



**HAL**  
open science

# Les vecteurs adéno-associés pour le transfert de gène dans les maladies métaboliques : exemple de la glycogénose de type III

Louisa Jauze

## ► To cite this version:

Louisa Jauze. Les vecteurs adéno-associés pour le transfert de gène dans les maladies métaboliques : exemple de la glycogénose de type III. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02338674

**HAL Id: dumas-02338674**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02338674v1>**

Submitted on 30 Oct 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

Année 2019

Thèse n°91

THESE POUR L'OBTENTION DU  
**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

Par **Louisa JAUZE**

Née le 22/07/1993 à Compiègne

Le 30 septembre 2019

**LES VECTEURS ADENO-ASSOCIES POUR LE TRANSFERT DE  
GENE DANS LES MALADIES METABOLIQUES : EXEMPLE DE LA  
GLYCOGENOSE DE TYPE III**

Sous la direction du Pr Nicolas SEVENET

Membres du jury :

Pr Nicolas SEVENET, Président

Dr Pauline GAINARD, Examineur

Dr Eric PASMANT, Examineur

Dr Fabienne TATOUT-RAJAS, Examineur

Dr Giuseppe RONZITTI, Examineur



**LES VECTEURS ADENO-ASSOCIES POUR LE TRANSFERT DE  
GENE DANS LES MALADIES METABOLIQUES : EXEMPLE DE LA  
GLYCOGENOSE DE TYPE III**

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Sevenet, mon directeur de thèse, pour avoir accepté de diriger cette thèse, et pour m'avoir guidée à travers son écriture.

Je remercie également, les Dr Gaignard, Pasmant, Tatout-Rajas, et Ronzitti d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement Fabienne et Giuseppe pour leurs conseils, leur disponibilité, et surtout leur patience !

Un grand merci à mes deux laboratoires de recherche, IMF et l'U1213, notamment à Patrice pour ses conseils, son soutien, sa disponibilité permanente ; Pauline pour sa gentillesse et son humour ; Fanny pour ses conseils, son aide, sa disponibilité, les trajets en RER, les apéros ; Jérémy pour les débats sur les transferts liquides et les cinétiques d'activité ; Justine pour avoir supporté mon humour ; Isabella pour sa bonne humeur et sa persévérance ; Pierre-Romain pour le café inter-spatial et sa gentillesse ; Laure, Judith, et Alexane pour leur aide, leur disponibilité, et les glaces lyonnaises ; Vincent pour son aide précieuse et indispensable. Merci à Bérangère, Tiziana, Christian, Séverine, Novella pour les discussions et les rigolades.

Merci à ma famille, à ma mère Corine, soutien inconditionnel et permanent, toujours présente et disponible, bien que critique ! Merci à mes sœurs, Anne-Lyse et Lucie, pour me donner confiance en moi, et me soutenir dans mes projets bien que vous n'y compreniez pas grand-chose ! Merci à grand-mère Claudine, pour ses petits plats, sa façon de voir le monde et de le relativiser à chaque instant. Je remercie également Guillaume, pour sa présence et sa soutien. Un immense merci à Sybille qui, bien qu'elle n'en soit pas consciente, nous émerveille et nous enthousiasme en permanence.

Un grand merci à mes amis, tout particulièrement Joanna et Camille, qui me soutiennent, me divertissent, et sont présents en chaque occasion.

Enfin, merci à Enzo. Merci à toi qui est toujours là, toujours présent, à me soutenir, à m'aider, à me conseiller, à me pousser à aller au bout de tout ce que j'entreprends, à tout faire pour que je réussisse, à me rendre heureuse. Sans toi ce travail n'aurait jamais abouti. Merci.

# Table des matières

Remerciements .....	4
Abréviations .....	7
Liste des figures et des tables .....	8
I. INTRODUCTION .....	9
A. La thérapie génique <i>in vivo</i> .....	9
1) Définition, principes, composantes.....	9
2) L'AAV : un vecteur de choix pour la thérapie génique <i>in vivo</i> .....	9
3) Les contraintes actuelles de la thérapie génique par AAV .....	11
B. Le foie, un organe essentiel et une cible de thérapie génique .....	16
1) Architecture et organisation tissulaire hépatique.....	16
2) Atteinte de l'architecture du foie : la fibrogenèse hépatique.....	18
3) Intérêts du foie en tant que cible de thérapie génique par AAV .....	19
II. MATERIELS ET METHODES .....	21
A. Clonages .....	21
B. Production d'AAV .....	21
C. Expériences <i>in vivo</i> .....	21
1) Test du wire hang .....	22
2) Mesure de la glycémie.....	22
D. Analyse des tissus.....	22
1) Broyage et obtention de lysats de tissus.....	22
2) Quantification de la concentration en protéines .....	22
3) Analyse par Western Blot.....	23
4) Quantification du glycogène .....	23
5) Evaluation de l'expression de hFIX.....	23
6) Quantification du nombre de copies de vecteur .....	23

7) Quantification des ARNm .....	23
E. Calculs statistiques .....	24
III. UTILISATION D'UN MODELE PATHOLOGIQUE POUR METTRE EN EVIDENCE LES LIMITES DE LA THERAPIE GENIQUE DU FOIE ET LES ETUDIER : LA GLYCOGENOSE DE TYPE III.....	25
A. La glycogénose de type III .....	25
B. Stratégies de transfert de gène par AAV pour le traitement de la GSDIII.....	27
1) Les défis de la thérapie génique pour GSDIII .....	27
4) Stratégies pour surmonter la limite d'encapsidation de l'AAV .....	29
5) Corriger le phénotype hépatique .....	34
IV. CONCLUSION, DISCUSSION .....	38
V. BIBLIOGRAPHIE.....	41

## Abréviations

<b>AAP</b>	Assembly-activating protein, protéine activatrice de l'assemblage
<b>AAV</b>	Adeno-associated virus, virus adéno-associé
<b>ACTA2</b>	Smooth muscle $\alpha$ actin, actine $\alpha$ des muscles lisses
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AGL</b>	Amylo- $\alpha$ 1,6-glucosidase, 4- $\alpha$ -glucanotransférase
<b>AHC</b>	Adénome hépatocellulaire
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARNt</b>	Acide ribonucléique de transfert
<b>ApoE</b>	Apolipoprotéine E
<b>BCA</b>	Bicinchoninic acid assay, test de l'acide bicinchoninique
<b>CHC</b>	Carcinome hépatocellulaire
<b>CSH</b>	Cellules stellaires hépatiques
<b>CMV</b>	Cytomégalovirus
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor, récepteur du facteur de croissance épidermique
<b>EMA</b>	European medicine agency, agence européenne du médicament
<b>FDA</b>	Food and drug administration, agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
<b>FGFR1</b>	Fibroblast growth factor receptor 1, récepteur du facteur de croissance du fibroblaste 1
<b>GYS2</b>	Isoforme 2 de la glycogène synthase
<b>hAAT</b>	Human $\alpha$ -1-antitrypsin, $\alpha$ -1-antitrypsine humaine
<b>HBB2</b>	Human hemoglobin subunit $\beta$ -2, sous-unité $\beta$ -2 de l'hémoglobine humaine
<b>HEK 293</b>	Human embryonic kidney 293 cells, cellules embryonnaires humaines de rein 293
<b>hFIX</b>	Human factor IX, facteur de coagulation IX humain
<b>HGFR</b>	Hepatocyte growth factor receptor, récepteur du facteur de croissance hépatocytaire
<b>HSPG</b>	heparan sulfateproteoglycan, héparane sulfate
<b>ITR</b>	Inverted terminal repeats, séquences terminales inversées
<b>GDE</b>	Glycogen debranching enzyme, enzyme débranchante du glycogène
<b>GSD</b>	Glycogen storage disease, glycogénose
<b>LamR</b>	Laminin receptor, récepteur de la laminine
<b>LiMP</b>	Liver muscle promoter, promoteur foie et muscles
<b>MMP-1</b>	Métalloprotéase matricielle 1
<b>MMP-2</b>	Métalloprotéase matricielle 2
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin, cible de la rapamycine chez les mammifères
<b>NAb</b>	Neutralizing antibodies, anticorps neutralisants
<b>PAI1</b>	Plasminogen activator inhibitor type 1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1
<b>PDGFR</b>	Platelet-derived growth factor receptor, récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
<b>rAAV</b>	Recombinant adeno-associated virus, virus adéno-associé recombinant
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SV40</b>	Simian virus 40, virus simien 40
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$ , facteur de croissance transformant $\beta$
<b>TLR</b>	Toll-like receptor, récepteurs Toll-like
<b>vg</b>	Vector genome, génome vectoriel
<b>VGCN</b>	Vector genome copy number, nombre de copies du génome vectoriel

## Liste des figures et des tables

### Figures

Figure 1: carte schématique du génome de l'AAV2 .....	10
Figure 2: cycle de vie de l'AAV.....	10
Figure 3: réponses immunitaires à l'AAV .....	13
Figure 4: stratégies mettant en jeu deux vecteurs AAV pour surmonter la limite d'encapsidation de l'AAV .....	15
Figure 5: anatomie du foie .....	16
Figure 6: lobule hépatique .....	17
Figure 7: parenchyme hépatique et organisation au niveau sinusoidal .....	17
Figure 8: parenchyme hépatique et organisation au niveau sinusoidal lors de la fibrose hépatique ..	18
Figure 9: molécule de glycogène et ses liaisons intra-moléculaires .....	25
Figure 10: exemples de mutations pathogéniques recensées dans la séquence du gène AGL.....	26
Figure 11: dégradation cytosolique du glycogène .....	27
Figure 12: optimisation de la taille de la cassette d'expression de GDE.....	28
Figure 13: évolution de la pathologie hépatique dans GSDIII .....	28
Figure 14: Approche deux vecteurs dans GSDIII .....	30
Figure 15: le vecteur AAV9-CMV-GDE overlapping permet une amélioration du phénotype musculaire .....	32
Figure 16: le vecteur AAV8-hAAT-GDE overlapping corrige partiellement le phénotype métabolique	33
Figure 17: le vecteur AAV9-LiMP-GDEov permet une correction du phénotype musculaire .....	34
Figure 18: expression transcriptomique de marqueurs de fibrose hépatique .....	35
Figure 19: perte d'expression du transgène dans les souris GSDIII avec le temps .....	36
Figure 20: le pré-traitement par rapamycine dans un modèle murin GSDIII.....	37
Figure 21: la co-thérapie AAV-rapamycine dans un modèle murin de GSDIII .....	37

### Tables

Table 1: tropisme des principaux sérotypes d'AAV utilisés en thérapie génique .....	11
Table 2: protocole in vivo d'injection des vecteurs AAV9-spC512-GDE overlapping ou dual hybrid et interventions .....	30
Table 3: protocole in vivo d'injection du vecteur AAV9-CMV-GDE overlapping et interventions .....	31
Table 4: protocole in vivo d'injection du vecteur AAV8-hAAT-GDE overlapping et interventions .....	32
Table 5: protocole in vivo d'injection du vecteur AAV9-LiMP-GDE overlapping et interventions.....	34
Table 6: protocole in vivo d'injection du vecteur AAV8-hAAT-hFIX et interventions .....	35
Table 7: protocole in vivo de la co-thérapie rapamycine et vecteur AAV9-LiMP-GDE overlapping et interventions .....	36

# I. INTRODUCTION

La thérapie génique est une stratégie de développement thérapeutique récente et innovante qui ne cesse de susciter l'intérêt et les espoirs des chercheurs, des médecins, et des patients. Il existe de nombreuses approches, qu'elles soient techniques ou liées à la pathologie ciblée, et de nombreux domaines d'application. Dans cette thèse, nous nous restreindrons à la thérapie génique utilisant les virus adéno-associés (AAV) et ciblant le foie.

L'objectif de cette thèse est de présenter les défis actuels de la thérapie génique du foie par AAV, et d'explorer des solutions concrètes pour y répondre. Dans ce but, nous présenterons tout d'abord les principes de la thérapie génique *in vivo*, l'intérêt de cibler le foie, puis les limites auxquelles sont aujourd'hui confrontés les chercheurs et les médecins, et enfin, nous proposerons un cas pratique de mise au point d'une stratégie de thérapie génique par AAV pour traiter la glycogénose de type III.

## A. La thérapie génique *in vivo*

### 1) Définition, principes, composantes

La thérapie génique a pour but d'introduire un gène dans les cellules. Ce gène est introduit car son expression physiopathologique est déficiente, erronée, surexprimée, ou bien son expression permet de contrer les effets négatifs de la pathologie. Plusieurs approches sont envisageables :

- Réintroduire l'expression d'un gène qui est défectueux ou manquant dans la pathologie,
- Supprimer l'expression d'un gène délétère dans la pathologie,
- Corriger la séquence d'un gène mis en cause dans la pathologie pour restaurer son expression physiologique ou en atténuer les effets délétères.

La stratégie choisie est fonction de la pathologie et de son mécanisme. Quelle que soit l'approche privilégiée, le produit thérapeutique doit comporter plusieurs éléments :

- Le transgène et les séquences régulatrices d'expression : c'est la séquence que l'on veut exprimer dans les cellules, classiquement la séquence codante du gène que l'on veut réintroduire. Des éléments régulateurs sont ajoutés autour de cette séquence afin d'optimiser l'expression du gène dans les cellules, tels qu'un promoteur associé ou non à un enhanceur qui favorisent l'expression du gène dans un tissu donné, une séquence intronique qui stabilise les ARNm en recrutant les spliceosomes et favorise la sortie des ARNm du noyau vers le cytoplasme pour la traduction<sup>1</sup>, ou un signal de polyadénylation qui permet de stabiliser l'ARN au sein des cellules.
- Le vecteur : c'est l'outil qui va permettre d'administrer le produit thérapeutique et de l'acheminer aux cellules cibles.

Le choix des éléments régulateurs et des vecteurs va conditionner l'efficacité et la sélectivité de la thérapie génique.

### 2) L'AAV : un vecteur de choix pour la thérapie génique *in vivo*

#### a. *L'AAV sauvage*

L'AAV est un virus de la famille *Parvoviridae*, et du genre *Dependovirus*. C'est un petit virus, de 20-25 nm, non

enveloppé et renfermant un simple brin d'ADN<sup>2-4</sup>. Le virus n'a jamais été mis en cause dans une pathologie, bien que des anticorps anti-AAV soient retrouvés chez 30 à 80% de la population selon le sérotype<sup>5,6</sup>, et est considéré comme non pathogène<sup>2</sup> car il dépend pour sa réplication d'autres virus satellites tels que l'adénovirus ou le virus de l'herpès.

On compte à ce jour 12 sérotypes d'AAV. Découvert en premier, le sérotype le plus décrit et le plus connu est celui de l'AAV2. Le génome de l'AAV2 fait 4,7 kb, et contient deux gènes : REP et CAP<sup>7-9</sup> (Figure 1). Le gène REP code pour quatre protéines nécessaires à la réplication de l'AAV, à travers des mécanismes d'épissage alternatif et de sites d'initiation de la traduction alternatifs. Le gène CAP code pour les protéines VP1, VP2 et VP3, constituants de la capsid, et pour la protéine activatrice de l'assemblage de la capsid (AAP). Ces deux gènes sont flanqués à leurs extrémités par des séquences terminales inversées (ITRs). Les ITRs sont des séquences en épingle de 145 bp, dont 125 bp consistent en une séquence palindromique et les 20 bp restant sont une séquence interne non appariée<sup>2,10</sup>.

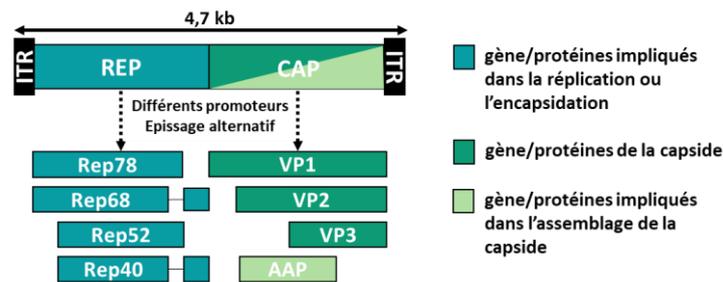


Figure 1: carte schématique du génome de l'AAV2

En l'absence d'un virus satellite pour la réplication, l'AAV peut entrer dans une phase de latence lors de laquelle il ne se réplique pas mais s'intègre de manière spécifique dans le locus 19q13.4 du génome humain<sup>11-13</sup>. Ce locus présente en effet deux motifs également présents au niveau des ITRs et cibles des protéines Rep. Les protéines Rep sont capables de réaliser un pontage entre l'ADN génomique et l'ADN viral. Un site de clivage présent dans la séquence des AAV permet l'intégration de la séquence virale dans le génome de la cellule hôte. Lors d'une infection ultérieure par un virus satellite, l'AAV pourra se répliquer<sup>3,4,13-16</sup>.

L'AAV est également capable de persister sous forme extra-chromosomique au sein des cellules, en formant des épisomes. Cependant, le virus n'est pas capable de répliquer son génome épisomale en même temps que l'ADN cellulaire (Figure 2).

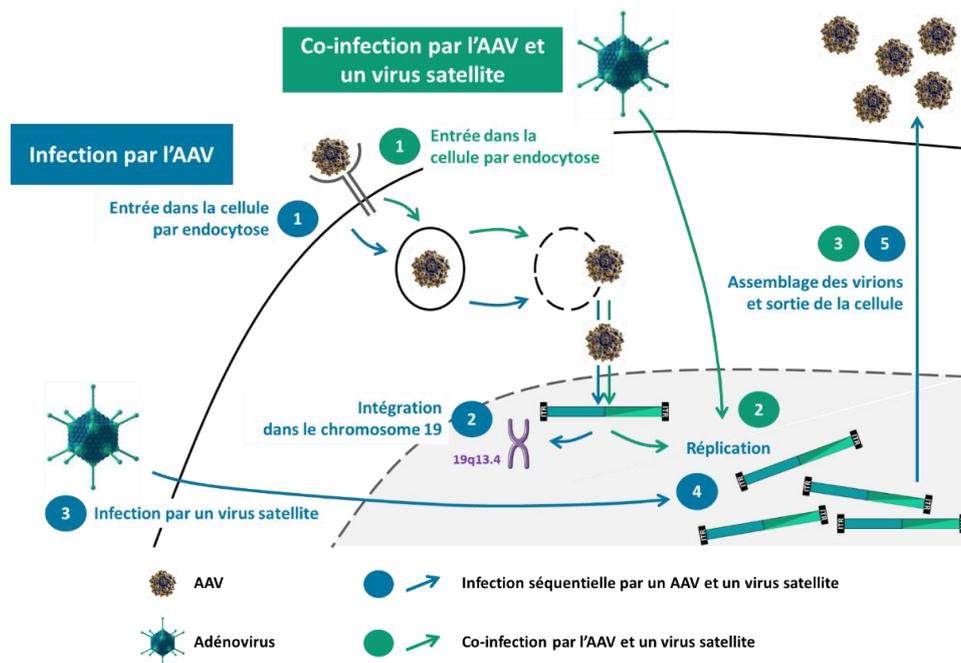


Figure 2: cycle de vie de l'AAV

## b. AAV recombinant

Les vecteurs AAV utilisés pour le développement thérapeutique, dits AAV recombinants (rAAV) ne comportent aucune séquence virale codante.

Les ITRs sont conservés, mais les gènes REP et CAP sont retirés de la séquence, et remplacés par la séquence du transgène. Les rAAV ne sont donc pas capables de s'intégrer dans le génome hôte au niveau du locus 19q13.4, mais ils persistent dans les cellules sous forme de concatamères. Les concatamères sont constitués par la succession de plusieurs séquences de rAAV liées par leurs ITRs<sup>17-19</sup>. Cette particularité est l'un des grands avantages de l'AAV. En effet, le caractère non intégratif des AAV diminue les risques d'insertion aléatoire dans le génome liés aux vecteurs rétroviraux notamment, tout en permettant une expression à long-terme dans les cellules post-mitotiques grâce à leur persistance épisomale.

La variété des sérotypes d'AAV est un facteur particulièrement intéressant en thérapie génique *in vivo*, car il existe en effet un tropisme tissulaire selon le sérotype utilisé (Table 1). Par exemple, l'AAV8 est décrit comme transduisant de manière particulièrement efficace le foie, tandis que l'AAV9 va transduire à la fois le foie, les muscles squelettiques, le cœur, et le système nerveux central<sup>20</sup>. Cette diversité dans la biodistribution des AAV serait due à la diversité des récepteurs assurant leur entrée dans les cellules.

Sérotype	Tissus cibles	Récepteur	Co-récepteur
AAV1	Foie, muscles squelettiques, cœur	Acide sialique N-lié	Inconnu
AAV2	Foie, muscles squelettiques, cœur, poumons	HSPG	FGFR1, intégrines $\alpha\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$ , HGFR, LamR, CD9
AAV5	Foie, muscles squelettiques, poumons	Acide sialique N-lié	PDGFR
AAV6	Foie, muscles squelettiques, cœur, poumons	HSPG Acide sialique N-lié	EGFR
AAV8	Foie, muscles squelettiques, cœur	Inconnu	LamR
AAV9	Foie, muscles squelettiques, cœur, SNC, poumons	Galactose N-lié	LamR

Table 1: tropisme des principaux sérotypes d'AAV utilisés en thérapie génique

*EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique ; FGFR1 : récepteur du facteur de croissance du fibroblaste 1 ; HGFR : récepteur du facteur de croissance hépatocytaire ; HSPG : héparane sulfate ; LamR : récepteur de la laminine ; PDGFR : récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes ; SNC : système nerveux central*

Ainsi, en associant de manière coordonnée le choix du sérotype et l'utilisation judicieuse de séquences régulatrices (promoteur) spécifiques d'un tissu, on peut cibler l'expression du vecteur thérapeutique dans un ou plusieurs types cellulaires et tissulaires définis.

## 3) Les contraintes actuelles de la thérapie génique par AAV

### a. Immunosuppression et perte d'expression

En comparaison à d'autres vecteurs viraux, l'AAV est considéré comme peu immunogène. Cependant, l'immunogénicité de l'AAV reste l'une de ses principales limites en thérapie génique.

La première réponse immunitaire est la réponse innée. Dans le cas de la thérapie génique par AAV, celle-ci peut s'exprimer contre le transgène ou contre la capsid de l'AAV.

De plus, bien que l'AAV sauvage n'est jamais été décrit comme pathogène chez l'homme, l'homme peut y être exposé au cours de sa vie et développer une réponse immunitaire. La capsid de l'AAV recombinant utilisé en thérapie génique est semblable à celle de l'AAV sauvage, ce qui signifie qu'une administration de rAAV à un

patient peut conduire à une réponse immune adaptative. Cette réponse immunitaire adaptative contre la capsid se manifeste sous deux volets : une réponse cellulaire, et une réponse humorale.

(i) La réponse immunitaire innée contre la capsid et le transgène

Après l'endocytose de l'AAV dans la cellule, le génome de l'AAV et sa capsid sont détectés par les récepteurs Toll-like (TLR) 9 et 2, respectivement (Figure 3).

Les TLR sont des récepteurs essentiels à la réponse innée. Ils sont capables de reconnaître des particules bactériennes et virales, notamment l'ADN viral<sup>21</sup>, ce qui conduit :

- Soit à une baisse de la synthèse protéique et à l'apoptose de la cellule infectée.
- Soit à la sécrétion par la cellule infectée de cytokines qui vont activer les cellules du système immunitaire inné (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes NK). L'activation des cellules du système immunitaire inné entraîne l'élimination de la cellule infectée.

(ii) La réponse immune cellulaire contre la capsid des rAAV

Dans un essai clinique utilisant un AAV2 exprimant le facteur IX injecté par voie veineuse à  $2 \times 10^{12}$  vg/kg à des patients hémophiliques B, une augmentation transitoire et asymptomatique des transaminases a été observée chez deux patients 4 semaines après l'injection, en parallèle d'une diminution de l'expression du facteur IX<sup>22</sup>.

Ces observations ont été corrélées à une expansion des lymphocytes T CD8+ spécifiques de la capsid, probablement responsables du rejet immunitaire des hépatocytes transduits<sup>23</sup>. L'injection d'un rAAV réactive les lymphocytes T CD8+ à mémoire spécifique de la capsid d'AAV sauvage, et conduit à leur expansion. Les lymphocytes T CD8+ éliminent alors les hépatocytes transduits par le rAAV, qui expriment les protéines virales à leur surface membranaire<sup>23</sup> (Figure 3).

Afin d'éviter cette réponse immune cellulaire, deux solutions sont possibles.

La première consiste à atteindre un équilibre entre la quantité de rAAV nécessaire pour obtenir une efficacité, et la quantité de rAAV à ne pas dépasser sous peine d'activer le système immunitaire. Néanmoins, il est difficile d'établir une règle générale pour déterminer ce ratio, car d'autres paramètres sont à prendre en compte tels que la préexposition à l'AAV sauvage, la variabilité génétique interindividuelle et le complexe majeur d'histocompatibilité.

Une seconde solution consiste à traiter les patients injectés par une immunosuppression (corticostéroïdes oraux) dès lors que les transaminases hépatiques augmentent. Dans un essai clinique plus récent pour l'hémophilie B, utilisant un AAV8 exprimant le facteur IX et ciblant le foie, cette stratégie a été mise en œuvre<sup>24,25</sup>. L'activation des lymphocytes T CD8+ anti-capsid et l'élévation des transaminases a été observée 7 à 9 semaines suite à l'administration de l'AAV8 chez 4 des 6 patients de la cohorte recevant la forte dose de vecteur ( $2 \times 10^{12}$  vg/kg)<sup>24,25</sup>. Le délai d'administration des immunosuppresseurs après le début de la réponse immunitaire est essentiel, et même dans le cas d'une intervention par corticostéroïdes très rapide, une perte d'expression du transgène rapide et importante a été observée<sup>25</sup>.

(iii) La réponse immune humorale contre la capsid des rAAV

Suite une à une exposition à l'AAV sauvage, estimée entre 1 et 3 ans d'âge, 30 à 80% de la population générale développe des anticorps anti-capsid<sup>5,6</sup>.

La séroprévalence la plus élevée est observée pour les AAV2 et AAV1<sup>5,6</sup>, alors que la plus faible séroprévalence est celle des AAV9 et surtout de l'AAV8<sup>5,6</sup>. Or, un faible titre d'anticorps anti-capsid, dits anticorps anti-capsid neutralisants ou NAbs, suffit à neutraliser les AAV en diminuant leur efficacité de transduction<sup>6,22</sup> (Figure 3).

Cela a été mis en évidence dans un essai clinique pour l'hémophilie B, mettant en jeu un AAV2 exprimant le facteur IX injecté par voie veineuse<sup>22</sup>. Dans la cohorte injectée à forte dose ( $2 \times 10^{12}$  vg/kg), un patient avec un titre de NAb de 1:2 avant administration du vecteur a obtenu une bonne réponse au traitement avec une expression de facteur atteignant jusqu'à 11% de l'expression d'une personne saine. Au contraire, chez un patient avec un titre de NAb de 1:17 avant administration du vecteur, le facteur IX n'a pas été détecté dans la circulation suite au traitement<sup>22</sup>.

Par conséquent, un titre d'anticorps neutralisants préexistant élevé (le plus souvent >1:5) constitue un critère d'exclusion des essais cliniques. Il est également possible de réaliser une plasmaphérèse, afin de retirer tous les anticorps présents dans la circulation des patients, avant d'administrer le vecteur.

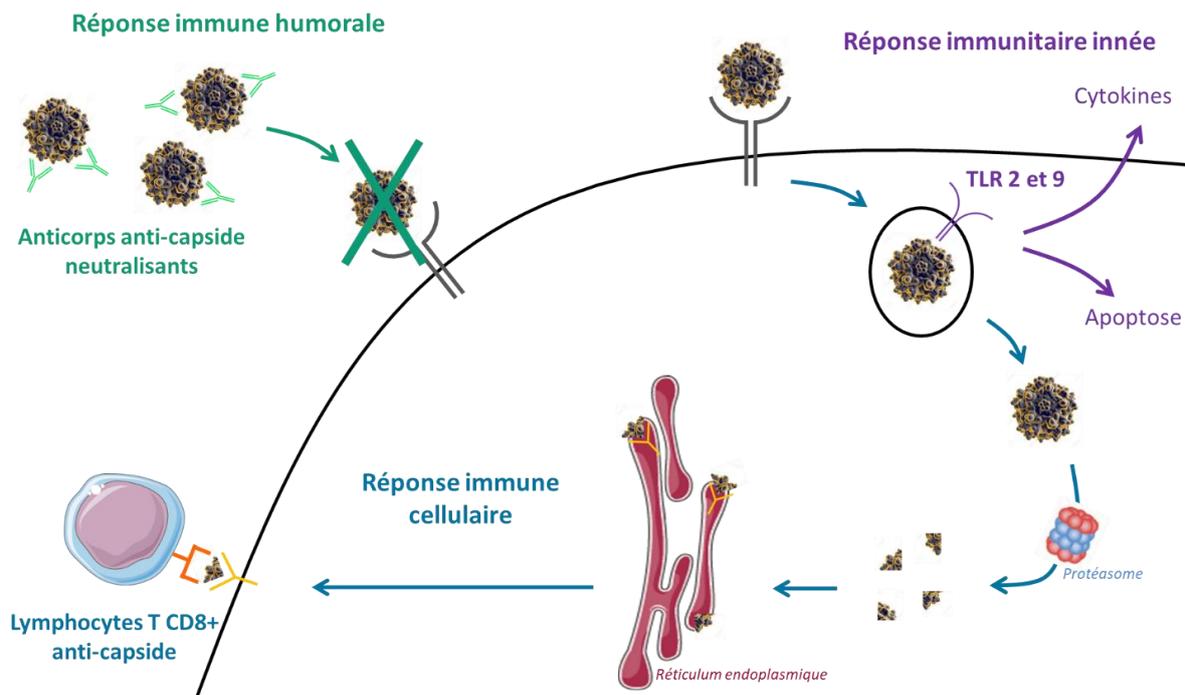


Figure 3: réponses immunitaires à l'AAV

*Dans la réponse immunitaire innée, le génome ou la capside de l'AAV est reconnu par les TLR, ce qui conduit à l'activation des cellules de la réponse immunitaire innée et l'élimination de la cellule transduite par les cellules de l'immunité, ou à l'apoptose de la cellule transduite.*

*Dans la réponse immunitaire adaptative cellulaire, les lymphocytes T CD8+ anti-capsides sont réactivés par la présentation de protéines de la capside de l'AAV par les cellules transduites, ce qui conduit à leur expansion, et in fine à l'élimination des cellules transduites. Dans la réponse immunitaire adaptative humorale, les lymphocytes B synthétisent des anticorps neutralisants anti-capside AAV, bloquant ainsi la transduction.*

### b. Efficacité et niveaux d'expression thérapeutiques

Le transfert de gène par AAV a pour but une expression du transgène à des niveaux suffisants pour observer un effet thérapeutique, stable, et sur le long-terme.

Les essais cliniques sur l'hémophilie ont permis d'établir que les niveaux d'expression du transgène sont liés à la dose d'AAV injectée<sup>22,24,25</sup> : plus la dose est forte, plus le niveau d'expression augmente. Or, la réponse immunitaire anti-capside est également liée à la dose d'AAV injectée et peut diminuer voire effacer l'expression du transgène, si elle n'est pas prise en charge. Afin d'être efficace, la dose de vecteur doit se trouver dans la fenêtre thérapeutique étroite entre la dose de vecteur nécessaire pour atteindre des niveaux d'expression thérapeutiques, et la dose de vecteur qui va engendrer une réponse immunitaire.

La quantité d'AAV nécessaire afin d'atteindre des niveaux d'expression thérapeutiques dépend de la physiopathologie de la maladie évaluée, mais des approches indépendantes de la pathologie existent afin de réduire la dose d'AAV nécessaire :

- Utiliser des capsides qui permettent d'échapper à la réponse immunitaire anti-capside

Afin de minimiser la réponse immunitaire anti-capside, la recherche portant sur l'identification de nouveaux variants et sur la modification des capsides s'est intensifiée ces dernières années.

Par exemple, des AAV infectant d'autres espèces que l'homme ont été identifiés et peuvent être utilisés chez l'homme<sup>26</sup>.

La modification de la capsid de l'AAV par ingénierie permet également de modifier le tropisme tissulaire du vecteur, mais aussi la signalisation intracellulaire de l'AAV<sup>27</sup>. Par exemple, il est possible de détourner les particules virales de la dégradation protéosomale en modifiant leurs capsides à des sites spécifiques, ou en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, ce qui permet d'augmenter l'efficacité de transduction de ces vecteurs.

- Augmenter l'activité/les niveaux d'expression du transgène

La codon optimisation a pour but de modifier les nucléotides de la séquence du transgène, sans modifier la séquence d'acides aminés de la protéine codée, afin de faire correspondre les codons de la séquence avec les acides ribonucléiques de transfert (ARNt) les plus représentés chez l'espèce cible.

Grâce à cette technique, la traduction des ARNm issus des transgènes est plus efficace, ce qui permet en théorie d'augmenter les niveaux de protéines synthétisées.

Il est également possible d'améliorer la cassette d'expression du transgène, en utilisant des éléments régulateurs additionnels. Les enhanceurs permettent d'augmenter l'efficacité du promoteur. Afin de moduler l'expression du transgène, il est aussi possible d'utiliser des promoteurs spécifiques d'un tissu.

### *c. Capacité d'encapsidation de l'AAV*

L'AAV sauvage encapside un génome de 4,7kb (Figure 1), ce qui restreint son utilisation à des pathologies causées par des gènes de taille réduite. C'est aujourd'hui l'une des principales limites à l'utilisation généralisée de l'AAV en thérapie génique.

Afin de surmonter cet obstacle, deux approches sont envisageables :

- Réduire la taille du transgène, en optimisant la cassette d'expression avec les séquences régulatrices les plus courtes et fonctionnelles connues, ou bien en utilisant des versions tronquées des protéines. Cette approche dépend du transgène et de la pathologie.
- Augmenter la capacité d'encapsidation de l'AAV. Ces stratégies reposent sur des mécanismes cellulaires et l'utilisation de deux AAV pour un seul produit thérapeutique, et ne dépendent pas du transgène ni de la pathologie<sup>28,29</sup>.

Plusieurs approches utilisant deux AAV ont été décrites : le chevauchement, ou « overlapping », et les vecteurs doubles hybrides.

L'overlapping est basé sur le mécanisme de réparation de l'ADN de recombinaison homologue. La cassette étant trop grande pour rentrer dans un vecteur AAV, elle est séparée en deux parties (appelées ici « Head » et « Tail ») qui sont incorporées dans deux particules d'AAV distinctes. Chaque partie, comporte une région d'homologie située en 3' de la cassette Head et en 5' de la cassette Tail (Figure 4A). C'est la recombinaison homologue intracellulaire entre chacune des parties qui permettra de reconstituer le transgène entier<sup>28,30</sup>. L'efficacité de cette stratégie a été démontrée dans plusieurs pathologies<sup>31-33</sup>.

Néanmoins, le taux de recombinaison dans la cellule reste faible, autour de 1 à 2% de ce qui est obtenu avec un unique AAV encapsidant le transgène complet<sup>34</sup>. De plus, les séquences Head et Tail peuvent être exprimées séparément<sup>35</sup>, sans qu'il y ait eu recombinaison, générant des protéines tronquées non naturelles potentiellement toxiques et/ou immunogènes.

La stratégie dite dual-hybrid est appelée ainsi car elle nécessite deux AAV et met en jeu deux mécanismes : la recombinaison homologue et l'épissage. Les séquences Head et Tail comprennent une séquence de recombinaison, et un site donneur d'épissage en 3' de la séquence Head ou un site accepteur d'épissage en 5' de la séquence Tail (Figure 4B). Grâce au mécanisme de recombinaison homologue, via les ITRs ou via la séquence de recombinaison, le transgène complet est reconstitué et transcrit. Lors de la maturation des ARNm, la séquence de recombinaison est éliminée par épissage via les sites donneurs et accepteurs insérés à ses extrémités<sup>28,29</sup>. Le plus souvent, la région d'homologie utilisée dans ce type de vecteur est la séquence de la phosphatase alcaline (AP), qui est connue pour conduire à de bons taux de recombinaison<sup>36</sup>.

Cependant, comme dans l'overlapping, des protéines tronquées peuvent être synthétisées à partir de chaque vecteur Head ou Tail. De plus, si les sites d'épissage ne sont pas reconnus, la protéine synthétique générée comporte une séquence exogène qui peut modifier la structure tridimensionnelle de la protéine, et donc sa fonction, mais également être reconnue comme exogène et entraîner une réponse immunitaire. Ce dernier phénomène est considéré comme mineur<sup>30</sup>.

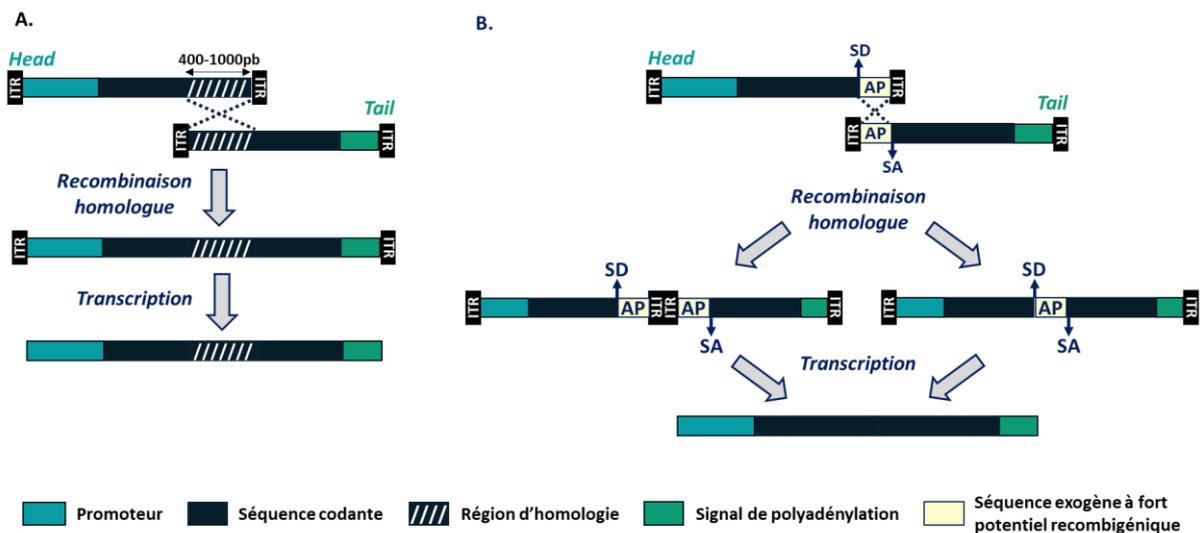


Figure 4: stratégies mettant en jeu deux vecteurs AAV pour surmonter la limite d'encapsidation de l'AAV

A. Stratégie de l'overlapping ; B. Stratégie dual hybrid, SD : site donneur ; SA : site accepteur

#### d. Quantité de vecteur à produire

Les vecteurs AAV peuvent être produits par plusieurs méthodes, dont la triple co-transfection de cellules de mammifères est la plus commune<sup>37,38</sup>.

La méthode de triple co-transfection est utilisée en recherche, mais aussi pour la production de lots cliniques. Les cellules utilisées sont le plus souvent des HEK 293 (cellules embryonnaires de reins), car ces cellules se transfectent facilement et efficacement. Trois plasmides sont transfectés :

- Un plasmide contenant la cassette d'expression du transgène, encadrée par deux ITRs.
- Un plasmide contenant les gènes Rep et Cap.
- Un plasmide encodant les gènes du virus satellite (l'adénovirus).

La purification des virus produit peut être réalisée par chromatographie sur colonne, ou par des méthodes physiques impliquant la séparation par gradient et des centrifugations. Selon la méthode choisie, les contaminations de débris cellulaires et de capsides d'AAV vides (ne contenant pas le transgène) seront plus ou moins importantes. La pureté de l'AAV produit est un paramètre essentiel à prendre en compte pour la réalisation d'études précliniques et surtout cliniques, car les contaminations peuvent avoir un impact en termes

de réponse immunitaire. Notamment, la persistance de capsides vides dans les lots d'AAV augmente la possibilité de reconnaissance des AAV par le système immunitaire.

Aujourd'hui, ces méthodes de production permettent d'obtenir des titres allant jusqu'à  $10^{12}$ - $10^{13}$  vg/mL (génomomes viraux/mL). Ces rendements sont élevés, cependant, dans des stratégies ciblant des organes difficilement transduits (système nerveux central, muscles squelettiques, reins) par voie systémique, les doses requises sont de l'ordre de  $10^{13}$  vg/kg, allant jusqu'à  $5 \times 10^{14}$  vg/kg (NCT00428935, NCT02122952, NCT03381729, NCT03199469, NCT03505099, NCT03375164, NCT00430768), ce qui représente plusieurs litres de production.

Les recherches scientifiques et médicales utilisant l'AAV sont de plus en plus nombreuses. En parallèle, la transposition en clinique de cette technologie s'améliore encore, notamment grâce à l'administration du vecteur par voie veineuse, plutôt que par voie locale. Bien que très enthousiasmantes, la multiplication de ces nouvelles approches souligne la nécessité d'augmenter les rendements de production pour ces stratégies qui requièrent des quantités importantes d'AAV.

Aujourd'hui, outre les aspects scientifiques, le frein majeur à la traduction d'une stratégie mise au point en préclinique sur le modèle animal, à un médicament utilisé en clinique, est le coût du développement d'un médicament de thérapie génique et la faisabilité de la production de lots de grade clinique en quantité suffisante.

## B. Le foie, un organe essentiel et une cible de thérapie génique

Le foie est la plus grande glande endocrine de l'organisme humain. De par ses fonctions sécrétoires, mais aussi grâce à ses particularités immunogéniques, c'est un organe cible intéressant en thérapie génique.

### 1) Architecture et organisation tissulaire hépatique

Le foie est l'organe abdominal le plus volumineux, il peut représenter jusqu'à 2% du poids corporel. Extrêmement vascularisé, il contient plus de 10% du sang total. Il est alimenté en sang par l'artère hépatique qui apporte de l'oxygène, et par la veine porte qui apporte un sang riche en nutriments provenant du tube digestif, du pancréas et de la rate. Le sang artériel et le sang issu de la veine porte se mélangent au niveau des sinusoides hépatiques. Le sang est ensuite évacué par les veines sus-hépatiques, puis la veine cave inférieure (Figure 5).

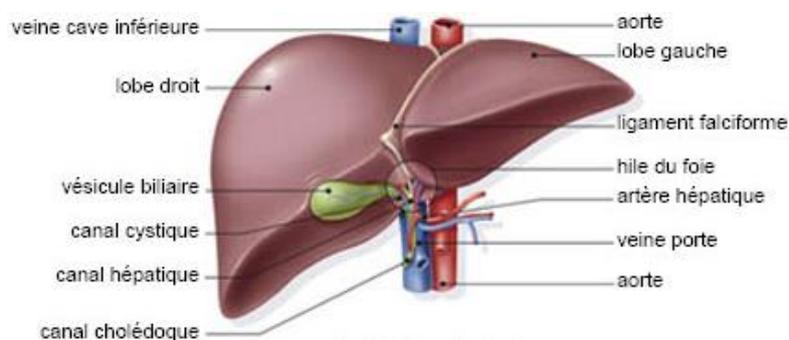


Figure 5: anatomie du foie

Source : <http://www.amfe.fr/maladies/description-du-foie/>, consulté le 06/06/2019

Viscère intra-péritonéal, il est également recouvert de la capsule de Glisson. Au niveau du hile hépatique, la capsule de Glisson s'internalise en profondeur dans le foie, divisant le foie en lobules hépatiques. Un lobule

hépatique est rempli par le parenchyme hépatique, et comporte une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte, et une branche du canal biliaire. A partir de la veine centro-lobulaire, plusieurs branches radiaires d'hépatocytes se déploient en monocouches. Les hépatocytes de cette monocouche s'anastomosent entre eux et sont fenestrés. Les rayons d'hépatocytes fenestrés délimitent l'espace sinusoidal (Figure 6).

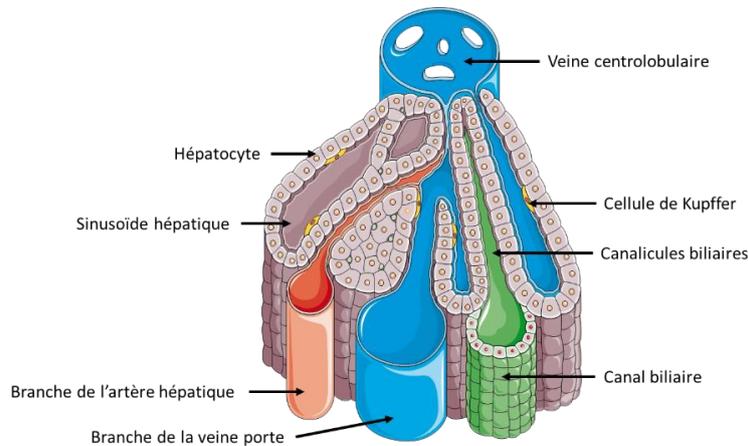
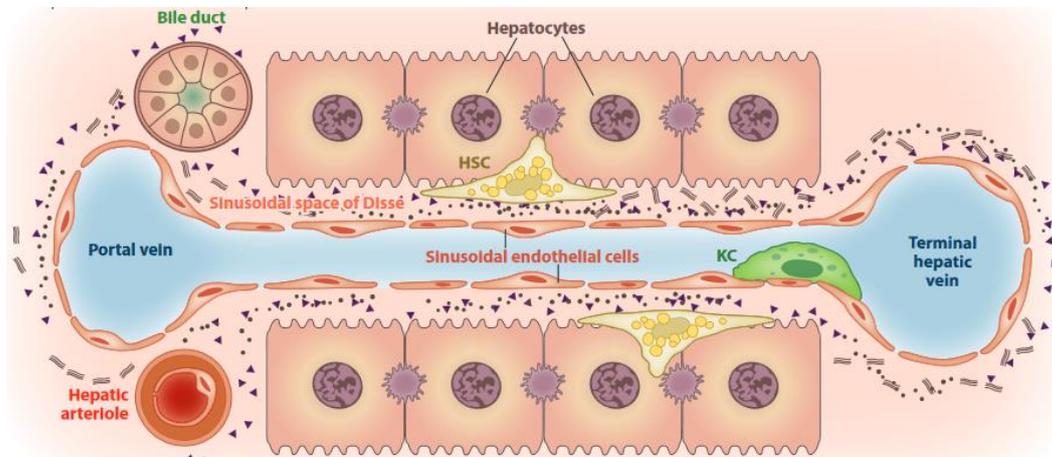


Figure 6: lobule hépatique

Source : adapté de Servier Medical ART, consulté le 06/06/2019

Cet espace sinusoidal est traversé par les sinusoides sanguins, qui relient les branches de la veine porte à la veine centro-lobulaire. Les cellules qui constituent la paroi des sinusoides sanguins sont des cellules endothéliales et les cellules de Kupffer. Les cellules de Kupffer ne sont pas en contact direct avec les hépatocytes mais en sont séparés par l'espace de Disse (Figure 7).



- Collagènes fibrillaires (types I, III, V)
- Collagènes de la lame basale (types IV, VI)
- ▲ Glycoconjugués (laminine, fibronectine, glycosaminoglycans, tenascine)

- |                              |                                     |
|------------------------------|-------------------------------------|
| Bile duct                    | Canal biliaire                      |
| Sinusoidal space of Disse    | Espace sinusoidal de Disse          |
| HSC (hepatic stellate cell)  | Cellule stellaire hépatique         |
| Sinusoidal endothelial cells | Cellules endothéliales sinusoidales |
| KC (Kupffer cell)            | Cellules de Kupffer                 |
| Terminal hepatic vein        | Veine centro-lobulaire              |

Figure 7: parenchyme hépatique et organisation au niveau sinusoidal

Source : traduit de : Pathogenesis of Liver Fibrosis, V. Hernandez-Gea and S. L. Friedman, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2011, 6:425–56

Dans l'espace de Disse, entre les hépatocytes et les cellules endothéliales, se trouvent les cellules stellaires hépatiques (CSH) (Figure 7). Les CSH sont importantes pour le métabolisme de la vitamine A, qu'elles stockent dans des gouttelettes lipidiques, et la fibrogenèse hépatique.

## 2) Atteinte de l'architecture du foie : la fibrogenèse hépatique

La synthèse et la régulation de la matrice extracellulaire hépatique est un phénomène très dynamique et très régulé. Lors que l'équilibre entre synthèse et dégradation est rompu, une fibrose hépatique se développe.

Le paramètre initial de la fibrogenèse hépatique est l'activation des cellules stellaires en myofibroblastes. Cette activation est due à des stimuli paracrines, sécrétés par les cellules parenchymales du foie suite à une lésion. Les stimuli vont induire la modification de l'expression des gènes des CSH, modifiant ainsi leur phénotype au niveau de plusieurs paramètres comme : la prolifération, la chimiotaxie, la contractilité, la dégradation de la matrice.

En effet, les CSH jouent un rôle central dans la synthèse de matrice extracellulaire par la sécrétion de ses composants et la régulation de la sa dégradation.

- A l'état quiescent, les CSH synthétisent : du collagène de type III, du collagène de type IV, du collagène de type VI, de la laminine, de la ténascine, des protéoglycanes, et des protéases impliquées dans la dégradation de la matrice telles que la MMP-1 (métalloprotéase matricielle 1).
- Après activation, les CSH se transforment en myofibroblastes et la composition de leur synthèse protéique change (Figure 8). Elles synthétisent en grande quantité des collagènes fibrillaires (type I, type III, type VI), de la fibronectine, et des protéoglycanes. De plus, les CSH activées synthétisent la MMP-2 (métalloprotéase matricielle 2), capable de dégrader le collagène de type IV qui est présent dans les lames basales, alors que la synthèse de la MMP-1 est elle diminuée<sup>39</sup>.

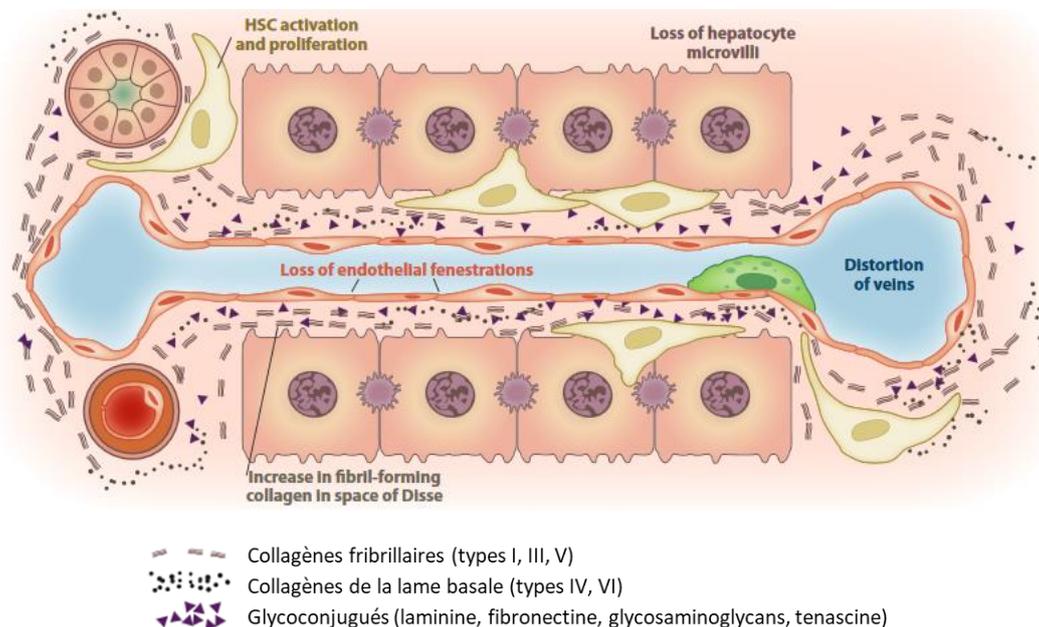


Figure 8: parenchyme hépatique et organisation au niveau sinusoidal lors de la fibrose hépatique

Source : traduit de : *Pathogenesis of Liver Fibrosis*, V. Hernandez-Gea and S. L. Friedman, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2011, 6:425–56

Ces modifications qualitatives et quantitatives de la matrice extracellulaires détériorent le microenvironnement sinusoidal. Le dépôt de matrice dans l'espace de Disse conduit à la perte de la fenestration des cellules endothéliales et à la perte des microvillosités des hépatocytes (Figure 8). En conséquence, les échanges bidirectionnels entre le flux sanguin de la veine porte et les hépatocytes sont altérés, conduisant à une altération de la fonction des hépatocytes et une hypertension portale<sup>39</sup>.

L'hypertension portale est le premier signe d'une cirrhose décompensée, c'est-à-dire d'un foie fibrotique qui a évolué en cirrhose jusqu'à un stade non réversible. Le seul traitement possible est la transplantation de foie.

Afin de cibler le foie, l'AAV est injecté par voie intraveineuse. Pour atteindre le foie, il circule donc par la circulation systémique puis les sinusoides hépatiques. Dans des conditions de fibrose hépatique, la diminution du flux sanguin et des échanges entre hépatocytes et plasma conduit à une baisse de l'efficacité de transduction des hépatocytes par les vecteurs AAV circulants.

### 3) Intérêts du foie en tant que cible de thérapie génique par AAV

Le foie présente plusieurs avantages pour la thérapie génique par AAV :

- C'est le principal organe bio-synthétiseur de l'organisme. Le foie est spécialisé dans la synthèse protéique. Il est de plus fortement vascularisé, ce qui représente deux avantages : il est facilement atteignable par voie systémique, et la sécrétion protéique hépatique est hautement efficace.
- Des études précliniques chez l'animal, sur différents modèles, ont montré que l'administration intraveineuse d'AAV permet de cibler le foie. Dans des essais cliniques, le foie a été transduit de manière efficace<sup>22,24,25</sup>.
- Les études précliniques chez l'animal, et les essais cliniques chez l'homme, ont permis de démontrer une expression hépatique à long-terme de transgènes injectés par AAV et visant le foie<sup>22,24,25,40-47</sup>.
- L'expression hépatique d'un transgène permet sa tolérisation.
- Le foie peut être utilisé pour produire des protéines sécrétées ciblant d'autres tissus.

#### a. *La tolérisation du transgène grâce à son expression hépatique*

Le foie est un organe dont l'environnement immunologique est particulier. Il est à la croisée entre le système veineux gastro-intestinal et le système sanguin systémique, ce qui l'expose continuellement aux antigènes alimentaires et provenant de la flore intestinale.

Dans le cadre de greffes de foies, l'immunosuppression n'est pas toujours requise dans les modèles animaux<sup>48,49</sup>. Chez l'homme, la discordance des complexes majeurs d'histocompatibilité entre hôte et receveur n'influence pas de manière significativement l'évolution de la greffe<sup>50</sup>. Enfin, la transplantation foie-rein simultanée améliore les chances de maintien du greffon rénal par rapport à une simple transplantation d'un rein seul, alors que cela ne varie pas pour le foie<sup>51</sup>.

Un essai clinique pour l'hémophilie B a montré que l'expression du facteur IX humain dans les hépatocytes, via un AAV, conduit à une tolérance du transgène chez le modèle animal<sup>23</sup>. Cette tolérance est médiée par les lymphocytes Treg CD4+CD25+FoxP3+ spécifiques du transgène<sup>52,53</sup>, capables d'inhiber les réponses des lymphocytes T CD4+ (responsables de la réponse humorale, produisant les NAbs) et CD8+ (responsables de la réponse cellulaire anti-capside). En effet, une immunisation de souris préalablement injectées avec un AAV-hFIX, par des injections de protéine hFIX n'a induit aucune réponse humorale<sup>52</sup>. De plus, l'activation des lymphocytes Treg CD4+CD25+FoxP3+ spécifiques du transgène, entraîne la diminution du nombre de lymphocytes T CD8+<sup>53</sup>.

Dans certaines pathologies traitées par substitution protéique, comme les hémophilies A et B, et la maladie de Pompe ou glycogénose de type II, certains patients développent des anticorps contre la protéine manquante réintroduite. Il est donc tout à fait possible que des patients n'exprimant pas la protéine manquante développent une réponse anti-transgène qui conduise à un échec thérapeutique.

Cependant, jusqu'à présent, aucun patient enrôlé dans les différents essais cliniques pour l'hémophilie n'a développé de réponse anti-transgène<sup>22,24,25</sup>, bien que certains d'entre eux soient porteurs de mutations nulles. Il

est important de noter néanmoins que tous les sujets ayant développé des anticorps anti-hFIX suite à au traitement par substitution protéique n'ont pas été inclus dans ces essais.

#### *b. Le foie en tant que bio-usine*

Le foie est le principal organe sécrétant des protéines. L'albumine, la protéine la plus présente dans le sérum, est produite et sécrétée par le foie. De plus, la plupart des facteurs de coagulation sont synthétisés au niveau hépatique.

Cette machinerie peut être exploitée en thérapie génique par AAV, « classiquement » pour exprimer des protéines hépatiques, mais aussi pour exprimer et sécréter des protéines qui ne sont pas produites dans le foie ou sécrétées par le foie.

Par exemple, le facteur de coagulation VIII et le facteur Von Willebrand sont normalement produits par les cellules endothéliales, mais des stratégies de thérapie génique par AAV les faisant synthétiser dans le foie et ensuite excrétés ont été mises au point<sup>47,54</sup>.

Plus récemment, une thérapie génique ciblant le foie a été mise au point pour la maladie de Pompe (glycogénose de type II)<sup>46</sup>. Cette pathologie affecte les muscles, notamment le diaphragme, le système nerveux central, et le foie des patients. La cassette d'expression du transgène conçue comporte un peptide signal qui va permettre la sécrétion de la protéine dans la circulation générale, elle est ensuite internalisée par les cellules musculaires.

Cette stratégie bénéficie d'un avantage quant à la dose de vecteur nécessaire, car transduire le foie nécessite moins d'AAV que de transduire un muscle par voie intraveineuse.

## II. MATERIELS ET METHODES

### A. Clonages

Les séquences ont été commandées chez Genecust Europe. Tous les clonages ont été réalisés dans des bactéries One Shot™ TOP10 (Thermo Fisher).

Après production, la purification a été réalisée grâce aux kits NucleoBond® MiniPrep, MidiPrep, ou MaxiPrep (Machery-Nagel), en fonction de la quantité de plasmide requise. Les plasmides obtenus ont été testés grâce à des enzymes de restriction (FastDigest, ThermoFisher) et migration sur gel d'agarose.

### B. Production d'AAV

Les AAV utilisés dans les expériences *in vivo* ont été produits dans l'unité de production du laboratoire Immunologie et maladies du foie (IMF), au sein du Généthon. La production des vecteurs AAV est réalisée sans adénovirus, mais nécessite trois plasmides :

- Un plasmide contenant les gènes Rep et Cap de l'AAV.
- Un plasmide contenant les séquences codant pour des gènes de l'adénovirus nécessaires à la réplication de l'AAV.
- Un plasmide codant pour le transgène devant être intégré dans l'AAV.

Ces trois plasmides sont transfectés sur des cellules HEK293, qui sont utilisées en raison de leur bon taux de transfection ainsi que leur bon rendement de production des vecteurs AAV. La transfection est facilitée par l'utilisation de phosphate calcium.

Les AAV produits sont ensuite purifiés grâce à deux gradients de césium, permettant de séparer les capsides vides des capsides contenant le transgène. Les titres des AAV produits ont été déterminés par deux techniques :

- Par une électrophorèse SDS-PAGE en quantifiant la protéine VP3 de chaque lot de vecteur grâce à la coloration SYPRO® Ruby (ThermoFisher).
- Par une qPCR (LightCycler 480, Roche). Les AAV sont d'abord incubés 1h à 37°C avec une DNase (DNase I, Invitrogen), puis dénaturés 10 minutes à 95°C. La qPCR est réalisée via des amorces situées sur les ITR, ou le promoteur hAAT, ou la séquence GDE overlapping, selon la séquence du transgène à titrer.

### C. Expériences *in vivo*

Les expériences sur les souris ont été réalisées sur le modèle  $Agl^{-/-}$  (déficient pour la protéine GDE) développé au sein du laboratoire Immunologie et thérapies géniques pour les maladies du foie<sup>55</sup>. Ce modèle est caractérisé par une accumulation du glycogène dans le foie et les muscles, une diminution de la force musculaire, une baisse constante du glucose sanguin, et une hépatomégalie

## 1) Test du wire hang

Le test du wire hang permet d'évaluer l'endurance. Les souris sont placées sur un fil de 4 mm d'épaisseur, elles doivent se maintenir sur ce fil uniquement grâce à leurs pattes avant. Le nombre de chutes est comptabilisé pendant 3 min, ou jusqu'à ce que la souris tombe 20 fois.

## 2) Mesure de la glycémie

Pour les procédures réalisées avec l'AAV9-CMV-GDE overlapping, la glycémie a été mesurée sur des sérums venant de souris nourries normalement, grâce à un kit de mesure du glucose (glucose GO assay kit, Sigma Aldrich). Ce kit permet de déterminer de façon enzymatique la quantité de glucose contenue dans un échantillon.

Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène par la glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'o-dianisidine, en présence de peroxydase, pour former un premier produit coloré après 30 minutes d'incubation à 37°C. L'o-dianisidine oxydée réagit avec l'acide sulfurique pour former un second produit coloré plus stable. L'absorbance à 540 nm de ce dernier produit coloré (lecture par l'EnSpire Microplate Reader, Perkin-Elmer) est proportionnelle à la concentration en glucose originelle de l'échantillon.

Pour toutes les autres procédures, la glycémie a été mesurée grâce au lecteur de glycémie Accu-Chek® Performa, en déposant une goutte de sang prise au coin interne de l'œil sur les bandelettes extra-larges Accu-Chek® Performa.

## D. Analyse des tissus

### 1) Broyage et obtention de lysats de tissus

Après le sacrifice des souris, plusieurs organes ont été récupérés (foie, cœur, triceps, quadriceps) et congelés dans de l'azote.

Ces tissus ont été lysés grâce au FastPrep®-24 (MPbio) dans de l'eau sans DNase/RNase.

### 2) Quantification de la concentration en protéines

La quantification des protéines présentes dans les tissus est réalisée grâce à un essai BCA (bicinchoninic acid assay), qui permet de doser par colorimétrie (vert à violet) une concentration en protéines en utilisant une gamme standard.

Les lysats de tissus sont mis en présence des réactifs du kit Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoScientific), contenant de l'acide bicinchoninique et du sulfate de cuivre. Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  sont réduits, à 37°C, par les liens peptidiques dans les protéines. La quantité d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  est proportionnelle à quantité de protéines dans le lysat. Les molécules d'acide bicinchoninique vont chélater les ions  $\text{Cu}^+$ , ce qui va donner une solution violette absorbant la lumière à une longueur d'onde de 562nm (lecture par l'EnSpire Microplate Reader, Perkin-Elmer).

Les valeurs d'absorbance obtenues permettent d'obtenir les concentrations en protéines des échantillons, grâce à une gamme de concentrations connues d'albumine de sérum bovin.

### 3) Analyse par Western Blot

Les tissus prélevés ont été homogénéisés dans de l'eau sans DNase/RNase, et la concentration en protéines a été déterminée grâce au BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

L'électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée sur un gel à gradient de polyacrylamide 4-12%. Après le transfert du gel sur une membrane de nitrocellulose, la membrane a été bloquée grâce au tampon Odyssey buffer (Li-Cor Biosciences) et incubée avec un anticorps anti-GDE (Rabbit polyclonal AS09-454, Agrisera), et un anticorps anti-actine (Rabbit monoclonal, sc-8432, SantaCruz Biotechnology). La membrane a été lavée et incubée avec l'anticorps secondaire adapté (Li-Cor Biosciences), et révélée grâce à l'appareil Odyssey imaging system (Li-Cor Biosciences).

### 4) Quantification du glycogène

Le glycogène a été mesuré indirectement dans les lysats tissulaires grâce à la mesure de la quantité de glucose libéré après une digestion complète par l'amyloglucosidase d'*Aspergillus Niger* (Sigma Aldrich).

Les lysats ont été incubés 5 minutes à 95°C, puis refroidis à 4°C. 25 µL d'amyloglucosidase diluée au 1/50ème dans du potassium acétate pH5.5 0,1M ont ensuite été ajoutés dans chaque échantillon. Un contrôle, sans amyloglucosidase, a été préparé pour chaque échantillon. Les contrôles et les lysats ont été incubés à 37°C pendant 90 minutes. Les réactions ont ensuite été stoppées par une incubation à 95°C pendant 5 min.

Le glucose libéré a ensuite été calculé en soustrayant les quantités obtenues dans les contrôles.

### 5) Evaluation de l'expression de hFIX

Pour évaluer l'expression de hFIX, un ELISA sandwich a été réalisé sur les plasma des souris.

Un anticorps anti-hFIX a été utilisé pour les coater les plaques (Goat anti-human factor IX, Affinity Biologicals). Afin de quantifier la quantité de protéine hFIX dans les échantillons, une gamme standard a été réalisée grâce à protéine recombinante humaine du FIX (human factor X native protein, ThermoFisher). L'anticorps secondaire (Goat anti-human factor IX-HRP, Affinity Biologicals) a été révélé par chimioluminescence grâce à l'OPD peroxydase (OPD peroxidase substrate, Sigma Aldrich). La réaction est ensuite stoppée par de l'acide sulfurique.

La mesure de l'absorbance a été réalisée à 450nm (lecture par l'EnSpire Microplate Reader, Perkin-Elmer).

### 6) Quantification du nombre de copies de vecteur

Le nombre de copies de génome a été déterminé par qPCR (LightCycler 480, Roche). L'ADN génomique a été extrait, à partir de 20mg de tissus, grâce à l'appareil MagNAPure 96 system (Roche).

Les amorces utilisées sont localisées au niveau du promoteur hAAT, ou des ITR, ou dans la région overlapping du transgène GDE. La titine a été utilisée comme contrôle interne.

### 7) Quantification des ARNm

Le nombre de copies des ARNm a été déterminé par RT-qPCR (LightCycler 480, Roche). L'ARN génomique a été extrait, à partir de 50mg de tissus, grâce au Trizol (Trizol reagent, Life technologies). Après extraction, les ARN

ont été incubés 1h à 37°C avec une DNase (DNA-free kit, Ambion), puis rétrotranscrits en cDNA (RevertAID cDNA first strand synthesis, ThermoFisher).

Les cDNA dilués au 1:10 ont été quantifiés par qPCR. Pour PAI-1, les amorces utilisées sont : Fwd 5' TTCAGCCCTTGCTTGCCTC 3' ; Rev 5' ACACTTTTACTCCGAAGTCGGT 3'. Pour VIM, les amorces utilisées sont : Fwd 5' CGGCTGCGAGAGAAATTGC 3' ; Rev 5' CCACTTTCGTTCAAGTCAAG 3'. Pour ACTA2, les amorces utilisées sont : Fwd 5' GTCCCAGACATCAGGGAGTAA 3' ; Rev 5' TCGGATACTTCAGCGTCAGGA 3'. Pour TGF $\beta$ , les amorces utilisées sont : Fwd 5' CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG 3' ; Rev 5' GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT 3'. Les amorces de la protéine ribosomale mL19 (Fwd 5' GGTGACCTGGATGAGAAGGA 3' ; Rev 5' TTCAGCTTGTGGATGTGCTC 3') ont été utilisées en tant que contrôle interne.

## E. Calculs statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Prism-GraphPad.

Toutes les analyses ont été réalisées par un test ANOVA, excepté pour : le nombre de copies de génome vectoriel du hFIX qui a été analysé par un test de Mann-Whitney, et l'expression transcriptomique de marqueurs de la fibrose qui ont été analysés par un test de Student.

Les barres d'erreur représentent la déviation standard à la moyenne.

### III. UTILISATION D'UN MODELE PATHOLOGIQUE POUR METTRE EN EVIDENCE LES LIMITES DE LA THERAPIE GENIQUE DU FOIE ET LES ETUDIER : LA GLYCOGENOSE DE TYPE III

#### A. La glycogénose de type III

Les glycogénoses sont un groupe de pathologies dans lesquelles le métabolisme du glycogène est affecté<sup>56</sup>.

Le glycogène est la forme de stockage du glucose, retrouvé dans les muscles et le foie au niveau du cytosol et des lysosomes. Il peut être synthétisé et dégradé rapidement dans le foie, ce qui permet le maintien de la glycémie, mais aussi dans les muscles où il est utilisé pour fournir de l'énergie lors des premières secondes de la contraction musculaire<sup>57</sup>.

Le glycogène est composé de résidus UDP-glucose liés en eux par des liaisons  $\alpha$ -1,4. A chaque douzaine de résidus environ, un branchement  $\alpha$ -1,6 permet d'initier une nouvelle chaîne de résidus glucodisiques liés en  $\alpha$ -1,4<sup>57</sup> (Figure 9). Du fait de ce branchement, les résidus UDP-glucose sont assemblés en une spirale centrée sur la glycogénine. La glycogénine est une glycosyltransférase capable de polymériser au moins 4 résidus UDP-glucose sur son résidu Tyrosine en position 194, et ainsi d'amorcer la synthèse du glycogène.

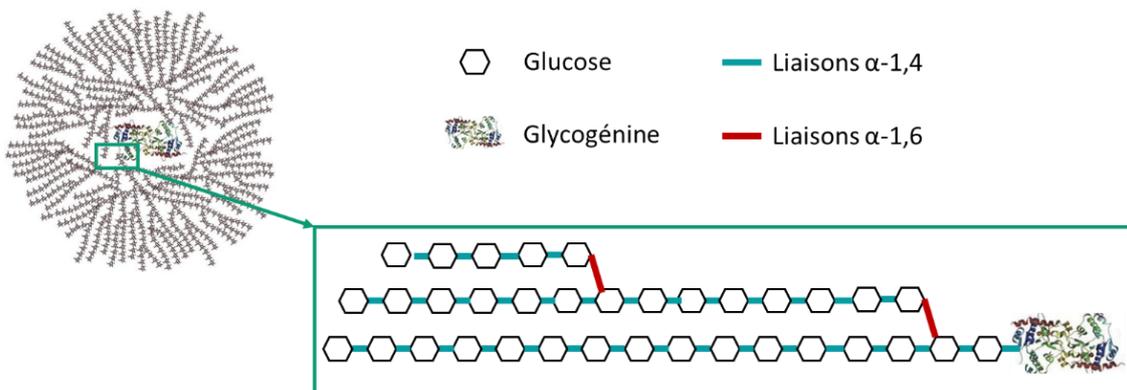


Figure 9: molécule de glycogène et ses liaisons intra-moléculaires

Source : adapté de [www.2012books.lardbucket.org/books/an-introduction-to-nutrition/s08-carbohydrates.html](http://www.2012books.lardbucket.org/books/an-introduction-to-nutrition/s08-carbohydrates.html) consulté le 25/03/2019

La glycogénose de type III (GSDIII) est une maladie génétique rare, affectant 1 :100 000 naissances par an, et de transmission autosomique récessive<sup>58</sup>. Elle débute le plus souvent pendant l'enfance. Sur le plan clinique, on peut distinguer deux phases d'évolution de la maladie :

- L'enfance : la manifestation de la maladie est surtout hépatique et métabolique. Les patients souffrent d'hypoglycémies lors de jeûnes, et d'hépatomégalie. Un retard de croissance peut être observé<sup>58,59</sup>.
- L'adolescence et la période adulte : l'hépatomégalie régresse, et une faiblesse musculaire progressive apparaît<sup>58</sup>. Les patients peuvent présenter une fibrose hépatique, voire une cirrhose, et près de 2% d'entre eux développent des hépatocarcinomes à l'âge de 30 ans<sup>58,60</sup>. Enfin, les patients présentent fréquemment une cardiomyopathie à un stade plus ou moins sévère<sup>58,59</sup>.

Il existe deux types de GSDIII :

- Le type a, dans lequel un phénotype hépatique et musculaire sont visibles.
- Le type b, dans lequel aucun phénotype musculaire n'est visible tandis que le foie est affecté.

La maladie est due à des mutations sur le gène AGL (amylo- $\alpha$ 1,6-glucosidase, 4- $\alpha$ -glucanotransférase), en position 1p21.2 du génome humain<sup>61</sup>. Le gène comprend 35 exons, et les mutations recensées chez les patients GSDIII sont nombreuses (plus de 170 mutations différentes<sup>58,62</sup>) et diverses : faux-sens, non-sens, insertions, délétions<sup>63-65</sup> (Figure 10).

Bien que certaines mutations soient préférentiellement associées au type a ou b<sup>66,67</sup>, aucune corrélation certaine entre le génotype et phénotype n'a été établie.

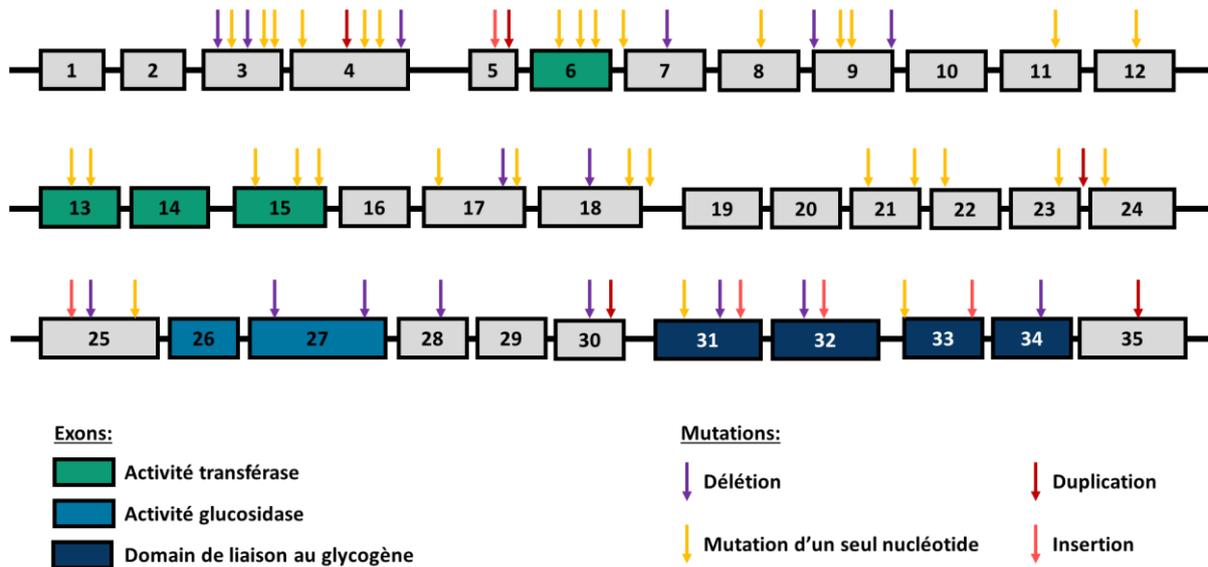


Figure 10: exemples de mutations pathogéniques recensées dans la séquence du gène AGL

Source : [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/) consulté le 31/03/2019

AGL code pour l'enzyme débranchante du glycogène (GDE) (OMIM 610860), une des deux enzymes impliquées dans la dégradation du glycogène.

La phosphorylase du glycogène est capable de d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -1,4 du glycogène jusqu'à obtenir une chaîne d'uniquement 4 résidus glucoses en  $\alpha$ -1,4<sup>57</sup>. C'est la GDE qui est responsable de la lyse des derniers résidus, grâce à ses deux activités catalytiques (Figure 11A):

- Une activité transférase : impliquée dans le transfert de 3 des 4 derniers résidus glucosidiques en  $\alpha$ -1,4 des chaînes branchées<sup>68</sup>.
- Une activité glucosidase : impliquée dans l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,6 du glycogène, qui permet de libérer le dernier résidu glucosidique d'une chaîne branchée<sup>68</sup>.

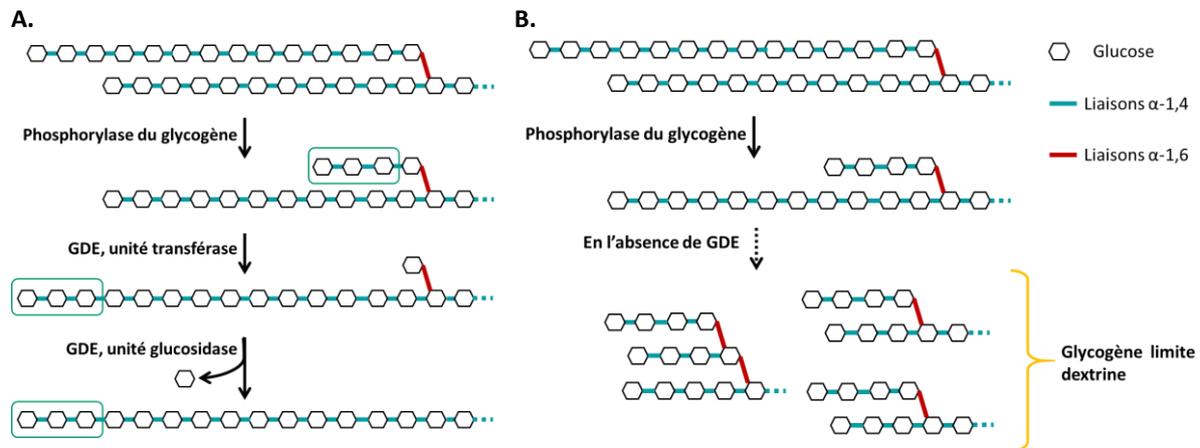


Figure 11: dégradation cytosolique du glycogène  
A. dans les conditions physiologiques ; B. dans GSDIII.

L'absence de GDE dans GSDIII conduit à l'accumulation de glycogène de structure anormale avec des branches accessibles courtes de 4 résidus glucosidiques uniquement (Figure 11B). Ce glycogène est dit limite dextrine<sup>57</sup>.

De façon intéressante, l'activité biochimique de la GDE explique directement les signes cliniques rencontrés chez les patients GSDIII. L'accumulation du glycogène est responsable dans le foie de l'hépatomégalie, tandis que l'impossibilité de produire du glucose à partir du glycogène en quantité suffisante conduit à des hypoglycémies et à un métabolisme détourné pour produire de l'énergie<sup>59</sup>. Dans les muscles, l'accumulation de glycogène dans de larges vacuoles modifie l'architecture des fibres, conduisant à un éloignement des myofibrilles entre elles et à une diminution de la force musculaire<sup>55,59</sup>.

Afin de prévenir l'accumulation de glycogène, le régime alimentaire des patients doit être adapté. Les sucres simples doivent être évités afin de réduire la synthèse de glycogène. Afin de prévenir les hypoglycémies, un régime alimentaire à base de carbohydrates complexes (féculé de maïs) et des prises alimentaires fréquentes sont mis en place<sup>58,59</sup>. De plus, Chez les adultes, un régime alimentaire riche en lipides et en protéines qui a montré son efficacité dans la prévention des cardiomyopathies hypertrophiques<sup>69-74</sup>.

A l'heure actuelle, la prise en charge thérapeutique de la pathologie repose uniquement sur ces régimes alimentaires adaptés.

## B. Stratégies de transfert de gène par AAV pour le traitement de la GSDIII

### 1) Les défis de la thérapie génique pour GSDIII

#### *a. La capacité d'encapsulation de l'AAV et la cassette d'expression de la séquence codante de GDE*

Malgré l'utilisation d'un promoteur et d'un signal de polyadénylation réduits, la cassette minimale pour GDE dépasse les 5kb (Figure 12), au-delà des 4,7kb autorisés par la capacité d'encapsulation de l'AAV sauvage. Néanmoins, quelques équipes ont pu obtenir l'encapsulation efficace de transgènes allant jusqu'à 5,2kb<sup>28,29,75,76</sup>, mais augmenter la taille du transgène conduit à une baisse du rendement lors de la production de l'AAV.

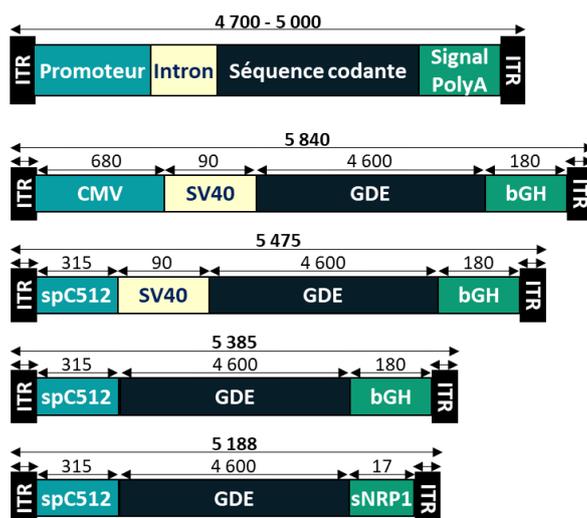


Figure 12: optimisation de la taille de la cassette d'expression de GDE

bGH : signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance bovine ; CMV : promoteur du cytomégalovirus ; hAAT : promoteur du gène humain anti-trypsine  $\alpha$  ; ITR : région terminale inversée ; sNRP1 : signal de polyadénylation du gène humain de la neuropiline soluble 1, brevet US7557197B2 ; spC512 : promoteur musculaire synthétique ; SV40 : intron du virus simien SV40. Les tailles des séquences sont indiquées en paires de bases.

### b. Cibler et transduire un foie fibrotique et prolifératif grâce à un AAV

Les patients atteints de GSDIII sont à risque de développer un foie fibrotique, pouvant évoluer en cirrhose, et dans de rares cas en carcinomes hépatocellulaires<sup>58-60</sup> (Figure 13).

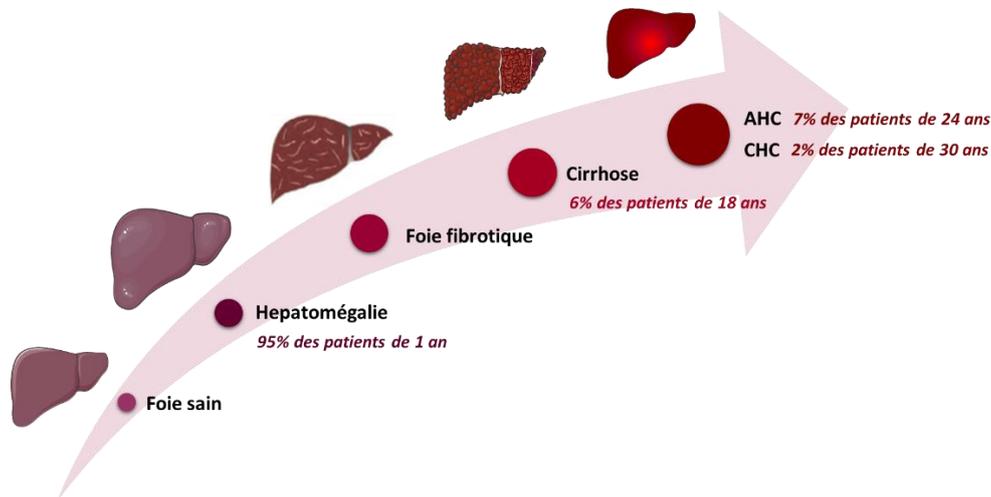


Figure 13: évolution de la pathologie hépatique dans GSDIII

Chez les modèles murins et canins de GSDIII, le foie est atteint dans son architecture et sa morphologie<sup>77,78</sup>. L'atteinte hépatique et l'inflammation constante du foie conduit à une activation des cellules stellaires hépatiques, qui vont alors se transformer en myofibroblastes et favoriser l'installation et la progression de la fibrose. Dans un foie fibrotique, les échanges avec le sang sont diminués. Dans ce contexte, la transduction des hépatocytes par un AAV injecté dans la circulation est moins efficace que dans le cas d'un foie sain.

En parallèle au développement d'une fibrose, les hépatocytes prolifèrent<sup>78</sup>. Or, l'AAV persiste dans les cellules hôtes sous forme épisodale et ne s'intègre pas, ou peu, dans le génome hôte. Lors des divisions cellulaires, l'AAV est donc dilué dans les cellules filles. Ce phénomène a été observé pour les foies en croissance, chez la souris et le rat, mais également dans des pathologies avec une prolifération hépatocytaire.

Du fait de la réponse immunitaire, il est aujourd'hui indispensable de ne procéder qu'à une unique administration de vecteur AAV chez les patients. La perte d'expression du transgène dans des foies en prolifération ne peut donc pas être contrée par la réadministration de la thérapie.

#### *c. Cibler et transduire plusieurs organes grâce à un AAV*

Comme listés plus haut, la GSDIII se manifeste au niveau hépatique, au niveau musculaire squelettique, et cardiaque. Cela représente une double contrainte pour les thérapies géniques par AAV :

- Le cœur, les muscles squelettiques, et le foie doivent être la cible de l'AAV et transduits.
- L'expression du transgène doit être suffisante pour corriger le phénotype pathologique dans chacun de ces tissus.

Afin de cibler ces différents tissus, il est nécessaire d'administrer le vecteur AAV par voie systémique. L'AAV9 permet de transduire efficacement ces organes. Les muscles squelettiques sont les plus difficiles à transduire, et nécessitent une augmentation de la dose – ce qui augmente le risque de réponse immunitaire anti-capside.

#### *d. Le développement tumoral dans GSDIII*

A ce jour, 10 patients GSDIII ayant développé un carcinome hépatocellulaire (CHC) ont été recensés dans le monde<sup>62</sup>. 9 d'entre eux présentaient une fibrose ou une cirrhose, et 2 présentaient des adénomes hépatocellulaires (AHC). L'étude d'une cohorte de patients a établi que 2% des patients GSDIII âgés de 30 ans développent des CHC.

Afin de prévenir le développement tumoral dans GSDIII, il faut administrer précocement le traitement qui permettra d'atteindre une expression suffisante pour éviter la transformation maligne.

## 4) Stratégies pour surmonter la limite d'encapsidation de l'AAV

La taille de la séquence codante de GDE ne permet pas de l'encapsider dans un AAV (Figure 12), mais des stratégies permettant d'augmenter la capacité d'encapsidation, telles que l'overlapping et dual hybrid (Figure 4), peuvent être envisagées pour la GSDIII.

Des cassettes Head et Tail ont été construites :

- Pour la stratégie overlapping : l'AAV-Head comprend le promoteur spC512 (promoteur musculaire synthétique), un intron HBB2 (intron du gène de l'hémoglobine  $\beta$  humaine), la première partie de la séquence codante de GDE dont une région d'homologie d'environ 1000 paire de bases, et deux ITRs ; l'AAV-Tail comprend la deuxième partie de la séquence codante de GDE dont une région d'homologie d'environ 1000 paire de bases, un signal de polyadénylation HBB2, et deux ITRs.
- Pour la stratégie dual hybrid : l'AAV-Head comprend le promoteur spC512, un intron HBB2, la première partie de la séquence codante de GDE, un site donneur d'épissage et une séquence dérivée de l'alkaline phosphatase qui permet une recombinaison efficace, et deux ITRs ; l'AAV-Tail comprend un site accepteur d'épissage et la séquence de l'alkaline phosphatase, la deuxième partie de la séquence codante de GDE, un signal de polyadénylation HBB2, et deux ITRs.

Les vecteurs de ces deux stratégies ont chacun été injectés à des souris  $Agl^{-/-}$  de 3 mois à une dose totale de  $2 \times 10^{12}$  vg/mouse. Trois mois après injections, les souris ont été sacrifiées afin de pouvoir évaluer l'efficacité des vecteurs (Table 2).

Date	Injection		Mois post-traitement				
	D0		M1		M2	M3	
Ag1 <sup>+/+</sup>	PBS	✓	Evaluation fonctionnelle (wire hang)	✓	Evaluation fonctionnelle (wire hang)	✓	Evaluation fonctionnelle (wire hang)
Ag1 <sup>-/-</sup>	PBS						
Ag1 <sup>-/-</sup>	AAV9-spC512-GDEov	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang
Ag1 <sup>-/-</sup>	AAV9-spC512-GDEdh					✓	Sacrifice

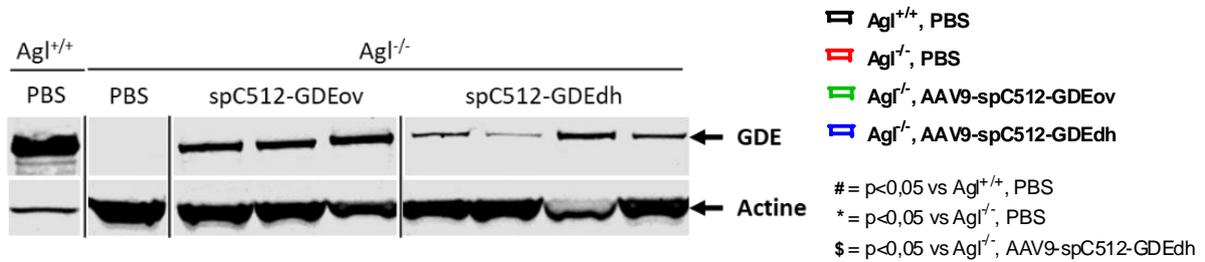
Table 2: protocole in vivo d'injection des vecteurs AAV9-spC512-GDE overlapping ou dual hybrid et interventions

Le vecteur dual hybrid n'a pas permis de corriger l'accumulation du glycogène dans le cœur (Figure 14B), ni la fonction musculaire (Figure 14C), ni la glycémie (Figure 14D).

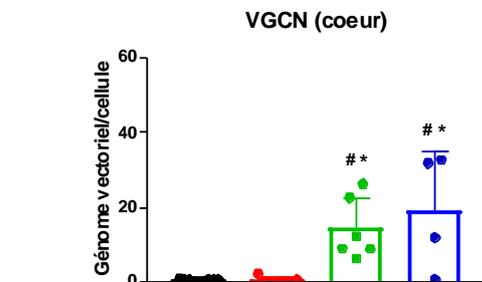
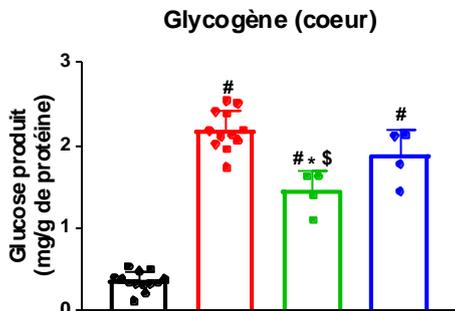
Au contraire, le vecteur overlapping a permis de diminuer l'accumulation du glycogène dans le cœur (Figure 14B). Cette différence s'explique par une quantité de protéine produite plus importante avec la stratégie overlapping qu'avec la stratégie dual hybrid dans GSDIII (Figure 14A).

Le vecteur overlapping a également permis une correction partielle de la glycémie (Figure 14D), sans toutefois corriger le phénotype musculaire (Figure 14C).

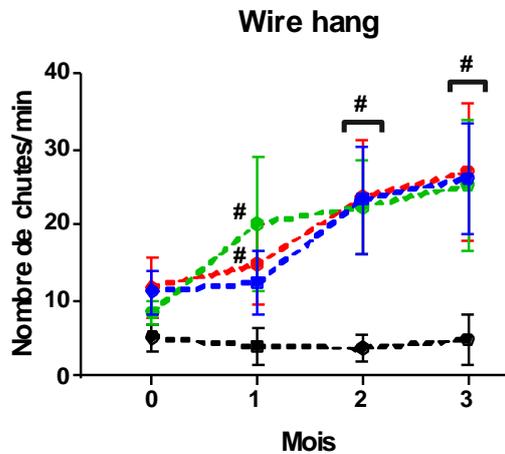
A.



B.



C.



D.

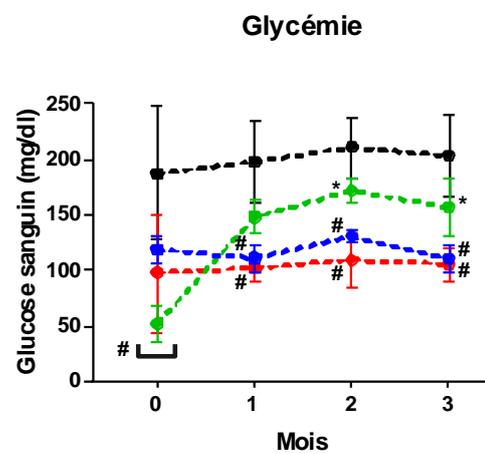


Figure 14: Approche deux vecteurs dans GSDIII

**A.** Etude de l'expression de GDE dans le cœur par western blot, un anticorps anti-actine a été utilisé comme contrôle. **B.** Teneur en glycogène dans le cœur. **C.** Test du wire hang chez les souris GSDIII et contrôles avant et après l'injection des vecteurs AAV. **D.** Glycémie des souris GSDIII et contrôles avant et après l'injection des vecteurs AAV, en l'absence de jeûne. Les significativités ont été déterminées par un ANOVA, #  $p \leq 0,05$ , \*  $p \leq 0,05$ , §  $p \leq 0,05$ , les barres d'erreur représentent la déviation standard.

Dans GSDIII, l'approche overlapping donne une meilleure réponse que la stratégie dual hybrid. Afin d'évaluer cette réponse au niveau musculaire, un nouveau vecteur contenant un promoteur constitutif, CMV, a été produit et injecté selon le même protocole (Table 3).

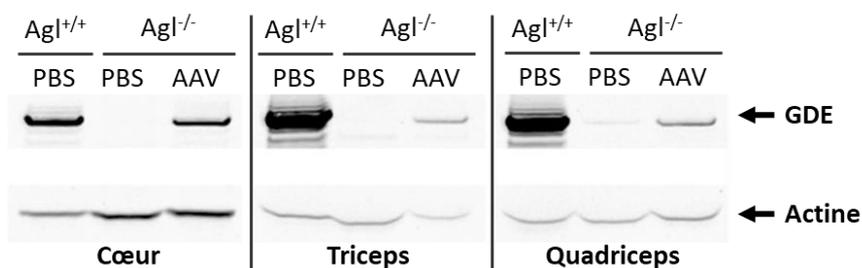
Date	Injection		Mois post-traitement				
	D0		M1		M2		M3
<b>AgI<sup>+/+</sup></b>	PBS	✓	Evaluation fonctionnelle (wire hang)	✓	Evaluation fonctionnelle (wire hang)	✓	Evaluation fonctionnelle (wire hang)
<b>AgI<sup>-/-</sup></b>	PBS						
<b>AgI<sup>-/-</sup></b>	AAV9-CMV-GDEov	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang
						✓	Sacrifice

Table 3: protocole *in vivo* d'injection du vecteur AAV9-CMV-GDE overlapping et interventions

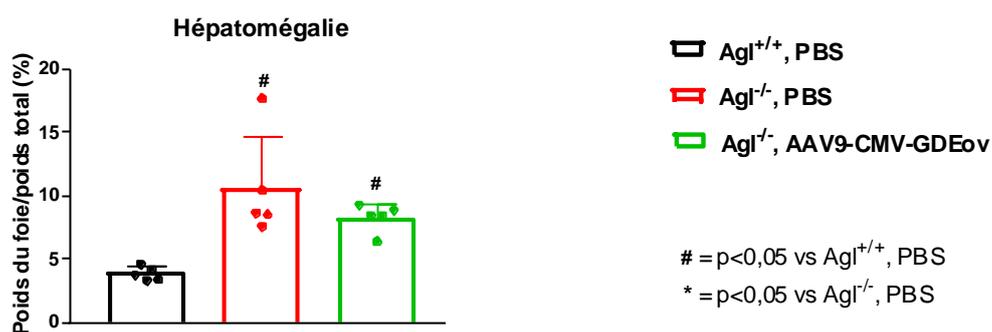
Ce vecteur a permis une expression de la GDE dans le cœur, les triceps, et les quadriceps (Figure 15A). En parallèle, l'accumulation du glycogène est diminuée dans ces tissus (Figure 15C), et le phénotype musculaire est corrigé (Figure 15E).

Cependant, malgré une bonne transduction du foie (Figure 15D), la stratégie CMV-GDEov n'a pas permis de corriger le phénotype hépatique : l'hépatomégalie persiste (Figure 15B), ni la glycémie ni l'accumulation de glycogène dans le foie ne sont corrigées (Figure 15C, E).

**A.**



**B.**



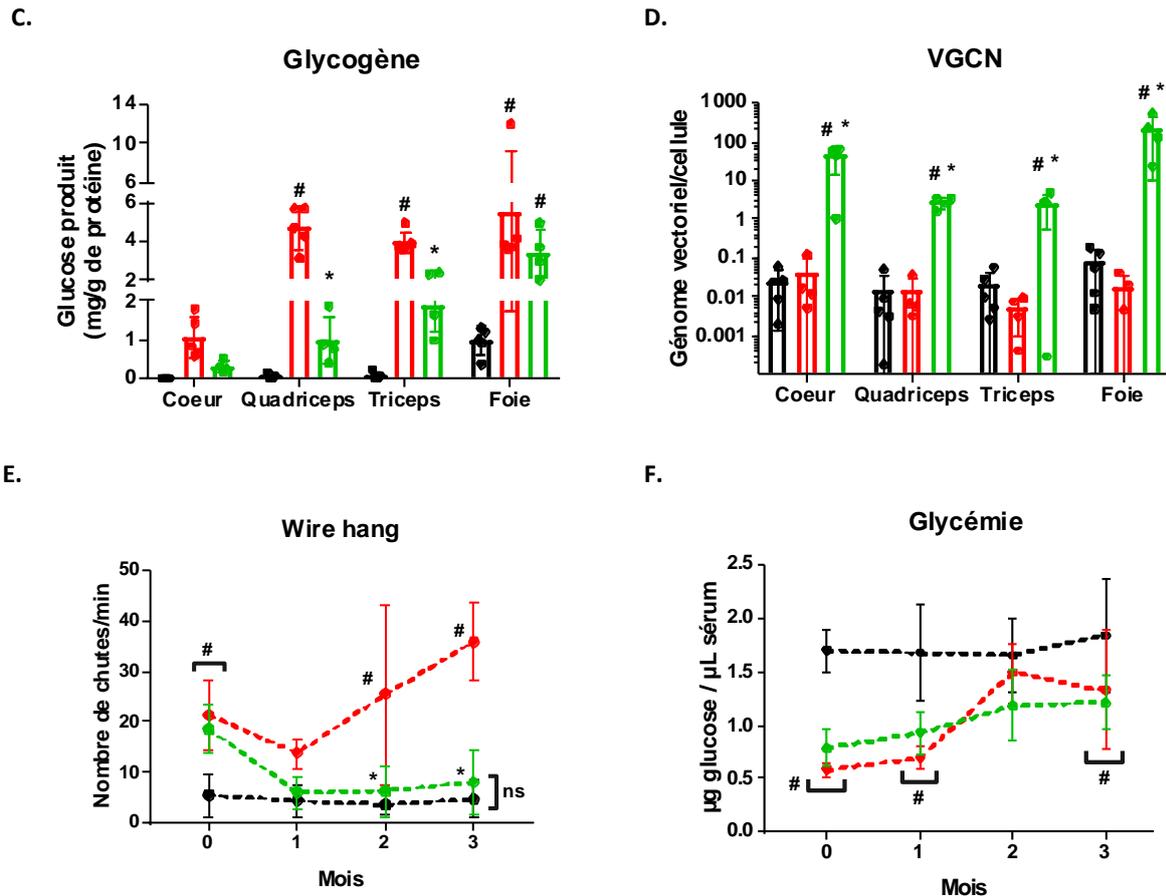


Figure 15: le vecteur AAV9-CMV-GDE overlapping permet une amélioration du phénotype musculaire

A. Etude de l'expression de GDE dans le triceps, le quadriceps, et le cœur par western blot, un anticorps anti-actine a été utilisé comme contrôle. B. Masse du foie, exprimée en pourcentage de la masse corporelle totale. C. Teneur en glycogène dans le foie, le cœur, le triceps et le quadriceps. D. Nombre de copies du génome vectoriel dans le foie. E. Test du wire hang chez les souris GSDIII et contrôles avant et après l'injection du vecteur AAV. F. Glycémie des souris GSDIII et contrôles avant et après l'injection du vecteur AAV, en l'absence de jeûne. Les significativités ont été déterminée par ANOVA, #  $p \leq 0,05$ , \*  $p \leq 0,05$ , les barres d'erreur représentent la déviation standard.

Ces résultats montrent qu'un double vecteur encodant GDE et dont l'expression est conduite par le promoteur CMV est capable de restaurer le phénotype musculaire de souris  $Agl^{-/-}$ , mais pas le phénotype hépatique et ce malgré une forte transduction. Ces résultats laissent penser que, comme cela a déjà été démontré, le promoteur CMV a été inactivé dans le foie<sup>79</sup>.

Afin de vérifier cette hypothèse, une cassette similaire avec un promoteur hAAT (promoteur du gène humain de l' $\alpha$ -1-antitrypsine), spécifique du foie, encapsidé dans un sérotype 8, a été produite et injectée de façon identique aux autres protocoles (Table 4).

Date	Injection		Mois post-traitement				
	D0	M1	M2	M3	M3	M3	
$Agl^{+/+}$	PBS	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang
$Agl^{-/-}$	PBS					✓	Sacrifice
$Agl^{-/-}$	AAV8-hAAT-GDEov						

Table 4: protocole in vivo d'injection du vecteur AAV8-hAAT-GDE overlapping et interventions

Cette stratégie a permis de corriger partiellement la glycémie et l'accumulation de glycogène dans le foie (Figure 16E, C) sans toutefois corriger l'hépatomégalie (Figure 16B). Malgré une bonne efficacité de transduction de toutes les souris injectées par l'AAV (Figure 16D), l'expression de la GDE observée par Western Blot est très variable (5 souris sur 8 expriment GDE) (Figure 16A).

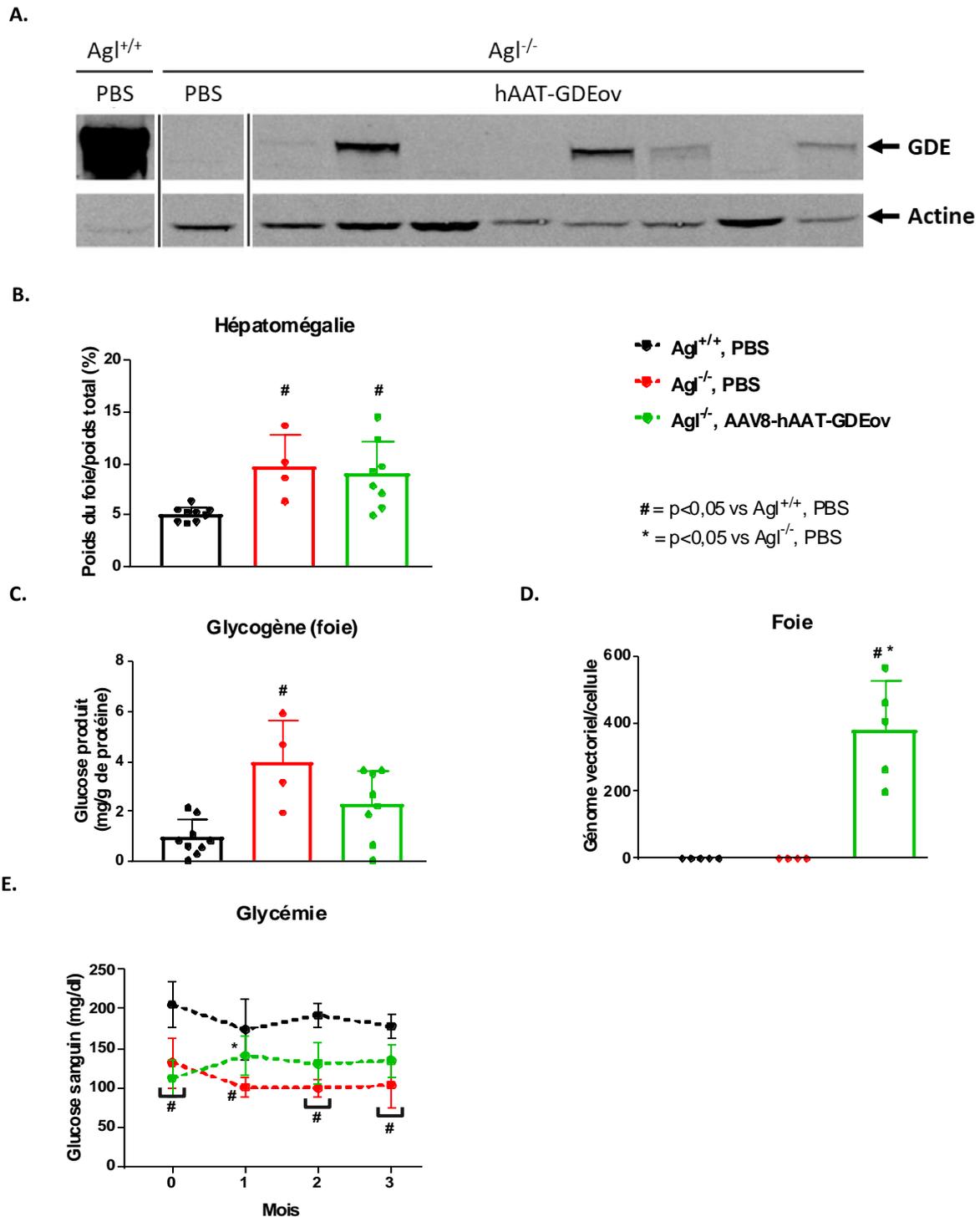


Figure 16: le vecteur AAV8-hAAT-GDE overlapping corrige partiellement le phénotype métabolique

**A.** Etude de l'expression de GDE dans le foie par western blot, un anticorps anti-actine a été utilisé comme contrôle. **B.** Masse du foie, exprimée en pourcentage de la masse corporelle totale. **C.** Teneur en glycogène dans le foie. **D.** Nombre de copies du génome vectoriel dans le foie. **E.** Glycémie des souris GSDIII et contrôles avant et après l'injection du vecteur AAV, en l'absence de jeûne. Les significativités ont été déterminées par ANOVA, #  $p \leq 0,05$ , \*  $p \leq 0,05$ , les barres d'erreur représentent la déviation standard.

Le traitement par un AAV9-CMV-GDEov a permis une correction de la fonction musculaire, tandis que le traitement par un AAV8-hAAT-GDEov a permis une correction partielle du phénotype hépatique. Afin de corriger les deux phénotypes, nous avons testé un promoteur ciblant le foie et les muscles. Le promoteur LiMP associe un enhanceur hépatique (ApoE, enhanceur du gène humain de l'apolipoprotéine E), un promoteur hépatique (hAAT), et un promoteur musculaire (spC512). Son efficacité a été démontrée dans un modèle murin de GSDII<sup>42</sup>.

Nous avons injecté des souris  $Agl^{-/-}$  de 3 mois avec l'AAV9-LiMP-GDEov à une dose totale de  $2 \times 10^{12}$  vg/souris (Table 5).

Date	Injection		Mois post-traitement				
	D0		M1	M2	M3		
$Agl^{+/+}$	PBS	✓	Evaluation fonctionnelle (wire hang)	✓	Evaluation fonctionnelle (wire hang)	✓	Evaluation fonctionnelle (wire hang)
$Agl^{-/-}$	PBS						
$Agl^{-/-}$	AAV9-LiMP-GDEov	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang

Table 5: protocole in vivo d'injection du vecteur AAV9-LiMP-GDE overlapping et interventions

Un mois après injection, ce vecteur permet de corriger la glycémie. A trois mois, cette correction est partielle (Figure 17: le vecteur AAV9-LiMP-GDEov permet une correction du phénotype musculaire A). Le promoteur LiMP permet également d'améliorer la fonction musculaire (Figure 17B).

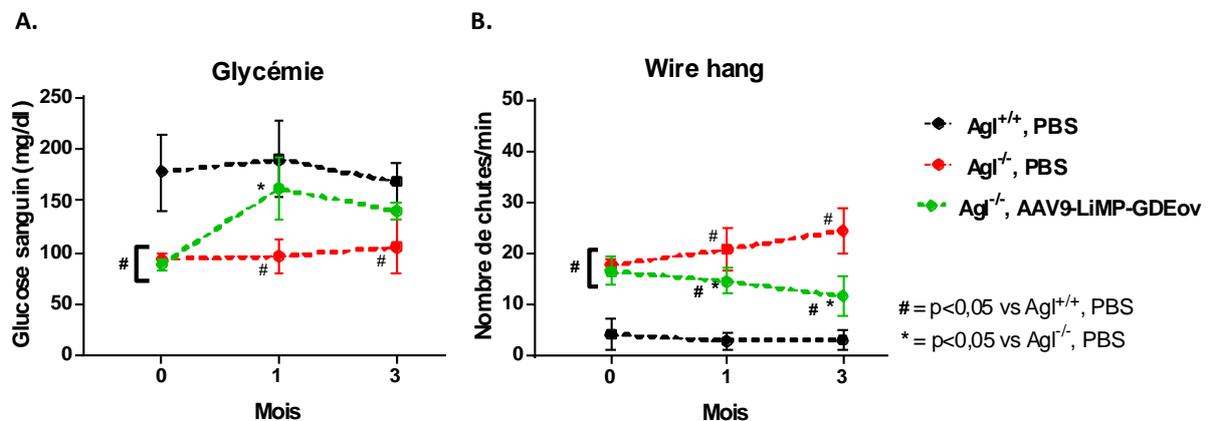


Figure 17: le vecteur AAV9-LiMP-GDEov permet une correction du phénotype musculaire

A. Glycémie des souris GSDIII et contrôles avant et après l'injection du vecteur AAV, en l'absence de jeûne. B. Test du wire hang chez les souris GSDIII et contrôles avant et après l'injection du vecteur AAV. Les significativités ont été déterminée par ANOVA, #  $p \leq 0,05$ , \*  $p \leq 0,05$ , les barres d'erreur représentent la déviation standard.

Contrairement à ce qui est noté dans la plupart des cas, dans GSDIII, la thérapie génique par AAV est efficace au niveau musculaire mais pas au niveau hépatique. Cette particularité pourrait être due aux dommages hépatiques observés dans GSDIII, qui seraient responsables de la moindre efficacité de transduction et/ou d'une perte d'expression du transgène au cours du temps.

## 5) Corriger le phénotype hépatique

De façon similaire à ce qui est observé chez les patients<sup>58,59</sup>, le foie des souris GSDIII est endommagé probablement en raison de l'inflammation due à l'accumulation de glycogène dextrine limite<sup>78</sup>. Les cellules stellaires du foie semblent s'activer en myofibroblastes, et les hépatocytes prolifèrent<sup>78</sup>.

En effet, les marqueurs de fibrose PAI1 et ACTA2 sont augmentés dans les souris GSDIII de trois mois (Figure 18). PAI1, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1, inhibe le clivage du plasminogène en plasmine, sa forme active capable de dégrader certains composants matriciels et d'activer d'autres enzymes dégradant la matrice. L'augmentation de PAI-1 traduit une inhibition de la fibrinolyse, et favorise le développement d'une fibrose dans le foie.

ACTA2, l'actine  $\alpha$  des muscles lisses, est un marqueur des cellules de type myofibroblastes, son augmentation caractérise ainsi une activation des cellules stellaires du foie en myofibroblastes.

La vimentine, VIM, est un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse. Le TGFβ est une cytokine essentielle à la fibrogénèse hépatique. Produite par les cellules de Kupffer, elle augmente la synthèse des collagènes de type I, III, et IV, des protéoglycanes, et de glycoprotéines par les cellules stellaires hépatiques.

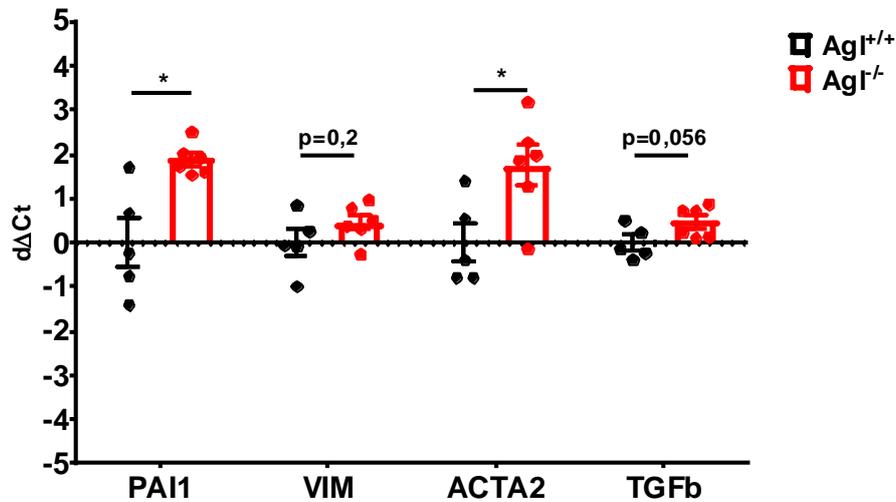


Figure 18: expression transcritomique de marqueurs de fibrose hépatique

Quantification de l'expression des ARNm par RT-qPCR, les expressions ont été normalisées par rapport à un contrôle interne et aux valeurs des souris Agl<sup>+/+</sup>, les significativités ont été déterminées par un student test, \* p < 0,05, les barres d'erreur représentent la déviation standard.

La faible expression du transgène dans le foie pourrait être due à la fibrose, qui limite la transduction des hépatocytes, tandis que la faible persistance d'expression pourrait être due à une dilution des épisomes d'AAV dans les hépatocytes en prolifération.

Afin de vérifier ces hypothèses, des souris Agl<sup>+/+</sup> et Agl<sup>-/-</sup> de 5 mois ont été injectées avec un AAV exprimant le gène humain du facteur de coagulation IX (hFIX) à 1,5 x 10<sup>10</sup> vg/mouse. Le hFIX est ici utilisé comme un gène rapporteur afin d'évaluer deux paramètres : l'efficacité de transduction, et la stabilité de l'expression du transgène, en éliminant l'effet confondant dû à la correction partielle du phénotype par GDE.

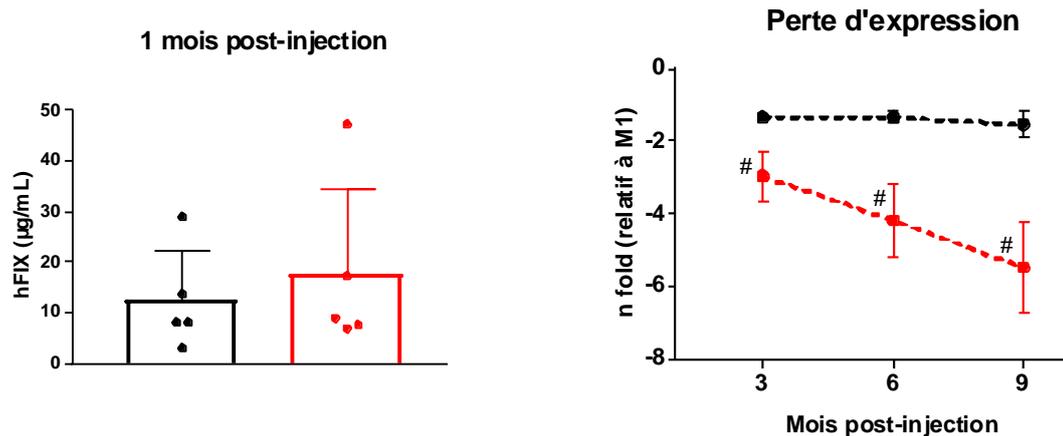
Date	Injection		Mois post-traitement						
	D0	M1	M3	M6	M9	M12	M15		
Agl <sup>+/+</sup>	AAV8-hFIX	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang	✓	Prise de sang
Agl <sup>-/-</sup>	AAV8-hFIX							✓	Sacrifice

Table 6: protocole in vivo d'injection du vecteur AAV8-hAAT-hFIX et interventions

Un mois après l'injection, l'expression du transgène est similaire dans les souris Agl<sup>+/+</sup> et Agl<sup>-/-</sup> (Figure 19A). Cela démontre que la problématique d'expression hépatique du transgène dans GSDIII n'est pas due à un blocage de la transduction, qui serait due à une fibrose comme dans d'autres pathologies<sup>80</sup>.

A.

B.



C.

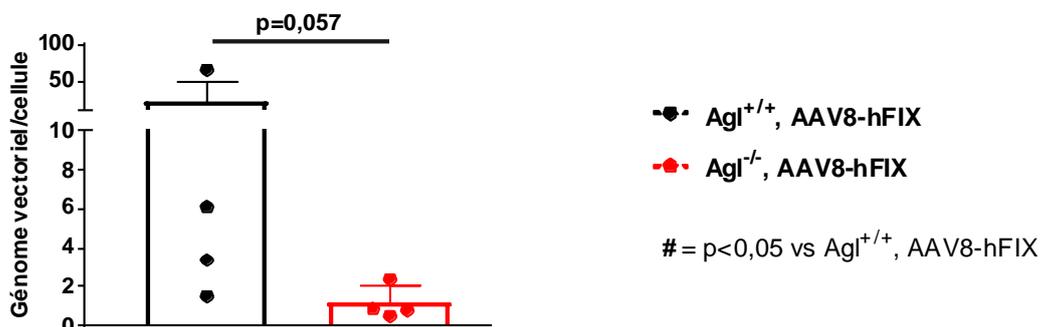


Figure 19: perte d'expression du transgène dans les souris GSDIII avec le temps

A. Expression du facteur IX humain dans le plasma de souris GSDIII 1 mois après l'injection d'AAV. B. Perte d'expression du facteur IX humain dans le plasma de souris GSDIII au cours du temps, par rapport à 1 mois post-injection. C. Nombre de copies du génome vectoriel dans le foie. Les significativités ont été déterminées par ANOVA en A et B, #  $p < 0,05$ , par Mann-Whitney en C, les barres d'erreur représentent la déviation standard.

Cependant, avec le temps, l'expression du transgène diminue (Figure 19A-B) : l'expression est divisée par 5 dans les souris GSDIII, alors qu'elle ne l'est que de 2 dans les souris saines. Cette perte d'expression du transgène dans les souris GSDIII, et la baisse du nombre de copies du génome viral dans les foies de souris atteintes (Figure 19C) démontre une dilution des formes épisomales du vecteur dans un foie en prolifération<sup>78</sup>.

Afin de traiter l'atteinte hépatique dans GSDIII par l'AAV, il est donc nécessaire de stopper, ou du moins freiner, la prolifération avant d'administrer le vecteur.

La rapamycine est une molécule approuvée par les agences du médicament européenne (EMA, agence européenne du médicament) et américaines (FDA, agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) en tant qu'immunosuppresseur pour prévenir le rejet de greffe. Elle inhibe la protéine mTOR1 (complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères), permettant ainsi d'inhiber la prolifération des lymphocytes B qui sont les cellules responsables de la sécrétion des anticorps. Cependant, mTOR est cœur de nombreuses autres voies de signalisation dont la progression dans le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. Un traitement rapamycine a été évalué chez un modèle canin GSDIII : pendant 8 à 16 mois, des doses de 0,5 ou 1 mg/kg/j ont été administrées aux animaux. Ce traitement a permis une réduction et une prévention de l'accumulation de glycogène dans le foie, une prévention de la progression de la fibrose hépatique, et de prévenir l'accumulation de glycogène dans les muscles squelettiques<sup>77</sup>. Dans cet optique, nous avons testé une association thérapeutique d'un pré-traitement avec la rapamycine pour améliorer le phénotype hépatique, suivi d'une administration d'un AAV-GDE pour corriger en une seule injection le foie.

Nous avons traité des souris GSDIII de 5 mois quotidiennement avec de la rapamycine à 1,5mg/kg/j pendant un mois, puis administré  $2 \times 10^{12}$  vg/souris d'AAV9-LiMP-GDEov. Suite à cette injection, le traitement par rapamycine a été continué pendant 14 jours (Table 7).



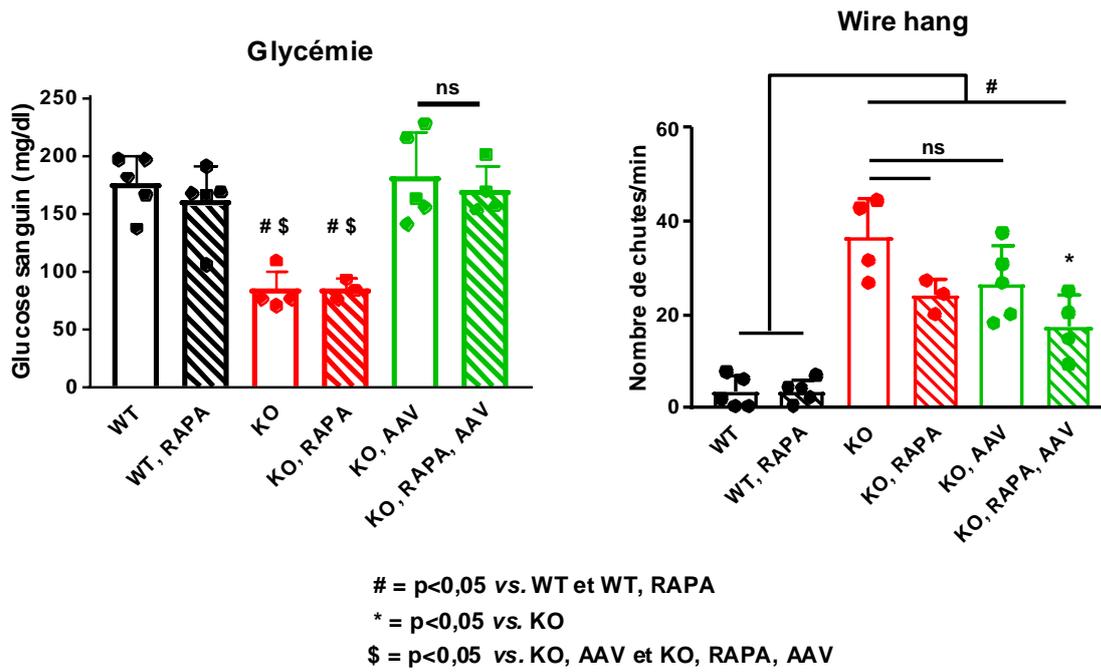


Figure 21: la co-thérapie AAV-rapamycine dans un modèle murin de GSDIII

A. Glycémie des souris GSDIII et contrôles 3 mois après l'injection des vecteurs AAV, en l'absence de jeûne. B. Test du wire hang chez les souris GSDIII et contrôles 3 mois après l'injection des vecteurs AAV. Les significativités ont été déterminée par ANOVA, #  $p \leq 0,05$ , \*  $p \leq 0,05$ , \$  $p \leq 0,05$ , les barres d'erreur représentent la déviation standard.

## IV. CONCLUSION, DISCUSSION

Le potentiel de la thérapie génique pour le traitement de pathologies génétiques est immense. De fait, ces approches n'ont cessé depuis une vingtaine d'années d'être explorées, étudiées et approfondies. Aujourd'hui, des dizaines d'essais cliniques de thérapie génique sont en cours, et plusieurs médicaments ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché, en Europe, aux Etats-Unis, et en Chine.

Dans ce cadre, le vecteur AAV est très intéressant. Il est peu immunogène, et présente l'intérêt de ne pas s'intégrer dans le génome hôte, ce qui évite les insertions aléatoires pouvant activer des oncogènes. Le premier médicament de thérapie génique mis sur le marché a d'ailleurs été un AAV. De plus, les AAV sont à ce jour les vecteurs les plus performants pour cibler le muscle squelettique.

Les thérapies géniques AAV ont d'abord été développées pour des administrations locales, avec des injections intraoculaires, ou intramusculaires. Cependant, ces méthodes d'injection limitent la thérapie génique au tissu cible. Ceci est un avantage dans le cadre des pathologies oculaires, mais dans le cas de pathologies neuromusculaires, c'est un inconvénient majeur car seul un muscle – celui ciblé par l'injection – est traité. Depuis plusieurs années, les approches systémiques utilisant une administration par voie intraveineuse se développent car elles permettent de cibler plusieurs tissus en une seule administration. De plus, l'injection intraveineuse est facilement transposable en clinique.

Néanmoins, cette méthode nécessite de plus fortes doses de vecteurs qu'une administration locale. Or, la fenêtre thérapeutique des AAV est difficile à délimiter entre la dose minimale efficace permettant un effet thérapeutique et la dose maximale efficace qui n'induit pas d'effets indésirables, tels que la réponse immunitaire contre la capsid. La réponse immunitaire anti-capsid est aujourd'hui le défi principal à relever pour permettre la généralisation de la thérapie génique par AAV en tant que plateforme de stratégies thérapeutiques efficaces et sûres.

Un autre défi est celui de la limite d'encapsidation de l'AAV, qui limite les pathologies pouvant être traitées par AAV à celles dont la séquence codante du gène défectueux a une taille inférieure à 5kb. Des stratégies permettant de contourner cette limitation existent et sont efficaces. Elles utilisent deux AAV, chacun encapsidant une partie de la cassette d'expression du transgène, qui seront réunis en une seule séquence dans les cellules transduites. Cela sous-entend que chacun des deux AAV doit transduire la même cellule. Par ailleurs, cela nécessite la fabrication de deux produits de thérapie génique, ce qui est un frein au développement clinique de ces approches.

L'AAV injecté par voie veineuse transduit très efficacement le foie. De nombreuses études précliniques chez différents modèles animaux, et des études cliniques chez l'homme ont été conduites en utilisant cette stratégie. Cibler le foie avec un AAV présente un avantage considérable qui est celui de la tolérisation du transgène introduit. C'est donc aujourd'hui une approche privilégiée pour la thérapie génique par AAV. Cependant, dans des pathologies hépatiques où le foie est lésé et son architecture tissulaire modifiée, cette approche est compliquée car le foie est peu transduit. La transduction par AAV des foies en croissance, ou en prolifération, est également peu efficace. En effet, l'AAV ne s'intégrant que très peu dans le génome de l'hôte, les épisomes d'AAV sont dilués au cours des divisions cellulaires, ce qui conduit à la perte d'expression du transgène.

La thérapie génique par AAV rencontre aujourd'hui les principales limites décrites ci-dessus : (i) la réponse immunitaire anti-capsid, (ii) la capacité d'encapsidation de l'AAV, (iii) la transduction d'un foie lésé et/ou en prolifération, (iv) une transduction multi-tissulaire.

Dans ce contexte, la GSDIII est une pathologie intéressante. En effet, dans la GSDIII, plusieurs organes sont affectés : les muscles squelettiques, le cœur, le foie. De plus, la pathologie hépatique se manifeste par une fibrose, pouvant conduire à une cirrhose et au développement de carcinomes hépatocellulaires. Enfin, la protéine déficiente dans la GSDIII, GDE, est codée par le gène *Agl* dont la séquence codante atteint la limite d'encapsidation de l'AAV. Ainsi, la GSDIII permet d'étudier les limites de la thérapie génique (ii), (iii) et (iv).

Afin de traiter la GSDIII par AAV, nous avons mis au point deux stratégies utilisant chacun deux vecteurs AAV afin de contourner la capacité d'encapsulation de l'AAV. Une première stratégie, la stratégie dual hybrid, repose sur la recombinaison d'une séquence exogène introduite à l'extrémité de chaque AAV ou des ITRs. Nous avons évalué cette stratégie dans un modèle murin de GSDIII. Cependant, les niveaux d'expression protéiques observés avec cette approche étaient plus faibles que ceux observés avec l'overlapping. La correction de la glycémie et de l'accumulation du glycogène dans les muscles est également meilleure avec la stratégie overlapping. Ceci est en accord avec d'autres études comparant les stratégies overlapping et dual hybrid dans les muscles. Dans l'overlapping, chaque séquence encapsidée dans deux AAV différents comporte une région d'homologie qui fait partie de la séquence codante du gène que l'on souhaite réintroduire. L'association de cette stratégie avec un promoteur constitutif efficace dans les muscles (CMV) a permis une correction de la fonction musculaire, une correction de l'accumulation de glycogène dans les muscles squelettiques, corrélée à une expression protéique visible dans ces tissus et une bonne efficacité de transduction. Néanmoins, cette stratégie n'a pas permis de corriger le phénotype hépatique, tant au niveau de la glycémie, de l'accumulation de glycogène, que de l'hépatomégalie, alors que le foie a été transduit efficacement. Cette faible expression pourrait être due à l'inactivation hépatique du promoteur utilisé.

Nous avons donc développé une stratégie qui a permis de transduire efficacement le foie dans d'autres pathologies, en utilisant une capsid d'AAV et un sérotype qui permettent de cibler spécifiquement le foie (AAV8, hAAT). Effectivement, cette stratégie a permis une meilleure correction de la glycémie, et une correction de l'accumulation de glycogène dans le foie. Mais ces résultats restent inférieurs aux résultats attendus, car la transduction du foie par cette approche est normalement très efficace. Notamment, la correction de la glycémie n'est que partielle.

Afin de corriger la GSDIII, il est nécessaire de traiter le foie et les muscles. La stratégie CMV-GDE overlapping nous a apporté la preuve de concept de la correction musculaire, tandis que la stratégie hAAT-GDE overlapping a montré une correction partielle du phénotype hépatique. Afin de cibler les deux tissus affectés, nous avons développé une stratégie associant un promoteur musculaire et un promoteur hépatique (LiMP) qui permet de corriger partiellement la glycémie et la fonction musculaire. Le promoteur LiMP est celui qui nous a permis d'obtenir les meilleurs résultats à la fois au niveau hépatique et musculaire.

Dans GSDIII, quel que soit le promoteur utilisé, la correction de la glycémie est partielle alors que nous traitons le muscle. Or, le transfert de gène dans le foie est habituellement l'une des stratégies la plus « simple » et la plus efficace dans le domaine de la thérapie génique actuelle. Ce paradoxe nous a amené à caractériser l'efficacité de transduction des foies de notre modèle murin GSDIII.

Dans GSDIII, l'inflammation due à l'accumulation de glycogène dextrine limite conduit à l'activation des cellules stellaires hépatiques, qui se transforment en myofibroblastes et conduisent à une fibrose, et à l'activation des hépatocytes qui prolifèrent et conduisent au développement de carcinomes hépatocellulaires. Afin d'évaluer l'efficacité de transduction des foies GSDIII, et la persistance d'expression du transgène au cours du temps, nous avons injecté des souris saines et des souris GSDIII avec le gène du facteur IX humain, utilisé ici comme gène rapporteur. Un mois après l'injection, au pic d'expression, l'expression du facteur IX était similaire entre les deux groupes de souris. Cela signifie que les foies de souris GSDIII peuvent être transduits efficacement, malgré le développement d'une fibrose. Cependant, avec le temps, l'expression du facteur IX diminue drastiquement chez les souris GSDIII, ce qui n'est pas le cas chez les souris saines. La perte d'expression du transgène observée chez les souris GSDIII est 5 fois supérieure à celle observée dans les souris saines. Cette perte d'expression s'explique par la prolifération des hépatocytes, et la dilution des épisomes d'AAV. Ce phénomène est connu, et caractérisé dans les souris jeunes dont le foie est en pleine croissance.

Afin d'obtenir de bons résultats avec la thérapie génique par AAV dans les foies GSDIII, il est donc nécessaire de diminuer, si ce n'est stopper, la prolifération hépatocytaire. Pour ce faire, la seule thérapie génique par AAV n'est pas une solution envisageable. Cette option thérapeutique doit être accompagnée de traitements au préalable, permettant de diminuer la prolifération des hépatocytes GSDIII et prévenir la dilution du vecteur.

La rapamycine est une molécule autorisée par les agences européenne et américaine des médicaments, en tant qu'immunosuppresseur, et dont des analogues sont prescrits pour le traitement du carcinome rénal. Dans notre

modèle murin GSDIII, le traitement d'un mois par rapamycine uniquement à 1,5 mg/kg/j n'a pas permis d'améliorer la fonction musculaire ni de corriger la glycémie. Un mois après le début du traitement par rapamycine, nous avons injecté un AAV overlapping et poursuivi le traitement rapamycine pendant 15 jours supplémentaires. Dans les deux groupes traités par AAV (contrôle et rapamycine), la glycémie est entièrement corrigée. Au niveau musculaire, le traitement par AAV seul n'a apporté aucun bénéfice, au contraire, l'association rapamycine-AAV a permis d'améliorer le phénotype avec une meilleure correction du wire hang. Cette association thérapeutique semble une approche intéressante pour traiter la GSDIII. Le mécanisme d'action de la rapamycine dans les muscles reste à caractériser : la rapamycine agit-elle en augmentant l'inféctivité de l'AAV, ou par exemple en améliorant le métabolisme musculaire dans GSDIII ce qui permet une meilleure expression du transgène ?

D'autres stratégies associant un pré-traitement pour normaliser le foie avant d'administrer une thérapie AAV sont envisageables. Alors que le mécanisme d'action de la rapamycine dans GSDIII n'est pas caractérisé, on peut envisager d'agir directement sur la cause de la prolifération des hépatocytes GSDIII : l'accumulation de glycogène.

Tout d'abord, une thérapie par ARNm exprimant la GDE permettrait de diminuer le glycogène de type dextrine limite dans le foie, permettant ainsi de normaliser les hépatocytes et leur organisation tissulaire avant d'administrer un AAV. Cette approche présente l'avantage de palier directement au déficit en GDE, et donc traiter directement la cause de la maladie. Cependant, la GDE ne permet de libérer que 4 résidus glucosidiques sur une branche  $\alpha$ -1,6 de glycogène. Afin de diminuer efficacement la quantité de glycogène accumulé, inhiber la glycogène synthase semble une stratégie plus efficace. Des siRNA anti-glycogène synthase ont été évalués dans un modèle murin de la GSDIII. Ils ont permis une diminution de l'accumulation de glycogène, une normalisation de l'histologie des foies et la prévention du développement tumoral. Les siRNA anti-glycogène synthase constituent une option thérapeutique intéressante pour traiter les foies GSDIII.

Ces deux thérapies sont intéressantes pour traiter les foies GSDIII, mais elles nécessitent une ré-administration régulière (tous les 15 jours en moyenne). De plus, elles ne permettent pas de traiter les muscles. Ces thérapies pourraient donc être mises à profit en tant que pré-traitement des foies GSDIII, au préalable d'une administration unique d'AAV qui permettrait de corriger le phénotype hépatique et musculaire.

D'autres molécules anti-prolifératives, ou anti-fibrotiques, peuvent être envisagées dans ce type de stratégie.

Enfin, une approche intégrative permettrait une expression à long terme, sans dilution des épisomes dans les hépatocytes en prolifération. Les lentivirus sont des vecteurs s'intégrant dans le génome de leur hôte. Dans le cadre de la GSDIII, les lentivirus présentent également l'avantage indéniable de pouvoir vectoriser des inserts allant jusqu'à 10kb. Aujourd'hui, les analyses des sites d'intégrations du lentivirus montrent que ce vecteur est de plus en plus sûr. Néanmoins, il reste encore des barrières quant à l'administration des lentivirus *in vivo*, notamment pour cibler les muscles, comme dans GSDIII.

En conclusion, l'association thérapeutique rapamycine et AAV-LiMP-GDE semble prometteuse pour traiter le foie et les muscles dans GSDIII.

## V. BIBLIOGRAPHIE

1. Furger, A., Binnie, J. M. O., Alexandra, Lee, B. A. & Proudfoot, N. J. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* **16**, 2792–2799 (2002).
2. Flotte, T. R. & Berns, K. I. Adeno-Associated Virus: A Ubiquitous Commensal of Mammals. *Hum. Gene Ther.* **16**, 401–407 (2005).
3. Hermonat, P. L., Labow, M. A., Wright, R., Berns, K. I. & Muzyczka, N. Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J. Virol.* **51**, 329–339 (1984).
4. Mah, C. S. *et al.* Adeno-Associated Virus–Mediated Gene Therapy for Metabolic Myopathy. *Hum. Gene Ther.* **24**, 928–936 (2013).
5. Boutin, S. *et al.* Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum. Gene Ther.* **21**, 704–712 (2010).
6. Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J. & Wilson, J. M. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J. Infect. Dis.* **199**, 381–390 (2009).
7. Srivastava, A., Lusby, E. W. & Berns, K. I. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* **45**, 555–564 (1983).
8. Cassinotti, P., Weitzand, M. & Tratschin, J. D. Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein. *Virology* **167**, 176–184 (1988).
9. Tratschin, J. D., Miller, I. L. & Carter, B. J. Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J. Virol.* **51**, 611–619 (1984).

10. Yan, Z., Zak, R., Zhang, Y. & Engelhardt, J. F. Inverted Terminal Repeat Sequences Are Important for Intermolecular Recombination and Circularization of Adeno-Associated Virus Genomes. *J. Virol.* **79**, 364–379 (2005).
11. Surosky, R. T. *et al.* Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J. Virol.* **71**, 7951–7959 (1997).
12. Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 11288–11294 (1996).
13. Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R., Kotin, R. M. & Owens, R. A. 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**, 5808–5812 (1994).
14. Daya, S. & Berns, K. I. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 583–593 (2008).
15. Kotin, R. M. *et al.* Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2211–2215 (1990).
16. Kotin, R. M., Linden, R. M. & Berns, K. I. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* **11**, 5071–5078 (1992).
17. Straus, S. E., Sebring, E. D. & Rose, J. A. Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 742–746 (1976).
18. Duan, D. *et al.* Circular Intermediates of Recombinant Adeno-Associated Virus Have Defined Structural Characteristics Responsible for Long-Term Episomal Persistence in Muscle Tissue. *J. Virol.* **72**, 8568–8577 (1998).
19. Duan, D., Yan, Z., Yue, Y. & Engelhardt, J. F. Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates. *Virology* **261**, 8–14 (1999).

20. Srivastava, A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* **21**, 75–80 (2016).
21. Ashkar, A. A. & Rosenthal, K. L. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr. Mol. Med.* **2**, 545–556 (2002).
22. Manno, C. S. *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* **12**, 342–347 (2006).
23. Mingozzi, F. *et al.* CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* **13**, 419–422 (2007).
24. Nathwani, A. C. *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2357–2365 (2011).
25. Nathwani, A. C. *et al.* Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1994–2004 (2014).
26. Li, Y. *et al.* Bat adeno-associated viruses as gene therapy vectors with the potential to evade human neutralizing antibodies. *Gene Ther.* (2019). doi:10.1038/s41434-019-0081-8
27. Büning, H. & Srivastava, A. Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **12**, 248–265 (2019).
28. Chamberlain, K., Riyad, J. M. & Weber, T. Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Hum. Gene Ther. Methods* **27**, 1–12 (2016).
29. Sun, L., Li, J. & Xiao, X. Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat. Med.* **6**, 599–602 (2000).
30. Ghosh, A., Yue, Y., Lai, Y. & Duan, D. A Hybrid Vector System Expands Adeno-associated Viral Vector Packaging Capacity in a Transgene-independent Manner. *Mol. Ther.* **16**, 124–130 (2008).
31. Trapani, I. *et al.* Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol. Med.* **6**, 194–211 (2014).
32. Lostal, W. *et al.* Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1897–1907 (2010).

- 33.Sondergaard, P. C. *et al.* AAV.Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2**, 256–270 (2015).
- 34.Halbert, C. L., Allen, J. M. & Miller, A. D. Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene. *Nat. Biotechnol.* **20**, 697–701 (2002).
- 35.Flotte, T. R. *et al.* Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J. Biol. Chem.* **268**, 3781–3790 (1993).
- 36.Ghosh, A., Yue, Y. & Duan, D. Viral serotype and the transgene sequence influence overlapping adeno-associated viral (AAV) vector-mediated gene transfer in skeletal muscle. *J. Gene Med.* **8**, 298–305 (2006).
- 37.Chen, Y. H., Keiser, M. S. & Davidson, B. L. Adeno-Associated Virus Production, Purification, and Titering. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **8**, e56 (2018).
- 38.Grieger, J. C. & Samulski, R. J. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **99**, 119–145 (2005).
- 39.Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **6**, 425–456 (2011).
- 40.Collaud, F. *et al.* Preclinical Development of an AAV8-hUGT1A1 Vector for the Treatment of Crigler-Najjar Syndrome. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **12**, 157–174 (2019).
- 41.Demaster, A. *et al.* Long-term efficacy following readministration of an adeno-associated virus vector in dogs with glycogen storage disease type Ia. *Hum. Gene Ther.* **23**, 407–418 (2012).
- 42.Colella, P. *et al.* AAV Gene Transfer with Tandem Promoter Design Prevents Anti-transgene Immunity and Provides Persistent Efficacy in Neonate Pompe Mice. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **12**, 85–101 (2019).
- 43.Jiang, H. *et al.* Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **14**, 452–455 (2006).

44. Kay, M. A. *et al.* Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* **24**, 257 (2000).
45. Lee, Y. M. *et al.* Long-term safety and efficacy of AAV gene therapy in the canine model of glycogen storage disease type Ia. *J. Inherit. Metab. Dis.* **41**, 977–984 (2018).
46. Puzzo, F. *et al.* Rescue of Pompe disease in mice by AAV-mediated liver delivery of secretable acid  $\alpha$ -glucosidase. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
47. Sabatino, D. E. *et al.* Efficacy and Safety of Long-term Prophylaxis in Severe Hemophilia A Dogs Following Liver Gene Therapy Using AAV Vectors. *Mol. Ther.* **19**, 442–449 (2011).
48. Calne, R. Y. *et al.* Induction of Immunological Tolerance by Porcine Liver Allografts. *Nature* **223**, 472 (1969).
49. Houssin, D. *et al.* Specific transplantation tolerance induced by spontaneously tolerated liver allograft in inbred strains of rats. *Transplantation* **29**, 418–419 (1980).
50. Opelz, G., Wujciak, T., Döhler, B., Scherer, S. & Mytilineos, J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev. Immunogenet.* **1**, 334–342 (1999).
51. Rasmussen, A., Davies, H. F., Jamieson, N. V., Evans, D. B. & Calne, R. Y. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation* **59**, 919–921 (1995).
52. Dobrzynski, E. Induction of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell anergy and deletion by in vivo viral gene transfer. *Blood* **104**, 969–977 (2004).
53. Cao, O. *et al.* Induction and role of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood* **110**, 1132–1140 (2007).
54. Wang, L. *et al.* In Vivo Gene Transfer Strategies to Achieve Partial Correction of von Willebrand Disease. *Hum. Gene Ther.* **23**, 576–588 (2012).
55. Vidal, P. *et al.* Rescue of GSDIII Phenotype with Gene Transfer Requires Liver- and Muscle-Targeted GDE Expression. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **26**, 890–901 (2018).

56. Di Mauro, S. Muscle glycogenoses: an overview. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* **26**, 35–41 (2007).
57. Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C. & Ameneiros-Rodríguez, E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* **5**, 85–100 (2016).
58. Sentner, C. P. *et al.* Glycogen storage disease type III: diagnosis, genotype, management, clinical course and outcome. *J. Inherit. Metab. Dis.* **39**, 697–704 (2016).
59. Kishnani, P. S. *et al.* Glycogen storage disease type III diagnosis and management guidelines. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **12**, 446–463 (2010).
60. Labrune, P., Trioche, P., Duvaltier, I., Chevalier, P. & Odièvre, M. Hepatocellular adenomas in glycogen storage disease type I and III: a series of 43 patients and review of the literature. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **24**, 276–279 (1997).
61. Yang-Feng, T. L. *et al.* Assignment of the human glycogen debrancher gene to chromosome 1p21. *Genomics* **13**, 931–934 (1992).
62. Korlimarla, A., Austin, S., Sun, B. & Kishnani, P. Hepatic Manifestations in Glycogen Storage Disease Type III. *Curr. Pathobiol. Rep.* **6**, 233–240 (2018).
63. Okubo, M., Aoyama, Y. & Murase, T. A Novel Donor Splice Site Mutation in the Glycogen Debranching Enzyme Gene Is Associated with Glycogen Storage Disease Type III. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 493–499 (1996).
64. Endo, Y. *et al.* Molecular analysis of the AGL gene: heterogeneity of mutations in patients with glycogen storage disease type III from Germany, Canada, Afghanistan, Iran, and Turkey. *J. Hum. Genet.* **51**, 958–963 (2006).
65. Cheng, A., Zhang, M., Okubo, M., Omichi, K. & Saltiel, A. R. Distinct mutations in the glycogen debranching enzyme found in glycogen storage disease type III lead to impairment in diverse cellular functions. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2045–2052 (2009).

66. Shaiu, W.-L., Kishnani, P. S., Shen, J., Liu, H.-M. & Chen, Y.-T. Genotype-Phenotype Correlation in Two Frequent Mutations and Mutation Update in Type III Glycogen Storage Disease. *Mol. Genet. Metab.* **69**, 16–23 (2000).
67. Shen, J. *et al.* Mutations in exon 3 of the glycogen debranching enzyme gene are associated with glycogen storage disease type III that is differentially expressed in liver and muscle. *J. Clin. Invest.* **98**, 352–357 (1996).
68. Zhai, L., Feng, L., Xia, L., Yin, H. & Xiang, S. Crystal structure of glycogen debranching enzyme and insights into its catalysis and disease-causing mutations. *Nat. Commun.* **7**, 11229 (2016).
69. Azael Meza, A., Ayub, M., Cantú, J. M. & Flores, J. Diet therapy in severe clinical expression of debrancher deficiency. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* **22**, 285–288 (1991).
70. Mayorandan, S., Meyer, U., Hartmann, H. & Das, A. M. Glycogen storage disease type III: modified Atkins diet improves myopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 196 (2014).
71. Sentner, C. P., Caliskan, K., Vletter, W. B. & Smit, G. P. A. Heart Failure Due to Severe Hypertrophic Cardiomyopathy Reversed by Low Calorie, High Protein Dietary Adjustments in a Glycogen Storage Disease Type IIIa Patient. *JIMD Rep.* **5**, 13–16 (2012).
72. Brambilla, A. *et al.* Improvement of Cardiomyopathy After High-Fat Diet in Two Siblings with Glycogen Storage Disease Type III. *JIMD Rep.* **17**, 91–95 (2014).
73. Valayannopoulos, V. *et al.* Successful treatment of severe cardiomyopathy in glycogen storage disease type III With D,L-3-hydroxybutyrate, ketogenic and high-protein diet. *Pediatr. Res.* **70**, 638–641 (2011).
74. Dagli, A. I. *et al.* Reversal of glycogen storage disease type IIIa-related cardiomyopathy with modification of diet. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 103–106 (2009).
75. Dong, J. Y., Fan, P. D. & Frizzell, R. A. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* **7**, 2101–2112 (1996).
76. Wu, Z., Yang, H. & Colosi, P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **18**, 80–86 (2010).

77. Yi, H. *et al.* Correction of glycogen storage disease type III with rapamycin in a canine model. *J. Mol. Med.* **92**, 641–650 (2014).
78. Pursell, N. *et al.* Inhibition of Glycogen Synthase II with RNAi Prevents Liver Injury in Mouse Models of Glycogen Storage Diseases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **26**, 1771–1782 (2018).
79. Löser, P., Jennings, G. S., Strauss, M. & Sandig, V. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J. Virol.* **72**, 180–190 (1998).
80. Siew, S. M. *et al.* Prevention of cholestatic liver disease and reduced tumorigenicity in a murine model of PFIC type 3 using hybrid AAV-piggyBac gene therapy. *Hepatology* (2019). doi:10.1002/hep.30773

## SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

**RESUME: LES VECTEURS ADENO-ASSOCIES POUR LE TRANSFERT DE GENE DANS LES MALADIES METABOLIQUES : EXEMPLE DE LA GLYCOGENOSE DE TYPE III**

Les virus adéno-associés (AAV) sont des vecteurs prometteurs pour la thérapie génique. Ils permettent de cibler notamment le foie et les muscles. Cibler le foie est l'une des stratégies les plus simple en thérapie génique par AAV, car il est hautement vascularisé. Une expression hépatique du transgène permet de plus une tolérance de l'organisme face à ce transgène réintroduit. Cependant, il existe encore des limites à surmonter avant de pouvoir établir une plateforme de thérapie génique par AAV : (i) la réponse immunitaire anti-capside, (ii) la capacité d'encapsidation du vecteur, (iii) le défi de cibler plusieurs tissus cibles, (iv) la perte d'expression du vecteur dans un foie en prolifération. La glycogénose de type III (GSDIII) est une maladie métabolique et génétique rare dont la physiopathologie en fait un excellent modèle pour étudier les limites de la thérapie génique par AAV. En effet, le foie et les muscles des patients sont affectés dans cette maladie. Plus précisément, l'atteinte hépatique dans GSDIII conduit à une fibrose, à une prolifération hépatocytaire, et au développement de carcinomes hépatocellulaires. En parallèle, une myopathie progressive s'installe. De plus, la taille du gène codant pour l'enzyme déficitaire dans GSDIII atteint presque la limite d'encapsidation de l'AAV, ce qui oblige à trouver des solutions pour augmenter cette capacité.

Nous avons développé un modèle murin de GSDIII, reproduisant les caractéristiques observées chez les patients. Dans cette étude, nous avons développé des stratégies mettant en jeu des AAV afin de répondre aux défis thérapeutiques que cette pathologie pose. Pour ce faire, nous avons développé des vecteurs AAV dual, overlapping et dual hybrid, qui ont permis de corriger le phénotype musculaire, mais seulement partiellement le phénotype métabolique.

---

**SUMMARY: GENE TRANSFER WITH ADENO-ASSOCIATED VIRUS FOR METABOLIC DISEASES: THE EXAMPLE OF GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE III**

Adeno-associated virus (AAV) are promising gene therapy vectors. They allow liver- or/and muscle-targeted gene transfer. Liver-targeting AAV gene therapy is among the simplest strategy, because the liver is highly vascularized hence easily reachable. Moreover, hepatic expression of a transgene induce its immune tolerance. Nevertheless, there are still some great challenges to overcome for AAV gene therapy: (i) anti-capsid immune response, (ii) the size-limited AAV's encapsidating capacity, (iii) multi-tissues targeting, (iv) the loss of expression in a growing/proliferative liver. Glycogen storage disease type III (GSDIII) is a rare metabolic and genetic disease. Its pathophysiology turns it into an excellent disease model to study AAV gene transfer limitations. Indeed, liver and muscles are affected in GSDIII. More specifically, the liver impairment in GSDIII leads to fibrosis, to hepatocytes proliferation, and to hepatocellular carcinomas development. Meanwhile, muscular progressive weakness appears and worsen with aging. In addition, the size of the gene coding for the enzyme lacking in GSDIII reaches almost the AAV encapsidation capacity, which oblige to develop strategies to increase the encapsidation capacity.

We developed a murine model of GSDIII that recapitulates the human phenotype observed in patients. In this study, we developed strategies based on AAV to overcome the therapeutic challenges associated with GSDIII. To do so, we developed dual AAV vectors approaches, the overlapping and the dual hybrid system, that allowed rescue of the muscular phenotype, but only a partial correction of the metabolic features.

---

**DISCIPLINE:** Pharmacie, biologie

---

**MOTS-CLES:** AAV, foie, fibrose, prolifération, glycogénose de type III, overlapping, associations thérapeutiques

---