycle des rétinoïdes. ....	25
Figure 11 : Les mécanismes de l'apoptose. ....	32
Figure 12 : Rôle du facteur de transcription RCC1. ....	40
Figure 13 : Le facteur de transcription GAL4. ....	43
Figure 14 : Le criblage double-hybride. ....	44
Figure 15 : Structure du gène RPGRIP1. ....	48
Figure 16 : Structure génomique de l'AAV2 wt. ....	59
Figure 17 : Cycle de vie de l'AAVwt. ....	64
Figure 18 : Structure génomique AAVwt / AAVr. ....	66
Figure 19 : Production d'AAVr par co-transfection. ....	67
Figure 20 : Devenir du génome recombinant de l'AAV dans la cellule hôte. ....	74
Figure 21 : Structure du promoteur Rhodopsine kinase humain. ....	79
Figure 22 : Les promoteurs inductibles TetOn et TetOff. ....	104
Figure 23 : . Fond d'œil de A2 à 2 et 5 mois.....	119
Figure 24 : Vecteurs AAV2/5-Rk-eGFP et AAV2/5-Rk-hRPGRIP1. ....	121
Figure 25 : Tropisme du vecteur AAV2/5-Rk-eGFP chez le rat et le chien.....	123
Figure 26 : Cinétique des profils ERG après injection d' AAV2/5-Rk-hRPGRIP1. ...	124
Figure 27 : Examens cliniques post-opératoires. ....	126
Figure 28 : Stratégie de clonage du gène RPGRIP1 canin. ....	128
Figure 29 : Principe de la RACE-PCR. ....	129
Figure 30 : Séquence nucléotidique (A) et protéique (B) du gène RPGRIP1 canin.	131

Figure 31 : Arbre phylogénétique. ....	133
Figure 32 : Structure génomique de RPGRIP1 chez l'homme, la vache, le chien. .	135
Figure 33 : Western Blot anti-RPGRIP1. ....	137
Figure 34 : (A) Test de liaison <i>in vitro</i> , (B) Interactions RPGRIP1c-RPGR. ....	139
Figure 35 : Force des promoteurs RPE65 et CMV dans les cellules de l'EPR. ....	149
Figure 36 : Le système régulable TetR-KRAB. ....	151
Tableau 1 :Sérotype des AAV, origines, hôtes et récepteurs connus. ....	61
Tableau 2 : Tropisme cellulaire des AAVr dans la rétine après ISR. ....	76
Tableau 3 : Thérapie génique d'addition des dystrophies rétiniennes héréditaires. .	84
Tableau 4 : Structure exons/introns du gène RPGRIP1 canin. ....	132
Tableau 5 : Homologies de séquence des orthologues RPGRIP1. ....	134

# SOMMAIRE

1. Introduction.....	5
1.1. La rétine et les dystrophies rétinienne.....	6
1.1.1. Structure et fonction de la rétine.....	6
1.1.2. Les dystrophies rétinienne.....	26
1.1.3. Dégénérescence des photorécepteurs par apoptose. ....	30
1.2. Le rôle de RPGRIP1.....	39
1.2.1. Structure et fonction de RPGR.....	39
1.2.2. RPGRIP1 : partenaire moléculaire de RPGR. ....	42
1.2.3. Structure et fonction de RPGRIP1.....	45
1.2.4. Localisation cellulaire de RPGR et RPGRIP1.....	51
1.2.5. Individus RPGRIP1 <sup>-/-</sup> : vers un traitement par thérapie génique.....	52
1.2.6. RPGRIP1-Like.....	54
1.3. La thérapie génique utilisant des vecteurs viraux AAV recombinants. ....	56
1.3.1. Généralités sur la thérapie génique.....	56
1.3.2. Les virus adéno-associés (AAV). ....	58
1.3.3. Le transfert de gènes dans la rétine via les AAVr. ....	83
1.4. Régulation de l'expression du transgène grâce au promoteur inductible à la tétracycline. ....	102
1.4.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans le système régulateur dépendant de la tétracycline.....	102
1.4.2. Évaluation du promoteur inductible à la tétracycline dans le muscle squelettique. ....	105
1.4.3. Évaluation du promoteur inductible à la tétracycline dans la rétine.....	107
2. Résultats. ....	111
2.1. Discussion du premier article : « The RPGRIP1 deficient dog, a promising canine model for gene therapy. ».....	115
2.2. Résultats complémentaires : transfert de gène chez le teckel RPGRIP1 <sup>-/-</sup> . ....	120
2.3. Discussion du deuxième article : « Regulation of retinal function but non rescue of vision in RPE65 deficient dogs treated with doxycycline-regulatable AAV vectors.» .....	143
3. Discussion générale. ....	152
4. Annexe. ....	155
5. Références bibliographiques. ....	156

## Préambule

Le travail de cette thèse a été réalisé au Laboratoire de thérapie génique (LTG) de Nantes dans l'unité Inserm UMR 649 dirigée par le Docteur Philippe Moullier, et plus particulièrement dans l'équipe du Docteur Fabienne Rolling qui est la directrice de cette thèse.

La principale thématique de recherche de ce laboratoire est le transfert de gènes à visée thérapeutique dans les maladies génétiques dites orphelines à l'aide de vecteurs recombinants dérivés des virus associés à l'adénovirus (AAV). Le LTG a la particularité de réunir en une même structure les différents maillons de la chaîne allant de la vectorologie fondamentale au développement d'essais cliniques. Pour ceci, le laboratoire est divisé en plusieurs départements. Le département Recherche et Développement (R&D) travaille sur l'élaboration et l'amélioration des procédés de production et de purification permettant de générer des vecteurs AAV recombinants (AAVr) de façon efficace et sûre. Le Laboratoire d'Amplification des Vecteurs viraux (LAV) est une plateforme de production qui délivre des lots d'AAVr aux équipes de recherche du LTG mais aussi à des partenaires extérieurs. Les techniques utilisées dans le LAV sont directement issues des avancées du département R&D. Les équipes de recherche travaillent sur différentes thématiques toutes liées au transfert de gène thérapeutique. L'équipe dirigée par le docteur Fabienne Rolling s'intéresse au transfert de gènes dans la rétine dans le cadre de dystrophies rétiniennes héréditaires tandis que l'équipe dirigée par le professeur Philippe Moullier s'intéresse au devenir des AAVr suite au transfert de gène et aux réactions immunitaires associées à ces transferts de gène. L'étroite collaboration du LTG avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes et le Centre de thérapie génique et cellulaire de Boisbonne, rend les essais pré-cliniques effectués sur les petits et gros animaux possibles. Enfin la collaboration avec le CHU de Nantes pour le recrutement des patients, et le développement d'une nouvelle structure (Atlantique Bio GMP, Saint Herblain) habilitée à produire des lots de vecteurs de qualité clinique, permettront de passer des animaux aux patients dans les mois qui viennent (essai clinique RPE65).

Les vecteurs recombinants adéno-associés sont connus depuis de nombreuses années pour transduire efficacement un grand nombre de tissus dont la rétine. L'existence de différents sérotypes pour les AAVr permet de cibler spécifiquement certaines cellules de

la rétine. Chez les animaux de grande taille, plusieurs études ont montré que l'expression du transgène thérapeutique dans la rétine était stable dans le temps.

À ce jour, le laboratoire dispose de plusieurs modèles canins de dystrophie rétinienne héréditaire : le mini teckel à poils longs  $RPGRIP1^{-/-}$  et le briard  $RPE65^{-/-}$ , tous deux atteints d'amaurose congénitale de Leber.

Dans la première partie de cette thèse, nous souhaitons évaluer l'efficacité d'un vecteur associé à l'adénovirus (AAV) recombinant pour le traitement par thérapie génique du teckel  $RPGRIP1^{-/-}$ . Ce projet a été initié lors de mon arrivée au laboratoire en septembre 2005 (stage de Master 2). Le mini teckel à poils longs portant une mutation dans le gène  $RPGRIP1$ , étant un modèle animal rare et extrêmement récent (caractérisation de la mutation en 2006), la première partie de ce projet a consisté à caractériser l'évolution de la pathologie chez ce chien dans le but de déterminer une fenêtre thérapeutique de traitement. La seconde partie de ce travail a été consacrée au développement d'un vecteur AAV recombinant ciblant spécifiquement les photorécepteurs rétinien, grâce à l'utilisation d'un gène rapporteur. Lorsque le tropisme du vecteur a été validé chez le petit et le gros animal, le gène rapporteur a été remplacé par l'ADN complémentaire (ADNc) du gène  $RPGRIP1$  humain et le vecteur thérapeutique a été testé chez le teckel  $RPGRIP1$  déficient. Les résultats n'étant pas concluants, nous avons alors décidé de cloner l'ADNc du gène canin  $RPGRIP1$  dans le but de l'introduire dans un vecteur thérapeutique. Plusieurs vecteurs portant l'ADNc  $RPGRIP1$  canin ont été construits et produits puis ils ont été injectés chez le teckel  $RPGRIP1$  déficient. Les deux chiens ayant reçu des injections sous-rétiniennes de vecteurs portant l'ADNc  $RPGRIP1$  canin sont actuellement suivis cliniquement.

Le projet de recherche pré-clinique concernant l'évaluation d'un AAV4 pour le traitement par thérapie génique du briard  $RPE65^{-/-}$ , a été initié au laboratoire il y a plusieurs années et a déjà fait l'objet d'une thèse de sciences publiée et soutenue par le Docteur Guylène Le Meur. Ces travaux, aboutissant à la restauration de la vision à long terme chez les briards, font aujourd'hui l'objet du développement d'un essai clinique dont les principaux investigateurs sont le Docteur Fabienne Rolling, coordinatrice scientifique (LTG) et le Professeur Michel Weber, investigateur principal (Service d'ophtalmologie, CHU de Nantes).

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression du transgène  $RPE65$  dans la rétine du briard  $RPE65^{-/-}$  au moyen d'un vecteur AAVr portant le système inductible à la tétracycline. Pour cela, nous nous sommes appuyés d'une part sur les travaux du Docteur Guylène Le Meur et d'autre part sur



les travaux du Docteur Knut Stieger, qui démontraient la possibilité de réguler l'expression du transgène Erythropoïétine (Epo) dans la rétine de macaque par induction orale à la Doxycycline suite à une injection sous-rétinienne d'AAV recombinant portant le transgène Epo sous le contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline (thèse de doctorat effectuée au LTG).

Ce manuscrit de thèse s'articule autour des parties suivantes. Tout d'abord une introduction qui résume les connaissances bibliographiques nécessaires à la compréhension des travaux. Puis une présentation des résultats obtenus comportant dans une première partie, l'article publié concernant la caractérisation de la pathologie chez le teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup> dans une seconde partie les résultats non publiés concernant la mise au point d'un vecteur thérapeutique pour traiter le teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup> et dans une dernière partie, l'article en cours de soumission concernant la régulation du transgène RPE65 chez le briard RPE65-déficient. Chaque article sera discuté séparément. Enfin nous résumerons les principaux points de ce manuscrit dans la discussion générale.

# Introduction

# 1. Introduction

L'introduction bibliographique de ce manuscrit sera divisée en plusieurs parties.

Nous décrirons dans un premier temps la structure et la fonction d'une rétine saine puis nous parlerons des dystrophies rétiniennes héréditaires comme la rétinite pigmentaire (RP) et l'Amaurose congénitale de Leber (ACL), aboutissant à plus ou moins longue échéance à la cécité. Nous aborderons également la mort cellulaire des photorécepteurs par apoptose qui est le mécanisme final de ces pathologies.

La seconde partie de l'introduction sera entièrement consacrée au gène et à la protéine RPGRIP1. Elle tentera de faire le tour des connaissances actuelles concernant ce gène.

Dans la troisième partie de l'introduction, nous parlerons de la thérapie génique et des vecteurs recombinants adéno-associés, et nous aborderons plus particulièrement le transfert de gène dans la rétine utilisant des AAVr.

Enfin la dernière partie de l'introduction traitera d'un des systèmes de régulation de l'expression du transgène : le promoteur inductible à la tétracycline.

## **1.1. La rétine et les dystrophies rétiniennes.**

### **1.1.1. Structure et fonction de la rétine.**

#### **1.1.1.1. Structure de l'œil et de la rétine.**

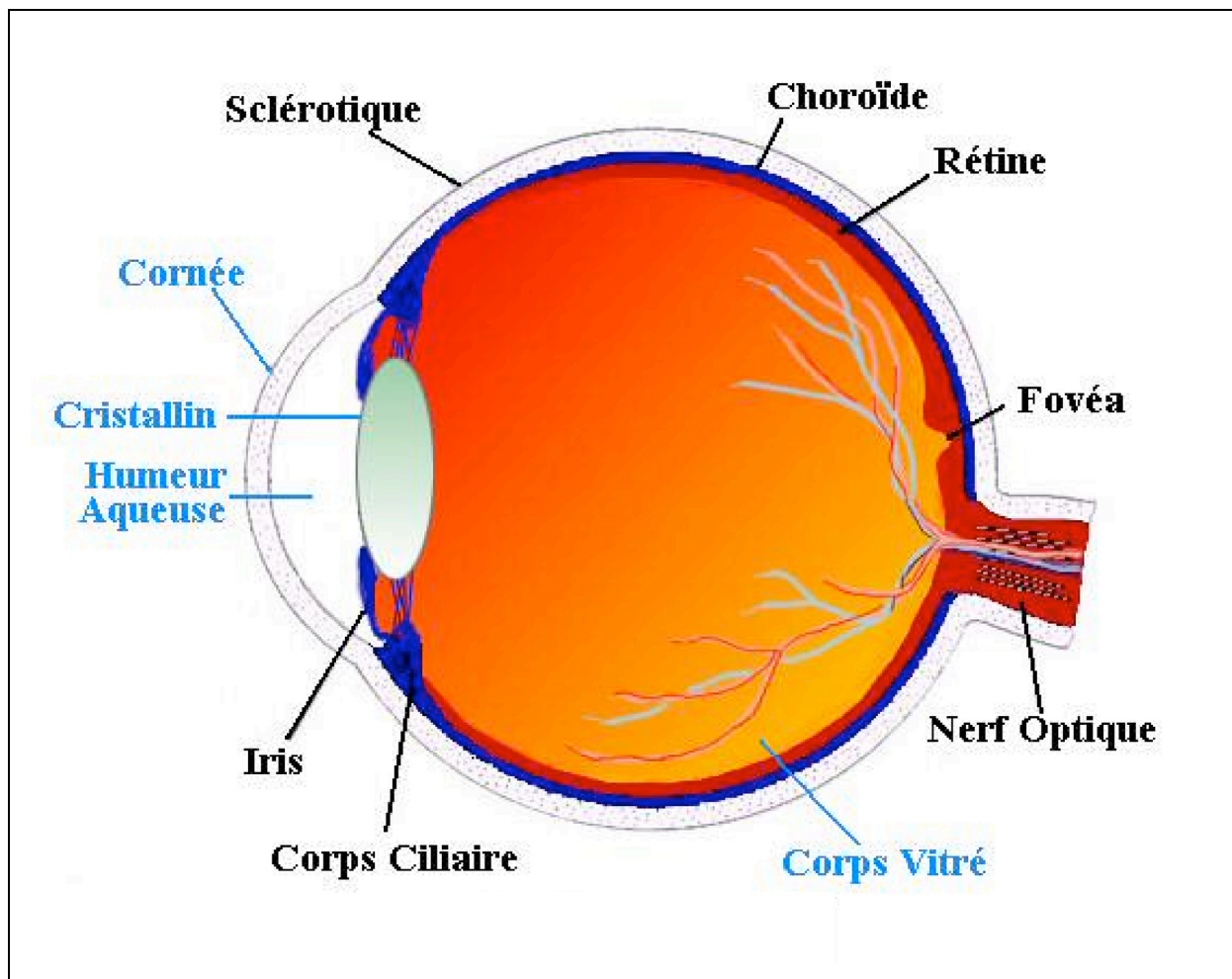
##### **L'œil**

L'œil est par définition l'organe de la vision (Figure 1). Il est composé d'une enveloppe externe de protection, la sclérotique, qui lui donne sa couleur blanche et sa rigidité. La cornée, lentille transparente, est le premier élément réfractif de l'œil, avant le cristallin, lentille biconvexe qui permet la mise au point (grâce à l'accommodation) et la formation d'une image nette de l'objet sur la rétine. La chambre antérieure est le compartiment délimité par la cornée dans sa partie externe et par le cristallin et l'iris dans sa partie interne. Elle contient un liquide transparent de faible viscosité appelé humeur aqueuse et composé à 99,6 % d'eau, mais aussi de vitamine C, de glucose, d'acide lactique, de sodium et de chlore. L'iris fait varier l'ouverture de la pupille afin de modifier la quantité de lumière qui pénètre dans l'œil, il donne également sa couleur à l'œil en fonction de la quantité plus ou moins importante de mélanine. L'humeur vitrée, constituée d'une gelée (acide hyaluronique), occupe 80% du volume de l'œil et lui donne sa consistance. La rétine est située entre l'humeur vitrée et la choroïde, une couche vasculaire pigmentée qui absorbe les rayons lumineux inutiles à la vision et a pour fonction de nourrir les photorécepteurs de la rétine. L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), situé entre la rétine et la choroïde, joue un rôle capital pour la rétine. En contact étroit avec les photorécepteurs (PR) rétiniens, les cellules de l'EPR assurent, entre autres rôles, le maintien de ces structures grâce à la phagocytose des débris issus des articles externes des PR (nous reparlerons du processus d'autorenouvellement des PR plus tard dans ce chapitre).

##### **La rétine**

La rétine est à l'origine de la transformation de la lumière émise par notre environnement en impulsions électriques qui seront traduites en images par le cerveau. Ce tissu, d'une épaisseur d'environ 200 à 500 µm selon les espèces, située au fond de chaque œil entre l'EPR et l'humeur vitrée, couvre environ 75 % du globe oculaire. Dérivée du neurectoderme, elle constitue une partie intégrante du système nerveux central (SNC).

La rétine des vertébrés est composée de 6 types de neurones et de 3 types de cellules gliales (Masland, 2001). Les neurones rétiniens qui traitent l'information visuelle forment trois couches nucléaires distinctes séparées par deux couches synaptiques appelées couches plexiformes.



**Figure 1 : Structure de l'œil.**

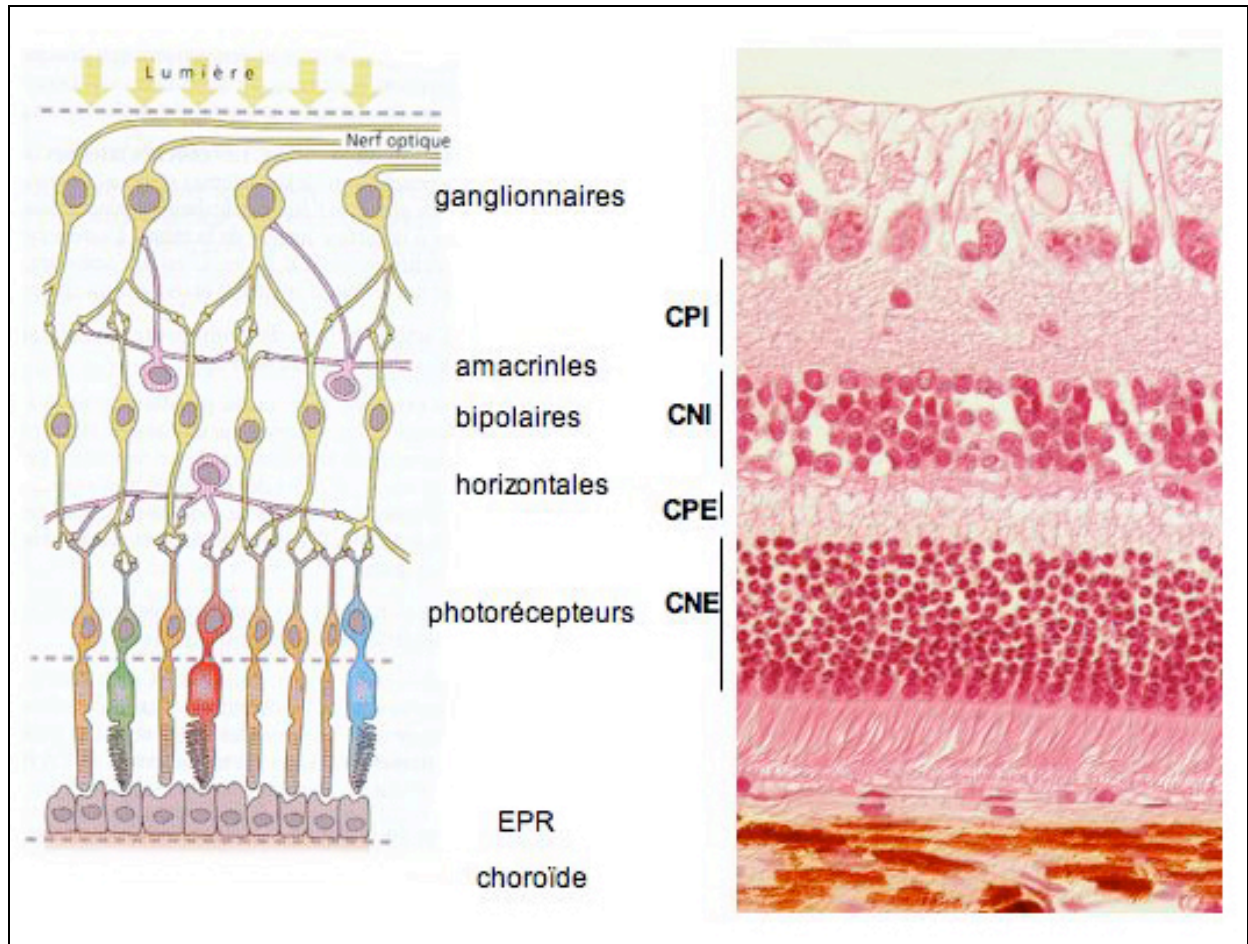
L'œil est composé d'une chambre antérieure contenant l'humeur aqueuse et protégée par la cornée, du cristallin qui fait converger les rayons lumineux vers la rétine, de l'iris qui donne sa couleur à l'œil, des corps ciliaires et du globe oculaire en arrière du cristallin. Le globe oculaire qui contient l'humeur vitrée est entouré de plusieurs membranes. La sclérotique est la membrane protectrice de l'œil la plus externe, la choroïde est une couche cellulaire très fortement vascularisée qui sert de membrane nourricière à la rétine, qui tapisse la face postérieure de l'œil.

A partir de l'humeur vitrée, la première couche neuronale rencontrée est composée essentiellement de cellules ganglionnaires dont les axones se rejoignent (plus d'un million de fibres nerveuses) pour former le nerf optique qui relie l'œil au cerveau via les voies visuelles. La couche nucléaire située sous les cellules ganglionnaires est la couche nucléaire interne (CNI) qui comporte les corps cellulaires des cellules horizontales, des cellules bipolaires et des cellules amacrines. Enfin la couche nucléaire externe (CNE) est composée de cellules sensorielles, les photorécepteurs rétiniens. Ces derniers sont en contact étroit avec les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Deux couches synaptiques séparent les trois couches nucléaires : la région où s'effectuent les connexions entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires se nomme couche plexiforme interne (CPI) et celle contenant les synapses reliant les photorécepteurs aux dendrites des cellules bipolaires et horizontales est appelée couche plexiforme externe (CPE) (Figure 2). Outre les neurones, la rétine, comme l'ensemble du système nerveux central ou périphérique, contient un grand nombre de cellules gliales (Newman, 2004). Elles jouent un rôle primordial en assurant l'isolement des tissus nerveux, les fonctions métaboliques, le soutien squelettique et la protection vis-à-vis des corps étrangers en cas de lésions. De récents travaux montrent que certaines cellules gliales jouent également un rôle actif dans la transmission de l'influx nerveux. Les cellules gliales présentes dans la rétine sont les cellules gliales de Müller (CGM), les astrocytes et les microglies.

Nous allons dans un premier temps décrire brièvement le rôle de chacune des cellules (neurones et cellules gliales) présentes dans la rétine puis nous nous attarderons plus particulièrement sur les photorécepteurs rétiniens.

### **Les cellules horizontales (CNI)**

Les cellules horizontales sont caractérisées par l'absence d'axone. Elles forment des connexions synaptiques horizontales au niveau de la couche plexiforme externe qui relie les photorécepteurs et les cellules bipolaires. Le rôle des cellules horizontales est d'inhiber l'activité des cellules avoisinantes. Quand une source lumineuse atteint la rétine, elle peut illuminer fortement certains photorécepteurs et d'autres beaucoup moins. En supprimant le signal de ces photorécepteurs moins illuminés, les cellules horizontales assurent que seul le signal des photorécepteurs bien illuminés est transmis aux cellules ganglionnaires, améliorant ainsi le contraste et la définition du stimulus visuel (Peichl *et al.*, 1994 ; Mojumder, 2008).



**Figure 2 : Structure de la rétine.**

Structure simplifiée de la rétine (gauche) et coupe histologique (droite). La rétine est composée de plusieurs couches de cellules. Les cellules ganglionnaires dont les axones forment le nerf optique sont situées dans la partie supérieure de ce schéma. Les dendrites des cellules ganglionnaires sont connectées aux axones des cellules amacrines et bipolaires de la couche nucléaire interne (CNI) au niveau de la couche plexiforme interne (CPI). Les cellules bipolaires et horizontales sont connectées aux photorécepteurs (couche nucléaire externe, CNE) au niveau de la couche plexiforme externe (CPE). Les photorécepteurs, cônes et bâtonnets, sont eux-même intimement liés aux cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). La choroïde est la membrane nourricière qui délimite la face interne de la rétine.

### **Les cellules amacrines (CNI)**

Les cellules amacrines sont elles aussi caractérisées par l'absence d'axone. Elles forment des connections synaptiques horizontales au niveau de la couche plexiforme interne qui relie les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. En reliant les neurones bipolaires et ganglionnaires, elles forment une route alternative indirecte entre ceux-ci (Nelson *et al.*, 1984). Les cellules amacrines, qui présentent une grande variabilité au niveau de leur morphologie, semblent avoir plusieurs fonctions dont la plupart sont encore inconnues. Les cellules amacrines libèrent également des neuromédiateurs tels que le GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique), la glycine, l'acétylcholine, la dopamine et la sérotonine.

### **Les cellules bipolaires (CNI)**

Les cellules bipolaires assurent la transmission verticale du signal entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires. Il existe trois types de cellules bipolaires (Copenhagen, 1991 ; Wassle *et al.*, 1991). Deux types de cellules dites ON, qui font synapses soit avec les cônes soit avec les bâtonnets, et dont la réponse à un signal lumineux se traduit par une dépolarisation. Un type de cellules dites OFF recevant uniquement l'information des cônes, et qui en réponse à un stimulus lumineux, s'hyperpolarisent. Ces cellules libèrent, tout comme les photorécepteurs, le glutamate comme neuromédiateur.

### **Les cellules ganglionnaires**

Les cellules ganglionnaires constituent le dernier maillon de la transmission verticale du signal lumineux. Elles sont caractérisées par une grande diversité morphologique. Elles possèdent de nombreux récepteurs (glutamate, acétylcholine, GABA, glycine...). Alors que les autres neurones de la rétine n'émettent que des potentiels électriques gradués (signalisation à courte distance), les cellules ganglionnaires sont les seules à transmettre le signal nerveux sous forme de potentiels d'action (signalisation à longue distance). Considérant que ce sont leurs axones qui forment le nerf optique et transmettent donc l'information à de grandes distances de la rétine, la génération de potentiels d'action dans ces cellules prend alors tout son sens (Mu *et al.*, 2004).

### **Les cellules gliales de Müller**

Parmi les trois types de cellules gliales, les cellules gliales de Müller (CGM) sont majoritaires. Elles sont générées à partir des cellules neuroépithéliales, précurseurs également des neurones rétiniens. Elles jouent un rôle lors du développement de la rétine, participant notamment à l'agencement du tissu en influençant l'orientation et la migration des neurones (Rakic, 1981). Traversant la rétine de part en part, leurs pieds internes sont apposés à la membrane limitante interne, leurs pieds externes forment (avec la base des



segments internes des PR) la membrane limitante externe, et leur corps cellulaire est situé dans la couche nucléaire interne. Dans la rétine adulte, les CGM occupent une place prépondérante, participant non seulement au maintien du tissu mais également aux fonctions métaboliques vitales pour les neurones, qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

### **Les astrocytes**

Les astrocytes sont présents dans l'ensemble de la rétine lors de la période embryonnaire. Dans la rétine adulte, les astrocytes ne sont présents qu'au niveau de la couche des cellules ganglionnaires, où ils sont étroitement associés aux vaisseaux sanguins. Les astrocytes jouent un rôle lors de la mise en place de la barrière hémato-rétinienne qui isole la rétine de la circulation générale, en modulant la croissance des cellules endothéliales (Jiang *et al.*, 1995).

### **Les microglies**

Pendant la période embryonnaire, les microglies se retrouvent en grand nombre dans toutes les couches de la rétine. À l'âge adulte, leur présence se réduit au niveau des couches plexiformes, cependant elles peuvent migrer suite à un épisode inflammatoire et exercer ainsi leur fonction phagocytaire au sein de la rétine.

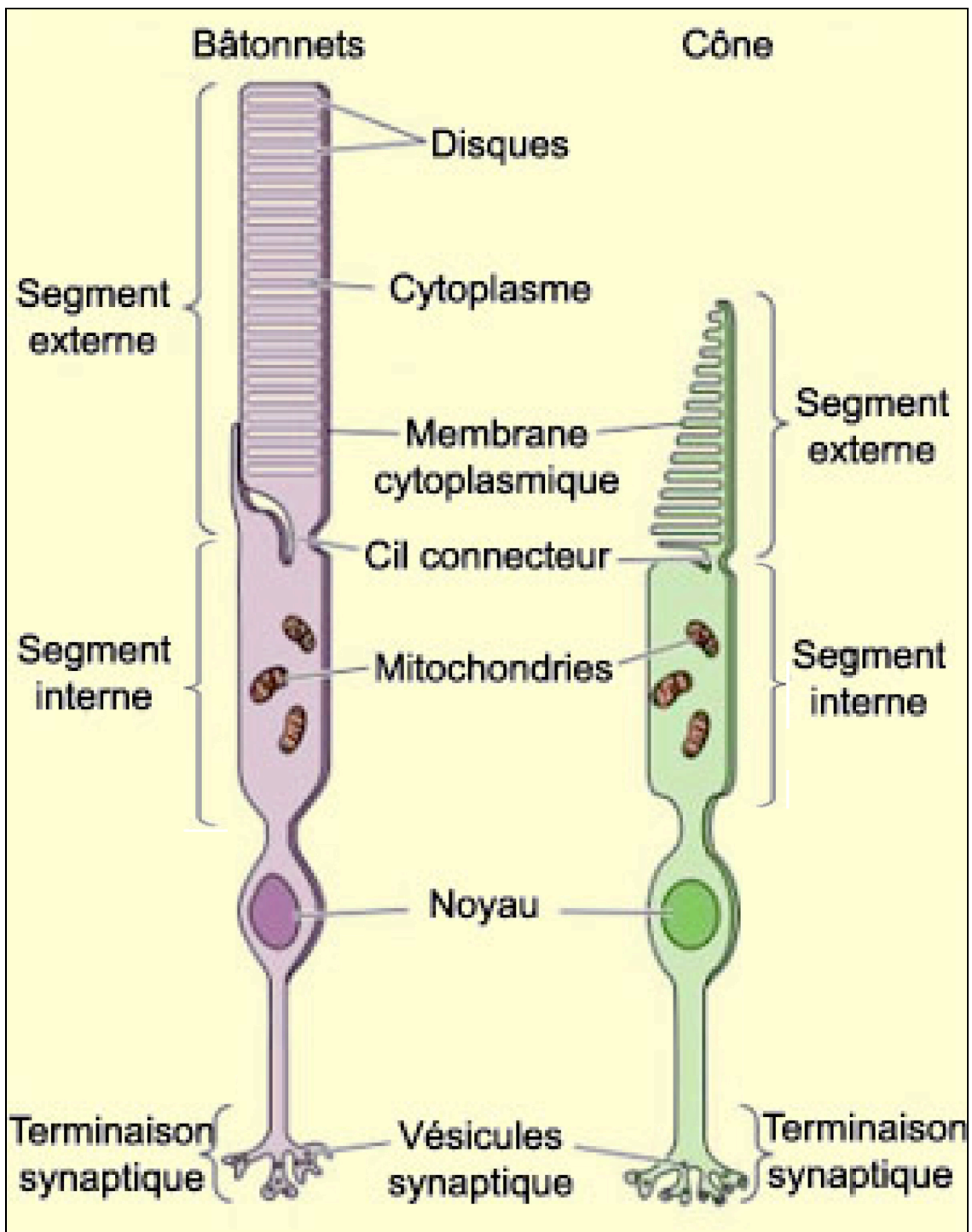
### **Les photorécepteurs (CNE)**

Comme nous l'avons dit précédemment, les photorécepteurs rétiniens sont les cellules où siège la transformation de l'information lumineuse en information électrique (Papermaster, 2002). La rétine humaine compte environ 130 millions de photorécepteurs. Deux principaux types, les cônes et les bâtonnets assurent la transmission du signal visuel grâce à la cascade de phototransduction. On dénombre environ 1 cône pour 13 bâtonnets. Les bâtonnets sont indispensables à la vision nocturne et en faible luminosité, ainsi qu'à la vision périphérique et à la détection des mouvements. Chez l'Homme, ils sont distribués de façon homogène sur toute la surface rétinienne excepté au niveau de la macula où ils sont absents.

Les cônes sont eux indispensables à la vision diurne, à la perception des couleurs et à l'acuité visuelle fine. Selon les espèces animales, cette acuité est plus ou moins développée. En effet, chez les carnivores (chiens, chats), les ruminants, les amphibiens, les sauriens (reptiles) ou les sélaciens (requin), la macula n'existe pas, seule est présente l'area centralis, une zone médio-temporale de plus forte densité cellulaire. La macula est une zone avasculaire de plus grande richesse en cônes qui existe chez l'Homme, chez les primates et chez certains poissons. La fovéa est la zone centrale de la macula uniquement constituée de cônes, cette zone permet l'acuité visuelle la plus fine. Chez l'Homme, 90% des cônes sont

répartis sur toute la surface rétinienne et les 10% restants sont concentrés au niveau de la fovéa. Alors que l'Homme ou le primate ne disposent que d'une seule fovéa, les rapaces en possèdent deux : une fovéa centrale et une latérale ce qui leur confère une acuité visuelle 7 à 8 fois plus fine que chez l'Homme.

Les photorécepteurs rétiniens, cônes et bâtonnets, sont des cellules photosensibles hautement spécialisées (Kawamura *et al.*, 2008 ; Luo *et al.*, 2008). Elles sont composées d'une terminaison synaptique, d'un corps cellulaire contenant le noyau, d'un segment interne riche en mitochondries, appareil de Golgi et réticulum endoplasmique, où se déroulent les biosynthèses et d'un segment externe où se déroule la cascade de phototransduction (Figure 3). Le segment externe contient un empilement de centaines de disques membranaires contenant le photopigment rétinien appelé rhodopsine dans les bâtonnets. Les disques membranaires des segments externes des photorécepteurs sont renouvelés en permanence (Guerin *et al.*, 1993). Un processus d'évagination de la membrane plasmique à la base du segment externe, mettant en jeu les filaments d'actine et la protéine PROML1 (prominin-like 1), permet la formation de nouveaux disques membranaires en continu, de nombreuses molécules d'opsine sont associées à ces disques membranaires pour former les futurs photopigments. Les disques néo-formés migrent alors de la base du segment externe jusqu'à l'apex. Là, les disques qui se décrochent sont phagocytés par les cellules de l'EPR (Young, 1976).



**Figure 3 : Structure des photorécepteurs.**

Ces cellules spécialisées sont divisées en quatre parties : i) le segment externe composé des disques contenant le photopigment rhodopsine et le cil connecteur, ii) le segment interne riche en mitochondries, iii) le corps cellulaire contenant le noyau, iv) la terminaison synaptique (pédoncule pour les cônes, sphérule pour les bâtonnets) reliant le photorécepteur aux cellules de la couche nucléaire interne.

Les cônes et les bâtonnets diffèrent à plusieurs égards. D'abord d'un point de vue morphologique. Dans les bâtonnets, le segment externe mesure de 25 à 28  $\mu\text{m}$  de long. Les structures membranaires sont des disques ou saccules empilés (1000 / bâtonnet), contenus dans le cytoplasme et entourés d'une membrane plasmique. Les disques contenus dans le segment externe sont donc séparés de la membrane plasmique. La partie apicale des segments externes est entourée par les invaginations de l'épithélium pigmentaire rétinien. La terminaison synaptique est appelée sphérule et mesure de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre. Pour les cônes, la structure lamellaire consiste en un repli de la membrane plasmique ou microvillosité tout le long du segment externe. Celui-ci mesure 10 $\mu\text{m}$ , et n'établit pas de contact étroit avec l'EPR. Dans la région de la fovéa, la morphologie des cônes est modifiée, du fait de leur grande densité : ils y sont moins larges, mais plus longs (33  $\mu\text{m}$ ). La terminaison synaptique des cônes est appelée pédoncule et est plus large (8 à 10  $\mu\text{m}$ ) que celle des bâtonnets.

Les différences entre cônes et bâtonnets existent aussi au niveau moléculaire. Par exemple, ils possèdent chacun un pigment visuel spécifique. Le pigment visuel des bâtonnets est la rhodopsine ; c'est une glycoprotéine composée d'une chaîne d'acides aminés, formant 7 domaines transmembranaires reliés par 3 boucles cytoplasmiques et 3 boucles intradiscales. Il s'agit d'un récepteur de la super famille des récepteurs couplés à une protéine G. Ce récepteur est composé d'une partie protéique, l'opsine, liée de façon covalente à un chromophore, l'isomère 11-cis du rétinol. Chaque segment externe d'un bâtonnet contient 140 millions de molécules de rhodopsine. En ce qui concerne les photopigments spécifiques des cônes, leur structure est semblable à celle de la rhodopsine des bâtonnets et ne diffère que par la séquence des acides aminés. Il existe différents types de cônes : deux chez la plupart des mammifères, trois chez les grands primates dont l'homme. Ces différents types de cônes sont définis par leur sensibilité spectrale, elle-même définie par la présence d'une opsine sensible à différentes longueurs d'ondes : longueurs d'ondes courtes (bleu), moyennes (vert) et longues (rouge) (Nathans, 1994).

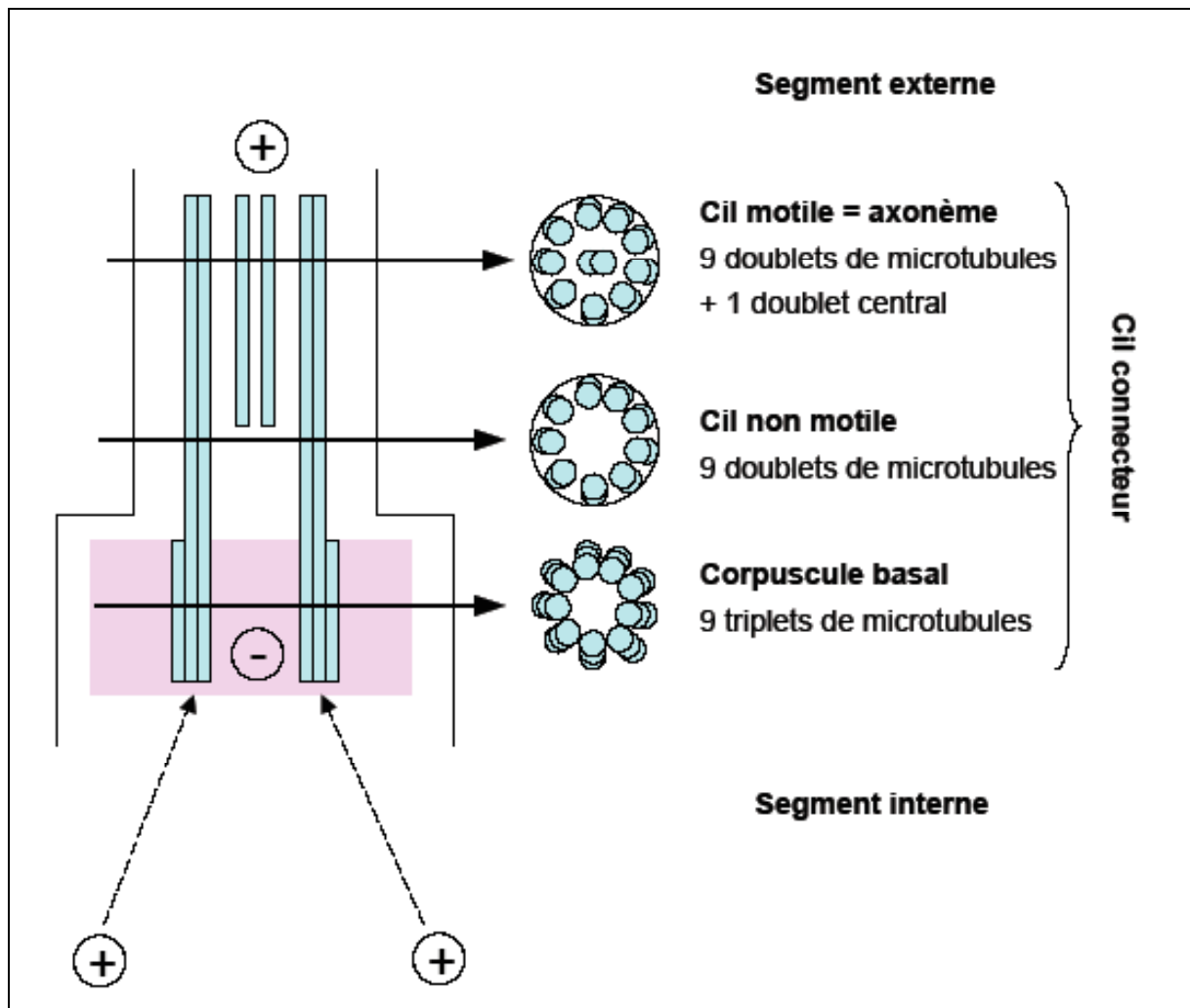
#### **1.1.1.2. Les cils connecteurs et le transport intra-flagellaire**

Le seul lien physique qui relie le segment externe au segment interne est le cil connecteur (CC). Le cil connecteur fait partie d'un réseau cytosquelettique complexe (Horst *et al.*, 1987). À partir du corpuscule basal, un faisceau de microtubules s'étend jusqu'au noyau et à l'appareil de Golgi d'une part, et dans le cil connecteur jusqu'au segment externe où il forme l'axonème d'autre part. L'axonème est un cil motile à 9 doublets périphériques avec un doublet central (Figure 4) (Fliegeauf *et al.*, 2006). Le corpuscule basal dans les

photorécepteurs rétiniens joue un rôle équivalent à celui du centrosome ou MTOC (microtubule organization center) dans l'ensemble des cellules animales (Wolfrum *et al.*, 1998). Le centrosome est composé de deux centrioles perpendiculaires entourées de matériel péricentriolaire. Les centrioles sont elles-mêmes composées de 9 triplets de 3 microtubules. Ces centrioles servent de centre de structuration des microtubules et de centre dynamique lors de la division cellulaire. En effet, le centrosome se duplique au cours de l'interphase puis se sépare pendant la mitose, pour former les deux pôles du fuseau mitotique, ce qui permet la correcte répartition des chromosomes durant la division cellulaire dans l'ensemble des cellules animales. De la même façon, le corpuscule basal du cil connecteur des photorécepteurs rétiniens permet la structuration et l'orientation des faisceaux de microtubules et de l'axonème.

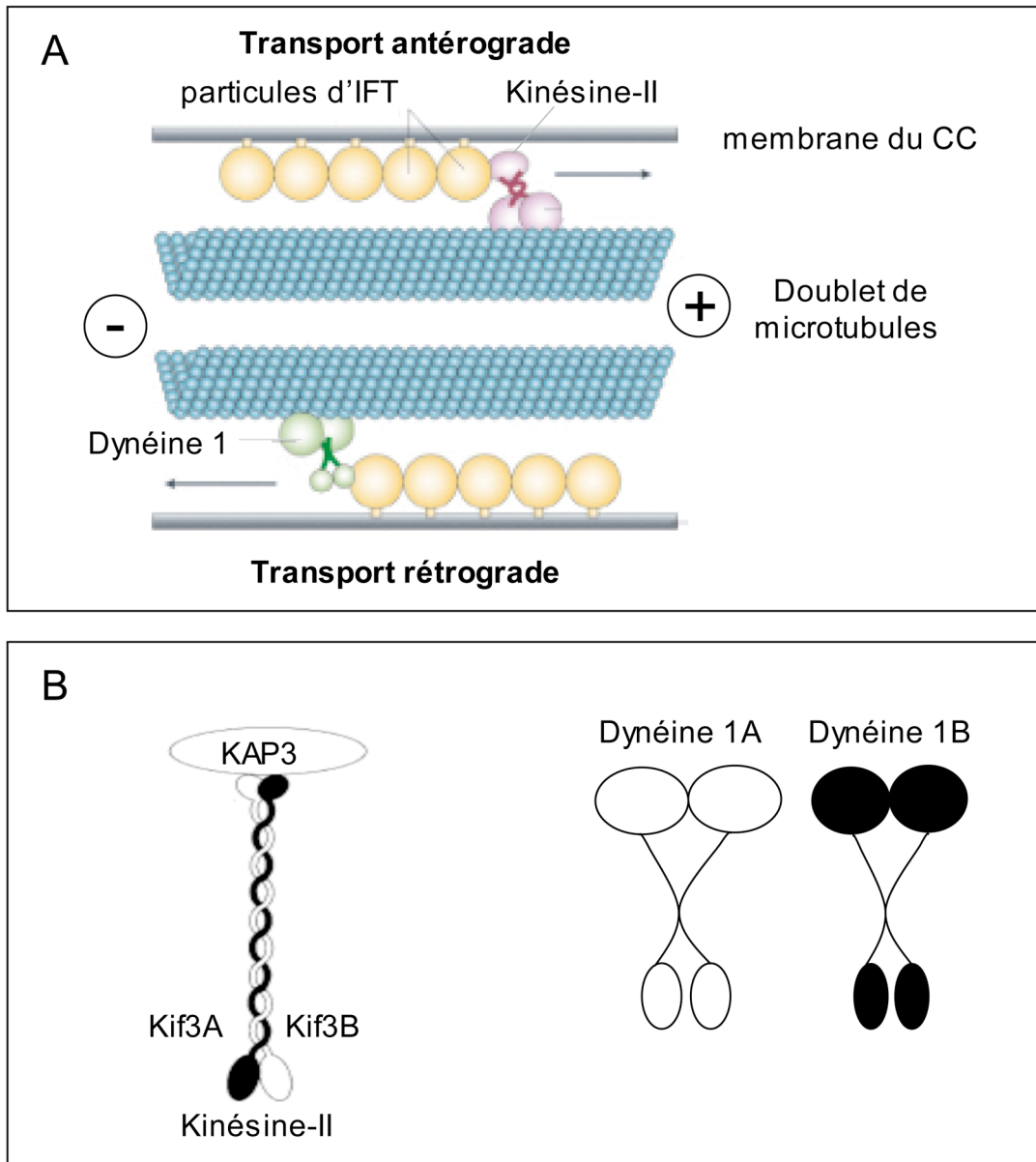
La protéine RPGRIP1, à laquelle nous consacrerons un chapitre complet dans la suite de cette introduction, serait associée de façon stable à la partie proximale de l'axonème du cil connecteur, et permettrait l'encrage de son partenaire moléculaire RPGR au niveau de cette structure. Ce complexe RPGRIP1/RPGR jouerait un rôle dans le transport ciliaire mais le mécanisme exact reste à ce jour inconnu.

Lors de la différenciation des photorécepteurs pendant l'embryogenèse, le segment interne est mis en place en premier. Pour que les structures ciliaires et le segment externe soient synthétisés, le transport intraflagellaire (IFT) des molécules synthétisées dans le segment interne doit se mettre en place. La formation du cil connecteur dépend de l'action des complexes de transport intraflagellaire qui assurent, avec les kinésines et les dynéines cytoplasmiques le transport des précurseurs qui vont former les microtubules et les membranes (Figure 5) (Rosenbaum *et al.*, 2002). L'axonème est assemblé par addition de précurseurs axonaux et de précurseurs membranaires provenant du segment interne (Figure 6) (Sloboda *et al.*, 2007). Lorsque les cils connecteurs sont formés, les segments externes et les disques qui le composent se construisent à partir des molécules et des précurseurs membranaires provenant du segment interne. Les particules IFT sont des complexes polypeptidiques de transport intraflagellaire (complexe IFT A pour le transport rétrograde et complexe IFT B pour le transport antérograde) qui prennent en charge les molécules à transporter, appelées « cargos » (Figure 7).



**Figure 4 : Structure du cil connecteur (D'après Fliegauf et al., 2006).**

Le cil connecteur des photorécepteurs est composé de trois parties : i) le corpuscule basal constitué de 9 triplets de microtubules, ii) le cil non motil constitué de 9 doublets de microtubules et iii) l'axonème ou cil motil constitué de 9 doublets périphériques et d'un doublet central.



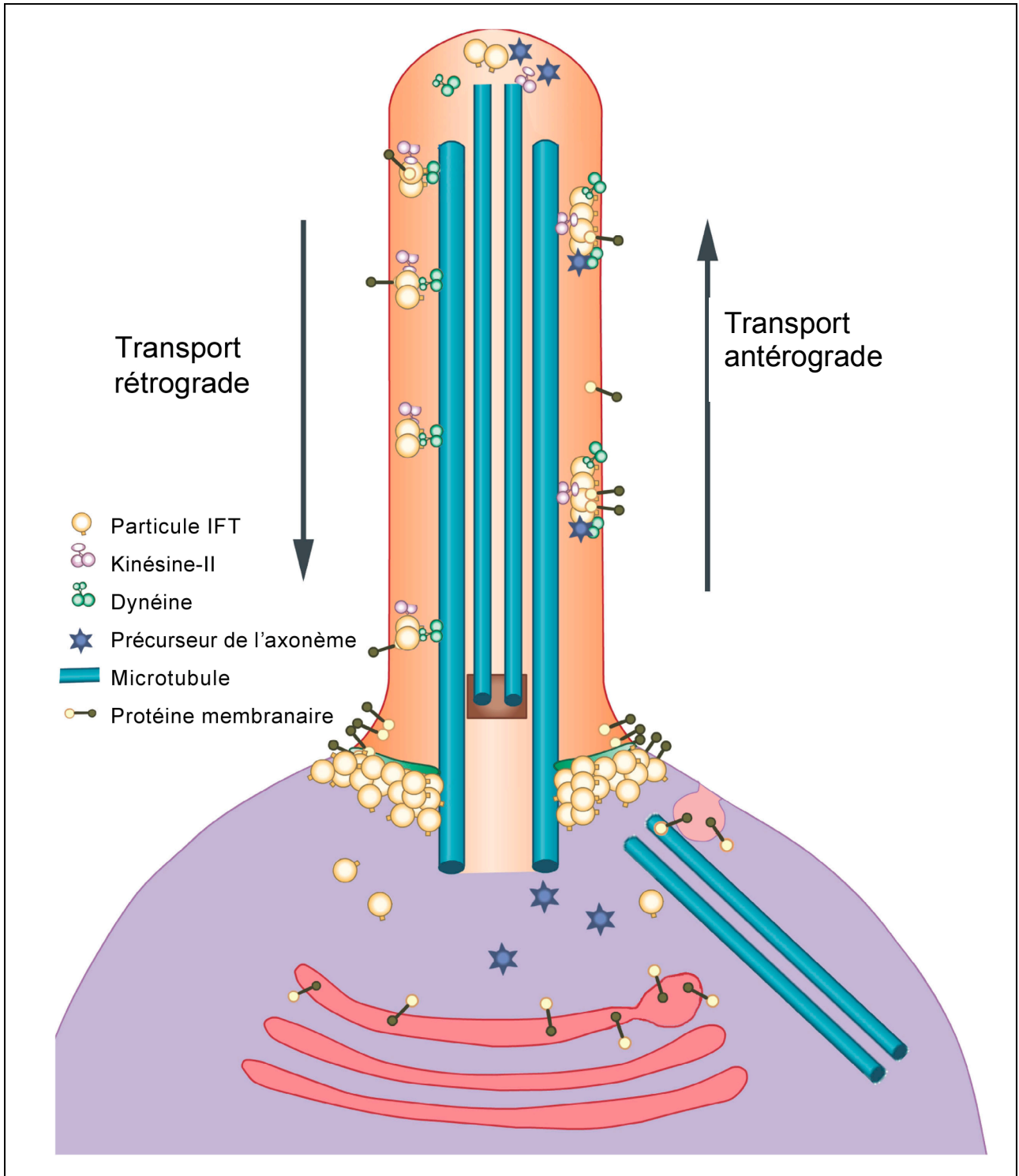
**Figure 5 : Les moteurs du transport intraflagellaire.**

**(A) D'après Rosenbaum et al., 2002.**

Les molécules à transporter le long des microtubules sont prises en charge par une particule d'IFT et le complexe ainsi formé se lie aux moteurs de transport intraflagellaire (dynéine ou kinésine).

**(B) D'après Williams et al., 2002.**

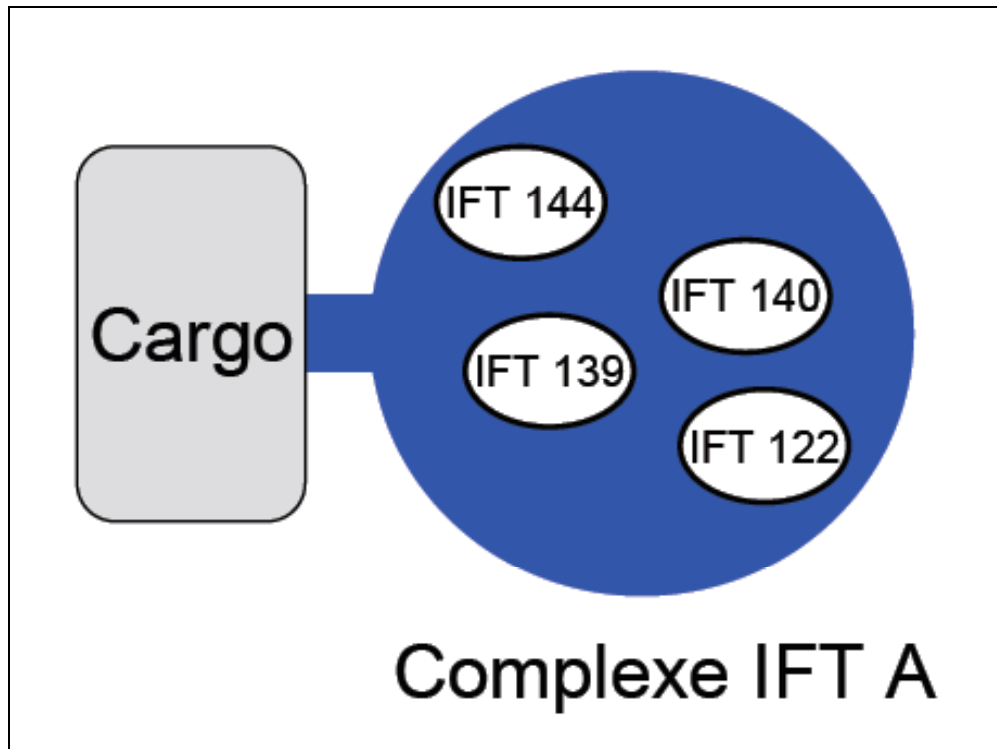
Le moteur du transport antérograde kinésine-II est un complexe polypeptidique composé de deux sous unités motrices Kif3A et Kif3B, associées à une sous unité accessoire KAP3 (Kinesin Associated Polypeptide 3). Le transport rétrograde est assuré par la dynéine 1A du pôle négatif au pôle positif le long des microtubules du segment interne et par la dynéine 1B du pôle positif au pôle négatif dans le cil connecteur.



**Figure 6 : Synthèse de l'axonème (D'après Sloboda et al., 2007).**

Lors de la différenciation du photorécepteur, le cil connecteur est formé grâce aux précurseurs membranaires et de l'axonème synthétisés dans le segment interne du photorécepteur puis pris en charge par les particules d'IFT. Une fois le cil connecteur formé, le segment externe est à son tour constitué.





**Figure 7 : Les complexes polypeptidiques ou particules d'IFT.**

Les particules d'IFT sont composées de plusieurs polypeptides dont IFT 144, 140, 139 et 122 pour le complexe A. Le complexe A permet le transport rétrograde du segment externe vers le segment interne le long des CC. Les particules d'IFT permettent l'ancrage des molécules à transporter appelées « cargos ».

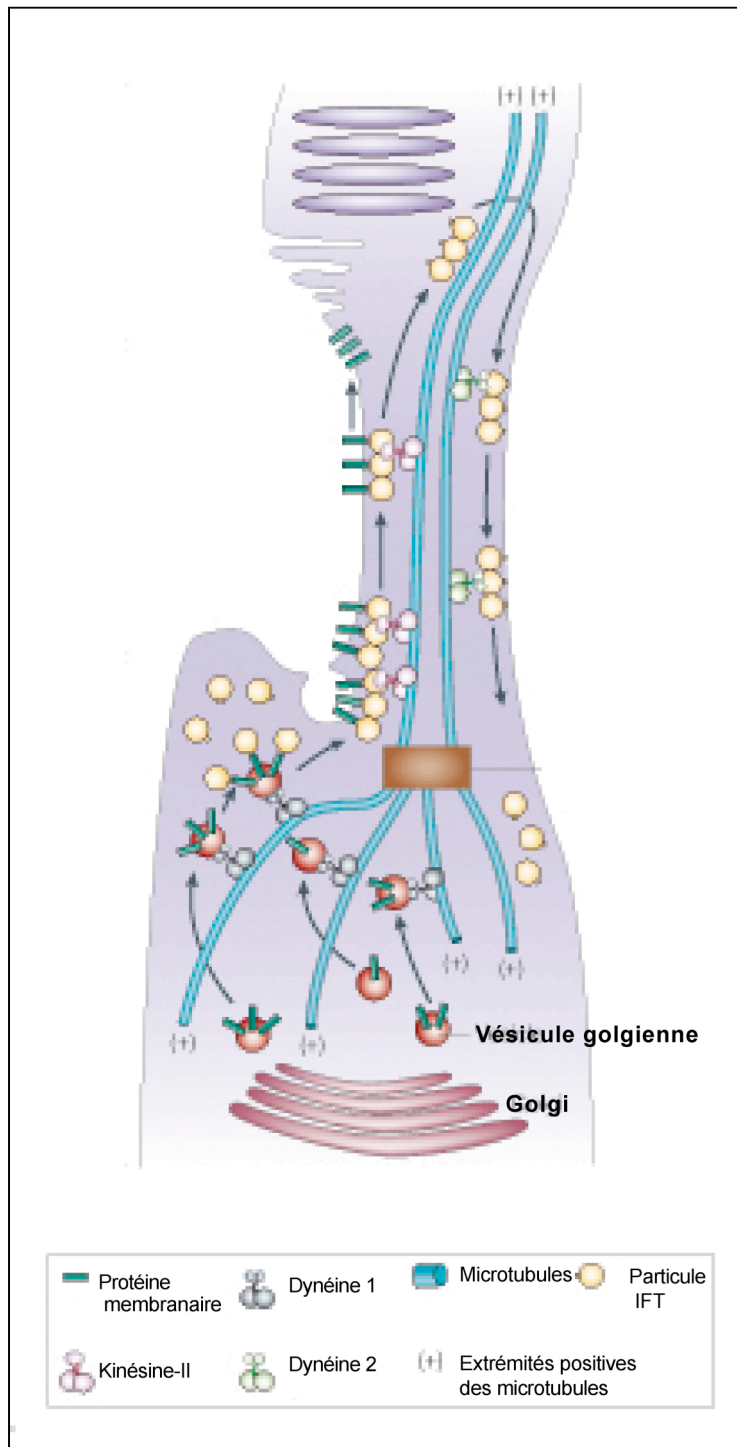
Le complexe IFT A est composé des protéines IFT144, 140, 139 et 122, tandis que le complexe IFT B est composé des protéines IFT172, 88, 81, 80, 74/72, 57/55, 52, 46, 27 et 20 (Rosenbaum *et al.*, 2002 ; Baker *et al.*, 2003). Les moteurs membranaires (kinésine et dynéine) qui permettent le déplacement de ces cargos sur les particules IFT, sont indispensables à la formation et au maintien des cils connecteurs et des segments externes. L'action concertée des IFT et d'une dépolymérase (la kinésine 13) située à l'extrémité distale de l'axonème permet de conserver une longueur déterminée.

Les « déchets » de dépolymérisation de l'axonème reviennent dans le segment interne où ils sont phagocytés grâce au transport rétrograde effectué par la dynéine.

Le transport des molécules du segment interne du photorécepteur au segment externe s'effectue de la façon suivante (Wolfrum *et al.*, 2000). Les molécules synthétisées dans le réticulum endoplasmique passent dans l'appareil de Golgi et sont sécrétées sous forme de vésicules post-golgiennes dans le cytoplasme. Nombre de ces protéines produites dans le segment interne ont une utilisation dans le segment externe, ce qui nécessite un transfert le long des cils connecteurs (Figure 8). Les vésicules du Golgi contenant la protéine à véhiculer sont prises en charge par les particules d'IFT. Les particules d'IFT chargées avec leurs cargos (les vésicules post-golgiennes pleines) se fixent sur la dynéine 1A (ou dynéine 1), ce qui permet le transport de ce complexe le long des microtubules, de l'extrémité positive vers l'extrémité négative jusqu'à la région péricilliaire située à la base du cil connecteur.

Au niveau du corpuscule basal, les vésicules post-golgiennes pleines, détachées des complexes IFT et de la dynéine, vont fusionner avec la membrane de la région péricilliaire grâce aux petites protéines Rab liant le GTP. Les molécules insérées dans la membrane plasmique seraient alors prises en charge par de nouvelles particules d'IFT puis liées à la kinésine-II (Figure 5C). La kinésine-II est un complexe polypeptidique composé de deux sous unités motrices Kif3A et Kif3B, associées à une sous unité accessoire KAP3 (Kinesin Associated Polypeptide 3). La kinésine-II se lie aux particules d'IFT et assure le transport antérograde des molécules de la base du cil connecteur jusqu'au segment externe où les molécules sont relarguées puis utilisées pour la phototransduction. Les particules d'IFT (non chargées) sont alors prises en charge par la dynéine 1B qui assure leur transport rétrograde jusqu'au pôle basal du cil connecteur.

La kinésine-II et la dynéine 1B (ou dynéine 2) sont les moteurs principaux du transport ciliaire mais il existe de nombreuses autres molécules (kinésines 2, -3, -9, -13, -14, -16, -17, Kif17, KLP-6, myosine VIIa...) qui servent de moteurs accessoires et qui sont spécifiques d'une molécule chargée ou d'une vitesse de transport requise (Liu *et al.*, 1999 ; Williams, 2002 ; Insinna *et al.*, 2008).



**Figure 8 : Le transport intraflagellaire (D'après Rosenbaum et al., 2002).**

Les molécules synthétisées dans le réticulum endoplasmique passent dans l'appareil de Golgi et sont sécrétées sous forme de vésicules dans le cytoplasme. Les vésicules pleines sont prises en charge par les particules d'IFT qui se fixent sur la dynéine 1, ce qui permet le transport de ce complexe le long des microtubules jusqu'à la région périciliaire. Au niveau du corpuscule basal, les vésicules pleines, détachées des complexes IFT et de la dynéine, vont fusionner avec la membrane de la région périciliaire puis seraient prises en charge par de nouvelles particules d'IFT liées à la kinésine-II. La kinésine-II assure le transport antérograde des molécules de la base du cil connecteur jusqu'au segment externe où les molécules sont relarguées puis utilisées pour la phototransduction. Les particules d'IFT (non chargées) sont alors prises en charge par la dynéine 2 qui assure leur transport rétrograde jusqu'au pôle basal du cil connecteur.

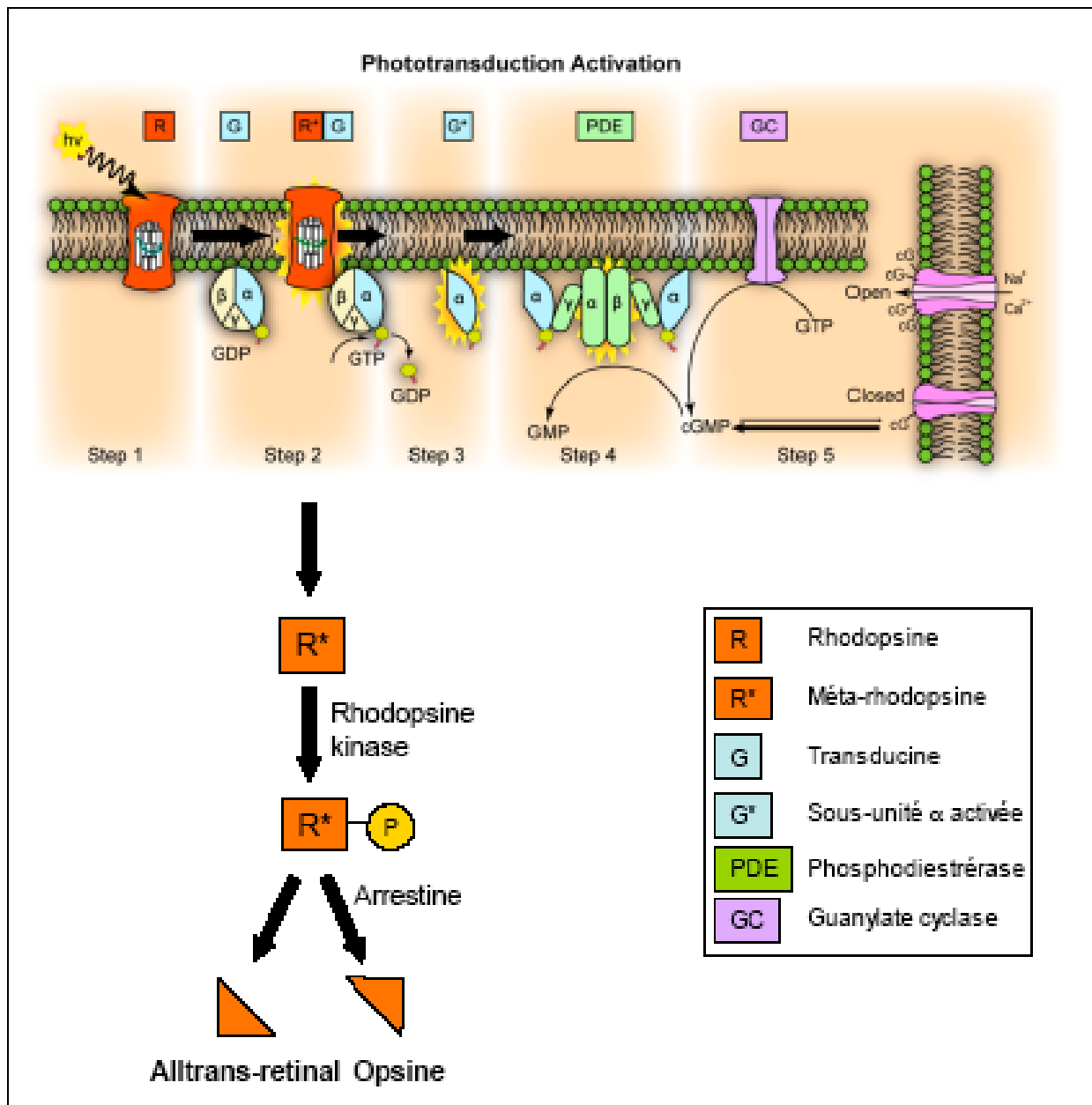
Les molécules d'IFT semblent impliquées dans tous les tissus qui contiennent des structures ciliaires ou flagellaires. Ainsi, des mutations dans le gène IFT88 qui code pour une protéine aussi appelée Tg737 chez la souris et chez l'homme, ont été impliquées à la fois dans les dégénérescences rétiniennes, les surdités et les polykystoses rénales. L'ensemble de ces pathologies ayant pour origine un défaut des structures ciliaires, est regroupé sous le terme global de ciliopathies (Pazour *et al.*, 2002).

### **1.1.1.3. Fonctionnement de la rétine.**

#### **1.1.1.3.1. La cascade de phototransduction.**

La rétine transforme l'énergie lumineuse en énergie électrique grâce à la cascade de phototransduction qui a lieu au niveau des disques des segments externes qui contiennent la rhodopsine. Dans ce paragraphe nous détaillerons le mécanisme moléculaire de la phototransduction dans les bâtonnets (Figure 9). Les mécanismes ayant lieu dans les cônes n'ont été élucidés que récemment (Arshavsky, 2002; Wolf, 2004 ; Fu *et al.*, 2007 ). Lorsque la rétine ne reçoit pas de lumière, les canaux ioniques cGMP dépendants (cGMP gated channel, CNG), présents au niveau des membranes des segments externes des photorécepteurs sont spontanément ouverts. Le flux constant d'ions sodium et calcium, entraîne un équilibre ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Aucun potentiel électrique n'est émis.

Lorsque la rétine est éclairée, cet équilibre ionique va être perturbé de la façon suivante. Les photons traversent les différentes couches neuronales pour venir frapper la rhodopsine des photorécepteurs. La rhodopsine est un photopigment composé d'une molécule d'opsine et d'un chromophore, le 11cis-retinal. Elle est ancrée dans la membrane des disques des segments externes des photorécepteurs rétiniens. Lorsqu'un photon vient exciter ce photopigment (Figure 9, step 1), celui-ci se déstabilise en méta-rhodopsine par isomérisation du 11cis-retinal en alltrans-retinal (Figure 9, step 2). À partir de cette étape deux phénomènes différents vont avoir lieu en parallèle l'un de l'autre. D'une part, la déstabilisation de la rhodopsine va entraîner une cascade de réactions aboutissant à la génération d'un signal électrique, c'est la cascade de phototransduction. D'autre part la méta-rhodopsine va se scinder en deux parties : l'opsine et le alltransretinal, celui-ci devra alors subir le cycle des rétinoïdes pour être recyclé. La cascade de phototransduction débute par la déstabilisation de la rhodopsine en méta-rhodopsine, celle-ci induit le clivage de la sous-unité alpha de la transducine membranaire qui comporte trois sous unités : alpha, beta et gamma (Figure 9, step 3) (Sokolov *et al.*, 2002). Cette sous-unité alpha porte un domaine de liaison à la guanine.



**Figure 9 : La cascade de phototransduction et le clivage de la méta-rhodopsine.**

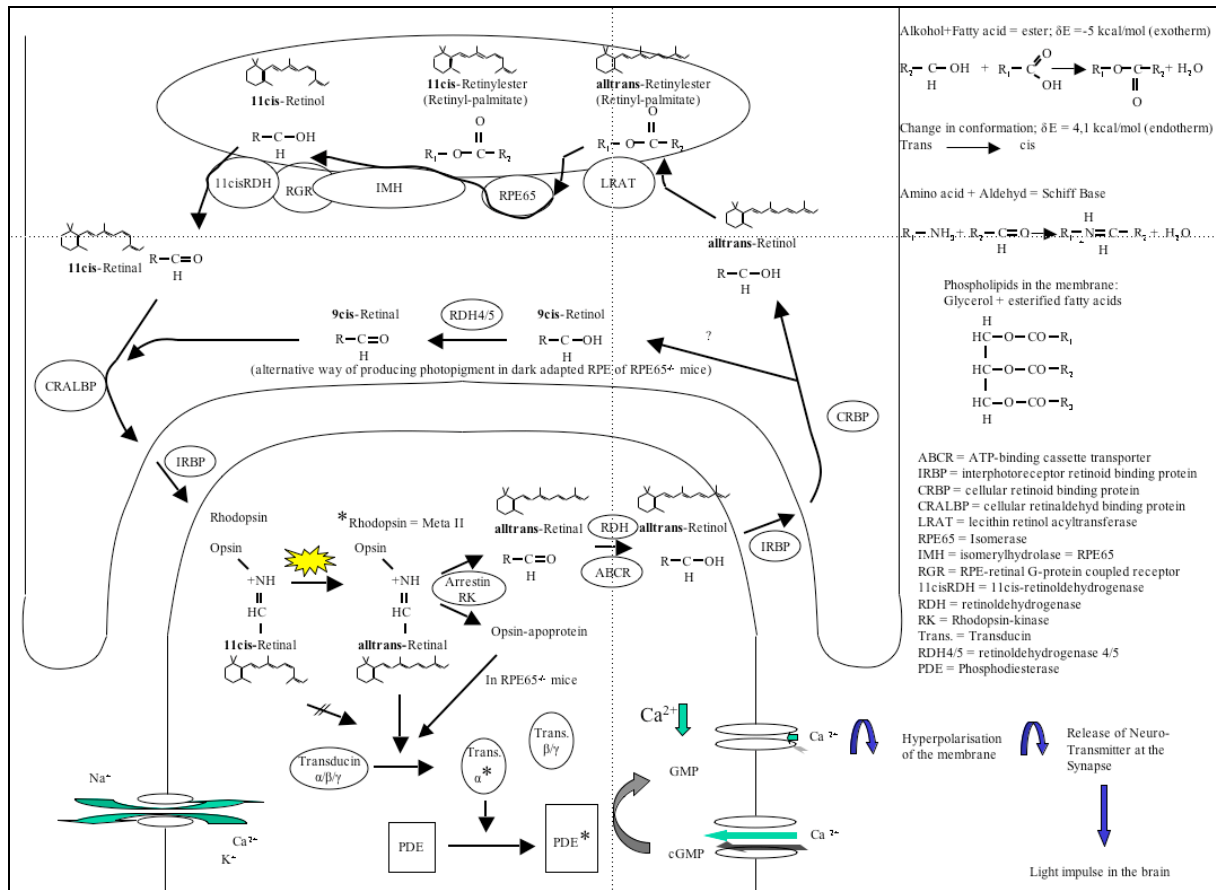
Les photons traversent les différentes couches neuronales de la rétine pour venir frapper la rhodopsine des photorécepteurs. La déstabilisation de la rhodopsine en méta-rhodopsine entraîne une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la génération d'un courant électrique qui sera transmis de proche en proche jusqu'au cerveau.

Il semblerait que la phosphodiesterase catalyse également le clivage de la transducine. Tandis que les sous-unités beta et gamma indissociables restent ancrées dans la membrane, la sous-unité alpha sort de la membrane et va activer la phosphodiesterase (PDE) qui catalyse l'hydrolyse du cGMP dans le cytoplasme (Figure 9, step 4). La diminution du taux de cGMP dans la cellule va entraîner la fermeture des canaux ioniques CNG (Figure 9, step 5). Le taux de calcium intra-cellulaire va alors diminuer à son tour entraînant une hyper-polarisation de la membrane du segment externe du photorécepteur. Cette hyper-polarisation se transmet de proche en proche le long du photorécepteur jusqu'à la terminaison synaptique où elle va se traduire par le relargage d'un neurotransmetteur (le glutamate) et la transmission du message électrique via les différentes couches neuronales de la rétine et le nerf optique jusqu'au cerveau où ce message sera interprété par le cortex visuel. Lorsque les canaux ioniques sont fermés, après un délai suffisant pour que le message électrique ait été créé et transmis, la guanylate cyclase (GC) activée par la diminution du taux de calcium intra-cellulaire, se charge de restaurer la concentration initiale de cGMP à partir du GMP hydrolysé et les canaux ioniques s'ouvrent à nouveau afin qu'un nouveau cycle visuel puisse avoir lieu.

Le second phénomène qui a lieu en parallèle de la cascade de phototransduction est le clivage de la méta-rhodopsine (Figure 9). Lorsque le taux de calcium intra-cellulaire est faible, la molécule de recoverine ancrée dans la membrane, retient l'enzyme rhodopsine kinase. Lorsque la concentration en calcium augmente, la recoverine se solubilise ce qui libère la rhodopsine kinase. La méta-rhodopsine est alors phosphorylée par la rhodopsine kinase puis elle est prise en charge par l'arrestine, ce qui induit le clivage en apo-protéine d'opsine et alltrans-retinal (Hanson *et al.*, 2007).

#### **1.1.1.3.2. Le cycle des rétinoïdes.**

Lorsque la cascade de phototransduction s'achève, la rhodopsine n'est plus intègre. La molécule d'opsine est prête à venir former une nouvelle molécule de photopigment mais le chromophore a été transformé en alltrans-retinal. Celui-ci doit donc nécessairement subir le cycle des rétinoïdes dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien pour pouvoir être recyclé en 11cis-retinal et s'associer à nouveau à une molécule d'opsine dans le segment externe du photorécepteur (Figure 10).



**Figure 10 : Le cycle des rétinoïdes (D'après la thèse de Knut Stieger).**

Lors de la cascade de phototransduction qui transforme l'énergie lumineuse en énergie électrique, le photopigment rhodopsine est déstabilisé en un composé appelé la méta-rhodopsine. Cette méta-rhodopsine est ensuite clivée en deux parties : l'apo-protéine opsine et le chromophore all trans-retinal. Le all trans-retinal doit alors subir le cycle des rétinoïdes pour être transformé en 11 cis-retinal, ce qui permettra le recyclage de la rhodopsine originelle.

Le cycle des rétinoïdes débute par la déshydrogénation du alltrans-retinal en alltrans-retinol dans le photorécepteur grâce à la rétinol-déshydrogénase et à l'ABCT (ATP-binding cassette transporter). Puis le alltrans-retinol passe du segment externe du photorécepteur à l'épithélium pigmentaire rétinien grâce à la protéine IRBP (Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein) qui assure son passage d'une cellule à l'autre et à la protéine CRBP (Cellular RBP) qui assure sa prise en charge dans l'EPR. L'acyltransférase LRAT (lecithin retinol acyltransferase) transforme ensuite le alltrans-retinal en alltrans-retinylester puis l'enzyme RPE65 (Retinal Pigment Epithelium derived protein of 65kDa) isomérisé le alltrans-retinylester en 11cis-retinylester (Moiseyev *et al.*, 2005). Celui-ci subit alors l'action d'une hydrolase qui le transforme en 11cis-retinol.

Avant d'avoir identifié RPE65 comme l'isomérase responsable de la réaction précédente, on nommait IMH l'isomérohydrolase qui prenait en charge les deux réactions (isomérisation et hydrolyse). Enfin, la 11cisRDH (11cis-retinoldéshydrogénase) associée au RGR (RPE-retinal G protein coupled receptor) restaure le 11cis-retinal initial à partir du 11cis-retinol. Le chromophore recyclé est pris en charge dans l'EPR par la protéine CRALBP (Cellular Retinaldehyde Binding Protein) puis à nouveau pris en charge par l'IRBP pour retourner dans le segment externe du photorécepteur où il peut s'associer à une molécule d'opsine pour former un photopigment fonctionnel.

Comme nous venons de le décrire, la protéine RPE65 est une enzyme clé du cycle des rétinoïdes qui catalyse la réaction d'isomérisation du alltrans-retinylester en 11cis-retinylester. Nous reparlerons de cette enzyme plus tard dans ce manuscrit avec les chiens briards RPE65-déficents.

### **1.1.2. Les dystrophies rétinienne**

Les dystrophies rétinienne héréditaire sont des affections évolutive qui peuvent conduire à la cécité à plus ou moins longue échéance. Elles peuvent être acquise comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la rétinopathie diabétique (RD) ou congénitale comme les rétinite pigmentaire (RP) (Maubaret *et al.*, 2005). À ce jour, 196 loci impliqués dans les dystrophie rétinienne héréditaire ont été identifiés et 149 gènes ont été caractérisés ([www.sph.uth.tmc.edu/retnet/](http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/)).

Le nom de *retinitis pigmentosa* aurait été proposé en 1855 par le Néerlandais Franz Donders, pour décrire une affection cécitante caractérisée par l'apparition de dépôts pigmentaire au fond d'oeil. Les RP correspondent à un groupe hétérogène de pathologie



rétiniennes d'origine génétique et se caractérisent par une dégénérescence progressive des photorécepteurs rétiniens aboutissant généralement à une cécité à l'âge adulte. La prévalence des RP est de 1/4000, ce qui porte à environ un million, le nombre de personnes atteintes dans le monde dont 30 000 en France. L'atteinte rétinienne peut être isolée, c'est le cas des RP non syndromiques, ou associée à des atteintes sur d'autres organes, c'est le cas des RP syndromiques.

### **Les RP non syndromiques**

#### **Les RP classiques ou « rod-cone dystrophies »**

Elles sont caractérisées par une dégénérescence précoce des bâtonnets suivie par une dégénérescence des cônes. Chez les patients atteints de « rod-cone dystrophies », les premiers signes cliniques sont une cécité en condition de faible éclairage dite scotopique (héméralopie) et un champ visuel qui se rétrécit en périphérie jusqu'à une vision « tubulaire ». Dans un second temps, l'acuité visuelle fine, la perception des couleurs et la vision centrale en condition d'éclairage diurne dite photopique est à son tour atteinte. À ce stade de la maladie, l'électrorétinogramme est inenregistrable (ERG plat) et une importante diminution du calibre des vaisseaux rétiniens ainsi qu'une pâleur papillaire sont observées.

#### **Les RP inversées ou « cone-rod dystrophies »**

Elles sont caractérisées par une perte précoce des cônes associée à une diminution de l'acuité visuelle, une photophobie et une dyschromatopsie (difficulté de distinction des couleurs). La vision centrale est atteinte dès le début de la maladie, relayée plus tard par des troubles du champ visuel périphérique. Cette forme particulière de RP concerne environ 10% des cas et cause un handicap plus sévère que les RP classiques.

#### **Les dystrophies maculaires ou « cone dystrophies »**

Ces pathologies ont la particularité de n'affecter que les cônes et pas les bâtonnets. Les patients, même s'ils sont incapables de lire ou de conduire puisqu'ils ont perdu l'acuité visuelle fine, restent relativement autonome.

L'apparition des symptômes lors de RP peut aller de la naissance pour l'amaurose congénitale de Leber, à 60 ans pour les rétinites pigmentaires tardives.

De nombreux gènes responsables des RP ont été identifiés. Le premier à avoir été découvert a été le gène codant pour la rhodopsine. En 1990, deux équipes mettent en évidence que la substitution de la proline par une histidine dans le codon 23 de la rhodopsine est responsable de RP autosomale dominante chez l'Homme (Dryja *et al.*, 1990 ;

Farrar *et al.*, 1990; Humphries *et al.*, 1990 ; Dryja *et al.*, 1991 ). Les trois types de transmission mendélienne peuvent être responsables des RP non syndromiques : la transmission autosomale récessive (50-60%, 16 gènes identifiés), la transmission autosomale dominante (30-40%, 15 gènes identifiés) ou la transmission liée à l'X (5-15%, 2 gènes identifiés) ([www.sph.uth.tmc.edu/retnet/](http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/)). La plupart des cas de RP non syndromiques est monogénique, toutefois les formes de RP à transmission digénique peuvent exister, mais elles sont rares (exemple : mutations simultanées dans la périphérine et ROM1, retinal outer segment membrane protein 1).

Les gènes impliqués dans les cas de RP codent généralement pour des protéines de la transduction visuelle (comme la rhodopsine, la transducine ou la phosphodiesterase), des protéines du cycle des rétinoïdes (comme LRAT ou RPE65), des protéines de structure des photorécepteurs (comme la périphérine, ROM1 ou RPGRIP1) ou encore des protéines de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'EPR (comme MERTK). Toutefois, les gènes identifiés ne sont responsables que de la moitié des cas de RP, ce qui indique que de nombreux gènes responsables sont encore inconnus à ce jour.

### **L'amaurose congénitale de Leber**

Une forme particulière de RP non syndromique extrêmement précoce est appelée amaurose congénitale de Leber (ACL). Décrite pour la première fois par Théodor Leber en 1869, l'amaurose congénitale de Leber est une variante de RP extrêmement grave où la perte de fonction rétinienne est observable très précocément. Le diagnostic est habituellement posé dès la naissance ou dans les premiers mois de la vie. Cette pathologie qui se caractérise par une cécité dès la naissance ou dans la petite enfance, représente 5% de toutes les rétinopathies et concerne 1000 à 2000 enfants en France. Les signes cliniques classiques sont une incapacité à fixer les objets, un nystagmus, un réflexe photomoteur diminué, et la présence d'un signe oculo-digital de Franschetti. Le fond d'oeil de ces très jeunes patients est normal mais l'électrorétinogramme est plat.

L'ACL est une pathologie génétique hétérogène dont le mode de transmission est le plus souvent autosomale récessif. Actuellement 14 gènes responsables d'amaurose congénitale de Leber ont été caractérisés (CEP290, RetGC1/GUCY2D, CRB1, CRX, LRAT, RD3, RDH12, LCA5/Leberciline, RPGRIP1, RPE65, TULP1, MERTK, AIPL1, IMPDH1). Soixante-dix pourcent des cas d'ACL sont associés à des mutations dans ces 14 gènes, ce qui signifie à nouveau qu'un certain nombre de gènes restent encore à découvrir (den Hollander *et al.*, 2008). Dans les RP comme dans l'ACL, le stade final de la maladie est toujours l'apoptose des photorécepteurs rétiens.

## **Les RP syndromiques**

### **Le syndrome d'Usher**

Parmi les RP syndromiques, le syndrome d'Usher est le plus fréquent (10 à 20% des rétinoopathies pigmentaires) et est associé à une surdité à la naissance.

### **Le syndrome de Bardet-Biedl**

C'est un syndrome plus rare qui associe à la rétinite pigmentaire, une ob  sitt  , une déficience intellectuelle, la présence de doigts surnuméraires (polydactylie), des malformations génitales, cardiaques et des anomalies rénales responsables de la mortalité de ce syndrome.

### **Le syndrome de Senior Locken**

Ce syndrome est une ciliopathie à transmission autosomale récessive décrite pour la première fois en 1961. Il associe chez un même patient une dystrophie rétinienne identique à celle observée dans l'amaurose congénitale de Leber et une n  phronoptose (affection rénale grave qui nécessite une dialyse de façon permanente) qui apparaît dès l'âge de 3 ans.

## **Les ciliopathies**

Certaines des RP peuvent être qualifiées de ciliopathies rétiniennes lorsque le gène responsable de la pathologie est impliqué dans la structure et/ou la fonction des cils connecteurs des photorécepteurs, c'est le cas de l'ACL due à un défaut dans le gène RPGRIP1 ou de la RP due à un défaut dans le gène RPGR.

Parfois la ciliopathie rétinienne peut être syndromique lorsque les dysfonctionnements atteignent les structures ciliaires présentes dans les photorécepteurs et dans d'autres types cellulaires. Ainsi le syndrome d'Usher atteint à la fois les photorécepteurs rétiniens et les cellules ciliées de l'oreille interne, le syndrome de Senior Locken atteint quant à lui les photorécepteurs rétiniens et les cellules ciliées rénales, tandis que le syndrome de Bardet-Biedel plus complexe atteint à la fois les photorécepteurs rétiniens, les cellules rénales et les gonades.

### **1.1.3. Dégénérescence des photorécepteurs par apoptose.**

La mort cellulaire peut intervenir de deux façons : la nécrose et l'apoptose. La nécrose est une mort cellulaire déclenchée par un traumatisme. C'est un mécanisme passif qui se caractérise par une entrée d'eau dans la cellule qui engendre un gonflement cellulaire associé à une destruction des organites et des membranes. Le contenu cytosolique se déverse alors dans son environnement ce qui entraîne une réaction inflammatoire.

L'apoptose est un terme anatomopathologique qui désigne les perturbations morphologiques et biochimiques aboutissant à la mort programmée des cellules. Cette mort cellulaire physiologique génétiquement programmée est nécessaire à l'embryogenèse et à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire et permet le maintien de l'homéostasie des tissus. L'apoptose est un mécanisme actif d'autodestruction déclenché par un signal de mort et qui se caractérise par une déshydratation cellulaire, une condensation du cytoplasme, une condensation de la chromatine en mottes compactes, une diminution du volume du noyau puis une fragmentation de l'ADN. Cette fragmentation résulte de l'activation d'une endonucléase qui coupe l'ADN entre les nucléosomes et conduit à l'apparition de fragments d'ADN de taille équivalente à des multiples de 180 pb. La membrane plasmique restée intacte durant tout le processus, forme alors des bourgeonnements qui se détachent pour former les corps apoptotiques. La phosphatidylsérine, un phospholipide normalement présent sur le feuillet interne des membranes plasmiques des cellules, s'externalise au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. La présence de phosphatidylsérine à la surface des corps apoptotiques et de la cellule en apoptose permettront l'absorption de ces structures cellulaires par les cellules avoisinantes et les macrophages, sans déclencher de réaction inflammatoire.

De nombreux signaux peuvent déclencher un phénomène d'apoptose, comme la déplétion en facteurs de croissance, les dommages subis par l'ADN cellulaire (irradiation) qui rendent la cellule dysfonctionnelle ou potentiellement cancéreuse, des signaux hormonaux comme les glucocorticoïdes qui permettent la régulation du système immunitaire, la perte de contact physique entre une cellule et son environnement, ou encore le vieillissement cellulaire normal se traduisant par une dégradation des télomères des chromosomes.

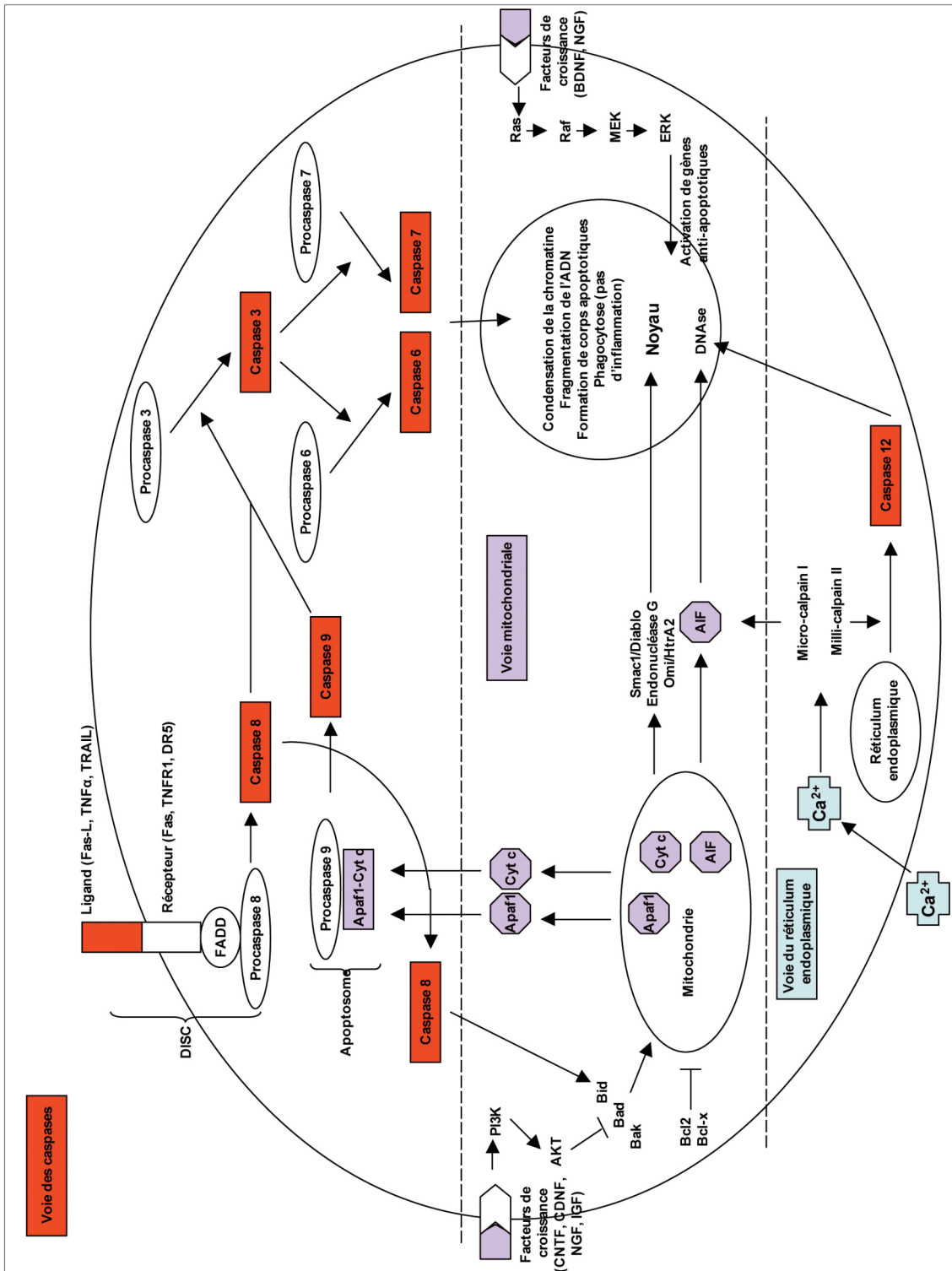
L'apoptose des photorécepteurs rétiniens, phénomène pourtant essentiel et bénéfique lors de l'embryogenèse de l'oeil, est le mécanisme final commun à toutes les rétinites pigmentaires. La voie d'initiation de l'apoptose dépend de la nature et de la sévérité

du dommage. Elle peut être déclenchée par un grand nombre de défauts génétiques ou environnementaux impliquant différents mécanismes. Initialement, l'apoptose avait été décrite comme étant un phénomène dépendant des protéases à cystéines appelées caspases (cysteinyI-aspartate-cleaving proteases) (Thornberry *et al.*, 1998 ; Nicholson, 1999). Puis, plusieurs études concernant des modèles animaux de dégénérescence rétinienne ont montré qu'il existait des voies d'initiation de l'apoptose qui ne dépendaient pas des caspases (Carmody *et al.*, 2000 ; Donovan *et al.*, 2002 ; Doonan *et al.*, 2003). Bien que le processus d'apoptose soit largement documenté, l'élément déclencheur de cette cascade d'évènement reste souvent indéterminé. Les récentes découvertes tendent à prouver qu'en fonction du signal de mort initial, trois principales voies entraînent l'apoptose des photorécepteurs (Figure 11 ) : (i) la voie intrinsèque mitochondriale ou MMP (mitochondrial membrane permeabilization), (ii) les voies extrinsèques dépendantes des caspases qui impliquent soit la présence des récepteurs de mort de la superfamille du TNF (tumor necrosis factor) alpha, soit la déplétion en facteurs de croissance et enfin (iii) la voie du réticulum endoplasmique indépendante des caspases impliquant, entre autres molécules, les micro-calpaïnes (Doonan *et al.*, 2003; Paquet-Durand *et al.*, 2006; Paquet-Durand *et al.*, 2007). Ces trois mécanismes sont intimement liés mais peuvent être activés indépendamment les uns des autres (Marigo, 2007).

### **1.1.3.1. Les voies d'initiation de l'apoptose.**

#### **1.1.3.1.1. Les voies extrinsèques directement dépendantes des caspases.**

Les caspases sont localisées dans le cytoplasme cellulaire sous forme de zymogènes appelées procaspases. Ces procaspases vont alors être clivées et dans certains cas dimérisées pour former les caspases actives. À ce jour, 15 caspases différentes ont été identifiées (Wenzel *et al.*, 2005). Les caspases pro-apoptotiques sont classées en deux grandes catégories selon la taille du pro-domaine N terminal : les caspases initiatrices -1, -2, -8, -9, -10 et -12 qui possèdent un pro-domaine long et les caspases effectrices -3, -6 et -7 qui possèdent un pro-domaine court et sont directement impliquées dans le clivage de différentes protéines intracellulaires (Strasser *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2001). Les caspases -4 et -5 sont pro-inflammatoires et jouent un rôle dans l'activation des cytokines. Les voies extrinsèques directement dépendantes des caspases peuvent être initiées par deux évènements, la présence d'un ligand de mort sur son récepteur cellulaire ou l'absence d'un facteur de croissance sur son récepteur cellulaire.



**Figure 11 : Les mécanismes d'apoptose.**

Représentation schématique des principales voies d'initiation de l'apoptose. La fixation d'un ligand de mort sur son récepteur induit la voie dépendante des caspases (en rouge). La déplétion en facteur de croissance induit la voie de perméabilisation de la membrane mitochondriale (en mauve). La variation de la concentration en calcium induit la voie dépendante du réticulum endoplasmique (en bleu).

#### 1.1.3.1.1.1. La présence d'un ligand de mort sur son récepteur cellulaire.

L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose se fait en réponse à la fixation de ligands spécifiques de type cytokines sur des récepteurs de surface appelés récepteurs de mort. Ces récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs au tumor necrosis factor (TNFR) et incluent des récepteurs tels que le récepteur Fas, les récepteurs au TNF (TNFR-1, TNFR-2) et les récepteurs au TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) DR-4 et DR-5 (Ashkenazi, 2002). Lorsqu'un ligand de mort tel que le TNF alpha, le Fas-Ligand ou le TRAIL s'associe à son récepteur membranaire respectivement TNFR1/2, Fas ou DR4/5, la fixation conduit à la trimérisation du récepteur qui lui permet d'être actif. La signalisation du récepteur de mort activé se fait par sa région cytoplasmique qui possède une séquence conservée appelée death domain (DD). L'activation du récepteur conduit au recrutement de protéines adaptatrices au niveau du DD. Ces protéines adaptatrices appelées Fas associated death domain (FADD) ou TNF receptor associated death domain (TRADD) possèdent leur propre DD par lequel elles sont recrutées au niveau des récepteurs activés. Les protéines adaptatrices possèdent également un second domaine d'interaction protéique appelé death effector domain (DED). Le domaine DED des protéines adaptatrices FADD ou TRADD interagit alors avec le domaine DED des pro-caspases initiatrices -8 et -10. Le complexe ainsi formé est appelé death inducing signaling complex (DISC) (Boatright *et al.*, 2003). La caspase-8 activée (forme dimérique) active alors à son tour les caspases dites effectrices -3, -6 et -7 qui sont responsables de la phase d'exécution de l'apoptose (Khosravi-Far *et al.*, 2004). C'est principalement au niveau de la formation du DISC que la voie extrinsèque est régulée. Il existe une isoforme de la caspase-8 appelée Flice-inhibitory protein (FLIP), qui contient 2 domaines DED mais pas de site catalytique. Cette protéine FLIP agit en entrant en compétition avec les caspases-8 et -10 et en empêchant leur recrutement au niveau du DISC (Krueger *et al.*, 2001). L'activation des caspases effectrices peut nécessiter une amplification du signal apoptotique via l'activation de la voie intrinsèque ou voie de perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP). Le lien entre les deux voies d'induction de l'apoptose est assuré par une petite molécule de la famille des protéines Bcl-2 (B cell lymphoma-2) appelée Bid. En effet, la caspase-8 activée clive Bid. La forme tronquée de Bid appelée tBid est alors rapidement transloquée du cytosol vers la membrane mitochondriale où elle se lie à Bax ou à d'autres protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et induit l'activation de la voie MMP (Luo *et al.*, 1998).

#### 1.1.3.1.1.2. La déplétion en facteur de croissance.

Deux voies de signalisation peuvent être impliquées dans le déclenchement de l'apoptose via une déplétion en facteurs de croissance. Tout d'abord la voie des MAP (Mitogen Activated Proteins) kinase. Lorsque le facteur de croissance BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ou NGF (Nerve Growth Factor) s'associe à son récepteur membranaire, ceci déclenche la cascade séquentielle Ras-Raf-MEK-ERK qui aboutit à une activation des gènes anti-apoptotiques dans le noyau. En absence de BDNF ou NGF, les gènes anti-apoptotiques ne sont plus activés ce qui revient à lever un mécanisme de protection cellulaire important. La seconde voie de signalisation impliquée dans ce mécanisme est la voie des phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K). Lorsque le facteur de croissance CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), CDNF (Conserved Dopamine Neurotrophic Factor), NGF (Nerve Growth Factor) ou IGF (Insulin-like Growth Factor) s'associe à son récepteur membranaire, ceci active le PI3K qui à son tour va activer la sérine-thréonine kinase Akt. Akt va alors inhiber l'expression de Bid, Bad, Bak qui sont des petites molécules de la famille de Bcl-2 qui ont pour rôle d'ouvrir les canaux protéiques qui forment alors les pores de la membrane mitochondriale. Lorsque ces molécules (Bid, Bad, Bak) sont inhibées par Akt, cela entraîne une fermeture des canaux protéiques. Au contraire, lorsqu'aucun facteur de croissance ne vient activer cette voie des PI3K, les molécules Bid, Bad, Bak ne sont plus inhibées ce qui entraîne une perméabilisation de la membrane mitochondriale et de ce fait le déclenchement de la voie mitochondriale de l'apoptose (voir paragraphe suivant).

#### **1.1.3.1.2. La voie de perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) ou voie intrinsèque.**

La mitochondrie est un organite cellulaire majeur qui est constitué d'une membrane externe, d'un espace intermembranaire, d'une membrane interne et d'une matrice. La mitochondrie joue un rôle primordial dans la physiologie de la cellule en générant l'énergie nécessaire à toutes les réactions biochimiques de la cellule. Cette énergie dérive de la production d'ATP qui se fait par phosphorylation oxydative dans la chaîne respiratoire. En dehors de son rôle métabolique, il est apparu depuis une dizaine d'années que la mitochondrie joue également un rôle clé dans l'apoptose (Green *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 2000).

L'action régulée de molécules de la famille Bcl-2, (qui comprend une trentaine de membres divisés en deux catégories : les molécules pro et anti-apoptotiques) permet d'ouvrir et de fermer les canaux oligo-protéiques de la membrane externe des mitochondries. Ainsi



les molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x permettent de maintenir les pores membranaires fermés tandis que les molécules pro-apoptotiques Bax, Bad, Bak et Bid déclenchent l'ouverture des pores et rendent donc la membrane mitochondriale perméable.

Le déclenchement de la voie mitochondriale dépendante des caspases se fait après relargage du cytochrome c depuis la mitochondrie. Le cytochrome c est synthétisé sous forme de précurseur cytoplasmique qui est incapable de participer à l'induction de l'apoptose. Le précurseur est importé dans la mitochondrie où il subit une maturation. La protéine devenue globulaire se lie à un hème. Le cytochrome c est séquestré au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial où il exerce sa fonction physiologique de transporteur dans la chaîne respiratoire (Ravagnan *et al.*, 2002). L'action de diverses molécules des voies de signalisation intracellulaire sur les molécules de la famille des Bcl-2 décrites précédemment, peut entraîner la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme cellulaire participe alors à l'activation de la cascade des caspases en activant une caspase initiateur, la caspase-9. L'activation de la caspase-9 se fait au sein d'un complexe multiprotéique. Ce complexe appelé apoptosome est constitué du cytochrome c, de la protéine Apaf-1 elle-même relarguée par la mitochondrie, d'ATP et de procaspase-9. La caspase 9 active est alors capable de recruter et d'activer les caspases effectrices -3, -6 et -7.

La voie mitochondriale de l'apoptose peut également être indépendante des caspases. Ainsi, d'autres molécules pro-apoptotiques sont relarguées de la mitochondrie comme l'AIF (Apoptosis Inducing Factor), l'endonucléase G et des inhibiteurs des IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins). L'AIF est transloqué dans le noyau où il induit une condensation de la chromatine ainsi qu'un clivage de l'ADN en fragments d'environ 50 kb, ceci par interaction directe avec l'ADN sans spécificité de séquence (Ye *et al.*, 2002). L'endonucléase G est une nucléase mitochondriale non-spécifique de 30 kDa, très conservée chez les eucaryotes (Li *et al.*, 2001), qui est elle aussi transloquée dans le noyau pour y détruire l'ADN. Enfin, les inhibiteurs des IAP comme Smac1/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspase 1 / Direct IAP Binding protein with Low pI) et Omi/HtrA2 se lient aux IAP et inhibent leur activité anti-apoptotique (Verhagen *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 2001; Martins, 2002).

Qu'elle soit déclenchée par la voie intrinsèque ou extrinsèque, la cascade des caspases est régulée par les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) qui se lient directement aux procaspases et empêchent leur clivage (Deveraux *et al.*, 1999). Les protéines de la famille des IAP telles que XIAP (X-linked IAP), c-IAP-1 ou c-IAP-2 interagissent avec les caspases-3, -7 et -9 par l'intermédiaire de domaines conservés appelés BIR (baculoviral IAP repeat).

#### 1.1.3.1.3. La voie dépendante du réticulum endoplasmique.

Le réticulum endoplasmique (RE) est le site d'assemblage des protéines, de modifications post-traductionnelles et de l'acquisition des structures conformationnelles des protéines nouvellement synthétisées. Le RE est également un site de stockage du calcium intracellulaire, qui permet de réguler la concentration cytoplasmique en calcium. Depuis quelques années un nouveau rôle dans la réponse au stress cellulaire et l'induction de l'apoptose est apparu concernant le RE. Plusieurs voies apoptotiques peuvent être induites après un stress du RE.

La première est l'induction transcriptionnelle de CHOP (C/EBP homologous protein), un membre de la famille des facteurs de transcription C/EBP (Ron *et al.*, 1992). CHOP est peu ou pas exprimé dans des conditions physiologiques normales et est fortement induit en réponse à un stress du réticulum. Sa surexpression conduit à un arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose (Gotoh *et al.*, 2002).

La seconde voie d'induction de l'apoptose met en jeu la voie de transduction cJun N-terminal kinase (JNK) (Urano *et al.*, 2000).

La dernière voie d'activation met en jeu les micro-calpaïnes qui sont activées par l'augmentation du calcium intracellulaire. L'activation de ces calpaïnes a pour effet d'activer la caspase-12. Cette activation conduit à l'apoptose. Il semblerait que JNK agisse comme partenaire dans l'activation de la caspase-12.

Ces différentes voies de signalisation peuvent être impliquées dans l'apoptose des photorécepteurs mais pour bon nombre de modèles de dégénérescence rétinienne on ne connaît ni le facteur déclenchant, ni la voie de signalisation mise en jeu.

Toutefois, dans certains modèles de dégénérescence rétinienne, des facteurs environnementaux ont été identifiés comme étant l'élément déclencheur de la cascade apoptotique. Parmi ces facteurs environnementaux responsables du déclenchement de l'apoptose se trouvent le stress oxydatif, l'excès de lumière et les variations du niveau de calcium intra-cellulaire.

### **1.1.3.2. Les facteurs environnementaux responsables de l'apoptose.**

#### **1.1.3.2.1. Le stress oxydatif.**

La choroïde, qui joue le rôle d'organe nourricier de la rétine, n'est pas capable de réguler l'apport en oxygène. Or les photorécepteurs rétiens sont très sensibles aux variations de concentration en oxygène (Tanito *et al.*, 2002; Osborne *et al.*, 2004; Sanvicens *et al.*, 2004; Sanvicens *et al.*, 2006). Une modification de l'état d'oxydoréduction cellulaire peut rapidement induire un processus de dégénérescence rétinienne (Sanvicens *et al.*, 2004). Dans le cas d'une suroxygénation, la choroïde envoie un excès d'oxygène aux cellules photoréceptrices de la rétine. Les mitochondries très nombreuses dans le segment interne des photorécepteurs vont alors synthétiser des céramides et des ROS (reactive oxygen species) (Donovan *et al.*, 2001; Sanvicens *et al.*, 2004; Tuson *et al.*, 2004; Sanvicens *et al.*, 2006). Les céramides vont inhiber les voies de survie des photorécepteurs tandis que les ROS vont activer la voie apoptotique MMP et la voie du réticulum endoplasmique. La synergie de ces deux phénomènes entraîne l'apoptose des photorécepteurs.

#### **1.1.3.2.2. L'excès de lumière.**

L'exposition prolongée à la lumière ou une exposition courte à une lumière vive est la cause de dégénérescence rétinienne dans de nombreux modèles animaux (Wenzel *et al.*, 2005). Lorsque la rétine est exposée de façon prolongée à la lumière ou qu'elle reçoit pendant une courte période une lumière trop intense, la quantité de photons arrivant sur les segments des photorécepteurs est trop grande par rapport au nombre de molécules de rhodopsine. Ceci va alors entraîner un phénomène de bleaching (saturation des photorécepteurs qui sont alors incapables d'absorber de nouveaux photons). Ce phénomène de saturation entraîne une augmentation des besoins intracellulaires en oxygène. L'hypo-oxygénation provoque un stress oxydatif (voir paragraphe précédent), qui peut conduire à la production de ROS (Tanito *et al.*, 2002; Wenzel *et al.*, 2005).

Une exposition courte à une lumière vive entraîne l'activation des facteurs de transcription c-Fos et c-Jun qui composent la protéine AP-1, et de ce fait, une activation de la voie des caspases (caspase 1) (Grimm *et al.*, 2001).

En revanche, une exposition prolongée à la lumière entraîne l'apoptose par une voie de signalisation dépendante de la transducine et indépendante de AP-1 (Hao *et al.*, 2002).

#### **1.1.3.2.3. Le niveau de calcium intra-cellulaire.**

Des mutations dans des gènes comme la phosphodiesterase induisent l'augmentation de la concentration du calcium intra-cellulaire. Cette augmentation déclencherait l'initiation de la voie apoptotique du réticulum endoplasmique (Doonan *et al.*, 2003; Paquet-Durand *et al.*, 2006; Sanges *et al.*, 2006). Les calpaïnes vont alors activer AIF et la caspase 12. Des études effectuées sur des rétines de rat ont également montré qu'une augmentation de la concentration du calcium intra-cellulaire peut initier la voie MMP et conduire au relargage du cytochrome c.

Dans le cas de l'amaurose congénitale de Leber due à un défaut dans le gène RPE65 ou RPGRIP1, qu'il s'agisse de la souris, du chien (respectivement briard ou mini teckel à poils longs) ou du patient, le mécanisme de déclenchement de la cascade apoptotique n'a pas été identifié.

Récemment, une étude centrée sur la souris rd1 atteinte de RP due à une mutation dans le gène de la phosphodiesterase, a montré que la mort des photorécepteurs rétiniens pouvait également faire intervenir des mécanismes indépendants de l'apoptose (Sancho-Pelluz *et al.*, 2008).

## **1.2. Le rôle de *RPGRIP1*.**

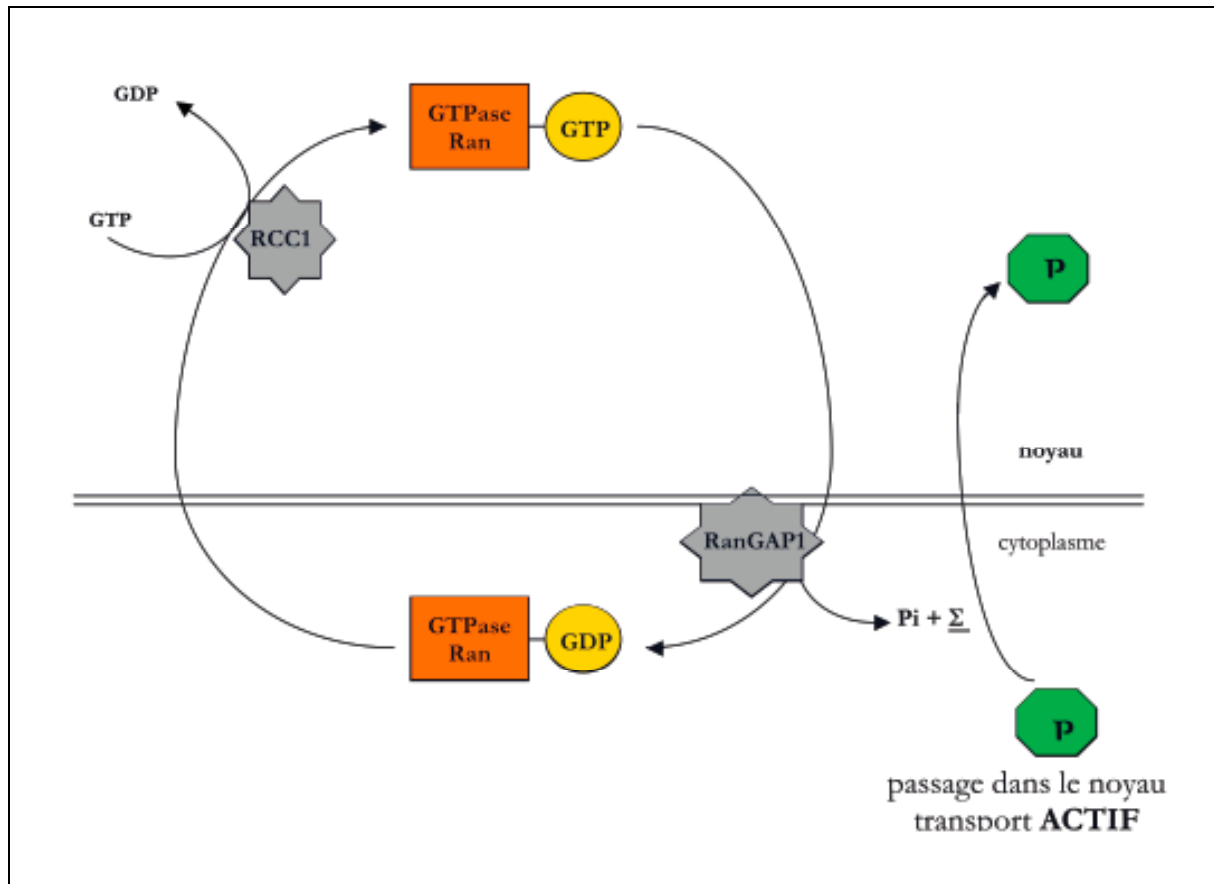
### **1.2.1. Structure et fonction de *RPGR*.**

Le gène *RPGR* (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator), lorsqu'il est muté, est responsable d'une forme très sévère de rétinopathie pigmentaire liée à l'X appelée RP3. Chez l'Homme, le gène *RPGR* est localisé sur le chromosome sexuel X dans la région Xp21.1 (Vervoort *et al.*, 2000).

La protéine *RPGR* est une protéine ubiquitaire exprimée dans tous les tissus mais une mutation dans le gène *RPGR* n'engendre de conséquences phénotypiques que dans la rétine. De nombreuses mutations conduisant à la RP sont situées dans un domaine particulier de *RPGR* : le domaine RHD (RCC1-homologous domain), ce qui semblerait indiquer que ce domaine homologue à *RCC1* joue un rôle majeur dans le fonctionnement de la rétine. Par ailleurs, de nombreuses mutations sont retrouvées dans le variant alternatif *RPGR-ORF15* chez les patients atteints de RP3, ce qui semblerait indiquer que ce variant joue également un rôle important dans la rétine (Wright *et al.*, 2007).

*RCC1* (Regulator of Chromosome Condensation 1) est un facteur d'échange de guanine (GEF, guanine nucleotide exchange factor) qui permet l'échange du GDP pour le GTP (Figure 12). La protéine Ran est une petite GTPase impliquée dans le transport nucléocytoplasmique. Dans le cytoplasme, Ran est associée à un GDP. La formation d'un complexe ternaire entre Ran, le GTP et le co-facteur GEF-*RCC1*, permet la formation de la GTPase Ran-GTP à partir de la GTPase Ran-GDP dans le noyau. Le retour de cette Ran-GTP dans le cytoplasme s'effectue grâce à la formation d'un complexe binaire entre Ran et le co-facteur Ran-GAP1 qui aboutit à la formation de la GTPase Ran-GDP à partir de la GTPase Ran-GTP. Ce retour dans le cytoplasme s'accompagne de la libération d'un phosphate et d'énergie qui permet alors le transport actif de molécules du cytoplasme dans le noyau.

Connaissant le rôle de *RCC1*, on peut imaginer que la protéine *RPGR* ait un rôle similaire de transport protéique intracellulaire.



**Figure 12 : Rôle du facteur de transcription RCC1.**

RCC1 est un facteur d'échange de guanine qui permet l'échange du GDP pour le GTP. Dans le cytoplasme, la petite GTPase Ran est associée à un GDP. La formation d'un complexe ternaire entre Ran, le GTP et le co-facteur GEF-RCC1, permet la formation de la GTPase Ran-GTP à partir de la GTPase Ran-GDP dans le noyau. Le retour de cette Ran-GTP dans le cytoplasme s'effectue grâce à la formation d'un complexe binaire entre Ran et le co-facteur Ran-GAP1 qui aboutit à la formation de la GTPase Ran-GDP à partir de la GTPase Ran-GTP. Ce retour dans le cytoplasme s'accompagne de la libération d'un phosphate et d'énergie qui permet alors le transport actif de molécules du cytoplasme dans le noyau.

Chez l'Homme comme chez la souris, le premier transcrit RPGR identifié était constitué de 19 exons (Meindl *et al.*, 1996). Les exons 1 à 11 codent pour le RHD tandis que les exons 12 à 19 codent pour une partie C-terminale riche en résidus acides. Par la suite, de nombreux variants d'épissage alternatif ont été mis en évidence. Chez l'Homme, les mini-exons alternatifs 15b1, 15b2 et 15a situés dans l'exon 15, introduisent chacun un codon stop prématuré. Les exons 14 et 15 peuvent quand à eux subir l'épissage. Il a également été mis en évidence des transcrits comprenant les séquences ORF14 et ORF15. La séquence ORF14 est composée de l'exon 14 et de l'intron 14, tandis que la séquence ORF15 est composée de l'exon 15 et d'une partie de l'intron15. Le variant composé des exons 1 à 14 et de la séquence ORF15 est appelé RPGR-ORF15 (Vervoort *et al.*, 2000). Chez l'Homme comme chez la souris, RPGR-ORF15 est l'isoforme majoritaire dans la rétine. Cette isoforme seule est capable de restaurer un phénotype normal chez des souris RPGR<sup>-/-</sup>. Il semblerait donc que ce soit l'isoforme RPGR-ORF15 qui soit fonctionnelle dans la rétine (Hong *et al.*, 2005).

RPGR est principalement localisé au niveau du cil connecteur des photorécepteurs dans la rétine (axonème et corpuscule basal) (Hong *et al.*, 2003). D'après sa localisation cellulaire, il est probable que RPGR joue un rôle dans le transport des molécules du segment interne du photorécepteur (où elles sont synthétisées), au segment externe (où elles sont utilisées). Des chercheurs ont montré que l'isoforme protéique RPGR-ORF15 serait liée à de nombreuses protéines au niveau de l'axonème et du corpuscule basal des cils connecteurs comme la calmoduline ou la néphronocystine 5, mais aussi à des protéines de transport intraflagellaire comme l'IFT88, la kinésine ou la dynéine, et à des protéines associées aux chromosomes comme SMC1 et SMC3 (Structural Maintenance of Chromosomes), elles mêmes localisées au niveau du cil connecteur des photorécepteurs (Khanna *et al.*, 2005).

Ces résultats donnent de nouvelles preuves que la protéine RPGR est possiblement impliquée dans l'organisation des microtubules et dans le transport intraflagellaire des photorécepteurs. Pour tenter d'élucider les mécanismes moléculaires qui conduisent à la RP de type 3, les chercheurs ont tenté d'identifier les partenaires moléculaires de la protéine RPGR dans la rétine.

### 1.2.2. RPGRIP1 : partenaire moléculaire de RPGR.

En 2000 puis 2001, trois équipes différentes mettent en évidence l'existence de la protéine RPGRIP1 (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein 1).

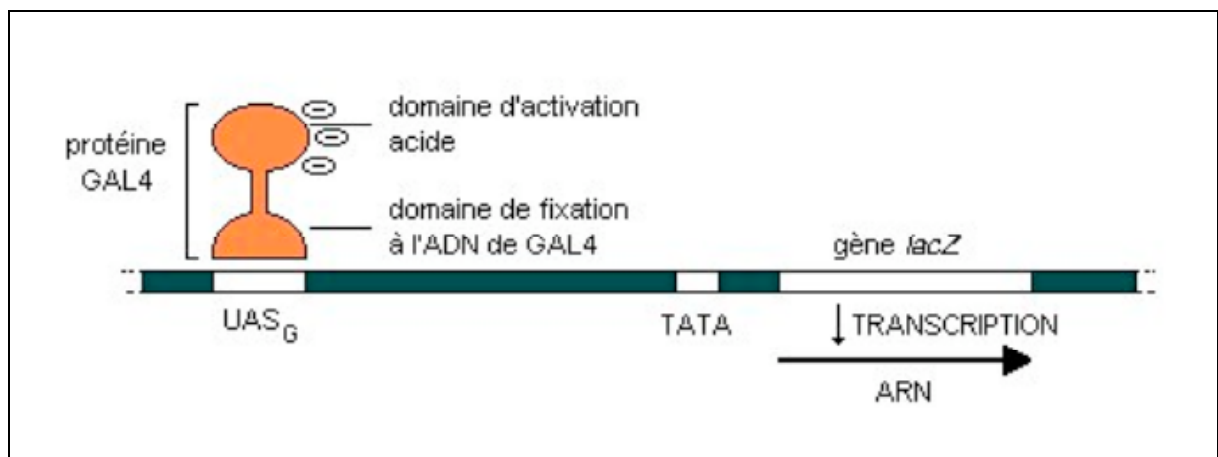
#### **Travaux de Alan Wright et al.**

Boylan et Wright découvrent la protéine RPGRIP1 grâce à un système de criblage double hybride en levures (Boylan *et al.*, 2000). Ce système de criblage permet d'identifier une interaction protéine-protéine *in vivo* par reconstitution d'un activateur de l'activité transcriptionnelle, ici le facteur de transcription GAL4 de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* (Fields *et al.*, 1989). La protéine GAL4 est constituée de deux domaines protéiques : d'une part le domaine N-terminal qui se lie spécifiquement à une séquence d'ADN (UAS<sub>G</sub> pour upstream activated sequence for the yeast Gal genes) et d'autre part le domaine C-terminal contenant une région acide dont les charges négatives participent à l'activation transcriptionnelle (Figure 13). Le criblage double-hybride (Figure 14) consiste à introduire deux plasmides codant pour des protéines de fusion chez la levure : le premier plasmide codant pour le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 fusionné à la protéine X appelée « appât » et dont on cherche les partenaires cellulaires (ici la protéine RPGR), et le second plasmide codant pour le domaine activateur de la transcription de GAL4, fusionné à la protéine Y appelé « proie ». La proie étant inconnue, Boylan et Wright ont utilisé les ADNc d'une banque de rétine de vache pour synthétiser un grand nombre de « proies ». L'interaction entre les deux protéines X et Y conduit à la reconstitution d'une protéine GAL4 fonctionnelle et donc à l'activation de la transcription du gène rapporteur contenant un site de liaison à GAL4. Cette technique a permis de mettre en évidence la liaison entre la protéine RPGR et une nouvelle protéine appelée RPGRIP1.

#### **Travaux de Paulo Ferreira et al.**

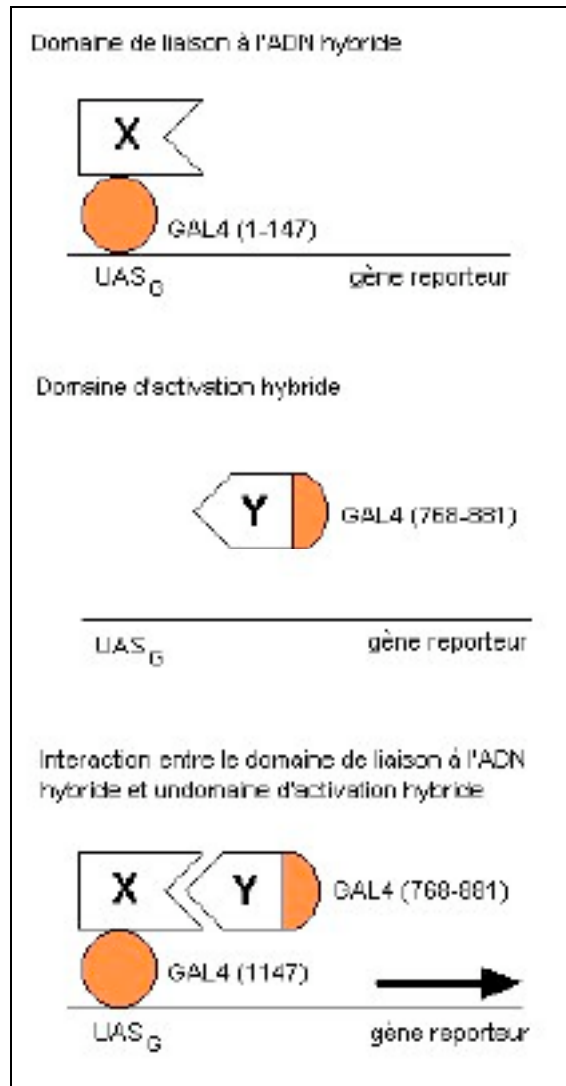
En utilisant la même technique de criblage double-hybride en levures avec la protéine RPGR comme « appât », l'équipe de P. Ferreira obtient la même année des résultats similaires (Roepman *et al.*, 2000). En utilisant des banques d'ADNc de rétine humaine et bovine comme « proies », les chercheurs identifient plusieurs molécules se liant à RPGR. Ces molécules se révèlent être des variants d'épissage alternatif correspondant à des isoformes de la protéine RPGRIP1. Les isoformes les plus longues obtenues chez l'Homme et la vache révèlent une similarité de 86% sur la séquence protéique.





**Figure 13 : Le facteur de transcription GAL4 (D'après Fields et al., 1989).**

La protéine GAL4 est constituée d'un domaine N-terminal qui se lie spécifiquement à une séquence d'ADN ( $UAS_G$ ) et d'un domaine C-terminal contenant une région acide dont les charges négatives participent à l'activation transcriptionnelle. La fixation du facteur de transcription GAL4 sur le domaine  $UAS_G$  entraîne l'initiation de la transcription du gène rapporteur *lacZ*.



**Figure 14 : Le criblage double hybride (D'après Fields et al., 1989).**

Le criblage double-hybride consiste à introduire deux plasmides codant pour des protéines de fusion chez la levure : le premier plasmide codant pour le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 fusionné à la protéine X appelée « appât » et dont on cherche les partenaires cellulaires, et le second plasmide codant pour le domaine activateur de la transcription de GAL4, fusionné à la protéine Y appelé « proie ». L'interaction entre les deux protéines X et Y conduit à la reconstitution d'une protéine GAL4 fonctionnelle et donc à l'activation de la transcription du gène rapporteur contenant un site de liaison à GAL4.

### **Travaux de Tiansen Li et al.**

L'année suivante (Hong *et al.*, 2001), l'équipe de Tiansen Li, qui utilise toujours la même technique de criblage mais cette fois avec une banque d'ADNc de rétine de souris, met à son tour en évidence l'existence de RPGRIP1 dans les cônes et les bâtonnets chez la souris.

## **1.2.3. Structure et fonction de RPGRIP1.**

### **Le gène RPGRIP1**

#### **Le gène RPGRIP1 humain**

Il a été localisé et séquencé (Roepman *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2001). Il est situé sur le chromosome 14 en position 14q11. En 2001, seulement 4 gènes responsables d'amaurose congénitale de Leber avaient été identifiés : RetGC1/GUCY2D (LCA1), RPE65 (LCA2), CRX (LCA6) et AIPL1 (LCA4). Deux gènes supplémentaires étaient toutefois considérés comme de bons candidats : LCA3 et LCA5. En étudiant le génotype de patients atteints d'amaurose congénitale de Leber et ne possédant de mutations dans aucun des 6 gènes connus, l'équipe de Jean-Michel Rozet a pu mettre en évidence des mutations dans le gène RPGRIP1 humain. Les études précédentes (Boylan *et al.*, 2000; Roepman *et al.*, 2000) avaient identifié un ADNc correspondant au gène RPGRIP1 humain codant pour une protéine de 903 acides aminés. L'alignement de cette protéine prédite avec les protéines orthologues murines et bovines semblaient montrer qu'il existait une partie N-terminale plus longue que celle prédite précédemment. La recherche des homologues de cette région N-terminale supplémentaire murine et bovine sur le chromosome 14 humain, a révélé l'existence de 9 exons supplémentaires en 5' (384 acides aminés) qui s'ajoutaient aux 15 exons déjà identifiés. La structure complète du gène a ainsi été déterminée. RPGRIP1 humain est composé de 3861 pb réparties en 24 exons codants et 23 introns, et codant pour une protéine de 1287 acides aminés.

#### **Le gène RPGRIP1 murin**

Le gène RPGRIP1 murin est localisé sur le chromosome 14 (14C2) (Hong *et al.*, 2001). Il code pour un ARNm de 4786 pb composé de 25 exons dont 24 exons codants. Le cadre de lecture ouvert contient 3993 nucléotides codant pour 1331 acides aminés.

## **Le gène RPGRIP1 canin**

Localisé sur le chromosome 15 canin, il existe seulement des séquences putatives de ce gène déterminées par bioinformatique. Le gène RPGRIP1 canin n'a jamais été cloné et séquencé.

## **Les transcrits RPGRIP1**

L'ARN messenger RPGRIP1, comme l'ARN messenger RPGR, subit un épissage alternatif important qui donne naissance à de nombreux variants. Chaque isoforme de la protéine RPGRIP1 possède une localisation cellulaire et subcellulaire spécifique ainsi que des propriétés biochimiques particulières (Lu *et al.*, 2005b). On dénombre au moins 4 isoformes chez l'Homme (RPGRIP1a/b/c/d). L'isoforme de poids moléculaire le plus élevé, RPGRIP1a qu'on appellera RPGRIP1 est l'isoforme majeure exprimée dans la rétine.

Dans l'étude de Paulo Ferreira (Roepman *et al.*, 2000), les isoformes humaines et bovines de RPGRIP1, mises en évidence par criblage double-hybride, contiennent toutes un domaine C-terminal appelé domaine RID (RPGR Interacting Domain), qui interagit avec le domaine RHD de la protéine RPGR, ainsi que des domaines super-enroulés (coiled-coil) dans la partie N-terminale, homologues aux domaines trouvés dans les protéines impliquées dans le trafic moléculaire. Après avoir séquencé les variants RPGRIP1 obtenus, l'équipe de recherche a pu mettre au point des sondes spécifiques de RPGRIP1 dans le but d'analyser les profils d'expression de l'ARN messenger et de la protéine RPGRIP1 dans la rétine. L'analyse des ARN messagers bovins par Northern Blot permet d'identifier différents transcrits RPGRIP1 : une isoforme ubiquitaire de 0,8 kb et deux isoformes exprimées exclusivement dans la rétine de 4,5 et 7,5 kb.

En 2005, Paulo Ferreira et ses collègues mettent en évidence un nouveau variant d'épissage alternatif chez l'Homme et la souris (Lu *et al.*, 2005a). Chez la souris, ce variant, appelé RPGRIP1b, est composé des exons 1 à 24 auxquels s'ajoute l'intron 13 introduisant un codon stop prématuré entre l'exon 13 et l'exon 14. Ce variant serait l'isoforme majoritaire dans la rétine de souris (plus abondant que le variant composé des 24 exons constitutifs) et coderait pour une protéine tronquée de ces domaines C2 et RID. L'abondance de ce transcrit dans la rétine murine laisse penser que RPGRIP1b aurait un rôle, totalement indépendant de RPGR. La colocalisation de RPGRIP1b avec le marqueur Lamp1 semble indiquer que ce variant est associé à une sous population de lysosomes.

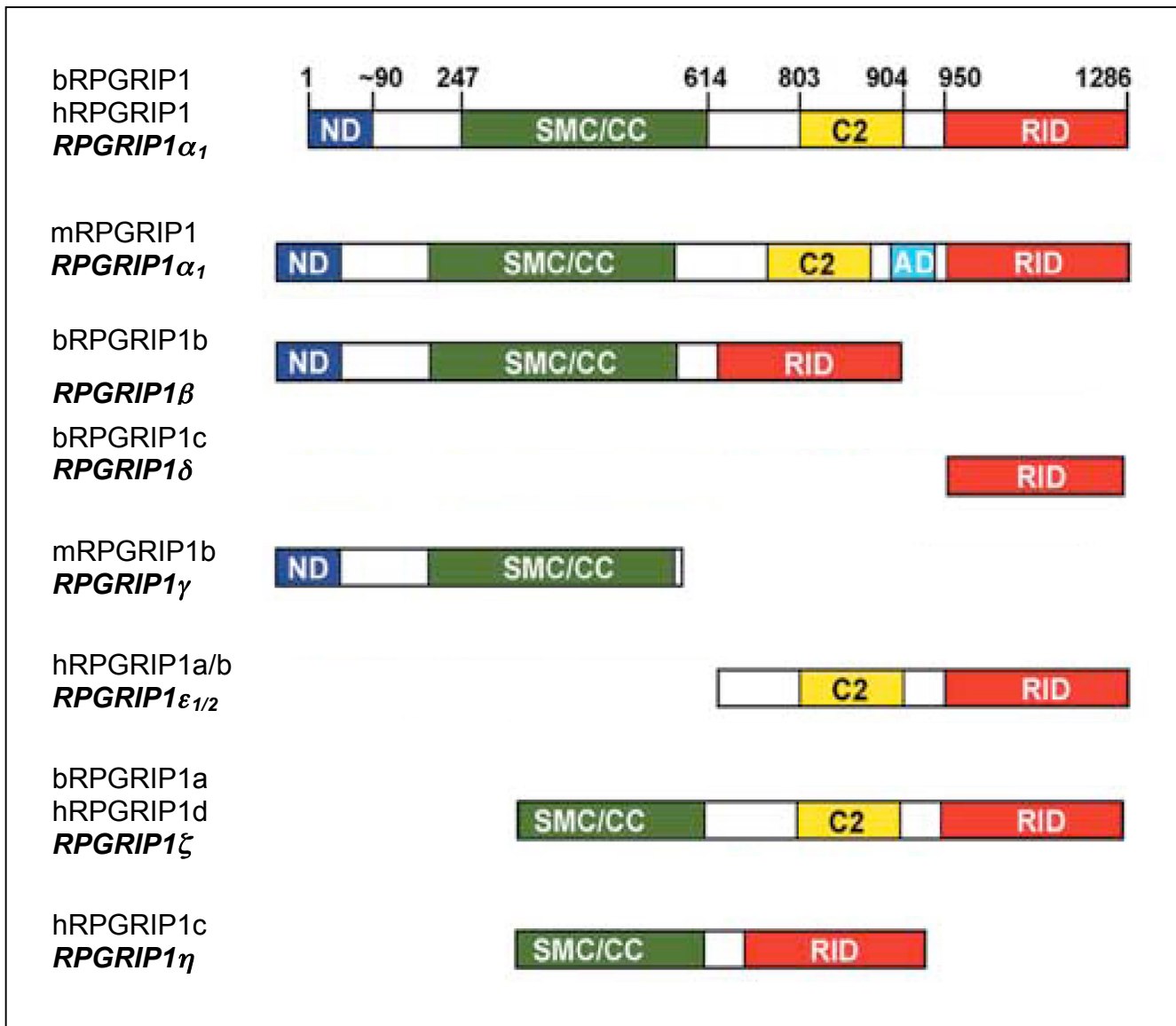
Ce transcrit qui retient l'intron 13 n'est pas retrouvé dans la rétine humaine. Mais un nouveau variant, où les 33 derniers nucléotides composants l'exon 13 ont été délétés (soit 11 acides

aminés), a toutefois été détecté dans la rétine humaine. Ce transcrit alternatif est largement minoritaire chez l'Homme en comparaison du transcrit non délété. Quelle que soit l'espèce, il semblerait que le ratio de ces différents transcrits dans les neurones rétiniens joue un certain rôle. Le déséquilibre de ce ratio, engendré par une mutation par exemple, pourrait contribuer à la pathogenèse.

### **Structure de la protéine RPGRIP1**

La protéine RPGRIP1 (humaine, bovine ou murine) est composée de 4 principaux domaines (Figure 15) : un domaine N-terminal ND (nuclear domain), un domaine qui code pour une structure super-enroulée SMC/CC permettant les interactions protéine-protéine et la polymérisation en filaments de RPGRIP1 (alpha-helical coiled coil-hinge-coiled coil protein interaction motif of member of the structural maintenance of chromosomes superfamily), un domaine central qui contient la partie conservée C2 de la protéine kinase répétée deux fois (potentiel site de liaison aux ions calcium) et un domaine C-terminal contenant le RID (RPGR Interacting Domain).

Les analyses protéiques (Western Blot) effectuées par l'équipe de Paulo Ferreira (Roepman *et al.*, 2000) permettent de mettre en évidence au moins quatre isoformes protéiques dans la rétine bovine dont les poids moléculaires apparents sont 175, 100, 97 et 48 kDa. La seconde partie de cette étude a également démontré que des mutations dans RPGR responsables de RP3 (4 mutants testés) diminuaient l'interaction avec RPGRIP1. Ces résultats semblent indiquer que la liaison RPGR-RPGRIP1 est indispensable au bon fonctionnement de la rétine. Compte tenu de l'homologie de RPGR avec la protéine RCC1 et de l'homologie de RPGRIP1 avec des protéines impliquées dans le trafic moléculaire, il est possible que RPGR et RPGRIP1 jouent un rôle dans le transport intraflagellaire des molécules dans les photorécepteurs.



**Figure 15 : Structure de RPGRIP1, d'après Ferreira et al., 2005.**

Isoformes connues de RPGRIP1 chez l'homme (h), la vache (b) et la souris (m). Ancienne et nouvelle nomenclature (en gras italique). RPGRIP1 est composé de 4 principaux domaines : ND, SMC/CC, C2 et RID. ND, nuclear domain; SMC/CC, structural maintenance of chromosomes / coiled-coil motif; C2, proteinase K C2 domain; RID, RPGR interacting domain.

## **Rôle de la protéine RPGRIP1**

### **Rôle de RPGRIP1 chez l'Homme**

En 2005, l'équipe de Paulo Ferreira a tenté d'élucider une partie des mécanismes impliquant RPGRIP1 dans le transport intraflagellaire au sein des photorécepteurs rétiniens (Lu *et al.*, 2005b). Pour cela, les chercheurs ont étudié les interactions entre le domaine RHD de RPGR et le domaine RID de RPGRIP1 en fonction de diverses mutations. Ils ont ainsi découvert que certaines mutations dans le domaine RID du gène humain ( $\Delta E1279$ ) augmentaient l'affinité de ce domaine pour le domaine RHD, tandis que d'autres mutations (D1114G), toujours dans le RID humain, abolissaient totalement ces interactions. Il semblerait que le domaine RID sauvage soit relativement instable et que les mutations du type  $\Delta E1279$  le stabilisent, favorisant ainsi les interactions avec RPGR. Des études immunohistologiques utilisant divers anticorps dirigés contre les différents domaines de RPGRIP1 semblent également montrer que la protéine RPGRIP1 bovine subirait une protéolyse très importante aboutissant entre autres, au clivage du domaine nucléaire (ND) N-terminal. La première étape de cette protéolyse donnerait naissance à deux fragments : un petit fragment N-terminal de 35 kDa et un grand fragment C-terminal de 140 kDa. Lors de la seconde étape de clivage, le domaine ND de 7 kDa serait dissocié du fragment N-terminal. Ce petit peptide de 7 kDa, très stable, serait alors transloqué dans le noyau, mais son rôle dans le noyau reste à déterminer. Il pourrait par exemple réguler l'expression de certains gènes impliqués dans la pathogenèse. En étudiant certaines isoformes de la protéine RPGRIP1 bovine et murine (isoformes délétées de la partie C2 et/ou RID), les auteurs ont pu mettre en évidence que la présence simultanée des deux domaines C2 et RID était nécessaire pour le clivage protéolytique et la translocation du domaine ND dans le noyau. L'analyse de la séquence N-terminale de RPGRIP1 a permis d'identifier une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) non canonique (KK/RXR), qui pourrait être responsable de la translocation du domaine ND dans le noyau. D'après les auteurs, l'isoforme la plus longue de RPGRIP1 (175 kDa) subirait les événements de protéolyse dont nous venons de parler uniquement dans les neurones internes de la rétine (cellules amacrines ou ganglionnaires), ce qui conférerait à RPGRIP1 un rôle particulier dans ces cellules. En revanche, cette protéolyse n'aurait pas lieu dans les photorécepteurs où seule l'isoforme de 175 kDa serait présente et fonctionnelle (liaison à RPGR) (Lu *et al.*, 2005b).

### **Rôle de RPGRIP1 chez la souris**

L'étude histologique réalisée par l'équipe de Tiansen Li chez la souris (Hong *et al.*, 2001) montre que les protéines RPGR et RPGRIP1 colocalisent au niveau du cil connecteur des cônes et des bâtonnets. Pour tenter de comprendre le rôle de RPGR et RPGRIP1 chez la

souris, les chercheurs utilisent des souris transgéniques  $RPGR^{-/-}$  et  $RPGRIP1^{-/-}$ . En observant les deux types de souris génétiquement modifiées, ils réalisent que le phénotype des souris  $RPGRIP1^{-/-}$  est plus sévère que celui des souris  $RPGR^{-/-}$ . L'analyse histologique de la rétine de ces souris révèle que chez les souris  $RPGR^{-/-}$ , la protéine  $RPGRIP1$  est correctement localisée au niveau du cil connecteur tandis que  $RPGR$  est absente alors que chez la souris  $RPGRIP1^{-/-}$  où il n'y a pas de protéine  $RPGRIP1$ , la protéine  $RPGR$  est présente dans le cytoplasme du segment interne des photorécepteurs (mauvaise localisation). Ces résultats tendent à montrer que  $RPGRIP1$  est présente dans un premier temps au niveau du cil connecteur et que par son interaction avec  $RPGR$ ,  $RPGRIP1$  permet l'ancrage de  $RPGR$  au niveau de ces structures. L'étude de microscopie électronique effectuée chez la souris montre que la protéine  $RPGRIP1$  est un polymère en forme de filament associé de façon stable à l'axonème du cil connecteur des photorécepteurs. Une étude publiée en 2005 par Alan Wright (Shu *et al.*, 2005), montre que dans des cultures de cellules ne comprenant pas de structures ciliaires, les protéines  $RPGR$  et  $RPGRIP1$  colocalisaient au niveau des centrioles cellulaires où se rejoignent les réseaux de microtubules. Les centrioles étant l'équivalent du corpuscule basal du cil connecteur dans les photorécepteurs, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Tiansen Li.

En 2003, l'équipe de Tiansen Li (Zhao *et al.*, 2003), précise un peu plus le rôle de  $RPGR$  et  $RPGRIP1$  chez la souris. En étudiant la morphologie des rétines de souris transgéniques  $RPGRIP1^{-/-}$ , ils observent que les segments externes de ces souris sont raccourcis et désorganisés, les disques sont difformes et empilés de façon anarchique. Les souris double knock-out (KO)  $RPGR^{-/-} RPGRIP1^{-/-}$  ont un phénotype et une morphologie rétinienne semblable aux souris qui possèdent seulement le défaut dans le gène  $RPGRIP1$ . Ces résultats confirment d'une part que la protéine  $RPGRIP1$ , grâce à ses domaines super-enroulés (coiled-coil) se polymérise en filaments qui s'accrochent à l'axonème du cil connecteur des photorécepteurs et permet l'ancrage de  $RPGR$  grâce à son domaine RID. D'autre part cette étude semble indiquer que la protéine  $RPGRIP1$  aurait également un rôle dans la morphogénèse des disques des segments externes des photorécepteurs. L'homologie de la séquence C-terminale de  $RPGRIP1$  avec l'Actine Fragmine Kinase (AFK), laisse penser que  $RPGRIP1$  pourrait faire partie d'un complexe protéique qui régulerait la réorganisation du cytosquelette d'actine permettant la néoformation des disques en continu.

De plus un nouveau modèle murin récemment décrit (Won *et al.*, 2009) semble mettre en évidence le rôle de  $RPGRIP1$  dans le développement embryonnaire de la rétine.



### **Interaction avec la néphrocystine-4**

Parmi les nombreux rôles de la protéine RPGRIP1, on peut également noter l'implication dans le syndrome de Senior-Loken qui est une ciliopathie associant une rétinite pigmentaire et une pathologie rénale appelée néphronophtisis . En effet, la néphrocystine-4 interagit avec les domaines C2 de RPGRIP1. L'abolition de l'interaction entre RPGRIP1 et la néphrocystine-4, due à une mutation de l'un ou l'autre des deux gènes, est responsable de néphronophtisis de type 4 (NPHP4) et du syndrome de Senior-Loken (RP associée à NPHP4) (Roepman *et al.*, 2005).

### **Protéolyse de la protéine RPGRIP1**

Outre l'épissage alternatif, la protéine RPGRIP1 subirait également une protéolyse importante dans les cellules (Lu *et al.*, 2005b). En effet, les différents essais d'extraction de la protéine RPGRIP1 à partir de photorécepteurs ont montré que cette protéine était extrêmement fragile car très sensible aux protéases (Castagnet *et al.*, 2003). Cette même étude de 2003 a également montré que les différentes isoformes de la protéine RPGRIP1 ainsi que les produits de protéolyse issus de RPGRIP1 étaient séquestrés différemment dans les compartiments cellulaires des neurones rétinien. Ces données semblent montrer que chaque isoforme et chaque produit de protéolyse aurait sa localisation cellulaire et subcellulaire spécifique (différente en fonction des espèces) associée à des propriétés biologiques et physico-chimiques propres. Ceci rend la compréhension du rôle général de RPGRIP1 extrêmement complexe.

### **1.2.4. Localisation cellulaire de RPGR et RPGRIP1.**

Il existe une controverse quant à la localisation cellulaire de RPGRIP1. En effet, d'après l'équipe de Paulo Ferreira, RPGRIP1 serait localisé dans les segments externes des bâtonnets dans la rétine humaine et bovine (Roepman *et al.*, 2000) et serait également présents chez l'Homme dans les segments externes des cônes, dans les cellules amacrines et parfois dans les cellules ganglionnaires (Mavlyutov *et al.*, 2002). Dans les cellules amacrines, RPGRIP1 est souvent associée à des composants du complexe des pores nucléaires (NPC nuclear Pore Complex) comme la nucléoporine RanBP2 (Ran Binding Protein 2) aussi appelé Nup358 (Nucleoporin 358 kDa) (Castagnet *et al.*, 2003) ce qui lui conférerait un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique. La présence de RPGRIP1 dans la couche nucléaire interne des neurones de la rétine et dans les cellules ganglionnaires, qui ont pour rôle la transmission de l'influx nerveux jusqu'au cerveau, pourrait contribuer à l'extrême sévérité de la pathologie. D'après l'équipe de Tiansen Li, RPGRIP1 serait associée

au cil connecteur des cônes et des bâtonnets chez la souris (Hong *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003). Selon ces données contradictoires, il existerait donc une localisation espèce-spécifique de RPGRIP1 dans la rétine (Mavlyutov *et al.*, 2002). Selon les auteurs, cette différence de distribution de la protéine en fonction des espèces pourrait être due à des différences de structure des photorécepteurs, et plus particulièrement des segments externes, entre les espèces et contribuerait aux différences de phénotypes observées. Aucune étude à ce jour n'a déterminé la localisation de RPGR et RGPGRIP1 chez le chien.

### **1.2.5. Modèles animaux et patients RPGRIP1<sup>-/-</sup>: vers un traitement par thérapie génique.**

#### **1.2.5.1. Les modèles murins.**

Pour comprendre la fonction de RPGRIP1 et évaluer l'efficacité de traitements potentiels, les chercheurs disposent de deux modèles de souris transgéniques. Dans le premier modèle murin appelé RPGRIP1<sup>-/-</sup> ou encore RPGRIP1<sup>tm1Tili</sup>, le variant long du gène RPGRIP1 a été invalidé par knock-out. Chez ces souris, dans un premier temps, les photorécepteurs se développent normalement mais les protéines des segments externes ne sont pas correctement localisées et la morphogenèse des disques des segments externes est altérée. Dans un second temps, les photorécepteurs dégénèrent et une perte totale de ces cellules est observée à l'âge de 3 mois. En utilisant ce modèle, l'équipe de Tiansen Li a publié en 2005 une étude qui montrait la faisabilité et l'efficacité d'un traitement par thérapie génique pour restaurer la fonction rétinienne (Pawlyk *et al.*, 2005). Nous détaillerons les résultats de cette étude dans le chapitre suivant.

Le second modèle murin RPGRIP1-déficient a été décrit très récemment par Patsy Nishina et ses collègues (Won *et al.*, 2009). Il s'agit des souris RPGRIP1<sup>nmf242</sup>. Ces souris ont été générées dans le cadre d'un programme de mutagenèse chimique par ENU (éthyl-nitroso-urée) du laboratoire Jackson (Maine, USA). Cette technique produit des mutations ponctuelles de façon aléatoire, qui sont ensuite caractérisées et corrélées au phénotype des animaux générés. Les souris RPGRIP1<sup>nmf242</sup> possèdent une mutation dans un site accepteur de l'épissage de l'intron 6 du gène RPGRIP1. La dégénérescence des photorécepteurs est plus rapide et plus précoce chez ces souris que chez les souris RPGRIP1<sup>-/-</sup>. L'analyse histologique de la rétine de ces souris montre une absence totale de segments externes des bâtonnets malgré la présence de cils connecteurs normaux. Les segments externes des cônes sont présents à des temps très précoces mais disparaissent très rapidement. Ces données semblent indiquer que RPGRIP1 aurait un rôle différent dans les 2 types de

photorécepteurs. La dégénérescence des photorécepteurs, cônes et bâtonnets, débute dès 12 jours après la naissance et 16 jours plus tard, une absence totale de photorécepteurs est observée. Cette étude montre que RPGRIP1 est impliquée dans la formation des segments externes des bâtonnets (Won *et al.*, 2009).

#### **1.2.5.2. Le modèle canin.**

Outre le modèle murin RPGRIP1<sup>-/-</sup>, il existe un modèle canin RPGRIP1<sup>-/-</sup>. La mutation présente chez le mini teckel à poils long RPGRIP1 déficient, a été identifiée pour la première fois en 2006 (Mellersh *et al.*, 2006). Il s'agit d'une insertion de 44 nucléotides dans l'exon 2, aboutissant à un codon stop prématuré. Le gène RPGRIP1 canin est localisé sur le chromosome 15 mais il n'a jamais été cloné. Le clonage de cet ADNc fera justement l'objet d'une partie de cette thèse. Deux études, dont la notre, ont traité de la caractérisation de la pathologie chez ce modèle canin d'amaurose congénitale de Leber (Turney *et al.*, 2007; Lheriteau *et al.*, 2009). Les détails concernant cette étude seront discutés dans la partie résultats de ce manuscrit.

#### **1.2.5.3. Les patients.**

Concernant les patients présentant un défaut dans le gène RPGRIP1, il est difficile d'évaluer leur nombre exact car celui-ci varie en fonction des études. Selon une étude publiée en 2001, les patients RPGRIP1 représenteraient 5,6% des cas d'amaurose congénitale de Leber (Gerber *et al.*, 2001), selon une autre étude publiée la même année, ils représenteraient 6% des ACL (Dryja *et al.*, 2001) et selon une dernière étude publiée en 2005, ils représenteraient 4,5% des cas d'ACL (Hanein *et al.*, 2004). La fiabilité des pourcentages obtenus dépendent du nombre de patients génotypés (respectivement 142, 57 et 179 patients).

Les patients porteurs d'une mutation RPGRIP1 sont atteints, soit d'amaurose congénitale de Leber (Dryja *et al.*, 2001) soit de rétinite pigmentaire inversée ou cone-rod dystrophy (CRD) (Booij *et al.*, 2005). Dans les deux cas, ces patients montrent une dégénérescence précoce des cônes associée à une perte de la vision centrale et des couleurs qui conduit à un nystagmus. Ces symptômes apparaissent dans la première ou la deuxième décennie dans les cas de CRD et dès la naissance dans les cas d'ACL. Le second stade de la maladie est la perte de la vision nocturne et de la vision périphérique aboutissant à la cécité. Chez les patients atteints d'ACL due à un défaut dans le gène RPGRIP1, dès la petite enfance, un nystagmus est observé et la vision est limitée à une simple perception lumineuse. A l'âge

adulte, le fond d'oeil révèle une diminution importante du calibre des vaisseaux rétiens, la présence de dépôts pigmentaires et une pâleur papillaire. L'ERG est quant à lui plat.

Une étude pilote ne concernant qu'un seul patient atteint d'ACL causée par une mutation dans le gène RPGRIP1 (Jacobson *et al.*, 2007) a évalué la structure rétinienne d'un patient de 19 ans grâce à la tomographie à cohérence optique (OCT). Les résultats montrent que chez ce patient, l'architecture de la partie centrale de la rétine est préservée, avec une couche nucléaire externe correspondant aux noyaux des photorécepteurs rétiens, diminuée mais présente. Bien que la fonction visuelle soit complètement abolie chez ce patient, la présence de photorécepteurs dans la partie centrale de la rétine laisse envisager une possibilité de traitement. Malheureusement, les résultats de cette étude sont difficilement exploitables puisqu'ils ne concernent qu'un seul et unique patient.

### **1.2.6. RPGRIP1-Like.**

Une protéine dont la structure est très proche de RPGRIP1 a été découverte récemment, il s'agit de RPGRIP1-Like ou RPGRIP1L. Le gène RPGRIP1L est localisé sur le chromosome 16 (Nagase *et al.*, 1999) en position 16q12.2, et est composé de 26 exons codants (Delous *et al.*, 2007). RPGRIP1L a été cloné pour la première fois en 1999 à partir d'une banque d'ADNc issus de tissus cérébraux (Nagase *et al.*, 1999). Le gène fut alors appelé KIAA1005. L'ARN de RPGRIP1L, détecté par RT-PCR, est présent en quantité modérée dans le cerveau adulte mais aussi en quantité plus faible dans d'autres organes (rein, ovaire, moelle épinière).

En 2007, des chercheurs alignent les séquences de KIAA1005 et RPGRIP1 et réalisent que non seulement les deux protéines ont 31% d'identité en acides aminés mais surtout qu'elles ont des domaines similaires. En effet, RPGRIP1L contient une région N-terminale avec 5 domaines super-enroulés (coiled-coil), une région centrale avec deux motifs C2 et une région C-terminale homologue au domaine RID de RPGRIP1. Au vu de ces similarités, les chercheurs décident donc de renommer KIAA1005 en RPGRIP1-Like (Delous *et al.*, 2007). De nouvelles analyses de RT-PCR (Arts *et al.*, 2007) détectent la présence d'ARN RPGRIP1L dans de nouveaux tissus comme les testicules adultes et l'œil fœtal. RPGRIP1L colocalise au niveau du corpuscule basal du centrosome avec la néphronocystine-4 (NPHP4), la néphronocystine-6 (NPHP6), et la gamma tubuline (TUBG1) qui est un marqueur des centrosomes.

L'équipe de Roepman (Arts *et al.*, 2007) détermine que RPGRIP1L interagit avec NPHP4 via son domaine C2. Ils colocalisent également RPGRIP1L et NPHP4 au niveau des corpuscules basaux et des axonèmes des structures ciliaires dans le cerveau, le rein mais

aussi la rétine. Cette étude fait le lien entre une mutation dans le gène RPGRIP1L et le syndrome de Joubert.

De leur côté, Delous et al., font également le lien entre une mutation dans le gène RPGRIP1L et les syndromes de Joubert et de Meckel (type 5). Le syndrome de Joubert est aussi appelé syndrome cérébello-oculo-rénal. L'atteinte du cervelet et du tronc cérébral se manifeste par un retard de développement, des anomalies de la respiration, une hypotonie et une ataxie et éventuellement un retard mental d'intensité variable. A ces symptômes neurologiques s'ajoutent des atteintes oculaires (nystagmus vertical et horizontal, paralysie de la paupière, et rétinite pigmentaire avec des caractéristiques électrorétinographiques ressemblant à l'amaurose congénitale de Leber) et des atteintes rénales (dysplasie rénale multikystique ou néphronophytose). Le syndrome de Meckel est quant à lui léthal. Il se caractérise par une polydactylie, une polykystose rénale, des anomalies hépatiques et de graves atteintes cérébrales entraînant la mort peu de temps après la naissance.

### **1.3. La thérapie génique utilisant des vecteurs viraux AAV recombinants.**

#### **1.3.1. Généralités sur la thérapie génique.**

La thérapie génique consiste à introduire dans une cellule cible un gène d'intérêt thérapeutique dans le but de produire une protéine manquante (dans une cellule déficiente) ou de produire un signal qui conduira à la mort cellulaire (dans une cellule infectée ou cancéreuse). L'introduction du gène d'intérêt thérapeutique peut s'effectuer dans les cellules germinales ou dans les cellules somatiques.

Lorsqu'on introduit un gène dans un embryon à un stade très précoce, voire unicellulaire, les informations génétiques seront transmises à l'ensemble des cellules qui formeront le futur organisme, y compris aux gamètes. Cette thérapie génique dite germinale est appelée transgénése et elle n'est autorisée que chez l'animal pour générer des modèles animaux de maladies humaines par exemple ou pour créer des animaux produisant des substances d'intérêt biologiques. Dans ce type de transfert de gènes, les caractères sont transmis à la descendance.

La seule thérapie génique autorisée chez l'Homme est la thérapie génique somatique qui consiste à introduire un gène d'intérêt dans certaines cellules somatiques d'un organisme constitué, sans modifier l'hérédité de l'individu. Ce transfert de gènes peut être spécifique ou non spécifique.

Dans le cadre de maladies monogéniques, un seul gène défectueux est responsable de l'ensemble des symptômes associés à la pathologie. Lorsque le gène muté est identifié, il faut alors disposer du gène sauvage non muté sous la forme d'un ADN complémentaire (ADNc). La thérapie génique spécifique consiste alors à apporter dans la cellule malade une ou plusieurs copies de ce gène sain, ce qui permettra une production de la protéine normale qui palliera le défaut génétique. Lorsque l'on utilise un vecteur de transfert de gène qui va venir remplacer sur le génome de l'hôte le gène muté par une copie normale de ce même gène, on parle de thérapie génique de remplacement ou de microchirurgie du gène. Une autre stratégie consiste à laisser le gène muté à sa place dans le génome de l'hôte et à apporter une copie supplémentaire du gène normal dans le noyau de la cellule dans le but

de produire une protéine fonctionnelle, cette stratégie est appelée thérapie génique d'addition ou de complémentation.

Dans le cadre de maladies plurigéniques comme le cancer, plusieurs gènes peuvent être responsable de la pathologie et il est souvent difficile d'identifier l'ensemble de ces gènes. C'est pourquoi il est souvent intéressant d'utiliser dans ce contexte la thérapie génique non spécifique. Les gènes mutés sont laissés à leur place dans le génome de l'hôte. La stratégie n'est cette fois plus curative mais palliative et consiste à apporter des molécules protectrices qui vont empêcher ou ralentir la dégénérescence des cellules malades (facteurs neurotrophiques qui protègent les neurones, facteurs anti-apoptotiques...), ou au contraire à apporter des signaux de mort qui vont déclencher la destruction des cellules cancéreuses.

Qu'elle soit germinale ou somatique, spécifique ou non spécifique, la thérapie génique nécessite la construction de vecteurs de transfert de gènes qui apporteront le gène d'intérêt thérapeutique dans le noyau de la cellule cible. Les vecteurs de transfert de gène peuvent être d'origine non virale comme l'ADN nu et les liposomes, ou d'origine virale comme les vecteurs dérivés des adénovirus, des rétrovirus, des lentivirus, des virus de l'herpes (Herpes Simplex Virus) ou des virus adéno-associés (Adeno-associated Virus, AAV). Les vecteurs non viraux étant peu efficaces *in vivo* chez l'animal, la majorité des essais précliniques et cliniques sont effectués grâce à des vecteurs viraux. Dans cette thèse, nous nous intéresserons particulièrement aux vecteurs AAV recombinants (AAVr) qui sont des vecteurs de choix pour un certain nombre d'applications.

Ces vecteurs, qu'ils soient d'origine non virale ou virale, doivent ensuite être administrés selon un protocole particulier (*ex vivo*, *in vivo*, *in situ*). L'administration *ex vivo* consiste à prélever des cellules du patient, à effectuer le transfert de gène sur des cellules en culture, suivi ou non d'une expansion cellulaire, puis à réimplanter les cellules génétiquement modifiées au patient. L'administration *in vivo* est plus simple puisqu'il s'agit d'une injection intraveineuse du vecteur recombinant, qui passe alors dans le flux sanguin. Quant à l'administration *in situ*, elle consiste à injecter le vecteur directement dans le tissu à cibler (muscle, foie, rétine...).

## **1.3.2. Les virus adéno-associés (AAV).**

### **1.3.2.1. Généralités sur les AAV.**

Les adeno-associated virus (AAV) ou virus adéno-associés sont des virus non enveloppés de la famille des Parvoviridae. Les Parvoviridae sont subdivisés en deux sous-familles : les Densovirinae infectant les insectes (comme les Densovirus, les Icteravirus et les Contravirus) et les Parvovirinae infectant les vertébrés (parmi lesquels les Parvovirus autonomes, les Erythrovirus et les Dependovirus dont font partie les AAV). Les Dependovirus sont les seuls virus du règne animal dont la réplication n'est possible qu'en présence d'un virus auxiliaire dit "helper", principalement l'adénovirus (Ad) ou l'herpes simplex virus (HSV) mais aussi le cytomégalovirus, le papillomavirus humain ou le virus de la vaccine.

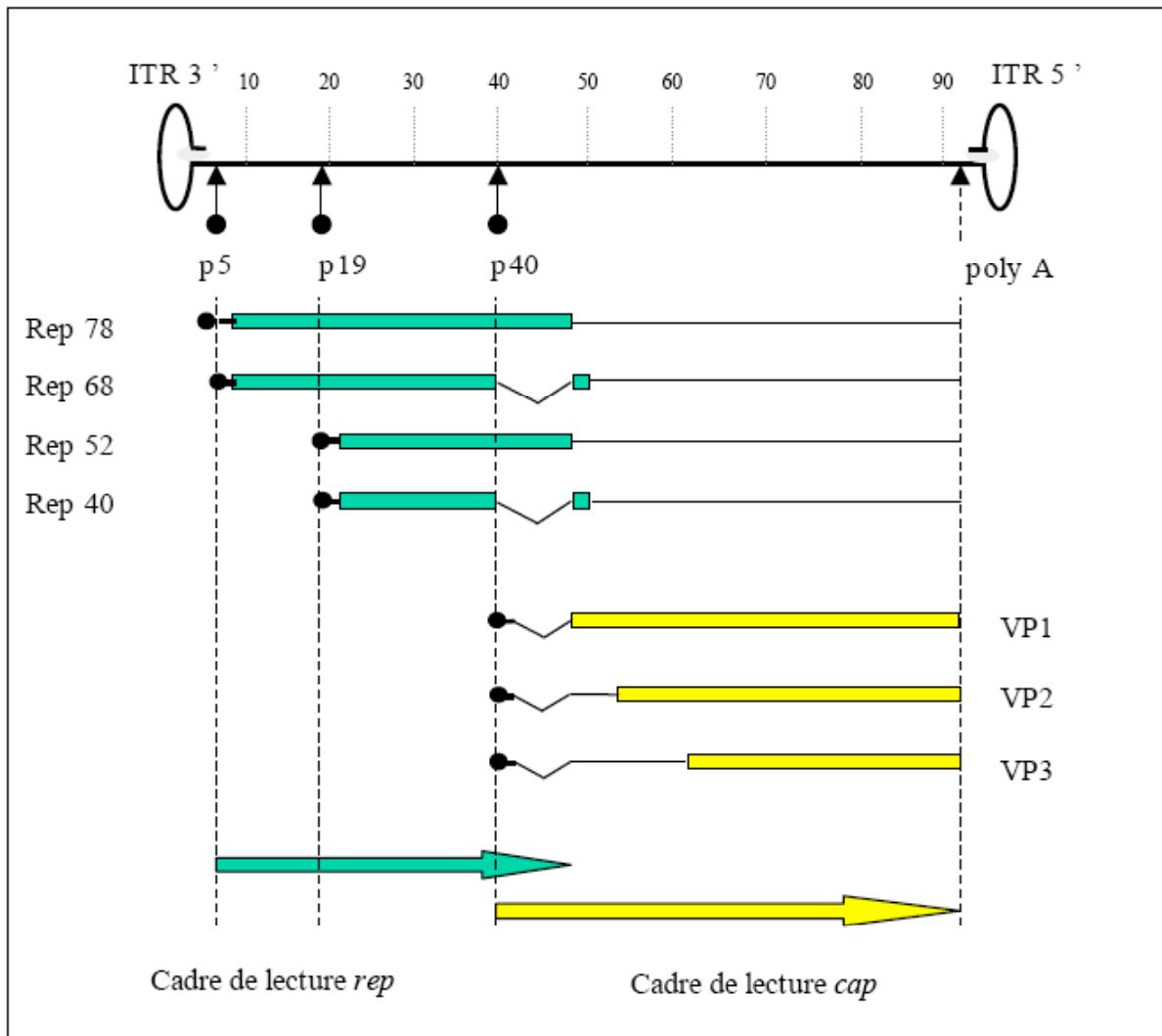
Les AAV ne sont associés à aucune pathologie chez l'Homme. On estime à 80% le pourcentage de la population humaine ayant été au moins une fois en contact avec de l'AAV et possédant des anticorps contre l'AAV2, mais une minorité seulement possède des anticorps neutralisants (Chirmule *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999 ; Calcedo *et al.*, 2009). L'infection asymptomatique se déroulerait principalement dans l'enfance et affecterait les voies respiratoires.

La capside de l'AAV est composée de trois protéines nommées VP1 (5%), VP2 (5%) et VP3 (90%). Les particules d'AAV formées de 60 sous-unités protéiques, sont icosaédriques et possèdent 20 faces et 12 sommets. Leur diamètre est de 20 à 24 nm et leur densité en gradient de chlorure de césium est de 1,41 g/cm<sup>3</sup>. Les particules AAV sont extrêmement résistantes à la fois au pH, aux détergents et à la chaleur. Les AAV sont capables d'infecter non seulement les cellules en division comme des hépatocytes mais aussi les cellules quiescentes comme les neurones rétiniens.

### **1.3.2.2. La structure du génome de l'AAV sauvage.**

Le génome de l'AAV sauvage est une molécule d'ADN linéaire simple brin d'environ 4700 pb composée de deux cadres de lecture ouverts bordés par deux séquences terminales répétées inversées, les ITR (Inverted Terminal Repeats) (Figure 16). Les ITR sont des structures secondaires palindromiques en épingle à cheveux de 145 paires de bases qui sont indispensables en cis pour la réplication et l'encapsidation des virions (Snyder *et al.*, 1993).





**Figure 16 : Structure génomique de l'AAV2 wt.**

Le génome de l'AAV2 est composé de deux cadres de lecture ouverts *Rep* et *Cap*. Le promoteur p5 initie la transcription des deux grandes protéines Rep 78 et 68 tandis que le promoteur p19 initie la transcription des deux petites protéines Rep 52 et 40. Les deux grandes Rep d'une part, et les deux petites Rep d'autre part, sont issues d'un transcrit commun qui subit un épissage alternatif dans sa partie C-terminale. Le promoteur p40 initie la transcription des trois protéines de capsid virale VP1, VP2 et VP3. Les trois VP sont issues d'un transcrit commun qui subit un épissage alternatif dans sa partie N-terminale.

Les deux ORF (open reading frame) Rep et Cap codent respectivement pour les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral et dans l'encapsidation des virions. L'ORF Rep qui code pour 4 protéines régulatrices multifonctionnelles est contrôlé par 2 promoteurs. Le promoteur p5 contrôle la transcription des ARN Rep78 et Rep68, aussi appelées « grandes Rep ». Rep78 et Rep68 sont issues d'un transcrit commun qui subit un épissage alternatif dans sa partie C-terminale. Le promoteur p19 contrôle la transcription des ARN Rep52 et Rep40, aussi appelées « petites Rep ». Les « petites Rep » sont également issues d'un transcrit commun qui subit un épissage alternatif dans sa partie C-terminale. L'ORF Cap est quant à lui contrôlé par un seul promoteur, le p40, qui initie la transcription de deux ARN. VP1 est traduit à partir d'un ARN épissé peu abondant tandis que VP2 et VP3 sont issus de l'épissage alternatif (dans la partie N-terminale) d'un même transcrit avec deux codons initiateurs différents. Les trois régions promotrices p5, p19 et p40 sont régulées de façon complexe par des facteurs cellulaires, des protéines adénovirales et les protéines Rep elles-mêmes (Pereira *et al.*, 1997).

### **1.3.2.3. Les sérotypes d'AAV.**

On dénombre aujourd'hui 12 sérotypes différents pour l'AAV (Gao *et al.*, 2004). Les AAV ont été découverts comme étant des contaminants de cultures adénovirales (AAV1, -2, -3, -4, -6). Les premiers sérotypes d'AAV à avoir été découverts ont été les sérotypes 1 à 6. L'AAV1 est un virus présent à la fois chez l'Homme et chez le primate non-humain (Atchison *et al.*, 1965; Parks *et al.*, 1970; Gao *et al.*, 2004), son hôte naturel n'est pas déterminé. Les AAV2, -3 et -5 sont des virus qui infectent préférentiellement l'Homme (Hoggan *et al.*, 1966; Bantel-Schaal *et al.*, 1984) tandis que l'AAV4 n'infecte que le primate non-humain (Parks *et al.*, 1967). L'AAV6 est considéré comme un hybride naturel issu des AAV1 et -2 (Xiao *et al.*, 1999), il a les mêmes propriétés sérologiques que l'AAV1 (présence chez l'Homme et le primate non-humain) (Rutledge *et al.*, 1998). Les sérotypes 7 à 12 n'ont été identifiés que plus récemment, grâce à des PCR effectuées sur des tissus. Les AAV7, -8, -10, -11 et -12 ont été isolés à partir de tissus simiens (Gao *et al.*, 2002a; Mori *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2006) tandis que l'AAV9 a été détecté dans des tissus humains (Gao *et al.*, 2004).

Chaque sérotype est associé à un tropisme donné. En effet, la nature des protéines présentes à la surface des capsides des différents AAV déterminera les interactions possibles avec les récepteurs et co-récepteurs membranaires présents à la surface des cellules cibles (Tableau 1). Dans le cas de l'AAV2, il existe des protéines capsidiques qui se lient aux récepteurs membranaires à l'héparan sulfate protéoglycan des cellules cibles et

Sérotype	Origine	Hôte	Récepteur	Références
AAV1	Contaminant de culture adénovirale	Homme et primate	Corécepteur : acide sialique 2,3 et 2,6 N-linked	Atchinson et al., 1965 Wu et al., 2006
AAV2	Contaminant de culture adénovirale	Homme	Récepteur : HSPG Corécepteurs : $\alpha$ V $\beta$ 5 intégrine, FGFR, HGFR, récepteur lamine 37/67kDa	Hoggan et al., 1966 Summerford et al., 1998 Summerford et al., 1999 Qing et al., 1999 Kashiwakura et al., 2005 Akache et al., 2006
AAV3	Contaminant de culture adénovirale	Homme	Récepteur : HSPG Corécepteur : récepteur lamine 37/67kDa	Hogan et al., 1966 Handa et al., 2000 Rabinowitz et al., 2002 Akache et al., 2006
AAV4	Contaminant de culture adénovirale	Primate	Corécepteur : acide sialique 2,3 O-linked	Parks et al., 1967 Kaludov et al., 2001
AAV5	Tissus humains	Homme	Corécepteurs : acide sialique 2,3 N-linked, PDGFR- $\alpha$	Bantel-Schaal et al., 1984 Walters et al., 2001 Di Pasquale et al., 2003
AAV6	Contaminant de culture adénovirale	Homme et primate	Corécepteur : acide sialique 2,3 et 2,6 N-linked	Rutledge et al., 1998 Wu et al., 2006
AAV7	Tissus de primate	Primate	Non déterminé	Gao et al., 2002
AAV8	Tissus de primate	Primate	Récepteur : récepteur lamine 37/67kDa	Gao et al., 2002 Akache et al., 2006
AAV9	Tissus humains	Homme	Corécepteur : récepteur lamine 37/67kDa	Gao et al., 2004 Akache et al., 2006
AAV10	Tissus de primates	Primate	Non déterminé	Mori et al., 2004
AAV11	Tissus de primates	Primate	Non déterminé	Mori et al., 2004
AAV12	Tissus de primates	Primate	Non déterminé	Schmidt et al., 2006

**Tableau 1 : Sérotypes des AAV, origine, hôte et récepteurs connus.**

permettent cet arrimage (Summerford *et al.*, 1998). L'AAV2 utilise également pour son internalisation d'autres récepteurs comme le Fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) (Qing *et al.*, 1999), l'intégrine alpha-V-beta-5 (Summerford *et al.*, 1999) et l'hépatocyte growth factor receptor (HGFR) (Kashiwakura *et al.*, 2005). Dans le cas de l'AAV4, des études ont montré qu'une liaison à l'acide sialique « O-linked alpha2-3 linked sialic acid » s'effectuait alors que pour l'AAV5 la liaison à l'acide sialique « N-linked alpha2-3 ou 2-6 sialic acid » était impliquée (Kaludov *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2001). Le platelet-derived growth factor receptor (PDGFR-alpha) a également été identifié comme un co-récepteur de l'AAV5 (Di Pasquale *et al.*, 2003). L'AAV6 a des caractéristiques très proches de celles de l'AAV1 vis à vis du récepteur à l'héparan sulfate, toutefois, il a été démontré que les capsides d'AAV1 et -6 se liaient à des récepteurs différents (Halbert *et al.*, 2001). L'acide sialique « N-linked alpha2-3 ou 2-6 sialic acid » a été identifié comme étant un co-récepteur à la fois de l'AAV1 et de l'AAV6 (Wu *et al.*, 2006). Un récepteur de l'AAV2, -3, -8 et -9 a récemment été mis en évidence. Il s'agit du récepteur de la lamine 37/67 kDa (LamR). La surexpression de LamR à la surface des cellules NIH 3T3 conduit à une augmentation du taux de transcription de ces cellules par les vecteurs AAV2, -3, -8 et -9 (Akache *et al.*, 2006). Les récepteurs et co-récepteurs des AAV7, -10, -11 et -12 n'ont à ce jour pas été identifiés.

Les homologies de séquence génomique varient entre les différents sérotypes. Ainsi, les AAV1, -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 et -11 ont des séquences présentant de très fortes homologies (entre 80 et 90%) (Gao *et al.*, 2002a; Mori *et al.*, 2004), alors que les AAV4 et -5 ont seulement 50 à 60% d'homologie avec l'AAV2 (Bantel-Schaal *et al.*, 1999).

La majorité des variations de séquence ADN se trouve au niveau du cadre de lecture Cap qui code pour les protéines de capsid. Le cadre de lecture Rep est fortement conservé entre les sérotypes, à l'exception du sérotype 5 pour lequel les ITR et l'ORF Rep varient significativement par rapport aux autres sérotypes (Bantel-Schaal *et al.*, 1999; Chiorini *et al.*, 1999).

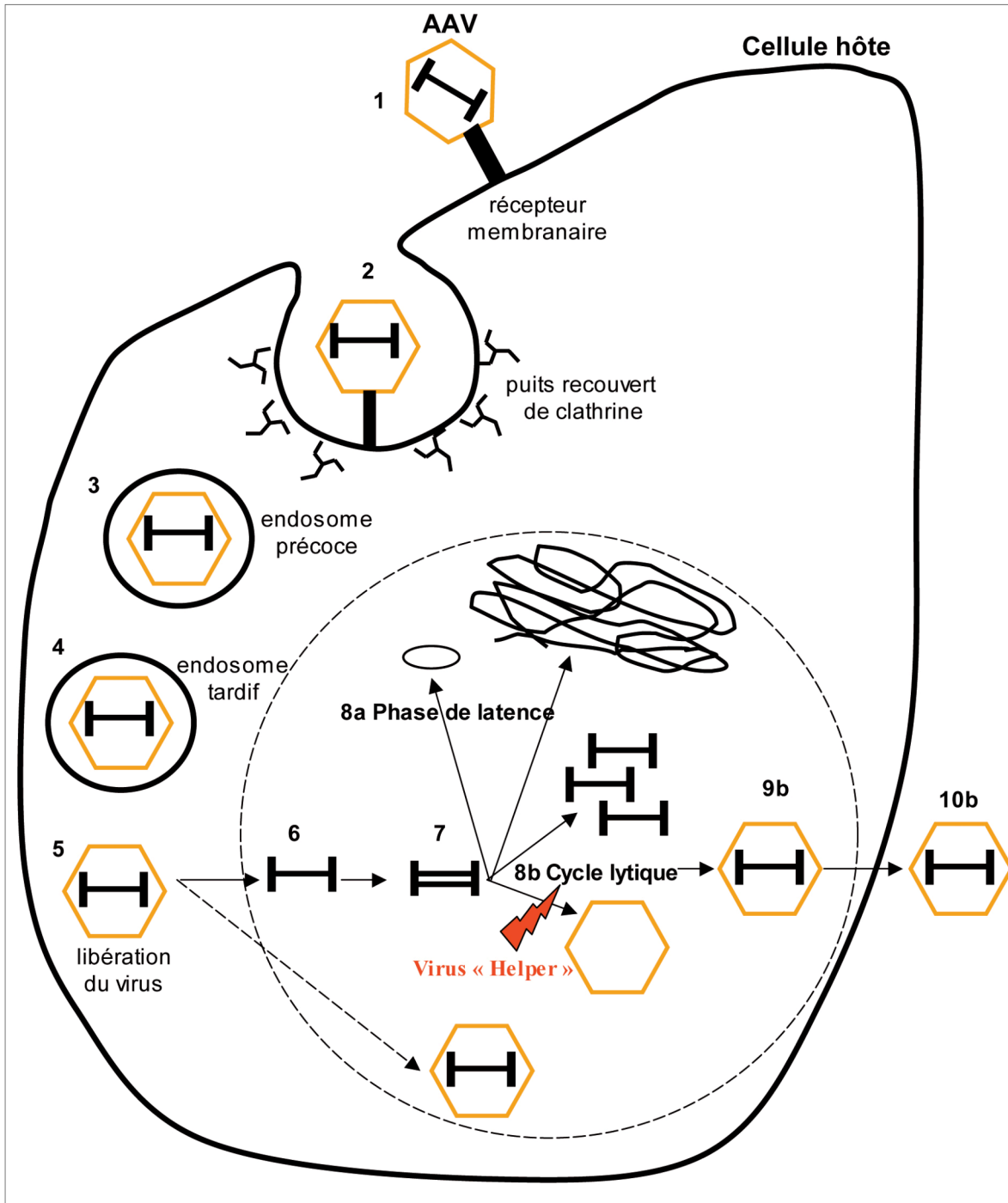
Entre 45 et 95% des hommes possèdent des anticorps neutralisants contre les AAV de sérotype 2 et 5 mais seulement un faible pourcentage de la population possède de tels anticorps contre l'AAV4 (Mingozzi *et al.*, 2007 ; Calcedo *et al.*, 2009).

#### 1.3.2.4. Le devenir de l'AAV dans la cellule hôte.

##### Devenir de l'AAV sauvage

Les mécanismes du cycle de vie de l'AAV2 ont essentiellement été décrit pour le sérotype 2. Dans cette partie, nous ne parlerons donc que de l'AAV2/2. Lorsque l'AAV2 pénètre dans un organisme hôte, il doit tout d'abord venir s'accrocher à sa cellule cible par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (Figure 17-1). L'arrimage de la particule virale à sa cellule cible est dépendant du sérotype de l'AAV (voir paragraphe précédent). L'AAV2 subit l'endocytose des puits recouverts de clathrine sous le contrôle de la dynamine, ce qui lui permet d'entrer dans la cellule hôte (Figure 17-2). Les molécules internalisées à partir de la membrane plasmique, ici les virions, arrivent tout d'abord dans des compartiments formés de tubules et de corps vésiculaires au pH légèrement acide (pH 6,2) : les endosomes précoces (Figure 17-3). De là, elles sont dirigées vers les endosomes tardifs (pH 5,5) plus acides (Figure 17-4). L'acidification de l'endosome tardif permet alors la libération des virions dans le cytosol (Figure 17-5). Ces virions entrent dans le noyau et seraient dans le même temps décapsidés (Figure 17-6). L'ADN viral libéré dans le noyau est converti en une molécule double-brin (Figure 17-7). La conversion de l'ADN simple brin en double brin se ferait soit par une hybridation de deux ADN complémentaires introduits simultanément dans la cellule, soit par un mécanisme de polymérisation au moyen de facteurs cellulaires. Le cycle de vie de l'AAV se décompose ensuite en deux phases qui dépendent de la présence ou non d'un virus auxiliaire. La phase de latence et le cycle réplicatif.

En absence de co-infection, les trois promoteurs de l'AAV sont silencieux, le virus est en phase de latence. Les protéines Rep78 et Rep68 viennent se fixer sur les séquences consensus RBP (Rep Binding Site) du promoteur p5 et induisent la répression de la réplication et de la synthèse des protéines de capsid (Weitzman *et al.*, 1994). Durant cette phase de latence, le génome de l'AAV wt peut persister sous une forme épisomique ou sous une forme intégrée (Figure 17-8a). Il a été montré une intégration site-spécifique du génome viral sauvage (wt) au niveau du site AAVS1 du chromosome 19 humain (Figure 17-8a) (Kotin *et al.*, 1990). Cette intégration site-spécifique se fait par recombinaison non-homologue entre le génome humain et viral et nécessite les protéines Rep et les origines de réplifications de l'AAV (ITR et/ou promoteur p5) (Francois *et al.*, 2005). L'AAV est alors sous forme de provirus silencieux (Kotin *et al.*, 1990; Kotin *et al.*, 1991; Samulski *et al.*, 1991; Kotin *et al.*, 1992).



**Figure 17 : Cycle de vie de l'AAV wt.**

Les principales étapes du cycle de vie de l'AAV sauvage sont (1) la fixation de l'AAV sur son récepteur cellulaire, (2) l'endocytose médiée par les puits de clathrine, (3) le transport de l'AAV internalisé dans les endosomes précoces, (4) l'acidification des endosomes en endosomes tardifs, (5) la libération de la particule virale dans le cytoplasme de la cellule hôte, (6) la décapsidation des virions et l'entrée de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte, (7) la conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin, (8a) la phase de latence du virus en absence de virus auxiliaire : le génome viral double brin persiste sous forme d'épisomes ou s'intègre dans le génome de l'hôte, (8b) phase lytique en présence d'un virus auxiliaire : réplication de l'ADN et synthèse des protéines de capsid, (9b) assemblage des nouveaux virions, (10b) sortie des virions pour infecter de nouvelles cellules.

En présence d'un virus auxiliaire, par exemple l'adénovirus, l'AAV entre en cycle répliatif. Le promoteur p5 est transactivé par la protéine adénovirale E1. L'activation du promoteur p5 entraîne l'expression des grandes protéines Rep78 et Rep68, qui à leur tour vont activer les promoteurs p19 et p40 conduisant à une production abondante des petites protéines Rep52 et Rep40 et des protéines de capsides VP1, VP2 et VP3. L'ADN viral est répliqué grâce aux ADN polymérases cellulaires et aux grandes Rep, les protéines de structure sont produites (Figure 17-8b) et les nouveaux virions sont assemblés (Figure 17-9b). L'effet cytopathique du virus auxiliaire (Ad) induit la sécrétion des particules néo-formées qui vont pouvoir infecter d'autres cellules (Figure 17-10b).

### **Devenir de l'AAV recombinant**

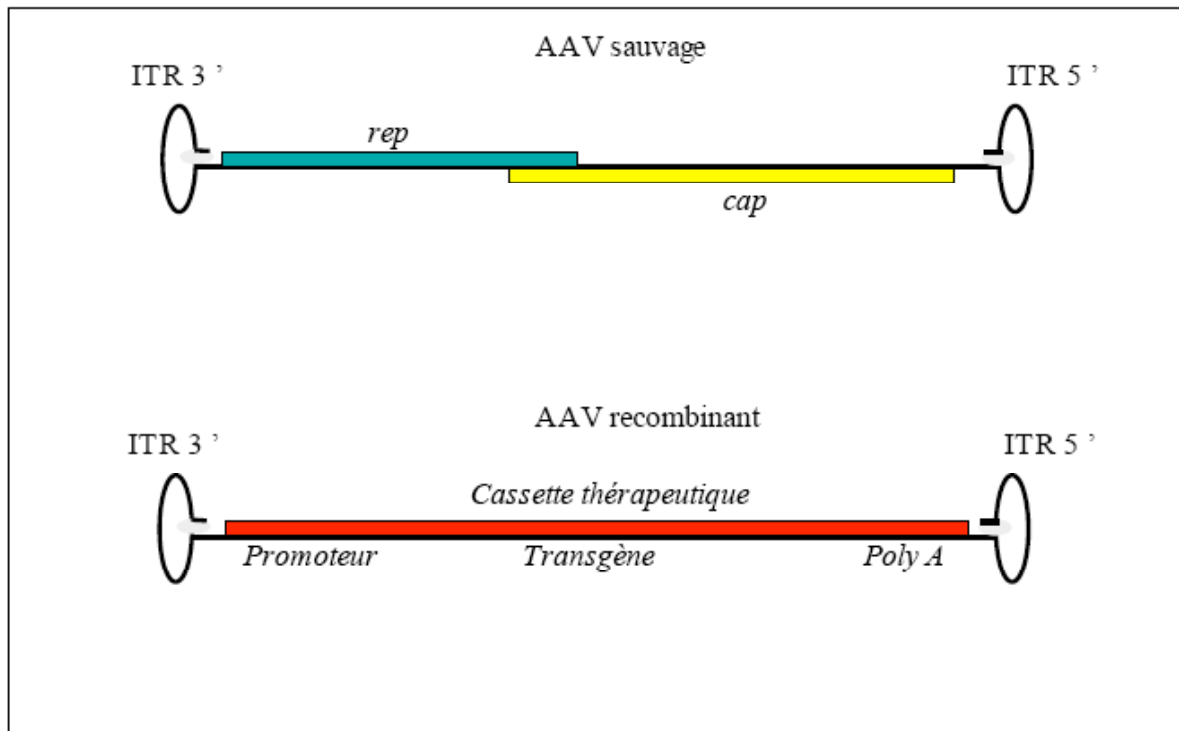
Lorsque les vecteurs AAV recombinants s'échappent de l'endosome, ils sont en majeure partie décapsidés et le génome recombinant peut alors entrer dans le noyau de la cellule hôte. Toutefois, les mécanismes de décapsidation sont très mal connus. Une étude de Jude Samulski de 2009 montre que *in vitro*, une partie des particules virales entre dans le noyau sans avoir été décapsidé (Johnson *et al.*, 2009). Des données récentes publiées par l'équipe de Fabienne Rolling au laboratoire ont montré qu'une partie des capsides virales persistaient plusieurs années après injection d'AAVr dans la rétine de chien ou de macaque (Stieger *et al.*, 2009c).

Le génome de l'AAVr libéré dans le noyau des cellules cibles persiste très majoritairement sous forme d'épisomes circulaires (voir paragraphe suivant sur la persistance de l'expression du transgène).

### **1.3.2.5. La production d'AAV recombinants.**

Les AAV recombinants sont obtenus en remplaçant les cadres de lecture Rep et Cap de l'AAV sauvage par une cassette d'expression contenant un promoteur, le transgène d'intérêt et un signal de polyadénylation (Figure 18). Le but est d'obtenir un vecteur non répliatif portant le transgène d'intérêt et transduisant les cellules ciblées. Le tropisme cellulaire dépendra de la capsidie choisie.

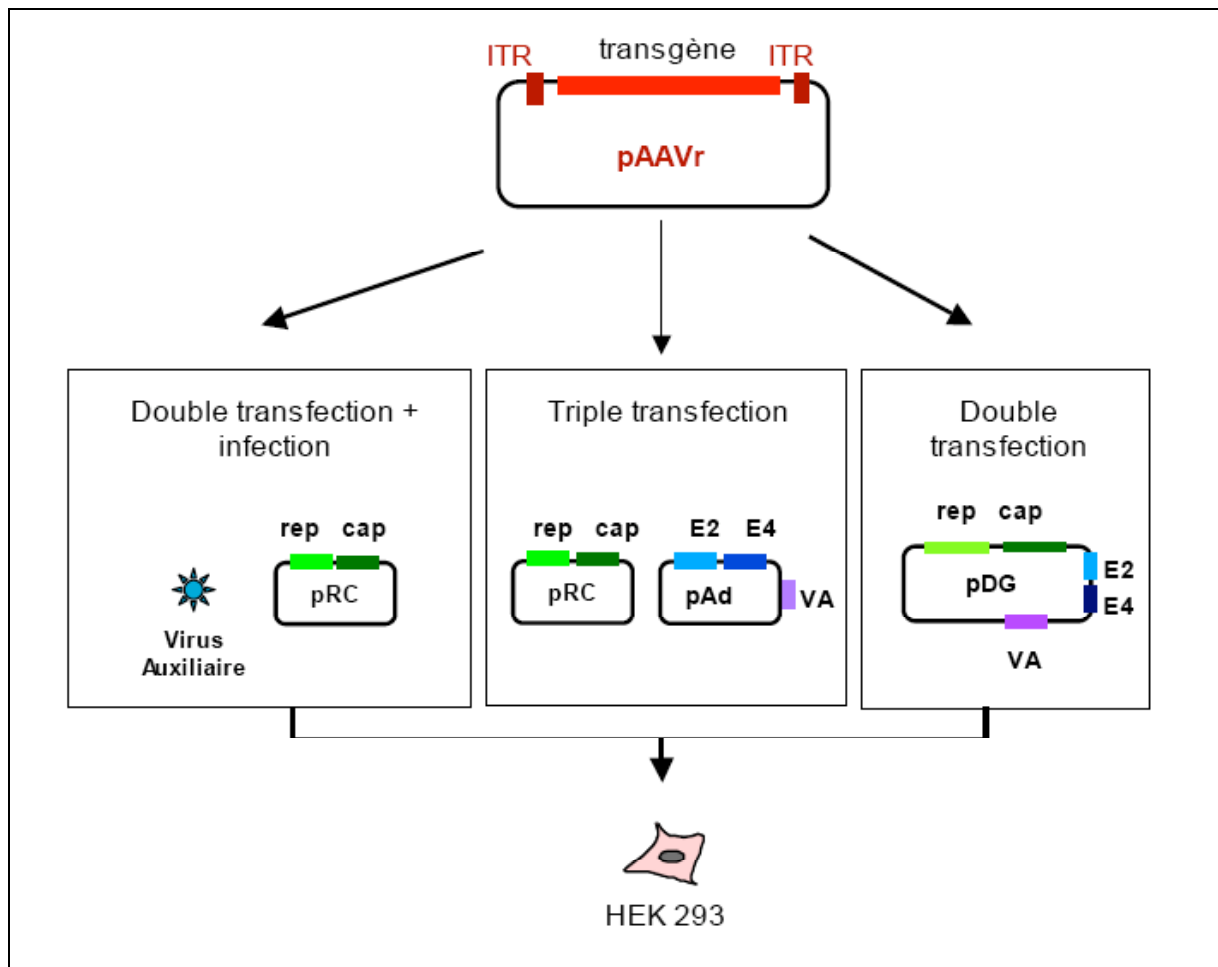
Il existe aujourd'hui plusieurs méthodes pour produire des AAVr. La méthode la plus commune est la transfection transitoire (Figure 19) (Rabinowitz *et al.*, 2002; Snyder *et al.*, 2002; Blouin *et al.*, 2004; Grieger *et al.*, 2005; Grieger *et al.*, 2006). Cette méthode, utilisée



**Figure 18 : Structure génomique AAVwt / AAVr.**

Le génome de l'AAV sauvage est constitué des deux cadres de lecture ouverts Rep et Cap flanqués de séquences terminales répétées inversées, les ITR. L'AAV recombinant est généré en remplaçant les ORF Rep/Cap par la cassette thérapeutique contenant un promoteur, le transgène d'intérêt et un signal de polyadénylation. Seuls les ITR sont indispensables en cis pour la réplication et l'encapsidation des vecteurs recombinants, les séquences Rep et Cap peuvent être apportées en trans.





**Figure 19 : Production d'AAVr par co-transfection. (D'après la thèse de Véronique Blouin)**

Représentation schématique de la production d'AAVr par transfection de cellules HEK293 au moyen du plasmide vecteur et du plasmide portant les gènes *rep-cap*. Les fonctions adénovirales peuvent être apportées par infection des cellules par l'adénovirus ou par transfection d'un plasmide codant les protéines adénovirales auxiliaires (pAd). Il est également possible d'apporter les gènes *rep-cap* et les fonctions adénovirales auxiliaires sur un seul plasmide (pDG) (Grimm *et al.*, 2003).

en routine pour la production d'AAV recombinants de qualité préclinique dans le Laboratoire d'Amplification des Vecteurs (LAV) du LTG, repose sur l'utilisation de cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney cells) provenant d'une banque de cellules contrôlées et sécurisées. Ces cellules ont intégré de façon stable dans leur génome cellulaire le gène E1 de l'adénovirus indispensable à la réplication. La transfection transitoire consiste à apporter sous forme de plasmide, les séquences adénovirales sauvages nécessaires à la production de vecteur AAVr, dans les cellules HEK293. Deux plasmides sont transfectés : le plasmide vecteur qui contient la cassette d'expression bordée des seules séquences nécessaires en cis pour la réplication (les ITRs de l'AAV2), et le plasmide auxiliaire (pDG) contenant à la fois les ORF Rep et Cap et les fonctions auxiliaires adénovirales nécessaires à l'entrée en cycle lytique à savoir E2b, E4 et VA (Grimm *et al.*, 2003).

Deux autres méthodes plus anciennes de transfection transitoires existent. La première consiste à transfecter les cellules avec les plasmides vecteur et Rep-Cap puis de les infecter avec un adénovirus sauvage (Samulski *et al.*, 1989) ou un adénovirus délété de sa fonction E1, déficient pour la réplication (Snyder *et al.*, 1997; Salvetti *et al.*, 1998). La seconde consiste à transfecter les cellules avec trois plasmides différents : le plasmide vecteur, le plasmide Rep-Cap et le plasmide pAd contenant les fonctions auxiliaires (Grimm *et al.*, 1998 ; Salvetti *et al.*, 1998 ; Xiao *et al.*, 1998).

La transfection au phosphate de calcium conduit à la formation de précipités (ADN/phosphate de calcium) qui entrent dans les cellules par endocytose. L'ADN plasmidique transfecté ne peut s'exprimer que dans le noyau, le passage du plasmide dans le noyau de la cellule s'effectue en phase mitotique quand la membrane nucléaire se rompt, il est donc indispensable que les cellules soient en phase de croissance à 70-80% de confluence. L'expression des différents plasmides aboutit à la réplication de l'ADN viral modifié contenant la cassette d'expression, à la synthèse des protéines de capsid et enfin à l'assemblage des virions dans les cellules d'encapsidation HEK293. Lors de la production des lots d'AAVr utilisés dans les études dont nous parlerons dans la partie « Résultats », les cellules ont été récoltées 48h après transfection puis les particules AAVr ont été extraites et purifiées à partir du culot cellulaire.

Il est également possible de produire des AAVr à grande échelle grâce à des systèmes basés sur l'herpes simplex virus (Conway *et al.*, 1997; Booth *et al.*, 2004) ou le baculovirus (Sollerbrant *et al.*, 2001). La production d'AAVr grâce au système HSV nécessite la production d'un lot de vecteur HSV-Rep, d'un lot de vecteur HSV-Cap et d'un lot de vecteur HSV-transgène contenant la cassette d'expression entre les deux ITR de l'AAV2. Ces trois lots de vecteurs sont obtenus par transfection de cellules rénales de singe VERO par les plasmides pHSV-Rep, pHSV-Cap et pHSV-transgène et culture en suspension

(permettant l'utilisation de bioréacteurs). Le vecteur HSV apportant les fonctions auxiliaires à l'exception de E1, à cette étape, des grandes quantités de vecteur HSV non réplcatif sont obtenus. Les lots doivent alors être correctement purifiés, dosés et caractérisés. L'étape suivante consiste à co-infecter des cellules HEK293 avec les trois lots de vecteurs HSV simultanément. Les virions produits dans ces cellules sont extraits et purifiés. La culture cellulaire s'effectue en bioréacteur ce qui permet une production à grande échelle compatible avec le passage en clinique. La principale difficulté de cette technique est que les lots de vecteurs Rep et Cap ne sont pas stables dans le temps, ils doivent donc être caractérisés régulièrement et renouvelés en cas de besoin. D'autre part les particules virales HSV contaminantes peuvent être un problème pour l'utilisation en clinique (Merten *et al.*, 2005).

La production en Baculovirus suit le même protocole que la production en HSV à l'exception des cellules productrices des lots de vecteurs qui sont dans le cas des Baculovirus des cellules d'insectes Sf9, Sf21 ou High5 transfectées avec les plasmides Bac (Heitz *et al.*, 1997; Merten *et al.*, 2005 ; Zolotukhin, 2005).

Malgré des améliorations de la production transitoire d'AAVr, le rendement de cette technique de production reste faible puisque seulement  $10^3$  à  $10^4$  particules d'AAVr sont produites par cellule d'encapsidation soit 100 fois moins que pour l'AAV sauvage (Samulski *et al.*, 1989; Snyder *et al.*, 1997 ; Salvetti *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1998 ). Ce mode de production est également peu reproductible et difficilement transposable à grande échelle. L'étape de transfection, fastidieuse et aléatoire, représente un des points critiques à améliorer.

Une solution envisageable pour le développement d'un mode de production plus efficace est la mise au point de lignées cellulaires ayant intégré de façon stable dans leur génome les gènes viraux rep2 et capX (délétés des ITR) en fonction du sérotype désiré. Dans de telles cellules, la transfection par le plasmide vecteur (contenant la cassette thérapeutique flanquée des ITR de l'AAV2) et l'apport des fonctions auxiliaires (par un Ad wt ou pAd) sont suffisantes pour déclencher la production de particules d'AAVr.

Les cellules HEK293 sont une lignée de choix mais l'expression constitutive du gène E1a de l'adénovirus sauvage dans ces cellules est toxique pour la cellule (expression continue de Rep78/68), ce qui rend la lignée instable (Clark *et al.*, 1995). La mise en évidence de l'effet toxique pour la cellule du gène Rep (Saudan *et al.*, 2000 ; Schmidt *et al.*, 2000) et sans doute aussi du gène Cap, impose de contrôler leur expression lorsqu'ils sont intégrés dans le génome cellulaire. Les lignées cellulaires d'encapsidation doivent pouvoir assembler efficacement les AAVr et ne pas exprimer les gènes Rep et Cap en absence de virus auxiliaire. Des lignées cellulaires dérivées des cellules HEK293 portant le gène Rep sous le

contrôle d'un promoteur inductible ont été développées mais les clones obtenus se sont révélés instables en culture au-delà de 10 passages (Qiao *et al.*, 2002).

Des lignées cellulaires dérivées des cellules HeLa portant les gènes Rep-Cap sous le contrôle des promoteurs natifs des AAV ont été mises au point (Clark *et al.*, 1995 ; Tamayose *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Chadeuf *et al.*, 2000 ). De façon inattendue, lorsque ces clones sont transfectés par le plasmide vecteur et infectés par un adénovirus sauvage, les rendements de production d'AAVr par cellule productrice sont 10 à 100 fois plus importants qu'après transfection transitoire de cellules HEK293 (Chadeuf *et al.*, 2000). Malgré cela, le rendement global de production d'AAVr n'est pas amélioré car le taux de transfection obtenu avec ces clones est très faible. Les cellules HeLa sont dérivées d'un cancer du col de l'utérus humain, elles contiennent donc le papillomavirus HPV18. Etant donné que la présence d'HPV18 dans les cellules HeLa représente un danger potentiel pour des applications cliniques, d'autres lignées cellulaires ont été considérées.

Les cellules A549 (dérivées d'un adénocarcinome pulmonaire humain) ayant intégré de façon stable les séquences Rep Cap présentent des caractéristiques similaires aux cellules HeLa. Les promoteurs AAV natifs sont spontanément silencieux, en présence d'adénovirus ou de plasmide auxiliaire, l'amplification des séquences Rep Cap est initiée et les cellules A549 sont capables d'assembler efficacement les AAVr (Gao *et al.*, 2002b; Farson *et al.*, 2004).

Des lignées stables hybrides rep2-cap1, -4, -5, -8 sont actuellement en cours de développement au LTG.

#### **1.3.2.6. Extraction et purification des AAVr.**

À partir des cellules préalablement récoltées, les particules virales recombinantes, produites dans le noyau, doivent être extraites et purifiées (Snyder *et al.*, 2002; Blouin *et al.*, 2004; Lu, 2004).

La première étape est une étape d'extraction des particules virales. La lyse des cellules peut se faire : (i) par des cycles de congélation-décongélation (technique standard de la plateforme de production du laboratoire pour obtenir des lots d'AAVr de qualité préclinique), (ii) par microfluidisation (pour obtenir des lots d'AAVr de qualité clinique), (iii) ou encore par utilisation de détergents et de DNase.

L'extraction est suivie d'une étape de clarification qui peut s'effectuer par centrifugation ou filtration. Puis les particules recombinantes sont concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium (qualité préclinique) ou filtration tangentielle (TFF) (qualité clinique).

Les vecteurs sont ensuite purifiés. La purification peut s'effectuer par ultracentrifugation sur des gradients qui peuvent être le chlorure de césium ou l'iodixanol (technique standard de la

plateforme de production du laboratoire pour obtenir des lots d'AAVr de qualité préclinique). Le chlorure de césium est ensuite éliminé par dialyse. Au cours de cette étape, il est possible de changer de tampon.

La purification peut également se faire sur colonnes échangeuses d'ions avec une étape finale de filtration stérilisante (Brument *et al.*, 2002).

### **1.3.2.7. La caractérisation des lots d'AAVr.**

Les lots d'AAV recombinants sont dosés par Dot Blot ou par PCR quantitative. Le Dot Blot permet de quantifier en "vector genome" les particules physiques d'AAVr en comparant le lot à doser par rapport à une gamme d'étalonnage. L'ADN viral est extrait puis transféré sur une membrane, il en est de même pour la gamme constituée de quantités croissantes de plasmide vecteur, la membrane est hybridée avec une sonde marquée, dirigée contre le transgène. L'intensité des spots obtenus est quantifiée. Cette étape de Dot Blot est de plus en plus souvent remplacée par de la PCR quantitative (SYBR Green ou TaqMan) qui permet d'évaluer la quantité de transgène.

Le Replication Center Assay (RCA) permet d'évaluer le rapport entre les particules infectieuses et les particules physiques totales (Salvetti *et al.*, 1998 ; Snyder, 1999). Des cellules Hela rep-cap permissives contenant de façon constitutive les séquences Rep-Cap sont infectées avec le lot d'AAVr à tester et un virus ou plasmide auxiliaire. Les cellules sont récoltées et l'ADN viral est extrait. Différentes dilutions d'ADN viral sont alors transférées sur des membranes. Celles-ci sont hybridées avec une sonde spécifique du transgène. Chaque point observé sur la membrane correspond à une particule d'AAVr qui est entrée dans la cellule et s'est répliquée.

Enfin, une batterie de contrôles qualité est effectuée, parmi eux une quantification des protéines contaminantes au nitrate d'argent, une quantification des ADN contaminants et des AAVrc (replication competent).

Pour mettre en évidence les protéines contaminantes, les vecteurs subissent une migration dans un gel de polyacrylamide dénaturant puis ce gel est coloré au nitrate d'argent. Si le lot d'AAVr est pur à 100%, seules les bandes correspondant aux protéines de capsid doivent apparaître (VP1, VP2, VP3) à des tailles précises et dans des proportions spécifiques en fonction du sérotype d'AAV. Les bandes supplémentaires sont représentatives des contaminations protéiques.

Les ADN contaminants (ADN cellulaire résiduel, plasmidique, adénoviral) sont détectés par PCR quantitative.

Les AAVrc ou particules compétentes pour la réplication sont mises en évidence en transfectant des cellules permissives avec les AAVr à tester puis en infectant ces cellules avec un adénovirus sauvage. Seuls les AAV ayant encapsidé par erreur les séquences Rep-Cap pourront se répliquer. Une PCR quantitative avec une amorce prise dans l'ITR et l'autre amorce prise dans l'ORF Rep permettra de quantifier les AAVrc.

Dans le cadre de la production de médicaments pour la clinique, des contrôles qualité sont également effectués sur les matières premières (les lignées cellulaires d'encapsulation, les consommables, les réactifs, les plasmides et autre matériel biologique) et l'ensemble des protocoles utilisés doit se conformer aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL), ce qui atteste de la traçabilité et de la qualité des contrôles effectués. En effet, les lots de vecteurs produits doivent respecter les normes des médicaments stériles injectables à savoir la stérilité, l'absence de mycoplasme, d'endotoxines et de divers virus humains, porcins et bovins.

#### **1.3.2.8. Persistance de l'expression du transgène.**

Les AAVr ainsi purifiés et contrôlés peuvent ensuite être injecté dans l'organe voulu. Les différentes études menées au laboratoire ont montré que ces AAV recombinants permettaient une expression du transgène à long terme dans la rétine et le muscle. Plusieurs études dont le travail de Magalie Penaud-Budloo au sein du laboratoire (Duan *et al.*, 1998; Duan *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2001; Schnepf *et al.*, 2003; Penaud-Budloo *et al.*, 2008) semblent montrer que la persistance des AAVr serait due à une circularisation du génome AAVr en monomères ou concatémères épisomaux (Figure 20).

La concatémérisation consiste en une fusion de plusieurs molécules d'ADN AAVr double brin en conformation « tête-à-tête » ou « tête-à-queue » (Fisher *et al.*, 1997; Nakai *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2003). La concatémérisation s'effectue grâce à des mécanismes de réparation des ADN double brin (Nakai *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2006). Ces épisomes persisteraient dans le noyau cellulaire sous une forme qu'on qualifie de néochromatinienne (Penaud-Budloo *et al.*, 2008). Les épisomes d'AAVr s'associeraient à des histones (comme la chromatine), ce qui leur permettrait de ne pas être éliminé par la cellule.

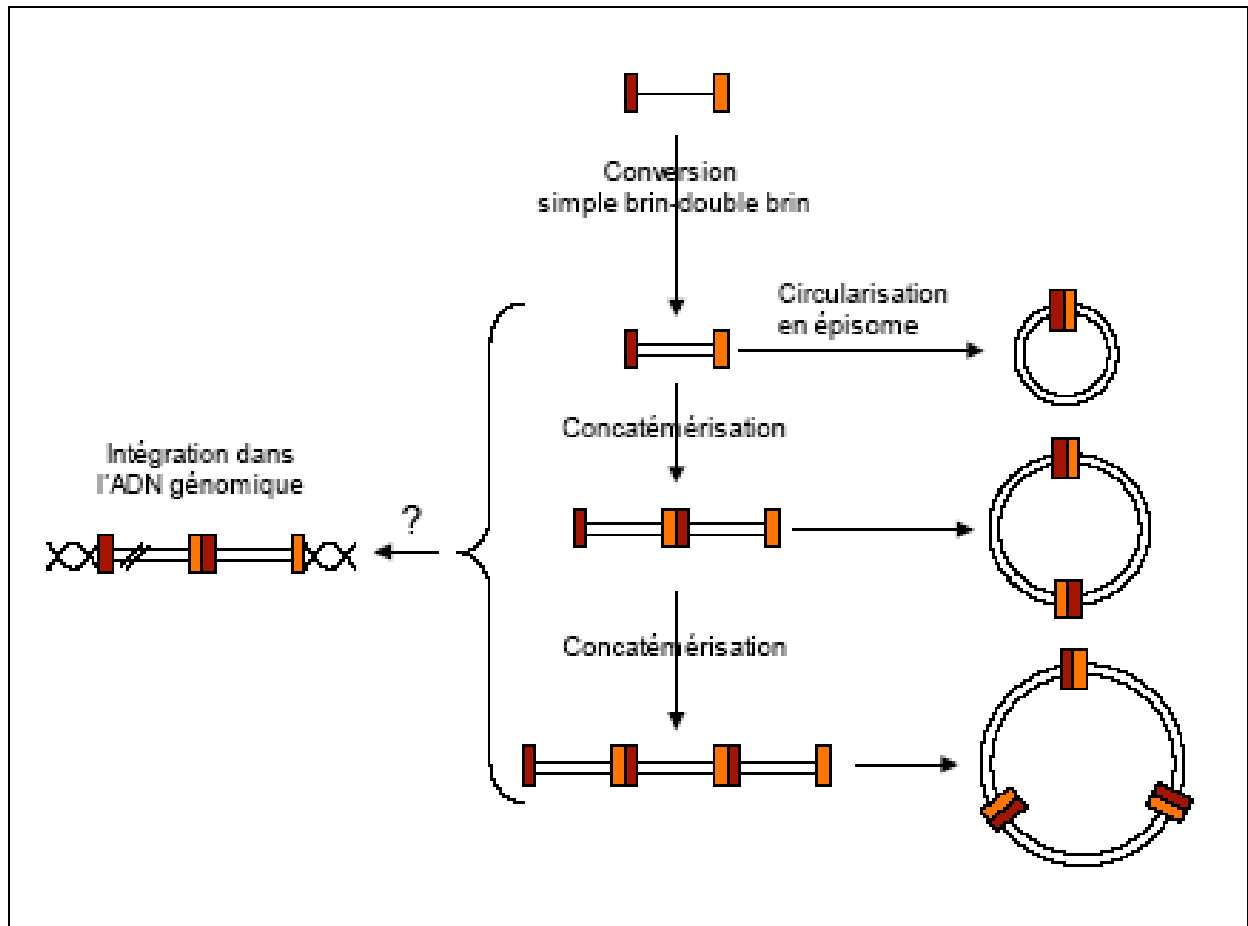
En 2009, l'équipe de Nicolas Ferry a publié une étude où des AAV2/8-LacZ étaient injectés par voie systémique chez des rats nouveaux-nés, dans le but de cibler les hépatocytes

(Flageul *et al.*, 2009). A 7 jours post-injection, la beta-galactosidase est détectée dans la majorité des hépatocytes mais 1 à 3 mois post-injection, seules quelques cellules (regroupées en clusters) expriment encore la beta-galactosidase. La microdissection de ces clusters a mis en évidence la présence de nombreuses copies de génome AAVr. La persistance de l'expression du transgène au niveau de ces clusters pourrait s'expliquer par une intégration dans le génome cellulaire. Des analyses de LAM-PCR (Linear Amplification Mediated-Polymerase Chain Reaction) ont permis de mettre en évidence des événements d'intégration dans ces cellules.

Il semblerait que l'intégration du génome de l'AAVr dans le génome hôte dépendent de l'espèce, du type cellulaire ciblé, de l'âge de l'animal, du mode d'administration, de la dose de vecteur AAVr, du promoteur utilisé et même du transgène.

De nombreux travaux ont tenté de mettre en évidence les événements d'intégration de l'AAVr dans différents tissus. La technique la plus récente utilisée pour mettre en évidence de tels événements est la LAM-PCR. La LAM-PCR, grâce à des couples d'amorces appropriés, permet d'amplifier spécifiquement dans un tissu, les liaisons entre l'ADN génomique et l'ADN du vecteur recombinant. Les études effectuées en collaboration entre le laboratoire de thérapie génique de Nantes et le laboratoire de Manfred Schmidt en Allemagne, n'ont pas permis de mettre en évidence d'événements d'intégration dans les muscles des macaques injectés avec des AAVr. Deux hypothèses peuvent alors être émises : (i) la sensibilité de la technique utilisée n'est pas suffisante pour détecter les rares événements d'intégration, (ii) l'AAV recombinant ne s'intègre pas dans le génome de son hôte.

Une nouvelle approche (basée sur la LAM-PCR) plus sensible est en cours de mise au point au laboratoire et pourra peut-être permettre de répondre à cette question dans les mois ou les années à venir.



**Figure 20 : Devenir du génome recombinant de l'AAV dans la cellule hôte. (D'après Penaud-Budloo et al., 2008)**

Lorsque le génome de l'AAVr pénètre dans le noyau de la cellule hôte, la première étape est toujours la conversion de l'ADN simple brin en double brin. Le génome persiste dans le noyau sous forme d'épisome (monomère ou concatémère). Il pourrait également, dans de très rares cas, s'intégrer dans le génome de l'hôte.



### **1.3.2.9. Tropisme cellulaire des AAVr qui ciblent la rétine.**

#### **1.3.2.9.1. Les sérotypes d'AAVr qui ciblent la rétine.**

De nombreuses recherches sur les pathologies rétiniennes héréditaires utilisent les AAV recombinants comme vecteurs de transfert de gène, car il a été démontré qu'un certain nombre de sérotypes d'AAVr transduisaient spécifiquement les tissus rétiniens. La rétine est un organe complexe, composé de plusieurs couches de neurones rétiniens. Parmi les 12 sérotypes d'AAV connus à ce jour, certains montrent un tropisme particulier pour l'une ou l'autre des couches composant la rétine. Il existe deux façons d'apporter le vecteur AAVr dans la rétine : l'injection intra-vitréenne et l'injection sous-rétinienne.

Lors de l'injection intra-vitréenne, la solution de vecteur est introduite dans le vitrée. L'AAVr est alors à proximité des cellules ganglionnaires séparées du vitrée par la membrane hyaloïde uniquement. L'injection intravitréenne a un intérêt très limité car un seul sérotype d'AAVr permet de transduire des neurones rétiniens suite à ce type d'injection. En effet, seul l'AAV2/2 transduit les cellules ganglionnaires, et le niveau d'expression du transgène dans ces neurones reste faible quelle que soit l'espèce (Dudus *et al.*, 1999; Folliot *et al.*, 2003).

Lors de l'injection sous-rétinienne, l'aiguille traverse le vitrée et l'extrémité vient se positionner entre les les photorécepteurs et les cellules de l'EPR. La solution de vecteur est alors injectée dans l'espace sous-rétinien. L'AAVr est en contact direct avec les photorécepteurs et les cellules de l'EPR. Après une injection sous-rétinienne, l'AAV2/2, comme l'AAV2/5, l'AAV2/7 et l'AAV2/8, sont capable de transduire à la fois les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (Ali *et al.*, 1996 ; Ali *et al.*, 1998 ; Bennett *et al.*, 1999 ; Auricchio *et al.*, 2001 ; Lebherz *et al.*, 2008) (Tableau 2). Une étude menée chez la souris montre que, outre les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, l'AAV2/2 et l'AAV2/8 transduisent les cellules ganglionnaires tandis que l'AAV2/2, l'AAV2/5 et l'AAV2/8 transduisent également les cellules gliales de Müller (Lebherz *et al.*, 2008).

L'AAV2/1, l'AAV2/4 et l'AAV2/9 transduisent spécifiquement l'épithélium pigmentaire rétinien (Auricchio *et al.*, 2001). L'AAV2/9 permet également de transduire les cellules gliales de Müller chez la souris (Lebherz *et al.*, 2008).

L'AAV2/8 est de plus en plus utilisé dans la rétine car suite à une injection sous-rétinienne chez le chien, il est le seul sérotype capable de diffuser en dehors de la surface rétinienne décollée par la bulle et c'est également le seul sérotype qui permet de transduire les voies visuelles jusqu'au cortex visuel grâce au transport transynaptique du vecteur (Stieger *et al.*, 2008).

Sérotype	Tropisme (rétine)			
	souris	rat	chien	primate
AAV2/1	EPR	EPR		
AAV2/2	EPR + PR	EPR+PR	EPR+PR	EPR+PR
AAV2/4	EPR	EPR	EPR	EPR
AAV2/5	EPR + PR	EPR + PR	EPR + PR	EPR + PR
AAV2/6	EPR			
AAV2/7	EPR + PR			
AAV2/8	EPR + PR		EPR+PR	
AAV2/9	EPR		EPR+PR	

EPR, épithélium pigmentaire rétinien ; PR, photorécepteurs.

**Tableau 2 : Tropisme cellulaire des AAV recombinants dans la rétine après injection sous-rétinienne.**

L'AAV2/3 ne transduit aucun tissu rétinien et l'AAV2/6 ne permet qu'une transduction très peu efficace des cellules de l'EPR (Yang *et al.*, 2002). Les sérotypes 10, 11 12 n'ont, à ce jour, pas été testés dans la rétine.

Cependant le tropisme d'un vecteur pour un type de neurone rétinien peut varier d'une espèce animale à l'autre. Il est donc indispensable de valider le tropisme des vecteurs utilisés chez l'animal désiré avant de démarrer une étude préclinique.

#### **1.3.2.9.2. Les promoteurs rétine-spécifiques.**

La plupart des études de transfert de gène dans la rétine, utilise des promoteurs ubiquitaires comme le promoteur précoce du cytomégalovirus (CMV) (Ali *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 1997; Narfstrom *et al.*, 2003) ou le promoteur chimérique chicken  $\beta$ -actine promoter/CMV enhancer (CBA) (Acland *et al.*, 2001). L'utilisation d'un promoteur s'exprimant spécifiquement dans un type de neurone rétinien, associé au tropisme d'un sérotype donné d'AAVr sont des éléments très importants pour la biosécurité d'un essai clinique. En effet, le tropisme du sérotype assure que le vecteur viral ne transduira qu'un type cellulaire donné et le choix du promoteur approprié permettra de ne faire exprimer le transgène que si le vecteur est entré dans la bonne cellule. Ces dernières années, un certain nombre de promoteurs spécifiques de la rétine ont été identifiés comme le promoteur humain RPE65 qui n'est actif que dans les cellules de l'EPR (Nicoletti *et al.*, 1998), le promoteur VMD2 ciblant également les cellules de l'EPR (Esumi *et al.*, 2004), le promoteur humain de la rhodopsine kinase spécifique des photorécepteurs, cônes et bâtonnets (Young *et al.*, 2003), le promoteur murin GFAP spécifique des cellules gliales de Müller (Kuzmanovic *et al.*, 2003) et différents promoteurs de l'opsine spécifique des bâtonnets ou des différents types de cônes. Ainsi, un promoteur spécifique de l'opsine des bâtonnets a été identifié chez la souris (Lem *et al.*, 1991), la vache (Zack *et al.*, 1991), et l'homme (Bennett *et al.*, 1995). Il a également été identifié un promoteur humain spécifique de l'opsine « bleue » des cônes (Chen *et al.*, 1994), et un promoteur humain spécifique de l'opsine rouge et verte des cônes (Fei, 2003). Pour traiter les bords RPE65<sup>-/-</sup>, l'utilisation d'un AAVr de sérotype 4 qui cible spécifiquement les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien est associée à un transgène sous le contrôle du promoteur constitutif RPE65 humain, qui ne permet une activation de la transcription que dans les cellules de l'EPR. La biosécurité du vecteur est ainsi assurée.

Dans le cadre des essais de traitement du teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup>, la situation est plus complexe car on veut cibler les photorécepteurs rétiens. Or, il n'existe pas de sérotype d'AAVr qui cible spécifiquement les photorécepteurs. Le choix s'est alors porté sur un AAV2/5 qui cible à la fois les cellules de l'EPR et les photorécepteurs. Toutefois, pour restreindre l'expression du transgène aux photorécepteurs seuls, le promoteur humain de la

rhodopsine kinase (Rk) a été utilisé. En effet, la rhodopsine kinase est une enzyme de la cascade de phototransduction qui catalyse la phosphorylation du photopigment. Cette enzyme n'est exprimée que dans les photorécepteurs. Le promoteur Rk utilisé dans les études qui vont vous être présentées est en réalité un fragment de 110 pb issu du promoteur constitutif (Figure 21).

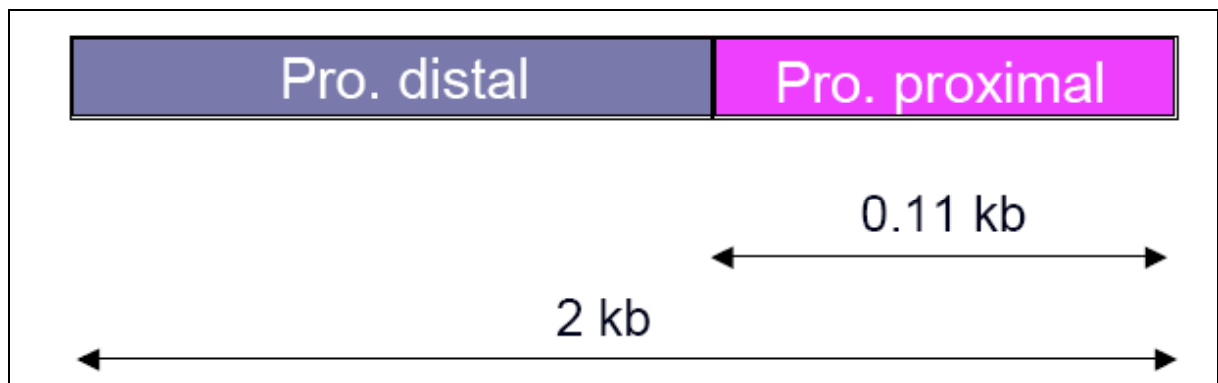
Le promoteur humain Rk constitutif est long de 2 kb, ce qui est beaucoup trop grand pour être intégré dans un AAVr puisque la taille totale de la cassette ne doit pas excéder 4,5 kb en prenant en compte le transgène et le signal de polyadénylation. Une étude de mutagenèse dirigée (Young *et al.*, 2003) a montré que la partie distale du promoteur n'était pas indispensable à l'activité transcriptionnelle. Seule la partie proximale confère au promoteur son activité transcriptionnelle. Une étude publiée en 2007 (Khani *et al.*, 2007) a montré que l'injection sous-rétinienne d'AAV2/5-Rk-GFP chez la souris permettait une expression de la GFP exclusivement dans les photorécepteurs.

#### **1.3.2.10. Inocuité des vecteurs AAVr dans la rétine.**

De nombreuses études ont prouvé que l'expression à long terme d'un transgène dans la rétine suite à un transfert de gène médié par les AAVr n'engendrait aucun effet délétère.

L'injection sous-rétinienne d'AAV2/2.CMV.GFP chez le chien a permis d'observer une expression du transgène stable pendant 18 mois, associée à une intégrité des structures rétiniennes (Bainbridge *et al.*, 2003). Le même vecteur injecté chez le primate a donné des résultats similaires sur une période de 12 mois (Bennett *et al.*, 1999).

Une étude plus complète menée par Guylène Le Meur au sein du laboratoire a consisté à injecter en sous-rétinien des vecteurs AAV2/2, AAV2/4 et AAV2/5 chez 14 chiens et 9 primates (Le Meur *et al.*, 2005). Les résultats de cette étude révèlent que l'injection sous-rétinienne de vecteurs AAV recombinants dans la rétine de chien ou de primate est une procédure sûre avec un taux de réussite de 95% et n'engendre pas de complication post-opératoire. L'angiographie à la fluorescéine montre que les vaisseaux rétiniens ne sont pas abimés par le décollement rétinien engendré par la chirurgie. L'électrorétinographie montre



**Figure 21 : Structure du promoteur humain de la rhodopsine kinase (Rk).**

Le promoteur humain de la rhodopsine kinase est composé d'une partie distale de 1,9 kb et d'une partie proximale de 0,11 kb. Il a été montré que la partie proximale seule suffisait à initier la transcription d'un transgène (Young *et al.*, 2003).

quant à elle que la fonction rétinienne n'est pas altérée. L'expression du transgène GFP chez ces animaux est stable sur une période de plus de 6 ans (Rolling, données non publiées).

#### **1.3.2.11. Etudes de biodistribution des AAVr dans la rétine.**

Le développement d'essais cliniques utilisant le transfert de gène, via des AAV recombinants, rend les études de biodistribution indispensables. En effet, il paraît nécessaire de s'assurer de la sécurité des vecteurs viraux utilisés. La grande majorité des études de biodistribution du vecteur recombinant dans l'organisme, est basée sur une quantification du vecteur dans les différents tissus et organes grâce à la PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel (qPCR). À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total, appelé amplicon, est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible. La qualité d'une étude de biodistribution est déterminée par plusieurs facteurs (Gonin *et al.*, 2004). Tout d'abord le soin avec lequel les prélèvements sont effectués. Il est primordial car il évite des contaminations entre échantillons. Ensuite la mise au point de la technique de qPCR. Celle-ci doit être modifiée pour chaque transgène et chaque couple d'amorces utilisé. Enfin, la cinétique des prélèvements est importante car elle détermine la pertinence des résultats.

La dissémination du vecteur dans l'organisme dépend essentiellement de deux facteurs : le sérotype du vecteur utilisé et le mode d'administration. Toutefois d'autres facteurs secondaires peuvent également entrer en jeu comme le promoteur utilisé ou la construction elle-même (Conrad *et al.*, 1996; Arruda *et al.*, 2001; Favre *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2002). Dans les paragraphes suivants nous détaillerons quelques études de biodistribution de l'AAVr suite à des injections intraoculaires.

##### **1.3.2.11.1. Dissémination suite à une injection sous-rétinienne.**

Chez le rat, 2 ou 3 mois après l'injection sous-rétinienne d'AAV2/2.CMV.GFP, il n'a pas été mis en évidence de diffusion du vecteur à distance de l'œil dans des organes comme le foie ou le muscle. Le vecteur n'a pu être détecté que dans le nerf optique de l'œil injecté et pas dans les voies visuelles (Provost *et al.*, 2005). La même étude effectuée chez le primate a permis de détecter le génome du vecteur 2 mois après l'injection au niveau des cellules blanches mononuclées (PBMC) et d'un nœud lymphatique sous-mandibulaire.

Chez le briard RPE65<sup>-/-</sup>, après injection en sous-rétinien avec un AAV2/2.CAG.RPE65, le génome du vecteur a été détecté dans le cœur, le diaphragme et un nœud lymphatique mandibulaire 3 mois après le geste chirurgical. Des traces de vecteur ont également été mises en évidence dans le nerf optique de l'œil injecté mais aucune trace n'a été retrouvée dans le reste des voies visuelles ou dans le cerveau (Jacobson *et al.*, 2006a).

L'étude de la biodistribution de ce même vecteur chez le primate après une injection sous-rétinienne a montré qu'une semaine après la chirurgie, le génome de vecteur pouvait être détecté dans le nerf optique, le tractus optique, le corps géniculé latéral et le cortex visuel ainsi que dans des organes à distance comme le muscle et dans un nœud lymphatique péri-auriculaire. Trois mois après l'injection, aucune trace de vecteur n'a pu être mis en évidence dans les voies visuelles (exception faite du corps géniculé latéral chez un des huit primates analysés) et les organes à distance des primates (Jacobson *et al.*, 2006b).

Après une injection sous-rétinienne d'AAV2/4.CMV.GFP ou d'AAV2/5.CMV.GFP chez le chien, comme chez le macaque, le génome du vecteur est retrouvé dans les fluides lacrimaux et nasaux dès 25 minutes après l'injection et pendant 3 à 4 jours, et dans le sérum dès 15 minutes après l'injection et pendant 15 à 20 jours (Weber *et al.*, 2003).

Après injections sous-rétiniennes d'AAV2/2.CMV.GFP, d'AAV2/4.CMV.GFP, d'AAV2/5.CMV.GFP ou d'AAV2/2.CAG.RPE65 chez le rat, le chien ou le primate, aucune diffusion du vecteur dans les gonades n'a été retrouvée ce qui indique que la transmission à la descendance des caractères génétiques apportés par le transfert de gène est peu probable (Provost *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2006a; Jacobson *et al.*, 2006b).

#### **1.3.2.11.2. Dissémination suite à une injection intravitréenne.**

L'injection intravitréenne d'un AAV2/2.GUSB chez une souris atteinte de mucopolysaccharidose de type VII a permis de détecter une activité enzymatique GUSB dans le cerveau, ceci signifie que le vecteur et/ou la protéine transgénique a diffusé du vitré de l'œil jusqu'au cerveau (Hennig *et al.*, 2003).

Après une injection intravitréenne d'AAV2/2.CMV.GFP chez le rat, il n'a pas été mis en évidence de diffusion du vecteur à distance de l'œil dans des organes comme le foie ou le muscle (Provost *et al.*, 2005). L'injection intravitréenne du même vecteur chez le chien a en revanche permis de détecter le génome du vecteur dans les cellules blanches mononuclées (PBMC), les nœuds lymphatiques axillaires, sous-mandibulaires ou prétragien, les amygdales et les glandes lacrymales. Dans cette étude, l'injection chez le rat et chez le chien a toutefois montré une diffusion du vecteur le long des voies visuelles (nerf optique, chiasma optique, tractus optique, corps géniculé latéral, colliculus supérieur, radiations

optiques et cortex visuel). Ces résultats suggèrent qu'un transport transynaptique du vecteur est possible après une injection intravitréenne.

Après injection intravitréenne d'AAV2/2.CMV.GFP chez le rat, le chien ou le primate, aucune diffusion du vecteur dans les gonades n'a été retrouvée ce qui indique que la transmission à la descendance des caractères génétiques apportés par le transfert de gène est peu probable (Provost *et al.*, 2005).



### **1.3.3. Le transfert de gènes dans la rétine via les AAVr.**

Dans cette partie du manuscrit, nous allons décrire certaines études utilisant le transfert de gène dans la rétine par le biais d'AAV recombinants, pour restaurer la vision dans des modèles de dystrophies rétiniennes héréditaires récessives (essentiellement des modèles de rétinite pigmentaire ou d'amaurose congénitale de Leber) (Smith *et al.*, 2009). Cette description ne sera pas exhaustive et se focalisera sur les essais ciblant les photorécepteurs et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Nous excluons volontairement de notre description les études utilisant des ARN interférents et autres ribozymes dans le cadre de pathologies dominantes ainsi que les essais de thérapie génique non spécifique impliquant les facteurs neurotrophiques ou anti-angiogéniques.

Nous nous attarderons spécifiquement sur les essais de thérapie génique d'addition ayant donné des résultats concluants. La thérapie génique corrective a pour but d'apporter à la cellule déficiente (ici les photorécepteurs rétiniens ou les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien), la protéine fonctionnelle qui lui fait défaut, par le biais d'un vecteur portant une copie non mutée du gène impliqué (Tableau 3).

#### **1.3.3.1. Les essais de thérapie génique d'addition ciblant les photorécepteurs.**

##### **1.3.3.1.1. La souris PDE6B-déficiente.**

La phosphodiesterase est une enzyme de la cascade de phototransduction des photorécepteurs, composée de plusieurs sous-unités (alpha, bêta, gamma). La souris rd1 (rodless retina) possède une mutation dans le gène de la sous-unité bêta de la phosphodiesterase (PDE6B) qui entraîne une dégénérescence très précoce des photorécepteurs (Keeler, 1924). Vingt et un jours après la naissance, ces souris ne possèdent déjà plus qu'une seule couche de noyaux de photorécepteurs. Ce modèle murin de rétinite pigmentaire a permis de tester le premier protocole de thérapie génique d'addition.

Dés 1997, des chercheurs injectent dans le vitré de souris âgées de 8 jours, un vecteur AAV recombinant portant le gène PDE6B sous le contrôle d'un promoteur de l'opsine tronqué (Jomary *et al.*, 1997). À 21 jours les souris sont sacrifiées et énucléées. L'expression de la protéine PDE6B a été confirmée par RT-PCR et immunohistochimie.

Gène responsable	Cellules impliquées	Rôle de la protéine	Pathologie	Mode de transmission	Modèle d'étude	Références
<b>PDE6B</b>	PR	Enzyme de la phototransduction	RP	Autosomale récessive	Souris	Jomary, 1997 Aguirre, 1999 Pang, 2008 Ali, 2000
<b>Prph2</b>	PR	Structure des PR	RP	Autosomale récessive	Souris	Sarra, 2001 Schlichtenbrede 2003-2004
<b>RetGC1/GUCY2D</b>	PR	Enzyme de la phototransduction	ACL	Autosomale récessive	Souris	Haire, 2006
<b>RPGRIP1</b>	PR	Structure des PR	ACL	Autosomale récessive	Souris	Pawlyk, 2005
<b>AIPL1</b>	PR	Protéine chaperonne de la phototransduction	ACL	Autosomale récessive	Souris	Tan, 2009 Sun, 2009
<b>RPGR</b>	PR	Structure des PR	RP	Récessive liée à l'X	Souris	Hong, 2005
<b>Rsh1</b>	PR	Inconnu	Retinoschisis juvénile	Récessive liée à l'X	Souris	Zeng, 2004 Min, 2005 Kjellstrom, 2007 Takoda, 2008
<b>GNAT2</b>	PR	Enzyme de la phototransduction	Achromatopsie	Autosomale récessive	Souris	Alexander, 2007
<b>CNGB3</b>	PR	Enzyme de la phototransduction	Achromatopsie	Autosomale récessive	Chien	Komaromy (Congrès ARVO, 2006)
<b>L-opsine</b>	PR	Enzyme de la phototransduction	Daltonisme	Récessive liée à l'X	Primate	Mancuso, 2009
<b>MERTK</b>	EPR	Phagocytose des segments externes	ACL	Autosomale récessive	Rat	Smith, 2003
<b>LRAT</b>	EPR	Cycle des rétinoides	ACL	Autosomale récessive	Souris	Batten, 2005
<b>Oa1</b>	EPR	Récepteur de l'EPR couplé à une protéine G	Albinisme oculaire	Récessive liée à l'X	Souris	Surace, 2005
<b>Oca1</b>	EPR	Enzyme impliquée dans la formation de la mélanine	Albinisme oculo-cutané	Autosomale récessive	Souris	Gargiulo, 2009
<b>RPE65</b>	EPR	Cycle des rétinoides	ACL	Autosomale récessive	Souris Chien Primate Homme	Dejneka, 2004 Lai, 2004 Pang, 2006 Acland, 2001-2005 Narfström, 2003-2005 Le Meur, 2007 Jacobson 2006a-b Maguire, 2008 Bainbridge, 2008 Hauswirth, 2008

Tableau 3 : Thérapie génique d'addition des dystrophies rétinienne héréditaires.

Dans les yeux traités des souris, les chercheurs ont observé une augmentation du nombre de couches de noyaux de photorécepteurs par rapport aux yeux non traités. L'évaluation de la fonction rétinienne *in vitro* montre que les rétines traitées sont deux fois plus sensibles à la lumière que les rétines non traitées. Malheureusement la fonction rétinienne n'a pas été évaluée *in vivo* chez ces animaux. Cette étude montre pour la première fois la faisabilité d'un traitement par thérapie génique d'addition.

Un autre modèle murin portant une mutation dans la PDE6B, la souris rd10, a été identifiée plus récemment (Chang *et al.*, 2002). Cette souris rd10 développe un phénotype plus proche de celui de la pathologie humaine (RP autosomale récessive). En 2008, l'équipe d'Hauswirth tente de restaurer la fonction rétinienne chez ces souris en injectant dans l'espace sous-rétinien 14 jours après la naissance un vecteur AAV2/5 portant l'ADNc PDE6B sous le contrôle du promoteur CBA (Pang *et al.*, 2008). Des ERG ont été effectués trois semaines post-injection et ont montré que la fonction rétinienne était préservée dans l'œil injecté. En effet, l'amplitude de l'onde b en conditions scotopiques dans l'œil injecté est significativement plus importante (200  $\mu$ V) que celle de l'œil non injecté (60  $\mu$ V). La fonction visuelle a également été évaluée et les tests de comportements ont montré que la vision était restaurée dans l'œil injecté. Les animaux ont ensuite été sacrifiés afin d'effectuer l'étude histologique. Celle-ci a mis en évidence la préservation des photorécepteurs avec des segments externes 30% plus longs dans les yeux injectés et une couche nucléaire externe 60% plus épaisse. Cette étude montre l'efficacité *in vivo* d'un traitement par thérapie génique chez la souris rd10 (Pang *et al.*, 2008).

Des expériences équivalentes ont été testées chez le Setter Irlandais rcd1 (Aguirre *et al.*, 1999) porteur lui aussi d'une mutation dans le gène PDE6B, mais à ce jour, aucune équipe n'a publié de résultats concluants concernant ce modèle de gros animal, dont la dégénérescence des photorécepteurs est extrêmement précoce. Au LTG, nous disposons de ce modèle de chiens PDE6B<sup>-/-</sup> et nous comptons initier un projet de thérapie génique d'addition prochainement.

#### **1.3.3.1.2. La souris Prph2-déficiente.**

La souris transgénique Prph2<sup>Rd2/Rd2</sup> ou souris rds (retinal degeneration slow) possède une mutation nulle homozygote dans le gène structural de la périphérine 2 et est atteinte de rétinite pigmentaire à transmission autosomale récessive. La périphérine 2 est une protéine indispensable à la formation des disques des segments externes des photorécepteurs. C'est une glycoprotéine membranaire qui s'associe à la protéine ROM1 pour former un complexe dont le rôle est de stabiliser les membranes des disques (Bascom *et al.*, 1992). La souris rds qui ne possède pas de périphérine 2, présente un défaut dans le développement des

disques et donc des segments externes, ce qui entraîne l'apoptose des photorécepteurs. La fonction rétinienne de ces souris, évaluée par l'électrorétinogramme, diminue très rapidement après la naissance et est indétectable dès l'âge de deux mois. Plusieurs équipes dont celle de Robin Ali, ont effectué une thérapie génique d'addition chez ces souris en utilisant un vecteur AAV2/2 portant le gène sauvage *Prph2* sous le contrôle d'un promoteur rhodopsine (Ali *et al.*, 2000; Sarra *et al.*, 2001; Schlichtenbrede *et al.*, 2003a; Schlichtenbrede *et al.*, 2003b; Schlichtenbrede *et al.*, 2004). L'injection sous-rétinienne de ce vecteur chez les souris atteintes a abouti à une amélioration de la fonction rétinienne (ERG), corrélée à une amélioration de la structure des photorécepteurs (présence de segments externes) comme le montrent les résultats de microscopie électronique publiés dans cette étude. Le métabolisme des photorécepteurs est également amélioré puisqu'un taux égal à 15% du taux normal de rhodopsine est observé au niveau des segments externes néoformés (Schlichtenbrede *et al.*, 2004). Malheureusement une étude à long terme a montré que ce vecteur ne permettait pas d'assurer le maintien de la structure des photorécepteurs dans le temps (Sarra *et al.*, 2001). La dégénérescence lente des photorécepteurs se poursuit malgré le traitement. Sarra et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de périphérine 2 dans la rétine avait des effets délétères. En effet, l'injection de ce même vecteur chez des souris saines, induisant une surexpression locale de *Prph2*, entraîne une destruction des photorécepteurs au niveau de la surface rétinienne traitée. Il semble donc indispensable de trouver un moyen de réguler l'expression du transgène avant de pouvoir passer en clinique avec ce type de traitement (voir chapitre suivant sur le système tétracycline). Schlichtenbrede et ses collaborateurs ont poussé plus loin l'analyse de la restauration de la fonction rétinienne après traitement des souris *rds* par un vecteur AAV2/2 portant le gène murin de la périphérine sous le contrôle du promoteur rhodopsine. En effet, ils ont montré une amélioration des réponses visuelles au niveau du colliculus supérieur par l'enregistrement des potentiels évoqués visuels au niveau de cette structure neurale (Schlichtenbrede *et al.*, 2004). Cette étude est la première à mettre en évidence l'amélioration de la capacité des axones des cellules ganglionnaires à maintenir ou à réutiliser des connexions synaptiques normales avec le cerveau suite à un traitement par thérapie génique dans le cadre de dystrophies rétiniennes héréditaires.

#### **1.3.3.1.3. La souris *RetGC1*-déficiente.**

La souris transgénique *RetGC1*<sup>-/-</sup> a été obtenue par invalidation du gène *RetGC1/GUCY2* par knock-out (KO). Le défaut en guanylate cyclase 1, qui est une enzyme de la cascade de phototransduction, entraîne l'abolition de la translocation de l'arrestine des cônes, ce qui a pour conséquence la perte de fonction puis la mort des photorécepteurs

dans les 6 premiers mois de la vie de ces souris. L'injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV recombinant de sérotype 5 portant le gène sauvage de la guanylate cyclase 1 sous le contrôle, soit du promoteur murin de l'opsine, soit du promoteur fort chicken-beta-actine (CBA), aboutit à une restauration de la translocation de l'arrestine des cônes suite à un stimulus lumineux mais n'entraîne pas de restauration de la fonction des cônes (pas d'amélioration de l'ERG) (Haire *et al.*, 2006). L'absence de restauration fonctionnelle dans cette étude peut être due à une toxicité engendrée par la surexpression de RetGC1, par rapport à son niveau physiologique.

#### **1.3.3.1.4. La souris RPGRIP1-déficiente.**

La souris RPGRIP1<sup>-/-</sup> possède une mutation nulle homozygote dans le gène RPGRIP1. Ces souris développent une dégénérescence proche de l'amaurose congénitale de Leber chez l'Homme. Dans un premier temps, les segments externes des photorécepteurs sont atrophiés et désorganisés puis dans un second temps les photorécepteurs meurent par apoptose et la couche nucléaire externe diminue de façon dramatique. La dégénérescence des photorécepteurs chez la souris RPGRIP1-déficiente est évidente dès 15 jours après la naissance et l'ERG est indétectable à l'âge de 3 mois (Hong *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003). L'équipe de Tiansen Li, qui a beaucoup étudié le rôle de RPGR et de RPGRIP1 dans ce modèle murin, a effectué en 2005 un essai de thérapie génique d'addition (Pawlyk *et al.*, 2005). L'injection sous-rétinienne d'AAV2/2 recombinant portant l'ADNc RPGRIP1 murin sous le contrôle du promoteur murin de l'opsine a abouti à la restauration de la localisation de RPGR au niveau des cils connecteurs (en absence de RPGRIP1, RPGR ne peut s'ancrer au cil connecteur et se retrouve diffus dans le cytoplasme du segment interne). De plus, l'étude histologique montre que chez les souris RPGRIP1<sup>-/-</sup> traitées avec ce vecteur, 5 mois après l'injection, le nombre de photorécepteurs a augmenté par rapport aux souris RPGRIP1<sup>-/-</sup> non traitées. En effet, au site d'injection l'épaisseur de la couche nucléaire externe est d'environ 35 µm chez les souris traitées alors qu'elle n'est que d'environ 3 µm chez les souris non traitées. Chez les souris traitées, les segments internes et externes des photorécepteurs sont également plus longs (environ 25 µm au site d'injection contre 5 µm pour les souris non traitées) et mieux organisés avec des disques empilés de façon régulière. Deux mois après l'injection, l'évaluation de la fonction rétinienne montrait une amplitude de 250 µV pour l'œil contrôle et 280 µV pour l'œil traité. Cette différence de 30 µV ne peut malheureusement pas être interprétée car nous ne disposons pas de l'évaluation ERG avant injection. Trois mois après injection, les amplitudes de l'onde b diminuent dans les deux yeux de la même façon (100 µV pour l'œil contrôle et l'œil traité), ce qui correspond à l'évolution normale de la pathologie chez les souris RPGRIP1<sup>-/-</sup>. Quatre

mois après le traitement, l'amplitude de l'ERG dans l'œil traité a augmenté significativement (160  $\mu$ V) par rapport à l'œil contrôle (100  $\mu$ V), ce qui semble indiquer une certaine efficacité du traitement. Malheureusement, le mois suivant les amplitudes ont commencé à diminuer (140  $\mu$ V pour l'œil traité, 60  $\mu$ V pour l'œil contrôle). Le suivi clinique n'ayant pas été poursuivi au-delà de 5 mois, il est difficile de conclure quand à la stabilité de cette amélioration. Le délai entre l'injection du vecteur et l'amélioration de l'ERG est sans doute dû au fait que la restauration du phénotype normal chez ces individus passe par deux étapes : tout d'abord la restauration de la structure normale des articles externes des photorécepteurs puis dans un second temps le redémarrage de la cascade de phototransduction dans les disques des segments externes néoformés.

#### **1.3.3.1.5. La souris AIPL1-déficiente.**

Le gène AIPL1 (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1), qui se situe près du gène RetGC1 sur le chromosome 17, code pour une protéine proche des protéines arylhydrocarbonées. La protéine AIPL1 située dans les photorécepteurs, contient des répétitions tétratricopeptides existant dans les protéines chaperones, suggérant qu'elle pourrait être impliquée dans le transport et le repliement des protéines de la rétine, notamment de l'enzyme de la cascade de phototransduction, la phosphodiesterase. Une étude récente montre que l'enzyme AIPL1 est liée à la sous-unité alpha de la phosphodiesterase (Kolandaivelu *et al.*, 2009). Un défaut dans le gène AIPL1 peut être responsable d'amaurose congénitale de Leber, de rétinite pigmentaire juvénile ou de dystrophie cônes-bâtonnets dominante. En 2004, un premier modèle murin KO pour le gène AIPL1 est généré (Dyer *et al.*, 2004). Ces souris transgéniques développent un phénotype proche de celui des souris rd qui sont mutées pour le gène de la phosphodiesterase. Ces données semblent montrer que la protéine AIPL1 joue un rôle dans l'expression ou la stabilité de la phosphodiesterase. En 2009, l'équipe de Robin Ali publie une étude sur l'évaluation d'un traitement de thérapie génique d'addition chez deux modèles murins AIPL1-déficients mimant trois degrés différents de pathologie (Dyer *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2009). Le premier modèle est la souris AIPL1 hypomorphe (h/h) qui possède des allèles du gène AIPL1 dits hypomorphes. Le produit du gène est synthétisé et il a la même fonction que le produit sauvage, mais la mutation fait qu'il est produit en quantité plus faible. La souris possède donc un taux de protéine AIPL1 diminué par rapport à une souris sauvage et a un phénotype peu sévère avec une dégénérescence des photorécepteurs lente. En exposant ces souris AIPL1-hypomorphes à la lumière, on génère un second modèle alternatif où la vitesse de dégénérescence des photorécepteurs est augmentée de 2 à 3 fois, ce qui engendre un phénotype qu'on qualifiera de sévère. Le dernier modèle est la souris AIPL1<sup>-/-</sup>

(invalidation du gène par KO) qui ne possède quant à elle pas du tout de protéine AIPL1 fonctionnelle, son phénotype est très sévère avec une dégénérescence des photorécepteurs extrêmement rapide. Les souris  $AIPL1^{h/h}$ ,  $AIPL1^{h/h+lumière}$  et  $AIPL1^{-/-}$  miment donc trois degrés de sévérité de pathologie qui sont retrouvés chez l'Homme. Des vecteurs AAV recombinants portant le gène AIPL1 sauvage murin ou humain sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV ont été générés. Pour traiter ces trois modèles murins, les auteurs ont choisi d'utiliser deux types de vecteurs ayant différentes cinétiques de transduction. Chez la souris  $AIPL1^{h/h}$  où la dégénérescence est lente, les auteurs ont choisi d'utiliser un vecteur AAV de sérotype 2, alors que chez les souris  $AIPL1^{h/h+lumière}$  et  $AIPL1^{-/-}$  où la dégénérescence est plus rapide, ils ont choisi d'utiliser un vecteur de sérotype 8 qui permet une transduction plus efficace ainsi qu'une expression du transgène plus rapide et plus forte. Les injections sous-rétiniennes d'AAV2/2 chez la souris  $AIPL1^{h/h}$  et d'AAV2/8 chez les souris  $AIPL1^{h/h+lumière}$  et  $AIPL1^{-/-}$  ont montré que dans chacune des trois situations correspondant aux différents tableaux cliniques de la pathologie, il était possible de restaurer à long terme la fonction des photorécepteurs. En effet, après injection des vecteurs AAV2/2 et AAV2/8, l'augmentation de la production de protéine AIPL1 a été détectée dans les segments internes des photorécepteurs ce qui a conduit à une augmentation de la phosphodiesterase et à la restauration de la translocation de PDE du segment interne au segment externe des photorécepteurs. Dans les trois modèles de souris, la dégénérescence des photorécepteurs est ralentie, les segments externes sont préservés et la fonction rétinienne est stabilisée. Les ERG effectués 28 semaines post-injection montrent que l'amplitude de l'onde b en conditions scotopiques dans l'œil injecté est significativement plus importante que celle de l'œil non injecté. La restauration de fonction la plus efficace est obtenue avec l'AAV2/8 car ce vecteur permet une transduction plus rapide et plus efficace et un taux d'expression du transgène plus important qu'avec l'AAV2/2. Ces résultats ont été obtenus à la fois avec les vecteurs portant l'ADNc murin et l'ADNc humain, ce qui s'explique par la forte homologie entre les deux ADNc (96% de similarité).

La même année, l'équipe de Tiansen Li publie une étude (Sun *et al.*, 2009) où le modèle murin utilisé est un croisement entre la souris KO  $AIPL1^{-/-}$  et la souris hypomorphique  $AIPL1^{h/h}$ , cette souris est appelée  $AIPL1^{hypo}$ . Cette nouvelle souris produit, en théorie, deux fois moins de protéine AIPL1 que la souris  $AIPL1^{h/h}$ . La dégénérescence des photorécepteurs débute plus précocement chez la souris  $AIPL1^{hypo}$  par rapport à la souris  $AIPL1^{h/h}$ . Un vecteur AAV de sérotype 5 portant l'ADNc AIPL1 murin ou humain sous le contrôle du promoteur Rhodopsine kinase (Rk) spécifique des photorécepteurs est injecté dans l'espace sous-rétinien chez des souris adultes  $AIPL1^{hypo}$  de 5 mois. Six semaines après l'injection, certains animaux sont sacrifiés et les Western-Blots réalisés mettent en évidence

la présence de protéines AIPL1 et PDE dans les rétines traitées dans des quantités équivalentes à celles observées dans les rétines saines. L'histologie réalisée sur des animaux injectés depuis 6 mois montre que l'épaisseur de la couche des photorécepteurs est plus importante dans l'œil traité par rapport à l'œil non traité et que les segments internes et externes sont plus longs, ce qui montre que le traitement permet de préserver les photorécepteurs. L'évaluation de la fonction rétinienne effectuée sur d'autres animaux 23 mois post-injection montre que dans les yeux traités, les amplitudes des ERG sont préservées à long terme par rapport aux yeux contrôles qui présentent des ERG non-enregistrables.

#### **1.3.3.1.6. La souris RPGR-déficiente.**

Les mutations dans le gène RPGR sont responsables de plus de 70% des cas de rétinopathie pigmentaire liée à l'X et d'environ 10% de tous les cas de RP. RPGR est une protéine de structure des photorécepteurs impliquée dans le transport intraflagellaire des photorécepteurs. Chez la souris RPGR<sup>-/-</sup>, générée par KO par l'équipe de Tiansen Li (Hong *et al.*, 2000), une dégénérescence précoce des cônes et des bâtonnets est observée, ainsi qu'une mauvaise localisation des molécules comme l'opsine et la rhodopsine qui se trouvent diffuses dans le cytoplasme du segment interne (au lieu d'être normalement localisées dans le segment externe). Chez la souris, comme dans les autres espèces, l'ARN de RPGR subit un épissage alternatif intense aboutissant à plusieurs variants. Le variant spécifique de la rétine chez la souris est le variant RPGR-ORF15. L'utilisation d'un AAV2/2 recombinant portant l'ADNc RPGR-ORF15 murin sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CBA pour générer une souris transgénique, puis le croisement de telles souris avec des souris RPGR-KO permet d'obtenir une souris qui ne possède que le variant RPGR-ORF15 et pas les autres variants endogènes de RPGR (souris Tg-KO) (Hong *et al.*, 2005). L'observation de ces animaux durant 18 mois a permis aux chercheurs de déterminer que la protéine RPGR-ORF15 était présente au niveau des cils connecteurs des photorécepteurs à un niveau égal à 20% du niveau endogène observé chez une souris sauvage. L'étude histologique a également montré que l'épaisseur de la couche nucléaire externe des souris Tg-KO était sensiblement la même que celle des souris sauvages (environ 40 µm, alors qu'elle n'est que d'environ 20 µm chez les souris KO). Les segments externes des souris Tg-KO sont également beaucoup plus longs (28 µm) et mieux organisés que ceux des souris KO (13 µm). De plus, les ERG montrent que la fonction des photorécepteurs des souris Tg-KO est améliorée (525 µV) en comparaison de la souris KO (350 µV). Toutefois, cette amplitude est plus faible que chez la souris sauvage (725 µV). Ces résultats indiquent que le variant RPGR-ORF15 seul permet de restaurer un phénotype proche du phénotype normal.



### 1.3.3.1.7. La souris Rs1h-déficiente.

Le rétinosischisis juvénile lié à l’X est une pathologie rétinienne héréditaire due à un défaut dans le gène Rs-1 humain qui code pour la protéine rétinosischisine. Cette affection oculaire qui ne touche que les garçons, se caractérise par une lésion maculaire kystique bilatérale au niveau du pôle postérieur rétinien, souvent associée à un soulèvement rétinien bulleux de la périphérie rétinienne appelé schisis. Les lésions existent à la naissance ou apparaissent dans les premières années de la vie. Leur évolution est lente, et si les lésions périphériques ont tendance à s’effacer et même à disparaître avec le temps, la lésion centrale évolue vers une atrophie et la vision s’altère lentement avec l’âge pour donner une acuité visuelle médiocre après la cinquième décennie. Les individus atteints ont une onde a relativement préservée à l’ERG mais une onde b complètement abolie indiquant le défaut de fonctionnement de la rétine interne. La physiopathogénie n’est pas encore élucidée.

Le gène orthologue à Rs-1 chez la souris est appelé Rs1h (Gehrig *et al.*, 1999). Deux modèles murins Rs1h-KO ont été générés : la souris Rs1h<sup>-Y</sup> et la souris Rs1h<sup>-/-</sup> (Zeng *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2005). Ils reproduisent tous deux le phénotype humain de la pathologie avec une absence totale de protéine rétinosischisine (RS), une réduction significative de l’onde b de l’ERG et une désorganisation de l’ensemble des couches de la rétine. Chacun de ces deux modèles a ensuite été utilisé pour étudier l’efficacité d’un protocole de thérapie génique d’addition. La première étude utilise un vecteur AAV2/2 contenant le gène Rs1h murin sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV (Zeng *et al.*, 2004). L’injection intra-vitréenne de ce vecteur est effectuée chez la souris Rs1h<sup>-Y</sup> âgée de 13 semaines. Neuf à 11 semaines plus tard, les analyses aboutissent à la détection de RS dans toutes les couches de la rétine et à une restauration de l’onde b à l’ERG bien que la structure rétinienne ne soit pas entièrement restaurée (Zeng *et al.*, 2004). La seconde étude utilise un vecteur AAV2/5 contenant le gène Rs-1 humain sous le contrôle du promoteur murin de l’opsine (Min *et al.*, 2005). L’injection sous-rétinienne de ce vecteur chez la souris Rs1h<sup>-/-</sup> âgée de 2 semaines aboutit à la détection de RS dans toutes les couches de la rétine ainsi qu’à une restauration d’un ERG normal dès 3 mois post-injection (environ 300 µV d’amplitude pour l’onde b, ce qui équivaut à l’amplitude obtenue chez la souris contrôle) et ce jusqu’à un an après l’injection du vecteur thérapeutique. De plus, la structure rétinienne a été nettement améliorée et les photorécepteurs ont été préservés durant toute l’étude (Min *et al.*, 2005).

Une troisième étude publiée en 2009, montre que l’injection intra-vitréenne chez la souris Rs1h<sup>-/-</sup> d’un vecteur AAV de sérotype 8 contenant le gène Rs-1 sous le contrôle du promoteur humain de la rétinosischisine permet une transduction exclusive de la neurorétine et une expression de RS équivalente à l’expression constitutive chez une souris wt (Park *et al.*, 2009). Onze à 15 semaines après le traitement, les ERG montrent une restauration de la

fonction rétinienne. De plus, les analyses morphologiques montrent également une diminution des lésions maculaires kystiques caractéristiques de la pathologie.

#### **1.3.3.1.8. La souris GNAT2-déficiente.**

L'achromatopsie complète est une pathologie qui entraîne la perte totale de fonction des cônes. Les patients souffrent de photophobie, d'absence de perception des couleurs, de l'acuité visuelle fine et de cécité diurne. Des mutations dans 3 gènes différents ont été identifiées comme engendrant l'achromatopsie complète : le gène GNAT2 (guanine nucleotide alpha transducin), le gène CNGB3 (cyclic nucleotide gated channel beta-3) et le gène CNGA3 (cyclic nucleotide gated channel alpha-3).

La souris *Gnat2*<sup>cpfl3</sup> possède une mutation homozygote dans le gène murin orthologue de GNAT2, le gène CPFL3 (cone photoreceptor function loss 3). Un dysfonctionnement des cônes associé à une perte progressive de la sous-unité alpha de la transducine des cônes est observé chez ces souris (Chang *et al.*, 2006). Un protocole de thérapie génique d'addition a été mis au point sur ce modèle murin (Alexander *et al.*, 2007). L'injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV recombinant de sérotype 5 portant le gène sauvage murin CPFL3 sous le contrôle du promoteur de l'opsine (rouge/vert) chez des souris *Gnat2*<sup>cpfl3</sup> âgées de 3-4 semaines, aboutit à la restauration de la fonction des cônes chez ces animaux jusqu'à 7 mois après le traitement. En effet, chez les souris traitées, sur 21 yeux injectés, 17 montrent des amplitudes de l'ERG cône équivalentes à celles des souris sauvages, 2 montrent une augmentation de l'amplitude de l'ERG plus faible et 2 seulement ne répondent pas (Alexander *et al.*, 2007).

#### **1.3.3.1.9. Le chien CNGB3-déficient.**

Une étude présentée lors du congrès international de l'ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) en 2008 en Floride par Komaromy et ses collègues, décrit les résultats d'un protocole de thérapie génique d'addition obtenus chez le chien. Cette étude n'est pas encore publiée à ce jour. Chez deux modèles canins possédant soit une mutation homozygote nulle, soit une mutation homozygote non-sens dans le gène CNGB3, ces chercheurs ont montré que l'injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV2/5 portant le gène sauvage CNGB3 sous le contrôle du promoteur humain de l'opsine rouge des cônes (version PR2.1) qui permet une transduction spécifique des cônes (Komaromy *et al.*, 2008), aboutissait à une restauration de la fonction rétinienne et visuelle en conditions diurnes (ERG et tests de comportement) et ce jusqu'à 20 mois après le traitement.

#### 1.3.3.1.10. Le singe écureuil daltonien L.opsine-déficient

Les singes-écureuils originaires d'Amérique du Sud souffrent spontanément d'une forme de daltonisme due à une mutation dans le gène de l'opsine L conférant la photosensibilité au rouge. Cette pathologie à transmission récessive liée à l'X engendre une impossibilité de percevoir le rouge et de distinguer cette couleur du vert. En septembre 2009, l'équipe de Jay et Maureen Neitz publie un article qui montre l'efficacité d'un traitement par thérapie génique chez ces animaux (Mancuso *et al.*, 2009). Deux singes L.opsine déficients sont injectés en sous-rétinien avec un AAV2/5 portant l'ADNc humain de la L.opsine sous le contrôle du promoteur L/M.opsine spécifique des cônes. Cinq mois après l'injection de vecteur, les deux singes traités sont capables de discriminer le rouge et le vert ce qui indique que le pigment photosensible au rouge (L.opsine) a été produit et est fonctionnel. Cette restauration de la vision des couleurs est stable pendant au mois deux ans selon les auteurs de cette étude. C'est la première fois chez un primate, qu'une anomalie congénitale de la rétine a ainsi été totalement corrigée par thérapie génique. Ces résultats sont très encourageants pour le futur traitement des patients souffrant de cette forme de daltonisme et pour les patients souffrant d'une autre forme de daltonisme impliquant le gène de l'opsine M (la forme la plus commune touchant jusqu'à 5 % des hommes et près de 0,4 % des femmes dans la population d'origine européenne).

Ces différents exemples montrent qu'il est possible qu'une protéine recombinante, synthétisée par le biais d'un vecteur de thérapie génique, qu'elle soit enzymatique ou structurale, retrouve son rôle naturel dans les photorécepteurs.

### **1.3.3.2. Les essais de thérapie génique d'addition ciblant les cellules de l'EPR.**

#### **1.3.3.2.1. Le rat MERTK-déficient.**

Chez le rat RCS (Royal College of Surgeons), une délétion dans le gène du récepteur de la tyrosine kinase MERTK, entraîne un défaut de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Ceci engendre une accumulation de débris d'articles externes dans l'espace sous-rétinien et par la suite la mort des photorécepteurs par apoptose. L'équipe de Robin Ali a montré que l'injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV2/2 portant le gène sauvage murin MERTK sous le contrôle soit du promoteur ubiquitaire CMV, soit du promoteur RPE65 spécifique des cellules de l'EPR, chez le rat RCS, aboutissait à la survie prolongée des photorécepteurs dans l'œil traité (Smith *et al.*, 2003). Neuf semaines après la chirurgie, le nombre de photorécepteurs est 2,5 fois plus important dans l'œil traité par rapport à l'œil non traité et les ERG montrent la présence de photorécepteurs fonctionnels dans l'œil traité alors que l'œil non traité présente un ERG plat. L'analyse histologique montre également une diminution des débris cellulaires dans l'espace sous-rétinien, suggérant une restauration de la fonctionnalité des cellules de l'EPR pour la phagocytose.

#### **1.3.3.2.2. La souris LRAT-déficiente.**

La lécithine-rétinal acyltransférase (LRAT) est une enzyme du cycle des rétinoïdes localisée dans les cellules de l'EPR. Cette protéine catalyse le transfert d'un groupe acyl de la phosphatidylcholine sur le all-trans-retinol, qui est alors converti en all-trans-retinylester (Golczak *et al.*, 2005). Cette étape est essentielle au recyclage du photopigment rhodopsine. Chez l'Homme, des mutations dans le gène LRAT sont responsables de dystrophies rétiniennes précoces et d'ACL (Thompson *et al.*, 2001). Un modèle murin LRAT-déficient est généré par knock-out (Batten *et al.*, 2004). Malgré la présence constitutive de la protéine LRAT dans de nombreux tissus chez les individus sauvages, la souris LRAT<sup>-/-</sup> se développe normalement. Seule la vision est affectée par ce défaut génétique. Chez la souris LRAT<sup>-/-</sup> de 6 à 8 semaines, les segments externes des bâtonnets sont raccourcis de 35% par rapport aux souris sauvages. Le photopigment des photorécepteurs rétiniens n'étant pas recyclé, la vision s'en trouve sévèrement diminuée dès l'âge de deux mois. La diminution de l'amplitude des ERG en conditions photopique et scotopique chez la souris LRAT-déficiente par rapport à la souris wt est statistiquement significative, ce qui montre que les cônes et les bâtonnets

sont affectés. De plus, le réflexe pupillaire est fortement diminué chez les souris malades (Batten *et al.*, 2004). Une étude publiée en 2005 a montré qu'il était possible de restaurer le déficit en LRAT chez la souris KO par administration orale (gavage) de 9 cis-retinylacetate (RA), qui est la pro-drogue du 9 cis-retinol (Batten *et al.*, 2005). La régénération du pigment visuel permet d'améliorer la morphologie des photorécepteurs mais aussi la fonction visuelle. Les analyses de microscopie électronique montrent une augmentation de l'épaisseur de la couche des segments externes des bâtonnets (de 10,7  $\mu\text{m}$  à 14  $\mu\text{m}$ ). Les ERG montrent qu'après un simple gavage, les amplitudes des ondes a et b en conditions scotopiques (réponse des bâtonnets) atteignent 5% des amplitudes obtenues chez une souris wt tandis qu'après des gavages répétés, ces amplitudes atteignent 50% des valeurs contrôles. Après gavage, le 9-cisRA est retrouvé de façon transitoire dans l'œil où il est métabolisé pour permettre le recyclage de la rhodopsine après 4-5h, mais on le retrouve également dans le sang et dans le foie. Une autre méthode pour restaurer le déficit en LRAT chez la souris KO est l'injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV2/1 portant le gène sauvage LRAT sous le contrôle du promoteur humain de la bestrophine (VMD2), spécifique des cellules de l'EPR. Elle permet de restaurer de 50% les amplitudes de l'ERG par rapport à une souris sauvage (Batten *et al.*, 2005). L'étude de 2005 a également mis en évidence l'intérêt d'un double traitement composé de thérapie génique et de gavage oral par rapport à la thérapie génique seule.

#### **1.3.3.2.3. La souris Oa1-déficiente et Oca1-déficiente**

Il existe deux types d'albinisme : l'albinisme oculaire et l'albinisme oculo-cutané.

L'albinisme oculaire récessif de type 1 lié à l'X est la forme la plus commune de l'albinisme oculaire et est causé par un défaut dans le gène Oa1. La protéine Oa1 est un récepteur couplé à une protéine G qui est responsable de l'organisation des mélanosomes présents dans les cellules de l'EPR. L'albinisme oculaire, qui ne touche que les garçons, se caractérise par une diminution voire une absence de pigmentation oculaire, un nystagmus, une photophobie, un éventuel strabisme et une baisse de l'acuité visuelle. L'albinisme oculaire n'est pas une cause de cécité.

Un modèle murin d'albinisme oculaire a été généré (Incerti *et al.*, 2000). La souris Oa1-KO présente un phénotype très proche du phénotype humain et est donc un bon modèle pour l'étude préclinique d'un traitement par thérapie génique d'addition. L'injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV2/1 portant le gène sauvage murin Oa1 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV chez la souris Oa1-KO âgée de 8 mois, abouti à l'expression de la protéine Oa1 dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR, à l'augmentation du nombre de

mélanosomes dans les cellules de l'EPR ainsi qu'à une amélioration de l'ERG. En effet, l'amplitude de l'onde b en conditions scotopiques est plus importante que chez la souris non traitée mais la différence n'est pas statistiquement significative ce qui suggère une restauration seulement partielle de la fonction des cônes (Surace *et al.*, 2005).

L'albinisme oculo-cutané (Oca1) est une pathologie à transmission autosomale récessive. Elle est caractérisée par une synthèse réduite de la mélanine dans la peau, les cheveux et les yeux associés avec des anomalies oculaires comme un nystagmus, une diminution de la pigmentation de l'iris et de la rétine, une hypoplasie de la fovéa et une diminution significative de l'acuité visuelle. Le trajet du nerf optique est anormal et s'accompagne de strabisme et d'une diminution de la vision stéréoscopique. Les individus atteints ont des cheveux blancs, une peau blanche qui ne bronze pas et un iris translucide qui ne fonce pas avec l'âge. La cause de l'albinisme oculo-cutané de type 1 est un défaut dans le gène de la tyrosinase. La tyrosinase est une enzyme qui catalyse l'hydroxylation de la tyrosine en L-DOPA qui est ensuite oxydée en dopaquinone. Cette réaction est une étape clé pour la formation de mélanine dans les mélanocytes. La mélanine piège les radicaux libres et protège ainsi la peau et les yeux des rayons ultra-violet (Oetting *et al.*, 2003).

Un modèle murin d'albinisme oculo-cutané a été généré, la souris Oca1 déficiente Tyr<sup>c-2j</sup> (Gargiulo *et al.*, 2009). Il a été montré que ces souris développaient une dégénérescence progressive des photorécepteurs due à l'environnement lumineux. Les observations effectuées chez les souris Tyr<sup>c-2j</sup> à l'âge de 9 mois montrent une réduction significative des réponses électrorétinographiques et une diminution importante du nombre de photorécepteurs dans la couche nucléaire externe. Afin de savoir si ces anomalies de la rétine sont réversibles, des injections sous-rétiniennes de vecteur AAV2/1 portant le gène humain de la tyrosinase sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV ont été effectuées chez des souris tyrosinase-déficientes âgées de 1 mois. Un mois après l'injection, les chercheurs ont observé une restauration de la pigmentation dans la zone injectée de l'œil, ce qui indiquait que la synthèse de mélanine avait à nouveau lieu dans les cellules de l'EPR, la choroïde et l'iris. Cette accumulation de mélanine dans les mélanocytes a pour conséquence de prévenir la dégénérescence des photorécepteurs. En effet, les ERG ont montré que la fonction rétinienne était préservée dans le temps dans l'œil injecté alors qu'elle diminuait significativement dans l'œil contrôle. Cette première étude montre la possible efficacité d'un traitement basé sur la thérapie génique d'addition pour les patients albinos (Gargiulo *et al.*, 2009).

#### 1.3.3.2.4. La souris RPE65-déficiente.

La pathologie la plus étudiée pour le traitement par thérapie génique d'addition est l'ACL due à un défaut dans le gène RPE65. Cette forme d'ACL a été la première à être étudiée notamment parce que les chercheurs disposent de modèles animaux de la pathologie (la souris RPE65<sup>-/-</sup>, la souris rd12 et le briard RPE65<sup>-/-</sup>). Le gène RPE65 code pour une isomérolase de 65 kDa du cycle des rétinoïdes. Lorsque ce gène est déficient, le photopigment rhodopsine n'est pas recyclé et le cycle visuel s'arrête. Le traitement de cette déficience génétique consiste à restaurer l'expression de l'enzyme RPE65 dans les cellules de l'EPR, ce qui permet de redémarrer le cycle des rétinoïdes, de recycler les molécules de photopigments puis de redémarrer la cascade de phototransduction.

Deux modèles murins RPE65-déficients existent. Un modèle transgénique RPE65-KO (Redmond *et al.*, 1998) et un modèle spontané la souris rd12 (Pang *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré l'efficacité d'un traitement par thérapie génique d'addition chez la souris RPE65-déficiente. En 2004, une première publication rapporte que l'injection sous-rétinienne chez des souris KO âgées de 3 semaines, d'un AAV2/2 portant le gène sauvage murin RPE65 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV, permet de restaurer la fonction rétinienne chez les animaux (Lai *et al.*, 2004). La protéine transgénique RPE65 est détectée jusqu'à 18 mois post-injection chez les souris traitées mais le niveau d'expression diminue avec le temps de manière inexpliquée. Deux mois post-injection, les ERG montrent une augmentation de l'amplitude de l'onde b de 76% en conditions scotopiques et de 59% en conditions photopiques ce qui indique que les bâtonnets et les cônes ont retrouvé leur fonction. Toutefois, ce traitement ne permet pas de ralentir la dégénérescence des photorécepteurs. À 7 et 11 mois post-injection, il n'y a plus de différence entre les souris KO injectées et non-injectées (Lai *et al.*, 2004). L'effet bénéfique du traitement n'aura été que transitoire.

Dans une seconde publication de 2005, l'équipe de William Hauswirth montre que l'injection sous-rétinienne chez des souris rd12 à P14 d'un AAV2/5 portant le gène sauvage humain RPE65 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CBA, permet de restaurer la fonction rétinienne et visuelle chez les animaux (Pang *et al.*, 2006). La protéine RPE65 est détectée dans les cellules de l'EPR transduites très rapidement après l'injection. La rhodopsine est à nouveau synthétisée et les photorécepteurs retrouvent leur fonction comme le prouvent les ERG dont les amplitudes deviennent proches de celles d'une souris normale 7 mois post-injection (66% de la fonction rétinienne normale). Le test de comportement effectué chez ces animaux traités montre que la fonction visuelle est elle aussi restaurée (Pang *et al.*, 2006).

Une dernière étude menée par l'équipe de Jean Bennett se focalise sur le traitement des souriceaux *in utero* (Dejneka *et al.*, 2004). L'étude consiste à injecter en sous-rétinien chez des souris RPE65<sup>-/-</sup> au stade fœtal (E14) et chez de jeunes adultes (P30 et P75) un vecteur AAV2/1 portant le gène sauvage humain RPE65 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV. L'injection *in utero* n'a pas d'impact sur le développement et la croissance des souriceaux, de plus la protéine RPE65 transgénique est détectée dans les RPE dès P0 et jusqu'à la fin de l'étude (5-6 mois). Le photopigment rhodopsine régénéré grâce à l'enzyme RPE65 est également détectée chez tous les animaux injectés. L'injection chez les jeunes adultes permet également une expression stable de RPE65 dans les RPE. Les ERG effectués ont montrés que chez l'ensemble des animaux traités (E14, P30, P75), il existait une augmentation significative des amplitudes dans l'œil traité. Cette étude prouve la faisabilité et l'efficacité d'un traitement *in utero* chez la souris RPE65 KO (Dejneka *et al.*, 2004).

#### **1.3.3.2.5. Le chien RPE65-déficient.**

Le briard est un modèle spontané RPE65-déficient (Aguirre *et al.*, 1998; Narfstrom, 1999). Il possède une délétion de 4 pb dans le gène RPE65 qui aboutit à un codon stop prématuré et à une absence de protéine RPE65 fonctionnelle dans la rétine (Veske *et al.*, 1999). L'ERG est quasi non-enregistrable dès l'âge de 4 mois pour les réponses scotopiques et un peu plus tard pour les réponses photopiques (Aguirre *et al.*, 1998). Le phénotype (rod-cone dystrophy) observé chez ce chien est très proche de celui observé chez les patients atteints d'une amaurose congénitale de Leber due à un défaut dans le gène RPE65 ce qui fait de ce chien un bon modèle pour l'étude préclinique du traitement par thérapie génique d'addition.

L'existence d'un tel modèle canin permet aux chercheurs d'effectuer des études précliniques pour évaluer les bénéfices et les risques d'un futur traitement clinique. Les modèles de gros animaux comme le chien sont essentiels car ces animaux possèdent un système immunitaire dont le fonctionnement est beaucoup plus proche de celui de l'Homme, par rapport aux modèles murins. Les modèles de gros animaux permettent également d'évaluer la toxicité du vecteur, les doses à utiliser et l'approche chirurgicale. En effet, la taille et la morphologie de l'œil d'un chien est extrêmement proche de celles de l'œil d'un enfant.

Plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité de la thérapie génique chez le briard RPE65<sup>-/-</sup> en utilisant différents vecteurs AAV recombinants. Deux études ont pour cela utilisé un vecteur AAV2/2 portant le gène sauvage RPE65 canin sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CBA (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003). Une étude ultérieure menée par une de ces deux équipes, a également montré l'efficacité du traitement en utilisant différents



sérotypes (AAV2/1, AAV2/2 et AAV2/5), différents promoteurs (CMV et RPE65) et différents gènes RPE65 (humain ou canin) (Acland *et al.*, 2005). Chacune de ces études a abouti à la restauration à long terme (Acland *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005) de la fonction rétinienne et visuelle sans effet délétère apparent, excepté l'apparition d'uvéïtes dans l'une des études, expliquée par la contamination du stock de vecteur thérapeutique. Toutefois, la publication de Kristina Narfstrom de 2005 rapporte une légère diminution de l'ERG après plusieurs années, sans apporter d'explications à ce phénomène. Au laboratoire de thérapie génique de Nantes, un essai préclinique a également été mené avec succès sur des bords RPE65<sup>-/-</sup> (Le Meur *et al.*, 2007). La principale particularité de cet essai est la notion de biosécurité. En effet, le vecteur choisi pour l'injection sous-rétinienne est l'AAV2/4 qui transduit exclusivement les cellules de l'EPR. De plus le promoteur choisi est lui-aussi tissu-spécifique (promoteur RPE65) ce qui permet une synthèse de protéine RPE65 uniquement dans les cellules désirées (les cellules de l'EPR). Pour finir, l'utilisation du gène RPE65 humain, qui possède une homologie avec la séquence canine de plus de 90%, permet de valider un vecteur qui pourra être utilisé chez l'Homme.

En 2006, une étude de biodistribution, de dose-réponse et de toxicité du vecteur AAV2/2 portant le gène RPE65 humain sous le contrôle du promoteur hybride CAG composé de l'enhancer du CMV et du promoteur CBA a été menée (Jacobson *et al.*, 2006a). Dix-huit bords RPE65<sup>-/-</sup> ont été traités avec ce vecteur. Cette étude n'a révélé aucune toxicité due au vecteur, aucune complication post-opératoire et aucune anomalie morphologique de la rétine mise à part une légère destruction des photorécepteurs autour du point d'injection aux doses de vecteur les plus fortes. L'étude de biodistribution effectuée à 3 mois post-injection n'a pas mis en évidence la présence de vecteur dans le nerf optique ou le cerveau.

#### **1.3.3.2.6. Le patient RPE65-déficient.**

Avant de pouvoir démarrer des essais cliniques chez l'Homme, des études chez le primate doivent confirmer l'inocuité du vecteur thérapeutique. Le même vecteur que celui décrit précédemment (AAV2/2-CAG-hRPE65) a été injecté chez 17 primates non-humains sains (Jacobson *et al.*, 2006b). Aucune toxicité systémique n'a été identifiée sur une période de 1 à 3 mois, les signes d'inflammation oculaire due à la chirurgie ont disparu en une semaine, l'ERG n'a pas montré d'effets délétères dus au vecteur ou à l'injection en elle-même, aucune anomalie morphologique de la rétine n'a été observée excepté une lésion présente au point d'injection. Contrairement à ce qui avait été observé chez le chien (Jacobson *et al.*, 2006a), 3 mois après l'injection, les injections chez le primate ont mis en évidence la présence de traces de vecteur dans le tractus optique et le corps géniculé, ce qui confirme les données obtenues précédemment par l'équipe du LTG (Provost, 2005).

Toutefois, ces résultats ne comportent aucune contre-indication à la poursuite de telles études chez l'Homme.

Avant d'initier des essais cliniques de phase 1, plusieurs études ont mis en évidence des prérequis importants pour la sélection des patients. Ainsi l'équipe de Samuel Jacobson a visualisé par microscopie haute résolution *in vivo* la présence de photorécepteurs dans la rétine (Jacobson *et al.*, 2005) et a cartographié la rétine des jeunes patients par tomographie à cohérence optique dans le but de déterminer le site d'injection optimal (Jacobson *et al.*, 2008). La même équipe a également démontré chez le chien et chez le patient RPE65<sup>-/-</sup>, que le cortex visuel était toujours intact et capable d'interpréter des messages électriques même après plusieurs années de cécité congénitale (Aguirre *et al.*, 2007). La faisabilité d'un traitement chez l'Homme ayant été démontré, trois essais cliniques ont été initiés, deux aux Etats-Unis et un en Angleterre (Bainbridge *et al.*, 2008; Hauswirth *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008). Dans chacun de ces trois essais, trois jeunes adultes âgés de 17 à 26 ans (9 patients au total) atteint d'ACL, ont été traités par thérapie génique. Ils ont reçu des injections sous-rétiniennes d'AAVr. Les vecteurs utilisés sont des AAV2/2 portant le gène RPE65 humain sous le contrôle de différents promoteurs : CBA avec insertion d'une séquence de Kozak modifiée (Hauswirth *et al.*, 2008), RPE65 humain (Bainbridge *et al.*, 2008) et CBA (Maguire *et al.*, 2008 ; Maguire *et al.*, 2009).

Dans l'étude de Samuel Jacobson (Hauswirth *et al.*, 2008), aucune preuve de dissémination du vecteur n'a été mise en évidence chez les patients à J1 et J30. Aucune réponse immune humorale ou cellulaire contre la capsid virale ou le transgène n'a été détectée. La micropérimétrie a montré une amélioration de la fonction rétinienne chez le patient 3 mais pas chez les deux autres patients. Le patient 3 a également diminué son temps de traversée du parcours d'obstacle (77 secondes avant traitement, 14 secondes après traitement) ce qui semble indiquer une amélioration de la fonction visuelle. Toutefois aucune amélioration de l'acuité visuelle n'a été mise en évidence chez les patients traités, le champs visuel n'a pas été élargi, la fréquence du nystagmus n'a pas été diminuée et les réponses ERG n'ont pas vu d'augmentation d'amplitude.

Dans l'étude de Robin Ali (Bainbridge *et al.*, 2008), le taux des anticorps circulants anti-AAV2 n'a pas mis en évidence de réponse immune humorale et l'ELISPOT n'a pas montré de réponse immune à médiation cellulaire. Après traitement, les trois patients décrivent une augmentation de la sensibilité à la lumière spécialement en condition de faible luminosité. Pour quantifier les observations des patients, la sensibilité visuelle est mesurée (FST). Les résultats indiquent une légère diminution immédiatement après la chirurgie puis une

amélioration de la sensibilité dans les yeux traités. Toutefois, ni l'acuité visuelle, ni la fonction rétinienne (ERG) n'ont pas été améliorées dans les yeux traités.

Dans l'étude de Jean Bennett (Maguire *et al.*, 2008), la séquence ADN du vecteur n'a été détectée que chez un des trois patients à J1 post-injection, aucune preuve de dissémination du vecteur n'a été mise en évidence chez les autres patients. Aucune réponse immune humorale ou cellulaire n'a été détectée. Deux semaines après injection du vecteur thérapeutique, les trois patients de l'essai ont décrit une amélioration de la vision en conditions de faible luminosité. En effet chez ces patients, la fréquence du nystagmus a été diminuée, le réflexe pupillaire a été amélioré, le champ visuel a été élargi et l'acuité visuelle a été améliorée. De plus le patient 2 qui avait de grandes difficultés pour traverser le parcours d'obstacle avant l'injection, a été capable d'éviter les collisions après le traitement ce qui semble indiquer une restauration partielle de la fonction visuelle chez cet individu. Toutefois, la fonction rétinienne évaluée grâce aux ERG n'a pas été améliorée.

Les résultats préliminaires de ces essais cliniques ont validé l'inocuité de ces vecteurs chez l'Homme, ce qui est une première étape importante malgré l'absence d'amélioration des réponses électrorétinographiques. La conclusion de cette première étape est que les patients injectés sont trop âgés et que la fenêtre thérapeutique a été dépassée. Cette notion de fenêtre thérapeutique avait déjà été mise en évidence dans l'étude nantaise (Le Meur *et al.*, 2007). En effet, seul le briard RPE65<sup>-/-</sup> injecté à l'âge de 30 mois n'avait pas répondu au traitement (les autres chiens étant traités entre 8 et 11 mois).

En 2009, l'équipe de Jean Bennett publie une étude dans le journal Lancet sur la poursuite de leur essai clinique (Maguire *et al.*, 2009). Cette seconde partie de l'essai clinique inclus 12 patients dont 4 enfants âgés de 8 à 11 ans. Des améliorations de la fonction rétinienne sont observées après traitement chez l'ensemble de ces patients (agrandissement du champ visuel, amélioration de l'acuité visuelle et de la sensibilité à la lumière, diminution du nystagmus). Des résultats particulièrement encourageants sont obtenus avec le plus jeune patient (8 ans) qui est capable d'évoluer sans aucun problème dans le parcours fléché après traitement. Les bénéfices de ce traitement chez les jeunes patients sont stables sur toute la durée de l'étude (2 ans) et montrent l'efficacité de la thérapie génique lorsque celle-ci est pratiquée à un stade précoce de la maladie.

En parallèle de ces études, un quatrième essai clinique est sur le point d'être initié à Nantes. Le vecteur utilisé sera l'AAV2/4-RPE65-hRPE65 (principal investigateur: Michel Weber, coordinatrice scientifique: Fabienne Rolling).

#### **1.4. Régulation de l'expression du transgène grâce au promoteur inductible à la tétracycline.**

De nombreuses études précliniques, dont certaines décrites dans le chapitre précédent, ont démontré l'efficacité de la thérapie génique utilisant des vecteurs viraux *in vivo*. De plus, un certain nombre d'essais cliniques montre aujourd'hui des résultats très encourageants chez l'Homme. Dans le cadre d'applications cliniques de la thérapie génique, le développement d'un système régulable qui peut activer ou inhiber l'expression du transgène thérapeutique semble être essentiel. Un tel système peut permettre de maintenir un certain niveau d'expression du transgène dans le temps, de prévenir la toxicité due à l'accumulation excessive du produit du transgène mais aussi de stopper totalement l'expression d'un transgène contre lequel une réaction immunitaire serait initiée.

Le contrôle de l'expression du transgène thérapeutique peut être effectué grâce à des systèmes de transcription régulée par la fixation d'un ligand sur une séquence cible. Parmi les différents systèmes existants, le système inductible à la tétracycline est le plus fréquemment utilisé.

Dans ce chapitre, nous décrivons les systèmes TetOn et TetOff puis nous nous focaliserons essentiellement sur les utilisations *in vivo* de ces systèmes dans le muscle et dans la rétine.

##### **1.4.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans le système régulateur dépendant de la tétracycline.**

Le système Tétracycline, développé par Gossen et Bujard il y a plus de 10 ans, dérive de l'opéron de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 d'*Escherichia Coli*. Dans la bactérie *Escherichia Coli*, la résistance à la tétracycline est conférée par une protéine membranaire qui a pour rôle d'éliminer la drogue de la bactérie (Wissmann *et al.*, 1986). L'expression de cette protéine membranaire est contrôlée par la présence de la drogue elle-même dans l'environnement de la bactérie. En effet, l'opéron code pour la protéine répresseur Tet (TetR) et pour la séquence opératrice Tet (TetO) (Orth *et al.*, 1998). En l'absence de tétracycline (Tet) ou de son analogue la doxycycline (Dox), la protéine TetR vient se fixer sur la séquence opératrice TetO, tandis qu'en présence d'antibiotique (Tet ou Dox), la drogue se fixe sur la protéine TetR, modifiant sa conformation spatiale et entraînant son impossibilité à se fixer sur la séquence opératrice TetO. Plusieurs systèmes basés sur

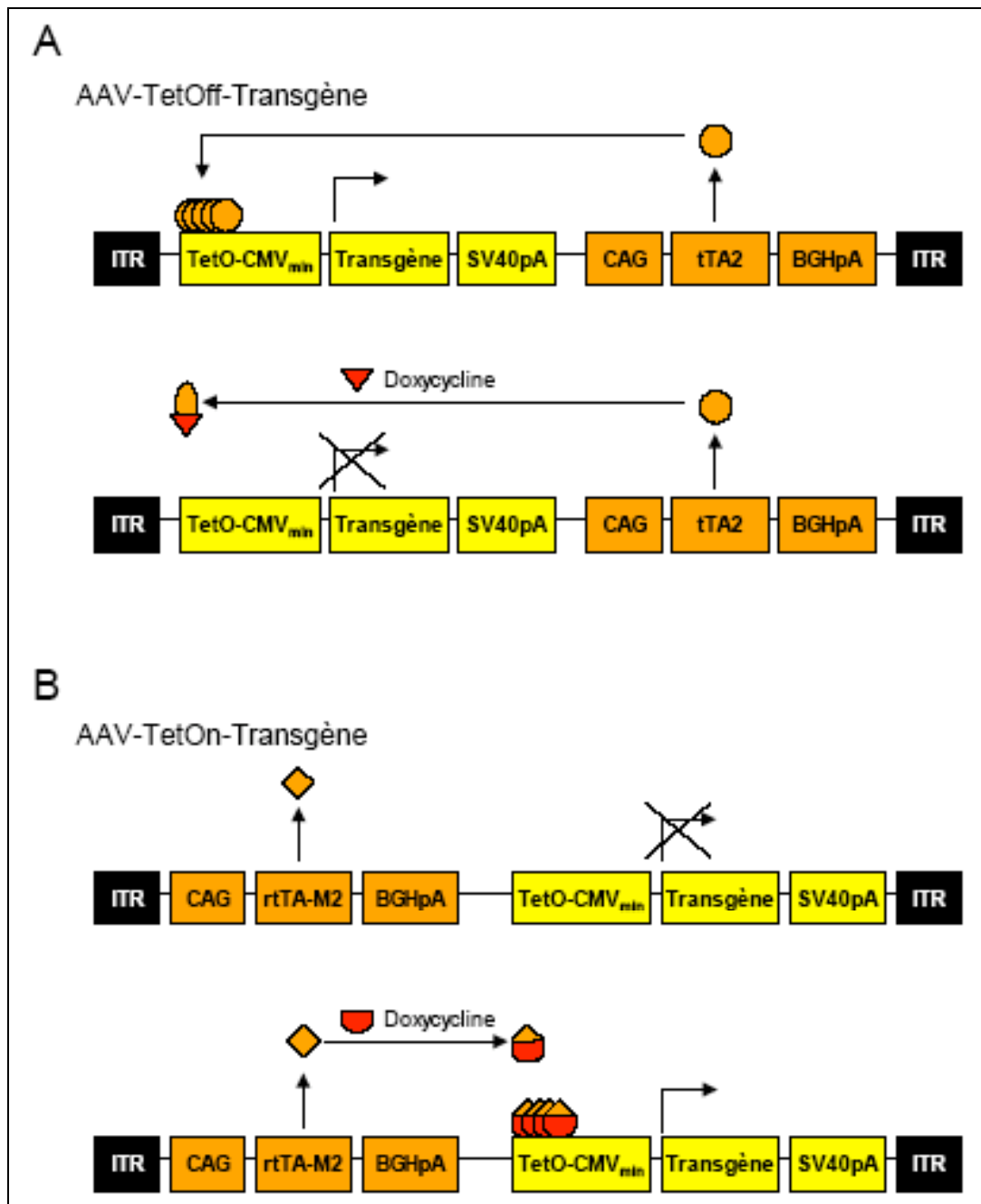
cet opéron bactérien régulable ont été développés notamment le système TetOff et le système TetOn (Figure 22).

#### **1.4.1.1. TetOff (tTA, TetR-VP16).**

Dans le système TetOff, on utilise deux cassettes d'expression distinctes dans un seul et même vecteur (Figure 22A). La première cassette d'expression code pour une protéine chimérique, constituée du domaine de liaison à l'ADN du répresseur TetR, fusionné à un transactivateur viral issu de l'Herpes Simplex Virus, le VP16. La protéine de fusion ainsi formée est appelée tTA (Tet-controlled Transcriptional Activator). Pour minimiser la possible interaction du transactivateur VP16 avec d'autres promoteurs cellulaires et pour éviter le déclenchement de réponses immunitaires, le VP16 a été réduit à trois répétitions de douze acides aminés (Baron *et al.*, 1997). La fusion du répresseur TetR avec le domaine d'activation minimal du VP16 est appelé tTA2. Cette protéine de fusion tTA2 possède le même potentiel d'activation mais une toxicité cellulaire trois fois moins importante que celle du tTA original. La seconde cassette d'expression est composée du transgène thérapeutique sous le contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline, le TetO-CMV<sub>min</sub> (Gossen *et al.*, 1992). Ce promoteur est composé de la séquence ADN opératrice TetO répétée sept fois, appelée TRE pour Tet-Responsive Element, fusionnée à un promoteur minimal CMV où toute la partie enhancer a été délétée. Le promoteur TetO-CMV<sub>min</sub> est inactif seul, son activation transcriptionnelle nécessite la fixation sur le TRE de la protéine chimérique tTA. En effet, lorsque le domaine TetR du tTA vient se fixer sur le TRE, la partie transactivatrice VP16 de ce même tTA peut alors déclencher l'activation transcriptionnelle du promoteur CMV minimal. Dans le système TetOff, la fixation du tTA sur le promoteur TetO-CMV<sub>min</sub>, et donc la production de la protéine issue du transgène, s'effectue en absence de drogue. En présence de Tet ou de Dox, la drogue se fixe sur le tTA et empêche sa liaison au TetO-CMV<sub>min</sub>. La protéine issue du transgène n'est plus produite.

#### **1.4.1.2. TetOn (rtTA, rTetR-VP16).**

Dans le système TetOn, la cassette d'expression codant pour le transgène est toujours sous le contrôle du promoteur inductible TetO-CMV<sub>min</sub>, mais la cassette d'expression codant pour la protéine chimérique comprenant le domaine VP16 a été modifiée (Figure 22B). En effet, le répresseur TetR a été transformé par mutagenèse dirigée en une protéine rTetR (reverse Tet Repressor protein) (Gossen *et al.*, 1995).



**Figure 22 : Les promoteurs inducibles TetOn et TetOff.**

Les vecteurs AAV-TetOff-Transgène et AAV-TetOn-Transgène sont composés de deux cassettes d'expression. **(A)** Le vecteur TetOff est composé d'une première cassette comprenant le transgène d'intérêt sous le contrôle du promoteur inducible à la tétracycline TetO-CMV<sub>min</sub>. La seconde cassette est composée du transactivateur tTA2 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CAG. En absence de doxycycline, le transactivateur tTA2 se fixe sur la séquence TetO ce qui induit la transcription du transgène. En présence de doxycycline, la drogue se fixe au tTA2 et modifie sa conformation spatiale, le complexe tTA2-Dox ne peut plus se fixer sur la séquence TetO, la transcription du transgène d'intérêt ne peut plus se faire. **(B)** Le vecteur TetOn est composé d'une première cassette comprenant le transgène d'intérêt sous le contrôle du promoteur inducible à la tétracycline TetO-CMV<sub>min</sub>. La seconde cassette est composée du transactivateur rtTA-M2 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CAG. En absence de doxycycline, le transactivateur rtTA-M2 ne peut pas se fixer sur la séquence TetO, la transcription du transgène ne se fait donc pas. En présence de doxycycline, la drogue se fixe au rtTA-M2 et modifie sa conformation spatiale, le complexe rtTA-M2-Dox peut alors se fixer sur la séquence TetO, la transcription du transgène d'intérêt est initiée.

Quatre mutations différentes sur la protéine TetR ont permis de modifier son affinité vis-à-vis du domaine de fixation TetO. La protéine rTetR résultant de ces modifications, possède une conformation spatiale qui l'empêche de se lier au domaine TetO. La fixation sur cette protéine rTetR du ligand Tet ou Dox modifie sa conformation spatiale permettant ainsi la liaison au domaine TetO. La protéine de fusion rTetR-VP16 est appelée rTA (reverse controlled-Transcriptional Activator). Dans le système TetOn, la fixation du rTA sur le promoteur TetO-CMV<sub>min</sub>, et donc la production de la protéine issue du transgène, s'effectue en présence de drogue (Tet ou Dox). En absence de drogue, le rTA ne peut se fixer au TetO-CMV<sub>min</sub> et la protéine issue du transgène n'est pas produite. L'équipe de Urlinger a étudié l'effet de mutations aléatoires sur le rTA et a identifié un mutant, rTA-M2, qui possédait une affinité plus importante pour la doxycycline, ce qui permet d'induire l'expression du transgène en utilisant des quantités de drogues moins importantes et réduit la transcription résiduelle en absence de Dox (Urlinger *et al.*, 2000).

L'activation de l'expression du transgène grâce à de fortes doses de drogues, semble être plus rapide avec le système TetOn qu'avec le système TetOff. La fonctionnalité du système TetOff a été prouvée *in vivo* pour la première fois chez la souris transgénique en 1994 (Furth *et al.*, 1994). Le système TetOn a quant à lui été évalué *in vivo* dans de nombreux modèles précliniques murins et primates (Favre *et al.*, 2001; Favre *et al.*, 2002; Latta-Mahieu *et al.*, 2002; Chenuaud *et al.*, 2004a; Stieger *et al.*, 2006; Stieger *et al.*, 2007).

#### **1.4.2. Évaluation du promoteur inductible à la tétracycline dans le muscle squelettique.**

La régulation de l'expression d'un transgène dans le muscle squelettique a été très étudiée car c'est un des organes les plus volumineux de l'organisme des mammifères et qu'il est facilement accessible. L'utilisation de l'hormone érythropoïétine (EPO) comme transgène rapporteur dans le muscle squelettique est relativement simple. En effet, lorsqu'elle est sécrétée par le muscle, l'EPO entraîne l'élévation de l'hématocrite, ce qui permet une évaluation simple et rapide de l'expression du transgène et de sa fonctionnalité *in vivo*. De plus, de nombreux kits de détection permettent aujourd'hui de quantifier aisément l'EPO sécrétée dans le sérum. Cette hormone a donc été utilisée dans de nombreuses études (Fishman *et al.*, 1994; Bohl *et al.*, 1997; Bohl *et al.*, 1998; Rendahl *et al.*, 1998; Lamartina *et al.*, 2002; Rendahl *et al.*, 2002; Sommer *et al.*, 2002; Lamartina *et al.*, 2003; Chenuaud *et al.*, 2004a; Lena *et al.*, 2005). D'autres transgènes rapporteurs ont également été utilisés dans des études concernant l'évaluation des systèmes inductibles, comme la luciférase (Fender *et*

*al.*, 2002), la phosphatase alcaline sécrétable (SEAP) (Latta-Mahieu *et al.*, 2002; Lamartina *et al.*, 2003), ou la beta-galactosidase (Sander *et al.*, 2000), mais nous n'en parlerons pas dans ce manuscrit.

La preuve du concept a dans un premier temps été effectuée chez la souris, en évaluant le système régulable TetOff dans le muscle squelettique (Dhawan *et al.*, 1995) ou dans le muscle cardiaque (Fishman *et al.*, 1994) par injection d'un plasmide nu. Ces premiers résultats encourageants ont permis le démarrage des études d'évaluation des systèmes régulables TetOff puis TetOn par transfert de gène médiés par l'AAV.

L'équipe de Bohl a construit un vecteur AAV recombinant contenant deux cassettes d'expression : le transactivateur rtTA sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire fort, le CMV, et le transgène rapporteur murin EPO sous le contrôle du promoteur inductible à la doxycycline TetO-CMV<sub>min</sub> (Bohl *et al.*, 1998). Après injection intra-musculaire de l'AAVr, la doxycycline a été administrée dans l'eau de boisson des rongeurs. Après une semaine d'induction, le taux d'EPO dans le sérum avait été multiplié par 10 et l'hématocrite avait également augmentée ce qui montrait l'activité biologique de l'EPO. Aucune réponse immune n'a été observée que ce soit contre le transactivateur rtTA ou contre la protéine transgénique EPO. Les résultats obtenus chez la souris ont permis de passer à l'étape suivante, à savoir l'évaluation de tels systèmes régulables chez le macaque. Ce modèle de primate non humain est la dernière étape de validation du système avant de passer à des applications cliniques chez l'Homme.

Lors de l'étude de Favre *et al.*, effectuée au laboratoire de thérapie génique de Nantes en 2001, 8 macaques ont reçu des injections intra-musculaires de vecteurs AAV2/2-TetOn-EPO (Favre *et al.*, 2001). Puis les inductions ont été effectuées par injection intraveineuse de doxycycline. Dans un premier temps, l'ensemble des primates a répondu correctement au traitement avec des cinétiques rapides d'induction et de désinduction de l'expression de l'EPO par la doxycycline. Les taux maximums d'EPO dans le sérum étaient obtenus 3-4 jours après l'administration de Dox et étaient corrélés à l'augmentation de l'hématocrite chez les macaques, démontrant l'activité biologique de l'EPO recombinante. Malheureusement, après plusieurs inductions (3 à 5 en fonction des individus), l'expression de l'EPO a été totalement perdue. Cette perte d'expression était due à une réponse immune humorale et cellulaire dirigée contre le transactivateur rtTA, qui a totalement détruit les cellules musculaires transduites.



En 2004, la même équipe du LTG de Nantes (Chenuaud *et al.*, 2004b), a évalué l'efficacité de nouveaux vecteurs AAV2/2-TetOn contenant des versions améliorées du transactivateur (rtTA-S2, rtTA-M2 et rtTA-M2nls). Une autre amélioration a consisté à ajouter le WPRE (Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element) derrière le transgène EPO dans le but de stabiliser les ARN transcrits et donc d'augmenter le niveau d'expression. Les deux cassettes d'expressions ont été introduites dans le vecteur AAVr dans le même sens (forward) ou dans le sens opposé (opposite). Ces différents vecteurs ont été injectés dans les muscles squelettiques de souris puis de primate. Chez la souris, la construction rtTA-M2 / EPO-WPRE (forward) a montré les meilleurs résultats avec une induction maximale du taux d'EPO et un niveau basal minimal sans induction. Cette cassette a alors été étudiée chez le primate par injection intra-musculaire d'AAV2/1 et d'AAV2/2. Ces expériences chez le primate ont montré que l'AAV2/1 permettait une transduction des cellules musculaires beaucoup plus importante aboutissant à un taux d'EPO 10 fois supérieur à celui observé après induction des primates injectés avec l'AAV2/2. De plus, le système AAV-TetOn semble être beaucoup plus efficace chez le primate non humain que chez la souris puisque les taux d'EPO obtenus sont 50 à 200 fois plus importants chez le primate.

Par ailleurs, une étude récente publiée en 2009 (Tafuro *et al.*, 2009) a montré que l'injection d'un vecteur AAV2/2-TetOn-VEGF dans le muscle squelettique ischémique de souris permettait d'induire de façon efficace l'angiogenèse chez ces animaux. L'expression constante de VEGF entraîne la formation de néovaisseaux anormaux. L'expression transitoire du facteur VEGF dans le tissu ischémique a permis d'éviter la formation de ces vaisseaux anormaux et de régénérer une vascularisation normale.

Pour conclure, nous pouvons affirmer qu'une régulation de l'expression du transgène dans le muscle squelettique est possible en utilisant le système Tétracycline mais qu'il existe une réponse immune dirigée contre le transactivateur chez le primate non humain, ce qui réduit l'intérêt d'une application en clinique pour le moment.

#### **1.4.3. Évaluation du promoteur inductible à la tétracycline dans la rétine.**

Dans des modèles animaux de dystrophie rétinienne comme la rétinite pigmentaire, l'utilisation des facteurs neurotrophiques, dont le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) ou le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), permet de retarder le début des symptômes ou

de diminuer la rapidité d'évolution de la maladie. Toutefois la surexposition à de tels facteurs neurotrophiques peut entraîner des effets délétères. Il a été démontré qu'une surdose de CNTF, dérégulait la cascade de phototransduction des bâtonnets (Wen *et al.*, 2006) et entraînait une diminution de la réponse électrorétinographique. La possibilité de réguler l'expression des facteurs neurotrophiques dans la rétine peut permettre d'éviter l'apparition des effets délétères. C'est pourquoi le système inductible à la doxycycline est utilisé dans le cadre du transfert de facteurs neurotrophiques dans la rétine par le biais d'AAV recombinants. Des stratégies similaires sont en train de se développer dans le cadre des pathologies de néovascularisation de la rétine comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou la rétinopathie diabétique, en utilisant des facteurs anti-angiogéniques (anti-VEGF par exemple) à la place des facteurs neurotrophiques.

La première évaluation du système inductible AAV-TetOn dans la rétine, a été effectuée en 2001 chez le rat par l'équipe de McGee-Sanftner (McGee Sanftner *et al.*, 2001) en utilisant deux vecteurs AAV2/2 différents contenant pour l'un le transactivateur (rtTA-M2) et pour l'autre la GFP sous le contrôle du promoteur inductible TetO-CMV<sub>min</sub>. Contrairement à ce que nous avons décrit précédemment, les deux cassettes d'expression composant le système TetOn, sont portées par deux vecteurs différents. Les deux vecteurs AAV2/2 sont injectés dans l'espace sous-rétinien des rats. L'AAV2/2 permet la transduction des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien et des photorécepteurs. La doxycycline est administrée dans l'eau de boisson des rongeurs. Une semaine après induction de l'expression du transgène à la doxycycline, de la GFP a été détectée dans les cellules de l'EPR et dans les photorécepteurs alors que l'expression de la GFP était négligeable chez les souris non-induites. Aucun effet délétère n'a été observé. Des expériences équivalentes ont été menées chez le rat en injectant le vecteur AAV2/2-TetOn-GFP dans l'espace sous rétinien (un seul vecteur pour les deux cassettes d'expression). Suite à l'administration de doxycycline dans l'eau de boisson des rongeurs, de la GFP a été détectée dans les cellules de l'EPR et dans les photorécepteurs. L'équipe a montré qu'une dose de 200µM de Dox était suffisante pour induire l'expression de la GFP dans 20% des cellules transduites. Cette première étude n'a pas mis en évidence d'altération de la fonction rétinienne.

L'évaluation du système AAV-TetOff effectuée au laboratoire de thérapie génique en 2003 chez le rat a également abouti à des résultats concluants (Folliot *et al.*, 2003). Après une injection intra-vitréenne d'AAV2/2-TetOff-GFP, le transgène est détecté dans les cellules ganglionnaires. Lorsque l'on administre la Dox aux animaux, l'expression de la GFP disparaît totalement en 5 à 7 jours. À l'arrêt de l'administration de la Dox, le niveau maximal de GFP

exprimé dans les cellules ganglionnaires est retrouvé en 21 jours. Cette cinétique a été reproduite plusieurs fois durant les 6 mois qu'a duré l'étude.

Au LTG, le système TetOn a été évalué chez le primate non-humain (Stieger *et al.*, 2006; Stieger *et al.*, 2007). Chez le primate, la rétine étant fortement pigmentée, la visualisation de la GFP *in vivo* est difficile, c'est pourquoi le transgène de l'érythropoïétine, facilement dosable après ponction de la chambre antérieure, a été utilisé. Dans la première étude de 2006, des vecteurs AAV de sérotype 4 et -5 ont été évalués. Différents promoteurs ont également été testés (CAG et RPE65). La doxycycline est administrée par voie intraveineuse. Dans la seconde étude de 2007, la doxycycline est administrée aux primates par voie orale grâce à des comprimés introduits dans des fruits secs. Ce protocole d'administration de l'antibiotique, ainsi que les doses utilisées, sont tout à fait compatibles avec une application clinique (5mg/kg par jour). Ces deux études ont permis de montrer que le vecteur AAV2/4-CAG-TetOn-EPO induisait une expression du transgène plus faible que le vecteur AAV2/5-CAG-TetOn-EPO. Ceci peut s'expliquer par le fait que le sérotype 4 de l'AAV ne transduit que les cellules de l'EPR alors que le sérotype 5 permet une transduction des cellules de l'EPR et des photorécepteurs. Il a également été montré que le vecteur AAV2/5.RPE65.TetOn.EPO induisait une expression du transgène plus faible que le vecteur AAV2/5.CAG.TetOn.EPO. Là encore on peut expliquer cela par le fait que le promoteur RPE65 ne permet qu'une expression du transgène restreinte aux cellules de l'EPR alors que le promoteur CAG qui est ubiquitaire, permet une expression à la fois dans les cellules de l'EPR et dans les photorécepteurs. Chez un des macaques injectés avec le vecteur AAV2/5.CAG.TetOn.EPO, huit inductions à la doxycycline ont été effectuées sur une durée de plus de deux ans et les dosages de l'EPO ont révélés que la protéine recombinante était produite dans des quantités équivalentes à chacune des huit inductions. L'étude de 2007 n'utilise que le vecteur AAV2/5.CAG.TetOn.EPO puisque c'est lui qui permet l'expression du transgène la plus forte. Cette étude fait part des résultats obtenus au laboratoire sur une période de 31 à 48 mois en fonction des individus (soit environ 2,5 à 4 ans) et montre deux choses. Tout d'abord qu'il est possible d'affiner la régulation de l'expression du transgène en modulant les doses de Dox administrées (en intraveineuse). Ensuite qu'il est également possible de réguler l'expression du transgène grâce à une administration orale de Dox. Contrairement à ce qui avait été observé dans le muscle squelettique de macaque (Favre *et al.*, 2002; Chenuaud *et al.*, 2004a), il n'y a pas eu dans l'œil de développement de réponse immune contre le rtTA ou contre l'EPO, même à long terme (Stieger *et al.*, 2006; Stieger *et al.*, 2007). L'étude publiée en 2009 montre que 5 ans après l'injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV2/5.CAG.TetOn.EPO chez le macaque, il est possible d'induire la production d'EPO à un taux équivalent à celui obtenu quelques mois après l'injection (Stieger *et al.*,

2009a). Chez ce macaque, aucune réponse immunitaire n'a été détectée contre le rtTA, l'EPO ou le vecteur AAV.

Le système AAV-TetOn est donc un bon système de régulation de l'expression du transgène dans l'œil car il permet une régulation à long terme et une administration orale de la doxycycline à des doses compatibles avec celles utilisées en clinique.

# Résultats

## 2. Résultats.

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit, le transfert de gènes dans la rétine utilisant les vecteurs AAV recombinants est porteur de beaucoup d'espoir, notamment pour le traitement des pathologies rétinienne héréditaires comme la rétinite pigmentaire ou l'amaurose congénitale de Leber. Les essais pré-cliniques effectués dans des modèles de gros animaux sont une étape indispensable au développement d'essais cliniques chez l'Homme. En effet, le passage direct du rongeur à l'Homme peut se révéler dangereux car le système immunitaire des rongeurs est assez éloigné de celui de l'Homme, de plus la taille d'un œil de rongeur ne peut pas permettre d'évaluer les doses de vecteur à administrer et les procédures chirurgicales à mettre en place. Pour ces différentes raisons, les modèles de gros animaux, comme le chat, le chien ou le primate, qui possèdent des caractéristiques morphologiques, physiologiques et immunitaires beaucoup plus proches de l'Homme sont une étape déterminante.

Une revue publiée en 2009 (Stieger *et al.*, 2009b), traite du transfert de gène dans la rétine médié par les vecteurs AAV recombinants dans des modèles de gros animaux et se focalise sur les essais pré-cliniques effectués chez le primate non humain et le chien. Plusieurs raisons expliquent l'intérêt du modèle canin. Tout d'abord, le chien souffre spontanément de maladies génétiques très semblables aux maladies humaines, comme les pathologies rétinienne héréditaires, alors que le développement de telles affections chez les rongeurs doit être provoqué par des facteurs exogènes. L'obtention récente de la séquence complète du génome du chien et la batterie de millions de marqueurs génétiques qui l'accompagnent expliquent cet engouement pour le modèle canin. Une pathologie donnée (due à un défaut génétique précis) est en général spécifique à une race de chien donnée.

Ainsi, différents défauts génétiques à l'origine d'amaurose congénitale de Leber chez le chien ont été mis en évidence par les vétérinaires. Une insertion de 44 nucléotides dans le gène RPGRIP1 a été retrouvé dans une colonie de mini-teckels à poils longs (miniature longhaired dachshund, MLHD) (Mellersh *et al.*, 2006) tandis qu'une délétion de 4 nucléotides dans le gène RPE65 a été détecté dans une colonie de chiens briards (Veske *et al.*, 1999).

Parmi les modèles canins potentiellement traitables par thérapie génique se trouve le chien teckel RPGRIP1-déficient. Ce modèle canin d'amaurose congénitale de Leber a été découvert très récemment (Mellersh *et al.*, 2006) et l'évolution de la pathologie n'avait pas encore été caractérisée. En 2005, le laboratoire de thérapie génique de Nantes a pu se procurer 4 individus possédant une délétion dans le gène RPGRIP1. Le premier objectif de ce travail de thèse a donc été de caractériser la pathologie du mini-teckel à poils longs RPGRIP1-déficient grâce à une batterie d'examens cliniques et à une étude histologique, dans le but de déterminer une fenêtre thérapeutique de traitement. La caractérisation de cette pathologie sera présentée dans le premier article et les résultats seront ensuite discutés (Lheriteau *et al.*, 2009).

La seconde partie de ce travail concernant le chien teckel RPGRIP1-déficient a consisté à construire un vecteur spécifique des photorécepteurs et à valider son tropisme chez le rat et chez le chien grâce au transgène rapporteur de la GFP. Puis le transgène GFP a été remplacé par l'ADNc RPGRIP1 humain et les vecteurs thérapeutiques ont été évalués chez le teckel. Malheureusement ce vecteur portant l'ADNc RPGRIP1 humain n'a pas permis de restaurer la fonction rétinienne et visuelle chez le teckel. Nous avons donc effectué le clonage de l'ADNc RPGRIP1 canin à partir de tissus rétiens issus de chiens sains. Cet ADNc canin a été testé *in vitro* puis inséré dans un vecteur AAV de sérotype 5 ou 8 (résultats complémentaires non publiés). Ces vecteurs thérapeutiques ont pu être injectés chez le teckel RPGRIP1-déficient en juin 2009 (n=1 pour l'AAV2/5-Rk-cRPGRIP1 et n=1 pour l'AAV2/8-CMV-cRPGRIP1). Malheureusement, nous ne disposons pas aujourd'hui du recul nécessaire pour pouvoir interpréter ces résultats.

La troisième partie de ces résultats de thèse concerne le briard RPE65-déficient. Le premier succès obtenu grâce à la thérapie génique rétinienne médiée par les AAVr chez le chien est le traitement de ce briard. Ce modèle canin d'amaurose congénitale de Leber a été découvert et caractérisé il y a plus de 10 ans (Aguirre *et al.*, 1998; Narfstrom, 1999; Veske *et al.*, 1999). De nombreux essais chez la souris RPE65-déficiente et chez le chien RPE65-déficient ont montré l'efficacité de la restauration de la fonction rétinienne et visuelle chez ces animaux grâce à la thérapie génique (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003; Dejneka *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2004; Acland *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2006; Le Meur *et al.*, 2007). En se basant sur ces études pré-cliniques, trois équipes ont d'ors et déjà lancé des essais cliniques de phase 1-2 (Bainbridge *et al.*, 2008; Hauswirth *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2009). Les résultats préliminaires de ces études montrent d'une part que le traitement n'engendre pas d'effet délétère, et d'autre part

que l'injection de vecteurs AAVr portant le transgène RPE65 humain chez des patients jeunes, permet de restaurer en partie la fonction rétinienne et visuelle.

Dans notre étude, nous avons développé des vecteurs AAV recombinants portant le gène RPE65 humain sous le contrôle de promoteurs régulables à la tétracycline (TetOff et TetOn) dans le but de pouvoir moduler l'expression de la protéine RPE65 dans la rétine et de ce fait de pouvoir déterminer la concentration optimale pour restaurer la fonction visuelle. En faisant varier les doses de doxycycline administrées, nous souhaitons également pouvoir faire varier l'amplitude des réponses électrorétinographiques obtenues. L'évaluation de la fonction rétinienne et visuelle des bords RPE65-déficients traités avec ces vecteurs sera présentée dans le second article (Lhériveau et al., en cours de soumission). Les résultats de cette étude seront ensuite discutés.



## Premier article

### **The RPGRIP1 deficient dog, a promising canine model for gene therapy.**

Molecular Vision, 2009, 15 : 349-361

Elsa Lhériveau, Lyse Libeau, Knut Stieger, Jack-Yves Deschamps, Alexandra Mendes-Madeira, Nathalie Provost, Françoise Lemoine, Cathryn Mellersh, N. Matthew Ellinwood, Yan Cherel, Philippe Moullier and Fabienne Rolling.

# The *RPGRIP1*-deficient dog, a promising canine model for gene therapy

Elsa Lh riteau,<sup>1</sup> Lyse Libeau,<sup>1</sup> Knut Stieger,<sup>1</sup> Jack-Yves Deschamps,<sup>2</sup> Alexandra Mendes-Madeira,<sup>1</sup> Nathalie Provost,<sup>1</sup> Francoise Lemoine,<sup>3</sup> Cathryn Mellersh,<sup>4</sup> N. Matthew Ellinwood,<sup>5</sup> Yan ChereI,<sup>6</sup> Philippe Moullier,<sup>1</sup> Fabienne Rolling<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR 649, CHU-Hôtel Dieu, Nantes, France; <sup>2</sup>Service d'Urgences, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, France; <sup>3</sup>Clinique Vétérinaire Vetoceane, Vertou, France; <sup>4</sup>Animal Health Trust, Lanwades Park, Kentford, Newmarket, Suffolk, UK; <sup>5</sup>Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, IA; <sup>6</sup>INRA UMR 703, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, France

**Purpose:** To evaluate the *RPGRIP1*-deficient miniature longhaired dachshund (MLHD) dog as a potential candidate for gene therapy.

**Methods:** Six *RPGRIP1*-deficient MLHD dogs from our dog colony have been observed for two years using a variety of noninvasive procedures. These included bilateral full-field electroretinograms (ERG) to evaluate retinal function, fundus photographs to evaluate retinal vascularization, and optical coherence tomographs (OCT) to evaluate retinal thickness. We also performed histological examination of hematoxylin- and eosin-stained retinal sections as well as sections labeled in situ by the terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) method.

**Results:** ERG findings showed that as early as 2 months of age, cone function was lost while rod function was preserved. However, by 9 months of age, both cone and rod functions could not be detected. Functional visual assessment based on the ability to avoid obstacles showed that vision was retained up to the age of 11 months. Both OCT and histopathology studies revealed a progressive thinning of the outer nuclear layer (ONL) over the first 2 years of age. TUNEL labeling identified apoptotic photoreceptor cell death as the cause of this thinning of the ONL.

**Conclusions:** A treatment strategy should consist in initiating gene therapy as early as possible after birth to prevent or delay the loss of rod function. In the MLHD, successful subretinal delivery of a therapeutic vector is feasible at 2 months of age and may prevent or delay the loss of rod function.

Inherited retinal degenerations are a heterogeneous group of disorders that nearly always share one critical feature: degeneration of photoreceptors. Retinal dystrophies often lead to blindness. Currently, there are no effective treatments. To study the pathophysiology of retinal degeneration, animal models for which the genetic basis is understood are used. They share clinical features with their human counterparts and serve as valuable tools to aid in the development of therapies. For example, the close similarities between humans and dogs, in terms of the clinical characteristics of disease resulting from *retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa (RPE65)* gene mutations, make the *RPE65*<sup>-/-</sup> Briard dog a valuable model for the evaluation of gene therapy. Several groups, including ours, have now reported restoration of vision in *RPE65*<sup>-/-</sup> dogs using recombinant adeno associated virus (rAAV) mediated delivery of the human *RPE65* gene [1-3]. The success of the *RPE65*<sup>-/-</sup> dog gene therapy experiments was crucial in the development of

human clinical trials to treat patients affected with Leber congenital amaurosis (LCA) or early onset retinal degeneration linked to a mutation in *RPE65* [4-6].

The mutation involved in a retinal degeneration previously described in miniature longhaired dachshunds has been identified [7,8]. This mutation consists of a 44 bp insertion in exon 2 of the *retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1 (RPGRIP1)* gene, and introduces a premature stop codon [9].

Genetic defects in the *retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)* gene cause retinitis pigmentosa and defects in *RPGRIP1* cause LCA [10,11]. A study reporting a comprehensive mutational analysis of all known genes in 179 unrelated patients showed that *RPGRIP1* accounts for 4.5% of the cases [12].

Patients with *RPGRIP1* mutations have degeneration of both rod and cone photoreceptor cells, and in early life they experience a severe loss of central acuity, which leads to nystagmus. The functions of *RPGR* and *RPGRIP1* are not fully understood. Both *RPGR* and *RPGRIP1* localize in the photoreceptor connecting cilium, a thin bridge linking the cell body and the light-sensing outer segment. A study of *RPGRIP1*<sup>-/-</sup> mice demonstrated that *RPGRIP1* is a stable polymer in the connecting cilium where it tethers *RPGR* and

Correspondence to: Fabienne Rolling, PhD, Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM U649, CHU-Hôtel Dieu, B t. J. Monnet, 30 Avenue J. Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France; Phone: (33) 240087490; FAX: (33) 240087491; email: [fabienne.rolling@univ-nantes.fr](mailto:fabienne.rolling@univ-nantes.fr)

TABLE 1. LIST OF DOGS AND EXAMINATIONS PERFORMED.

Dogs	ERG	Fundus photography	OCT	Behavioral study (once a month)	H&E	IF	TUNEL
A1	2, 4, 9 m	2, 9 m	nd	2–10 m	11 m	nd	11 m
A2	2, 4, 9, 12 m	2, 12 m	5, 12 m	2–24 m	28 m	nd	28 m
A3	2, 4, 9, 12 m	2, 12 m	nd	2–24 m	nd	nd	nd
A4	2, 4, 9, 12 m	2, 12 m	nd	2–24 m	nd	nd	nd
A5	nd	nd	10 y	nd	10 y	nd	nd
A6	nd	nd	nd	nd	2 m	2 m	2 m
NA1	6 m	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NA2	nd	nd	nd	nd	2 m	2 m	2 m

Abbreviations: affected dog (A); nonaffected dog (NA); electroretinography (ERG); OCT is optical coherence tomography; hematoxylin- and eosin-stained sections (H&E); immunofluorescence stained sections (IF); sections labeled in situ by the terminal dUTP nick end labeling method (TUNEL); months (m); years (y); not done (nd).

that *RPGR* depends on *RPGRIP1* for subcellular localization and normal function [13]. This same study also suggested that *RPGRIP1* is required for disk morphogenesis, putatively by regulating actin cytoskeleton dynamics.

The objective of this study was to evaluate this LCA canine model as a potential candidate for gene therapy. For this purpose, we further characterized the kinetics of the retinal degeneration and the disease phenotype in the *RPGRIP1* deficient miniature longhaired dachshund (MLHD).

## METHODS

***RPGRIP1*-deficient dogs:** A colony of MLHD dogs carrying the *RPGRIP1* mutation (a 44 nucleotide insertion that introduces a premature stop codon) was developed at the Boisbonne center (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, France). All animals were cared for in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. Dogs were housed in purpose-built, environmentally enriched facility with 12 h light-12 h dark cycle, they were fed with commercial diets and provided with water ad lib. Affected dogs A1-A4 were monitored from birth to 2 years of age. A1 died at the age of 11 months from an intestinal obstruction. Dogs A5 (a 10-year-old affected dog) and A6 (a 2-month-old affected dog) were sacrificed for histology study (Table 1).

***Electroretinography:*** Dogs were dark-adapted for 20 min, and electroretinograms (ERGs) were performed under general anesthesia. Dogs were anesthetized with a combination of 40 µg/kg medetomidine (Domitor®; Pfizer, Paris, France) with 5 mg/kg ketamine (Imalgène®; Rhone Merieux, Toulouse, France), mixed in one syringe and given intravenously in a single dose. After endotracheal intubation, anesthesia was maintained with 1.5% isoflurane. Dogs were monitored by clinical observations, respiratory rate measurements, temperature measurements, oxymetry, and capnography. Rod and cone function was tested using simultaneous bilateral

flash photopic and scotopic electroretinography. ERGs were recorded in a standardized fashion, according to the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) [14], using a computer-based system (Neuropack µ™ MEB-9102K, Nikon-Kohden, Tokyo, Japan) and contact lens electrodes (ERGjet®; Microponent, Le Cret-du-Lochie, Switzerland).

In fully dark-adapted dogs, attenuated white flash (0.028 cd.s.m<sup>-2</sup>) was used to elicit a rod ERG b-wave. Four flashes, presented at a rate of 0.5 Hz, were used to average the rod system response.

To elicit a maximal mixed rod and cone response, we used a single white light flash (2.8 cd.s. m<sup>-2</sup>). The maximal mixed rod and cone responses were averaged by using three flashes, presented at a rate of 0.1 Hz. Following a 10 min light adaptation, cone function was tested with 1 Hz white light flashes, and the cone flicker was tested with 30 Hz white light flashes, both in addition to a continuous rod desensitizing white background light. Ten to 20 responses were averaged for light-adapted recordings.

The *b*-wave amplitude was measured from the *a*-wave peak to the *b*-wave peak. Flicker amplitude was measured from the trough to the peak. Measurement method followed the recommendations in the ISCEV Standard for Clinical electroretinography.

***Behavioral studies:*** Using a camcorder, we recorded the visual behavior of affected dogs walking through an obstacle course in normal light. The number of collisions incurred by each dog as it went through the course was compared at different time points after birth (every month over a 2 year period).

***Fundus photography:*** The pupils of the dogs were dilated 20 min before anesthesia using tropicamide (Ciba Vision Faure®; Novartis, Annonay, France) and phenylephrine hydrochloride (10% Neosynephrine®; Novartis). Dogs were anesthetized with a combination of 40 µg/kg medetomidine (Domitor®, Pfizer, Paris, France) with 5 mg/kg ketamine

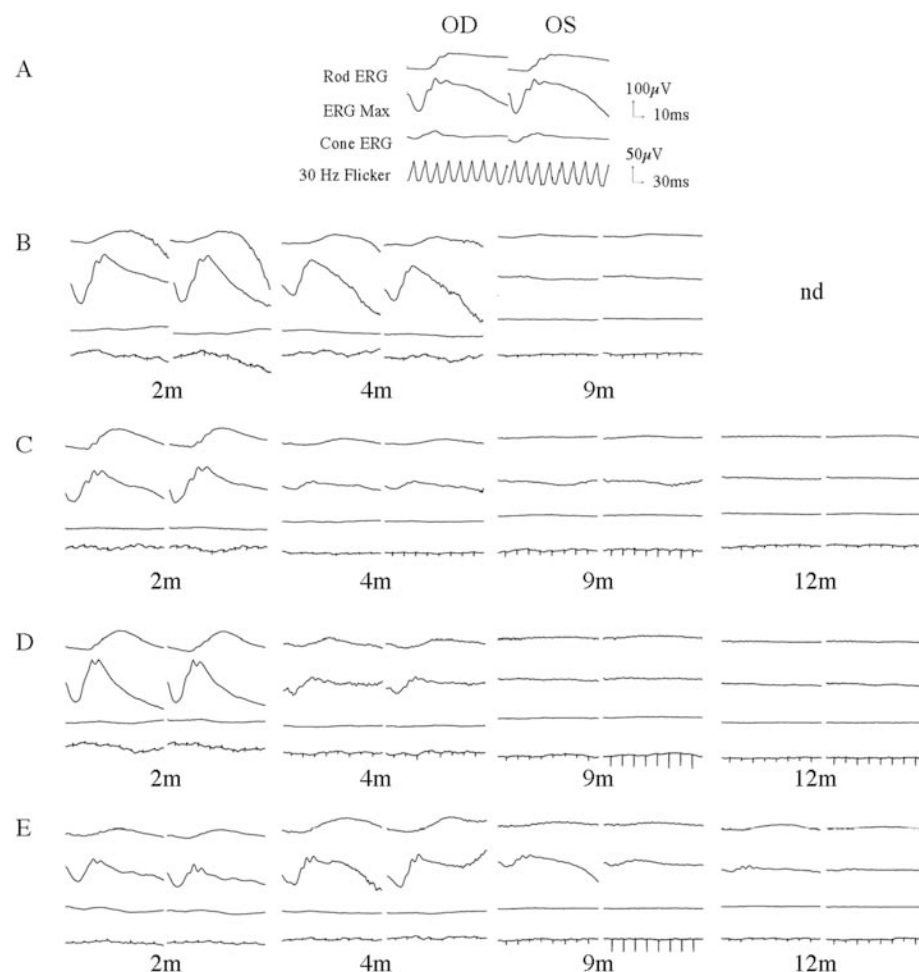


Figure 1. Bilateral full-field electroretinographic recordings of *RPGRIP1*-deficient dogs. **A:** Heterozygous carrier NA1 at the age of 6 months. **B:** Affected dog A1 at the age of 2, 4, and 9 months. **C:** Affected dog A2 at the age of 2, 4, 9, and 12 months. **D:** Affected dog A3 at the age of 2, 4, 9, and 12 months. **E:** Affected dog A4 at the age of 2, 4, 9, and 12 months. The top two recordings are low and high intensity scotopic responses. The bottom two recordings show photopic responses to light-adapted single flash and 30 Hz flicker stimuli.

(Imalgène®), mixed in one syringe and given intravenously in a single dose. Maintenance with isoflurane was not needed. After endotracheal intubation, dogs were clinically observed and their respiratory rates were monitored. Fundi were imaged using a Canon UVI retinal camera connected to a digital imaging system (Lhedioph win software; Lheritier SA, Saint-Ouen l'Aumône, France).

**Optical coherence tomography:** Retinal morphology was assessed by optical coherence tomography (OCT; Stratus 3000; Zeiss, Jena, Germany). Dilatation of the pupils and intravenous anesthesia of the animals were performed as described in the previous section. At different time points, a 3 mm horizontal line scan was performed in the area located above the optical nerve head.

**Histology:** Eyecups were obtained from normal and affected dogs and were fixed for 48 h in Bouin's solution (Laurylab, Saint Fons, France). Tissue sections (5–7 µm thick) were cut from paraffin-embedded blocks on a microtome. For histopathological examinations, sections were stained using a standard hematoxylin and eosin staining protocol. H&S

sections were viewed with bright-light microscopy (Nikon, Champigny sur Marne, France).

For immunofluorescence evaluation, paraffin-embedded sections were deparaffinized and rehydrated with phosphate buffered saline (PBS, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.49 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136.89 mM NaCl, 8.10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). The sections were blocked with 5% BSA in 0.2% Tween/PBS for 30 min at room temperature, washed at room temperature in 0.2% Tween/PBS with 1% BSA. Sections were then incubated overnight at 4 °C with 1:100 mouse monoclonal anti-Rho4D2 antibody [15] (kindly provided by Dr. Molday, University of British Columbia, Vancouver, Canada) or 1:1,000 peanut lectin agglutinin-conjugated with fluorescein isothiocyanate (PNA-FITC; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) diluted in 0.2% Tween/PBS. Sections were washed with 1% BSA in 0.2% Tween/PBS at room temperature and labeled with anti-Rho4D2 antibody. They were then incubated with 1:400 FITC-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Newmarket, England) diluted in 0.2%



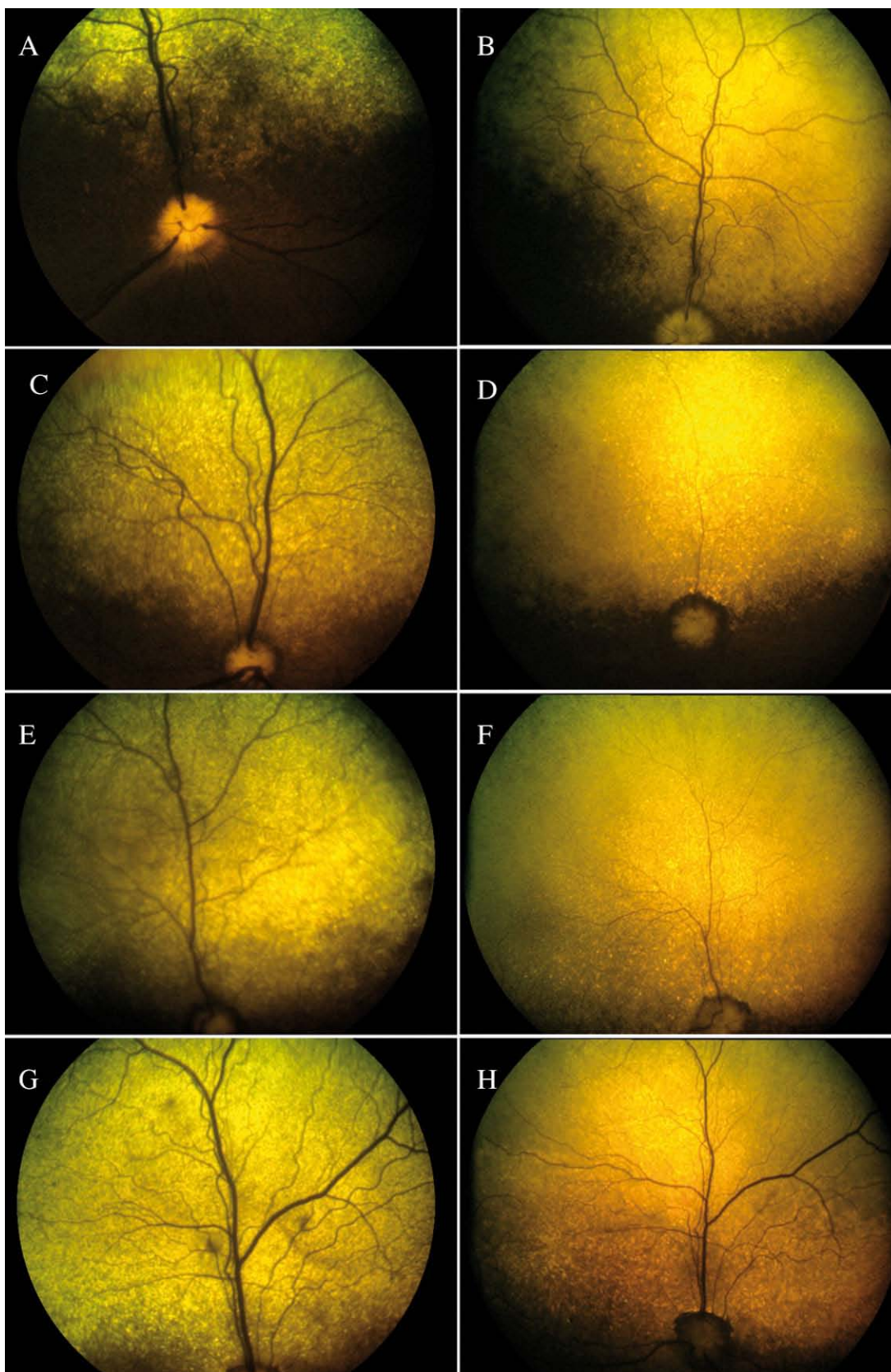


Figure 2. Fundus photographs in *RPGRIP1*-deficient dogs. **A, B:** A1 at the age of 2 and 9 months. **C, D:** A2 at the age of 2 and 12 months. **E, F:** A3 at the age of 2 and 12 months. **G, H:** A4 at the age of 2 and 12 months. There is progressive thinning of the retinal vasculature and an increase in hyperreflectivity of the tapetal area of the fundus.

Tween/PBS for 1 h 30 min at room temperature. Sections were then washed with 1% BSA in 0.2% PBS/Tween.

**TUNEL assay:** To detect apoptosis, we employed the TUNEL technique, using a commercially available kit (In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein; Roche, Mannheim, Germany). TUNEL staining was performed according to the manufacturer's instructions and as described by Labat-Moleur [16]. A positive control was used. This was obtained by inducing DNA fragmentation with DNaseI treatment before TUNEL staining, which mimics the DNA fragmentation associated with apoptosis. The negative control consisted of performing the TUNEL labeling without including the TdT enzyme.

**Statistical analysis:** Retinal thickness values were obtained with OCT on both eyes from dogs A1, A2, A3, and A4. At each time point (2, 6, 9, 12, 15, 18, 21, and 28 months) the thickness of the retinas was expressed as mean ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ 1 SD. Comparisons of retinal thickness were performed by Student's *t*-test. A  $p < 0.05$  was accepted as significant. The Student test required two assumptions are met: 1) the samples must be distributed as a Gaussian distribution, which was a reasonable assumption; 2) the variances of the two samples must be equal. The second assumption was checked using a Fisher Test.

For time points 2, 6, and 9 months, the number of measurements was  $n=8$ , and included measurements taken from dogs A1, A2, A3, and A4. For time points 12, 15, 18, 21, and 28 months, the number of measurements was  $n=6$ , and included dogs A2, A3, and A4 (A1 died at the age 11 months).

## RESULTS

**Kinetics of retinal function loss in RPGRIP1-deficient dogs:** Retinal function was tested using simultaneous bilateral full-field flash ERG (Figure 1). For all affected MLHD, the cone function (cone ERG and 30 Hz flicker) were barely detectable as early as 2 months of age. At this same time point, the rod function was similar between heterozygous carrier and affected animals, but progressively declined thereafter. At 4 months of age, the rod function was dramatically reduced for A2, A3, and A4 while A1 still displayed respectable signals. The ERG responses became undetectable at the age of 9 months for A1, A2, A3, and by 14 months for A4. It is interesting to note the substantial variation within the kinetic of retinal function loss from animal to animal. However, for all affected dogs, no retinal function could be detected by 14 months.

**Kinetics of vision loss in RPGRIP1-deficient dogs:** We evaluated vision in all 4 affected MLHD using behavioral testing at different time points. This evaluation started at 2 months of age and was repeated every month over a 2 year period. Visual assessment was based on the ability to avoid obstacles in normal light. The obstacle course was arranged such that the placement of obstacles was unique from trial to trial. All dogs consistently avoided obstacles at the age of 9

months. At 11 months, A1, A2 and A3 failed to avoid obstacles, indicating they had loss of vision (a movie of A2 in the obstacle course can be viewed in [Appendix 1](#)). For A4, loss of vision was observed at 15 months. For all affected dogs, that residual vision was still detected during the 1–2 months following a complete loss of a measurable ERG signal.

**Thinning of retinal blood vessel and decrease of retinal thickness:** Retinal morphology was monitored by color fundus photographs and by OCT in A2 to A4 for up to 2 years and up to 10 months for A1. For each affected MLHD, color fundus photographs displayed a progressive and dramatic thinning of the retinal vascularization, accompanied by a hyperreflectivity of the tapetal area of the fundus, over a 12 month period (Figure 2).

OCT is a non-contact, optical imaging technique that measures the intensity of backscattered light [17,18]. It produces a cross-sectional image, analogous to B-scan ultrasonography, but based on the optical reflectivity of the tissue, and thus, by using light instead of sound waves, provides an image with greater resolution. OCT imaging was performed in all affected animals at different time points. Long-term OCT monitoring in A1-A4 documented an important decrease of the retinal thickness between 5 and 12 months (Figure 3A,B). This decrease was statistically significant over the first 2 years of life (Figure 4). Interestingly, OCT imaging of A5, an older *RPGRIP1*-deficient dog that was monitored at the age of 10 years, displayed the RPE layer but no neuroretina, suggesting a complete degeneration of neuroretinal cells (Figure 3C). Moreover, dogs A2-A4 displayed lens opacities at the age of 21 months. Lens photographs of A5 at the age of 10 years showed a total cataract (data not shown).

**Histopathology and apoptosis of photoreceptors:** To better evaluate the retinal alterations observed on the OCT images, we sacrificed A6 at the age of 2 months, A1 at the age of 11 months, A2 at the age of 28 months, and A5 at the age of 10 years. The eyes were used for histopathological examination (Figure 5). Examination of hematoxylin- and eosin-stained sections revealed thinning of the outer nuclear layer between the age of 2 and 28 months, reflecting the progressive loss of photoreceptor cells. As seen in dog A5, by the age of 10 years, and as observed by OCT, a thin gliotic retina remained visible on histologic section with a complete lack of the photoreceptor layer.

Immunofluorescence staining of the retina of A6 was performed, using the PNA-FITC lectin and the Rho4D2-FITC antibody. Distinct cone and rod labeling (Figure 6F,H) were observed, suggesting that rods and cones were still present at 2 months of age.

To test whether apoptotic cell death was the cause of retinal thinning of over time, we employed the TUNEL technique to stain sections from A6, A1, and A2 for apoptotic



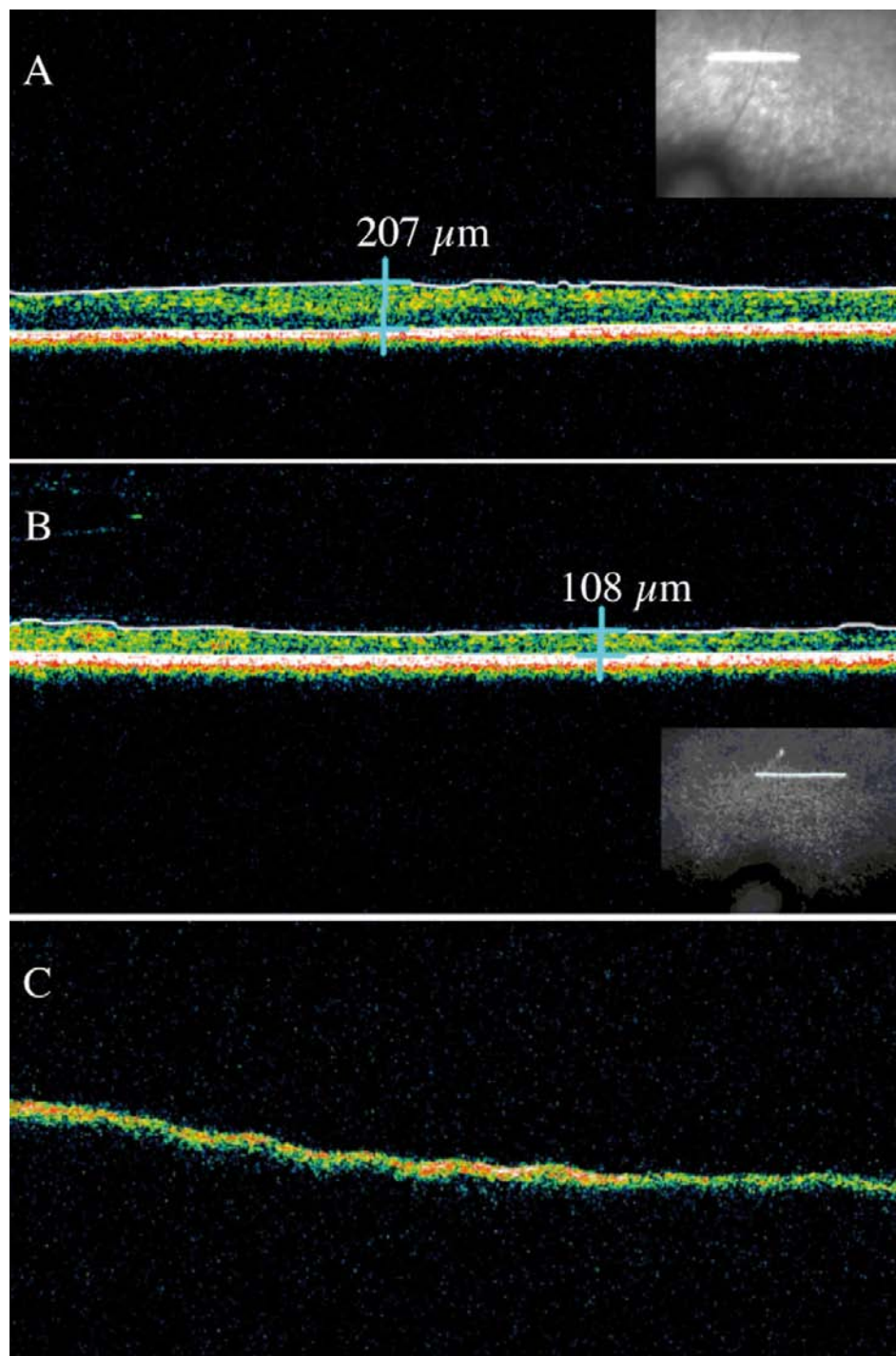


Figure 3. Images of OCT recordings of *RPGRIP1*-deficient dogs. The insets show the localization of the 3mm horizontal line scan above the optical nerve head. Notable decrease of the retinal thickness is observed in the affected dog A2 between 5 (A) and 12 months (B). Surprisingly, extreme thinning is seen in the 10-year-old affected dog A5 (C).

cells. Retina sections from A6, A1, and A2 were positive for TUNEL compared to normal retina. Most of the apoptotic nuclei were detected in the outer nuclear layer, with some nuclei detected in the inner nuclear layer and no signal in the ganglion cell layer (Figure 7).

## DISCUSSION

In this study, *RPGRIP1*-deficient MLHD dogs were monitored clinically to define the optimal therapeutic window for retinal gene therapy. Analysis of the ERG findings showed that as early as 2 months of age, cone function was lost, while rod function was preserved. While cone function was undetectable at this time point, the cone photoreceptors

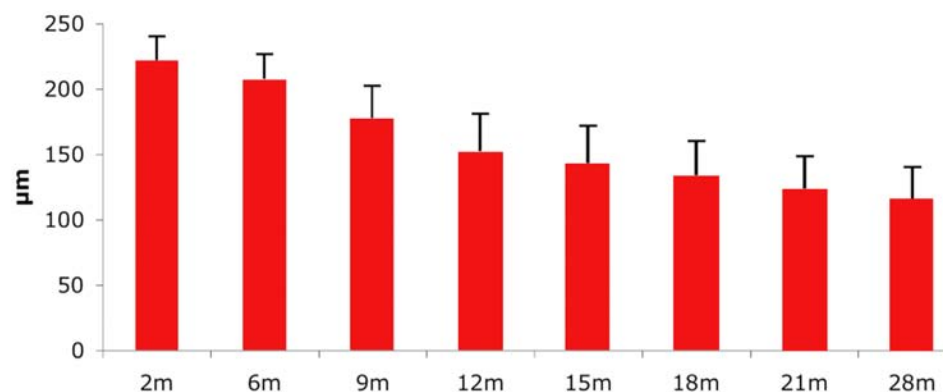


Figure 4. Decrease of full retinal thickness over time as observed on OCT scans. Bars (+1 standard deviation) represent retinal thickness measured on retinal sections from dogs of different ages. The Student *t*-test was performed to compare the mean retinal thickness at different stages of the disease. A  $p < 0.05$  was considered significant. The retinal thickness decrease was significant between 2 months and 28 months ( $p = 8.7E07$ ).

themselves were still present in the retina at this early age. At 9 months of age, both cone and rod functions were undetectable. Interestingly, at this time point, assessment of each dog's ability to avoid obstacles showed that functional vision is retained up to the age of 11 months. Both OCT and histopathology studies revealed a progressive thinning of the neuroretina over the first 2 years of age. TUNEL assay indicated that the apoptotic photoreceptor cell death was the mechanism of this thinning of the neuroretina.

In contrast to the study by Curtis and Barnett [7], which described what was thought to be a rod-cone dystrophy in the MLHD, and in accordance with the recent findings of Turney et al. [8], our results indicated that the *RPGRIP1*-deficient MLHD manifested a cone-rod dystrophy. Our ERG findings matched the Turney et al. [8] study. In their study, the ERG of a 6-week-old affected MLHD showed significant reduction of the 30 Hz flicker response.

Cone-rod dystrophies are rare. This is the first canine model of cone-rod dystrophy with a mutation that has been characterized [9]. A veterinary ophthalmological report from Kijas et al. [19] described a cone-rod dystrophy in pit bull terrier dogs; however, the causal gene was not identified. In this last model, the cone dysfunction was synchronous with the rod dysfunction, in contrast to what we have documented in the *RPGRIP1*-deficient model, where the rod responses appear to be relatively better preserved early in disease. Another cone-rod dystrophy was described in a standard wire haired dachshund, also displaying early functional changes of cones [20].

Although the ERG recordings were undetectable at the age of 9 months in several *RPGRIP1*-deficient dogs, these same affected dogs still retained some residual functional vision at this same age point. Functional vision persisted in at least one dog up to 14 months of age, at a time when the ERG was undetectable in this animal. This analysis suggests that evaluation both of functional vision using a behavioral test, as well as retinal function, using ERG, will have to be performed to evaluate the efficacy of any future treatment using this model. This is in sharp contrast to what we have observed in

gene therapy treated *RPE65*<sup>-/-</sup> dogs, where rescue of retinal function was directly associated to an improvement of functional vision as assessed by behavioral studies [3].

The progressive thinning of the ONL observed by OCT and on the retinal sections was due to apoptotic photoreceptor cell death. The photoreceptor cell death appears to progress in a similar rate over the first 2 years since the proportion of TUNEL-labeled photoreceptors remains consistent among the 3 different time points (2, 11, and 28 months; Figure 8). These results in the MLHD are different from those observed in the X-linked progressive retinal atrophy 2 (XLPRA2), which is characterized genetically by a frameshift mutation in exon 15 of the *RPGR* gene. In this model, a biphasic pattern of cell death was found, with an initial phase, from 4 to 12 weeks of age, and then a more gradual decrease after 12 weeks [21].

It was surprising to observe that for the 10-year-old *RPGRIP1*-deficient dog, not only had the outer retina disappeared but so had the inner retina. An analysis of hematoxylin- and eosin-counterstained sections from dogs between 2 months and 10 years of age did not reveal any inflammatory cells. To our knowledge, this phenomenon of complete neuroretinal degeneration has not been described in any other animal models of LCA or retinitis pigmentosa.

To date, the clinical literature on *RPGRIP1*-LCA patients clearly documents early and severe visual disturbances with nystagmus, abnormal visual acuity, nondetectable ERGs, and fundus features of retinal degeneration [22,23]. The close similarities between the clinical disease characteristics resulting from *RPGRIP1* gene mutations in humans and in the dog make this *RPGRIP1*-deficient MHLA a valuable model for the evaluation of gene therapy.

Recent success of AAV-mediated *RPGRIP1* gene transfer in a murine model of *RPGRIP1*-LCA is encouraging [24]. However, the evaluation of pre-clinical gene therapy in the eye of canine genetic models is far more desirable with respect to future clinical development; the canine eye is anatomically more similar to the human eye than the mouse counterpart. The dog ocular anatomic features are of similar proportion. Also, the surgical procedures for vector delivery



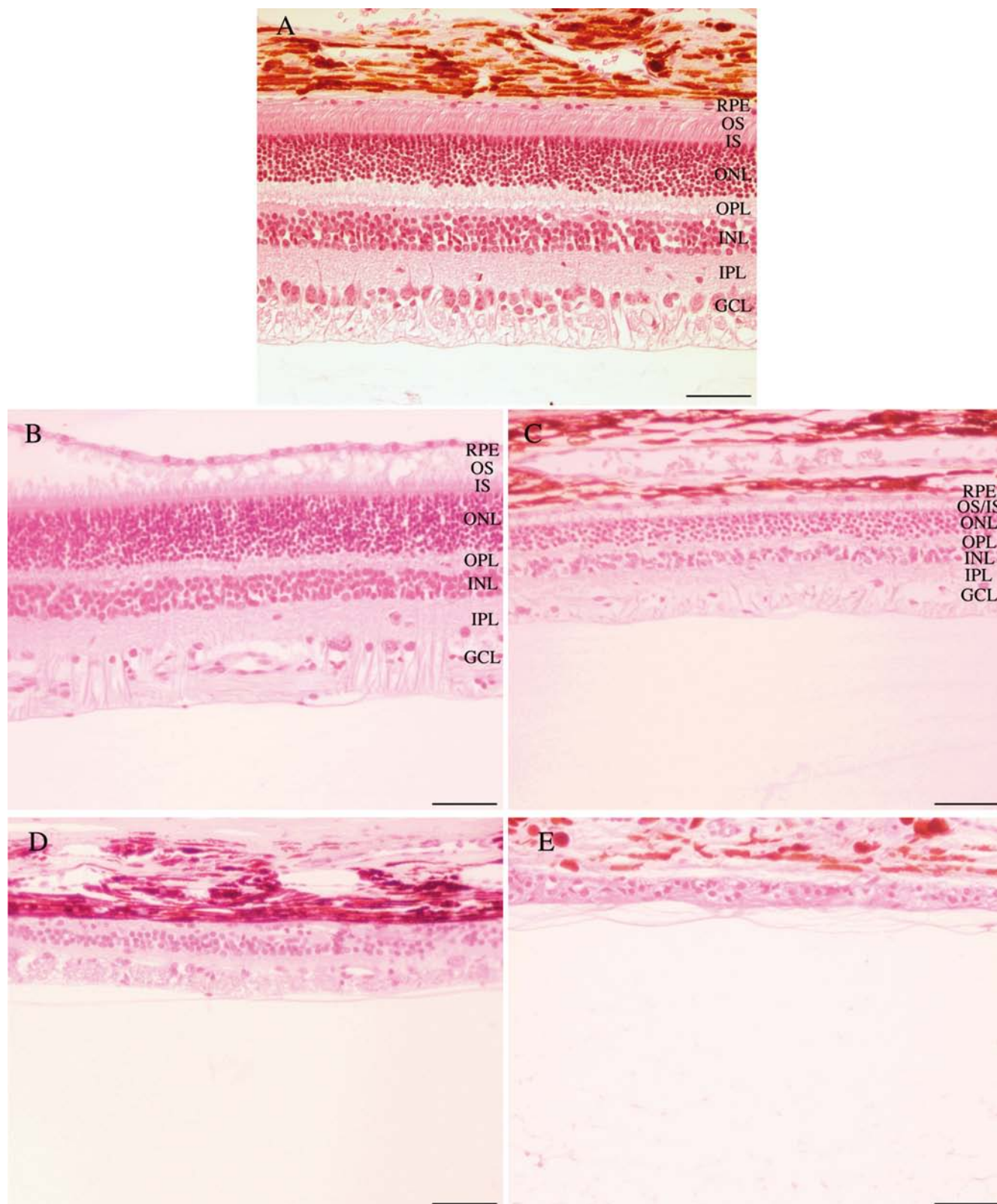


Figure 5. Histological sections of *RPGRIPI*-deficient dog's retinas. **A:** Normal dog NA2 at the age of 2 months. **B:** Affected dog A6 at the age of 2 months. **C:** Affected dog A1 at the age of 11 months. **D:** Affected dog A2 at the age of 28 months. **E:** Affected dog A5 at the age of 10 years. These results confirm the thinning of the retina observed on OCT images. Abbreviations: retinal pigment epithelium (RPE); outer segments (OS); inner segments (IS); outer nuclear layer (ONL); outer plexiform layer (OPL); inner nuclear layer (INL); inner plexiform layer (IPL); ganglion cell layer (GCL). The scale bar represents 100  $\mu$ m.

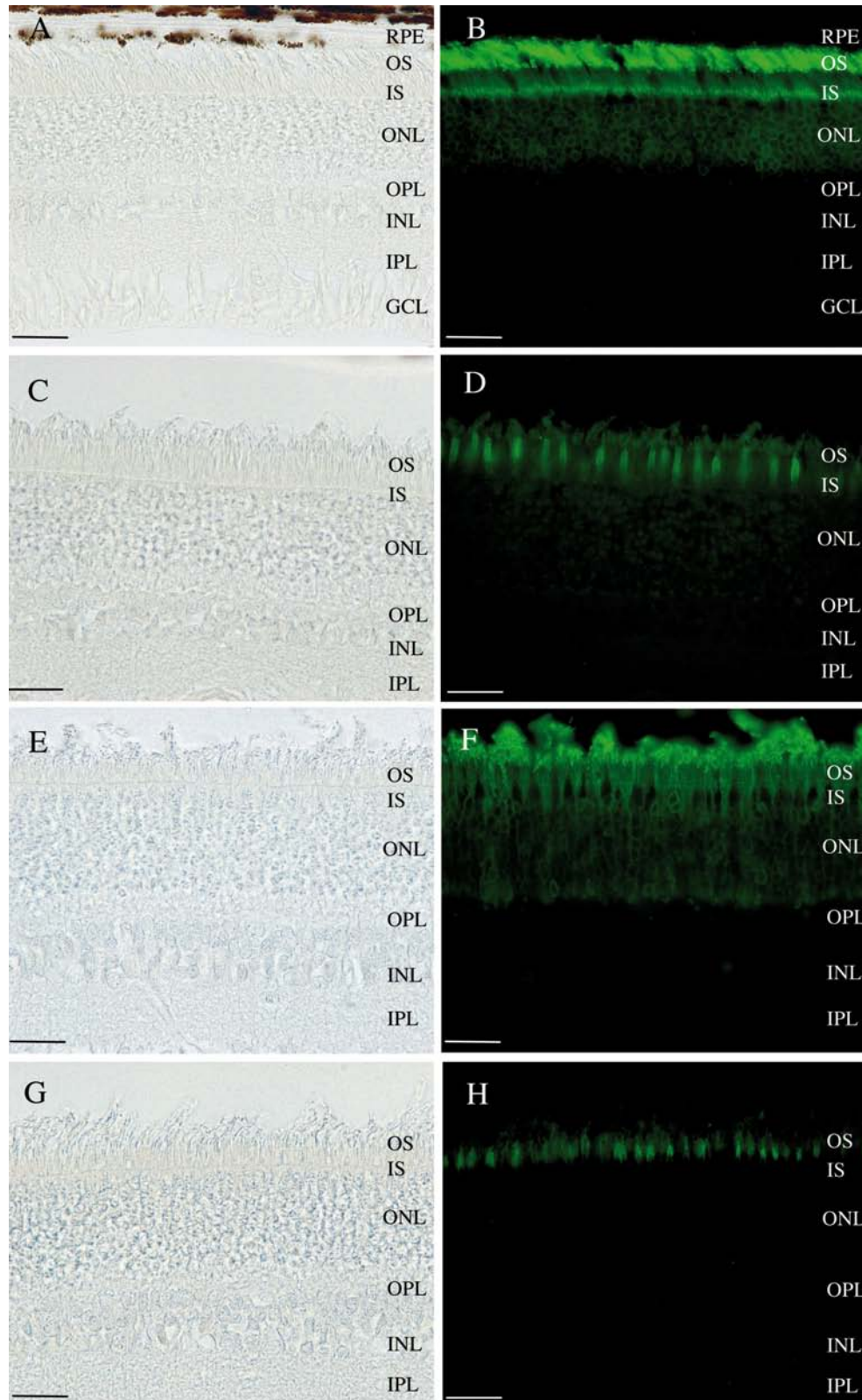


Figure 6. Light micrographs and immunofluorescent staining. **A,B,C,D:** Retina of the non affected dog NA2. **E,F,G,H:** Retina of the 2 months old affected dog A6. **B,F:** Rod labeling with anti-Rho4D2 antibody. **D,H:** Cone labeling with PNA-FITC lectin. These results show that both the rods and cones are still present at the age of 2 months in affected dogs. Abbreviations: retinal pigment epithelium (RPE); outer segments (OS); inner segments (IS); outer nuclear layer (ONL); outer plexiform layer (OPL); inner nuclear layer (INL); inner plexiform layer (IPL); ganglion cell layer (GCL). The scale bar represents 50  $\mu$ m.



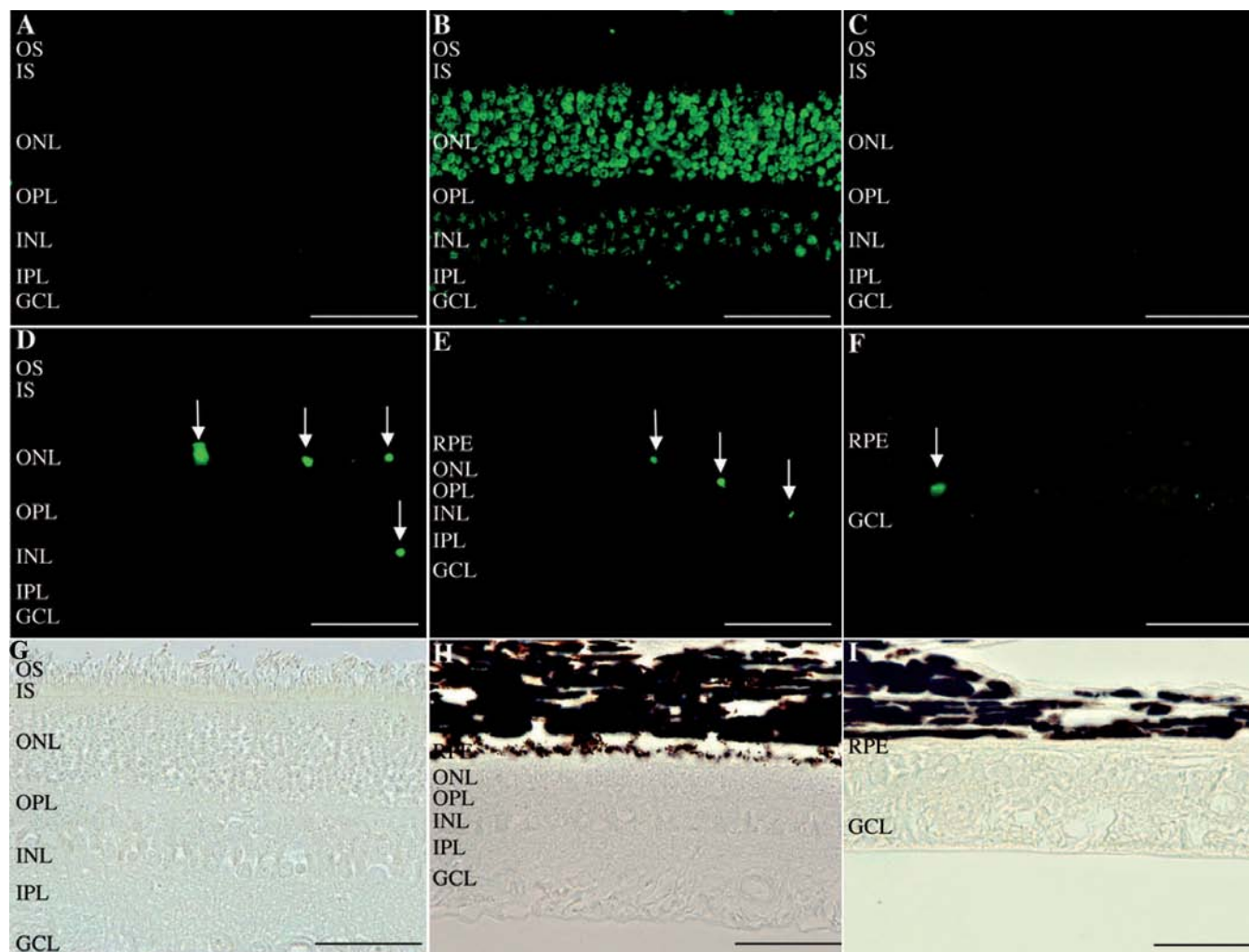


Figure 7. TUNEL assay on normal and affected dogs. **A:** Retina of the normal dog NA2 displayed no TUNEL-positive labeling. **B:** Retina of the affected dog A6 at the age of 2 months treated with DnaseI (positive control). **C:** Retina of the affected dog A6 at the age of 2 months treated with label solution only (negative control). TUNEL staining (**D,E,F**) and corresponding light micrographs (**G,H,I**) of the retinas of affected dogs. (**D,G**) retina of the affected dog A6 at the age of 2 months, (**E,H**) retina of the affected dog A1 at the age of 11 months and (**F,I**) retina of the affected dog A2 at the age of 28 months. TUNEL staining revealed apoptotic cells in all affected dogs, mostly in the outer nuclear layer, indicating apoptosis of photoreceptor cells. Abbreviations: retinal pigment epithelium (RPE); outer segments (OS); inner segments (IS); outer nuclear layer (ONL); outer plexiform layer (OPL); inner nuclear layer (INL); inner plexiform layer (IPL); ganglion cell layer (GCL). The scale bar represents 100  $\mu$ m.

and the amount of vector injected in the dog will be similar to what will be used in humans. In addition, dogs, which are relatively outbred compared to murine models, have greater immunological and biologic similarity to humans, which is vital and essential for determining the tolerance of vectors before clinical trials.

Recombinant AAV-mediated gene therapy has already been shown successful in the first canine model of LCA, the *RPE65*<sup>-/-</sup> dog. This *RPGRIP1*-deficient model is an attractive alternative LCA canine model in the sense that, in contrast to *RPE65*, it is not a rod-cone dystrophy but a cone-rod dystrophy and that the cells to target are not the RPE but the photoreceptors. A photoreceptor defect is more difficult to

treat than a RPE defect, and a large animal model of such a defect has great intrinsic value.

In conclusion, we have characterized the kinetics of functional and structural changes that occur in *RPGRIP1*-deficient dogs. The results of this present study suggest a therapeutic strategy that consists of initiating gene therapy as early as possible after birth. Considering the small size of the MLHD dogs (120–200 g at birth) and our preliminary surgical data (unpublished results), accurate transvitreal subretinal injection is not possible in dogs younger than 2 months. Successful subretinal delivery of a therapeutic vector will be feasible by 2 months of age and may prevent or delay the loss of rod function. This is a valuable spontaneous animal model

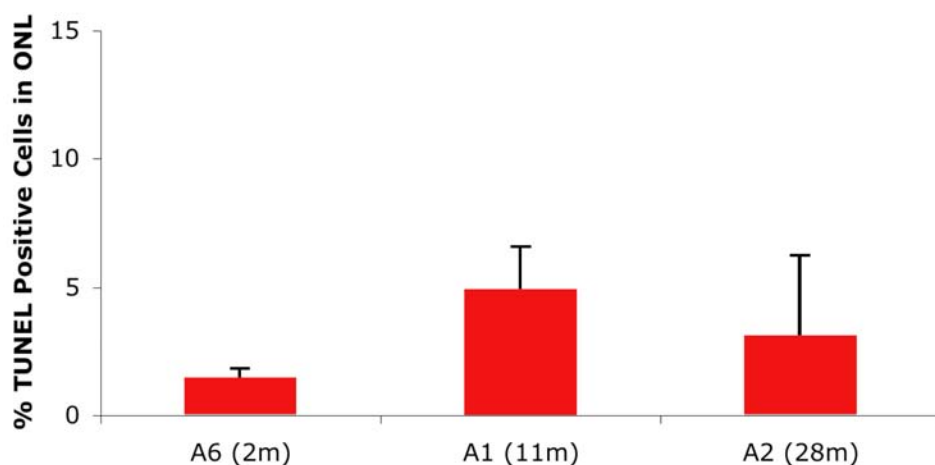


Figure 8. Quantification of TUNEL-positive cells in the outer nuclear layer of affected dogs. Apoptosis analysis was performed with fluorescent microscopy and a 40 $\times$  objective. Terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) positive cells stained with fluorescein were visualized and counted. TUNEL-positive cells in the outer nuclear layer (ONL) were quantified as the percent of the total number of cells in ONL per field. Data are the mean $\pm$ standard error of the mean from 10 fields of view. The graph represents the average of 3 independent experiments. Months are abbreviated as m.

that represents a unique and important tool to assess the in vivo efficacy of photoreceptor targeted gene based therapeutic strategies for cone-rod dystrophies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Agence Nationale de la Recherche, the Association Française contre les Myopathies, Inserm, Retina France, and the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire. This work was also supported by the French Lions Club and the Lions Clubs International foundation.

#### REFERENCES

- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001; 28:92-5. [PMID: 11326284]
- Narfstrom K, Katz ML, Bragadottir R, Seeliger M, Boulanger A, Redmond TM, Caro L, Lai CM, Rakoczy PE. Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:1663-72. [PMID: 12657607]
- Le Meur G, Stieger K, Smith AJ, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, Mendes-Madeira A, Provost N, Pereaon Y, Chere Y, Ali RR, Hamel C, Moullier P, Rolling F. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 2007; 14:292-303. [PMID: 17024105]
- Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358:2231-9. [PMID: 18441371]
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358:2240-8. [PMID: 18441370]
- Hauswirth W, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon T, Boye SL, Flotte TR, Byrne B, Jacobson SG. Phase I Trial of Leber Congenital Amaurosis due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results. *Hum Gene Ther*. 2008 [PMID: 18441370]
- Curtis R, Barnett KC. Progressive retinal atrophy in miniature longhaired dachshund dogs. *Br Vet J* 1993; 149:71-85. [PMID: 8439801]
- Turney C, Chong NH, Alexander RA, Hogg CR, Fleming L, Flack D, Barnett KC, Bird AC, Holder GE, Luthert PJ. Pathological and electrophysiological features of a canine cone-rod dystrophy in the miniature longhaired dachshund. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:4240-9. [PMID: 17724213]
- Mellersh CS, Boursnell ME, Pettitt L, Ryder EJ, Holmes NG, Grafham D, Forman OP, Sampson J, Barnett KC, Blanton S, Binns MM, Vaudin M. Canine RPGRIP1 mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshunds as a homologue of human Leber congenital amaurosis. *Genomics* 2006; 88:293-301. [PMID: 16806805]
- Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson F, Ciccociocola A, Edgar A, Carvalho MR, Achatz H, Hellebrand H, Lennon A, Migliaccio C, Porter K, Zrenner E, Bird A, Jay M, Lorenz B, Wittwer B, D'Urso M, Meitinger T, Wright A. A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nat Genet* 1996; 13:35-42. [PMID: 8673101]
- Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, McGee TL, Hong DH, Li T, Andreasson S, Berson EL. Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1295-8. [PMID: 11283794]
- Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, Calvas P, Dollfus H, Hamel C, Loppönen T, Munier F, Santos L, Shalev S, Zafeiriou D, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J. Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy

- for molecular diagnosis. *Hum Mutat* 2004; 23:306-17. [PMID: 15024725]
13. Zhao Y, Hong DH, Pawlyk B, Yue G, Adamian M, Grynberg M, Godzik A, Li T. The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:3965-70. [PMID: 12651948]
  14. Narfstrom K, Ekesten B, Rosolen SG, Spiess BM, Percicot CL, Ofri R. Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Doc Ophthalmol* 2002; 105:83-92. [PMID: 12462438]
  15. Grayson C, Molday RS. Dominant negative mechanism underlies autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy linked to mutations in ELOVL4. *J Biol Chem* 2005; 280:32521-30. [PMID: 16036915]
  16. Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 1998; 46:327-34. [PMID: 9487114]
  17. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, Fujimoto JG. Optical coherence tomography. *Science* 1991; 254:1178-81. [PMID: 1957169]
  18. Fujimoto JG, Brezinski ME, Tearney GJ, Boppart SA, Bouma B, Hee MR, Southern JF, Swanson EA. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nat Med* 1995; 1:970-2. [PMID: 7585229]
  19. Kijas JW, Zangerl B, Miller B, Nelson J, Kirkness EF, Aguirre GD, Acland GM. Cloning of the canine ABCA4 gene and evaluation in canine cone-rod dystrophies and progressive retinal atrophies. *Mol Vis* 2004; 10:223-32. [PMID: 15064680]
  20. Ropstad EO, Bjerkas E, Narfstrom K. Electroretinographic findings in the Standard Wire Haired Dachshund with inherited early onset cone-rod dystrophy. *Doc Ophthalmol* 2007; 114:27-36. [PMID: 17180612]
  21. Beltran WA, Hammond P, Acland GM, Aguirre GD. A frameshift mutation in RPGR exon ORF15 causes photoreceptor degeneration and inner retina remodeling in a model of X-linked retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:1669-81. [PMID: 16565408]
  22. Galvin JA, Fishman GA, Stone EM, Koeneke RK. Evaluation of genotype-phenotype associations in leber congenital amaurosis. *Retina* 2005; 25:919-29. [PMID: 16205573]
  23. Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS, Sumaroka A, Schwartz SB, Roman AJ, Stone EM. Leber congenital amaurosis caused by an RPGRIP1 mutation shows treatment potential. *Ophthalmology* 2007; 114:895-8. [PMID: 17306875]
  24. Pawlyk BS, Smith AJ, Buch PK, Adamian M, Hong DH, Sandberg MA, Ali RR, Li T. Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:3039-45. [PMID: 16123399]

## **Appendix 1. Behavioral tests.**

Visual function was evaluated using behavioral testing based on the ability of each animal to avoid obstacles in normal light. The treated affected A2 avoided obstacles at the age of 8 months but consistently failed to avoid obstacles after

the age of 11 months, seen in the movie in [Appendix 1](#). To access the movie, click or select the words “[Appendix 1](#).” This will initiate the download of a compressed (.mov) archive that contains the movie.

## **2.1. Discussion du premier article : « The RPGRIP1 deficient dog, a promising canine model for gene therapy. »**

La caractérisation de la pathologie affectant le teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup> a été publiée en 2009 dans la revue internationale Molecular Vision, sous le titre : **The RPGRIP1 deficient dog, a promising canine model for gene therapy.**

L'amaurose congénitale de Leber est un type de rétinite pigmentaire particulièrement sévère aboutissant à la cécité infantile. Quatorze gènes connus sont actuellement responsables de 70% des cas d'amaurose congénitale de Leber, dont le gène RPGRIP1 responsable de environ 5% des cas. RPGRIP1 est une protéine localisée dans les cellules photoréceptrices rétiniennes et impliquée dans le transport des protéines du segment interne, où les biosynthèses sont effectuées, au segment externe où les molécules sont utilisées pour la cascade de phototransduction. RPGRIP1 joue également un rôle dans la morphogénèse des disques des segments externes (voir introduction).

Récemment, un nouveau modèle canin d'amaurose congénitale de Leber à transmission autosomale récessive à été découvert : le mini teckel à poils longs RPGRIP1-déficient. La mutation impliquée dans la dégénérescence rétinienne décrite chez ce chien a été caractérisée. Il s'agit d'une insertion de 44 paires de bases dans l'exon 2, engendrant un codon stop prématuré et une absence totale de protéine RPGRIP1 dans les photorécepteurs (Mellersh *et al.*, 2006).

En 2005, le LTG en collaboration avec Cathryn Mellersh, s'est procuré 4 individus RPGRIP1-déficients. Depuis, une colonie de teckels est développée dans le centre de thérapie génique et cellulaire de Boisbonne (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes). Parmi les chiots RPGRIP1-déficients nés dans notre centre, six ont été suivis cliniquement, depuis leur naissance et sur une période de 3 ans. L'évolution de la pathologie affectant le teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup> a été caractérisée grâce à une batterie d'examen non-invasifs (Turney *et al.*, 2007; Lheriteau *et al.*, 2009).

Dans l'étude que nous avons réalisée (Lheriteau *et al.*, 2009), la fonction rétinienne de 4 mini teckels à poils longs RPGRIP1<sup>-/-</sup> a été évaluée *in vivo* grâce à des électrorétinogrammes (ERG). Les tests de comportements permettent quant à eux d'évaluer la fonction visuelle des chiens. L'évolution de la vascularisation rétinienne est évaluée régulièrement grâce à une observation du fond d'œil (FO). Les examens de tomographie à cohérence optique (OCT) permettent d'évaluer l'épaisseur et la structure rétinienne. L'observation du cristallin permet de mettre en évidence l'opacité et la cataracte.

L'étude histologique effectuée sur les rétines des chiens RPGRIP1<sup>-/-</sup> (A6 à 2 mois, A1 à 11 mois, A2 à 28 mois et A5 à 10 ans) est composée d'une analyse de la structure rétinienne par coloration à l'hématoxyline-éosine-safran (HES), d'une détection des noyaux apoptotiques par la méthode enzymatique de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling), et enfin d'un marquage immunohistochimique des cônes et des bâtonnets.

#### **Etude *in vivo* : évaluation de la fonction rétinienne (ERG)**

Les ERG testant la fonction rétinienne des chiots ont montré que dès l'âge de 2 mois, les cônes n'étaient plus fonctionnels alors que les bâtonnets montraient une réponse électrique quasi-normale, mais cette fonction des bâtonnets diminue très rapidement et à l'âge de 9 mois l'ensemble des photorécepteurs rétiniens deviennent non fonctionnels.

#### **Etude *in vivo* : évaluation de la fonction visuelle (tests de comportements)**

La fonction visuelle de ces animaux a été évaluée grâce à des tests de comportement qui consistent à observer l'évolution du chien dans un parcours d'obstacle. On regarde si le chien se cogne contre les obstacles ou s'il les évite sans difficulté. Les tests comportementaux effectués sur les chiens RPGRIP1<sup>-/-</sup> ont confirmé une cécité totale à l'âge de 1 an. Le décalage temporel qui existe entre l'ERG plat et la cécité observée aux tests de comportements peut s'expliquer par le manque de sensibilité des ERG. En effet, il est possible qu'entre 9 et 12 mois quelques photorécepteurs soient encore fonctionnels mais que cela ne suffise pas à déclencher des réponses électriques enregistrables à l'ERG.

#### **Etude *in vivo* : évaluation de la vascularisation rétinienne (fonds d'oeil)**

Les photographies de fond d'œil effectuées toutes les trois semaines révèlent une forte diminution du calibre des vaisseaux rétiniens durant la première année de vie. Cette diminution peut s'expliquer par le fait qu'à un an, la rétine de ces chiens est devenue non fonctionnelle, elle n'a donc plus besoin d'être vascularisée. A un an, une hyper réflectivité du tapis est également observée. Le tapis ou tapetum lucidum est une couche réfléchissante située immédiatement à l'arrière de la rétine de l'oeil de nombreux vertébrés (chats, chiens,



cerfs, grands dauphins) qui leur permet d'augmenter, par réflexion, la quantité de lumière captée par la rétine. La vision des animaux possédant un tapis est ainsi améliorée sous faible luminosité. L'hyperréflexivité observée au fond d'œil chez nos teckels est due à l'amincissement de la rétine, qui ne masque plus le réfléchissement de la lumière.

#### **Etude *in vivo* : évaluation de la structure rétinienne (OCT)**

La tomographie à cohérence optique (OCT) est une sorte de scanner *in vivo* qui permet d'évaluer l'épaisseur et la morphologie de la rétine. Des OCT ont été réalisés régulièrement sur une période de 11 mois pour A1, 28 mois pour A2, et 36 mois pour A3 et A4. L'étude a montré une diminution progressive mais rapide de l'épaisseur de la rétine durant la première année, qui se poursuit par une diminution progressive beaucoup plus lente .

#### **Etude *in vivo* : évaluation de l'opacification du cristallin**

L'examen du cristallin a révélé un début d'opacification à partir de l'âge de 21 mois et une cataracte totale chez les animaux de 10 ans.

#### **Etude *post mortem* : analyse de la structure rétinienne (HES)**

Les marquages HES effectués sur les coupes d'yeux confirment la diminution, non seulement de l'épaisseur de la couche des photorécepteurs mais aussi de l'intégralité de la rétine durant les deux premières années avec une disparition complète de celle-ci à l'âge de 10 ans.

#### **Etude *post mortem* : marquage des noyaux apoptotiques (TUNEL)**

Les expériences de TUNEL ont révélé la présence de noyaux apoptotiques dans la couche des photorécepteurs à 2, 11 et 28 mois. A ces trois temps, le pourcentage de noyaux apoptotiques dans la couche des photorécepteurs reste constant, suggérant que la diminution d'épaisseur de la neurorétine est due à l'apoptose progressive des photorécepteurs.

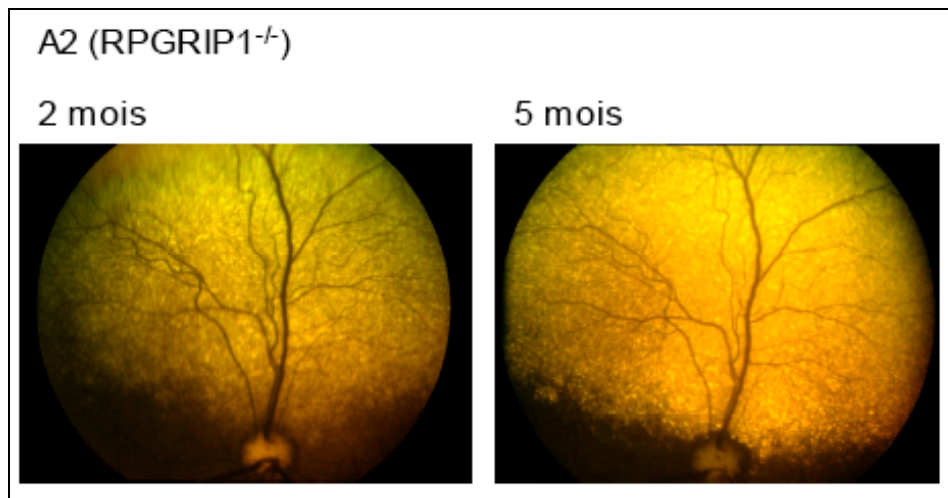
#### **Etude *post mortem* : marquage des cônes et des bâtonnets**

Les marquages immunohistochimiques des cônes et des bâtonnets chez le chiot de 2 mois (A6), montrent qu'à cet âge, les deux types de photorécepteurs sont présents malgré l'absence totale de fonction des cônes. Ces résultats montrent qu'à 8 ou 9 semaines un traitement par thérapie génique est envisageable puisque les cellules à cibler sont encore présentes.

Une autre étude de l'évaluation de la pathologie chez le teckel (Turney *et al.*, 2007) a mis en évidence des résultats similaires concernant l'évolution de la fonction rétinienne. Toutefois, les observations cliniques effectuées dans l'étude de Turney ont montré que le fond d'œil des animaux RPGRIP1<sup>-/-</sup> ne présentait aucune anomalie jusqu'à l'âge de 21 semaines (5 mois), ce qui est contradictoire avec les observations que nous avons faites puisqu'entre l'âge de 2 et 5 mois nous remarquons déjà une hyperréflexivité du tapis et une diminution du calibre des vaisseaux (Figure 23).

Pour conclure, notre étude (Lheriteau *et al.*, 2009) montre que le mini teckel à poils longs RPGRIP1-déficient souffre d'une atrophie progressive de la rétine affectant dans un premier temps les cônes puis dans un second temps les bâtonnets. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Curtis et Barnett qui décrivent une dystrophie bâtonnets-cônes chez le teckel (Curtis *et al.*, 1993). Les caractéristiques cliniques que nous avons pu mettre en évidence sont en accord avec le phénotype clinique des patients atteints d'amaurose congénitale de Leber due à un défaut dans le gène RPGRIP1. En effet, les patients montrent une dégénérescence précoce des cônes associée à une perte de la vision centrale et des couleurs dès la naissance dans les cas d'ACL. Le second stade de la maladie étant la perte de la vision nocturne et de la vision périphérique aboutissant à la cécité. A l'âge adulte, le fond d'œil révèle une diminution importante du calibre des vaisseaux rétiens, la présence de dépôts pigmentaires et une pâleur papillaire. L'ERG est quant à lui plat (Dryja *et al.*, 2001).

Ce modèle canin est donc un bon modèle pré-clinique pour l'évaluation de la thérapie génique via des vecteurs AAV recombinants. La précocité des symptômes et la rapidité d'évolution de la pathologie montrent que la fenêtre thérapeutique optimale est très courte et qu'il sera nécessaire de traiter ces animaux aussi vite que possible après la naissance si l'on veut espérer maintenir la fonction des bâtonnets à long terme et peut-être restaurer la fonction des cônes. Des essais d'injections sous-rétiennes de liquide physiologique ophtalmologique chez le chien A5 ont prouvé qu'il était possible de traiter ces animaux à l'âge de deux mois sans altérer la fonction rétinienne et la morphologie de la rétine.



**Figure 23 : Fond d'œil de A2 à 2 et 5 mois.**

Les photographies de fond d'œil réalisées chez le chien A2 RPGRIP1<sup>-/-</sup> à l'âge de 2 et 5 mois montrent que dès 5 mois, le calibre des vaisseaux rétiniens est diminué et une hyperréflexivité du tapis dû à un amincissement de la rétine est observé.

## **2.2. Résultats complémentaires : transfert de gène chez le teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup>.**

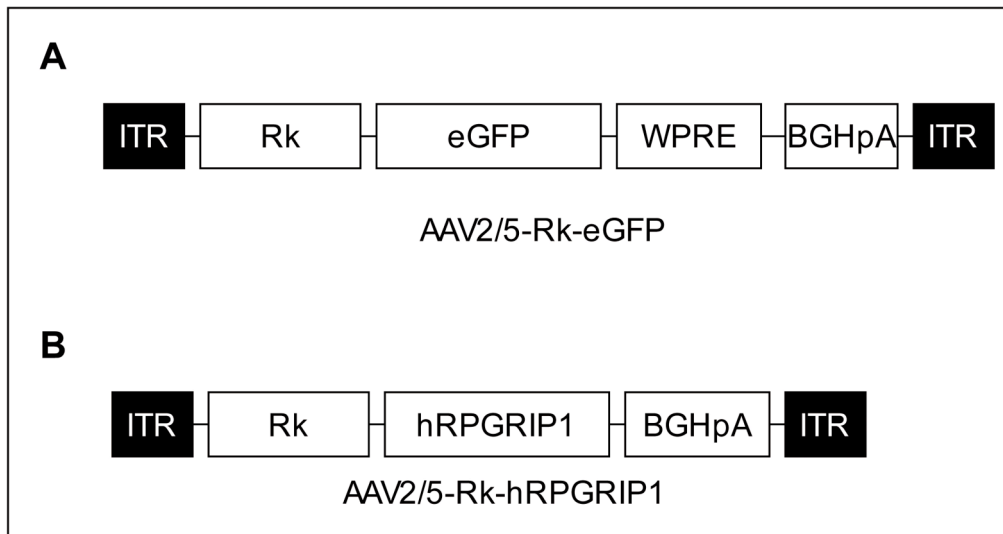
L'étude précédente (Lheriteau *et al.*, 2009) avait permis de déterminer la fenêtre thérapeutique de traitement chez le teckel RPGRIP1-déficient. La précocité et la rapidité d'évolution des symptômes nous permettaient de penser qu'un traitement par thérapie génique à l'âge de 8 ou 9 semaines serait optimal chez ce chien.

### **Choix du vecteur et du promoteur**

Afin de pouvoir effectuer un traitement par thérapie génique d'addition, un vecteur AAV recombinant ciblant spécifiquement les photorécepteurs a dû être développé. En effet, la protéine RPGRIP1 est une protéine de structure spécifique de ces cellules. Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser un vecteur AAV2/5 car il permet de transduire les photorécepteurs et les cellules de l'EPR. Malheureusement, il n'existe pas à l'heure actuelle de vecteur ne transduisant que les photorécepteurs. En se basant sur les résultats publiés précédemment (Young *et al.*, 2003; Khani *et al.*, 2007), nous avons ensuite choisi d'utiliser le promoteur humain de la rhodopsine kinase (Rk) car il permet une expression du transgène exclusivement dans les photorécepteurs. Pour finir, nous avons choisi le transgène rapporteur de la GFP (green fluorescent protein). En effet, cette protéine est idéale dans la rétine car elle est visible *in vivo* par simple photographie de fond d'œil en utilisant une longueur d'onde adaptée. Le tropisme des vecteurs AAV2/5-Rk-eGFP (Figure 24-A) pour les photorécepteurs rétiniens a été testé chez le rat et chez le chien.

### **Evaluation du tropisme du vecteur AAV2/5-Rk-eGFP chez le rat**

Lors de l'injection sous-rétinienne chez le rat, de la fluorescéine est ajoutée à la solution de vecteur afin de visualiser la surface rétinienne décollée par la bulle (Figure 25-A). La fluorescéine disparaît en 24 heures et le signal fluorescent spécifique de la GFP peut alors être observé *in vivo* (Figure 25-B, C, D). L'évaluation du signal GFP montre que la protéine issue du transgène est produite en grande quantité dès 2 semaines après l'injection (Figure 25-B) et que ce signal reste stable dans le temps (Figure 25-C: 4 semaines post-injection, Figure 25-D : 6 semaines post-injection). Le signal observé se superpose parfaitement avec la surface de la bulle d'injection, indiquant que ni le vecteur, ni la protéine ne diffuse au delà des cellules transduites.



**Figure 24 : Vecteurs AAV2/5-Rk-eGFP et AAV2/5-Rk-hRPGRIP1.**

**(A)** Le plasmide SSV9-Rk-eGFP-WPRE-BGHpA a été obtenu en remplaçant le promoteur humain long RPE65 (phIRPE65) par le promoteur humain Rhodopsine kinase (Rk) provenant du plasmide pXP1-Rk-luc-pA (donné par S. Khani) dans le plasmide SSV9-phIRPE65-eGFP-WPRE-BGHpA (LTG).

**(B)** Le plasmide SSV9-Rk-hRPGRIP1-BGHpA a été obtenu en remplaçant le fragment eGFP-WPRE par l'ADNc RPGRIP1 humain provenant du plasmide pCMV6XL5-hRPGRIP1 (Origene) dans le plasmide SSV9-Rk-eGFP-WPRE-BGHpA.

Après euthanasie des rats injectés, énucléation, fixation des yeux, congélation et coupes au cryostat, la localisation cellulaire de la GFP produite a été observée directement au microscope à fluorescence (Figure 25-E, F). Le signal GFP est observé dans les photorécepteurs uniquement (Figure 25-E). Aucun signal n'a été détecté ni dans les cellules de l'EPR, ni hors de la bulle (Figure 25-F). Le tropisme du vecteur AAV de sérotype 5 associé au promoteur de la rhodopsine kinase humaine pour les photorécepteurs a été validé chez le rat.

### **Evaluation du tropisme du vecteur AAV2/5-Rk-eGFP chez le chien**

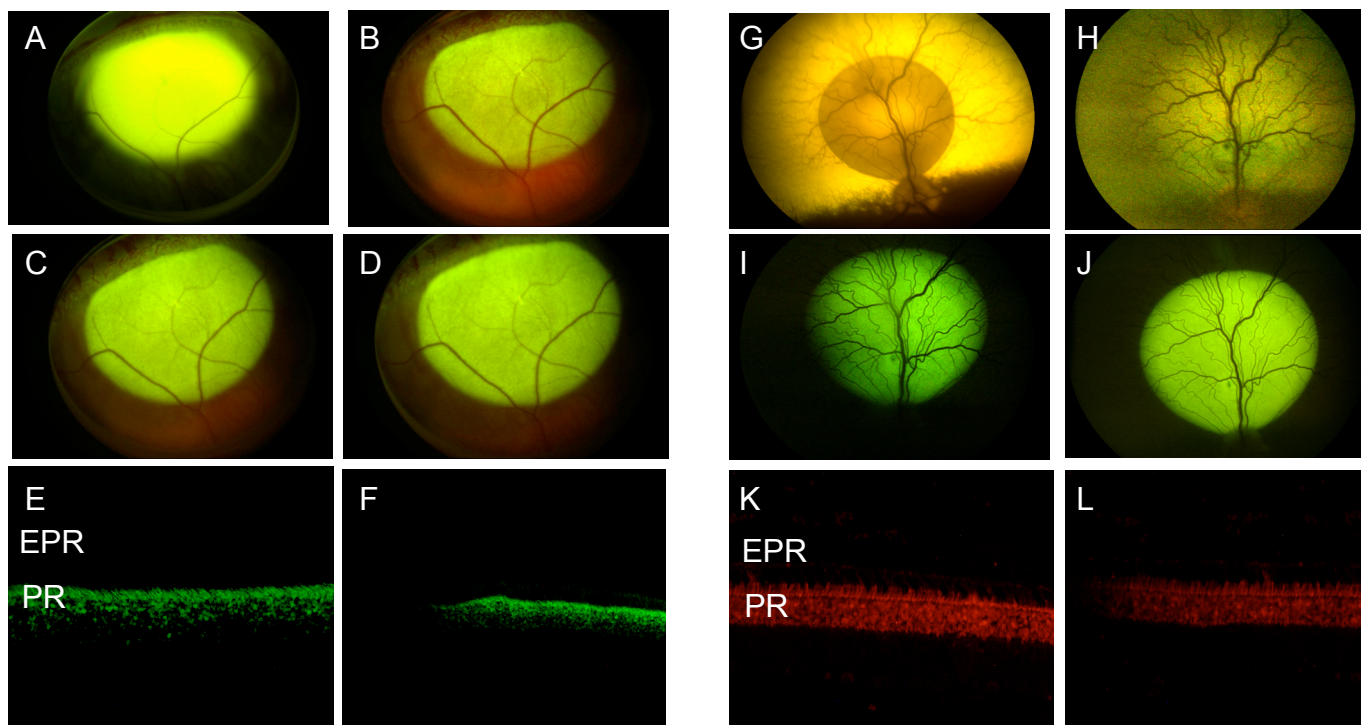
Le même vecteur a ensuite été injecté en sous-rétinien chez le chien beagle. Contrairement au protocole opératoire utilisé chez le rat, chez le chien la solution de vecteur injecté ne contient pas de fluorescéine car le décollement rétinien est directement visible au microscope opératoire (Figure 25-G : fond d'œil post opératoire). L'évaluation *in vivo* du signal GFP chez le chien a montré une forte fluorescence dès 7 jours post-injection (Figure 25-H), qui augmente durant le premier mois (Figure 25-I) puis reste stable sur une période d'un an (Figure 25-J).

Après euthanasie de l'animal et énucléation, l'œil a été fixé à l'acide picrique (liquide de Bouin) et des coupes ont été effectuées. Avec cette technique de fixation, le signal GFP n'est pas visualisable directement au microscope à fluorescence car le liquide de Bouin entraîne une auto-fluorescence trop importante. Des marquages anti-GFP ont donc été effectués (Figure 25-K, L) et ont montré que la protéine transgénique n'était présente que dans les photorécepteurs situés sous la bulle d'injection.

Ces expériences valident le tropisme spécifique du vecteur pour les photorécepteurs chez le chien.

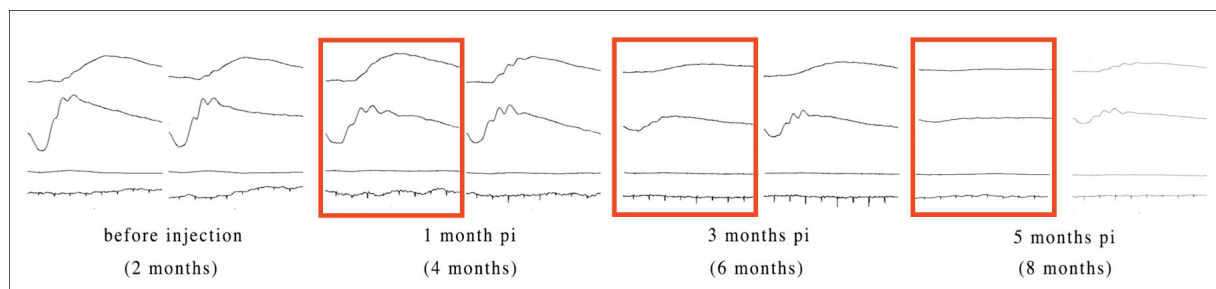
### **Evaluation de l'efficacité du vecteur portant l'ADNc RPGRIP1 humain**

Dans un second temps, le transgène eGFP a été remplacé par l'ADNc RPGRIP1 humain (ADNc commercialisé chez Origene) dans le vecteur AAV2/5-Rk-eGFP (Figure 24-B). Ce vecteur portant le gène humain a été injecté en sous-rétinien chez 4 teckels RPGRIP1<sup>-/-</sup> âgés de 2 mois. Des ERG ont ensuite été réalisés régulièrement. Malheureusement, quelques semaines après l'injection, l'amplitude de l'ERG de l'œil traité a chuté brutalement par rapport à l'œil contrôle et les oscillations représentatives du passage du signal électrique dans les différentes couches neuronales ont été modifiées. Ces résultats montrent que le vecteur portant le gène RPGRIP1 humain ne stabilise pas la vision et engendre en outre des effets délétères (Figure 26).



**Figure 25 : Tropisme du vecteur AAV2/5-Rk-eGFP chez le rat et le chien.**

Le vecteur AAV2/5-Rk-eGFP-WPRE-BGHpA a été injecté en sous-rétinien chez le rat (A, B, C, D, E, F) et le chien (G, H, I, J, K, L). Le signal GFP est observé in vivo au fond d'œil (B, C, D et H, I, J) puis les animaux sont euthanasiés et une étude histologique permet de localiser précisément la GFP dans la rétine (E, F et K, L). **(A)** Chez le rat, de la fluorescéine est ajoutée à la solution de vecteur afin de visualiser la bulle d'injection. **(B)** Apparition d'un signal GFP 2 semaines post-injection chez le rat. **(C)** Signal GFP 4 semaines post-injection chez le rat. **(D)** Signal GFP 6 semaines post-injection chez le rat. **(E)** Le signal GFP est observé en direct au microscope à fluorescence inversé, la GFP est localisée dans les photorécepteurs et pas dans les cellules de l'EPR. **(F)** Le signal GFP n'est observé qu'au niveau de l'espace sous-rétinien décollé par la bulle d'injection. **(G)** Chez le chien, l'espace sous-rétinien décollé par la bulle est observée en effectuant une photographie de fond d'œil quelques minutes après l'injection. **(H)** Apparition d'un signal GFP 1 semaine post-injection chez le chien. **(I)** Signal GFP 4 semaines post-injection chez le chien. **(J)** Signal GFP 12 mois post-injection chez le chien. **(K)** Le signal GFP est observé après marquage immuno-histochimique, la GFP est localisée dans les photorécepteurs et pas dans les cellules de l'EPR. **(L)** Le signal GFP n'est observé qu'au niveau de l'espace sous-rétinien décollé par la bulle d'injection.



**Figure 26 : Cinétique des profils ERG après injection d' AAV2/5-Rk-hRPGRIP1.**

Un chien RPGRIP1<sup>-/-</sup> a été injecté avec le vecteur thérapeutique à l'âge de 8 semaines. Les profils ERG réalisés après injection montrent que dans l'œil droit traité, non seulement la fonction des bâtonnets n'a pas été préservée, l'amplitude de l'ERG de l'œil traité a chuté brutalement par rapport à l'œil contrôle mais en outre les oscillations représentatives du passage du signal électrique dans les différentes couches neuronales ont été modifiées.



Un certain nombre d'éléments nous permet d'affirmer que ces effets délétères ne sont pas dûs à la chirurgie. En effet, un des chiot suivi pour l'étude sur l'évolution de la maladie avait reçu des injections sous-rétiniennes de solution saline à l'âge de 2 mois, et ses profils électrorétinographiques n'en avaient pas été affectés (Figure 27C). De plus, les angiographies à la fluorescéine montrent que la vascularisation rétinienne n'est pas altérée par la chirurgie (Figure 27A) et les OCT effectués avant et après l'injection sous-rétinienne montrent que la structure rétinienne n'est pas non plus altérée (Figure 27B).

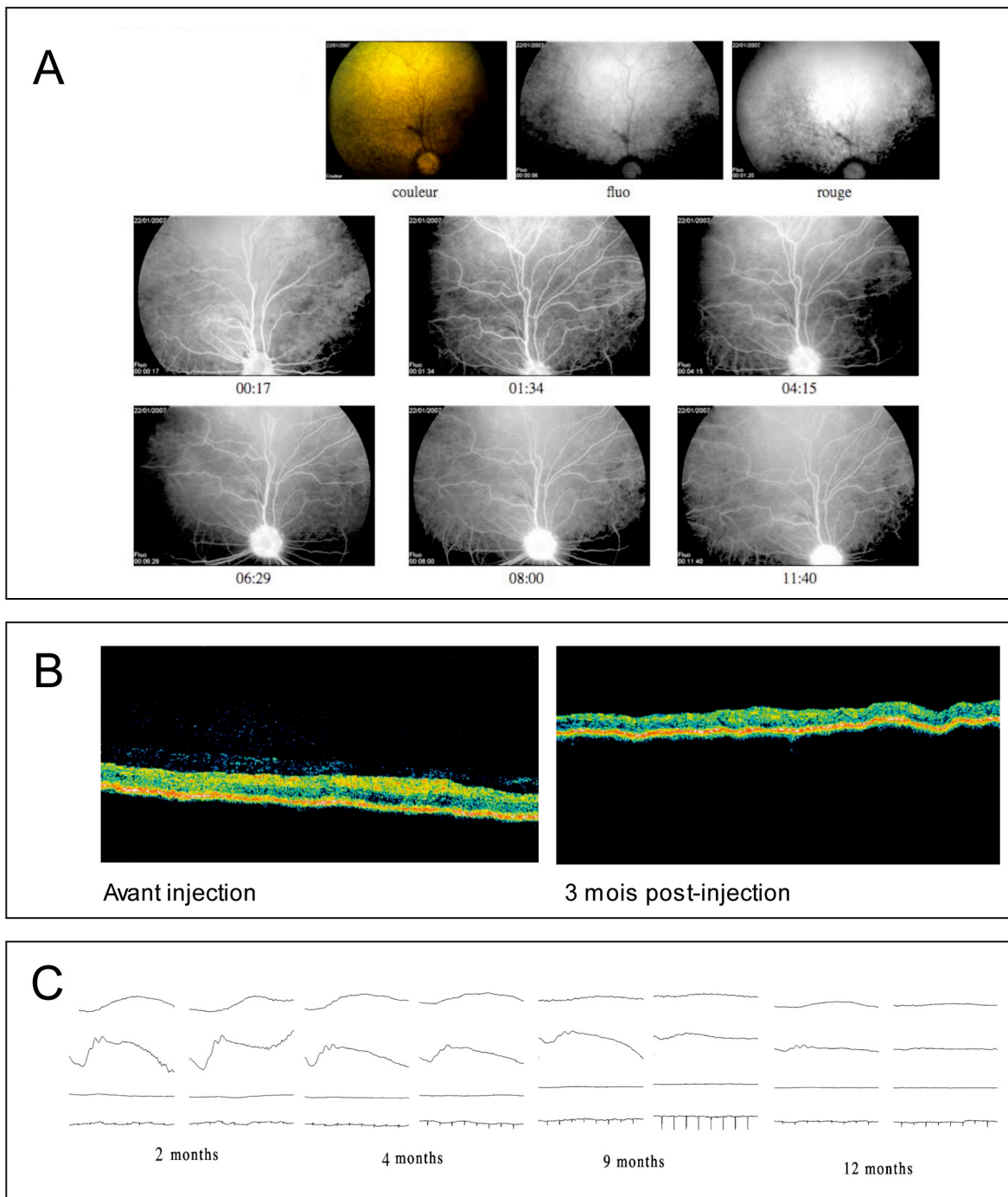
L'hypothèse que nous avons alors formulée était que les effets délétères engendrés par le vecteur étaient dus à un manque d'homologie entre la séquence RPGRIP1 humaine et la séquence RPGRIP1 canine. La séquence du gène RPGRIP1 canin n'étant pas connue (nous ne disposons que de séquences prédites par bioinformatique), une cause possible de cet échec pourrait être que les domaines de liaison entre RPGR et RPGRIP1 ne soient pas conservés entre les espèces. Dans ce cas, la protéine RPGRIP1 humaine issue du transgène ne permettrait pas à la protéine RPGR canine endogène de se lier et de jouer son rôle correctement.

L'étape suivante du projet a donc été de cloner l'ADNc RPGRIP1 canin à partir d'ARN messagers (polyA) extraits de rétines de chiens sains.

### **Stratégie de clonage de l'ADNc RPGRIP1 canin**

Les séquences canines du gène et de l'ARN messager RPGRIP1 n'étant pas connues, les séquences putatives ainsi que les séquences connues chez l'Homme, le singe, la souris et le rat ont été alignées. Avec l'aide du laboratoire de Génétique et développement de Rennes et plus particulièrement d'un bioinformaticien Richard Guyon, nous avons pu générer une séquence « de travail ». Malheureusement cette séquence ne comprenait que la partie interne de l'ADNc canin et n'englobait ni le codon initiateur ni le codon stop et le signal de polyadénylation.

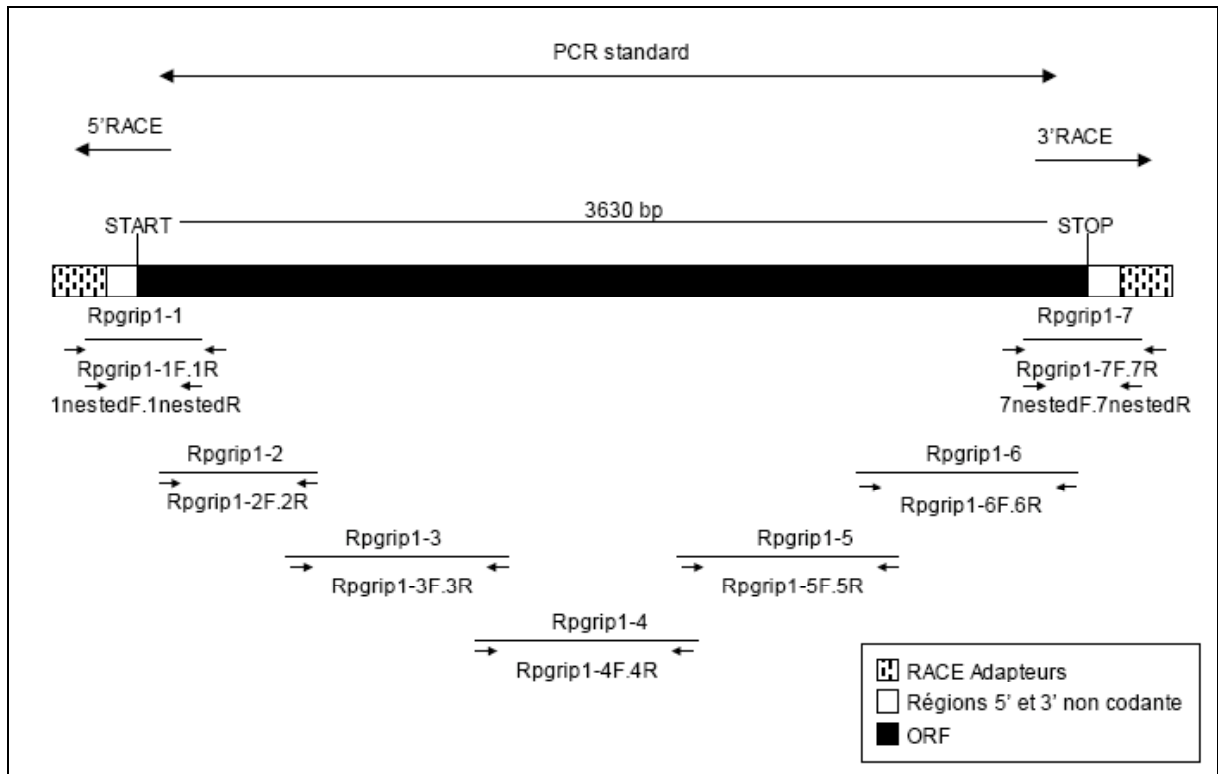
Dans le but d'amplifier la totalité de l'ADNc RPGRIP1 canin, des amorces de PCR (Polymerase chain reaction) ont été sélectionnées dans les zones conservées entre notre séquence de travail et les différentes espèces citées précédemment.



**Figure 27 : Examens cliniques post-opératoires.**

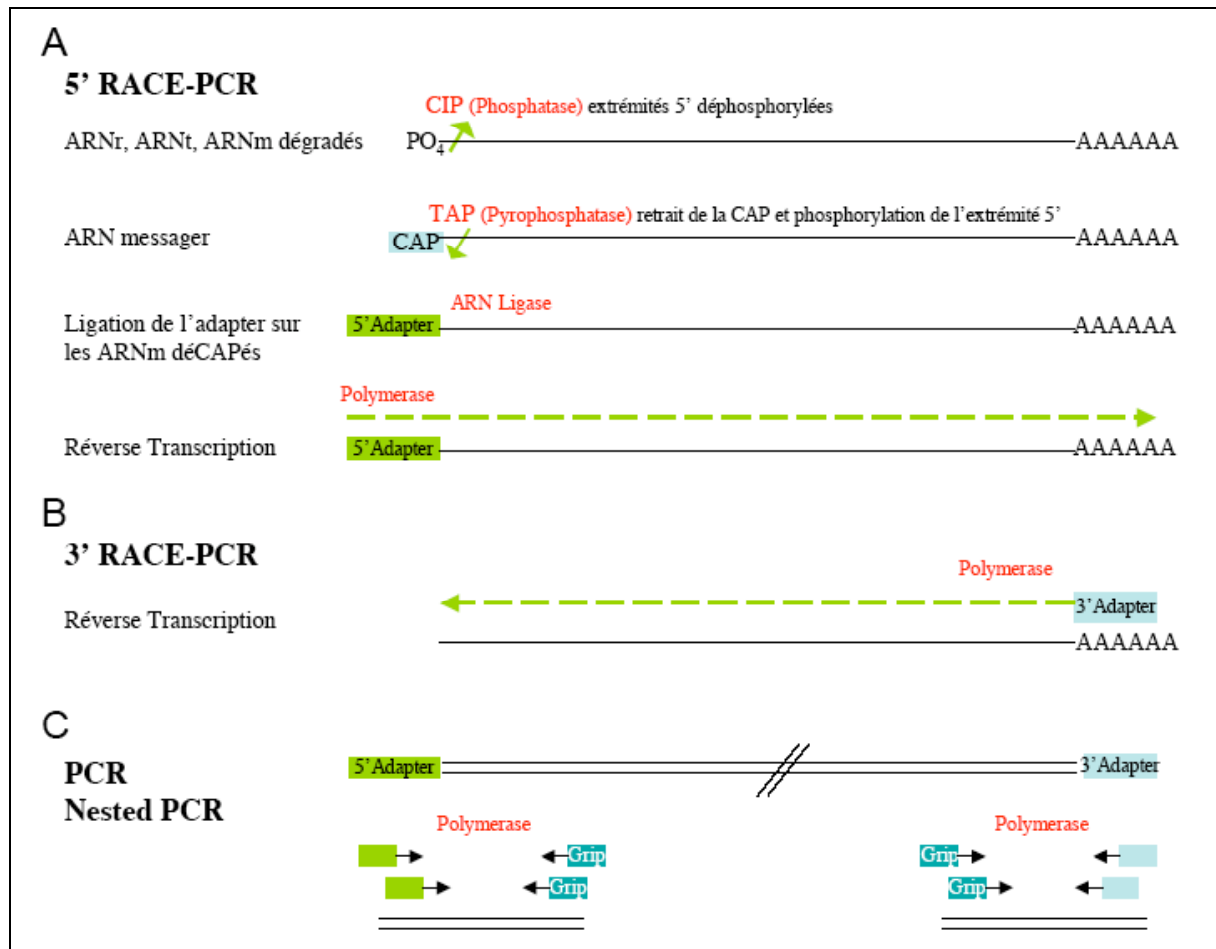
(A) L'angiographie à la fluorescéine réalisée après l'injection du vecteur thérapeutique n'a révélé aucune lésion rétinienne ou choroïdienne. (B) L'OCT réalisé 3 mois post-injection n'a pas montré d'amincissement de la rétine en comparaison des examens réalisés avant le traitement. (C) Le chien qui a subi une injection sous-rétinienne de solution saline n'a pas vu ces profils ERG affectés après le traitement.





**Figure 28 : Stratégie de clonage du gène RPGRIP1 canin.**

Cinq couples d'amorces ont été sélectionnés pour amplifier la partie interne de l'ADNc par PCR classique tandis que les deux extrémités N-terminale et C-terminale de séquences inconnues devaient être générées par RACE-PCR. Cette technique est basée sur l'ajout d'adapteurs de séquences connues aux extrémités de l'ADNc.



**Figure 29 : Principe de la RACE-PCR.**

**(A) 5' RACE-PCR.** Les ARN totaux sont traités à la CIP ce qui déphosphoryle les extrémités des ARN ne possédant pas de coiffe (ARNr, ARNt, ARNm non matures). Ils subissent ensuite un traitement à la TAP qui clive la coiffe des ARNm matures et ajoute un phosphate en 5'. Un adapteur est ensuite ligué sur les ARNm matures déCAPés. Une réverse-transcription est effectuée en utilisant des amorces sélectionnées dans l'adapteur. **(B) 3' RACE-PCR.** Une réverse-transcription est effectuée sur les ARN totaux en utilisant comme amorce un adapteur se fixant sur la queue polyA des ARNm matures. **(C)** A partir des ADNc synthétisés en (A) et (B), les extrémités de notre ADN aux séquences inconnues sont polymérisées en effectuant des PCR utilisant une amorce dans l'adapteur et une amorce dans la partie interne du gène dont la séquence est connue. Des PCR internes sont ensuite effectuées (nested PCR) afin d'augmenter la quantité de produit de PCR et de s'affranchir des faux-positifs.

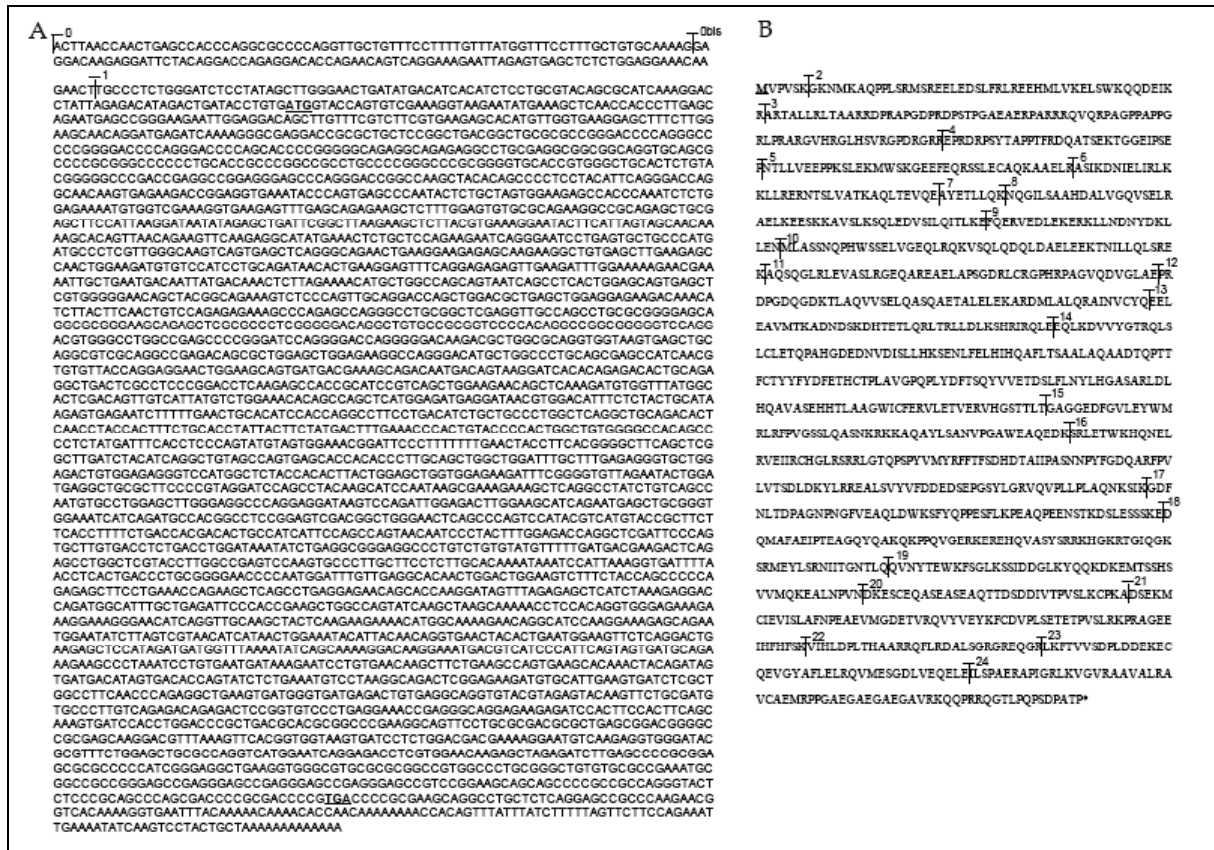
L'ADNc obtenu comprend une séquence 5' non codante (UTR, untranslated region) de 262 pb, un cadre ouvert de lecture de 3630 pb initié par un codon méthionine ATG et terminé par un codon stop TGA, et une séquence 3' non codante de 158 pb comprenant un signal de polyadénylation non canonique 65 nucleotides après le codon stop (AACAAA) (Figure 30-A). À partir de la séquence codante identifiée, nous avons pu déduire la séquence protéique (Figure 30-B).

### **Organisation génomique de l'ADNc RPGRIP1 canin**

Nous avons ensuite aligné notre séquence d'ADNc RPGRIP1 canine avec la zone correspondante sur le chromosome 15 canin. La corrélation s'est révélée être complète. Des analyses supplémentaires ont montré que les sites d'épissages de début et de fin d'exon étaient parfaitement déterminés (Tableau 4). Les exons et les introns ont ainsi pu être localisés sur les séquences nucléotidiques et protéiques (Figure 30).

### **Comparaison de la séquence canine avec ses orthologues**

La comparaison de notre ADNc canin avec ses orthologues bovin, humain, murin et rat a permis de mettre en évidence deux clusters sur l'arbre phylogénétique (Figure 31). Un premier cluster composé des séquences rongeurs et un second comprenant les séquences canines, humaines et bovines. L'analyse des pourcentages d'homologie des séquences nucléotidiques de ces 5 espèces a confirmé cette tendance (Tableau 5). De plus la comparaison de la structure exons/introns des gènes canins, humains et bovins a montré une forte similarité entre ces trois gènes (Figure 32).



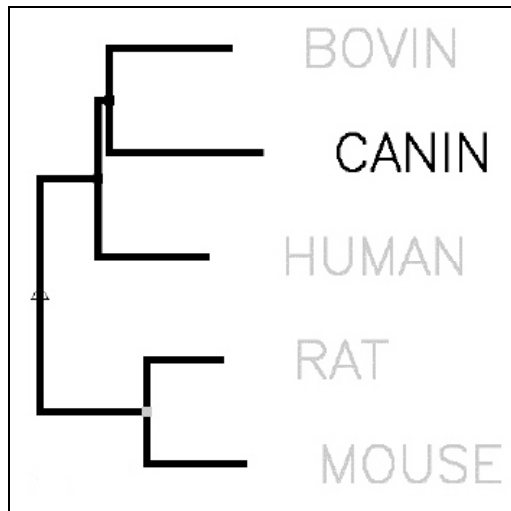
**Figure 30 : Séquence nucléotidique (A) et protéique (B) du gène RPGRIP1 canin.**

(A) Sur la séquence nucléotidique de l'ADNc RPGRIP1 canin, les exons non-codant (0) et (0bis) ainsi que le début du premier exon codant (1) sont indiqués. Le codon start (ATG) et le codon stop (TGA) sont indiqués en gras et soulignés. (B) Sur la séquence protéique de l'ADNc RPGRIP1 canin est indiqué la position des exons 1 à 24.

Exon n°	Taille de l'exon (bp)	Séquence acceptrice	Séquence donneuse	Intron n°	Taille de l'intron (bp)
0	79	ND	CAAAAGgtttgt	0-0bis	14749
0bis	85	agccagGAGGAC	AGAACTgtaagt	0bis-1	6727
1	120	tccagTGCCCT	CGAAAGgtaaat	1-2	8087
2	133	cttagGTAAGA	CAAAAGgtacct	2-3	3901
3	224	tcacagGGCGAG	GGAGGGgtgagt	3-4	939
4	91	tccagAGCCCA	TGAGCCgtgagt	4-5	968
5	114	gaccagCAATAC	GCTGCGgtaaga	5-6	1891
6	106	tccagAGCTTC	CAAGAGgtgagg	6-7	3657
7	24	tccagGCATAT	CAGAAGgtactt	7-8	1075
8	147	ccccagAATCAG	AAGGAGgtaaat	8-9	476
9	74	tcttagTTTCAG	AGAAAgtgagt	9-10	3133
10	146	tcccagCATGCT	AGAAAGgtaggt	10-11	3048
11	140	ccccagCCCAGA	GCCGAGgtaaga	11-12	134
12	144	ccgcagCCCCGG	TACCAGgtgtgg	12-13	458
13	118	tccagGAGGAA	TGAAGgtattt	13-14	2233
14	453	ctctagAACAGC	TACTGgtaagt	14-15	161
15	152	atccagGAGCTG	GATAAGgtgaga	15-16	441
16	343	tccagTCCAGA	TTAAAGgtggga	16-17	1203
17	162	taccagGTGATT	AAAGAGgtaaag	17-18	330
18	203	atttagGACCAG	TTACAAgtaagg	18-19	1819
19	139	ctaaagCAGGTG	TGAATGgtattg	19-20	10713
20	98	ttgcagATAAAG	AAGGCAGtaagt	20-21	4901
21	193	tgccagGACTCG	GCAAAGgtgacg	21-22	5766
22	85	gcccagTGATCC	AGGACGgtaagg	22-23	2667
23	125	cttagTTTAAA	TAGAGAgtagt	23-24	2127
24	344	ccgcagTCTTGA	ND	ND	ND

Tableau 4 : Structure exons/introns du gène RPGRIP1 canin.



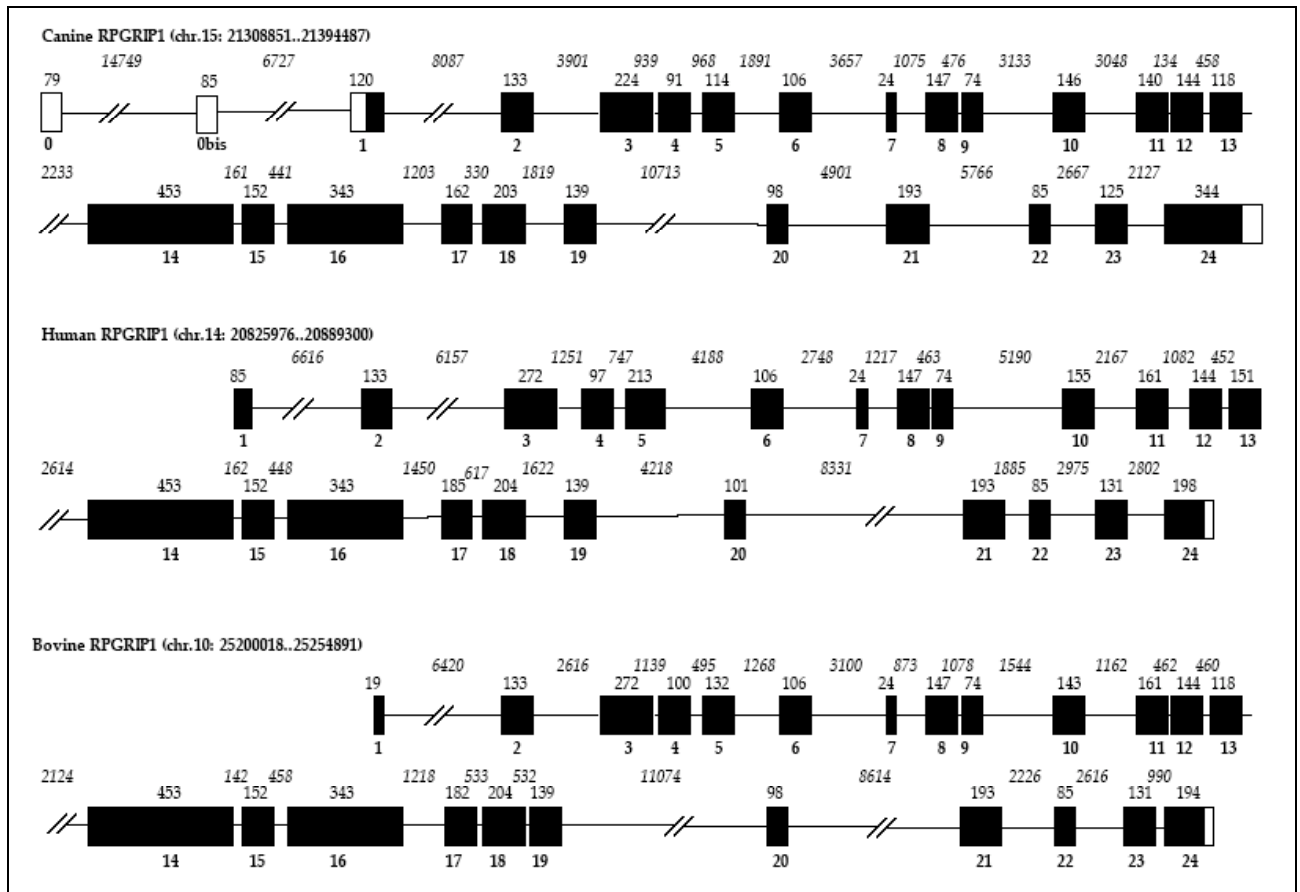


**Figure 31 : Arbre phylogénétique.**

L'arbre phylogénétique effectué à partir des séquences nucléotidiques des gènes RPGRIP1 bovin, canin, humain, rat et murin montre que le gène canin possède une structure proche de celle des gènes bovin et humain. Les gènes rat et souris appartiennent à un autre cluster.

	Séquence canine	Séquence humaine	Séquence bovine	Séquence murine	Séquence rat
Séquence humaine	66,8%	100%	75,4%	53,9%	55,5%
Séquence bovine	69,0%	75,4%	100%	49,1%	47,9%
Séquence murine	45,5%	53,9%	49,1%	100%	70,3%
Séquence rat	52,0%	55,5%	47,9%	70,3%	100%

**Tableau 5 : Homologies de séquence des orthologues RPGRIP1.**



**Figure 32 : Structure génomique de RPGRIP1 chez l'homme, la vache et le chien.**

Les cadres blancs représentent les exons non codants, les cadres noirs les exons codants, les introns sont symbolisés par les lignes horizontales qui relient les exons. La taille en paires de bases des exons et des introns (en italique) est indiquée au-dessus de ceux-ci, le numéro de chaque exon est indiqué en dessous de ceux-ci. La structure exon-intron du gène RPGRIP1 canin est très proche de la structure des gènes RPGRIP1 humain et bovin.

### **Clonage de l'ADNc complet dans un plasmide d'expression**

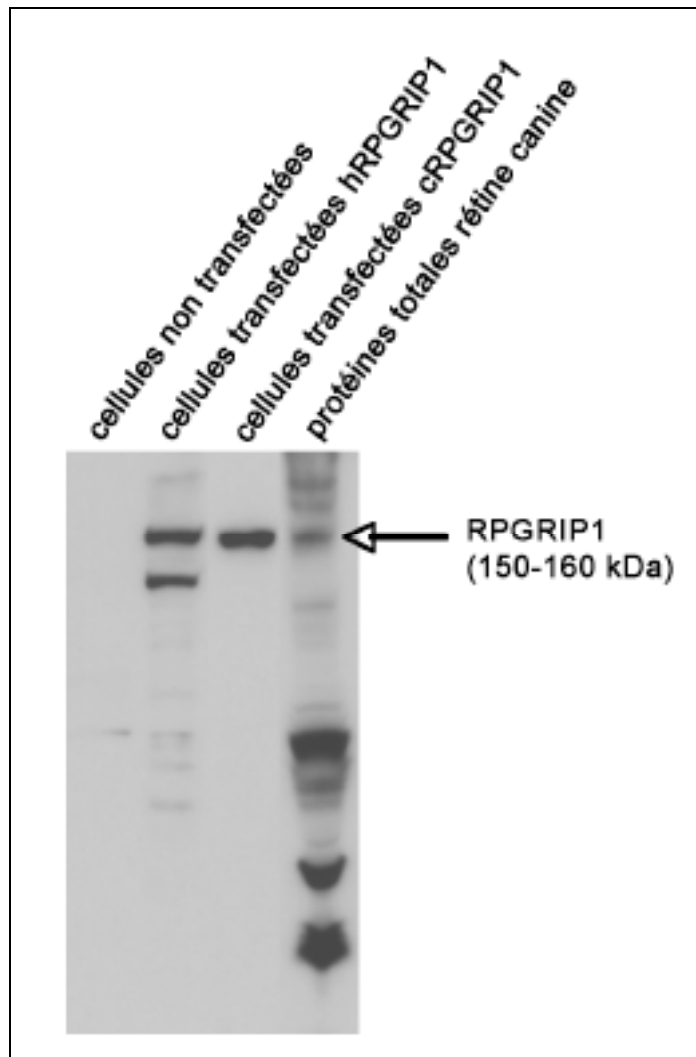
Les 7 fragments obtenus par PCR ont ensuite été mis bout à bout par stratégie enzymatique puis l'ORF complet a été cloné dans un plasmide d'expression sous le contrôle du promoteur CMV. La totalité de l'ORF a été séquencée et n'a pas révélé de mutations.

### **Evaluation de l'ADNc RPGRIP1 canin *in vitro***

L'expérience a ensuite consisté à transfecter des cellules HEK293 avec ce plasmide pCMV-RPGRIP1c et avec un plasmide équivalent portant l'ADNc humain pCMV-RPGRIP1h. Les contrôles utilisés étaient des cellules non transfectées (contrôle négatif) et des extraits protéiques de rétine canine saine (contrôle positif). Quarante-huit heures après la transfection, les protéines totales ont été extraites des cultures cellulaires. Un western blot a alors été réalisé dans le but de mettre en évidence la protéine RPGRIP1 dans les différents extraits cellulaires. Pour cela nous avons utilisé des anticorps anti-RPGRIP1 murin gracieusement donné par Tiansen Li. Le western blot a révélé la présence en quantité importante d'une protéine spécifique RPGRIP1 d'environ 150-160 kDa dans les extraits des cellules transfectées avec les plasmides humains et canins et dans les extraits de rétine canine (Figure 33).

Ces résultats montrent que l'ADNc que nous avons cloné code pour une protéine canine transgénique qui a approximativement la même taille que la protéine transgénique humaine et que la protéine endogène canine (extraite de rétine de chien sain) et qui est reconnu spécifiquement par les anticorps anti-RPGRIP1.

Les extraits protéiques issus de la transfection par le plasmide portant l'ADNc humain de chez Origene montre, outre la bande attendue à 150 kDa, une bande supplémentaire à environ 110 kDa. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer la présence de cette bande supplémentaire. Tout d'abord, la protéine RPGRIP1 est connue pour être instable une fois produite, elle est extrêmement sensible à la protéolyse spécifique et non spécifique (Lu *et al.*, 2005b). De plus, une étude menée chez le bœuf a montré que la première étape de la protéolyse dans la rétine de bœuf était le clivage d'un fragment de 35 kDa en N-terminal de l'isoforme majoritaire de 175 kDa (Roepman *et al.*, 2000). Le clivage d'un fragment équivalent à partir de notre isoforme humaine d'environ 150 kDa pourrait aboutir à un fragment d'environ 115 kDa. Nous pensons donc que la deuxième bande observée en western blot peut être un produit de protéolyse.



**Figure 33 : Western Blot anti-RPGRIP1.**

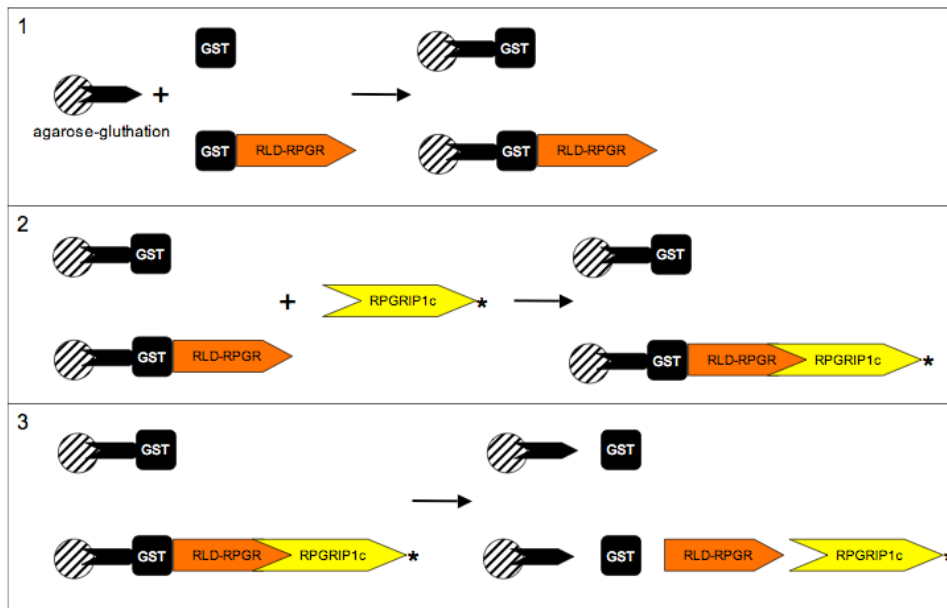
Les dépôts qui composent ce western blot sont les suivants : sur la première piste, les protéines extraites de cellules HEK293 non transfectées (témoin négatif), sur la deuxième piste, les protéines extraites de cellules HEK293 transfectées avec le plasmide portant l'ADNc RPGRIP1 humain, sur la troisième piste, les protéines extraites de cellules HEK293 transfectées avec le plasmide portant notre ADNc RPGRIP1 canin, sur la quatrième piste, les protéines extraites d'une rétine de chien sain (témoin positif). Après hybridation avec des anticorps anti-RPGRIP1, nous observons qu'aucune bande n'est révélée sur le témoin négatif, et qu'une bande spécifique de RPGRIP1 apparaît à 150-160 kDa sur les trois autres pistes (protéine humaine recombinante, protéine canine recombinante, protéine canine endogène).

Grâce à la collaboration avec Aziz El-Amraoui du laboratoire de Génétique et Physiologie de l'Audition de l'Institut Pasteur, nous avons également pu mettre en évidence l'interaction *in vitro* entre notre protéine RPGRIP1 canine recombinante et la région conservée N-terminale de RPGR (RLD), qui intéragit avec RPGRIP1 (Figures 34-A et 34-B).

Les protéines RPGRIP1c, GST et GST-RPGR sont produites et purifiées.

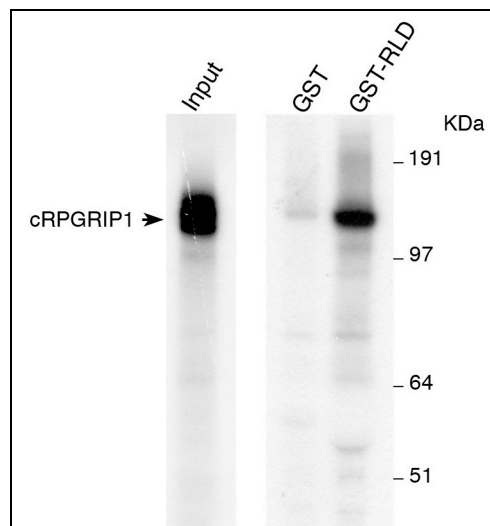
La GST (Glutathion-S-Transferase) est une enzyme qui fixe le glutathion. Cette protéine est largement utilisée en biologie moléculaire pour la fabrication de protéines de fusion. Le test de liaison directe *in vitro* consiste à mettre en contact une suspension de billes d'agarose couplées au glutathion avec d'une part une protéine de fusion composée de l'appât (dont on cherche les partenaires moléculaires) couplé au GST (ici RPGR-GST), et d'autre part l'enzyme GST seule (Figure 34-A, 1). La protéine de fusion comme la GST seule, vont s'accrocher aux billes d'agarose par liaison de la GST avec le glutathion. On incube ensuite cette résine chargée avec la molécule « cible » marquée, ici la protéine recombinante RPGRIP1c (marquée au soufre 35). Les billes chargées avec le RPGR-GST vont accrocher le RPGRIP1c tandis que les billes chargées avec le GST seul ne fixeront pas la protéine RPGRIP1c (Figure 35-A, 2). Après plusieurs lavages qui permettent d'éliminer les molécules non fixées à la résine, l'éluat aboutit à la dissociation des liaisons glutathion-GST mais également à la dissociation des liaisons entre « appâts » et « cibles ». L'éluat que l'on récupère est une solution contenant les différents éléments retenus sur la résine, séparés les uns des autres (Figure 34-A, 3).

La révélation de la radioactivité se fait en déposant les extraits protéiques sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE dénaturant. La protéine RPGRIP1c marquée au soufre 35 est déposée seule sur gel pour servir de contrôle positif de la réaction de révélation (Input). Les extraits protéiques issus du test de liaison *in vitro* sont également déposés sur le gel. La première piste de la figure 34-B donne la taille de la protéine recombinante RPGRIP1 canine produite à partir de l'ADNc canin cloné, la seconde piste montre que la protéine RPGRIP1c ne peut pas se fixer de façon non spécifique aux billes d'agarose sans la présence de RPGR, enfin la troisième piste montre que notre protéine RPGRIP1c se lie à la partie N-terminale de RPGR *in vitro*. Ces résultats sont très encourageants mais malheureusement, il ne démontrent en rien la fonctionnalité de cette protéine recombinante *in vivo*.



**Figure 34A : Test de liaison *in vitro*.**

(1) Une suspension de billes d'agarose couplées au glutathion est incubée avec de la GST ou une protéine de fusion composée de la partie RLD de RPGR couplée au GST. (2) On incube ensuite cette résine chargée avec la protéine recombinante RPGRIP1c marquée au soufre 35. (3) Après plusieurs lavages, l'éluat aboutit à la dissociation des liaisons glutathion-GST mais également à la dissociation des liaisons entre RPGR et RPGRIP1.



**Figure 34-B : Interaction RPGRIP1c-RPGR.**

La révélation de la protéine RPGRIP1c marquée au soufre 35 se fait sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE dénaturant. RPGRIP1c est déposée seule pour servir de contrôle positif de la réaction de révélation (Input). Les éluats issus du test de liaison décrit précédemment sont déposés sur les pistes suivantes.

### **2.2.1. Evaluation de l'efficacité du vecteur portant l'ADNc RPGRIP1 canin**

#### **Deux vecteurs différents portant l'ADNc RPGRIP1 canin ont été construits**

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment (voir introduction), il existe une controverse quant à la localisation de la protéine RPGRIP1. Les travaux menés par l'équipe de Tiansen Li chez la souris ont montré que la protéine RPGRIP1 était localisée au niveau des cils connecteurs des photorécepteurs et était impliquée dans le transport intracellulaire et dans la morphogénèse des disques. Par ailleurs, les travaux de Paulo Ferreira ont montré que chez l'Homme la protéine RPGRIP1 était non seulement présente dans les photorécepteurs mais aussi dans les cellules de la couche nucléaire interne (cellules amacrines), ce qui pourrait donner à cette protéine un rôle supplémentaire dans la transmission du signal électrique des photorécepteurs jusqu'aux cellules ganglionnaires.

Compte-tenu de cette controverse, et puisque nous ne connaissons pas la localisation et le rôle exact de RPGRIP1 chez le chien, nous avons décidé de générer deux vecteurs différents portant l'ADNc RPGRIP1 canin.

Le premier vecteur est un AAV2/5 portant l'ADNc RPGRIP1 canin sous le contrôle du promoteur Rhodopsine kinase humain. Ce vecteur cible spécifiquement les photorécepteurs, comme nous l'avons démontré précédemment.

Le second vecteur est un AAV2/8 portant l'ADNc RPGRIP1 canin sous le contrôle du promoteur CMV. Ce vecteur permet une transduction de l'ensemble des cellules de la neurorétine.

#### **Effets thérapeutiques attendus**

Ces deux vecteurs portant l'ADNc RPGRIP1 canin (AAV2/5-Rk-RPGRIP1c et AAV2/8-CMV-RPGRIP1c) ont été injectés en sous-rétinien chez des teckels RPGRIP1<sup>-/-</sup> en juin 2009 (n=1 pour chaque vecteur). Comme nous l'avons décrit précédemment, la pathologie dont souffre le teckel RPGRIP1-déficient est une dégénérescence progressive des photorécepteurs qui aboutit à la cécité en 9 à 12 mois (ERG plat). De plus, la protéine RPGRIP1 étant une protéine de structure des photorécepteurs, la restauration de l'expression de cette protéine fonctionnelle dans les cellules malades devra dans un premier temps permettre de restaurer la structure normale des photorécepteurs avant de pouvoir restaurer la fonction de ces cellules. L'effet thérapeutique que nous attendons chez les chiens injectés ne s'observera donc qu'à long terme, lorsque l'amplitude de l'ERG de l'œil contrôle non injecté chutera alors que celle de l'œil traité devrait se stabiliser si le traitement est efficace.



### **Résultats préliminaires**

Chez les chiens injectés avec l'AAV2/5-Rk-RPGRIP1c et avec l'AAV2/8-CMV-RPGRIP1c, les ERG suivants ont été réalisés : avant injection ( à l'âge de 6 semaine), 1 mois après injection (à l'âge de 3 mois), puis tous les mois. Au moment de la rédaction de ce manuscrit, l'ERG 4 mois post-injection vient d'être réalisé. Malheureusement, il nous est aujourd'hui impossible d'interpréter ces résultats pour plusieurs raisons.

Tout d'abord les profils électrorétinographiques obtenus montrent le manque de maturité de la rétine de ces chiots (1,5-6 mois). Avec de tels profils, les variations d'amplitude de l'onde b de l'ERG max. ne peuvent être comparées.

De plus, nous ne disposons pas du recul nécessaire à l'interprétation des résultats. En effet, contrairement au traitement de thérapie génique chez le chien briard RPE65<sup>-/-</sup> où les résultats sont clairs dès 15 jours post-injection (avant l'injection : ERG plat, après l'injection : détection d'un signal), les éventuels effets thérapeutiques de nos vecteurs chez les teckels RPGRIP1<sup>-/-</sup> ne seront observables qu'à long terme, lorsque l'œil non traité présentera un ERG plat alors que la fonction rétinienne de l'œil traité aura été maintenue.

Enfin, il sera nécessaire d'injecter plus de chiens pour pouvoir interpréter les résultats car le phénotype des teckels RPGRIP1<sup>-/-</sup> présente une grande variabilité interindividuelle.

## Deuxième article

**Regulation of retinal function but non rescue of vision in RPE65 deficient dogs treated with doxycycline-regulatable AAV vectors.**

[Mol Ther.](#) 2010 Jun;18(6):1085-93

Elsa Lhériveau, Lyse Libeau, Alexandra Mendes-Madeira, Jack-Yves Deschamps, Michel Weber, Guylène Le Meur, Nathalie Provost, Caroline Guihal, Philippe Moullier, and Fabienne Rolling.

**Regulation of retinal function but non rescue of vision in RPE65-deficient dogs treated with doxycycline-regulatable AAV vectors**

Elsa Lhériveau<sup>1</sup>, Lyse Libeau<sup>1</sup>, Alexandra Mendes-Madeira<sup>1</sup>, Jack-Yves Deschamps<sup>2</sup>, Michel Weber<sup>3</sup>, Guylène Le Meur<sup>3</sup>, Nathalie Provost<sup>1</sup>, Caroline Guihal<sup>1</sup>, Philippe Moullier<sup>1,4</sup>, and Fabienne Rolling<sup>1,#</sup>.

<sup>1</sup>INSERM UMR U649, Institut de Recherche Thérapeutique 1, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 01, France.

<sup>2</sup>Ecole Nationale Vétérinaire, Service d'Urgences, 44000 Nantes, France.

<sup>3</sup>CHU-Hotel Dieu, Service d'Ophtalmologie, 1 place Alexis Ricordeau, 44000 Nantes, France.

<sup>4</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA.

(#) Correspondence should be addressed to F.R.

Fabienne Rolling, PhD  
Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM U649  
Institut de Recherche Thérapeutique 1  
Université de Nantes  
8 quai Moncousu  
44007 Nantes Cedex 01, France.

Fax: (33) 2 28 08 04 16

Tel: (33) 2 40 08 04 15

e-mail: fabienne.rolling@univ-nantes.fr

Short title: regulation of retinal function in RPE65<sup>-/-</sup> dogs

**Abstract**

In previous studies, we demonstrated that recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV)-mediated gene transfer of the doxycycline-regulatable system allows for the regulation of transgene expression in the retina of nonhuman primates after intravenous or oral administration of doxycycline. In addition, it was shown that administrating different amounts of doxycycline resulted in a dose-response dynamic of transgene expression.

Adeno-Associated viral gene therapy has raised hope for the treatment of patients with Leber congenital Amaurosis, caused by mutations in the retinal pigment epithelium (RPE)-specific gene RPE65. The preliminary results of three clinical trials suggest some improvement in visual function. However, further improvements might be necessary to optimize vision recovery and this means developing vectors able to generate transgene expression at physiological levels.

The purpose of this study was to investigate the ability of the doxycycline-regulatable system (TetOn and TetOff) to regulate retinal function in RPE65<sup>-/-</sup> Briard dogs.

Recombinant AAV vectors expressing RPE65 under the control of either the TetOff and TetOn doxycycline-regulated promoters and the CMV constitutive promoter were generated and administered subretinally to seven RPE65-deficient dogs. We demonstrate that the induction and de-induction of retinal function, as assessed by electroretinography, can be achieved using a doxycycline-regulatable system. However, doxycycline-regulatable promoters do not lead to any recovery of vision.

**Key words: doxycycline-regulated transgene expression, retina, RPE65, RPE65-deficient dogs, AAV vectors, electroretinography**

## Introduction

Several ligand-dependent transcription regulatory systems have been developed<sup>1-4</sup>. Among these, the doxycycline-regulatable system is by far the most frequently used and the most advanced in terms of its potential application in gene therapy trials. Doxycycline-regulatable AAV vectors have been tested to regulate transgene expression *in vivo*, mainly in the muscle<sup>5-9</sup>, the brain<sup>10,11</sup> and in the retina<sup>12,13</sup> (for review see<sup>14</sup>).

Our group has developed a regulatory system based on the TetOn technique (rtTA-M2) that controls the expression of EPO in the eye of nonhuman primates<sup>15,16</sup>. Three different vectors, AAV2/5CMV.TetOn.epo, AAV2/4CMV.TetOn.epo and AAV2/4pRPE65.TetOn.epo, were injected into a total of seven primates. An induction of EPO expression was performed initially by a 3-day doxycycline (Dox) pulse given intravenously (10mg/kg/day). After 2-4 days post Dox administration, EPO concentrations reached a peak and declined to background levels within 10-14 days of withdrawal of the inducer drug. Maximum EPO concentrations in the anterior chamber fluid were 1000mU/ml, 100mU/ml and 10mU/ml for animals injected with AAV2/5CMV.TetOn.epo, AAV2/4CMV.TetOn.epo, and AAV2/4pRPE65.TetOn.epo vectors respectively. This shows a range of two orders of magnitude of possible concentrations for any given therapeutic protein, depending on the serotype and the amount of vector injected, and the promoter driving the expression of the rtTA-M2 protein. Regulated transgene expression was observed for more than 5 years following administration of the AAVTetOn vector<sup>14</sup>. No immune response was observed either to transgene products, rtTA and EPO, or to the AAV capsids.

Since the possibility of oral administration of Dox is paramount when one considers advancing to clinical trials, we also evaluated the influence of oral administration upon the capacity to control transgene expression<sup>16</sup>. In this study, we not only demonstrated the equally efficient and tight control of induction and de-induction of EPO expression following oral administration of Dox, but we were also able to show that the system is capable of continuously inducing transgene expression for a period of 6 months, without eliciting any negative side effects.

Based on these extensive preclinical experiments in the nonhuman primate model, we consider this regulatory system to be a useful tool for the development of gene therapy strategies in the retina.

A landmark study for retinal gene therapy was provided in a dog model by the treatment of LCA caused by mutations in the RPE65 gene<sup>17-19</sup>. RPE65 is involved in the conversion of all-trans-retinal to

11-cis-retinal and in the RPE65-deficient dog, the photoreceptor function is absent despite the photoreceptor cells being initially healthy. The subretinal administration of AAV2/2 or AAV2/4 vectors expressing RPE65 restores the photoreceptor function and consequently, improves visual mobility in dim light<sup>17,19</sup>. Initial results from three separate clinical trials of gene therapy for RPE65 deficiency have recently been reported. Each study involved the treatment of three young adults by subretinal injection of an AAV2/2 vector expressing RPE65, using either the tissue-specific RPE65 promoter<sup>20</sup> or a chicken  $\beta$ -actin (CBA) ubiquitous promoter<sup>21,22</sup>. Although all three studies detected improvement in retinal sensitivity, no improvement in photoreceptor function could be detected by electroretinography (ERG) in any of the patients. A recent study in younger subjects with much less advanced disease, showed the greatest improvement in vision<sup>23</sup>. Nonetheless, certain improvements might be required for an optimal recovery of vision, including the development of vectors to generate transgene expression at physiological levels.

In our previous study in RPE65<sup>-/-</sup> Briard dogs, we had observed structural alterations of the retina specific to the subretinal injection of AAV2/2RPE65.rpe65 or AAV2/4RPE65.rpe65 or vehicle alone<sup>19</sup>. Similar retinal complications also occurred in patients that had vector injections into areas that included the fovea with retinotomy sites within 1-1.5 mm of the foveal region<sup>21,22</sup>. These observations suggest that subretinal injection of the therapeutic vector in humans should be preferentially performed outside but adjacent to the fovea. Although RPE65 is present only in transduced cells, the 11-cis retinal substrate is able to diffuse through cell membranes<sup>24</sup>, and should therefore be able to diffuse to the foveal area. Therefore, the level of RPE65 expressed in the targeted RPE cells within the vicinity of cone photoreceptors of the fovea could constitute a key factor in the vision recovery of humans. One approach to evaluate this issue is to study regulatable RPE65 vectors. In addition, regulated vectors would be needed in the event that individual patients might respond to different doses of the gene product. The use of regulatable vectors should allow for clinical dose-response studies by varying the amount of the regulating compound.

The purpose of this study was to investigate the ability of the Dox-regulatable system (TetOff and TetOn) to regulate retinal function and to evaluate the correlation between the amount of Dox administered and the recovered vision in RPE65-deficient dogs.

## Results

### Vector design

We generated the regulatable rAAV2/4TetOff.rpe65 and rAAV2/4TetOn.rpe65 vectors containing the human RPE65 cDNA under the Dox-inducible TetO-CMV promoter and the chimeric transactivator (tTA2 for the TetOff vector and rtTA-M2 for the TetOn vector) driven by the CAG promoter (CMV enhancer/chicken  $\beta$  actin promoter). Given that the Dox-regulatable promoters, TetOff and TetOn, are based on a CMV promoter, we also generated a constitutive rAAV2/4CMV.rpe65 vector containing the human RPE65 cDNA under the control of the CMV promoter (Fig.1).

A total of seven dogs were treated: A1 through A3 were injected with AAV2/4TetOff.rpe65, A4 and A5 were injected with AAV2/4TetOn.rpe65, and A6 and A7 were treated with vectors constitutively expressing RPE65 under the control of the ubiquitous CMV promoter or the specific RPE65 promoter, AAV2/4CMV.rpe65 and AAV2/4RPE65.rpe65 respectively (Table 1). All dogs received rAAV unilaterally in the right retina at the age of 9-10 months. A1, A2 and A4 were treated first, followed by A3 and A5, which received injections 4 months later. Expression of the transgene RPE65 in the 5 dogs treated with the regulatable vectors was turned OFF and ON simultaneously in all animals.

### Long-term regulation of retinal function in RPE65-deficient dogs following subretinal injection of the AAV2/4TetOff.rpe65 vector

Retinal function was tested using simultaneous bilateral full-field flash electroretinography (ERG) prior to surgery and at different time-points post-injection in ON and OFF states, in order to assess the kinetics of functional recovery. The same investigator (LL) recorded the ERGs in a standardized manner.

Cycles of Dox induction in the AAV2/4TetOff.rpe65 vector-treated dogs started at 7 months post-injection for A1 and A2, and 3 months post-injection for A3.

Follow-up with ERG was 19 months post-injection for A1 and A2, and 15 months for A3. The ERG profiles and the kinetics of functional recovery are described in Figures 2a and 3.

All AAV2/4TetOff.rpe65-treated retinas showed tightly regulated retinal function and displayed rod and cone function recovery in the ON states (in absence of Dox). The maximum recovered amplitude

of the dark-adapted b-wave (ERG max.) 3 months post-induction in the ON states was 40-50  $\mu\text{V}$  for A1, 20-25  $\mu\text{V}$  for A2 and 30-35  $\mu\text{V}$  for A3 (Table 1 and Fig.3).

In the absence of Dox ( $\text{ON}_1$ ), the restoration of rod and cone photoreceptor function started at 2 months post-injection, reached a maximum at 3 months post-injection, and remained stable thereafter (Fig.3).

Upon Dox administration, the rod and cone function returned to the baseline level within 1 month ( $\text{OFF}_1$ ).

Two months following Dox removal ( $\text{ON}_2$ , 10 mpi for A1, A2 and 6 mpi for A3), A2 and A3 displayed a recovery of retinal function, but not A1. Three months following Dox removal ( $\text{ON}_2$ , 11 mpi for A1, A2, and 7 mpi for A3), all dogs displayed rod and cone function recovery to the same extent as that observed in the  $\text{ON}_1$  state (Fig. 2a and 3).

Similar variations in retinal function were observed for the  $\text{OFF}_2$  and  $\text{ON}_3$  states. In the  $\text{ON}_3$  state, all three dogs started to recover rod and cone function 2 months after Dox removal and achieved the initial rod and cone function recovery 3 months after Dox removal ( $\text{ON}_3$ , 16 mpi for A1 and A2, and 12mpi for A3) and remained stable thereafter with some individual variations.

#### **Long-term regulation of retinal function in RPE65-deficient dogs following subretinal injection of the AAV2/4TetOn.rpe65 vector**

Cycles of Dox induction in the AAV2/4TetOn.rpe65 vector-treated dogs started 7 months postinjection for A4 and 3 months postinjection for A5.

Follow-up with ERG was 19 months postinjection for A4 and 15 months for A5. The ERG profiles and the kinetics of functional recovery are described in Figures 2b and 4.

All AAV2/4.TetOn.rpe65-treated retinas showed a tightly regulated retinal function and displayed rod and cone function recovery in the ON states, in the presence of Dox. The ERG max. levels 3 months post-induction in the ON states were 23-30  $\mu\text{V}$  for A4, and 35-40  $\mu\text{V}$  for A5 (Table 1 and Fig.4).

For these 2 dogs, Dox administration started the day after the subretinal injection of the vector. Restoration of rod and cone photoreceptor function started at 2 months post-injection and reached a maximum at 3 months post-injection, and remained stable thereafter in A4 ( $\text{ON}_1$ , Fig.4).

Upon Dox removal, the rod and cone function returned to the baseline level within 1 month ( $\text{OFF}_1$ ).



Upon the second Dox administration, dogs started to recover rod and cone function at 2 months (ON<sub>2</sub>, 10 mpi for A4 and 6 mpi for A5), and reached the level of retina function observed in the ON<sub>1</sub> state, 3 months post-Dox administration. Similar variations in retinal function were observed for the OFF<sub>2</sub> and ON<sub>3</sub> states. In the ON<sub>3</sub> state, the 2 dogs started to recover rod and cone function 2 months after Dox administration and reached the initial rod and cone function recovery 3 months after Dox administration (ON<sub>3</sub>, 16 mpi for A4, and 12mpi for A5), with a slight increased in the ERG max. over time.

Both AAV2/4TetOff.rpe65 and AAV2/4TetOn.rpe65 dogs showed a tightly regulated retinal function with similar profiles. In all dogs, the maximum recovered b-wave amplitude in the first ON state (ON<sub>1</sub>) consistently occurred 3 months post-induction (in the absence of Dox for the TetOff and in the presence of Dox for the TetOn) and returned to the baseline level within one month following de-induction (upon administration of Dox for the TetOff, and withdrawal of Dox for the TetOn). Although the general trend of ERG profiles was similar in all Briards between the ON and the OFF states, individual variations were observed. For all animals, a slight increased in the ERG max. was observed in the ON<sub>3</sub> state over time. In all AAV2/4TetOff.rpe65 and AAV2/4TetOn.rpe65 treated Briards, the maximum recovered amplitude of the dark-adapted b-wave was consistently between 30 and 60  $\mu V$ .

#### **Comparison between dogs treated with Dox-regulatable vectors and the control dogs that were not affected or injected with constitutive vectors**

In parallel to the 5 dogs treated with the Dox-regulatable vectors, 3 additional dogs were used as controls. A6 and A7 were treated with the constitutive AAV2/4CMV.rpe65 and AA2/4RPE65.rpe65<sup>19</sup> respectively. NA is a non-affected dog (Table 1). Follow-up with ERG was 9 months post-injection for A6 and A7 and 9 months (9 months to 18 months of age) for NA. The ERG profiles and the kinetics of the functional recovery are described in Fig.5.

The amplitude of the dark-adapted b-wave was approximately 250  $\mu V$  in the non-affected dog. In the AAV2/RPE65.rpe65 treated dog, the recovered amplitude was approximately 100  $\mu V$  at 3 months post-injection and remained stable thereafter. This result was in accordance with our previous study in which all affected Briards treated between the age of 8 and 11 months (5 dogs) with this same vector displayed a maximum b-wave amplitude between 86 and 131  $\mu V$ <sup>19</sup>. In spite of the larger

volume of vector injected into the AAV2/4CMV.rpe65 treated dog, the amplitude was around 40  $\mu\text{V}$  at 2 and 3 months post-injection and increased to up to 74  $\mu\text{V}$  between 3 and 6 months.

### **Assessment of vision recovery**

We evaluated vision in all 7 treated Briards using behavioural testing at different time-points post-injection, as previously described<sup>19</sup>. Three months post-induction for the regulatable vectors and, post-injection for the constitutive vectors, only the AAV2/4RPE65.rpe65 treated dog (A7) avoided obstacles (Table 1). The AAV2/4TetOff.rpe65 and the AAV2/4TetOn.rpe65 treated dogs never displayed recovery of vision at any time. As an example, at 11 months postinjection, at the peak of retinal function in the ON<sub>2</sub> for A1 (Fig.3, ERG max.= 49 $\mu\text{V}$ ), the time to negotiate the obstacle course did not change between the two configurations, either when the untreated eye was covered (20 seconds) or when the treated eye was covered (17 seconds) (video1). Although retinal function slightly increased in the ON<sub>3</sub> state (ERG max.= 57  $\mu\text{V}$ ) for A1, no improvement of vision was observed up to 8 months after Dox removal in the ON<sub>3</sub> state (data not shown). Interestingly, the AAV2/4CMV.rpe65 treated dog (A6) that did not show any detectable vision improvement 3 months post-vector administration (ERG max.= 43  $\mu\text{V}$ ), started to show signs of recovered vision from 6 months onwards (ERG max= 74  $\mu\text{V}$ ) (video2). The time to negotiate the obstacle course was shorter when the untreated eye was covered (7 seconds), compared to the configuration in which the treated eye was covered (41 seconds). Considered together, these results indicate that an ERG max below 60  $\mu\text{V}$  does not result in the recovery of an effective vision in RPE65-deficient dogs, as assessed with our ERG and behavioural test set-up.

### **Discussion**

In this study, we demonstrated that a single subretinal injection into RPE65-deficient dogs of an AAV2/4TetOff.rpe65 or AAV2/4TetOn.rpe65 vector containing the RPE65 transgene under a doxycycline-dependent expression system results in an effective regulation of retinal function for at least 19 months.

All treated dogs displayed tightly regulated retinal rod and cone function with similar induction and de-induction kinetics. The maximum amplitude of the dark-adapted b-wave consistently occurred 3

months after induction (upon withdrawal of Dox for the TetOff and upon administration of Dox for the TetOn), returning to the baseline level within one month of de-induction (upon administration of Dox for the TetOff and withdrawal of Dox for the TetOn).

In all AAV2/4TetOff.rpe65 and AAV2/4TetOn.rpe65 treated Briards, the maximum recovered amplitude of the dark-adapted b-wave was consistently below  $60\mu\text{V}$ . None of these treated dogs displayed vision recovery at any time.

Our group has previously shown long-term Dox-regulated transgene expression (reporter gene EPO) in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors<sup>15,16</sup>. The results in this new study demonstrate for the first time that it is possible to use a Dox-regulatable system to regulate rod and cone function in RPE65-deficient dogs, by controlling the expression of the RPE65 therapeutic transgene.

In our previous study in nonhuman primates, we validated the TetOn system, in which the ligand (Dox) activates transcription. In the case of RPE65 gene replacement therapy, gene expression is to be maintained to a switch-on state over a long period of time, which makes the TetOff system more attractive. In this case, the activation of transgene expression depends mainly on the clearance kinetics of Dox.

Surprisingly, the induction and de-induction kinetics of rod and cone function were similar between both TetOff and TetOn systems.

Unfortunately, in the ON state all AAV2/4TetOff.rpe65 and AAV2/4TetOn.rpe65 treated dogs displayed only low levels of retinal function recovery. First, no ERG improvement was detected at one month post-vector administration. This is in contrast to our previous study in RPE65-deficient dogs treated with the AAV2/4RPE65.rpe65 constitutive vector where restoration of rod and cone photoreceptor function started from 15 days post-injection<sup>19</sup>. Secondly, using the regulatable vectors, the maximum recovered amplitude of the dark-adapted b-wave at 3 months post-vector administration ranged from 20 to  $42\mu\text{V}$ . In our previous study of five AAV2/4RPE65.rpe65 treated dogs, and in the control dog A7, the maximum recovered amplitude of the dark-adapted b-wave 3 months post-vector administration ranged from 94 to  $110\mu\text{V}$ <sup>19</sup>. Moreover, given that the same administration procedure, the same vector titer, and the same ERG set-up was used for all animals (in the previous study Le Meur et al, and in this new study), the lower level of retinal function restoration observed in the dogs treated with the regulatable vectors (AAV2/4TetOff.rpe65 and

AAV2/4TetOn.rpe65) is likely to be both real and significant when compared to the dogs treated with the constitutive AAV2/4RPE65.rpe65 vector.

These small improvements in ERG were confirmed by the behavioural testing, as none of the regulatable AAV vectors made it possible for treated dogs to recover their vision. In contrast, all of the dogs treated with the AAV2/4.RPE65.rpe65 vector recovered their vision (5 dogs in our previous study Le Meur et al and A7 in this study). Using our ERG and behavioural test set-up, it appeared that a dark-adapted b-wave amplitude below 60  $\mu$ V did not restore vision.

Our previous results using regulatable AAVTetOn vectors for gene transfer in the retina of nonhuman primates<sup>14-16</sup> showed that the maximum transgene expression was detected as early as 48h after oral Dox administration and that the regulation of transgene expression persisted for up to 5 years post-subretinal injection with no detection of deleterious side effects. This indicates that the delay in the onset and the lower levels of retinal function recovery in RPE65-deficient dogs using the TetOff or the TetOn vectors is not due to a delay in transgene expression, to the pharmacokinetics of Dox after oral administration, or to the toxicity of the Tet system.

Our results lean more towards the hypothesis suggesting that the CMV-based TetOff and TetOn promoters are not as strong as the RPE65 promoter for transgene expression in the RPE cells *in vivo*, and therefore lead to a lower recovery of retinal function in treated RPE65-deficient dogs. Interestingly, although only one control animal was treated with the constitutive vector AAV2/4CMV.rpe65, it displayed an ERG improvement similar to that obtained in the AAV2/4TetOff.rpe65 and AAV2/4TetOn.rpe65 treated animals. This observation lends support to our hypothesis suggesting that the strength of the CMV and CMV-based promoters is lower than the strength of the RPE65 promoter *in vivo*. Additional experiments would, however, be necessary in dogs to confirm such a hypothesis.

Unfortunately, the low level of retinal function recovery using the Dox-regulated system prevented any dose-response study.

Different regulatory elements controlling expression of the RPE65 cDNA were used in the three clinical trials. Bainbridge and coworkers employed the RPE65 promoter used in our previous study<sup>19,20</sup> and in A7. The other 2 teams employed the CBA promoter<sup>21,22,23</sup>. Moreover, Maguire et al. inserted a modified Kozac translational initiation sequence before the RPE65 cDNA<sup>25</sup>. In this condition, it is difficult to know the relative strength of expression for each of the three vectors. This could only be addressed by running parallel experiments in RPE65-deficient dogs with a similar vector containing these three different promoters.

In conclusion, we demonstrate for the first time, that it is possible to use the TetOff and TetOn system to regulate retinal function in RPE65-deficient dogs. Such a regulatable system will therefore be valuable to assess the level of RPE65 expression necessary to obtain an optimal rescue of retinal function and vision. Unfortunately, the CMV-based TetOff and TetOn promoters seem much less efficient than the specific RPE65 promoter and lead to a lower level of retinal function recovery, which prevents any dose-response study or a more accurate evaluation of the promoter strength necessary for an optimized rescue of vision. Future efforts should focus on designing a strong regulatable promoter. Our results suggest that the nature of the promoter may be critical for the recovery of retinal function and vision in RPE65-deficient dogs and the need to develop AAV vectors that generate optimal RPE65 expression for the treatment of patients.

## **Materials and Methods**

### **Recombinant AAV2/4TetOn.rpe65, AAV2/4TetOff.rpe65 and AAV2/4CMV.rpe65 vectors**

#### *rAAV2/4TetOff.rpe65 vector*

Generation of expression cassettes encoding d2GFP (TetO.CMVmin-d2GFP-SV40pA) and the transactivator tTA2 under the control of the CAG promoter (CAG-tTA2-BGHpA) was previously described<sup>13</sup>. The expression cassette TetO.CMVmin-hrpe65-SV40pA was produced by replacing the 951-bp d2GFP cDNA fragment with the 1630-bp human RPE65 transgene fragment (kindly provided by Robon Ali, London, UK).

*rAAV2/4TetOn.rpe65 vector*

Generation of expression cassettes encoding EPO (TetO.CMVmin-mEPO-WPRE-SV40pA) and the transactivator rtTA.M2 under the control of the CAG promoter (CAG-rtTA.M2-BGHpA) was previously described<sup>15</sup>. The expression cassette TetO.CMVmin-hrpe65-SV40pA was produced by replacing the 1237-bp mEPO-WPRE fragment with the 1630-bp human RPE65 transgene fragment (kindly provided by Robon Ali, London, UK).

*rAAV2/4CMV.rpe65 vector*

Generation of expression cassette encoding human RPE65 cDNA under the control of the human RPE65-specific promoter (RPE65-hrpe65-BGHpA) was previously described<sup>19</sup>. The expression cassette CMV-hrpe65-BGHpA was produced by replacing the 806-bp human RPE65-specific promoter fragment with the 586-bp CMV promoter fragment.

The expression cassettes, flanked by two AAV2 ITRs, were encapsidated into AAV4 shells. Vectors were produced as described previously by Rabinowitz et al., in the Vector Core at the University Hospital of Nantes (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>). The rAAV titers were determined by dot blot and expressed as vector genomes (vg) per ml.

**Subretinal injection of rAAV vectors**

A colony of Briard dogs carrying the RPE65 null mutation was developed at the Boisbonne Center (Veterinary School of Nantes, France). All animals were cared for in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. The subretinal injections were performed on 9-10 month old dogs using a transvitreal approach and following vitrectomy. Procedures were conducted on dogs under isoflurane gas anesthesia as previously described<sup>26</sup>. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes. All subretinal injections were performed unilaterally in the right eye. Volumes injected were between 280 and 600  $\mu$ l and vector titers were  $10^{11}$  vg/ml.

### **Bilateral full-field electroretinography**

Dogs were dark-adapted for 20 min and electroretinograms (ERGs) were performed under general anesthesia. Rod and cone function was tested using simultaneous bilateral flash photopic and scotopic electroretinography. ERGs were recorded in a standardized fashion, according to the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV)<sup>27</sup>, using a computer based system (Neuropack  $\mu$ ™ MEB-9102K -Nikon-Kohden™, Tokyo, Japan) and contact lens electrodes (ERGjet®, Microcomponents SA, Grenchen, Switzerland).

In fully dark-adapted dogs, attenuated white flash ( $0.028 \text{ cd.s.m}^{-2}$ ) was used to elicit a rod ERG b-wave. Four flashes, presented at a rate of 0.5 Hz, were used to average the rod system response. To elicit a maximal mixed rod and cone response, we used a single white light flash ( $2.8 \text{ cd.s. m}^{-2}$ ). The maximum mixed rod and cone responses were averaged by using three flashes, presented at a rate of 0.1 Hz. Following a 10 min light adaptation, cone function was tested with 1Hz white light flashes and the cone flicker was tested with 30Hz white light flashes, both in addition to a continuous rod desensitizing white background light. Ten to 20 responses were averaged for light-adapted recordings.

The *b*-wave amplitude of the ERG max of the treated and the untreated eyes, was measured from the *a*-wave peak to the *b*-wave peak, at different times postinjection and reported in the graphs. The uninjected left eye served as an intra-individual control. The method of measurement was in accordance with the recommendations in the ISCEV Standard for Clinical electroretinography.

### **Doxycycline administration**

Oral administration of doxycycline (Dox) consisted of the daily uptake of  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  Dox (Doxy 100 Gé, ELERTE, Aubervilliers, France). In A1, A2 and A3 injected with the AAV2/4TetOff.rpe65 vector, the ON state was obtained in the absence of Dox while the OFF state was obtained upon oral administration of Dox. In A4 and A5 treated with the AAV2/4TetOn.rpe65 vector, the ON state was obtained upon administration of Dox while the OFF state was obtained upon withdrawal of Dox.

**Behavioural studies**

Ambulation of treated and untreated RPE65<sup>-/-</sup> dogs through an obstacle course in dim light was recorded using a camcorder. An opaque lens, specifically designed for dogs, was used to alternatively cover the treated or the untreated eye. The time to negotiate the obstacle course was compared between the course for which the untreated eye was covered and the course in which the treated eye was covered.



## **Acknowledgments**

We thank Knut Stieger (Department of Ophthalmology, Justus-Liebig-University of Giessen, Germany) for critical reading. We also thank the Vector Core ([www.vectors.nantes.inserm.fr](http://www.vectors.nantes.inserm.fr)) at the University Hospital of Nantes. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the INSERM, and the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire.

## **Supplementary Material**

**Video 1.** Visual function of A1 was evaluated 11 months post-injection by behavioural testing. The time to negotiate the obstacle course does not change between the two configurations, either when the untreated eye is covered with an opaque contact lens (20 seconds) or when the treated eye is covered (17 seconds).

**Video 2.** Visual function of A6 was evaluated 6 months post-injection by behavioural testing. The time to negotiate the obstacle course is shorter when the untreated eye is covered (7 seconds), compared to the configuration in which the treated eye is covered (41 seconds).

## References

1. Gossen, M, and Bujard, H (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5547-5551.
2. Rivera, VM, Clackson, T, Natesan, S, Pollock, R, Amara, JF, Keenan, T, *et al.* (1996). A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* **2**: 1028-1032.
3. Vegeto, E, Allan, GF, Schrader, WT, Tsai, MJ, McDonnell, DP, and O'Malley, BW (1992). The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell* **69**: 703-713.
4. Palli, SR, Kapitskaya, MZ, Kumar, MB, and Cress, DE (2003). Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur J Biochem* **270**: 1308-1315.
5. Rendahl, KG, Quiroz, D, Ladner, M, Coyne, M, Seltzer, J, Manning, WC, *et al.* (2002). Tightly regulated long-term erythropoietin expression in vivo using tet-inducible recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* **13**: 335-342.
6. Agha-Mohammadi, S, O'Malley, M, Etemad, A, Wang, Z, Xiao, X, and Lotze, MT (2004). Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *J Gene Med* **6**: 817-828.
7. Bohl, D, Salvetti, A, Moullier, P, and Heard, JM (1998). Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* **92**: 1512-1517.
8. Favre, D, Blouin, V, Provost, N, Spisek, R, Porrot, F, Bohl, D, *et al.* (2002). Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol* **76**: 11605-11611.
9. Chenuaud, P, Larcher, T, Rabinowitz, JE, Provost, N, Joussemet, B, Bujard, H, *et al.* (2004). Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* **9**: 410-418.
10. Jiang, L, Rampalli, S, George, D, Press, C, Bremer, EG, O'Gorman, MR, *et al.* (2004). Tight regulation from a single tet-off rAAV vector as demonstrated by flow cytometry and quantitative, real-time PCR. *Gene Ther* **11**: 1057-1067.

11. Chen, Q, Xiong, X, Lee, TH, Liu, Y, Sun, QA, Wetsel, W, *et al.* (2008). Adeno-associated virus-mediated ILK gene silencing in the rat NAc core. *J Neurosci Methods* **173**: 208-214.
12. McGee Sanftner, LH, Rendahl, KG, Quiroz, D, Coyne, M, Ladner, M, Manning, WC, *et al.* (2001). Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol Ther* **3**: 688-696.
13. Folliot, S, Briot, D, Conrath, H, Provost, N, Chereil, Y, Moullier, P, *et al.* (2003). Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *J Gene Med* **5**: 493-501.
14. Stieger, K, Belbellaa, B, Le Guiner, C, Moullier, P, and Rolling, F (2009). In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv Drug Deliv Rev* **61**: 527-541.
15. Stieger, K, Le Meur, G, Lasne, F, Weber, M, Deschamps, JY, Nivard, D, *et al.* (2006). Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther* **13**: 967-975.
16. Stieger, K, Mendes-Madeira, A, Meur, GL, Weber, M, Deschamps, JY, Nivard, D, *et al.* (2007). Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther* **14**: 1668-1673.
17. Acland, GM, Aguirre, GD, Ray, J, Zhang, Q, Aleman, TS, Cideciyan, AV, *et al.* (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* **28**: 92-95.
18. Narfstrom, K, Katz, ML, Bragadottir, R, Seeliger, M, Boulanger, A, Redmond, TM, *et al.* (2003). Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 1663-1672.
19. Le Meur, G, Stieger, K, Smith, AJ, Weber, M, Deschamps, JY, Nivard, D, *et al.* (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* **14**: 292-303.
20. Bainbridge, JW, Smith, AJ, Barker, SS, Robbie, S, Henderson, R, Balaggan, K, *et al.* (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358**: 2231-2239.
21. Maguire, AM, Simonelli, F, Pierce, EA, Pugh, EN, Jr., Mingozzi, F, Bennicelli, J, *et al.* (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358**: 2240-2248.

22. Hauswirth, W, Aleman, TS, Kaushal, S, Cideciyan, AV, Schwartz, SB, Wang, L, *et al.* (2008). Phase I Trial of Leber Congenital Amaurosis due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results. *Hum Gene Ther* **7**: 7.
23. Maguire, AM, High, KA, Auricchio, A, Wright, JF, Pierce, EA, Testa, F, *et al.* (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. (online publication ahead of print).
24. MacLaren, RE (2009). An analysis of retinal gene therapy clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* **11**: 540-546.
25. Bennicelli, J, Wright, JF, Komaromy, A, Jacobs, JB, Hauck, B, Zeleniaia, O, *et al.* (2008). Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther* **16**: 458-465.
26. Weber, M, Rabinowitz, J, Provost, N, Conrath, H, Folliot, S, Briot, D, *et al.* (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* **7**: 774-781.
27. Narfstrom, K, Ekesten, B, Rosolen, SG, Spiess, BM, Percicot, CL, and Ofri, R (2002). Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Doc Ophthalmol* **105**: 83-92.

## Figure Legends

### Figure 1. Structure of rAAV vectors

(a) The AAV2/4TetOff.rpe65 vector encodes the human RPE65 cDNA under the control of the Dox-inducible TetO-CMV promoter, and the tTA chimeric transactivator (tTA2) under the control of the CAG promoter (CMV enhancer/chicken  $\beta$  actin promoter). (b) The AAV2/4TetOn.rpe65 vector encodes the human RPE65 cDNA under the control of the Dox-inducible TetO-CMV promoter, and the rtTA chimeric transactivator (rtTA-M2) under the control of the CAG promoter. (c) The AAV2/4CMV.rpe65 vector encodes the human RPE65 cDNA under the control of the CMV promoter.

### Figure 2. Bilateral full-field electroretinographic recordings of AAV2/4TetOff.rpe65 and AAV2/4TetOn.rpe65 treated dogs in the ON and OFF states

(a) Affected dog A2 treated with the AAV2/4TetOff.rpe65 vector before and at different timepoints postinjection, in the ON<sub>1</sub>, OFF<sub>1</sub> and ON<sub>2</sub> states. (b) Affected dog A5 treated with the AAV2/4TetOn.rpe65 vector before and at different time-point post-injection, in the ON<sub>1</sub>, OFF<sub>1</sub> and ON<sub>2</sub> states. The top two recordings are low- and high-intensity scotopic responses, whereas the bottom two recordings show photopic responses (responses to light-adapted single flash and 30 Hz flicker stimuli, respectively). bi, before injection ; mpi, months post-injection. R, right eye ; L, Left eye.

### Figure 3. Long-term regulation of retinal function in RPE65-deficient dogs following subretinal injection of the AAV2/4TetOff.rpe65 vector

Affected dogs A1, A2 and A3 before injection and at different time-point post-injection, in the ON and OFF states. The b-wave amplitudes of the ERG max. (scotopic) of the treated and untreated eyes were measured and reported in the graphs. grey : treated eye. black : untreated contralateral eye. The ON state was obtained in the absence of Dox while the OFF state was obtained upon oral administration of Dox.

### Figure 4. Long-term regulation of retinal function in RPE65-deficient dogs following subretinal injection of the AAV2/4TetOn.rpe65 vector

Affected dogs A4 and A5 before injection and at different timepoints postinjection, in the ON and OFF states. The b-wave amplitudes of the ERG max. (scotopic) of the treated and untreated eyes were measured and reported in the graphs. grey : treated eye. black : untreated contralateral eye. The ON

state was obtained upon oral administration of Dox, while the OFF state was obtained in the absence of Dox.

**Figure 5. Retinal function in control dogs**

**(a) Bilateral full-field electroretinographic recordings of control dogs.** Non affected dog NA at 12 months of age, affected dog A7 treated with the AAV2/4RPE65.rpe65 vector at 3 months postinjection, affected dog A6 treated with the AAV2/4CMV.rpe65 vector at 3 months postinjection.

**(b) Kinetics of retinal function in control dogs.** Non affected dog NA at different timepoints after birth, affected dog A7 treated in the right eye with the AAV2/4RPE65.rpe65 vector and affected dog A6 treated in the right eye with the AAV2/4CMV.rpe65 vector at different timepoints postinjection. The b-wave amplitudes of the ERG max. (scotopic) of both eyes were measured at different times and reported in the graphs. grey : right eye. black : left eye.

Table 1 : List of treated dogs and rAAV doses injected.

Dog	Vector	Vector titer (vg/ml)	Injected volume ( $\mu$ l)	Age at injection (months)	ERG max ( $\mu$ V)						Vision ON <sub>1</sub>
					bi	ON <sub>1</sub>	OFF <sub>1</sub>	ON <sub>2</sub>	OFF <sub>2</sub>	ON <sub>3</sub>	
A1	AAV2/4TetOff.rpe65	10 <sup>11</sup>	600	10	4	42	3	49	3	39	-
A2	AAV2/4TetOff.rpe65	10 <sup>11</sup>	350	10	2	20	3	21	3	25	-
A3	AAV2/4TetOff.rpe65	10 <sup>11</sup>	590	9	2	35	3	32	2	26	-
A4	AAV2/4TetOn.rpe65	10 <sup>11</sup>	540	10	3	23	2	30	4	31	-
A5	AAV2/4TetOn.rpe65	10 <sup>11</sup>	460	9	2	34	3	36	3	39	-
A6	AAV2/4CMV.rpe65	10 <sup>11</sup>	560	9	3	43	na	na	na	na	-
A7	AAV2/4RPE65.rpe65	10 <sup>11</sup>	280	10	3	97	na	na	na	na	+
NA	na	na	na	na	na	253	na	na	na	na	+

A, affected; NA, non affected ; rAAV, recombinant adeno-associated virus, vg, vector genome; ERG, electroretinography ; bi, before injection; na, not applicable. ON<sub>1</sub>, ERG at 3 months after the first induction for A1-A5 ; ERG at 3 months post-injection for A6 and A7 ; ERG at 12 months of age for NA. OFF<sub>1</sub>, ERG after the first de-induction for A1-A5. ON<sub>2</sub>, ERG at 3 months after the second induction for A1-A5. OFF<sub>2</sub>, ERG after the second de-induction for A1-A5. ON<sub>3</sub>, ERG at 3 months after the third induction for A1-A5.

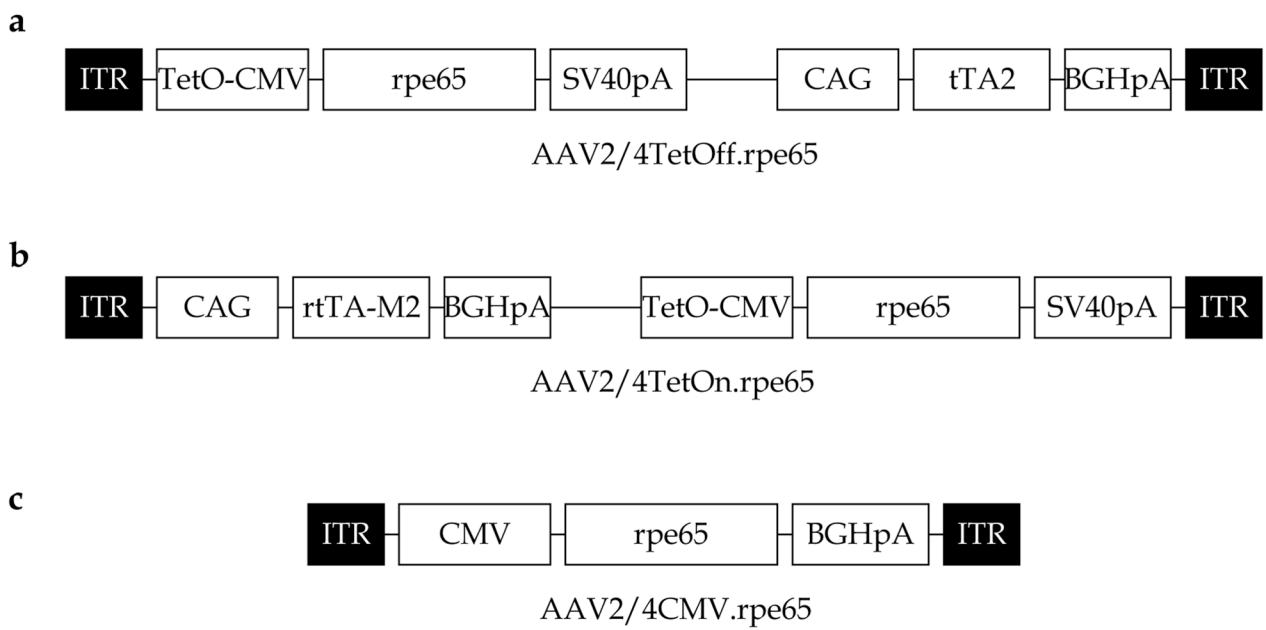


Figure 1



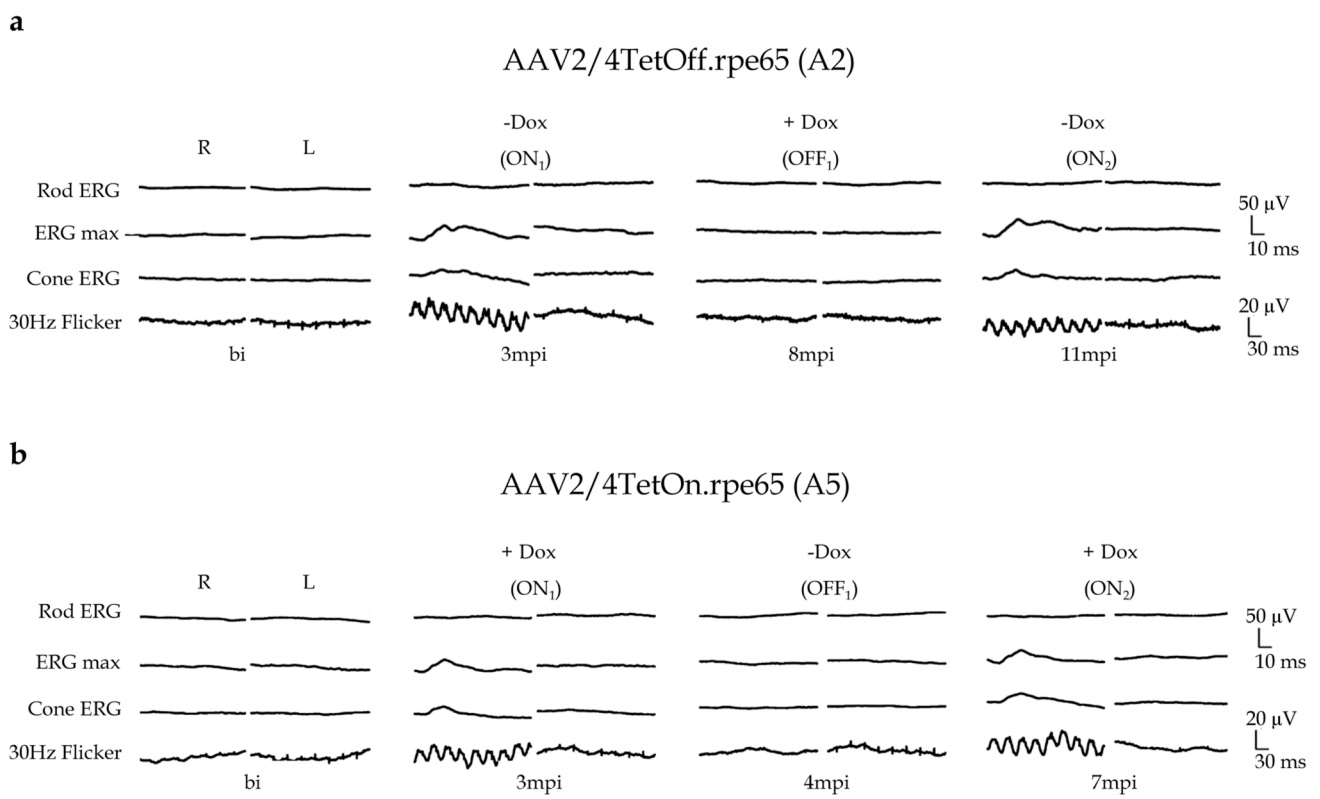


Figure 2

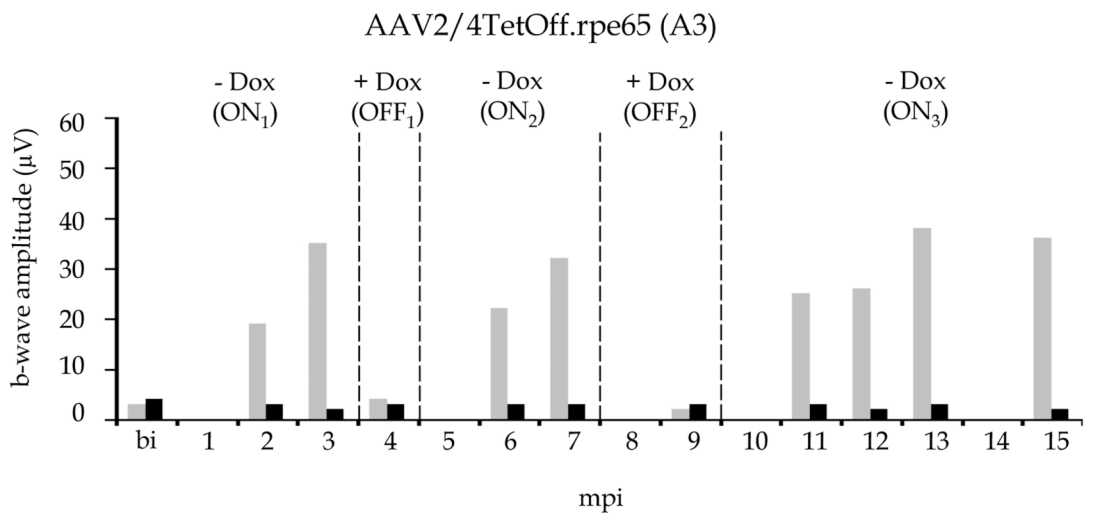
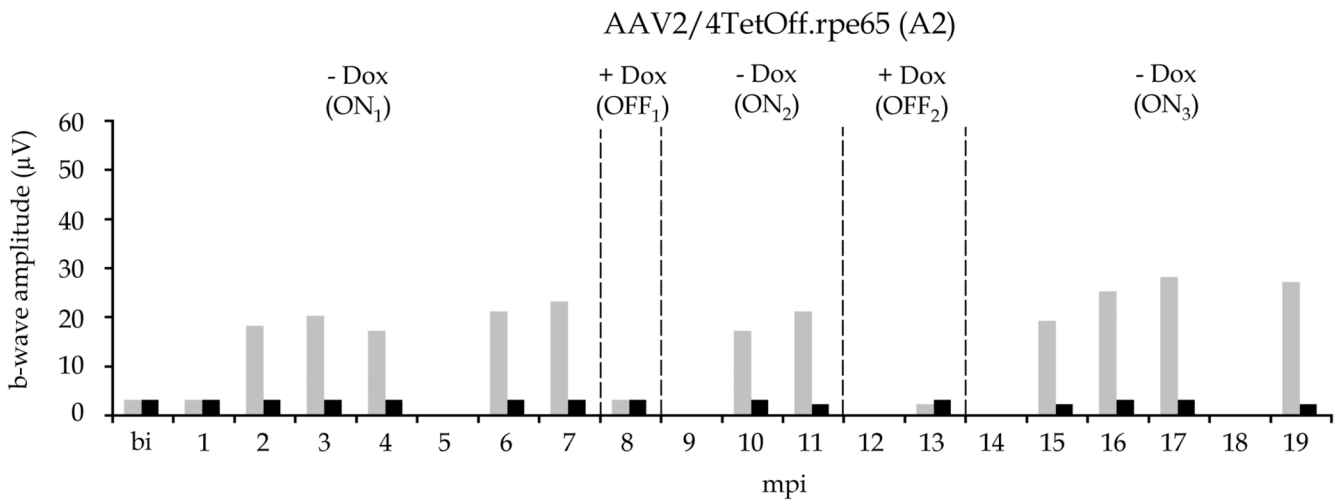
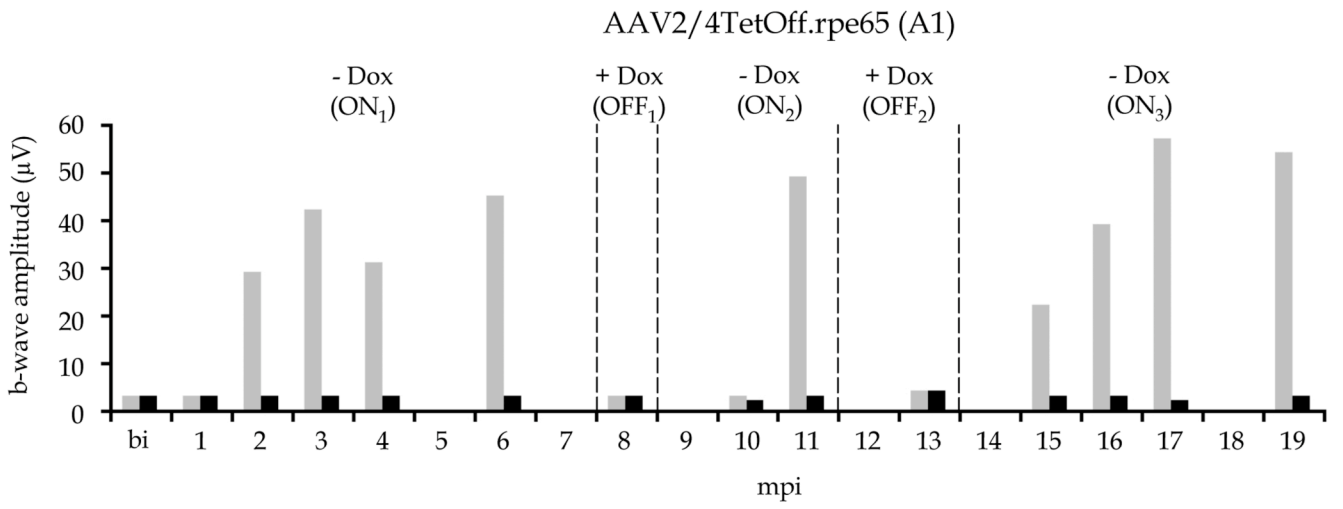


Figure 3

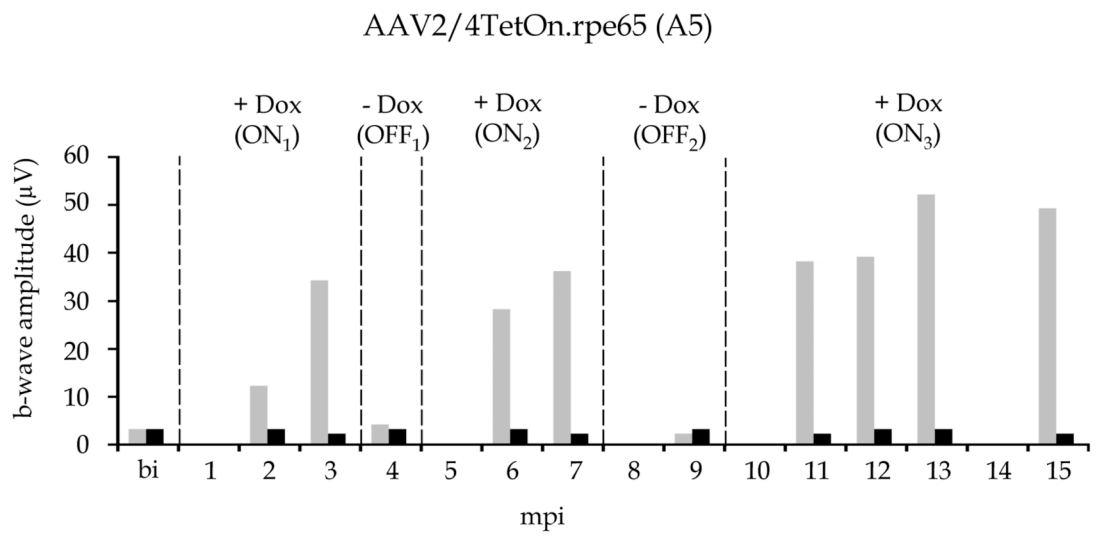
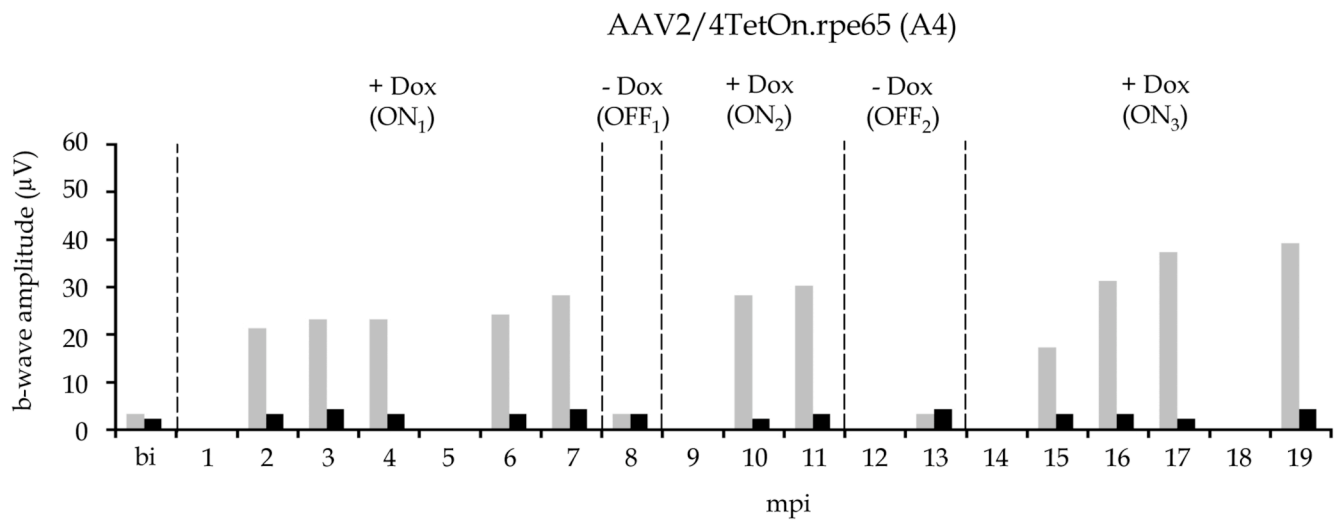


Figure 4

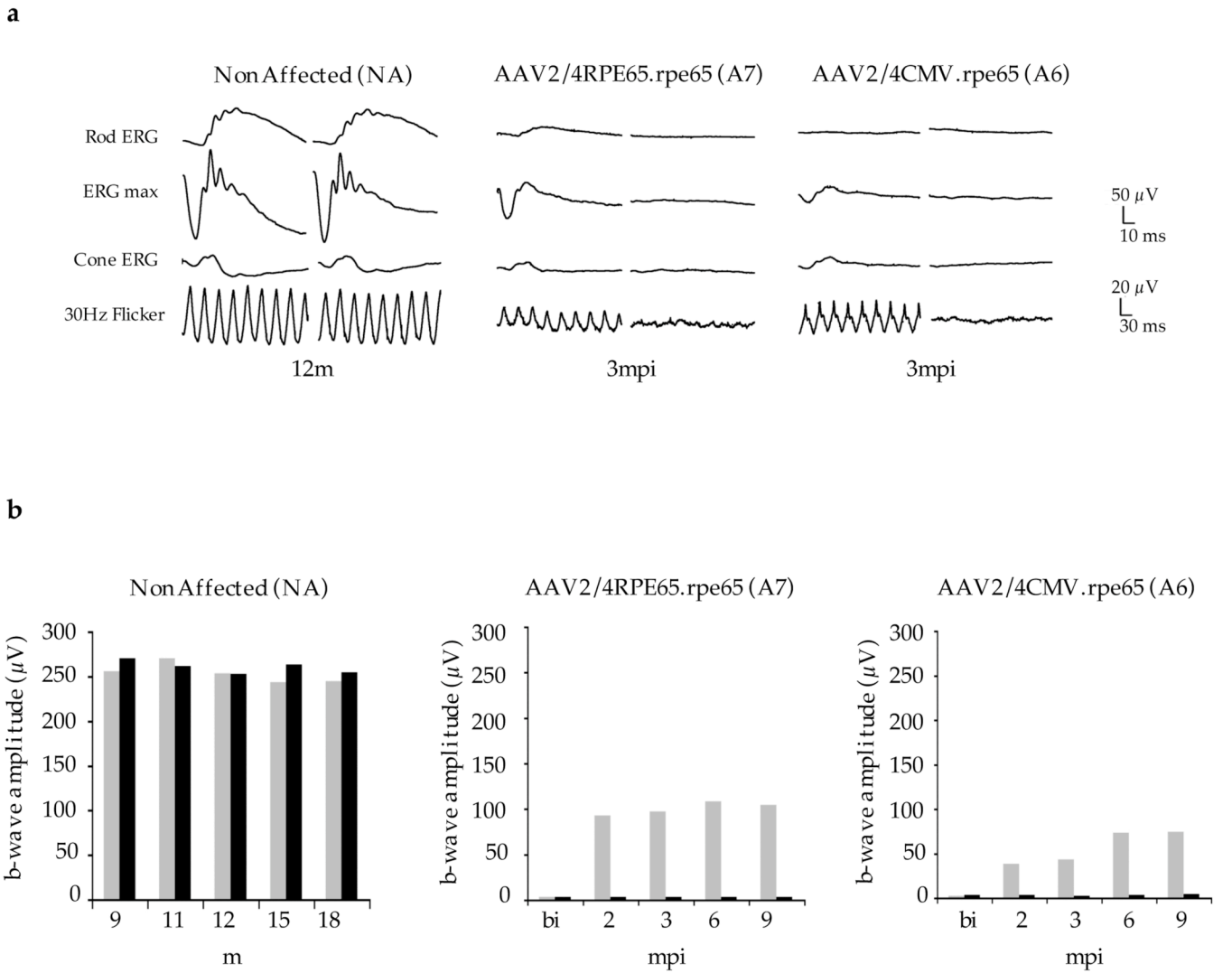


Figure 5

### **2.3. Discussion du deuxième article : « Regulation of retinal function but non rescue of vision in RPE65 deficient dogs treated with doxycycline-regulatable AAV vectors.»**

Les résultats concernant ce projet sont en cours de soumission dans la revue internationale *Molecular Therapy* sous le titre : **Regulation of retinal function but non rescue of vision in RPE65 deficient dogs treated with doxycycline-regulatable AAV vectors.**

#### **Le briard RPE65-déficient, modèle canin de l'amaurose congénitale de Leber**

La protéine RPE65 exprimée dans les cellules de l'EPR, est impliquée dans le cycle de recyclage du photopigment et plus précisément dans l'isomérisation du all trans-retinal en 11 cis-retinal (voir introduction). Le briard est un modèle spontané RPE65-déficient (Aguirre *et al.*, 1998; Narfstrom, 1999) qui possède une délétion de 4 pb dans le gène RPE65 (Veske *et al.*, 1999). Le phénotype observé chez ce chien est très proche de celui observé chez les patients atteints d'une amaurose congénitale de Leber ce qui fait de ce chien un bon modèle pour l'étude préclinique du traitement par thérapie génique d'addition.

Chez le chien briard RPE65-déficient, la protéine RPE65 est absente et les photorécepteurs sont non fonctionnels mais ces cellules sont toutefois présentes et préservées durant les premiers stades de la maladie.

#### **Succès de la thérapie génique chez le briard RPE65-déficient**

Plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité de la thérapie génique chez le briard RPE65<sup>-/-</sup> en utilisant différents vecteurs AAV recombinants (Acland *et al.*, 2001; Narfstrom *et al.*, 2003; Acland *et al.*, 2005; Narfstrom *et al.*, 2005; Le Meur *et al.*, 2007). Aujourd'hui ce type de traitement est porteur d'espoir pour les patients atteint d'ACL due à une mutation dans le gène RPE65.

#### **Les essais cliniques en cours chez les patients RPE65-déficients**

Trois essais cliniques de phase I/II sont actuellement en cours dans le monde (Bainbridge *et al.*, 2008; Hauswirth *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008 ; Maguire *et al.*, 2009 ). Dans ces trois essais cliniques, 18 patients âgés de 8 à 44 ans ont subi des injections sous rétiniennes de vecteurs AAVr de sérotype 2 portant le transgène RPE65 humain sous le contrôle soit du promoteur tissu-spécifique RPE65, soit du promoteur ubiquitaire CBA (chicken beta-actine) , soit du promoteur modifié CBA possédant une séquence de Kozak supplémentaire. Les

résultats préliminaires de ces essais cliniques montrent qu'un tel traitement n'engendre pas d'effet délétère. De plus, l'évaluation clinique des 9 premiers patients traités montre qu'après traitement, une amélioration de la sensibilité rétinienne est observée bien que les réponses électrorétinographiques des patients ne soient pas augmentées, ce qui montre que des modifications devront être apportées pour pouvoir restaurer la fonction visuelle chez ces patients. Parmi ces améliorations, le traitement de patients plus jeunes (Maguire *et al.*, 2009) permet une meilleure restauration de la fonction rétinienne. De plus, le développement de vecteurs capables de délivrer une protéine transgénique à un taux physiologique pourrait apporter de meilleurs résultats.

### **Intérêt du développement de systèmes régulables dans le cadre du traitement des patients RPE65-déficients**

Dans la précédente étude menée au LTG sur les brianids RPE65<sup>-/-</sup> (Le Meur *et al.*, 2007), des altérations de la structure rétinienne ont été observées au point d'injection chez les animaux ayant subi des injections sous-réiniennes de vecteurs AAV2/2-RPE65-RPE65, AAV2/4-RPE65-RPE65 mais aussi de solution saline, ce qui semble prouver que ces altérations sont dues au geste chirurgical indépendamment du vecteur. De telles altérations morphologiques au point d'injection ont également été reportées chez les patients. Au vu de ces résultats, le choix du site d'injection chez les patients RPE65<sup>-/-</sup> semble être une question primordiale. En effet, pour permettre de restaurer le maximum d'acuité visuelle chez les patients, il faut traiter les cellules de la fovéa. Mais il serait risqué d'effectuer une injection dans cette zone de haute densité cellulaire compte tenu des altérations réiniennes observées précédemment. Une solution envisageable pourrait donc consister à injecter le vecteur hors de la fovéa mais dans une zone adjacente. Bien que l'enzyme RPE65 ne soit présente que dans les cellules transduites, le produit de la réaction d'isomérisation, le 11 cis-retinal, peut quant à lui diffuser en dehors de la bulle d'injection jusque dans la fovéa pour restaurer la fonction rétinienne dans cette zone. Dans cette hypothèse, il est important de pouvoir réguler le niveau d'expression du transgène car on ne connaît pas la concentration nécessaire dans la zone d'injection pour obtenir une concentration physiologique dans la macula.

De plus, le promoteur tissu-spécifique RPE65 utilisé n'est pas le promoteur humain endogène mais une version tronquée de celui-ci. Ce promoteur tronqué a montré qu'il permettait d'obtenir de très fortes concentrations de protéines transgéniques chez le rat et chez le chien mais nous n'avons pas la possibilité de comparer ces niveaux d'expressions obtenus avec les niveaux d'expression qui seraient obtenus avec le promoteur endogène complet. De plus, nous ne connaissons pas la force de ce promoteur tronqué chez l'Homme, ni la force relative du promoteur endogène. La difficulté est donc de déterminer quel promoteur permettra d'obtenir une expression de protéine transgénique proche du niveau

endogène. C'est pour cela qu'il semble très intéressant de développer des vecteurs portant le système régulier à la tétracycline de façon à pouvoir diminuer la force du promoteur et donc le niveau d'expression protéique en jouant sur les doses de doxycycline administrées.

### **Prérequis et objectifs de l'étude**

Au LTG, plusieurs études concernant : (i) la restauration de la vision chez le brianard RPE65-déficient grâce à un traitement de thérapie génique et (ii) la régulation de l'expression du transgène érythropoïétine dans l'œil de primate non humain, ont déjà abouti à des publications (Stieger *et al.*, 2006; Le Meur *et al.*, 2007; Stieger *et al.*, 2007 ; Stieger *et al.*, 2009a). Fort de notre expérience en matière de transfert de gènes médiés par les AAV et de régulation de l'expression du transgène via le système inductible à la tétracycline, nous avons donc initié un projet qui consiste à développer un vecteur AAVr portant le transgène RPE65 sous le contrôle de promoteur régulier à la tétracycline. Le but final de ce projet est de pouvoir délivrer dans la rétine du brianard RPE65<sup>-/-</sup> la concentration optimale en protéine RPE65, pour permettre la meilleure restauration de vision. Pour cela, nous souhaitons pouvoir faire varier le niveau d'expression de la protéine RPE65 dans la rétine grâce à l'administration de doxycycline en quantités plus ou moins importantes. Nous évaluerons alors la restauration de la fonction rétinienne et visuelle chez le brianard.

Nous souhaitons savoir s'il est possible « d'allumer » et « d'éteindre » la fonction rétinienne et visuelle en faisant produire ou non la protéine RPE65 par le vecteur. Nous souhaitons également savoir s'il est possible de moduler l'amplitude des réponses rétiniennes en modulant la quantité de doxycycline administrée.

### **Construction des vecteurs AAVr portant le transgène RPE65 sous le contrôle d'un promoteur régulier à la doxycycline et injections sous-rétiniennes chez le chien RPE65-déficient (Figure 1, Table 1, Lhériveau *et al.*, en cours de soumission)**

Pour cette étude, quatre vecteurs ont été utilisés. Un vecteur régulier AAV2/4 ciblant spécifiquement les cellules de l'EPR portant le gène RPE65 sous le contrôle du promoteur régulier à la tétracycline TetOn et un vecteur similaire portant le gène RPE65 sous le contrôle du promoteur TetOff. Ces vecteurs sont composés de deux cassettes d'expression : une première cassette contenant l'ADNc RPE65 humain sous le contrôle du promoteur TetO-CMV<sub>min</sub> (voir introduction) et une seconde cassette contenant la protéine chimérique tTA2 ou rtTA-M2 sous le contrôle du promoteur fort CAG. Après injection du vecteur AAV2/4-TetOff-RPE65, la protéine RPE65 sera synthétisée spontanément et l'administration de doxycycline entraînera l'arrêt de la synthèse de la protéine. Au contraire, après injection du vecteur AAV2/4-TetOn-RPE65, la protéine RPE65 ne sera pas synthétisée spontanément et la synthèse n'aura lieu qu'avec l'administration de doxycycline. Dans ces deux vecteurs, le

transgène RPE65 est sous le contrôle d'un promoteur CMV modifié, alors que dans les études précédentes (Le Meur *et al.*, 2007), le transgène RPE65 était sous le contrôle du promoteur RPE65 humain. Nous avons donc utilisé deux vecteurs supplémentaires non régulable portant le transgène RPE65 sous le contrôle du promoteur CMV long ou du promoteur RPE65 humain (vecteur utilisé dans Le Meur *et al.*, 2007), dans le but de pouvoir comparer les niveaux d'expression protéique en fonction du promoteur.

Trois chiens ont été injectés avec l'AAV2/4-TetOff-RPE65 et deux chiens ont été injectés avec l'AAV2/4-TetOn-RPE65. Un chien témoin a été injecté avec le vecteur utilisé dans l'étude précédente, à savoir l'AAV2/4-RPE65-RPE65. Un chien a été injecté avec l'AAV2/4-CMV-RPE65. Tous les briards ont été injectés en sous-rétinien à l'âge de 9 ou 10 mois et ont reçu des volumes de vecteurs de 280 à 600  $\mu$ l à une dose de  $10^{11}$  vg/ml. Des ERG ainsi que des tests de comportements ont été effectués régulièrement pour tester la fonction rétinienne et visuelle. Avant la chirurgie, tous les animaux présentaient des ERG plats et des tests de comportement indiquant une cécité congénitale.

### **Résultats chez le chien RPE65-déficient**

#### **Régulation à long terme de la fonction rétinienne chez les chiens RPE65-déficients après une injection sous-rétinienne d' AAV2/4-TetOff-RPE65 (Figure 3 Lhériveau *et al.*, en cours de soumission).**

Pour les chiens injectés avec le vecteur régulable TetOff, des ERG ont d'abord été effectués sans administrer de doxycycline aux animaux. Chez les trois chiens (A1, A2 et A3), une fonction rétinienne apparaît dès deux mois, augmente jusqu'à trois mois puis se stabilise. Malheureusement, à trois mois post-injection, les tests de comportements ne sont pas concluants montrant ainsi qu'une restauration de fonction rétinienne de 35 et 42 $\mu$ V n'est pas suffisante pour assurer la fonction visuelle.

Puis, de la doxycycline a été administrée à ces chiens sous la forme de comprimés (à une dose de 10mg/kg) donnés quotidiennement. Des ERG ont alors été effectués un mois après l'induction à la doxycycline. Ces ERG ont montré que la fonction rétinienne avait totalement disparu, ce qui indique que la protéine RPE65 n'est plus synthétisée et qu'il ne reste pas non plus de protéine RPE65 qui se serait accumulée dans les cellules de l'EPR.

La doxycycline a alors été retirée et de nouveaux ERG ont montré la réapparition du signal rétinien avec un temps de latence d'un ou deux mois en fonction des individus, à une amplitude équivalente à la première fois (entre 30 et 50 $\mu$ V).

Enfin, une nouvelle administration de doxycycline a permis de mettre en évidence la reproductibilité du phénomène.



Lors de la dernière induction de l'expression de la protéine RPE65 (doxycycline retirée), les animaux sont restés 6 mois en configuration ON. Une légère augmentation de l'amplitude de l'ERG max a été observée entre 3 et 6 mois post-induction.

**Régulation à long terme de la fonction rétinienne chez les chiens RPE65-déficients après une injection sous-rétinienne d' AAV2/4-TetOn-RPE65 (Figure 4 Lhériveau et al., en cours de soumission).**

Des expériences équivalentes ont été menées chez les chiens injectés avec le vecteur TetOn à la différence que la fonction rétinienne est restaurée grâce à l'administration orale de doxycycline et annulée après arrêt de l'antibiotique. La cinétique d'apparition et de disparition du signal rétinien (2 mois pour l'apparition du signal ERG puis augmentation jusqu'au troisième mois et stabilisation, 1 mois pour la disparition totale du signal), ainsi que l'amplitude maximale des ERG (entre 20 et 50 $\mu$ V) sont équivalentes à celles obtenues avec le vecteur TetOff.

**Comparaison entre les chiens traités avec les vecteurs régulables et les chiens contrôles (non affecté ou injectés avec des vecteurs constitutifs) (Figure 5 Lhériveau et al., en cours de soumission).**

Nous avons pu observer une différence de réponse électrorétinographique entre le chien non affecté, le chien injecté avec l'AAV2/4-RPE65-RPE65 et le chien injecté avec l'AAV2/4-CMV-RPE65. En effet, à l'âge de 12 mois, le chien non affecté présentait un ERG max d'une amplitude d'environ 250  $\mu$ V alors que trois mois après la chirurgie, le chien ayant reçu le vecteur avec le promoteur RPE65 avait une réponse ERG de 97 $\mu$ V et le chien qui avait reçu le vecteur avec le promoteur CMV avait une réponse ERG de seulement 43 $\mu$ V. Les tests de comportement effectués chez ces trois animaux ont montré que le chien non affecté et le chien injecté avec le vecteur AAV2/4-RPE65-RPE65 étaient capable de traverser le parcours d'obstacle sans se cogner alors que le chien injecté avec le vecteur AAV2/4-CMV-RPE65 en était incapable 3 mois après le traitement.

Chez le chien injecté avec le vecteur AAV2/4-CMV-RPE65, l'amplitude de l'ERG max augmente significativement entre 3 et 6 mois (de 43 $\mu$ V à 73  $\mu$ V) puis se stabilise entre 6 et 9 mois. Six mois après le traitement ce chien est capable de traverser le parcours d'obstacle sans se cogner. Ces résultats semblent indiquer qu'une restauration de fonction rétinienne de moins de 60  $\mu$ V n'est pas suffisante pour assurer la fonction visuelle. Ceci suggère que la force du promoteur CMV dans les cellules de l'EPR est moins grande que celle du promoteur endogène RPE65, mais il serait nécessaire d'injecter d'autres chiens avec ces mêmes vecteurs pour confirmer cette hypothèse.

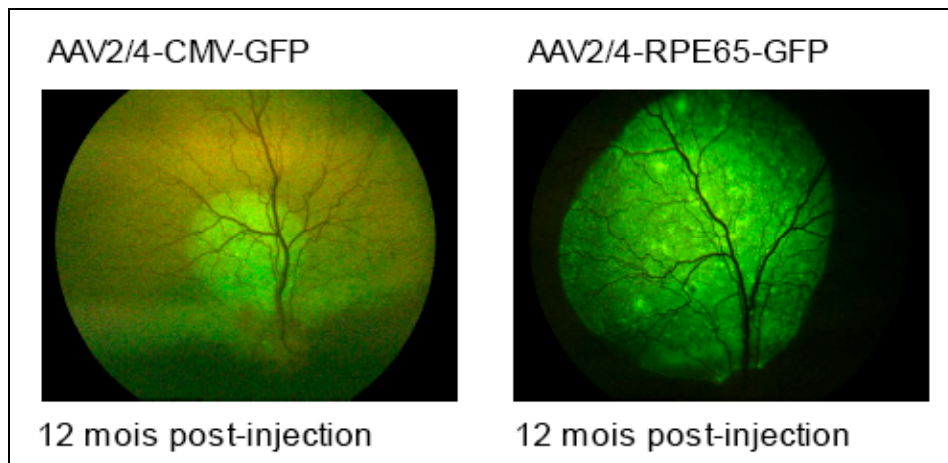
Toutefois, nous avons déjà observé cette différence de force des promoteurs chez des chiens injectés avec des vecteurs AAV2/4-CMV-GFP et AAV2/4-RPE65-GFP. En effet, le signal GFP était beaucoup plus intense avec le vecteur portant le promoteur tissu-spécifique RPE65 (Figure 35).

### **Le traitement par des vecteurs régulables à la doxycycline ne permet pas de restaurer la fonction visuelle.**

Chez tous les chiens traités avec les vecteurs AAV2/4-TetOff-RPE65 et AAV2/4-TetOn-RPE65, l'amplitude maximum de l'onde b obtenue en conditions scotopiques n'a pas excédée 50-60  $\mu$ V, ce qui est en accord avec les résultats obtenus après l'injection du vecteur non régulable AAV2/4-CMV-RPE65. Malheureusement, le faible niveau d'expression protéique obtenu avec le promoteur ubiquitaire CMV et les systèmes dérivés de ce promoteur (TetO-CMV<sub>min</sub>) présents dans les vecteurs TetOn et TetOff ne permet pas de restaurer la fonction visuelle et empêche également la possibilité de réguler plus finement le niveau d'expression protéique en fonction de la dose de doxycycline administrée. Dans l'étude précédente (Le Meur *et al.*, 2007), l'amplitude maximum de l'onde b obtenue en conditions scotopiques chez les cinq chiens injectés avec le vecteur AAV2/4-RPE65-RPE65 était comprise entre 94 et 110 V. Ces observations montrent que le promoteur RPE65 humain permet une expression plus forte que le promoteur CMV et ses dérivés régulables TetO-CMV<sub>min</sub> dans les cellules de l'EPR *in vivo* et permet ainsi une meilleure restauration de la fonction rétinienne chez les chiens RPE65<sup>-/-</sup>.

### **Conclusions**

Ces données nous permettent d'affirmer qu'il est possible de réguler la fonction rétinienne chez le chien RPE65<sup>-/-</sup> en modulant l'expression du transgène RPE65 grâce à un vecteur AAV recombinant portant le système inductible à la tétracycline (configuration ON ou OFF). Toutefois, les vecteurs développés dans notre étude n'ont pas permis d'une part de restaurer la fonction visuelle et d'autre part de réguler le niveau d'expression de RPE65 en fonction de la dose de doxycycline administrée. Or, la possibilité de réguler finement le niveau d'expression de la protéine transgénique dans la rétine semble être un élément clé. Pour poursuivre cette étude, il semble donc indispensable de développer de nouveaux vecteurs régulables portant le transgène RPE65 sous le contrôle d'un promoteur qui soit beaucoup plus fort dans les cellules de l'EPR : le promoteur RPE65 humain par exemple.



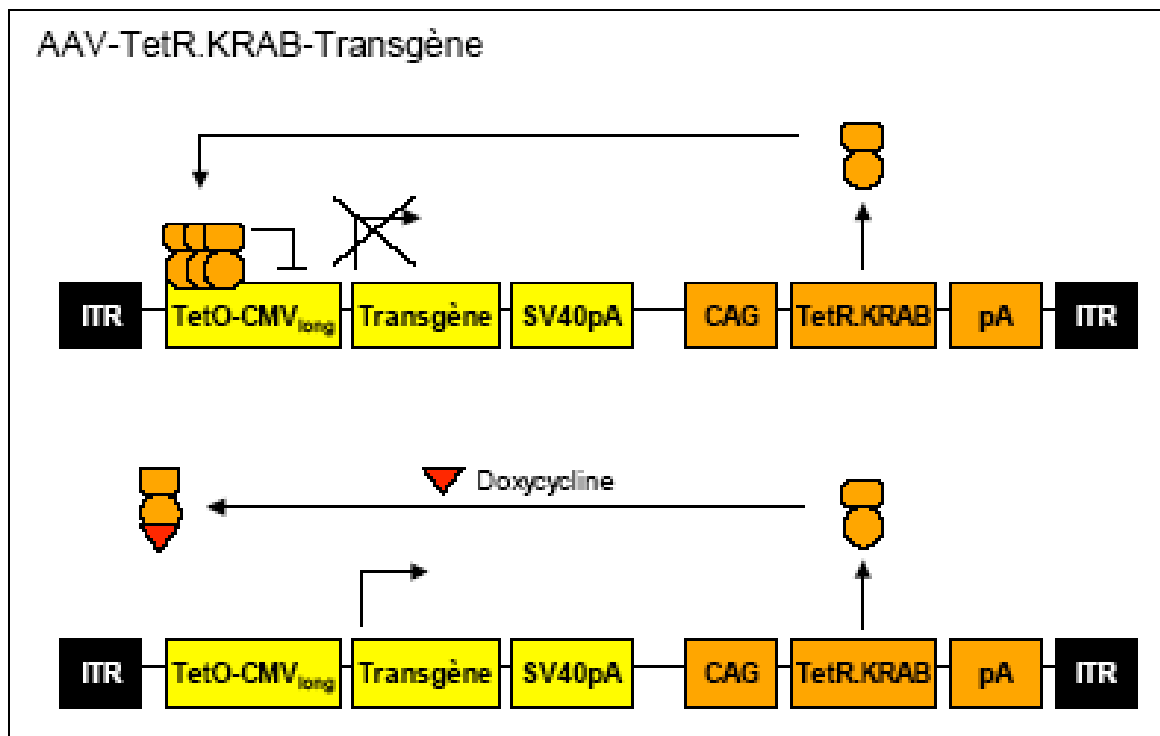
**Figure 35 : Force des promoteurs RPE65 et CMV dans les cellules de l'EPR.**

Photographies de fond d'œil réalisées 12 mois post injection chez le chien. Le cliché de gauche montre le signal GFP chez un chien injecté avec un vecteur AAV2/4-CMV-GFP, tandis que le cliché de droite montre le signal GFP chez un chien injecté avec un vecteur AAV2/4-RPE65-GFP. Le signal observé dans les cellules de l'EPR est beaucoup plus intense avec le promoteur tissu-spécifique RPE65.

## Perspectives

Pour générer des vecteurs régulables portant le transgène RPE65 sous le contrôle du promoteur RPE65 humain, nous souhaitons utiliser le système TetR.KRAB. L'équipe de Deuschle a développé un système où la protéine TetR est fusionnée avec le domaine transrépresseur KRAB issu de la Zing Finger protéine Kox1, formant ainsi un transinhibiteur appelé TetR.KRAB ou tTS (Deuschle *et al.*, 1995). Les Zing Finger protéines sont des protéines régulatrices et leurs domaines KRAB sont connus pour inhiber toutes les ADN Polymérase I et II situées dans les 3 kb autour du site de liaison à l'ADN. Le mécanisme par lequel le transrépresseur KRAB inhibe l'expression des gènes n'est pas entièrement connu. Trois mécanismes semblent toutefois être impliqués : un changement de la structure de la chromatine, une désacétylation des histones et une modification de l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle. Le système inductible TetR.KRAB est composé du transinhibiteur du même nom sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire fort CAG et d'une seconde cassette d'expression où le transgène d'intérêt est placé sous le contrôle d'un promoteur composé du domaine de liaison à l'ADN TRE fusionné au promoteur constitutif CMV long (Figure 36). Sans doxycycline, la partie TetR du TetR.KRAB vient se fixer au domaine TRE, et le transrépresseur KRAB empêche l'activation transcriptionnelle du CMV long. En présence de doxycycline, la partie TetR change de conformation spatiale, ne peut se fixer au domaine TRE et le promoteur constitutif CMV active l'expression du transgène. L'intérêt de ce système est qu'il permet de mettre le transgène sous le contrôle du promoteur constitutif désiré, dans notre cas, le promoteur humain RPE65.

Nous aurions voulu, dans un premier temps, construire un vecteur AAV2/4-TetR.KRAB portant le transgène rapporteur GFP sous le contrôle du promoteur RPE65 humain, dans le but de tester chez le rat *in vivo* (par une cinétique +/- Dox dont le suivi serait effectué par photographies du fond d'œil) l'efficacité du promoteur RPE65 dans un contexte régulable à la doxycycline. La seconde étape aurait consisté à remplacer la GFP par l'ADNc RPE65 et à tester le vecteur chez le briard RPE65<sup>-/-</sup>. Malheureusement, ce projet n'a pas pu être initié car la taille des cassettes (TetO-pRPE65-GFP/RPE65-pA // CAG-TetR.KRAB-pA) était trop importantes (5,5-6 kb) pour que celles-ci puissent être encapsidées dans un vecteur AAVr. Une solution aurait pu consister à utiliser un autre vecteur comme le lentivirus non-intégratif dont la capacité d'encapsidation est de 8 kb. Mais l'injection sous-rétinienne de vecteur lentiviral, quelque soit sa méthode de purification, chez le gros animal et en particulier le chien, entraîne une réponse immunitaire importante systématique invalidant les effets du transfert de gène (observations effectuées au laboratoire).



**Figure 36 : Le système régulable TetR.KRAB.**

Le vecteur AAV-TetR.KRAB-Transgène est composé de deux cassettes d'expression. La première cassette contient le transgène sous le contrôle du promoteur TetO-CMV<sub>long</sub>. La seconde cassette comprend le transrépresseur TetR.KRAB sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CAG. En absence de doxycycline, le TetR.KRAB se fixe sur la séquence TetO et inhibe le promoteur CMV long. Le transgène n'est pas transcrit. En présence de doxycycline, le transrépresseur change de conformation spatiale et ne peut plus se fixer sur la séquence TetO, le CMV long initie alors la transcription du transgène.

# Discussion générale

### 3. Discussion générale.

Le premier objectif que nous nous étions fixé dans cette thèse était de caractériser la pathologie du teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup> et de développer un vecteur qui cible spécifiquement les photorécepteurs. Cet objectif est atteint puisque nous avons pu déterminer que le transfert de gène chez ce chien devrait s'effectuer dès l'âge de 8 ou 9 semaines à cause de la précocité et de la rapidité de la pathologie, et que le vecteur AAV2/5 portant un transgène sous le contrôle du promoteur rhodopsine kinase permettait de transduire efficacement et exclusivement les cônes et les bâtonnets chez le chien.

Notre deuxième objectif était d'évaluer l'efficacité d'un vecteur AAV2/5 portant le gène RPGRIP1 sous le contrôle du promoteur rhodopsine kinase pour restaurer la fonction rétinienne et visuelle chez le teckel RPGRIP1-déficient.

Si l'on compare le transfert de gène chez le briard RPE65<sup>-/-</sup> et le transfert de gène chez le teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup>, un certain nombre de difficultés supplémentaires apparaissent.

Chez le briard RPE65<sup>-/-</sup>, les cellules ciblées par le vecteur AAV recombinant sont les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Or chaque cellule de l'EPR est en contact étroit avec environ 25 photorécepteurs, ce qui signifie que lorsque l'on restaure la fonctionnalité d'une cellule de l'EPR, 25 photorécepteurs voient leur activité également restaurée. Chez le teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup>, les cellules ciblées par le vecteur sont les photorécepteurs ce qui implique qu'il faudra transduire 25 fois plus de cellules pour obtenir un effet thérapeutique similaire.

L'autre différence majeure qui apparaît est celle de la différence de fonction des protéines RPE65 et RPGRIP1. En effet, RPE65 est une enzyme (une isomérolase) du cycle des rétinoïdes qui permet le recyclage des molécules de photopigment dans les cellules de l'EPR. Un défaut dans le gène RPE65 entraîne un arrêt du cycle des rétinoïdes et donc de la cascade de phototransduction puisqu'il n'y a plus de molécule de rhodopsine disponible, mais il n'entraîne pas de défaut au niveau de la structure rétinienne. Lorsque l'on amène le vecteur AAV-RPE65, l'enzyme est produite dans les cellules de l'EPR dès 15 jours et le all trans-retinal est à nouveau isomérisé en 11 cis-retinal. Le photopigment est alors restauré et la phototransduction peut à nouveau avoir lieu. La vision est ainsi restaurée chez les individus traités.

Au contraire, RPGRIP1 est une protéine de structure des photorécepteurs. Un défaut dans le gène RPGRIP1 entraîne une morphologie anormale voire une absence de segments externes des photorécepteurs. Lorsque le vecteur AAV-RPGRIP1 va être apporté dans les photorécepteurs, la protéine produite va devoir dans un premier temps permettre une restauration de la structure des segments externes des photorécepteurs, puis dans un second temps, la cascade de phototransduction pourra se remettre en fonctionnement, ce qui engendrera certainement un délai d'efficacité.

Le vecteur AAV2/5-Rk-hRPGRIP1 a été injecté en sous-rétinien chez le teckel RPGRIP1-déficient (n=4). Malheureusement, dès trois mois après l'injection, l'amplitude de l'onde b en conditions scotopiques a chuté dramatiquement dans l'œil injecté par rapport à l'œil non injecté. De plus, dans l'œil traité, la courbe de l'ERG max a perdu les oscillations caractéristiques du passage du signal électrique dans les différentes couches neuronales. Ceci indique que non seulement le transfert de gène n'a pas permis de maintenir la fonction des bâtonnets ou de restaurer la fonction des cônes mais qu'il a en outre engendré des effets délétères. Nous en avons déduit que l'homologie entre la protéine humaine et canine n'était pas suffisante et nous avons cloné l'ADNc RPGRIP1 canin puis construit des vecteurs portant ce gène canin.

Une des grandes difficultés que nous avons rencontrée lors de ce projet a été le manque d'animaux à injecter. En effet, il nous a fallu attendre de nombreux mois avant de pouvoir injecter les vecteurs synthétisés car nous rencontrions des problèmes de reproduction dans notre colonie de teckels RPGRIP1-déficients. Ceci peut s'expliquer par plusieurs raisons. Tout d'abord le mini teckel à poils longs est une race de chien très fragile qu'il est difficile de faire reproduire en captivité. De plus, pour maintenir le statut homozygote malade des individus à naître, les chiens ont été croisés au sein d'une même famille sur un grand nombre de générations aboutissant à une consanguinité importante porteuse d'anomalies génétiques affectant les fonctions reproductrices ou d'anomalies léthales *in utero*. Pour résoudre ce problème, nous avons dû faire appel à une vétérinaire spécialisée dans l'élevage des teckels, Françoise Lemoine (Clinique Vétocéane, Vertou). Avec son aide, nous avons entrepris de diluer la consanguinité au sein de notre colonie en croisant les individus malades avec des chiens sains de race ou d'origine génétique différente. Mais ces différents croisements ont pris beaucoup de temps.

Pour toutes les raisons que nous venons d'évoquer, les vecteurs RPGRIP1 canins n'ont pu être injectés qu'en juin 2009. Lors de la rédaction de ce manuscrit, nous ne disposons que d'un recul de 4 mois après l'injection des vecteurs. Compte-tenu du manque de maturité des



rétines des chiens injectés lors des premiers ERG, du nombre de chiens injectés (n=1 pour chacun des 2 vecteurs) et du temps nécessaire pour observer les effets de notre traitement, nous ne pouvons à l'heure actuelle pas interpréter nos résultats.

Enfin, notre troisième et dernier objectif était d'évaluer chez le chien briard RPE65<sup>-/-</sup>, la possibilité de réguler l'expression du transgène RPE65 grâce à des vecteurs AAV recombinants portant le système réguleable à la tétracycline. Le but final de ce projet était de pouvoir délivrer dans la rétine du briard RPE65<sup>-/-</sup> la concentration optimale en protéine RPE65, pour permettre la meilleure restauration de vision. Pour cela, nous souhaitions pouvoir faire varier le niveau d'expression de la protéine RPE65 dans la rétine grâce à l'administration ou à la privation en doxycycline. Nous voulions également pouvoir réguler l'amplitude des réponses rétiniennes (ERG) grâce à différentes doses de doxycycline. Une partie seulement des objectifs a été atteinte. En effet, nous avons pu restaurer une fonction rétinienne chez les animaux traités avec les vecteurs AAV-TetOff-RPE65 et AAV-TetOn-RPE65, puis annuler cette fonction par l'administration ou non de doxycycline, et ce de façon répétée. Toutefois, nous n'avons pas réussi à restaurer la fonction visuelle chez ces animaux puisque les amplitudes électrorétinographiques obtenues avec de tels vecteurs ne sont pas assez importantes. Au vu des faibles amplitudes obtenues, nous n'avons pas pu explorer notre deuxième objectif de modulation de la réponse ERG. La suite de ce projet consiste donc à développer des vecteurs régulables qui permettront d'obtenir des amplitudes ERG beaucoup plus fortes, de façon à restaurer la vision et à pouvoir moduler l'amplitude des réponses rétiniennes en fonction de la dose de doxycycline administrée.

# Annexe

#### **4 Annexe.**

Publication d'une revue sur les essais de thérapie génique chez le primate non-humain et le chien.

*ILAR Journal*

#### **AAV-mediated gene therapy for retinal disorders in large animal models.**

ILAR J. 2009;50(2):206-24. Review. Erratum in: ILAR J. 2009;50(3):E1. Lhériveau, Elsa [corrected to Lhériveau, Elsa].

Knut Stieger , Elsa Lhériveau, Philippe Moullier , and Fabienne Rolling.

*Knut Stieger, Elsa Lh riteau, Philippe Moullier, and Fabienne Rolling*

### Abstract

Retinal gene therapy holds great promise for the treatment of inherited and noninherited blinding diseases such as retinitis pigmentosa and age-related macular degeneration. The most widely used vectors for ocular gene delivery are based on adeno-associated virus (AAV) because they elicit minimal immune responses and mediated long-term transgene expression in a variety of retinal cell types. Extensive preclinical evaluation of new strategies in large animal models is key to the development of successful gene-based therapies for the retina. Because of differences in the retinal structures among species and unique structures such as the macula and fovea in the primate retina, nonhuman primates are widely used as preclinical animal models. But the observation of inherited retinal degenerations in dogs, which share a number of clinical and pathologic similarities with humans, has led to the characterization of several canine models for retinal diseases, one of which has already responded successfully to AAV-mediated gene therapy. This article presents a review and detailed discussion of the various large animal models available for the study of AAV-mediated gene-based therapies in the retina.

**Key Words:** adeno-associated virus (AAV); dog model; gene therapy; nonhuman primate; retinal disorders

### Introduction

Significant progress in understanding the molecular basis of a variety of retinal disorders has led to the development of gene therapies for treatment of these diseases. Of all the vectors that have been evaluated in the eye, recombinant adeno-associated virus (rAAV<sup>1</sup>) is poten-

tially the most useful for the treatment of retinal diseases as its tropism and transduction patterns lead to efficient and stable gene transfer in a variety of retinal cell types. The retinal diseases that have been studied for suitability of gene-based therapies include retinal degenerative diseases, such as retinitis pigmentosa (RP) and Leber congenital amaurosis (LCA), and neovascular diseases, such as age-related macular degeneration (AMD<sup>1</sup>), diabetic retinopathy (DR), and retinopathy of prematurity (ROP).

Recombinant AAV-mediated gene therapy studies have involved gene transfer to spontaneous as well as transgenic animal models of the diseases. Evaluation of rAAV-mediated gene transfer in the eye of large animals is highly relevant to clinical development as large animals' eyes are anatomically more similar to the human eye than those of mice or rats. Retinal degenerative diseases occur naturally in the canine and feline population, and large animal models for retinal neovascular disorders have been generated in pigs and nonhuman primates, but only dogs and nonhuman primates have been the subject of experimental studies for the development of adeno-associated viral (AAV<sup>1</sup>)-mediated gene therapy.<sup>2</sup>

The nonhuman primate in particular has ocular anatomic features virtually identical to those of humans (including the macula) and its components are of similar proportion. Moreover, surgical procedures for vector delivery and the amount of injected vector for primates are similar to those for humans. In addition, primates' immunological and biological similarity to humans is essential for determining tolerance to vectors before clinical trials. However, there are no naturally occurring models for inherited retinal dystrophies in nonhuman primates.

The fact that many human genetic diseases have their equivalent in the canine population allows for the evaluation of gene therapy in dogs affected by diseases that mimic their human counterpart. For example, close similarities in the clinical characteristics of the disease resulting from RPE65 gene mutations (mutations in the gene encoding the retinal pigment epithelium [RPE<sup>1</sup>]-specific 65-kDa protein) make the RPE65<sup>-/-</sup> Briard dog a valuable model for the evaluation of gene therapy for this disease. Indeed, after extensive

Knut Stieger, DVM, PhD, is postdoctoral fellow in the Department of Ophthalmology at Justus-Liebig-University in Giessen, Germany; Elsa Lh riteau is a PhD student, Philippe Moullier, MD, PhD, is Director, and Fabienne Rolling, PhD, is a principal investigator, all at the INSERM U649 Laboratory in Nantes, France.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Fabienne Rolling, Laboratoire de Thérapie G nrique, INSERM U649, CHU Hôtel-Dieu, B timent J. Monnet, 30 Avenue J. Monnet, 44035 Nantes CEDEX 01, France or email fabienne.rolling@univ-nantes.fr.

<sup>1</sup>Abbreviations used in this article: AAV, adeno-associated virus; a.c.f., anterior chamber fluid; AMD, age-related macular degeneration; bp, base pair; CNV, choroidal neovascularization; EPO, erythropoietine; ERG,

electroretinogram; GFP, green fluorescent protein; LCA, Leber congenital amaurosis; ORF, open reading frame; rAAV, recombinant adeno-associated virus; RP, retinitis pigmentosa; RPE, retinal pigment epithelium; VEGF, vascular endothelial growth factor

<sup>2</sup> Most such studies use the *Macaca fascicularis* (see Table 1).

evaluation in RPE65<sup>-/-</sup> dogs, gene therapy for inherited retinal degeneration due to RPE65 deficiency is now being tested in three concurrent clinical trials.

For all these reasons, nonhuman primates and canine models of retinal diseases are key tools to develop and evaluate gene transfer as a treatment. In this article we provide an overview of retinal degenerative and neovascular disorders in humans and review the current large animal models for retinal AAV-mediated gene therapy, their applications, their great intrinsic value, and their potential to facilitate the clinical translation of findings.

## Retinal Disorders in Humans

In this first section we provide an overview of the different retinal degenerative and neovascular disorders in humans that may be suitable for potential gene-based therapies.

### Retinal Degenerative Disorders

#### *Retinitis Pigmentosa (RP)*

There are three groups of hereditary degenerative disorders of the retina, based on which type of photoreceptor manifests the primary insult, rods or cones. The three types of disorder are rod-cone dystrophies (retinitis pigmentosa, RP<sup>1</sup>), cone-rod dystrophies (inverse RP), and cone dystrophies (maculopathies). Visual symptoms for all three indicate the gradual loss of the two photoreceptor types: rods, which mediate achromatic vision under poor lighting conditions; and cones, which are important for color vision and visual acuity in daylight. In this section we focus on the first two types.

RP has a worldwide prevalence of 1 in 4000 people, leading to 1 million total affected individuals worldwide (Berson 1993; Hartong et al. 2006; Puech et al. 1991). One in ten cases is inverse RP.

The onset of RP can vary significantly: some patients lose vision very early in life whereas others remain asymptomatic until midadulthood (Hartong et al. 2006). All RP patients eventually develop difficulties with dark adaptation and night blindness and subsequently loss of midperipheral visual field. Patients with inverse RP rapidly lose central vision and develop abnormalities of color vision associated with a variable degree of nystagmus and photophobia. Over time, rod system abnormalities lead to impaired peripheral vision (Michaelides et al. 2006; Rabb et al. 1986).

Most cases of RP are monogenic, but the disease itself is very heterogeneous. Researchers have associated about 200 loci with retinal dystrophies, and identified and characterized about 45 genes that cause RP<sup>3</sup> (Hartong et al. 2006). Interestingly, these 45 genes collectively account for only a little over half of all patients. There are three predominant

modes of inheritance of RP: autosomal recessive (50-60%), autosomal dominant (30-40%), and X-linked (5-15%) (Hartong et al. 2006). Other forms of inheritance, such as uniparental isodisomy or non-Mendelian inheritance (mitochondrial or digenic), occur only very rarely. Most genes cause only a small proportion of cases, but there are some exceptions; for example, the RHO gene causes about 25% of autosomal dominant RP cases, the USH2A gene causes 20% of autosomal recessive cases, and RPGR causes 70% of X-linked cases. Mutations in these three genes account for about 30% of all RP cases (Hartong et al. 2006).

The roles of the proteins encoded by many of these genes have been deciphered recently, and knowledge of the molecular function may help researchers to better understand the pathways that lead to photoreceptor degeneration and visual loss. These proteins are involved in the visual cycle that includes the phototransduction cascade and the retinoid cycle. Other proteins are structural or cytoskeletal proteins, while still others are signaling proteins, transport and trafficking proteins, transcription factors, and proteins involved in phagocytosis and pH regulation (Hartong et al. 2006). Although these proteins are involved in a variety of biochemical pathways, mutations in one of the corresponding genes eventually leads to degeneration of the retina due to loss of photoreceptors. The mechanisms by which the genetic defects lead to photoreceptor cell death are still not clearly understood, but recent advances shed light on some of them. The final pathway in all cases is apoptosis (Marigo 2007).

#### *Leber Congenital Amaurosis (LCA)*

Leber congenital amaurosis (LCA<sup>1</sup>) is the most severe form of all hereditary retinal dystrophies and is responsible for congenital blindness, with an estimated prevalence of about 5% of all cases of RP (Kaplan et al. 1990; Koenekeop 2004). Symptoms include severe impairment of visual function at birth or within the first months of life. In infants, these signs include the inability to visually fix on objects, nystagmus, a diminished photomotor reflex, and the presence of the oculodigital Franceschetti sign. The funduscopic image of such patients is normal and the electroretinogram (ERG<sup>1</sup>) nonrecordable (Koenekeop 2004).

LCA is a genetically heterogeneous condition. In most cases the inheritance pattern is autosomal recessive, although some autosomal dominant mutations are known. To date, 14 genes are known to contribute to the onset of the disease: IMPDH1, AIPL1, CRB1, CEP290, CRX, GUCY2D, LCA5, LRAT, MERTK, RD3, RDH12, RPGRIP1, TULP1, and RPE65. Mutations in these genes account for about 70% of all cases of LCA, thus many genes responsible for the onset of this disease remain undiscovered (den Hollander et al. 2008).

The identified genes have important roles in several different biochemical pathways in the retina and also cause some forms of RP. The same mechanisms of photoreceptor

<sup>3</sup> For further information about these and other retinal disorders, we refer readers to the online database "Summaries of Genes and Loci Causing Retinal Diseases" (<http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/sum-dis.htm>).

cell death seen in RP also lead to retinal degeneration in LCA, and their common final pathway is, as mentioned above, apoptosis (Marigo 2007).

## Retinal Neovascular Disorders

### *Age-Related Macular Degeneration (AMD)*

Age-related macular degeneration (AMD) is the largest single cause of severe visual impairment in individuals over 50 years of age worldwide, and its prevalence continues to increase. This disease is diagnosed in 2% of the population between the ages of 45 and 65, in 12% of those aged 65 to 75, and in 30% of individuals older than 75 (Friedman et al. 2004; Klein et al. 1992).

Recent etiological research has shown that AMD most likely results from interactions of multiple genes and environmental factors (Chamberlain et al. 2006; Donoso et al. 2006; Haddad et al. 2006). The most well-established demographic and environmental risk factors are increasing age and cigarette smoking (Klaver et al. 2001; Klein et al. 2007; Tomany et al. 2004; Wang et al. 2007); fat intake and obesity also play a role. Protective effects have been associated with antioxidants, nuts, fish, and omega-3 fatty acids (Seddon et al. 1994, 2003). Recent findings showed a strong association of the complement factor H (CFH) with the onset of AMD (Edwards et al. 2005; Haines et al. 2005; Klein et al. 2005). One single nucleotide polymorphism, Tyr402His in the CFH gene, is linked to about 50% of all cases of AMD. As this factor is found in drusen, and all complement factors are generally upregulated during smoking, the role of inflammation in the pathogenesis of AMD may be important.

There are two types of AMD: the atrophic form, called “dry” AMD, and the exudative form, called “wet” AMD (Bird et al. 1995). Typical clinical signs of the atrophic form of the disease are drusen, pigmentary changes, pigmentary epithelial defects, disciform scarring, and geographic atrophy. The dry form occurs in patients at the beginning of the disease and can later develop into the wet form, which is characterized by choroidal neovascularization (CNV<sup>1</sup>), hemorrhage, and retinal detachment. Although only 10% of all patients develop the wet form of the disease, they account for most cases of severe visual loss (Ambati et al. 2003; Ferris et al. 1984). Patients affected with both forms of AMD have metamorphopsia, loss of visual acuity, and color vision problems because the pathologic changes are mostly apparent in the macula region of the retina. These symptoms profoundly affect patients in their daily life as they lose the ability to read, write, and drive.

Choroidal neovascularization during the wet form of the disease is due to a change in the balance of growth factors in the eye that regulate the vascularization of the choroid and the retina (Campochiaro 2000; Holz et al. 2004). How this balance is changed is not exactly known, but one hypothesis cites hypoxic conditions due to a thickening of the Bruch’s membrane (Green and Enger 1993; Grunwald et al. 1998).

Another suggests that inflammation plays a role in the onset of CNV (Ryan 1982); material found in drusen, and the recent discovery that a specific complement factor H polymorphism is a risk factor for CNV, seem to confirm this theory (Donoso et al. 2006). In all cases, damage to the Bruch’s membrane leads to the growth of new vessels into the ruptured site and the concomitant proliferation and thickening of the retinal pigment epithelium (Campochiaro 2000).

The most important growth factors in the retina are vascular endothelial growth factor (VEGF<sup>1</sup>) and pigment epithelium-derived factor (PEDF) (Ferrara and Kerbel 2005; Witmer et al. 2003). Other factors that regulate neovascularization are angiopoietins (proangiogenic factors) and angiostatins and endostatins (antiangiogenic factors). High concentrations of VEGF have been found in surgically resected choroidal neovascular membranes from AMD patients, indicating the importance of VEGF in the mechanisms that lead to CNV (Lopez et al. 1996). PEDF is responsible for the suppression of inward growth of blood vessels from the choroid into the Bruch’s membrane, thus keeping it non-vascular (Dawson et al. 1999; Eichler et al. 2004).

Standard treatment includes argon laser photocoagulation and photodynamic therapy (PDT) (Chong and Bird 1998). Increasing knowledge about the pathogenesis of CNV, especially the involvement of growth factors in the onset of new vessels, has facilitated the development (Ferrara and Kerbel 2005) and widespread use of a range of synthetic proteins to block new vessel growth in treatment protocols for this disease (Bashshur et al. 2006; Brown et al. 2006; Ng and Adamis 2006; Rosenfeld et al. 2006).

### *Diabetic Retinopathy (DR)*

Diabetic retinopathy (DR) accounts for about 5% of all visually impaired persons (almost 5 million people worldwide) and is the most common cause of vision impairment in working-age adults (20-65 years) (Klein et al. 1992). Twenty percent of all patients with diabetes mellitus will develop retinal neovascularization, the major cause of vision loss in this disease.

Patients with DR experience central vision loss and impaired peripheral vision. The disease is a progressive, microvascular complication of diabetes mellitus that causes damage to retinal capillaries (Ting and Martin 2006). The complication, termed microangiopathy, involves damage of the endothelial cells lining the retinal blood vessels and pericytes, resulting in microaneurysms and the subsequent closure of blood vessels. This first stage of the disease is nonproliferative DR, in which clogged retinal blood vessels lead to ischemia in the surrounding tissue. This results in retinal neovascularization (RNV), which is the next stage of the disease, now called proliferative DR. The newly formed vessels, weak and prone to damage, eventually rupture, causing hemorrhage and macular edema (Campochiaro 2000; Kent et al. 2000). In addition, contraction of fibrovascular proliferations in the retina may cause retinal detachment (Frank 2004; Ting and Martin 2006).

RNV results from both a hypoxia-induced increase in the expression levels of VEGF and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and a decrease in antiangiogenic factors such as PEDF (Aiello 2005; Ferrara and Kerbel 2005; Frank 2004). Animal studies using various VEGF inhibitors have directly demonstrated the role of VEGF as a key mediator of ischemia-induced retinal neovascularization in DR (Adamis et al. 1996; Aiello et al. 1995; Robinson et al. 1996), and have described elevations of VEGF levels in the aqueous and vitreous humor of human eyes with DR (Aiello et al. 1994; Malecaze et al. 1994) and the upregulation of VEGFR-2 on endothelial membranes of retinal capillaries (Witmer et al. 2003).

## Recombinant AAV Gene Transfer in the Retina of Dogs and Nonhuman Primates

In this section we provide an overview of the basic mechanisms of AAV-mediated gene transfer, cellular tropism in the retina, and biodistribution of AAV vectors after retinal gene transfer in large animals. Studies in these areas are essential for the development of AAV-mediated gene therapy protocols, which we also describe below.

The generation of new information about these important aspects of viral vector-mediated gene transfer into the eye has depended on a variety of animal models, most of them genetically engineered mice (Auricchio and Rolling 2005; Buch et al. 2008). But spontaneous mutations have led to retinal degenerations in dogs that have been thoroughly characterized and have served as animal models for gene therapy. Because of differences of retinal structures among species and unique structures (such as the macula and fovea) in the primate retina, nonhuman primates are also useful as preclinical animal models.

## AAV as Vector for Gene Transfer into the Retina

Adeno-associated viruses are considered nonpathogenic, contain a single-stranded DNA genome, and are able to infect a variety of dividing and nondividing cells. These characteristics make AAV-derived vectors favorable for many applications in gene therapy, especially in the retina (Warrington and Herzog 2006). AAVs belong to the family of parvoviridae and are among the smallest known viruses, without envelope and approximately 19 to 21 nm (Siegl et al. 1985). They were first discovered as a small contaminating DNA virus in an adenovirus preparation about 40 years ago (Atchison et al. 1965). The virus's single strand of DNA has about 4700 base pairs (bp<sup>1</sup>), contains two open reading frames (ORFs<sup>1</sup>) for the production of viral proteins, and is flanked by two inverted terminal repeats (ITRs) necessary for viral replication (Flotte 2004; Srivastava et al. 1983). To date, 12 serotypes have been identified that display distinct binding and cell tropism characteristics, which are important when choosing the optimal vector for the transfer of genes into a

specific tissue. In addition, the cellular tropism of serotypes varies among species.

To obtain a recombinant vector, the whole coding sequence of wild-type AAV DNA is replaced by an expression cassette containing a promoter sequence, the gene of interest, and a poly-A tail. Only the ITR sequences are necessary in cis for the production of the vector. The actual production technique for AAV vectors uses the ITRs of AAV2, which flank the expression cassette encapsidated in the viral capsids of the AAV serotype of choice. The method for the production of these chimeric vectors is called "cross packaging" and the corresponding AAV vectors are called AAV2/1, AAV2/2, and so forth (Rabinowitz et al. 2002).

## Cellular Tropism of rAAV Vectors

Different AAV serotypes display tissue preference and specific cellular tropism in a variety of organs. The retina contains many different cell types, some of them unique to the eye, so it is necessary to test the cellular tropism of each serotype in the retina of every animal model before starting any gene therapy protocol. Over the last decade, serotypes AAV2/1, 2/2, 2/3, 2/4, 2/5, and 2/6 have been tested for cellular tropism and long-term expression in the retina of rodents, dogs, and nonhuman primates. More recently, serotypes 7 to 9 have also been studied but, with the exception of serotype 8, have not passed the mouse level. In this section we focus on studies in large animals.

There are two methods of delivery of vector to the retina: intravitreal and subretinal injection. Intravitreal injection produces close contact of the vector with retinal ganglion cells, separated only by the hyaloid membrane; with subretinal injection, the needle is advanced through the vitreous and the tip positioned between the RPE and the photoreceptor layer, permitting the deposit of vectors directly adjacent to the cells of interest. The detachment of the neuroretina from the RPE, due to the volume of vector solution injected, resolves within 24 hours (Rolling, personal observation).

Only AAV serotype 2 transduces retinal (mainly ganglion) cells after intravitreal injection, but efficacy of transduction and level of transgene expression have been low in rodents (Dudus et al. 1999; Folliot et al. 2003; Guy et al. 1999; Liang et al. 2001), so this technique is not used in large animal models.

The cellular tropism of most AAV serotypes has been verified after subretinal injection in rodent models, but only a few have been thoroughly characterized in large animals. Bainbridge and colleagues (2003) observed transgene expression in RPE and photoreceptor cells after subretinal injection of AAV2/2 vector in dogs. Comparative studies using AAV2/2 and AAV2/5 showed that the transduction efficacy of photoreceptors by AAV2/5 was superior to that of AAV2/2 in rats, dogs, and nonhuman primates, and that AAV2/4 allowed exclusive and stable transduction of RPE cells in all three animal models (Weber et al. 2003). Subretinal injection of a complete AAV5/5 showed higher transduction efficacy



than AAV2/2 in RPE and photoreceptors of mice and nonhuman primates (Lotery et al. 2003).

Recently, the AAV serotype 8 has been used to study cellular tropism in rodents and dogs (Stieger et al. 2008). In contrast to all other serotypes tested, subretinal delivery of AAV2/8 was able to transduce all cell layers in the retina—the RPE, photoreceptors, cells of the inner nuclear layer, and ganglion cells. Moreover, the expression of green fluorescent protein (GFP<sup>1</sup>) was not limited to the injected area, as has been the case with the other serotypes. Transgene expression was detectable in all cell layers outside the injected area. This observation may have important consequences for gene therapy trials, where widespread expression of the transgene in the retina is the objective.

### Safety and Biodistribution of rAAV-Mediated Gene Transfer

Evaluation of the safety of gene transfer in the eye of large animal models is highly relevant for the development of future clinical trials. As mentioned above, nonhuman primates have ocular anatomic features similar in proportion and size to those in humans. In addition, surgical procedures for vector delivery and the amount of vector injected in dogs and primates are similar to those used in humans. Furthermore, dogs and especially primates have greater immunological and biological similarities to humans than do rodents, an essential feature for determining the tolerance of vectors before clinical trials.

As fluorescence fundus photography has facilitated the direct visualization of GFP expression in the retina, vectors encoding this reporter gene have been used to study the capacity of AAV for long-term expression in the retina of large animals. Subretinal injection of an AAV2/2 vector carrying the GFP gene under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter in dogs resulted in efficient and stable transgene expression for at least 18 months (Bainbridge et al. 2003). Using the same vector in the primate retina led to efficient transduction of RPE cells and rod photoreceptors for more than 12 months (Bennett et al. 1999). Another study, using the AAV5 capsid and the expression cassette flanked by the AAV5 ITRs (AAV5/5), showed similar cellular tropism in the primate retina and persistent transgene expression for 10 months, the duration of the study (Lotery et al. 2003).

To evaluate the short-term morbidity of subretinal injections and the safety of long-term rAAV-mediated transgene expression, Le Meur and colleagues (2005) unilaterally injected AAV2/2, AAV2/4, and AAV2/5 in 14 beagle dogs and 9 nonhuman primates. They found that such injections in both species were safe, with no perioperative complications and a high rate of successful retinal gene transfer (95%). Angiography and electroretinography revealed that retinal anatomy and function remained unchanged, despite persistent transgene expression for up to 6 years.

A primary requirement for safe and successful ocular gene therapy with rAAV is an accurate evaluation of vector

distribution after subretinal or intravitreal delivery—multiple cell types in the retina are exposed to the vector and some scattering of vector to the systemic circulation is possible, and because the eye is closely connected to the brain via the optic nerve it is important to check for the presence of vector DNA in the brain. Weber and colleagues (2003) documented vector shedding after subretinal delivery of rAAVs in dogs and nonhuman primates; they detected vector DNA in the serum and nasal and lacrimal fluid of injected animals as early as 15 minutes after AAV administration and for up to 25 days (for the serum) and up to 4 days (for the nasal and lacrimal fluid) in some individuals.

Regarding the distribution of vector DNA in the optic nerve and brain, investigators have to distinguish between the presence of transgene product and the actual expression of the transgene in the brain. Early studies showed that after intravitreal injection of AAV2/2.CMV.gfp in mice and dogs, levels of GFP protein persist for 6 months in the brain and optic nerve, but no vector DNA was detectable outside the retina (Dudus et al. 1999). Other studies showed the presence of  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -glucuronidase as transgene products in the optic nerve or the brain of mice and guinea pigs, respectively (Guy et al. 1999; Hennig et al. 2003); again, vector DNA was not present in the optic nerve or brain. Griffey and colleagues (2005) showed improved enzyme activity along the visual pathway in the brain after intravitreal delivery of an AAV2/2 vector encoding for the missing enzyme in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Their data suggest that AAV2/2-mediated intravitreal gene transfer resulted in the transduction of retinal ganglion cells and that transgene products were anterogradely transported along the visual pathway into the brain; but they do not show any anterograde transport of vector DNA into the brain via the optic nerve.

In contrast, Provost and colleagues (2005) studied the vector DNA distribution in rats and, more importantly, in dogs and nonhuman primates after subretinal or intravitreal injection of AAV2/2, 2/4, and 2/5 vectors. They detected vector DNA occasionally in peripheral blood mononuclear cells at early time points after injection in all animals. Specifically, vector DNA sequences were present in the optic nerve of dogs and primates that received subretinal injections of AAV2/4 or AAV2/5; intravitreal injection of rAAV2/2 in dogs resulted in the detection of vector DNA along the visual pathway in the brain—the optic nerve, optic chiasm, optic tract, lateral geniculate nucleus, and visual cortex. These results suggested for the first time the anterograde transport of rAAV2/2 from the retina to central visual structures.

Jacobson and colleagues (2006a,b) studied vector DNA distribution in the entire organism in dogs and primates at different time points after subretinal or intravitreal injection of AAV2/2 vector. They did not detect vector DNA in a dose escalation study of subretinally injected AAV2/2 in dogs (Jacobson et al. 2006a), but temporarily detected it in the optic nerve and brain of primates 1 week after the animals received a subretinal injection of AAV2/2 vector (Jacobson et al.



2006b). At 3 months after injection, only one primate had a detectable number of copies in the left geniculate nucleus. In all cases, although vector DNA was detected in the brain, there was no transgene expression in brain structures after subretinal injection. The explanation for this outcome may be a spreading of nonfunctional vector that does not allow transgene expression or transgene expression that was below detection level.

However, a recent study by our group reported the presence of vector DNA, GFP mRNA, and GFP protein in neurons in the left lateral geniculate nucleus (contralateral to the injected eye) after subretinal delivery in dogs (Stieger et al. 2008). In addition, we found vector DNA in many parts of the brain, but chiefly on the contralateral side. These results demonstrated for the first time that subretinal injection of AAV2/8 vector leads to gene transfer into distal parts of the brain. Because axons of the retinal ganglion cells project to the contralateral geniculate nucleus, the data also suggest trans-synaptic transport as the mode of delivery to these neurons; however, due to limitations in the experimental design, this could not be proved.

### **Preclinical Gene Therapy Studies in Nonhuman Primate Models of Retinal Degeneration**

No inherited retinal disorders have been characterized in nonhuman primates, because homozygous animals for retinal degenerations would have a huge selective disadvantage in nature and would therefore not be able to survive and reproduce in the wild. Nevertheless, nonhuman primates represent an important model system to study retinal gene transfer because of their unique retinal structures, their equivalent size, and their human-like immune system (Table 1{TAB1}).

#### **sFLT-1 Gene Therapy to Treat Laser-Induced CNV**

For studies of the pathologic mechanisms of choroidal neovascularization, there are several large animal models, including pigs and nonhuman primates, in which laser-induced rupture of the Bruch's membrane produces lesions comparable to those in human patients (Ryan 1982; Saishin et al. 2003, 2005). Using maximum energy levels of ophthalmic lasers, it is possible to cause lesions in the retina that lead to the development of new vessels that grow from the Bruch's membrane into the subretinal space. Generally, this technique is used to create up to eight small regional CNV lesions within or outside the retina in each treated eye (Shen et al. 2004). We will discuss only the nonhuman primate model of laser-induced CNV and its use in studies of antiangiogenic therapies based on AAV-mediated retinal gene transfer (Lai et al. 2005).

As mentioned above, VEGF is the most important angiogenic factor in the pathogenic development of choroidal and

retinal neovascularization in AMD and DR, respectively. It is produced by retinal cells and interacts with two receptors: VEGFR-1 (also known as FLT-1, fms-like tyrosine kinase; de Vries et al. 1992) and VEGFR-2 (or FLK/Kbr, fetal liver kinase; Mustonen and Alitalo 1995). Research has shown that an alternatively spliced isoform of VEGFR-1 (sFlt-1) is an inhibitor of VEGF activity (Kendall and Thomas 1993) and is responsible for corneal avascularity (Ambati et al. 2006).

An improved understanding of the pathologic mechanisms of CNV has led to the development of new strategies for the treatment of this condition. One of these strategies involves the expression of antiangiogenic factors in the retina to block the activity of VEGF. Several antiangiogenic factors have been expressed in the retina of rodent models of laser-induced CNV: pigment epithelium-derived factor (Mori et al. 2002), angiostatin (Lai et al. 2001), and sFLT-1 (Lai et al. 2002). Only the latter was the subject of study in a primate model of laser-induced CNV, in which the investigators subretinally injected an AAV2/2 vector carrying the sFLT-1 gene under the control of a CMV promoter in the central retina of three primates (Lai et al. 2005). The animals underwent laser-induced CNV 16 months later. The researchers found that new vessels, which normally start to grow into the ruptured site within 2 weeks, were significantly less prominent and fluorescein leakage was much lower in the treated eyes than in nontreated control retinas. The authors of the study concluded that this strategy could be a treatment option for patients with wet AMD, and a phase I clinical trial is in preparation.

### **Regulation of Transgene Expression**

Antiangiogenic therapy restricted to the retina has been demonstrated in recent clinical trials using several synthetic anti-VEGF molecules. Injections are necessary every 1 or 2 months over several years, leading to anti-VEGF molecule levels in the retina that fluctuate. AAV-mediated gene transfer protocols would allow the long-term expression of the molecules from within the retina, but it is not clear whether long-term near complete inhibition of VEGF is safe because this factor is important for endothelial cell survival and plays a role in the maintenance of blood vessels (Alon et al. 1995; Campochiaro 2007). Also, circulation of anti-VEGF molecules derived from the retina may have negative effects on fenestrated capillaries in many endocrine glands and the gastrointestinal tract (Baffert et al. 2006; Kamba et al. 2006). In addition, VEGF provides survival signals for some neurons, such as the motor neurons in the spinal cord (Oosthuysen et al. 2001). Whether VEGF plays a role in the maintenance of photoreceptors is unclear.

To avoid any unwanted side effects from long-term complete inhibition of VEGF, it is important to regulate the expression of antiangiogenic factors in a therapeutic window. Such an approach also enables the temporary suspension of anti-VEGF expression when necessary. The regulated expression of proteins is a further treatment option for retinal degeneration.

**Table 1 Preclinical studies in nonhuman primates (*Macaca fascicularis*) in support of potential retinal gene therapy**

Study	Targeted disease	Pathology	Targeted cells	Vector	References
sFLT-1 gene therapy to treat laser-induced CNV <sup>a</sup>	Age-related macular degeneration (AMD)	Laser-induced rupture of Bruch's membrane	RPE, PR	AAV2/2	Lai et al. 2005
Regulation of transgene expression in the retina using a rapamycin-dependent system	n.a.	none	RPE, PR	AAV2/2	Auricchio et al. 2002; Lebherz et al. 2005
Regulation of transgene expression in the retina using a tetracycline-dependent system	n.a.	none	RPE, PR	AAV2/2, 2/4, 2/5	Stieger et al. 2006, 2007
Toxicology study for the treatment of inherited retinal degeneration due to mutations in RPE65	Inherited retinal degeneration due to RPE65 deficiency	none	RPE, PR	AAV2/2	Jacobson et al. 2006

<sup>a</sup> AAV, adeno-associated virus; CNV, choroidal neovascularization; LCA, Leber congenital amaurosis; n.a., not applicable; PR, photoreceptor cells; RPE, retinal pigmented epithelium.

As mentioned above, inherited retinal degenerative disorders are triggered by mutations in a variety of genes, many of which have not yet been identified. Hence, there is great interest in the development not only of a specific gene therapy but also of a more generally applicable survival factor therapy, which would target not the mutant gene but rather alter the photoreceptor environment in a manner that promotes cell survival.

To inhibit photoreceptor degeneration, neuroprotective factors have to be present in the retina for a long time, probably the life span of the individual. To avoid unwanted side effects, a regulatory system to control transgene expression could allow the expression of neuroprotective cytokines, such as ciliary neurotrophic factor (CNTF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), while abolishing their negative effects. Expression of these factors would be regulated in a therapeutic window. Of several regulatory systems tested *in vitro* and *in vivo* in mice, only two have advanced to evaluation in large animal models: small molecule-dependent systems that use rapamycin or tetracycline as inducer drugs.

#### *Rapamycin-Dependent System*

The first system used to regulate transgene expression in the retina of large animals is the rapamycin-dependent system. The basic concept of this approach is to express the two critical domains of a transcription factor as separate polypeptides that interact only in the presence of a dimerizer, such

as rapamycin. In cells, rapamycin binds to two peptides, FKBP12 (FK506 binding protein of 12kDa) and FRAP (FKBP rapamycin-associated protein), bringing them into close proximity and thus activating their transcriptional competence as inhibitors of T cell proliferation and immunosuppression (Abraham 1998). By fusing the FKBP12 domain to a DNA binding domain, called ZFHD1 (zinc finger homeodomain 1), and one portion of FRAP, called FRB (FKBP rapamycin binding), to the activation domain from the p65 subunit of transcription factor NF- $\kappa$ B, dimerization of both peptides would result in the formation of a functional transactivator. The FKBP12-ZFHD1 protein attaches to its corresponding binding domain upstream from the inducible promoter without activation of transgene expression. In the presence of rapamycin, the domain FRB-p65 affixes to the FKBP12-ZFHD1 protein, resulting in the formation of the transactivator that allows the expression of the transgene; in the absence of rapamycin, the complex disintegrates into the two proteins, which are transcriptionally inert. The first to describe such a system were Rivera and colleagues (1996).

Initially, the rapamycin-dependent regulatory system served as a dual vector system in the retina (Auricchio et al. 2002). An AAV2/2 vector containing the FRB-p65 protein and the ZFHD1-FKBP protein, together with a second vector containing the recombinant human erythropoietine (EPO<sup>1</sup>) gene under the control of the minimal interleukin (IL)-2 promoter fused to the ZFHD1 DNA binding site, were injected at a 1:1 ratio subretinally into rats and one nonhuman primate. Three days after an intraperitoneal administration of

2 mg/kg rapamycin, EPO concentration reached a peak (>100-fold induction) in the anterior chamber fluid (a.c.f.<sup>1</sup>) of the rats and returned to baseline levels within 21 days of rapamycin withdrawal. In the nonhuman primate, induction and deinduction kinetics were less tight, even though the serum half-life is 4½ hours, which would be an advantage for fast on and off switches. EPO concentrations peaked in the nonhuman primate's a.c.f. 1 to 2 weeks after drug delivery and dropped to baseline levels 44 days after drug withdrawal. The explanation for this delay in response to the change in drug application is not yet clear, but probably involves the strong stability of the transcription activating complex assembled by the drug.

Based on this study, Lebherz and colleagues (2005) conducted a 2-year study of rapamycin-controlled EPO expression in the retina of nonhuman primates. They injected the rapamycin-inducible dual vector system either intravitreally (n=1 animal) or subretinally (n=2 animals) at a 1:1 ratio in both eyes of each animal. Within 7 to 14 days of the intravenous administration, EPO levels reached a peak and returned to baseline levels within 3 to 4 weeks. Animals showed signs of weight loss but no other side effects after administration of 2 mg/kg of rapamycin. Lower doses of inducer drug resulted in lower EPO expression in the retina. No neutralizing antibodies against viral capsid proteins were detectable in serum or a.c.f., and histopathological examination of the retina showed only minor scar tissue at the injection site.

A limitation for the use of this system in clinical trials would be the challenge of simultaneously administering two vectors in a way that ensures they both transduce each cell in the retina. Cells transduced by only one of the vectors would not display regulated transgene expression but the continuous expression of the two chimeric regulatory proteins (FRAP-p65 or FKBP-ZFHD1). A second limitation is the pharmacology of rapamycin—bioavailability after oral administration is only 10%, requiring high doses for effective function. The third and most important limitation is the immunosuppressive activity of rapamycin, although there have been efforts to develop nonimmunosuppressive analogues (“rapalogs”), which carry substitutions at different positions in the protein chain (Chong et al. 2002; Pollock et al. 2002). The less immunosuppressive rapamycin analogue AP22594 was tested in the primates used in the study by Lebherz and colleagues at equivalent doses to the original rapamycin, but induced EPO expression at levels only slightly above threshold values. This finding contrasts with results obtained with this analogue in a study done in the skeletal muscles of nonhuman primates, where it induced transgene expression efficiently (Rivera et al. 2005).

#### *Tetracycline-Dependent System*

The second system tested in large animal models is the tetracycline-dependent system. Regulatory systems based on this mechanism are widely used because they are able to tightly control transgene expression in a wide range of cultured

cells as well as plants, yeast, insects, and mammals in vivo. They are based on the *E. coli* Tn10 tetracycline resistance operon, which consists of the tetracycline repressor protein (TetR) and the tetracycline operator DNA sequence (TetO) (Wissmann et al. 1986). In the absence of tetracycline or its derivative doxycycline (Dox), the TetR protein attaches to the TetO DNA sequence, whereas in the presence of the drug it changes its conformation, thus detaching from the DNA (Orth et al. 1998).

Two different tetracycline-responsive regulatory systems have been developed based on this bacterial operon system; both contain the TetR protein fused to the transactivator VP16 of herpes simplex virus (HSV) (Gossen and Bujard 1992; Gossen et al. 1995). If transgene expression is allowed only in the absence of Dox, the system is called TetOff; if it is allowed in the presence of Dox, the system is called TetOn.

The first to evaluate tetracycline-dependent control of transgene expression in the retina were McGee Sanftner and colleagues (2001), who used a modified TetOn system in the retina of rats. They observed successful induction and deinduction of GFP expression in response to the presence or absence of Dox in the drinking water. Oral administration of Dox at very low levels (2 µM) initiated GFP expression, which increased with the dose.

Folliot and colleagues (2003) also used an AAV vector to control transgene expression in the retina, with the TetOff system. Regulation of d2GFP expression was very tight, with 95% of retinal signal gone within 48 hours of Dox administration and 100% at 7 days. Upon Dox withdrawal, reexpression of d2GFP was slower, returning to full signal within 21 days, although it was readily detectable at 48 hours.

The use of tetracycline-dependent systems to drive reporter transgene expression in the eyes of higher mammals, such as nonhuman primates, is an absolute requirement before the initiation of any preclinical work on neuroprotective or antiangiogenic treatment of ocular diseases. Immune reactions against the reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA) in muscle-transduced primates raise particular concerns about the safety of this system (Favre et al. 2001). However, the eye has developed some special features to prevent ocular inflammation, a pathologic mechanism that is incompatible with good vision; the eye's anatomical, cellular, and molecular specializations are together referred to as “ocular immune privilege” (for review see Streilein 2003). Therefore, in contrast to the muscle, local immune modulation in the eye allows rtTA-mediated transgene regulation in the eye of higher mammals.

Our group developed a regulatory system based on the TetOn technique that controls the expression of EPO in the eye of nonhuman primates (Stieger et al. 2006, 2007). The use of EPO as a reporter protein allows easy and objective quantification of transgene expression in the a.c.f. and thus represents an advantage over the subjective evaluation of GFP expression. We injected three different vectors—AAV2/5.CMV.TetOn.epo, AAV2/4.CMV.TetOn.epo, and AAV2/4.pRPE65.TetOn.epo—in seven primates. Induction

of EPO expression was performed initially by 3-day Dox pulses given intravenously (10 mg/kg/day). EPO concentrations reached a peak 2 to 4 days after Dox administration and declined to background levels 10 to 14 days after withdrawal of the inducer drug. Maximum EPO concentrations in the a.c.f. were 1000 mU/ml (for animals injected with the AAV2/5.CMV.TetOn.epo vector), 100 mU/ml (AAV2/4.CMV.TetOn.epo), and 10 mU/ml (AAV2/4.pRPE65.TetOn.epo). These results represent a 2 log range of possible concentrations for any given therapeutic protein, depending on the serotype injected, the amount of vector injected, and the promoter driving the expression of the rtTA protein. Regulated transgene expression persisted for more than 4 years with no immune response to either the expression of both rtTA and EPO proteins or the AAV vectors. Because the possibility of oral administration of Dox is a key factor when considering advancing to clinical trials, we also evaluated the influence of oral administration on the capacity to control transgene expression (Stieger et al. 2007). In this study, we demonstrated not only the similarly efficient and tight control of induction and deinduction of EPO expression after oral administration of Dox but also the system's ability to continuously induce transgene expression for 6 months without any negative side effects.

Based on these extensive preclinical experiments in non-human primates, we conclude that this regulatory system is a useful tool in the development of neurotrophic or antiangiogenic gene therapy strategies for the retina.

### Preclinical Gene Therapy Studies in Canine Models of Retinal Degeneration

Inherited retinal dystrophies are common among many breeds in the canine population, and the most common form is progressive retinal atrophy (PRA). Veterinary ophthalmologists have identified several subgroups of the disease, depending on whether the photoreceptors have fully developed (dystrophies) or not (dysplasias) before degeneration, and whether inheritance is autosomal recessive, autosomal dominant, or X-chromosomal (Petersen-Jones 2005). In addition, researchers have described inherited retinal dystrophies in several feline breeds (Narfström 1999) and have developed transgenic pigs (Petters et al. 1997).

A limited number of dog breeds with retinal degenerations have served as large animal models for human retinal diseases and been thoroughly studied for the development of gene-based therapies. Of these, the Swedish Briard (RPE65<sup>-/-</sup>) is the only dog breed that has responded successfully to gene therapy, opening the door for several human clinical trials (see below). Soon, the two dog breeds with mutations in the CNGB3 gene (the Alaskan malamute and the German shorthaired pointer), which represent a canine model for human achromatopsia, may follow suit.

Other canine models, which we present in detail below, have not yet been used in gene therapy protocols but are considered ideal models for such studies. They have been well

characterized, on both the clinical and molecular level, and transgenic mouse models for the complementary human diseases have responded successfully to gene therapy, which is a prerequisite for such trials in dogs.

### Successful Gene Therapy Studies

#### *Canine Model for Autosomal Recessive RP, LCA Due to a Mutation in the RPE65 Gene: Translation to Human Trials*

The RPE65 gene encodes for an RPE-specific 65 kD protein that is the isomerohydrolase in the visual cycle, restoring the rhodopsin ligand 11-cis retinal. Mutations in this gene are responsible for about 6% of all LCA cases.

In addition to a genetically engineered RPE65 knockout mouse model (Redmond et al. 1998), there are two naturally occurring models of LCA caused by mutations in RPE65: the homozygous Swedish Briard dog (Aguirre et al. 1998) and the rd12 mouse (Pang et al. 2005). Like humans, these animals do not develop sufficient amounts of the photopigment rhodopsin, and as a result have poor vision and diminished light- and dark-adapted ERG responses. The Briard represents an especially valuable model for the development of a gene therapy for RPE65-deficient patients, as the phenotype of the retinal degeneration is very similar to that of humans (Table 2{TAB2}). In these animals, a 4 bp deletion leads to a premature stop codon and the absence of functional protein in the retina (Veske et al. 1999).

Two research groups demonstrated that a single subretinal injection of an rAAV2/2 vector carrying the canine RPE65 gene under the control of a strong chicken/beta-actin (CBA) promoter was sufficient to restore visual function in these animals, as assessed by ERG, immunohistochemistry, and behavioral testing (Acland et al. 2001; Narfström et al. 2003), and they reported the long-term outcome of their studies (Acland et al. 2005; Narfström et al. 2005). Acland and colleagues (2005) injected several different constructs—using AAV2/1, 2/2, or 2/5 capsids, the nonspecific CMV promoter, or the tissue-specific RPE65 promoter to drive either the canine or the human RPE65 gene—and reported restoration of visual function for up to 3 years. Narfström and colleagues (2005) also studied the long-term outcome of their animals, which received AAV2/2.CMV.cRPE65 injections, and reported a gradual loss of visual function as measured by ERG over 3 years; the reason for the loss was not clear.

In view of a possible human gene therapy trial, Bennicelli and colleagues developed an AAV2/2 vector carrying the human RPE65 gene under the control of a modified CBA promoter and tested this vector successfully in the canine model (Bennicelli et al. 2008). Based on these data, a phase I/II clinical trial began in 2007 ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical); Trial ID US-740, A. Maguire) and the first encouraging results of the treatment of three patients have been published recently (Maguire et al. 2008). The most important

**Table 2 Canine models of retinal degenerative diseases currently used in gene therapy protocols**

Breed	Human disease	Inheritance	Gene	Mutation	Characterization of the model: References	Cells affected	Vector	Evaluation of gene therapy: References
Briard	RP, LCA <sup>a</sup>	Autosomal recessive	RPE65	4nt deletion introducing a premature stop codon	Aguirre et al. 1998; Veske et al. 1999	RPE	AAV2/2 and 2/4	Acland et al. 2001, 2005; Bennicelli et al. 2008; Jacobson et al. 2006a; Le Meur et al. 2007; Narfström et al. 2003, 2005
German shorthaired pointer Alaskan malamute	Achromatopsia	Autosomal recessive	CNGB3	Missense substitution in exon 6 D262N Genomic deletion removing the entire gene	Aguirre and Rubin 1974, 1975; Seddon et al. 2006; Sidjanin et al. 2002	PR	AAV2/5	Komaromy et al., unpublished data
Irish setter	RP	Autosomal recessive	PDE-β	Nonsense mutation at codon 807 introducing a premature stop codon	Farber et al. 1992; Suber et al. 1993	PR	none	—
Miniature longhaired dachshund	LCA	Autosomal recessive	RPGRIP1	44nt insertion in exon 2 introducing a premature stop codon	Mellersh et al. 2006; Turney et al. 2007	PR	none	—
Siberian husky and Samoyed	RP	X-linked	RPGR	5nt deletion in exon ORF15 introducing a premature stop codon	Guyon et al. 2007; Zeiss et al. 1999; Zhang et al. 2002	PR	none	—
Mongrel	RP			2nt deletion in exon ORF15 introducing a premature stop codon	Beltran et al. 2006			
English mastiff	RP	Autosomal dominant	RHO	C to G transversion at codon 4 (Thr to Arg)	Kijas et al. 2002	PR	none	—
Great Pyrenees	BMD	Autosomal recessive	VMD2	C73T stop mutation	Grahn et al. 1998; Grahn and Cullen 2001	RPE	none	—
Coton de Tulear	BMD			G482A missense mutation	Grahn et al. 2006, 2008; Guziewicz et al. 2007			

<sup>a</sup> —, no published studies; BMD, Best macular dystrophy; LCA, Leber congenital amaurosis; PR, photoreceptor cells; RP, retinitis pigmentosa; RPE, retinal pigment epithelium.



goal of the initial study was safety and none of the patients developed any severe adverse reaction to the treatment.

A second group, led by Jacobson and Hauswirth, reported preclinical safety data on 18 RPE65<sup>-/-</sup> dogs and 17 normal nonhuman primates received subretinal injections of an rAAV2/2 vector carrying the human RPE65 gene driven by the CMV/beta-actin hybrid promoter (Jacobson et al. 2006a,b). These studies provided the data for preparation of a phase I/II clinical trial, the results of which have not been published yet ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical); Trial ID US-677, S. Jacobson).

Our group in Nantes has recently demonstrated the capacity of an rAAV2/4 vector carrying the human RPE65 gene under control of the human RPE65 promoter to restore vision in the Briard dog (Le Meur et al. 2007). As mentioned above, rAAV2/4 vectors transduce only the RPE and therefore the use of this serotype increases the specificity and safety of the therapy. In addition, the tissue-specific RPE65 promoter also increases specificity by allowing physiologic transgene expression only in RPE cells. We are preparing a clinical phase I/II trial for the treatment of RPE65 patients in France that may start in 2010.

In addition to the rAAV2/4 vector, we tested an AAV2/2 vector carrying the same expression cassette side by side in RPE65<sup>-/-</sup> dogs (Le Meur et al. 2007). Based on these results, a group led by Robin Ali at the Moorfields Eye Hospital (London, UK) began in 2007 a phase I/II clinical trial for the treatment of RPE65<sup>-/-</sup> patients using an rAAV2/2 vector carrying the human RPE65 gene driven by the human RPE65 promoter for subretinal injection ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical); Trial ID UK-141, R. Ali). The results of this trial were recently published (Bainbridge et al. 2008). Again, safety was the most important goal of the study and none of the three patients developed any severe adverse effect.

The RPE65 clinical trials are to date the only realistic treatment option for patients with retinal degenerative diseases, but mutations in this gene are extremely rare. In contrast, more than 180 gene loci have been identified, and each requires the development of a separate gene therapy protocol. The successful story of the RPE65 gene therapy strategy—from the initial identification in 1997 of patients with this mutation (Gu et al. 1997), to the identification in 1998 of dogs carrying a similar mutation (Aguirre et al. 1998), to the first successful gene therapy experiments in these dogs in 2001 (Acland et al. 2001), and up to the start of the first clinical trials in humans in 2007 (Bainbridge et al. 2008; Maguire et al. 2008)—highlights the need for large animal models of inherited degenerative diseases for the development of new therapeutic strategies.

#### *Canine Models of Achromatopsia (CNGB3)*

Achromatopsia is an autosomal recessive inherited disorder that affects photoreceptor cells. It has been associated in dogs with a substitution in exon 6 (D262N) of the CNGB3 gene in German shorthaired pointers and with a nonsense

mutation in Alaskan malamutes (Seddon et al. 2006; Sidjanin et al. 2002) (Table 2).

In humans, mutations in three different genes are associated with this disease: CNGA3, CNGB3, and GNAT2. CNGB3 encodes for the beta-subunits of cyclic nucleotide-gated channels in the photoreceptor plasma membrane, and mutations in the gene cause a channelopathy that results in impaired cone function manifesting achromatopsia (Khan et al. 2007). Mutations in the CNGB3 gene are responsible for 50% of all cases of human achromatopsia (Kohl et al. 2005).

In humans and dogs, affected subjects show an absence of retinal cone function with colorblindness, day blindness, and photophobia, but normal vision in dim light. Progressive retinal atrophy has been described in 1974 by Aguirre and colleagues in the Alaskan malamute, and in 2006 by Beltran and colleagues in the German shorthaired pointer. In both canine models, cone response was abolished at the age of 8 weeks (Aguirre and Rubin 1974, 1975; Beltran et al. 2006), and by adulthood the retinas lack all cones (although the structure and function of rods remain normal). Potential rAAV gene therapy treatment for achromatopsia must therefore target cones.

Komaromy and colleagues (2008a) evaluated three versions of the human red cone opsin promoter (PRO.5, 3LCR-PRO.5, PR2.1) and the human blue cone opsin promoter (HB569) for their specificity in targeting GFP gene expression to cones in the canine retina when used with AAV vectors of serotype 5. After subretinal injection, the blue cone opsin promoter (HB569) was not specific, because GFP was expressed in a few cones but also in some rods and the retinal pigment epithelium. The PRO.5 promoter was not at all effective and the modified version of this promoter, the 3LCR-PRO.5, led to weak GFP expression in cones. Only the PR2.1 promoter led to effective and specific transgene expression in cones (Komaromy et al. 2008a).

Based on these studies, affected dogs received unilateral injections in the subretinal space with an AAV2/5 vector containing the transgene CNGB3 under the control of these four different promoters (PRO.5, 3LCR-PRO.5, PR2.1, and the human cone arrestin promoter). Four weeks after treatment, 10 dogs with either CNGB3 null or missense mutation showed successful restoration of cone function. Animals that received treatment at a young age experienced the best outcome. Although all four promoters yielded positive results, the PR2.1 promoter produced the most robust restoration of cone function. Monitoring for over 14 months of two dogs treated with AAV5.PR2.1.CNGB3 revealed no deterioration of the rescue effect (Komaromy et al. 2008b).

#### **Other Canine Models of Retinal Degeneration as Possible Candidates for Gene Therapy**

##### *Autosomal Recessive RP (PDE)*

Rod-cone dysplasia 1 (rcd1) is a photoreceptor pathology in dogs that resembles the pathologic features of autosomal recessive RP due to mutations in the rod-specific cGMP

phosphodiesterase (PDE) and segregates in the Irish setter breed (Table 2).

Dogs affected with *rcd1* display markedly elevated levels and abnormal distribution of PDE activity. Farber and colleagues (1992) suggested that the beta subunit is implicated in the disease, and Suber and colleagues (1993) went on to identify a nonsense mutation at codon 807, introducing a premature stop codon, which truncates the protein by 49 residues; the mutation removes the C-terminal domain necessary for post-translational processing and membrane association.

In humans, there are several mutations in the PDE- $\beta$  gene that lead to autosomal recessive RP, accounting for 4% of cases in North America. Characteristic of these patients are reduced, delayed, or nonexistent rod ERG responses, markedly reduced cone responses, and a lack of night vision beginning in early childhood. Ophthalmoscopy reveals attenuated retinal vessels (Dryja et al. 1999; McLaughlin et al. 1993, 1995).

In Irish setters, the photoreceptor degeneration begins approximately 25 days after birth and culminates at about 1 year of age, when the population of rods and cones is completely depleted. A pharmacological study showed that D-cis-diltiazem, a calcium channel blocker used in cardiology, rescued photoreceptors and preserved visual function in the *rd* mouse, a rodent model of PDE- $\beta$  mutations (Frasson et al. 1999). But use of the same protocol for the *Rcd1* Irish setters was not successful—D-cis-diltiazem did not slow their retinal degeneration (Pearce-Kelling et al. 2001).

Although this dog model was discovered 16 years ago, it is difficult to develop a treatment because of the rapid evolution of the lesions. Gene therapy with this model is very challenging because the therapeutic window is very narrow and because photoreceptor defects are more difficult to treat than RPE defects after retinal gene transfer.

#### *Autosomal Recessive LCA (RPGRIP1)*

Defects in the retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 (RPGRIP1) gene cause an autosomal recessive disease affecting photoreceptor cells in dogs and humans.

Researchers have recently identified the RPGRIP1 mutation involved in the miniature longhaired dachshund (MLHD) (Mellersh et al. 2006) (Table 2); it consists of a 44 bp insertion in exon 2 of the RPGRIP1 gene, introducing a premature stop codon. The RPGRIP1 protein was discovered through its interaction with RPGR (retinitis pigmentosa GTPase regulator) (Boylan and Wright 2000). The function of RPGR and RPGRIP1 are not fully understood. Both proteins localize in the photoreceptor connecting cilium, a thin bridge linking the cell body and the light-sensing outer segment. A study of RPGRIP1<sup>-/-</sup> mice demonstrated that RPGRIP1 is a stable polymer anchored to the axoneme of the connecting cilium where it tethers RPGR and that RPGR itself depends on RPGRIP1 for subcellular localization and normal function (Hong et al. 2001). Both proteins may be involved in microtubule organization in the connecting cilium and regulation of molecular trafficking between the inner and outer segments

of photoreceptors (He et al. 2008). Another study suggested that RPGRIP1 is required for disk morphogenesis, putatively by regulating actin cytoskeleton dynamics (Zhao et al. 2003). Experiments in mice identified intense alternative splicing of the RPGRIP1 gene, which led to several mRNA variants with distinct cellular and subcellular localization between species (Castagnet et al. 2003; Mavlyutov et al. 2002).

The human RPGRIP1 gene is localized on chromosome 14q11 and contains 3861 base pairs divided in 24 exons (Gerber et al. 2001). Several studies reporting a comprehensive mutational analysis of all known genes in 179 unrelated patients showed that mutations in RPGRIP1 account for 4.5% of the cases (Dryja et al. 2001; Hanein et al. 2004; Meindl et al. 1996). Clinical signs include photophobia, severe loss of central acuity, and nystagmus.

In order to evaluate the canine RPGRIP1<sup>-/-</sup> dog model as a potential candidate for gene therapy, two groups have now characterized the kinetics and pathological mechanisms of the retinal degeneration (Rolling, unpublished data; Turney et al. 2007). Analysis of the ERG findings showed that cone function was lost as early as 2 months of age, although the cone photoreceptors were still present in the retina, and rod function was preserved. But at 9 months of age, both cone and rod functions were undetectable. Interestingly, assessment of the dogs' functional vision, based on their ability to avoid obstacles, showed that it remained up to the age of 11 months. Both optical coherence tomography (OCT) and histopathology studies revealed a progressive thinning of the neuroretina over the first 2 years of age. The TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assay showed that the apoptotic photoreceptor cell death was the causative mechanism (Rolling, unpublished data).

The results of the study by our group suggest a therapeutic strategy that consists of initiating gene therapy as soon as possible after birth. The RPGRIP1<sup>-/-</sup> dogs represent a unique and important tool to assess the *in vivo* efficacy of photoreceptor targeted gene therapy in a cone-rod dystrophy. However, visual function in this canine model will still be difficult to rescue using gene therapy because (1) the photoreceptors and not the RPE need to be targeted, (2) RPGRIP1 is a structural gene, and (3) variants of the gene might be expressed and functional not only in photoreceptors but also in other retinal cell types (Castagnet et al. 2003; Mavlyutov et al. 2002; Zhao et al. 2003).

#### *X-Linked RP (RPGR)*

The X-linked progressive retinal atrophy (XLPR) in dogs is similar to human X-linked RP and is also caused by mutations in the RPGR gene. Two mutations in exon ORF15 occur in three canine models: a 2 bp deletion in Siberian huskies and Samoyeds (XLPR1), and a 5 bp deletion in mongrel dogs (XLPR2) (Zhang et al. 2002) (Table 2).

Studies in mice have localized the RPGR protein to the connecting cilium of both photoreceptor types, rods and cones (Hong et al. 2003). The first 10 exons encode a tandem

repeat structure highly similar to RCC1 (regulator of chromosome condensation), which suggests an interaction with a small GTPase. This RCC1-like domain is present in all major isoforms of RPGR. The most important function of RPGR seems to be the interaction with the RPGRIP1 protein (as described above); it is also involved in microtubule organization and regulation of molecular trafficking in the cilia of the photoreceptor (located between the inner and outer segments) (He et al. 2008). In addition, the protein associates with a number of cilia-centrosomal proteins (e.g., structural maintenance of chromosomes [SMC] 1 and SMC3) as well as with the intraflagellar transport polypeptide IFT88 and microtubule motors such as Kif3A-KinesinII (Khanna et al. 2005).

The considerable heterogeneity in RPGR transcript processing results from an alternative RNA splicing mediated by multiple purine-rich exonic splicing enhancers (Hong and Li 2002). Of the many isoforms expressed in the retina, RPGR-ORF15 is the major form, containing the first 14 exons of the gene plus an unusually large terminal exon ORF15 (Vervoort et al. 2000). About 80% of the more than 240 identified disease-causing mutations in this gene occur in a specific repetitive region of the ORF15 (which is thus called the “mutation hot spot” of RPGR).

XLPR represents the most severe form of RP in humans, with early onset of night blindness, visual field loss, and eventual loss of central acuity. In dogs, the phenotype associated with the frame shift mutation in XLPRA2 is very severe and manifests during retinal development (Beltran et al. 2006). In contrast, the phenotype associated with the nonsense mutation in XLPRA1 manifests after normal photoreceptor morphogenesis. Morphological characterization has shown that photoreceptor cells develop and function normally, but subsequently undergo a progressive degeneration with variability in onset and severity. Rods are affected first, and cone degeneration starts later (Zeiss et al. 1999). Abnormal development of photoreceptors was evident in XLPRA2 dogs as early as 4 weeks of age (Beltran et al. 2006), whereas in XLPRA1 dogs photoreceptor degeneration was present at 4 to 5 years of age (Guyon et al. 2007). The normal retinal development in XLPRA1 suggests that the C-terminal 230 amino acids encoded by exon ORF15 are not crucial for functional and structural development of rods and cones early in life, but the severity of the disease at later stages demonstrates that RPGR plays an essential role in photoreceptor viability (Zhang et al. 2002).

Siberian huskies (XLPRA1) provide a particularly valuable model to evaluate gene therapy because both their genetic mutation and clinical characteristics are comparable to those of humans. In addition, because the onset of the lesions occurs later and the evolution is slower in XLPRA1 dogs than in XLPRA2 dogs, the window for therapeutic treatment is larger. The therapeutic hurdles for the rescue of visual function in this canine model are similar to those for RPGRIP1<sup>-/-</sup> dogs, because (1) the source of the problem is a photoreceptor defect and (2) the RPGR gene undergoes complex alternative splicing and encodes multiple protein isoforms (constitutive and ORF15 variants).

#### *Autosomal Dominant RP (RHO)*

More than 100 different mutations in the rhodopsin gene (RHO) cause autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) in humans. Kijas and colleagues (2002) described English mastiffs with a naturally occurring dominant retinal degeneration and identified a disease-causing point mutation in the RHO gene (T4R) (Table 2).

Rhodopsin is the G protein–coupled receptor that is activated by light and initiates the transduction cascade that enables night vision. Mutations in the rhodopsin gene account for most cases of ADRP, but the RHO group of diseases includes a variation of severity that is not strictly mutation dependent—there are differences within and between families and even within regions in the same affected eye (Cideciyan et al. 2005; Gu et al. 2007). The hypothesis is that genetic background and environmental factors (e.g., light) can modify the phenotype.

Dogs with the mutant allele manifest a retinal phenotype that closely mimics the human phenotype of RHO mutations. The T4R RHO–mutant dog retina shows a dramatically slowed recovery of rod photoreceptor function after light exposure. There seems to be a link between the mutant-RHO retina’s level of exposure to light and the photoreceptor cell death.

The English mastiffs are a valuable canine model for gene therapy trials because their mutations and phenotypes are very similar to those of humans and because RHO mutations are a very common cause of ADRP, affecting a large pool of potential human patients. But simple gene addition therapy in this dominant canine model may not be sufficient to rescue the photoreceptors, as the expression of the mutant allele is toxic to these cells. Because the presence of only one mutant allele is sufficient for the onset of retinal degeneration in dominant diseases, gene suppression in conjunction with gene addition is necessary. To downregulate the production of toxic proteins in the cell, several strategies are now available, including one that calls for the use of ribozymes and another the use of siRNA (small interfering ribonucleic acid) technologies; both strategies have been studied in rodent models of the disease with varying degrees of success. Subretinal administration of an rAAV containing siRNA that downregulates both endogenous alleles of rhodopsin while expressing a normal protein from a transgene has been a promising strategy in mice (O’Reilly et al. 2007).

To our knowledge, there have been no tests of this or any other gene therapy–based strategy in the canine T4R dog model. The major hurdles for the development of such strategies are the targeting of photoreceptors, and, more importantly, the efficient suppression of endogenous RHO expression and efficient gene replacement in the same photoreceptor cell.

#### *Best Disease (VMD2)*

Canine multifocal retinopathy (cmr) is caused by mutations in the bestrophin gene (BEST1, also called VMD2). Although dogs lack a foveomacular region, the ophthalmoscopic



appearance of lesions characteristic of *cmr* closely resembles vitelliform lesions in the human counterpart, Best macular dystrophy.

*Cmr* occurs in several dog breeds, two of which have been studied in detail: Great Pyrenees (*cmr1*) and Coton de Tulear (*cmr2*). The disease is inherited as an autosomal recessive condition (Guziewicz et al. 2007) and is associated in Great Pyrenees dogs with a C73T stop mutation and in Coton de Tulear dogs with a G482A missense mutation.

*Cmr1* in Great Pyrenees dogs was first described by Grahn and colleagues in 1998, and is manifested by multifocal serous retinal and RPE detachments. The condition develops at approximately 13 weeks of age and the focal areas of retinal detachment and RPE vacuolation progress to permanent and stable focal areas of retinal degeneration, RPE hypertrophy, and changes in RPE pigmentation. ERG measurements did not reveal significant deterioration of the a- or b-wave parameters (Grahn and Cullen 2001; Grahn et al. 1998).

*Cmr2* in the Coton de Tulear manifests as multifocal serous retinal detachments in homozygous puppies at 3 to 4 months of age. The retinopathy occurs early in life and is nonprogressive. Photopic and scotopic ERG measurements are minimally diminished compared to age-matched dogs that do not carry the mutation (Grahn et al. 2006, 2008).

Best macular dystrophy in humans is an autosomal dominant retinal disease caused by mutations in the bestrophin gene. It is typically characterized by a single vitelliform lesion of the macula that is yellow to orange and appears in childhood. However, phenotypic heterogeneity occurs, and multifocal vitelliform, atrophic lesions, or chorioretinal scars have been described. The disease is slowly progressive and can result in atrophy of the RPE, photoreceptor degeneration, and subretinal fibrosis, severely impairing central vision (Guziewicz et al. 2007).

The human *VMD2* gene is located on the long arm of the human chromosome 11. Bestrophin is a transmembrane protein localized at the basolateral portion of the RPE; its function is not fully understood. One hypothesis is that it functions as a regulatory part of a calcium-dependent channel; a second hypothesis is that it regulates a voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel assuming an indirect involvement of bestrophin in the generation of the light peak in the ERG (Strauss and Rosenthal 2005). The pathogenicity of *VMD2* mutations is likely based on a dominant negative effect possibly by oligomerization of normal and mutated bestrophin molecules to form a defective ion channel (Stohr et al. 2005).

To evaluate a potential rAAV-mediated gene therapy for *cmr* in affected dogs, Zangerl and colleagues (2008) evaluated the human bestrophin promoter (*hVMD2*) for its specificity in targeting GFP expression to RPE cells in the canine retina using an AAV2/1 vector. Four weeks after subretinal injection in normal dogs, GFP expression was evident in RPE cells in the injected area. Based on these preliminary results, the authors are evaluating rAAV-mediated expression of wild-type bestrophin in place of GFP in the same construct in order to treat affected dogs. The results of these trials have not yet been published.

## Conclusion

Two large animal systems are used in the development of gene therapy strategies for retinal disorders, nonhuman primate and canine models of retinal degenerations. Nonhuman primates are essential for any treatment strategy, as the animals' retinal structure and other close similarities with human physiology enable researchers to obtain the most reliable safety information without risking potentially severe negative side effects in human clinical trials. Moreover, the human-like immune system of nonhuman primates allows the evaluation of possible adverse immune responses to vector or transgene. Biosafety studies with primates are now a requirement before initiation of any clinical trials for retinal gene therapy. However, because there is no pathologic model for inherited retinal dystrophies in nonhuman primates, these animals are of limited use in the evaluation of the therapeutic benefit of a given treatment strategy.

In contrast, many human genetic diseases have their equivalent in the canine population. Once descendants of the wolf became domesticated, natural selective pressure, which normally eliminates disadvantageous mutations, no longer applied. In this review we have described canine models that have been thoroughly characterized and are in use today for the development of gene therapy strategies. Canine models of retinal degenerations exist for all major inheritance patterns, including autosomal recessive (RPE65, RPGRIP1), autosomal dominant (RHO), and X-linked (RPGR) PRA. Mutations in RHO and RPGR account for 25% of all ADRP and 70% of all XLRP cases in humans, respectively. Therefore, the canine models for these diseases can support the development of treatment strategies for many patients around the world. Recently, proof of principle in the Briard RPE65 dog model led to the start of three clinical trials of gene therapy for inherited retinal degeneration. New forms of canine retinal degeneration that await characterization may represent additional valuable models for retinal gene therapy.

The successful treatment of canine models in gene therapy protocols is essential for any research group that plans to advance its findings to clinical trials. These models are very important to support the development of treatment strategies for diseases for which no treatment option is yet available.

## References

- Abraham RT. 1998. Mammalian target of rapamycin: Immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 10:330-336.
- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J. 2001. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28:92-95.
- Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bencicelli J, Dejneka NS, Pearce-Kelling SE, Maguire AM, Palczewski K, Hauswirth WW, Jacobson SG. 2005. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 12:1072-1082.

- Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, D'Amore PA, Miller JW. 1996. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 114:66-71.
- Aguirre GD, Rubin LF. 1974. Pathology of hemeralopia in the Alaskan malamute dog. *Invest Ophthalmol* 13:231-235.
- Aguirre GD, Rubin LF. 1975. The electroretinogram in dogs with inherited cone degeneration. *Invest Ophthalmol* 14:840-847.
- Aguirre GD, Baldwin V, Pearce-Kelling S, Narfström K, Ray K, Acland GM. 1998. Congenital stationary night blindness in the dog: Common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Mol Vis* 4:23.
- Aiello LP. 2005. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 353:839-841.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL. 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331:1480-1487.
- Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE. 1995. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10457-10461.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1:1024-1028.
- Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK. 2003. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 9:1390-1397.
- Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, Albuquerque RJ, Richter E, Sakurai E, Newcomb MT, Kleinman ME, Caldwell RB, Lin Q, Ogura Y, Orecchia A, Samuelson DA, Agnew DW, St Leger J, Green WR, Mahasreshti PJ, Curiel DT, Kwan D, Marsh H, Ikeda S, Leiper LJ, Collinson JM, Bogdanovich S, Khurana TS, Shibuya M, Baldwin ME, Ferrara N, Gerber HP, De Falco S, Witta J, Baffi JZ, Raisler BJ, Ambati J. 2006. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 443:993-997.
- Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. 1965. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149:754-756.
- Auricchio A, Rolling F. 2005. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases. *Curr Gene Ther* 5:339-348.
- Auricchio A, Rivera VM, Clackson T, O'Connor EE, Maguire AM, Tolentino MJ, Bennett J, Wilson JM. 2002. Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol Ther* 6:238-242.
- Baffert F, Le T, Sennino B, Thurston G, Kuo CJ, Hu-Lowe D, McDonald DM. 2006. Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *Am J Physiol-Heart C* 290:H547-H559.
- Bainbridge JW, Mistry A, Schlichtenbrede FC, Smith A, Broderick C, De Alwis M, Georgiadis A, Taylor PM, Squires M, Sethi C, Charteris D, Thrasher AJ, Sargan D, Ali RR. 2003. Stable rAAV-mediated transduction of rod and cone photoreceptors in the canine retina. *Gene Ther* 10:1336-1344.
- Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358:2231-2239.
- Bashshur ZF, Bazarbachi A, Schakal A, Haddad ZA, El Haibi CP, Nouredin BN. 2006. Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 142:1-9.
- Beltran WA, Hammond P, Acland GM, Aguirre GD. 2006. A frameshift mutation in RPGR exon ORF15 causes photoreceptor degeneration and inner retina remodeling in a model of X-linked retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1669-1681.
- Bennett J, Maguire AM, Cideciyan AV, Schnell M, Glover E, Anand V, Aleman TS, Chirmule N, Gupta AR, Huang Y, Gao GP, Nyberg WC, Tazelaar J, Hughes J, Wilson JM, Jacobson SG. 1999. Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9920-9925.
- Bennicelli J, Wright JF, Komaromy A, Jacobs JB, Hauck B, Zelenia O, Mingozzi F, Hui D, Chung D, Rex TS, Wei Z, Qu G, Zhou S, Zeiss C, Arruda VR, Acland GM, Dell'osso LF, High KA, Maguire AM, Bennett J. 2008. Reversal of blindness in animal models of Leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther* 22:22.
- Berson EL. 1993. Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:1659-1676.
- Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, de Jong PT, Klaver CC, Klein BE, Klein R, Mitchell P, Sarks JP, Sarks SH, Soubrane G, Taylor HR, Vingerling JR. 1995. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 39:367-374.
- Boylan JP, Wright AF. 2000. Identification of a novel protein interacting with RPGR. *Hum Mol Genet* 9:2085-2093.
- Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, Sy JP, Schneider S. 2006. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355:1432-1444.
- Buch PK, Bainbridge JW, Ali RR. 2008. AAV-mediated gene therapy for retinal disorders: From mouse to man. *Gene Ther* 15:849-857.
- Campochiaro PA. 2000. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 184:301-310.
- Campochiaro PA. 2007. Molecular targets for retinal vascular diseases. *J Cell Physiol* 210:575-581.
- Castagnet P, Mavlyutov T, Cai Y, Zhong F, Ferreira P. 2003. RPGRIP1s with distinct neuronal localization and biochemical properties associate selectively with RanBP2 in amacrine neurons. *Hum Mol Genet* 12:1847-1863.
- Chamberlain M, Baird P, Dirani M, Guymer R. 2006. Unraveling a complex genetic disease: Age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 51:576-586.
- Chong NH, Bird AC. 1998. Alternative therapies in exudative age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 82:1441-3.
- Chong H, Ruchatz A, Clackson T, Rivera VM, Vile RG. 2002. A system for small-molecule control of conditionally replication-competent adenoviral vectors. *Mol Ther* 5:195-203.
- Cideciyan AV, Jacobson SG, Aleman TS, Gu D, Pearce-Kelling SE, Sumaroka A, Acland GM, Aguirre GD. 2005. In vivo dynamics of retinal injury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5233-5238.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. 1999. Pigment epithelium-derived factor: A potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285:245-248.
- den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP. 2008. Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27:391-419.
- de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. 1992. The fms-like tyrosine kinase: A receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:989-991.
- Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A, Hageman G. 2006. The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 51:137-152.
- Dryja TP, Rucinski DE, Chen SH, Berson EL. 1999. Frequency of mutations in the gene encoding the alpha subunit of rod cGMP-phosphodiesterase in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1859-1865.
- Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, McGee TL, Hong DH, Li T, Andreasson S, Berson EL. 2001. Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 68:1295-1298.
- Dudus L, Anand V, Acland GM, Chen SJ, Wilson JM, Fisher KJ, Maguire AM, Bennett J. 1999. Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vision Res* 39:2545-2553.

- Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. 2005. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308:421-424.
- Eichler W, Yafai Y, Wiedemann P, Reichenbach A. 2004. Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Muller) cells in hypoxia. *Neuroreport* 15:1633-1637.
- Farber DB, Danciger JS, Aguirre G. 1992. The beta subunit of cyclic GMP phosphodiesterase mRNA is deficient in canine rod-cone dysplasia 1. *Neuron* 9:349-356.
- Favre D, Provost N, Blouin V, Blanco G, Chereil Y, Salvetti A, Moullier P. 2001. Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther* 4:559-566.
- Ferrara N, Kerbel RS. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438:967-974.
- Ferris FL 3rd, Fine SL, Hyman L. 1984. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch Ophthalmol* 102:1640-1642.
- Flotte TR. 2004. Gene therapy progress and prospects: Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* 11:805-810.
- Folliot S, Briot D, Conrath H, Provost N, Chereil Y, Moullier P, Rolling F. 2003. Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *J Gene Med* 5:493-501.
- Frank RN. 2004. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 350:48-58.
- Frasson M, Sahel JA, Fabre M, Simonutti M, Dreyfus H, Picaud S. 1999. Retinitis pigmentosa: Rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat Med* 5:1183-1187.
- Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J. 2004. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 122:564-572.
- Gerber S, Perrault I, Hanein S, Barbet F, Ducroq D, Ghazi I, Martin-Coignard D, Leowski C, Homfray T, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. 2001. Complete exon-intron structure of the RPGR-interacting protein (RPGRIP1) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis. *Eur J Hum Genet* 9:561-571.
- Gossen M, Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
- Grahn BH, Cullen CL. 2001. Retinopathy of Great Pyrenees dogs: Fluorescein angiography, light microscopy and transmitting and scanning electron microscopy. *Vet Ophthalmol* 4:191-199.
- Grahn BH, Philibert H, Cullen CL, Houston DM, Semple HA, Schmutz SM. 1998. Multifocal retinopathy of Great Pyrenees dogs. *Vet Ophthalmol* 1:211-221.
- Grahn BH, Sandmeyer LS, Breaux CB. 2006. Multifocal bullous retinopathy of Coton de Tulear dogs. *Can Vet J* 47:929-930.
- Grahn BH, Sandmeyer LL, Breaux C. 2008. Retinopathy of Coton de Tulear dogs: Clinical manifestations, electroretinographic, ultrasonographic, fluorescein and indocyanine green angiographic, and optical coherence tomographic findings. *Vet Ophthalmol* 11:242-249.
- Green WR, Enger C. 1993. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* 100:1519-1535.
- Griffey M, Macauley SL, Ogilvie JM, Sands MS. 2005. AAV2-mediated ocular gene therapy for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol Ther* 12:413-421.
- Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J, Maguire MG, Fine SL, Brucker AJ, Maguire AM, Ho AC. 1998. Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalm Vis Sci* 39:385-390.
- Gu SM, Thompson DA, Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A, Murthy KR, Rathmann M, Kumaramanickavel G, Denton MJ, Gal A. 1997. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 17:194-197.
- Gu D, Beltran WA, Li Z, Acland GM, Aguirre GD. 2007. Clinical light exposure, photoreceptor degeneration, and AP-1 activation: A cell death or cell survival signal in the rhodopsin mutant retina? *Invest Ophthalm Vis Sci* 48:4907-4918.
- Guy J, Qi X, Muzyczka N, Hauswirth WW. 1999. Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch Ophthalmol* 117:929-937.
- Guyon R, Pearce-Kelling SE, Zeiss CJ, Acland GM, Aguirre GD. 2007. Analysis of six candidate genes as potential modifiers of disease expression in canine XLPR1, a model for human X-linked retinitis pigmentosa 3. *Mol Vis* 13:1094-1105.
- Guziewicz KE, Zangerl B, Lindauer SJ, Mullins RF, Sandmeyer LS, Grahn BH, Stone EM, Acland GM, Aguirre GD. 2007. Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: A novel animal model for Best disease. *Invest Ophthalm Vis Sci* 48:1959-1967.
- Haddad S, Chen CA, Santangelo SL, Seddon JM. 2006. The genetics of age-related macular degeneration: A review of progress to date. *Surv Ophthalmol* 51:316-363.
- Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Noureddine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance, MA. 2005. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308:419-421.
- Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, Calvas P, Dollfus H, Hamel C, Loppönen T, Munier F, Santos L, Shalev S, Zafeiriou D, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J. 2004. Leber congenital amaurosis: Comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat* 23:306-317.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368:1795-1809.
- He S, Parapuram SK, Hurd TW, Behnam B, Margolis B, Swaroop A, Khanna H. 2008. Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) protein isoforms in mammalian retina: Insights into X-linked retinitis pigmentosa and associated ciliopathies. *Vision Res* 48:366-376.
- Hennig AK, Levy B, Ogilvie JM, Vogler CA, Galvin N, Bassnett S, Sands MS. 2003. Intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in specific areas of the CNS in mucopolysaccharidosis VII mice. *J Neurosci* 23:3302-3307.
- Holz FG, Pauleikhoff D, Klein R, Bird AC. 2004. Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am J Ophthalmol* 137:504-510.
- Hong DH, Li T. 2002. Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers. *Invest Ophthalm Vis Sci* 43:3373-3382.
- Hong DH, Yue G, Adamian M, Li T. 2001. Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium. *J Biol Chem* 276:12091-12099.
- Hong DH, Pawlyk B, Sokolov M, Strissel KJ, Yang J, Tulloch B, Wright AF, Arshavsky VY, Li T. 2003. RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. *Invest Ophthalm Vis Sci* 44:2413-2421.
- Jacobson SG, Acland GM, Aguirre GD, Aleman TS, Schwartz SB, Cideciyan AV, Zeiss CJ, Komaromy AM, Kaushal S, Roman AJ, Windsor EA, Sumaroka A, Pearce-Kelling SE, Conlon TJ, Chiodo VA, Boye SL, Flotte TR, Maguire AM, Bennett J, Hauswirth WW. 2006a. Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. *Mol Ther* 13:1074-1084.
- Jacobson SG, Boye SL, Aleman TS, Conlon TJ, Zeiss CJ, Roman AJ, Cideciyan AV, Schwartz SB, Komaromy AM, Doobrajh M, Cheung AY, Sumaroka A, Pearce-Kelling SE, Aguirre GD, Kaushal S, Maguire AM, Flotte TR, Hauswirth WW. 2006b. Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis. *Hum Gene Ther* 17:845-858.
- Kamba T, Tam BY, Hashizume H, Haskell A, Sennino B, Mancuso MR, Norberg SM, O'Brien SM, Davis RB, Gowen LC, Anderson KD, Thurston G, Joho S, Springer ML, Kuo CJ, McDonald DM. 2006. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart C* 290:H560-H576.

- Kaplan J, Bonneau D, Frezal J, Munnich A, Dufier JL. 1990. Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 85:635-642.
- Kendall RL, Thomas KA. 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10705-10709.
- Kent D, Viores SA, Campochiaro PA. 2000. Macular oedema: The role of soluble mediators. *Br J Ophthalmol* 84:542-545.
- Khan NW, Wissinger B, Kohl S, Sieving PA. 2007. CNGB3 achromatopsia with progressive loss of residual cone function and impaired rod-mediated function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3864-3871.
- Khanna H, Hurd TW, Lillo C, Shu X, Parapuram SK, He S, Akimoto M, Wright AF, Margolis B, Williams DS, Swaroop A. 2005. RPGR-ORF15, which is mutated in retinitis pigmentosa, associates with SMC1, SMC3, and microtubule transport proteins. *J Biol Chem* 280:33580-33587.
- Kijas JW, Cideciyan AV, Aleman TS, Pianta MJ, Pearce-Kelling SE, Miller BJ, Jacobson SG, Aguirre GD, Acland GM. 2002. Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6328-6333.
- Klaver CC, Assink JJ, van Leeuwen R, Wolfs RC, Vingerling JR, Stijnen T, Hofman A, de Jong PT. 2001. Incidence and progression rates of age-related maculopathy: The Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2237-22341.
- Klein R, Klein BE, Moss SE. 1992. Epidemiology of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 15:1875-1891.
- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. 2005. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308:385-389.
- Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Meuer SM, Swift M, Gangnon RE. 2007. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 114:253-262.
- Koenekoop RK. 2004. An overview of Leber congenital amaurosis: A model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol* 49:379-398.
- Kohl S, Varsanyi B, Antunes GA, Baumann B, Hoyng CB, Jagle H, Rosenberg T, Kellner U, Lorenz B, Salati R, Jurklics B, Farkas A, Andreasson S, Weleber RG, Jacobson SG, Rudolph G, Castellan C, Dollfus H, Legius E, Anastasi M, Bitoun P, Lev D, Sieving PA, Munier FL, Zrenner E, Sharpe LT, Cremers FP, Wissinger B. 2005. CNGB3 mutations account for 50% of all cases with autosomal recessive achromatopsia. *Eur J Hum Genet* 13:302-308.
- Komaromy AM, Alexander JJ, Cooper AE, Chiodo VA, Glushakova LG, Acland GM, Hauswirth WW, Aguirre GD. 2008a. Targeting gene expression to cones with human cone opsin promoters in recombinant AAV. *Gene Ther* 15:1073.
- Komaromy AM, Alexander JJ, Chiodo VA, Garcia MM, Tanaka JC, Craft CM, Acland GM, Hauswirth WW, Aguirre GD. 2008b. Long-term rescue of cone function in a canine model of achromatopsia by rAAV-mediated gene therapy. ARVO Presentation (Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2008 Annual Meeting), April 28, Fort Lauderdale.
- Lai CC, Wu WC, Chen SL, Xiao X, Tsai TC, Huan SJ, Chen TL, Tsai RJ, Tsao YP. 2001. Suppression of choroidal neovascularization by adeno-associated virus vector expressing angiostatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2401-2407.
- Lai YK, Shen WY, Brankov M, Lai CM, Constable IJ, Rakoczy PE. 2002. Potential long-term inhibition of ocular neovascularization by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy. *Gene Ther* 9:804-813.
- Lai CM, Shen WY, Brankov M, Lai YK, Barnett NL, Lee SY, Yeo IY, Mathur R, Ho JE, Pineda P, Barathi A, Ang CL, Constable IJ, Rakoczy EP. 2005. Long-term evaluation of AAV-mediated sFlt-1 gene therapy for ocular neovascularization in mice and monkeys. *Mol Ther* 12:659-668.
- Le Meur G, Weber M, Peroon Y, Mendes-Madeira A, Nivard D, Deschamps JY, Moullet P, Rolling F. 2005. Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates. *Arch Ophthalmol* 123:500-506.
- Le Meur G, Stieger K, Smith AJ, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, Mendes-Madeira A, Provost N, Peroon Y, Cherel Y, Ali RR, Hamel C, Moullet P, Rolling F. 2007. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 14:292-303.
- Lebherz C, Auricchio A, Maguire AM, Rivera VM, Tang W, Grant RL, Clackson T, Bennett J, Wilson JM. 2005. Long-term inducible gene expression in the eye via adeno-associated virus gene transfer in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 16:178-186.
- Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, Dudas L, Fisher KJ, Maguire AM, Jacobson SG, Bennett J. 2001. Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 4:461-472.
- Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR. 1996. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:855-868.
- Lotery AJ, Yang GS, Mullins RF, Russell SR, Schmidt M, Stone EM, Lindbloom JD, Chiorini JA, Kotin RM, Davidson BL. 2003. Adeno-associated virus type 5: Transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther* 14:1663-1671.
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358:2240-2248.
- Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, Mathis A, Chollet P, Favard C, Bayard F, Plouet J. 1994. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 112:1476-1482.
- Marigo V. 2007. Programmed cell death in retinal degeneration: Targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration. *Cell Cycle* 6:652-655.
- Mavlyutov TA, Zhao H, Ferreira PA. 2002. Species-specific subcellular localization of RPGR and RPGRIP isoforms: Implications for the phenotypic variability of congenital retinopathies among species. *Hum Mol Genet* 11:1899-1907.
- McGee Sanftner LH, Rendahl KG, Quiroz D, Coyne M, Ladner M, Manning WC, Flannery JG. 2001. Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol Ther* 3:688-696.
- McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. 1993. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 4:130-134.
- McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL, Dryja TP. 1995. Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3249-3253.
- Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson F, Ciccodicola A, Edgar A, Carvalho MR, Achatz H, Hellebrand H, Lennon A, Migliaccio C, Porter K, Zrenner E, Bird A, Jay M, Lorenz B, Wittwer B, D'Urso M, Meitinger T, Wright A. 1996. A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nat Genet* 13:35-42.
- Mellersh CS, Bourns ME, Pettitt L, Ryder EJ, Holmes NG, Grafham D, Forman OP, Sampson J, Barnett KC, Blanton S, Binns MM, Vaudin M. 2006. Canine RPGRIP1 mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshunds as a homologue of human Leber congenital amaurosis. *Genomics* 88:293-301.
- Michaelides M, Hardcastle AJ, Hunt DM, Moore AT. 2006. Progressive cone and cone-rod dystrophies: Phenotypes and underlying molecular genetic basis. *Surv Ophthalmol* 51:232-258.
- Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, Duh E, Zack DJ, Li Q, Berns KI, Raisler BJ, Hauswirth WW, Campochiaro PA. 2002. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1994-2000.



- Mustonen T, Alitalo K. 1995. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 129:895-898.
- Narfström K. 1999. Hereditary and congenital ocular disease in the cat. *J Feline Med Surg* 1:135-141.
- Narfström K, Katz ML, Ford M, Redmond TM, Rakoczy E, Bragadottir R. 2003. In vivo gene therapy in young and adult RPE65<sup>-/-</sup> dogs produces long-term visual improvement. *J Hered* 94:31-37.
- Narfström K, Vaegan, Katz M, Bragadottir R, Rakoczy EP, Seeliger M. 2005. Assessment of structure and function over a 3-year period after gene transfer in RPE65<sup>-/-</sup> dogs. *Doc Ophthalmol* 111:39-48.
- Ng EW, Adamis AP. 2006. Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1082:151-171.
- O'Reilly M, Palfi A, Chadderton N, Millington-Ward S, Ader M, Cronin T, Tuohy T, Auricchio A, Hildinger M, Tivnan A, McNally N, Humphries MM, Kiang AS, Humphries P, Kenna PF, Farrar GJ. 2007. RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet* 81:127-135.
- Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brüsselmanns K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vlemingckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. 2001. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28:131-138.
- Orth P, Cordes F, Schnappinger D, Hillen W, Saenger W, Hinrichs W. 1998. Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping. *J Mol Biol* 279:439-447.
- Pang JJ, Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Li J, Noorwez SM, Malhotra R, McDowell JH, Kaushal S, Hauswirth WW, Nusinowitz S, Thompson DA, Heckenlively JR. 2005. Retinal degeneration 12 (rd12): A new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Mol Vis* 11:152-162.
- Pearce-Kelling SE, Aleman TS, Nickle A, Laties AM, Aguirre GD, Jacobson SG, Acland GM. 2001. Calcium channel blocker D-cis-diltiazem does not slow retinal degeneration in the PDE6B mutant rcd1 canine model of retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 7:42-47.
- Petersen-Jones S. 2005. Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases. *J Small Anim Pract* 46:371-380.
- Peters RM, Alexander CA, Wells KD, Collins EB, Sommer JR, Blanton MR, Rojas G, Hao Y, Flowers WL, Banin E, Cideciyan AV, Jacobson SG, Wong F. 1997. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat Biotechnol* 15:965-970.
- Pollock R, Giel M, Linher K, Clackson T. 2002. Regulation of endogenous gene expression with a small-molecule dimerizer. *Nat Biotechnol* 20:729-733.
- Provost N, Le Meur G, Weber M, Mendes-Madeira A, Povevin G, Cheral Y, Colle MA, Deschamps JY, Moullier P, Rolling F. 2005. Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: Evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol Ther* 11:275-283.
- Puech B, Kostrubiec B, Hache JC, François P. 1991. [Epidemiology and prevalence of hereditary retinal dystrophies in Northern France]. *J Fr Ophthalmol* 14:153-164.
- Rabb MF, Tso MO, Fishman GA. 1986. Cone-rod dystrophy: A clinical and histopathologic report. *Ophthalmology* 93:1443-1451.
- Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ. 2002. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 76:791-801.
- Redmond TM, Yu S, Lee E, Bok D, Hamasaki D, Chen N, Goletz P, Ma JX, Crouch RK, Pfeifer K. 1998. RPE65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet* 20:344-351.
- Rivera VM, Clackson T, Natesan S, Pollock R, Amara JF, Keenan T, Magari SR, Phillips T, Courage NL, Cerasoli F Jr, Holt DA, Gilman M. 1996. A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* 2:1028-1032.
- Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zoltick PW, Rozamus LW, Clackson T, Wilson JM. 2005. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105:1424-1430.
- Robinson, GS, Pierce, EA, Rook, SL, Foley, E, Webb, R and Smith, LE. 1996. Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4851-6.
- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY. 2006. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355:1419-1431.
- Ryan SJ. 1982. Subretinal neovascularization: Natural history of an experimental model. *Arch Ophthalmol* 100:1804-1809.
- Saishin Y, Silva RL, Saishin Y, Callahan K, Schoch C, Ahlheim M, Lai H, Kane F, Brazzell RK, Bodmer D, Campochiaro PA. 2003. Periocular injection of microspheres containing PKC412 inhibits choroidal neovascularization in a porcine model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4989-4993.
- Saishin Y, Silva RL, Saishin Y, Kachi S, Aslam S, Gong YY, Lai H, Carrion M, Harris B, Hamilton M, Wei L, Campochiaro PA. 2005. Periocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization in a human-sized eye. *Hum Gene Ther* 16:473-478.
- Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, Farber MD, Gragoudas ES, Haller J, Miller DT. 1994. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *Eye Disease Case-Control Study Group. JAMA* 272:1413-1420.
- Seddon JM, Cote J, Rosner B. 2003. Progression of age-related macular degeneration: Association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake. *Arch Ophthalmol* 121:1728-1737.
- Seddon JM, Hampson EC, Smith RI, Hughes IP. 2006. Genetic heterogeneity of day blindness in Alaskan Malamutes. *Anim Genet* 37:407-410.
- Shen WY, Lee SY, Yeo I, Lai CM, Mathur R, Tan D, Constable IJ, Rakoczy PE. 2004. Predilection of the macular region to high incidence of choroidal neovascularization after intense laser photocoagulation in the monkey. *Arch Ophthalmol* 122:353-360.
- Sidjanin DJ, Lowe JK, McElwee JL, Milne BS, Phippen TM, Sargan DR, Aguirre GD, Acland GM, Ostrander EA. 2002. Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3. *Hum Mol Genet* 11:1823-1833.
- Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E, Tattersall P. 1985. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23:61-73.
- Srivastava A, Lusby EW, Berns KI. 1983. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45:555-564.
- Stieger K, Le Meur G, Lasne F, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, Mendes-Madeira A, Provost N, Martin L, Moullier P, Rolling F. 2006. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther* 13:967-975.
- Stieger K, Mendes-Madeira A, Le Meur G, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, Provost N, Moullier P, Rolling F. 2007. Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: A key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther* 14:1668-1673.
- Stieger K, Colle MA, Dubreil L, Mendes-Madeira A, Weber M, Le Meur G, Deschamps JY, Provost N, Nivard D, Cheral Y, Moullier P, Rolling F. 2008. Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Mol Ther* 16:916-923.
- Stohr H, Milenkovic V, Weber BH. 2005. [VMD2 and its role in Best's disease and other retinopathies]. *Ophthalmologie* 102:116-121.
- Strauss O, Rosenthal R. 2005. [Function of bestrophin]. *Ophthalmologie* 102:122-126.
- Streilein JW. 2003. Ocular immune privilege: Therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 3:879-889.
- Suber ML, Pittler SJ, Qin N, Wright GC, Holcombe V, Lee RH, Craft CM, Lolley RN, Baehr W, Hurwitz RL. 1993. Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3968-3972.
- Ting JH, Martin DK. 2006. Basic and clinical aspects of gene therapy for retinopathy induced by diabetes. *Curr Gene Ther* 6:193-214.

- Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR, Klein BE, Smith W, De Jong PT. 2004. Risk factors for incident age-related macular degeneration: Pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology* 111:1280-1287.
- Turney C, Chong NH, Alexander RA, Hogg CR, Fleming L, Flack D, Barnett KC, Bird AC, Holder GE, Luthert PJ. 2007. Pathological and electrophysiological features of a canine cone-rod dystrophy in the miniature longhaired dachshund. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:4240-4249.
- Vervoort R, Lennon A, Bird AC, Tulloch B, Axton R, Miano MG, Meindl A, Meitinger T, Ciccodicola A, Wright AF. 2000. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 25:462-466.
- Veske A, Nilsson SE, Narfström K, Gal A. 1999. Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. *Genomics* 57:57-61.
- Wang JJ, Rohtchina E, Lee AJ, Chia EM, Smith W, Cumming RG, Mitchell P. 2007. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 114:92-98.
- Warrington KH Jr, Herzog RW. 2006. Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* 119:571-603.
- Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D, Chereil Y, Chenuaud P, Samulski J, Moullier P, Rolling F. 2003. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* 7:774-781.
- Wissmann A, Meier I, Wray LV Jr, Geissendorfer M, Hillen W. 1986. Tn10 tet operator mutations affecting Tet repressor recognition. *Nucleic Acids Res* 14:4253-4266.
- Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 22:1-29.
- Zangerl B, Guziewicz KE, Komaromy AM, Lindauer SJ, Alexander JJ, Glushakova LG, Hauswirth WW, Acland GM, Aguirre GD. 2008. Human bestrophin promoter drives RPE-specific GFP expression in the canine retina. ARVO Presentation (Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2008 Annual Meeting), April 28, Fort Lauderdale.
- Zeiss CJ, Acland GM, Aguirre GD. 1999. Retinal pathology of canine X-linked progressive retinal atrophy, the locus homologue of RP3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:3292-3304.
- Zhang Q, Acland GM, Wu WX, Johnson JL, Pearce-Kelling S, Tulloch B, Vervoort R, Wright AF, Aguirre GD. 2002. Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. *Hum Mol Genet* 11:993-1003.
- Zhao Y, Hong DH, Pawlyk B, Yue G, Adamian M, Grynberg M, Godzik A, Li T. 2003. The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein: Subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3965-3970.

# Références bibliographiques

## 5. Références bibliographiques.

- Acland, G. M., G. D. Aguirre, J. Bennett, T. S. Aleman, A. V. Cideciyan, J. Bennicelli, N. S. Dejneka, S. E. Pearce-Kelling, A. M. Maguire, K. Palczewski, W. W. Hauswirth and S. G. Jacobson (2005). "Long-Term Restoration of Rod and Cone Vision by Single Dose rAAV-Mediated Gene Transfer to the Retina in a Canine Model of Childhood Blindness." *Mol Ther* **12**(6): 1072-82.
- Acland, G. M., G. D. Aguirre, J. Ray, Q. Zhang, T. S. Aleman, A. V. Cideciyan, S. E. Pearce-Kelling, V. Anand, Y. Zeng, A. M. Maguire, S. G. Jacobson, W. W. Hauswirth and J. Bennett (2001). "Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness." *Nat Genet* **28**(1): 92-5.
- Aguirre, G. D., V. Baldwin, S. Pearce-Kelling, K. Narfstrom, K. Ray and G. M. Acland (1998). "Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect." *Mol Vis* **4**: 23.
- Aguirre, G. D., V. Baldwin, K. M. Weeks, G. M. Acland and K. Ray (1999). "Frequency of the codon 807 mutation in the cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in Irish setters and other dog breeds with hereditary retinal degeneration." *J Hered* **90**(1): 143-7.
- Aguirre, G. K., A. M. Komaromy, A. V. Cideciyan, D. H. Brainard, T. S. Aleman, A. J. Roman, B. B. Avants, J. C. Gee, M. Korczykowski, W. W. Hauswirth, G. M. Acland, G. D. Aguirre and S. G. Jacobson (2007). "Canine and human visual cortex intact and responsive despite early retinal blindness from RPE65 mutation." *PLoS Med* **4**(6): e230.
- Akache, B., D. Grimm, K. Pandey, S. R. Yant, H. Xu and M. A. Kay (2006). "The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9." *J Virol* **80**(19): 9831-6.
- Alexander, J. J., Y. Umino, D. Everhart, B. Chang, S. H. Min, Q. Li, A. M. Timmers, N. L. Hawes, J. J. Pang, R. B. Barlow and W. W. Hauswirth (2007). "Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia." *Nat Med* **13**(6): 685-7.
- Ali, R. R., M. B. Reichel, M. De Alwis, N. Kanuga, C. Kinnon, R. J. Levinsky, D. M. Hunt, S. S. Bhattacharya and A. J. Thrasher (1998). "Adeno-associated virus gene transfer to mouse retina." *Hum Gene Ther* **9**(1): 81-6.
- Ali, R. R., M. B. Reichel, A. J. Thrasher, R. J. Levinsky, C. Kinnon, N. Kanuga, D. M. Hunt and S. S. Bhattacharya (1996). "Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector." *Hum Mol Genet* **5**(5): 591-4.



- Ali, R. R., G. M. Sarra, C. Stephens, M. D. Alwis, J. W. Bainbridge, P. M. Munro, S. Fauser, M. B. Reichel, C. Kinnon, D. M. Hunt, S. S. Bhattacharya and A. J. Thrasher (2000). "Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy." *Nat Genet* **25**(3): 306-10.
- Arruda, V. R., J. N. Hagstrom, J. Deitch, T. Heiman-Patterson, R. M. Camire, K. Chu, P. A. Fields, R. W. Herzog, L. B. Couto, P. J. Larson and K. A. High (2001). "Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX." *Blood* **97**(1): 130-8.
- Arshavsky, V. (2002). "Like night and day: rods and cones have different pigment regeneration pathways." *Neuron* **36**(1): 1-3.
- Arts, H. H., D. Doherty, S. E. van Beersum, M. A. Parisi, S. J. Letteboer, N. T. Gordon, T. A. Peters, T. Marker, K. Voeselek, A. Kartono, H. Ozyurek, F. M. Farin, H. Y. Kroes, U. Wolfrum, H. G. Brunner, F. P. Cremers, I. A. Glass, N. V. Knoers and R. Roepman (2007). "Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome." *Nat Genet* **39**(7): 882-8.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." *Nat Rev Cancer* **2**(6): 420-30.
- Atchison, R. W., B. C. Casto and W. M. Hammon (1965). "Adenovirus-Associated Defective Virus Particles." *Science* **149**: 754-6.
- Auricchio, A., G. Kobinger, V. Anand, M. Hildinger, E. O'Connor, A. M. Maguire, J. M. Wilson and J. Bennett (2001). "Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model." *Hum Mol Genet* **10**(26): 3075-81.
- Bainbridge, J. W., A. Mistry, F. C. Schlichtenbrede, A. Smith, C. Broderick, M. De Alwis, A. Georgiadis, P. M. Taylor, M. Squires, C. Sethi, D. Charteris, A. J. Thrasher, D. Sargan and R. R. Ali (2003). "Stable rAAV-mediated transduction of rod and cone photoreceptors in the canine retina." *Gene Ther* **10**(16): 1336-44.
- Bainbridge, J. W., A. J. Smith, S. S. Barker, S. Robbie, R. Henderson, K. Balaggan, A. Viswanathan, G. E. Holder, A. Stockman, N. Tyler, S. Petersen-Jones, S. S. Bhattacharya, A. J. Thrasher, F. W. Fitzke, B. J. Carter, G. S. Rubin, A. T. Moore and R. R. Ali (2008). "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis." *N Engl J Med* **358**(21): 2231-9.
- Baker, S. A., K. Freeman, K. Luby-Phelps, G. J. Pazour and J. C. Besharse (2003). "IFT20 links kinesin II with a mammalian intraflagellar transport complex that is conserved in motile flagella and sensory cilia." *J Biol Chem* **278**(36): 34211-8.

- Bantel-Schaal, U., H. Delius, R. Schmidt and H. zur Hausen (1999). "Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvoviruses." *J Virol* **73**(2): 939-47.
- Bantel-Schaal, U. and H. zur Hausen (1984). "Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site." *Virology* **134**(1): 52-63.
- Baron, U., M. Gossen and H. Bujard (1997). "Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential." *Nucleic Acids Res* **25**(14): 2723-9.
- Bascom, R. A., S. Manara, L. Collins, R. S. Molday, V. I. Kalnins and R. R. McInnes (1992). "Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disk rim protein family implicated in human retinopathies." *Neuron* **8**(6): 1171-84.
- Batten, M. L., Y. Imanishi, T. Maeda, D. C. Tu, A. R. Moise, D. Bronson, D. Possin, R. N. Van Gelder, W. Baehr and K. Palczewski (2004). "Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver." *J Biol Chem* **279**(11): 10422-32.
- Batten, M. L., Y. Imanishi, D. C. Tu, T. Doan, L. Zhu, J. Pang, L. Glushakova, A. R. Moise, W. Baehr, R. N. Van Gelder, W. W. Hauswirth, F. Rieke and K. Palczewski (2005). "Pharmacological and rAAV gene therapy rescue of visual functions in a blind mouse model of Leber congenital amaurosis." *PLoS Med* **2**(11): e333.
- Bennett, J., D. Duan, J. F. Engelhardt and A. M. Maguire (1997). "Real-time, noninvasive in vivo assessment of adeno-associated virus-mediated retinal transduction." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**(13): 2857-63.
- Bennett, J., A. M. Maguire, A. V. Cideciyan, M. Schnell, E. Glover, V. Anand, T. S. Aleman, N. Chirmule, A. R. Gupta, Y. Huang, G. P. Gao, W. C. Nyberg, J. Tazelaar, J. Hughes, J. M. Wilson and S. G. Jacobson (1999). "Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9920-5.
- Bennett, J., D. Sun and K. Kariko (1995). "Sequence analysis of the 5.34-kb 5' flanking region of the human rhodopsin-encoding gene." *Gene* **167**(1-2): 317-20.
- Blouin, V., N. Brument, E. Toubanc, I. Raimbaud, P. Moullier and A. Salvetti (2004). "Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process." *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S223-8.
- Boatright, K. M., M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J. E. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherlin, D. R. Green and G. S. Salvesen (2003). "A unified model for apical caspase activation." *Mol Cell* **11**(2): 529-41.

- Bohl, D., N. Naffakh and J. M. Heard (1997). "Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts." *Nat Med* **3**(3): 299-305.
- Bohl, D., A. Salvetti, P. Moullier and J. M. Heard (1998). "Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector." *Blood* **92**(5): 1512-7.
- Booij, J. C., R. J. Florijn, J. B. ten Brink, W. Loves, F. Meire, M. J. van Schooneveld, P. T. de Jong and A. A. Bergen (2005). "Identification of mutations in the AIPL1, CRB1, GUCY2D, RPE65, and RPGRIP1 genes in patients with juvenile retinitis pigmentosa." *J Med Genet* **42**(11): e67.
- Booth, M. J., A. Mistry, X. Li, A. Thrasher and R. S. Coffin (2004). "Transfection-free and scalable recombinant AAV vector production using HSV/AAV hybrids." *Gene Ther* **11**(10): 829-37.
- Boylan, J. P. and A. F. Wright (2000). "Identification of a novel protein interacting with RPGR." *Hum Mol Genet* **9**(14): 2085-93.
- Brument, N., R. Morenweiser, V. Blouin, E. Toublanc, I. Raimbaud, Y. Cherel, S. Folliot, F. Gaden, P. Boulanger, G. Kroner-Lux, P. Moullier, F. Rolling and A. Salvetti (2002). "A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5." *Mol Ther* **6**(5): 678-86.
- Calcedo, R., L. H. Vandenberghe, G. Gao, J. Lin and J. M. Wilson (2009). "Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses." *J Infect Dis* **199**(3): 381-90.
- Carmody, R. J. and T. G. Cotter (2000). "Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro." *Cell Death Differ* **7**(3): 282-91.
- Castagnet, P., T. Mavlyutov, Y. Cai, F. Zhong and P. Ferreira (2003). "RPGRIP1s with distinct neuronal localization and biochemical properties associate selectively with RanBP2 in amacrine neurons." *Hum Mol Genet* **12**(15): 1847-63.
- Chadeuf, G., D. Favre, J. Tessier, N. Provost, P. Nony, J. Kleinschmidt, P. Moullier and A. Salvetti (2000). "Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome." *J Gene Med* **2**(4): 260-8.
- Chang, B., M. S. Dacey, N. L. Hawes, P. F. Hitchcock, A. H. Milam, P. Atmaca-Sonmez, S. Nusinowitz and J. R. Heckenlively (2006). "Cone photoreceptor function loss-3, a novel mouse model of achromatopsia due to a mutation in Gnat2." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(11): 5017-21.

- Chang, B., N. L. Hawes, R. E. Hurd, M. T. Davisson, S. Nusinowitz and J. R. Heckenlively (2002). "Retinal degeneration mutants in the mouse." *Vision Res* **42**(4): 517-25.
- Chen, J., C. L. Tucker, B. Woodford, A. Szel, J. Lem, A. Gianella-Borradori, M. I. Simon and E. Bogenmann (1994). "The human blue opsin promoter directs transgene expression in short-wave cones and bipolar cells in the mouse retina." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(7): 2611-5.
- Chenuaud, P., T. Larcher, J. E. Rabinowitz, N. Provost, Y. Cherel, N. Casadevall, R. J. Samulski and P. Moullier (2004a). "Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy." *Blood* **103**(9): 3303-4.
- Chenuaud, P., T. Larcher, J. E. Rabinowitz, N. Provost, B. Joussemet, H. Bujard, R. J. Samulski, D. Favre and P. Moullier (2004b). "Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle." *Mol Ther* **9**(3): 410-8.
- Chiorini, J. A., F. Kim, L. Yang and R. M. Kotin (1999). "Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5." *J Virol* **73**(2): 1309-19.
- Chirmule, N., K. Propert, S. Magosin, Y. Qian, R. Qian and J. Wilson (1999). "Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans." *Gene Ther* **6**(9): 1574-83.
- Choi, V. W., D. M. McCarty and R. J. Samulski (2006). "Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing." *J Virol* **80**(21): 10346-56.
- Clark, K. R., F. Voulgaropoulou, D. M. Fraley and P. R. Johnson (1995). "Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus." *Hum Gene Ther* **6**(10): 1329-41.
- Conrad, C. K., S. S. Allen, S. A. Afione, T. C. Reynolds, S. E. Beck, M. Fee-Maki, X. Barraza-Ortiz, R. Adams, F. B. Askin, B. J. Carter, W. B. Guggino and T. R. Flotte (1996). "Safety of single-dose administration of an adeno-associated virus (AAV)-CFTR vector in the primate lung." *Gene Ther* **3**(8): 658-68.
- Conway, J. E., S. Zolotukhin, N. Muzyczka, G. S. Hayward and B. J. Byrne (1997). "Recombinant adeno-associated virus type 2 replication and packaging is entirely supported by a herpes simplex virus type 1 amplicon expressing Rep and Cap." *J Virol* **71**(11): 8780-9.
- Copenhagen, D. R. (1991). "Synaptic transmission in the retina." *Curr Opin Neurobiol* **1**(2): 258-62.
- Curtis, R. and K. C. Barnett (1993). "Progressive retinal atrophy in miniature longhaired dachshund dogs." *Br Vet J* **149**(1): 71-85.
- Dejneka, N. S., E. M. Surace, T. S. Aleman, A. V. Cideciyan, A. Lyubarsky, A. Savchenko, T. M. Redmond, W. Tang, Z. Wei, T. S. Rex, E. Glover, A. M. Maguire, E. N. Pugh, Jr.,

- S. G. Jacobson and J. Bennett (2004). "In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness." *Mol Ther* **9**(2): 182-8.
- Delous, M., L. Baala, R. Salomon, C. Laclef, J. Vierkotten, K. Tory, C. Golzio, T. Lacoste, L. Besse, C. Ozilou, I. Moutkine, N. E. Hellman, I. Anselme, F. Silbermann, C. Vesque, C. Gerhardt, E. Rattenberry, M. T. Wolf, M. C. Gubler, J. Martinovic, F. Encha-Razavi, N. Boddaert, M. Gonzales, M. A. Macher, H. Nivet, G. Champion, J. P. Bertheleme, P. Niaudet, F. McDonald, F. Hildebrandt, C. A. Johnson, M. Vekemans, C. Antignac, U. Ruther, S. Schneider-Maunoury, T. Attie-Bitach and S. Saunier (2007). "The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome." *Nat Genet* **39**(7): 875-81.
- den Hollander, A. I., R. Roepman, R. K. Koenekoop and F. P. Cremers (2008). "Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms." *Prog Retin Eye Res* **27**(4): 391-419.
- Deuschle, U., W. K. Meyer and H. J. Thiesen (1995). "Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters." *Mol Cell Biol* **15**(4): 1907-14.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-52.
- Dhawan, J., T. A. Rando, S. L. Elson, H. Bujard and H. M. Blau (1995). "Tetracycline-regulated gene expression following direct gene transfer into mouse skeletal muscle." *Somat Cell Mol Genet* **21**(4): 233-40.
- Di Pasquale, G., B. L. Davidson, C. S. Stein, I. Martins, D. Scudiero, A. Monks and J. A. Chiorini (2003). "Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction." *Nat Med* **9**(10): 1306-12.
- Donovan, M., R. J. Carmody and T. G. Cotter (2001). "Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent." *J Biol Chem* **276**(25): 23000-8.
- Donovan, M. and T. G. Cotter (2002). "Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development." *Cell Death Differ* **9**(11): 1220-31.
- Doonan, F., M. Donovan and T. G. Cotter (2003). "Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration." *J Neurosci* **23**(13): 5723-31.
- Dryja, T. P., S. M. Adams, J. L. Grimsby, T. L. McGee, D. H. Hong, T. Li, S. Andreasson and E. L. Berson (2001). "Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis." *Am J Hum Genet* **68**(5): 1295-8.
- Dryja, T. P., L. B. Hahn, G. S. Cowley, T. L. McGee and E. L. Berson (1991). "Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(20): 9370-4.

- Dryja, T. P., T. L. McGee, L. B. Hahn, G. S. Cowley, J. E. Olsson, E. Reichel, M. A. Sandberg and E. L. Berson (1990). "Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa." *N Engl J Med* **323**(19): 1302-7.
- Duan, D., P. Sharma, L. Dudus, Y. Zhang, S. Sanlioglu, Z. Yan, Y. Yue, Y. Ye, R. Lester, J. Yang, K. J. Fisher and J. F. Engelhardt (1999). "Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression." *J Virol* **73**(1): 161-9.
- Duan, D., P. Sharma, J. Yang, Y. Yue, L. Dudus, Y. Zhang, K. J. Fisher and J. F. Engelhardt (1998). "Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue." *J Virol* **72**(11): 8568-77.
- Dudus, L., V. Anand, G. M. Acland, S. J. Chen, J. M. Wilson, K. J. Fisher, A. M. Maguire and J. Bennett (1999). "Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV." *Vision Res* **39**(15): 2545-53.
- Dyer, M. A., S. L. Donovan, J. Zhang, J. Gray, A. Ortiz, R. Tenney, J. Kong, R. Allikmets and M. M. Sohocki (2004). "Retinal degeneration in Aipl1-deficient mice: a new genetic model of Leber congenital amaurosis." *Brain Res Mol Brain Res* **132**(2): 208-20.
- Esumi, N., Y. Oshima, Y. Li, P. A. Campochiaro and D. J. Zack (2004). "Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box binding factors in its regulation." *J Biol Chem* **279**(18): 19064-73.
- Farrar, G. J., P. McWilliam, D. G. Bradley, P. Kenna, M. Lawler, E. M. Sharp, M. M. Humphries, H. Eiberg, P. M. Conneally, J. A. Trofatter and et al. (1990). "Autosomal dominant retinitis pigmentosa: linkage to rhodopsin and evidence for genetic heterogeneity." *Genomics* **8**(1): 35-40.
- Farson, D., T. C. Harding, L. Tao, J. Liu, S. Powell, V. Vimal, S. Yendluri, K. Koprivnikar, K. Ho, C. Twitty, P. Husak, A. Lin, R. O. Snyder and B. A. Donahue (2004). "Development and characterization of a cell line for large-scale, serum-free production of recombinant adeno-associated viral vectors." *J Gene Med* **6**(12): 1369-81.
- Favre, D., V. Blouin, N. Provost, R. Spisek, F. Porrot, D. Bohl, F. Marme, Y. Cherel, A. Salvetti, B. Hurtrel, J. M. Heard, Y. Riviere and P. Moullier (2002). "Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus." *J Virol* **76**(22): 11605-11.

- Favre, D., N. Provost, V. Blouin, G. Blancho, Y. Cherel, A. Salvetti and P. Moullier (2001). "Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle." *Mol Ther* **4**(6): 559-66.
- Fei, Y. (2003). "Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice." *Mol Vis* **9**: 31-42.
- Fender, P., L. Jeanson, M. A. Ivanov, P. Colin, J. Mallet, J. F. Dedieu and M. Latta-Mahieu (2002). "Controlled transgene expression by E1-E4-defective adenovirus vectors harbouring a "tet-on" switch system." *J Gene Med* **4**(6): 668-75.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* **340**(6230): 245-6.
- Fisher, K. J., K. Jooss, J. Alston, Y. Yang, S. E. Haecker, K. High, R. Pathak, S. E. Raper and J. M. Wilson (1997). "Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy." *Nat Med* **3**(3): 306-12.
- Fishman, G. I., M. L. Kaplan and P. M. Buttrick (1994). "Tetracycline-regulated cardiac gene expression in vivo." *J Clin Invest* **93**(4): 1864-8.
- Flageul, M., D. Aubert, V. Pichard, T. H. Nguyen, A. Nowrouzi, M. Schmidt and N. Ferry (2009). "Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors." *J Gene Med* **11**(8): 689-96.
- Fliegauf, M. and H. Omran (2006). "Novel tools to unravel molecular mechanisms in cilia-related disorders." *Trends Genet* **22**(5): 241-5.
- Folliot, S., D. Briot, H. Conrath, N. Provost, Y. Cherel, P. Moullier and F. Rolling (2003). "Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector." *J Gene Med* **5**(6): 493-501.
- Francois, A., M. Guilbaud, R. Awedikian, G. Chadeuf, P. Moullier and A. Salvetti (2005). "The cellular TATA binding protein is required for rep-dependent replication of a minimal adeno-associated virus type 2 p5 element." *J Virol* **79**(17): 11082-94.
- Fu, Y. and K. W. Yau (2007). "Phototransduction in mouse rods and cones." *Pflugers Arch* **454**(5): 805-19.
- Furth, P. A., L. St Onge, H. Boger, P. Gruss, M. Gossen, A. Kistner, H. Bujard and L. Hennighausen (1994). "Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9302-6.
- Gao, G., L. H. Vandenberghe, M. R. Alvira, Y. Lu, R. Calcedo, X. Zhou and J. M. Wilson (2004). "Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues." *J Virol* **78**(12): 6381-8.
- Gao, G. P., M. R. Alvira, L. Wang, R. Calcedo, J. Johnston and J. M. Wilson (2002a). "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11854-9.

- Gao, G. P., F. Lu, J. C. Sanmiguel, P. T. Tran, Z. Abbas, K. S. Lynd, J. Marsh, N. B. Spinner and J. M. Wilson (2002b). "Rep/Cap gene amplification and high-yield production of AAV in an A549 cell line expressing Rep/Cap." *Mol Ther* **5**(5 Pt 1): 644-9.
- Gao, G. P., G. Qu, L. Z. Faust, R. K. Engdahl, W. Xiao, J. V. Hughes, P. W. Zoltick and J. M. Wilson (1998). "High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus." *Hum Gene Ther* **9**(16): 2353-62.
- Gargiulo, A., C. Bonetti, S. Montefusco, S. Neglia, U. Di Vicino, E. Marrocco, M. D. Corte, L. Domenici, A. Auricchio and E. M. Surace (2009). "AAV-mediated Tyrosinase Gene Transfer Restores Melanogenesis and Retinal Function in a Model of Oculo-cutaneous Albinism Type I (OCA1)." *Mol Ther* **12**: 12.
- Gehrig, A. E., R. Warneke-Wittstock, C. G. Sauer and B. H. Weber (1999). "Isolation and characterization of the murine X-linked juvenile retinoschisis (Rs1h) gene." *Mamm Genome* **10**(3): 303-7.
- Gerber, S., I. Perrault, S. Hanein, F. Barbet, D. Ducroq, I. Ghazi, D. Martin-Coignard, C. Leowski, T. Homfray, J. L. Dufier, A. Munnich, J. Kaplan and J. M. Rozet (2001). "Complete exon-intron structure of the RPGR-interacting protein (RPGRIP1) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis." *Eur J Hum Genet* **9**(8): 561-71.
- Golczak, M., Y. Imanishi, V. Kuksa, T. Maeda, R. Kubota and K. Palczewski (2005). "Lecithin:retinol acyltransferase is responsible for amidation of retinylamine, a potent inhibitor of the retinoid cycle." *J Biol Chem* **280**(51): 42263-73.
- Gonin, P. and C. Gaillard (2004). "Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development." *Gene Ther* **11 Suppl 1**: S98-S108.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5547-51.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen and H. Bujard (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." *Science* **268**(5218): 1766-9.
- Gotoh, T., S. Oyadomari, K. Mori and M. Mori (2002). "Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP." *J Biol Chem* **277**(14): 12343-50.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* **281**(5381): 1309-12.
- Grieger, J. C., V. W. Choi and R. J. Samulski (2006). "Production and characterization of adeno-associated viral vectors." *Nat Protoc* **1**(3): 1412-28.



- Grieger, J. C. and R. J. Samulski (2005). "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications." *Adv Biochem Eng Biotechnol* **99**: 119-45.
- Grimm, C., A. Wenzel, T. Williams, P. Rol, F. Hafezi and C. Reme (2001). "Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(2): 497-505.
- Grimm, D., M. A. Kay and J. A. Kleinschmidt (2003). "Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6." *Mol Ther* **7**(6): 839-50.
- Grimm, D., A. Kern, K. Rittner and J. A. Kleinschmidt (1998). "Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors." *Hum Gene Ther* **9**(18): 2745-60.
- Guerin, C. J., G. P. Lewis, S. K. Fisher and D. H. Anderson (1993). "Recovery of photoreceptor outer segment length and analysis of membrane assembly rates in regenerating primate photoreceptor outer segments." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**(1): 175-83.
- Haire, S. E., J. Pang, S. L. Boye, I. Sokal, C. M. Craft, K. Palczewski, W. W. Hauswirth and S. L. Semple-Rowland (2006). "Light-driven cone arrestin translocation in cones of postnatal guanylate cyclase-1 knockout mouse retina treated with AAV-GC1." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(9): 3745-53.
- Halbert, C. L., J. M. Allen and A. D. Miller (2001). "Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors." *J Virol* **75**(14): 6615-24.
- Hanein, S., I. Perrault, S. Gerber, G. Tanguy, F. Barbet, D. Ducroq, P. Calvas, H. Dollfus, C. Hamel, T. Lopponen, F. Munier, L. Santos, S. Shalev, D. Zafeiriou, J. L. Dufier, A. Munnich, J. M. Rozet and J. Kaplan (2004). "Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis." *Hum Mutat* **23**(4): 306-17.
- Hanson, S. M., E. V. Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, M. R. Ahmed, X. Song and V. V. Gurevich (2007). "Each rhodopsin molecule binds its own arrestin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(9): 3125-8.
- Hao, W., A. Wenzel, M. S. Obin, C. K. Chen, E. Brill, N. V. Krasnoperova, P. Eversole-Cire, Y. Kleyner, A. Taylor, M. I. Simon, C. Grimm, C. E. Reme and J. Lem (2002). "Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration." *Nat Genet* **32**(2): 254-60.

- Hauswirth, W., T. S. Aleman, S. Kaushal, A. V. Cideciyan, S. B. Schwartz, L. Wang, T. Conlon, S. L. Boye, T. R. Flotte, B. Byrne and S. G. Jacobson (2008). "Phase I Trial of Leber Congenital Amaurosis due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results." *Hum Gene Ther* **7**: 7.
- Heitz, F., C. Nay and C. Guenet (1997). "Expression of functional human muscarinic M2 receptors in different insect cell lines." *J Recept Signal Transduct Res* **17**(1-3): 305-17.
- Hennig, A. K., B. Levy, J. M. Ogilvie, C. A. Vogler, N. Galvin, S. Bassnett and M. S. Sands (2003). "Intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in specific areas of the CNS in mucopolysaccharidosis VII mice." *J Neurosci* **23**(8): 3302-7.
- Hoggan, M. D., N. R. Blacklow and W. P. Rowe (1966). "Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics." *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(6): 1467-74.
- Hong, D. H., B. Pawlyk, M. Sokolov, K. J. Strissel, J. Yang, B. Tulloch, A. F. Wright, V. Y. Arshavsky and T. Li (2003). "RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(6): 2413-21.
- Hong, D. H., B. S. Pawlyk, M. Adamian, M. A. Sandberg and T. Li (2005). "A single, abbreviated RPGR-ORF15 variant reconstitutes RPGR function in vivo." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(2): 435-41.
- Hong, D. H., B. S. Pawlyk, J. Shang, M. A. Sandberg, E. L. Berson and T. Li (2000). "A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3649-54.
- Hong, D. H., G. Yue, M. Adamian and T. Li (2001). "Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGRr)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium." *J Biol Chem* **276**(15): 12091-9.
- Horst, C. J., D. M. Forestner and J. C. Besharse (1987). "Cytoskeletal-membrane interactions: a stable interaction between cell surface glycoconjugates and doublet microtubules of the photoreceptor connecting cilium." *J Cell Biol* **105**(6 Pt 2): 2973-87.
- Humphries, P., G. J. Farrar, P. Kenna and P. McWilliam (1990). "Retinitis pigmentosa: genetic mapping in X-linked and autosomal forms of the disease." *Clin Genet* **38**(1): 1-13.
- Incerti, B., K. Cortese, A. Pizzigoni, E. M. Surace, S. Varani, M. Coppola, G. Jeffery, M. Seeliger, G. Jaissle, D. C. Bennett, V. Marigo, M. V. Schiaffino, C. Tacchetti and A. Ballabio (2000). "Oa1 knock-out: new insights on the pathogenesis of ocular albinism type 1." *Hum Mol Genet* **9**(19): 2781-8.

- Inoue, N. and D. W. Russell (1998). "Packaging cells based on inducible gene amplification for the production of adeno-associated virus vectors." *J Virol* **72**(9): 7024-31.
- Insinna, C., N. Pathak, B. Perkins, I. Drummond and J. C. Besharse (2008). "The homodimeric kinesin, Kif17, is essential for vertebrate photoreceptor sensory outer segment development." *Dev Biol* **316**(1): 160-70.
- Jacobson, S. G., G. M. Acland, G. D. Aguirre, T. S. Aleman, S. B. Schwartz, A. V. Cideciyan, C. J. Zeiss, A. M. Komaromy, S. Kaushal, A. J. Roman, E. A. Windsor, A. Sumaroka, S. E. Pearce-Kelling, T. J. Conlon, V. A. Chiodo, S. L. Boye, T. R. Flotte, A. M. Maguire, J. Bennett and W. W. Hauswirth (2006a). "Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection." *Mol Ther* **13**(6): 1074-84.
- Jacobson, S. G., T. S. Aleman, A. V. Cideciyan, A. Sumaroka, S. B. Schwartz, E. A. Windsor, E. I. Traboulsi, E. Heon, S. J. Pittler, A. H. Milam, A. M. Maguire, K. Palczewski, E. M. Stone and J. Bennett (2005). "Identifying photoreceptors in blind eyes caused by RPE65 mutations: Prerequisite for human gene therapy success." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17): 6177-82.
- Jacobson, S. G., S. L. Boye, T. S. Aleman, T. J. Conlon, C. J. Zeiss, A. J. Roman, A. V. Cideciyan, S. B. Schwartz, A. M. Komaromy, M. Doobrajeh, A. Y. Cheung, A. Sumaroka, S. E. Pearce-Kelling, G. D. Aguirre, S. Kaushal, A. M. Maguire, T. R. Flotte and W. W. Hauswirth (2006b). "Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis." *Hum Gene Ther* **17**(8): 845-58.
- Jacobson, S. G., A. V. Cideciyan, T. S. Aleman, A. Sumaroka, S. B. Schwartz, A. J. Roman and E. M. Stone (2007). "Leber congenital amaurosis caused by an RPGRIP1 mutation shows treatment potential." *Ophthalmology* **114**(5): 895-8.
- Jacobson, S. G., A. V. Cideciyan, T. S. Aleman, A. Sumaroka, E. A. Windsor, S. B. Schwartz, E. Heon and E. M. Stone (2008). "Photoreceptor layer topography in children with leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(10): 4573-7.
- Jiang, B., M. A. Bezhadian and R. B. Caldwell (1995). "Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: effects on endothelial cell differentiation." *Glia* **15**(1): 1-10.
- Johnson, J. S. and R. J. Samulski (2009). "Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus." *J Virol* **83**(6): 2632-44.
- Jomary, C., K. A. Vincent, J. Grist, M. J. Neal and S. E. Jones (1997). "Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration." *Gene Ther* **4**(7): 683-90.

- Kaludov, N., K. E. Brown, R. W. Walters, J. Zabner and J. A. Chiorini (2001). "Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity." *J Virol* **75**(15): 6884-93.
- Kashiwakura, Y., K. Tamayose, K. Iwabuchi, Y. Hirai, T. Shimada, K. Matsumoto, T. Nakamura, M. Watanabe, K. Oshimi and H. Daida (2005). "Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection." *J Virol* **79**(1): 609-14.
- Kaufmann, S. H. and M. O. Hengartner (2001). "Programmed cell death: alive and well in the new millennium." *Trends Cell Biol* **11**(12): 526-34.
- Kawamura, S. and S. Tachibanaki (2008). "Rod and cone photoreceptors: molecular basis of the difference in their physiology." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **150**(4): 369-77.
- Keeler, C. E. (1924). "The Inheritance of a Retinal Abnormality in White Mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **10**(7): 329-33.
- Khani, S. C., B. S. Pawlyk, O. V. Bulgakov, E. Kasperek, J. E. Young, M. Adamian, X. Sun, A. J. Smith, R. R. Ali and T. Li (2007). "AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(9): 3954-61.
- Khanna, H., T. W. Hurd, C. Lillo, X. Shu, S. K. Parapuram, S. He, M. Akimoto, A. F. Wright, B. Margolis, D. S. Williams and A. Swaroop (2005). "RPGR-ORF15, which is mutated in retinitis pigmentosa, associates with SMC1, SMC3, and microtubule transport proteins." *J Biol Chem* **280**(39): 33580-7.
- Khosravi-Far, R. and M. D. Esposti (2004). "Death receptor signals to mitochondria." *Cancer Biol Ther* **3**(11): 1051-7.
- Kolandaivelu, S., J. Huang, J. B. Hurley and V. Ramamurthy (2009). "AIPL1, a protein associated with childhood blindness, interacts with  $\alpha$ -subunit of rod phosphodiesterase (PDE6) and is essential for its proper assembly." *J Biol Chem* **16**: 16.
- Komaromy, A. M., J. J. Alexander, A. E. Cooper, V. A. Chiodo, L. G. Glushakova, G. M. Acland, W. W. Hauswirth and G. D. Aguirre (2008). "Targeting gene expression to cones with human cone opsin promoters in recombinant AAV." *Gene Ther* **15**(14): 1073.
- Kotin, R. M., R. M. Linden and K. I. Berns (1992). "Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination." *Embo J* **11**(13): 5071-8.

- Kotin, R. M., J. C. Menninger, D. C. Ward and K. I. Berns (1991). "Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter." *Genomics* **10**(3): 831-4.
- Kotin, R. M., M. Siniscalco, R. J. Samulski, X. D. Zhu, L. Hunter, C. A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi and K. I. Berns (1990). "Site-specific integration by adeno-associated virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2211-5.
- Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer and S. Kirchhoff (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* **276**(23): 20633-40.
- Kuzmanovic, M., V. J. Dudley and V. P. Sarthy (2003). "GFAP promoter drives Muller cell-specific expression in transgenic mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(8): 3606-13.
- Lai, C. M., M. J. Yu, M. Brankov, N. L. Barnett, X. Zhou, T. M. Redmond, K. Narfstrom and P. E. Rakoczy (2004). "Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe65<sup>-/-</sup> knockout mouse eye results in limited rescue." *Genet Vaccines Ther* **2**(1): 3.
- Lai, Y. K., W. Y. Shen, M. Brankov, C. M. Lai, I. J. Constable and P. E. Rakoczy (2002). "Potential long-term inhibition of ocular neovascularisation by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy." *Gene Ther* **9**(12): 804-13.
- Lamartina, S., G. Roscilli, C. D. Rinaudo, E. Sporeno, L. Silvi, W. Hillen, H. Bujard, R. Cortese, G. Ciliberto and C. Toniatti (2002). "Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators." *Hum Gene Ther* **13**(2): 199-210.
- Lamartina, S., L. Silvi, G. Roscilli, D. Casimiro, A. J. Simon, M. E. Davies, J. W. Shiver, C. D. Rinaudo, I. Zampaglione, E. Fattori, S. Colloca, O. Gonzalez Paz, R. Laufer, H. Bujard, R. Cortese, G. Ciliberto and C. Toniatti (2003). "Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates." *Mol Ther* **7**(2): 271-80.
- Latta-Mahieu, M., M. Rolland, C. Caillet, M. Wang, P. Kennel, I. Mahfouz, I. Loquet, J. F. Dedieu, A. Mahfoudi, E. Trannoy and V. Thuillier (2002). "Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression." *Hum Gene Ther* **13**(13): 1611-20.
- Le Meur, G., K. Stieger, A. J. Smith, M. Weber, J. Y. Deschamps, D. Nivard, A. Mendes-Madeira, N. Provost, Y. Pereon, Y. Chereil, R. R. Ali, C. Hamel, P. Moullier and F. Rolling (2007). "Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium." *Gene Ther* **14**: 292-303.

- Le Meur, G., M. Weber, Y. Pereon, A. Mendes-Madeira, D. Nivard, J. Y. Deschamps, P. Moullier and F. Rolling (2005). "Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates." *Arch Ophthalmol* **123**(4): 500-6.
- Leberherz, C., A. Maguire, W. Tang, J. Bennett and J. M. Wilson (2008). "Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer." *J Gene Med* **10**(4): 375-82.
- Lem, J., M. L. Applebury, J. D. Falk, J. G. Flannery and M. I. Simon (1991). "Tissue-specific and developmental regulation of rod opsin chimeric genes in transgenic mice." *Neuron* **6**(2): 201-10.
- Lena, A. M., P. Giannetti, E. Sporeno, G. Ciliberto and R. Savino (2005). "Immune responses against tetracycline-dependent transactivators affect long-term expression of mouse erythropoietin delivered by a helper-dependent adenoviral vector." *J Gene Med* **7**(8): 1086-96.
- Lheriteau, E., L. Libeau, K. Stieger, J. Y. Deschamps, A. Mendes-Madeira, N. Provost, F. Lemoine, C. Mellersh, N. M. Ellinwood, Y. Cherel, P. Moullier and F. Rolling (2009). "The RPGRIP1-deficient dog, a promising canine model for gene therapy." *Mol Vis* **15**: 349-61.
- Li, L. Y., X. Luo and X. Wang (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* **412**(6842): 95-9.
- Liu, X., I. P. Udovichenko, S. D. Brown, K. P. Steel and D. S. Williams (1999). "Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium." *J Neurosci* **19**(15): 6267-74.
- Lu, X. and P. A. Ferreira (2005a). "Identification of novel murine- and human-specific RPGRIP1 splice variants with distinct expression profiles and subcellular localization." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(6): 1882-90.
- Lu, X., M. Guruju, J. Oswald and P. A. Ferreira (2005b). "Limited proteolysis differentially modulates the stability and subcellular localization of domains of RPGRIP1 that are distinctly affected by mutations in Leber's congenital amaurosis." *Hum Mol Genet* **14**(10): 1327-40.
- Lu, Y. (2004). "Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review." *Stem Cells Dev* **13**(1): 133-45.
- Luo, D. G., T. Xue and K. W. Yau (2008). "How vision begins: an odyssey." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 9855-62.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.

- Maguire, A. M., K. A. High, A. Auricchio, J. F. Wright, E. A. Pierce, F. Testa, F. Mingozzi, J. L. Bencicelli, G. S. Ying, S. Rossi, A. Fulton, K. A. Marshall, S. Banfi, D. C. Chung, J. I. Morgan, B. Hauck, O. Zelenaia, X. Zhu, L. Raffini, F. Coppieters, E. De Baere, K. S. Shindler, N. J. Volpe, E. M. Surace, C. Acerra, A. Lyubarsky, T. M. Redmond, E. Stone, J. Sun, J. W. McDonnell, B. P. Leroy, F. Simonelli and J. B. Gauderman (2009). "Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial." *Lancet* (online publication ahead of print).
- Maguire, A. M., F. Simonelli, E. A. Pierce, E. N. Pugh, Jr., F. Mingozzi, J. Bencicelli, S. Banfi, K. A. Marshall, F. Testa, E. M. Surace, S. Rossi, A. Lyubarsky, V. R. Arruda, B. Konkle, E. Stone, J. Sun, J. Jacobs, L. Dell'Osso, R. Hertle, J. X. Ma, T. M. Redmond, X. Zhu, B. Hauck, O. Zelenaia, K. S. Shindler, M. G. Maguire, J. F. Wright, N. J. Volpe, J. W. McDonnell, A. Auricchio, K. A. High and J. Bennett (2008). "Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis." *N Engl J Med* **358**(21): 2240-8.
- Mancuso, K., W. W. Hauswirth, Q. Li, T. B. Connor, J. A. Kuchenbecker, M. C. Mauck, J. Neitz and M. Neitz (2009). "Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates." *Nature* **461**(7265): 784-7.
- Marigo, V. (2007). "Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration." *Cell Cycle* **6**(6): 652-5.
- Martins, L. M. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2: a second mammalian protein with a Reaper-like function." *Cell Death Differ* **9**(7): 699-701.
- Masland, R. H. (2001). "The fundamental plan of the retina." *Nat Neurosci* **4**(9): 877-86.
- Maubaret, C. and C. Hamel (2005). "[Genetics of retinitis pigmentosa: metabolic classification and phenotype/genotype correlations]." *J Fr Ophtalmol* **28**(1): 71-92.
- Mavlyutov, T. A., H. Zhao and P. A. Ferreira (2002). "Species-specific subcellular localization of RPGR and RPGRIP isoforms: implications for the phenotypic variability of congenital retinopathies among species." *Hum Mol Genet* **11**(16): 1899-907.
- McGee Sanftner, L. H., K. G. Rendahl, D. Quiroz, M. Coyne, M. Ladner, W. C. Manning and J. G. Flannery (2001). "Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina." *Mol Ther* **3**(5 Pt 1): 688-96.
- Meindl, A., K. Dry, K. Herrmann, F. Manson, A. Ciccodicola, A. Edgar, M. R. Carvalho, H. Achatz, H. Hellebrand, A. Lennon, C. Migliaccio, K. Porter, E. Zrenner, A. Bird, M. Jay, B. Lorenz, B. Wittwer, M. D'Urso, T. Meitinger and A. Wright (1996). "A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3)." *Nat Genet* **13**(1): 35-42.

- Mellersh, C. S., M. E. Bournsnel, L. Pettitt, E. J. Ryder, N. G. Holmes, D. Grafham, O. P. Forman, J. Sampson, K. C. Barnett, S. Blanton, M. M. Binns and M. Vaudin (2006). "Canine RPGRIP1 mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshunds as a homologue of human Leber congenital amaurosis." *Genomics* **88**(3): 293-301.
- Merten, O. W., C. Geny-Fiamma and A. M. Douar (2005). "Current issues in adeno-associated viral vector production." *Gene Ther* **12 Suppl 1**: S51-61.
- Min, S. H., L. L. Molday, M. W. Seeliger, A. Dinculescu, A. M. Timmers, A. Janssen, F. Tonagel, N. Tanimoto, B. H. Weber, R. S. Molday and W. W. Hauswirth (2005). "Prolonged recovery of retinal structure/function after gene therapy in an Rs1h-deficient mouse model of x-linked juvenile retinoschisis." *Mol Ther* **12**(4): 644-51.
- Mingozzi, F., M. V. Maus, D. J. Hui, D. E. Sabatino, S. L. Murphy, J. E. Rasko, M. V. Ragni, C. S. Manno, J. Sommer, H. Jiang, G. F. Pierce, H. C. Ertl and K. A. High (2007). "CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans." *Nat Med* **13**(4): 419-22.
- Moiseyev, G., Y. Chen, Y. Takahashi, B. X. Wu and J. X. Ma (2005). "RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35): 12413-8.
- Mojumder, D. K. (2008). "Capillary-contacting horizontal cells in the rodent retina." *J Anat Soc India* **57**(1): 34-36.
- Mori, S., L. Wang, T. Takeuchi and T. Kanda (2004). "Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein." *Virology* **330**(2): 375-83.
- Mu, X. and W. H. Klein (2004). "A gene regulatory hierarchy for retinal ganglion cell specification and differentiation." *Semin Cell Dev Biol* **15**(1): 115-23.
- Nagase, T., K. Ishikawa, M. Suyama, R. Kikuno, M. Hirose, N. Miyajima, A. Tanaka, H. Kotani, N. Nomura and O. Ohara (1999). "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro." *DNA Res* **6**(1): 63-70.
- Nakai, H., E. Montini, S. Fuess, T. A. Storm, L. Meuse, M. Finegold, M. Grompe and M. A. Kay (2003). "Helper-independent and AAV-ITR-independent chromosomal integration of double-stranded linear DNA vectors in mice." *Mol Ther* **7**(1): 101-11.
- Nakai, H., S. R. Yant, T. A. Storm, S. Fuess, L. Meuse and M. A. Kay (2001). "Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo." *J Virol* **75**(15): 6969-76.
- Narfstrom, K. (1999). "Retinal dystrophy or 'congenital stationary night blindness' in the Briard dog." *Vet Ophthalmol* **2**(1): 75-76.



- Narfstrom, K., M. L. Katz, R. Bragadottir, M. Seeliger, A. Boulanger, T. M. Redmond, L. Caro, C. M. Lai and P. E. Rakoczy (2003). "Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(4): 1663-72.
- Narfstrom, K., Vaegan, M. Katz, R. Bragadottir, E. P. Rakoczy and M. Seeliger (2005). "Assessment of Structure and Function Over a 3-year Period after Gene Transfer in RPE65-/- dogs." *Doc Ophthalmol* **111**(1): 39-48.
- Nathans, J. (1994). "In the eye of the beholder: visual pigments and inherited variation in human vision." *Cell* **78**(3): 357-60.
- Nelson, R. and H. Kolb (1984). "Amacrine cells in scotopic vision." *Ophthalmic Res* **16**(1-2): 21-6.
- Newman, E. A. (2004). "Glial modulation of synaptic transmission in the retina." *Glia* **47**(3): 268-74.
- Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." *Cell Death Differ* **6**(11): 1028-42.
- Nicoletti, A., K. Kawase and D. A. Thompson (1998). "Promoter analysis of RPE65, the gene encoding a 61-kDa retinal pigment epithelium-specific protein." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(3): 637-44.
- Oetting, W. S., J. P. Fryer, S. Shriram and R. A. King (2003). "Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years." *Pigment Cell Res* **16**(3): 307-11.
- Orth, P., F. Cordes, D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger and W. Hinrichs (1998). "Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping." *J Mol Biol* **279**(2): 439-47.
- Osborne, N. N. and J. P. Wood (2004). "Metipranolol blunts nitric oxide-induced lipid peroxidation and death of retinal photoreceptors: a comparison with other anti-glaucoma drugs." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(10): 3787-95.
- Pang, J. J., S. L. Boye, A. Kumar, A. Dinculescu, W. Deng, J. Li, Q. Li, A. Rani, T. C. Foster, B. Chang, N. L. Hawes, J. H. Boatright and W. W. Hauswirth (2008). "AAV-mediated gene therapy for retinal degeneration in the rd10 mouse containing a recessive PDEbeta mutation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(10): 4278-83.
- Pang, J. J., B. Chang, A. Kumar, S. Nusinowitz, S. M. Noorwez, J. Li, A. Rani, T. C. Foster, V. A. Chiodo, T. Doyle, H. Li, R. Malhotra, J. T. Teusner, J. H. McDowell, S. H. Min, Q. Li, S. Kaushal and W. W. Hauswirth (2006). "Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis." *Mol Ther* **13**(3): 565-72.
- Pang, J. J., B. Chang, A. Kumar, S. Nusinowitz, S. M. Noorwez, J. Li, A. Rani, T. C. Foster, V. A. Chiodo, T. Doyle, H. Li, R. Malhotra, J. Tusner, J. H. McDowell, S. H. Min, Q. Li,

- S. Kaushal and W. W. Hauswirth (2005). "Gene Therapy Restores Vision-Dependent Behavior as Well as Retinal Structure and Function in a Mouse Model of RPE65 Leber Congenital Amaurosis." *Mol Ther* **10**: 10.
- Papermaster, D. S. (2002). "The birth and death of photoreceptors: the Friedenwald Lecture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(5): 1300-9.
- Paquet-Durand, F., S. Azadi, S. M. Hauck, M. Ueffing, T. van Veen and P. Ekstrom (2006). "Calpain is activated in degenerating photoreceptors in the rd1 mouse." *J Neurochem* **96**(3): 802-14.
- Paquet-Durand, F., L. Johnson and P. Ekstrom (2007). "Calpain activity in retinal degeneration." *J Neurosci Res* **85**(4): 693-702.
- Park, T. K., Z. Wu, S. Kjellstrom, Y. Zeng, R. A. Bush, P. A. Sieving and P. Colosi (2009). "Intravitreal delivery of AAV8 retinoschisin results in cell type-specific gene expression and retinal rescue in the Rs1-KO mouse." *Gene Ther* **21**: 21.
- Parks, W. P., D. W. Boucher, J. L. Melnick, L. H. Taber and M. D. Yow (1970). "Seroepidemiological and Ecological Studies of the Adenovirus-Associated Satellite Viruses." *Infect Immun* **2**(6): 716-722.
- Parks, W. P., M. Green, M. Pina and J. L. Melnick (1967). "Physicochemical characterization of adeno-associated satellite virus type 4 and its nucleic acid." *J Virol* **1**(5): 980-7.
- Pawlyk, B. S., A. J. Smith, P. K. Buch, M. Adamian, D. H. Hong, M. A. Sandberg, R. R. Ali and T. Li (2005). "Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(9): 3039-45.
- Pazour, G. J., S. A. Baker, J. A. Deane, D. G. Cole, B. L. Dickert, J. L. Rosenbaum, G. B. Witman and J. C. Besharse (2002). "The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance." *J Cell Biol* **157**(1): 103-13.
- Peichl, L. and J. Gonzalez-Soriano (1994). "Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig." *Vis Neurosci* **11**(3): 501-17.
- Penaud-Budloo, M., C. Le Guiner, A. Nowrouzi, A. Toromanoff, Y. Cherel, P. Chenuaud, M. Schmidt, C. von Kalle, F. Rolling, P. Moullier and R. O. Snyder (2008). "Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle." *J Virol* **82**(16): 7875-85.
- Pereira, D. J. and N. Muzyczka (1997). "The cellular transcription factor SP1 and an unknown cellular protein are required to mediate Rep protein activation of the adeno-associated virus p19 promoter." *J Virol* **71**(3): 1747-56.

- Provost, N., G. Le Meur, M. Weber, A. Mendes-Madeira, G. Podevin, Y. Cherel, M. A. Colle, J. Y. Deschamps, P. Moullier and F. Rolling (2005). "Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain." *Mol Ther* **11**(2): 275-83.
- Qiao, C., J. Li, A. Skold, X. Zhang and X. Xiao (2002). "Feasibility of generating adeno-associated virus packaging cell lines containing inducible adenovirus helper genes." *J Virol* **76**(4): 1904-13.
- Qing, K., C. Mah, J. Hansen, S. Zhou, V. Dwarki and A. Srivastava (1999). "Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2." *Nat Med* **5**(1): 71-7.
- Rabinowitz, J. E., F. Rolling, C. Li, H. Conrath, W. Xiao, X. Xiao and R. J. Samulski (2002). "Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity." *J Virol* **76**(2): 791-801.
- Rakic, P. (1981). "Development of visual centers in the primate brain depends on binocular competition before birth." *Science* **214**(4523): 928-31.
- Ravagnan, L., T. Roumier and G. Kroemer (2002). "Mitochondria, the killer organelles and their weapons." *J Cell Physiol* **192**(2): 131-7.
- Redmond, T. M., S. Yu, E. Lee, D. Bok, D. Hamasaki, N. Chen, P. Goletz, J. X. Ma, R. K. Crouch and K. Pfeifer (1998). "Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle." *Nat Genet* **20**(4): 344-51.
- Reed, J. C. and G. Kroemer (2000). "Mechanisms of mitochondrial membrane permeabilization." *Cell Death Differ* **7**(12): 1145.
- Rendahl, K. G., S. E. Leff, G. R. Otten, S. K. Spratt, D. Bohl, M. Van Roey, B. A. Donahue, L. K. Cohen, R. J. Mandel, O. Danos and R. O. Snyder (1998). "Regulation of gene expression in vivo following transduction by two separate rAAV vectors." *Nat Biotechnol* **16**(8): 757-61.
- Rendahl, K. G., D. Quiroz, M. Ladner, M. Coyne, J. Seltzer, W. C. Manning and J. A. Escobedo (2002). "Tightly regulated long-term erythropoietin expression in vivo using tet-inducible recombinant adeno-associated viral vectors." *Hum Gene Ther* **13**(2): 335-42.
- Roepman, R., N. Bernoud-Hubac, D. E. Schick, A. Maugeri, W. Berger, H. H. Ropers, F. P. Cremers and P. A. Ferreira (2000). "The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors." *Hum Mol Genet* **9**(14): 2095-105.
- Roepman, R., S. J. Letteboer, H. H. Arts, S. E. van Beersum, X. Lu, E. Krieger, P. A. Ferreira and F. P. Cremers (2005). "Interaction of nephrocystin-4 and RPGRIP1 is disrupted

- by nephronophthisis or Leber congenital amaurosis-associated mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18520-5.
- Ron, D. and J. F. Habener (1992). "CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription." *Genes Dev* **6**(3): 439-53.
- Rosenbaum, J. L. and G. B. Witman (2002). "Intraflagellar transport." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(11): 813-25.
- Rutledge, E. A., C. L. Halbert and D. W. Russell (1998). "Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2." *J Virol* **72**(1): 309-19.
- Salveti, A., S. Oreve, G. Chadeuf, D. Favre, Y. Cherel, P. Champion-Arnaud, J. David-Ameline and P. Moullier (1998). "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production." *Hum Gene Ther* **9**(5): 695-706.
- Samulski, R. J., L. S. Chang and T. Shenk (1989). "Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression." *J Virol* **63**(9): 3822-8.
- Samulski, R. J., X. Zhu, X. Xiao, J. D. Brook, D. E. Housman, N. Epstein and L. A. Hunter (1991). "Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19." *Embo J* **10**(12): 3941-50.
- Sancho-Pelluz, J., B. Arango-Gonzalez, S. Kustermann, F. J. Romero, T. van Veen, E. Zrenner, P. Ekstrom and F. Paquet-Durand (2008). "Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration." *Mol Neurobiol* **38**(3): 253-69.
- Sander, A., A. Guth, H. R. Brenner and V. Witzemann (2000). "Gene transfer into individual muscle fibers and conditional gene expression in living animals." *Cell Tissue Res* **301**(3): 397-403.
- Sanges, D., A. Comitato, R. Tammaro and V. Marigo (2006). "Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(46): 17366-71.
- Sanvicens, N. and T. G. Cotter (2006). "Ceramide is the key mediator of oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells." *J Neurochem* **98**(5): 1432-44.
- Sanvicens, N., V. Gomez-Vicente, I. Masip, A. Messeguer and T. G. Cotter (2004). "Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6." *J Biol Chem* **279**(38): 39268-78.
- Sarra, G. M., C. Stephens, M. de Alwis, J. W. Bainbridge, A. J. Smith, A. J. Thrasher and R. R. Ali (2001). "Gene replacement therapy in the retinal degeneration slow (rds)

- mouse: the effect on retinal degeneration following partial transduction of the retina." *Hum Mol Genet* **10**(21): 2353-61.
- Saudan, P., J. Vlach and P. Beard (2000). "Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb." *Embo J* **19**(16): 4351-61.
- Schlichtenbrede, F. C., L. da Cruz, C. Stephens, A. J. Smith, A. Georgiadis, A. J. Thrasher, J. W. Bainbridge, M. W. Seeliger and R. R. Ali (2003a). "Long-term evaluation of retinal function in Prph2Rd2/Rd2 mice following AAV-mediated gene replacement therapy." *J Gene Med* **5**(9): 757-64.
- Schlichtenbrede, F. C., A. MacNeil, J. W. Bainbridge, M. Tschernutter, A. J. Thrasher, A. J. Smith and R. R. Ali (2003b). "Intraocular gene delivery of ciliary neurotrophic factor results in significant loss of retinal function in normal mice and in the Prph2Rd2/Rd2 model of retinal degeneration." *Gene Ther* **10**(6): 523-7.
- Schlichtenbrede, F. C., A. J. Smith, J. W. Bainbridge, A. J. Thrasher, T. E. Salt and R. R. Ali (2004). "Improvement of neuronal visual responses in the superior colliculus in Prph2(Rd2/Rd2) mice following gene therapy." *Mol Cell Neurosci* **25**(1): 103-10.
- Schmidt, M., S. Afione and R. M. Kotin (2000). "Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53." *J Virol* **74**(20): 9441-50.
- Schmidt, M., E. Grot, P. Cervenka, S. Wainer, C. Buck and J. A. Chiorini (2006). "Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks." *J Virol* **80**(10): 5082-5.
- Schnepf, B. C., K. R. Clark, D. L. Klemanski, C. A. Pacak and P. R. Johnson (2003). "Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle." *J Virol* **77**(6): 3495-504.
- Shu, X., A. M. Fry, B. Tulloch, F. D. Manson, J. W. Crabb, H. Khanna, A. J. Faragher, A. Lennon, S. He, P. Trojan, A. Giessl, U. Wolfrum, R. Vervoort, A. Swaroop and A. F. Wright (2005). "RPGR ORF15 isoform co-localizes with RPGRIP1 at centrioles and basal bodies and interacts with nucleophosmin." *Hum Mol Genet* **14**(9): 1183-97.
- Sloboda, R. D. and J. L. Rosenbaum (2007). "Making sense of cilia and flagella." *J Cell Biol* **179**(4): 575-82.
- Smith, A. J., J. W. Bainbridge and R. R. Ali (2009). "Prospects for retinal gene replacement therapy." *Trends Genet* **25**(4): 156-65.
- Smith, A. J., F. C. Schlichtenbrede, M. Tschernutter, J. W. Bainbridge, A. J. Thrasher and R. R. Ali (2003). "AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa." *Mol Ther* **8**(2): 188-95.

- Snyder, R. O. (1999). "Adeno-associated virus-mediated gene delivery." *J Gene Med* **1**(3): 166-75.
- Snyder, R. O. and T. R. Flotte (2002). "Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors." *Curr Opin Biotechnol* **13**(5): 418-23.
- Snyder, R. O., D. S. Im, T. Ni, X. Xiao, R. J. Samulski and N. Muzyczka (1993). "Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral Rep protein." *J Virol* **67**(10): 6096-104.
- Snyder, R. O., C. H. Miao, G. A. Patijn, S. K. Spratt, O. Danos, D. Nagy, A. M. Gown, B. Winther, L. Meuse, L. K. Cohen, A. R. Thompson and M. A. Kay (1997). "Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors." *Nat Genet* **16**(3): 270-6.
- Sokolov, M., A. L. Lyubarsky, K. J. Strissel, A. B. Savchenko, V. I. Govardovskii, E. N. Pugh, Jr. and V. Y. Arshavsky (2002). "Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation." *Neuron* **34**(1): 95-106.
- Sollerbrant, K., J. Elmen, C. Wahlestedt, J. Acker, H. Leblois-Prehaud, M. Latta-Mahieu, P. Yeh and M. Perricaudet (2001). "A novel method using baculovirus-mediated gene transfer for production of recombinant adeno-associated virus vectors." *J Gen Virol* **82**(Pt 9): 2051-60.
- Sommer, B., C. Rinsch, E. Payen, B. Dalle, B. Schneider, N. Deglon, A. Henri, Y. Beuzard and P. Aebischer (2002). "Long-term doxycycline-regulated secretion of erythropoietin by encapsulated myoblasts." *Mol Ther* **6**(2): 155-61.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi and E. S. Alnemri (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." *Nature* **410**(6824): 112-6.
- Stieger, K., B. Belbellaa, C. Le Guiner, P. Moullier and F. Rolling (2009a). "In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(7-8): 527-41.
- Stieger, K., M. A. Colle, L. Dubreil, A. Mendes-Madeira, M. Weber, G. Le Meur, J. Y. Deschamps, N. Provost, D. Nivard, Y. Cherel, P. Moullier and F. Rolling (2008). "Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain." *Mol Ther* **16**(5): 916-23.
- Stieger, K., G. Le Meur, F. Lasne, M. Weber, J. Y. Deschamps, D. Nivard, A. Mendes-Madeira, N. Provost, L. Martin, P. Moullier and F. Rolling (2006). "Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors." *Mol Ther* **13**(5): 967-75.

- Stieger, K., E. Lheriteau, P. Moullier and F. Rolling (2009b). "AAV-mediated gene therapy for retinal disorders in large animal models." *Hum J* **50**(2): 206-24.
- Stieger, K., A. Mendes-Madeira, G. L. Meur, M. Weber, J. Y. Deschamps, D. Nivard, N. Provost, P. Moullier and F. Rolling (2007). "Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases." *Gene Ther* **14**(23): 1668-73.
- Stieger, K., J. Schroeder, N. Provost, A. Mendes-Madeira, B. Belbellaa, G. Le Meur, M. Weber, J. Y. Deschamps, B. Lorenz, P. Moullier and F. Rolling (2009c). "Detection of intact rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates." *Mol Ther* **17**(3): 516-23.
- Strasser, A., L. O'Connor and V. M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." *Annu Rev Biochem* **69**: 217-45.
- Summerford, C., J. S. Bartlett and R. J. Samulski (1999). "AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection." *Nat Med* **5**(1): 78-82.
- Summerford, C. and R. J. Samulski (1998). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions." *J Virol* **72**(2): 1438-45.
- Sun, X., B. Pawlyk, X. Xu, X. Liu, O. V. Bulgakov, M. Adamian, M. A. Sandberg, S. C. Khani, M. H. Tan, A. J. Smith, R. R. Ali and T. Li (2009). "Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations." *Gene Ther* **27**: 27.
- Surace, E. M., L. Domenici, K. Cortese, G. Cotugno, U. Di Vicino, C. Venturi, A. Cellerino, V. Marigo, C. Tacchetti, A. Ballabio and A. Auricchio (2005). "Amelioration of both functional and morphological abnormalities in the retina of a mouse model of ocular albinism following AAV-mediated gene transfer." *Mol Ther* **12**(4): 652-8.
- Tafuro, S., E. Ayuso, S. Zacchigna, L. Zentilin, S. Moimas, F. Dore and M. Giacca (2009). "Inducible adeno-associated virus vectors promote functional angiogenesis in adult organisms via regulated vascular endothelial growth factor expression." *Cardiovasc Res* **8**: 8.
- Tamayose, K., Y. Hirai and T. Shimada (1996). "A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography." *Hum Gene Ther* **7**(4): 507-13.
- Tan, M. H., A. J. Smith, B. Pawlyk, X. Xu, X. Liu, J. B. Bainbridge, M. Basche, J. McIntosh, H. V. Tran, A. Nathwani, T. Li and R. R. Ali (2009). "Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors." *Hum Mol Genet* **19**: 19.

- Tanito, M., H. Masutani, H. Nakamura, S. Oka, A. Ohira and J. Yodoi (2002). "Attenuation of retinal photooxidative damage in thioredoxin transgenic mice." *Neurosci Lett* **326**(2): 142-6.
- Thompson, D. A., Y. Li, C. L. McHenry, T. J. Carlson, X. Ding, P. A. Sieving, E. Apfelstedt-Sylla and A. Gal (2001). "Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy." *Nat Genet* **28**(2): 123-4.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* **281**(5381): 1312-6.
- Turney, C., N. H. Chong, R. A. Alexander, C. R. Hogg, L. Fleming, D. Flack, K. C. Barnett, A. C. Bird, G. E. Holder and P. J. Luthert (2007). "Pathological and electrophysiological features of a canine cone-rod dystrophy in the miniature longhaired dachshund." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(9): 4240-9.
- Tuson, M., G. Marfany and R. Gonzalez-Duarte (2004). "Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26)." *Am J Hum Genet* **74**(1): 128-38.
- Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding and D. Ron (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." *Science* **287**(5453): 664-6.
- Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard and W. Hillen (2000). "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7963-8.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* **102**(1): 43-53.
- Vervoort, R., A. Lennon, A. C. Bird, B. Tulloch, R. Axton, M. G. Miano, A. Meindl, T. Meitinger, A. Ciccodicola and A. F. Wright (2000). "Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa." *Nat Genet* **25**(4): 462-6.
- Veske, A., S. E. Nilsson, K. Narfstrom and A. Gal (1999). "Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65." *Genomics* **57**(1): 57-61.
- Walters, R. W., S. M. Yi, S. Keshavjee, K. E. Brown, M. J. Welsh, J. A. Chiorini and J. Zabner (2001). "Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer." *J Biol Chem* **276**(23): 20610-6.



- Wassle, H., M. Yamashita, U. Greferath, U. Grunert and F. Muller (1991). "The rod bipolar cell of the mammalian retina." *Vis Neurosci* **7**(1-2): 99-112.
- Weber, M., J. Rabinowitz, N. Provost, H. Conrath, S. Folliot, D. Briot, Y. Cherel, P. Chenuaud, J. Samulski, P. Moullier and F. Rolling (2003). "Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery." *Mol Ther* **7**(6): 774-81.
- Weitzman, M. D., S. R. Kyostio, R. M. Kotin and R. A. Owens (1994). "Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13): 5808-12.
- Wen, R., Y. Song, S. Kjellstrom, A. Tanikawa, Y. Liu, Y. Li, L. Zhao, R. A. Bush, A. M. Laties and P. A. Sieving (2006). "Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor." *J Neurosci* **26**(52): 13523-30.
- Wenzel, A., C. Grimm, M. Samardzija and C. E. Reme (2005). "Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration." *Prog Retin Eye Res* **24**(2): 275-306.
- Williams, D. S. (2002). "Transport to the photoreceptor outer segment by myosin VIIa and kinesin II." *Vision Res* **42**(4): 455-62.
- Wissmann, A., I. Meier, L. V. Wray, Jr., M. Geissendorfer and W. Hillen (1986). "Tn10 tet operator mutations affecting Tet repressor recognition." *Nucleic Acids Res* **14**(10): 4253-66.
- Wolf, G. (2004). "The visual cycle of the cone photoreceptors of the retina." *Nutr Rev* **62**(7 Pt 1): 283-6.
- Wolfrum, U. and J. L. Salisbury (1998). "Expression of centrin isoforms in the mammalian retina." *Exp Cell Res* **242**(1): 10-7.
- Wolfrum, U. and A. Schmitt (2000). "Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells." *Cell Motil Cytoskeleton* **46**(2): 95-107.
- Won, J., E. Gifford, R. S. Smith, H. Yi, P. A. Ferreira, T. Li, J. K. Naggert and P. M. Nishina (2009). "RPGRIP1 is essential for normal rod photoreceptor outer segment elaboration and morphogenesis." *Hum Mol Genet* **13**: 13.
- Wright, A. F. and X. Shu (2007). "Focus on Molecules: RPGR." *Exp Eye Res* **85**(1): 1-2.
- Wu, Z., E. Miller, M. Agbandje-McKenna and R. J. Samulski (2006). "Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6." *J Virol* **80**(18): 9093-103.
- Xiao, W., N. Chirmule, S. C. Berta, B. McCullough, G. Gao and J. M. Wilson (1999). "Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1." *J Virol* **73**(5): 3994-4003.

- Xiao, X., J. Li and R. J. Samulski (1998). "Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus." *J Virol* **72**(3): 2224-32.
- Yang, G. S., M. Schmidt, Z. Yan, J. D. Lindbloom, T. C. Harding, B. A. Donahue, J. F. Engelhardt, R. Kotin and B. L. Davidson (2002). "Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size." *J Virol* **76**(15): 7651-60.
- Ye, H., C. Cande, N. C. Stephanou, S. Jiang, S. Gurbuxani, N. Larochette, E. Daugas, C. Garrido, G. Kroemer and H. Wu (2002). "DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor." *Nat Struct Biol* **9**(9): 680-4.
- Young, J. E., T. Vogt, K. W. Gross and S. C. Khani (2003). "A short, highly active photoreceptor-specific enhancer/promoter region upstream of the human rhodopsin kinase gene." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(9): 4076-85.
- Young, R. W. (1976). "Visual cells and the concept of renewal." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **15**(9): 700-25.
- Zack, D. J., J. Bennett, Y. Wang, C. Davenport, B. Klaunberg, J. Gearhart and J. Nathans (1991). "Unusual topography of bovine rhodopsin promoter-lacZ fusion gene expression in transgenic mouse retinas." *Neuron* **6**(2): 187-99.
- Zeng, Y., Y. Takada, S. Kjellstrom, K. Hiriyanna, A. Tanikawa, E. Wawrousek, N. Smaoui, R. Caruso, R. A. Bush and P. A. Sieving (2004). "RS-1 Gene Delivery to an Adult Rs1h Knockout Mouse Model Restores ERG b-Wave with Reversal of the Electronegative Waveform of X-Linked Retinoschisis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(9): 3279-85.
- Zhao, Y., D. H. Hong, B. Pawlyk, G. Yue, M. Adamian, M. Grynberg, A. Godzik and T. Li (2003). "The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3965-70.
- Zolotukhin, S. (2005). "Production of recombinant adeno-associated virus vectors." *Hum Gene Ther* **16**(5): 551-7.

## **Évaluation de vecteurs associés à l'adénovirus recombinant pour le traitement par thérapie génique de modèles canins de l'amaurose congénitale de Leber : le teckel RPGRIP1 déficient et le briard RPE65 déficient.**

### **Résumé :**

L'amaurose congénitale de Leber est une dystrophie rétinienne héréditaire responsable de cécité congénitale. Le teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup> et le briard RPE65<sup>-/-</sup> sont deux modèles canins de cette pathologie.

Chez le teckel RPGRIP1<sup>-/-</sup>, nous avons tout d'abord caractérisé la pathologie puis nous avons mis au point un vecteur ciblant spécifiquement les photorécepteurs. L'efficacité de ce vecteur portant le gène RPGRIP1 humain ou canin a alors été évalué.

La thérapie génique d'addition médiée par les AAV a déjà démontré son efficacité chez le briard RPE65<sup>-/-</sup>. Dans le but de réguler l'expression du transgène dans le temps, nous avons développé et évalué l'efficacité de vecteurs portant le gène RPE65 humain sous le contrôle de promoteurs régulables à la tétracycline.

### **Mots-clés :**

Amaurose congénitale de Leber, RPGRIP1, RPE65, modèles canins, thérapie génique, AAV, système régulable à la tétracycline.

## **Evaluation of rAAV vectors for gene replacement therapy in new canine model of Leber congenital amaurosis : the RPGRIP1 deficient dachshund dog and the RPE65 deficient briard dog.**

### **Abstract :**

Leber congenital amaurosis is an hereditary retinal dystrophy responsible for congenital blindness. The Dachshund dog RPGRIP1<sup>-/-</sup> and the Briard dog RPE65<sup>-/-</sup> are two canine models of this pathology.

We have characterized the pathology in the dachshund dog RPGRIP1<sup>-/-</sup>. Then, we have developed a photoreceptor-specific AAV vector and we have evaluated the efficiency of this vector carrying either the human RPGRIP1 gene, or the canine RPGRIP1 gene.

Replacement gene therapy with AAV vectors has already showed its efficacy in the Briard dog RPE65<sup>-/-</sup>. We have investigated the ability of the tetracycline-regulatable system to regulate retinal function in RPE65<sup>-/-</sup> Briard dogs.

### **Key words:**

Leber congenital amaurosis, RPE65, RPGRIP1, canine models, gene therapy, AAV, Tetracycline regulatable system.

MOUGENOT-LHERITEAU Elsa  
Unité INSERM UMR 649  
IRT1, Université de Nantes  
8, quai Moncoussu  
44007 Nantes Cedex 1