



UNIVERSITÉ PARIS VII DENIS DIDEROT

École doctorale Biologie et Biotechnologie

*Thérapeutiques Biotechnologiques*

DEVELOPPEMENT  
DE VECTEURS LENTIVIRAUX NON-INTEGRATIFS  
EN VUE DU TRANSFERT DE GENES  
DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Présentée par Stéphanie PHILIPPE

Le 23 Octobre 2007

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris 7

Composition du jury :

Ali SAÏB	Président du jury
Ignacio ANEGON	Rapporteur
François-Loïc COSSET	Rapporteur
Salima HACEIN-BEY ABINA	Examineur
Jacques MALLET	Directeur de thèse



UNIVERSITÉ PARIS VII DENIS DIDEROT

École doctorale Biologie et Biotechnologie

*Thérapeutiques Biotechnologiques*

DEVELOPPEMENT  
DE VECTEURS LENTIVIRAUX NON-INTEGRATIFS  
EN VUE DU TRANSFERT DE GENES  
DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Présentée par Stéphanie PHILIPPE

Le 23 Octobre 2007

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris 7

Composition du jury :

Ali SAÏB	Président du jury
Ignacio ANEGON	Rapporteur
François-Loïc COSSET	Rapporteur
Salima HACEIN-BEY ABINA	Examineur
Jacques MALLET	Directeur de thèse

---

# SOMMAIRE

---

SOMMAIRE .....	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
REMERCIEMENTS.....	13
AVANT-PROPOS .....	14
INTRODUCTION .....	16
1. TRANSFERT DE GENE, VECTEURS RETROVIRAUX ET GENOTOXICITE ..	18
1.1. Les vecteurs rétroviraux .....	18
1.1.1. Quelques données sur les rétrovirus et les pathologies qui leur sont associées.....	18
1.1.1.1. Description .....	18
1.1.1.2. Les rétrovirus oncogènes .....	20
1.1.1.3. Les lentivirus .....	20
1.1.2. Caractéristiques des vecteurs rétroviraux.....	21
1.1.2.1. Transduction et cycle cellulaire .....	21
1.1.2.2. Réaction immunitaire .....	24
1.1.2.2.1. Réaction immunitaire innée.....	25
1.1.2.2.2. Réaction immunitaire acquise .....	26
1.1.2.3. Tropisme .....	27
1.1.3. Applications et perspectives .....	29
1.2. Mise en évidence du risque de génotoxicité .....	30
1.2.1. Essais de thérapie génique du déficit immunitaire sévère lié à l’X de type 1 .....	31
1.2.2. Essai de thérapie génique de la maladie granulomateuse chronique .....	34
1.2.3. Essais de thérapie génique de la déficience en adénosine déaminase .....	35
1.3. Réévaluation du risque de génotoxicité.....	36
1.3.1. Étude de la répartition des sites d’intégration.....	37
1.3.1.1. Les techniques d’analyse des sites d’intégration .....	37
1.3.1.2. Les résultats .....	38
1.3.1.2.1. Résultats généraux.....	38

---

1.3.1.2.2. Hot spots ? .....	39
1.3.1.2.3. Capture de promoteur .....	39
1.3.1.2.4. Influence de l'enveloppe .....	40
1.3.1.2.5. Mécanismes viraux de sélection des sites d'intégration .....	40
1.3.2. Autres facteurs de risque .....	41
1.3.2.1. Les modèles d'étude .....	41
1.3.2.2. Cas particulier du traitement X1-SCID .....	42
1.3.2.3. Les vecteurs dérivés de rétrovirus oncogènes .....	43
1.3.2.4. Les vecteurs dérivés de lentivirus .....	46
1.3.2.5. Promoteur et efficacité d'expression .....	47
1.3.2.6. Dose de vecteur et efficacité de transduction .....	49
1.3.2.7. Les cellules cibles .....	50
1.3.2.8. Dispersion du transgène .....	51
<b>2. LES VECTEURS NON-INTEGRATIFS .....</b>	<b>53</b>
2.1. Les vecteurs non-intégratifs .....	53
2.1.1. Les vecteurs dérivés des virus associés à l'adénovirus .....	54
2.1.1.1. Pré-immunité, immunisation .....	54
2.1.1.2. Génotoxicité .....	56
2.1.1.2.1. Limites de clonage .....	58
2.1.1.2.2. Tropisme .....	58
2.1.2. Les vecteurs dérivés des adénovirus .....	59
2.1.2.1. Immunité induite par l'expression de protéines virales .....	60
2.1.2.2. Immunité contre la capsidite .....	61
2.1.2.3. Tropisme .....	62
2.1.3. Les vecteurs dérivés du virus herpes simplex de type 1 .....	63
2.1.3.1. Vecteurs amplicons et production .....	64
2.1.3.2. Vecteurs recombinants non-réplicatifs et toxicité .....	65
2.1.4. Les vecteurs non-viraux .....	66
2.1.4.1. Cas particulier des immuno-liposomes « PEGylés » ou PILS .....	66
2.1.5. Besoin de solutions alternatives .....	67
2.2. Biologie du HIV et formation des cercles .....	68
2.2.1. Présentation des virions .....	68
2.2.2. Le cycle répliatif du HIV .....	70
2.2.2.1. Phases précoces .....	70
2.2.2.2. Phases tardives .....	74
2.3. Les vecteurs lentiviraux non-intégratifs .....	76
2.3.1. Hypothèse de travail .....	76
2.3.2. Stabilité des formes épisomales .....	77
2.3.3. Transcription des formes épisomales .....	78
2.3.3.1. Transcription des formes épisomales dans le contexte viral .....	79
2.3.3.2. Transcription des formes épisomales dans le contexte vecteur .....	83

MATERIEL ET METHODES .....	87
1. LES VECTEURS LENTIVIRAUX.....	89
1.1. Système de production.....	89
1.1.1. Construction des plasmides .....	89
1.1.1.1. Plasmides d'encapsidation .....	89
1.1.1.2. Plasmides vecteurs.....	91
1.2. Titration des stocks.....	91
1.2.1. Mesure de la quantité de particules physiques.....	92
1.2.1.1. Mesure de la quantité de capside .....	92
1.2.1.2. Mesure de la quantité de génomes ARN .....	92
1.2.2. Mesure de la quantité de particules efficaces.....	93
2. CARACTERISATION DES VECTEURS <i>IN VITRO</i> .....	94
2.1. Cultures cellulaires .....	94
2.1.1. Lignées cellulaires .....	94
2.1.2. Cultures primaires .....	94
2.1.2.1. Cultures de neurones et d'astrocytes primaires corticaux murins.....	94
2.1.2.2. Cellules souches nerveuses fœtales humaines.....	95
2.2. Analyse de l'expression du transgène .....	95
2.2.1. Cytométrie en flux à fluorescence (FACS) .....	95
2.2.2. Immunocytofluorescence.....	95
2.2.3. Activité Luciférase .....	96
2.2.4. Dosage du GDNF .....	96
2.3. Analyse de l'activité résiduelle d'intégration .....	96
2.3.1. Sélection de clones stables résistants au G418.....	96
2.3.2. LAM-PCR.....	96
3. CARACTERISATION DES VECTEURS <i>IN VIVO</i> .....	99
3.1. Analyse de l'expression dans le cerveau .....	99
3.2. Analyse de l'expression dans la rétine .....	99
RESULTATS .....	101
1. LES DETERMINANTS VIRAUX DE L'INTEGRATION .....	103
1.1. Mutations de l'intégrase .....	103
1.1.1. Structure de l'intégrase et mutations de classe I.....	103
1.1.2. Mutations de la région C-terminale .....	105
1.1.3. Mutations du site catalytique .....	109
1.2. Mutations des séquences <i>att</i> des LTR .....	109
2. CARACTERISATION DES VECTEURS LENTIVIRAUX EPISOMAUx .....	111
2.1. Expression du transgène <i>in vitro</i> .....	111

---

2.1.1. Expression du transgène .....	111
2.1.2. Phénotype non-intégratif .....	113
2.1.3. Efficacité .....	117
2.1.4. Importance du <i>flap</i> .....	118
2.1.5. Stabilité des cercles .....	120
2.2. Expression du transgène <i>in vivo</i> .....	121
2.2.1. Cerveau .....	121
2.2.2. Rétine .....	122
2.3. Conclusion .....	125
3. AMELIORATIONS .....	127
3.1. Effet des séquences d'attachement à la matrice sur l'expression du transgène .....	127
3.2. Utilisation d'autres mutations d'intégrase .....	129
3.2.1. Influence des mutations d'intégrase sur l'expression de la GFP .....	129
3.2.2. Influence des mutations d'intégrase sur l'expression de la Luciférase .....	132
3.2.3. Influence des mutations d'intégrase sur l'expression du GDNF .....	133
3.3. Réduction de l'intégration résiduelle .....	135
3.4. Conclusion .....	138
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	140
1. LES VECTEURS LENTIVIRAUX NON-INTEGRATIFS .....	142
1.1. L'intégration n'est pas nécessaire à l'expression d'un transgène par un vecteur lentiviral ..	142
1.2. Intégrase, import nucléaire et rétrotranscription .....	145
1.2.1. Implication de l'intégrase dans l'import nucléaire .....	145
1.2.2. Implication de l'intégrase dans la rétrotranscription .....	146
1.2.3. Mutation N .....	147
1.2.4. Mutation LQ .....	148
1.3. Intégrase, <i>att</i> et intégration .....	149
1.4. Perspectives d'amélioration .....	150
2. COMPRENDRE LES PHASES PRECOCES DU CYCLE VIRAL .....	153
2.1. Les acteurs de l'intégration .....	153
2.2. « Prédestination » des CPI ? .....	154
3. AVENIR DES VECTEURS LENTIVIRAUX NON-INTEGRATIFS .....	157
3.1. ... et vecteurs AAV .....	157
3.2. ... sous forme de vecteurs épisomaux .....	158
3.3. ... sous forme de vecteurs à intégration ciblée .....	159
3.3.1. ZFN .....	160
3.3.2. Recombinases de phage .....	162
3.3.3. Transposons .....	163

4. PRECAUTIONS D'EMPLOI DES VECTEURS LENTIVIRAUX .....	165
4.1. Risques cliniques .....	165
4.1.1. Activation de la transcription à distance.....	165
4.1.2. Transcription des séquences voisines du site d'intégration .....	166
4.1.3. Efficacité de transcription .....	167
4.2. Risques environnementaux .....	168
4.2.1. Description de l'essai VRX496.....	169
4.2.2. Système de production et recombinaison .....	169
4.2.3. Mobilisation par les lentivirus sauvages .....	170
4.2.4. Pression de sélection et émergence de nouveaux virus.....	172
4.3. Conclusion .....	173
CONCLUSION.....	175
ANNEXES .....	177
1. BREVET.....	178
2. ARTICLE 1.....	180
3. ARTICLE 2 .....	187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	199

---

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

---

<u>FIGURE 1</u> : COMPARAISON DES GENOMES RETROVIRAUX SIMPLES ET COMPLEXES .....	19
<u>FIGURE 2</u> : LES VECTEURS VIRAUX EN THERAPIE GENIQUE .....	54
<u>FIGURE 3</u> : STRUCTURE D'UN VIRION HIV-1 .....	69
<u>FIGURE 4</u> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE DE REPLICATION DU HIV-1 .....	70
<u>FIGURE 5</u> : MECANISME DE RETROTRANSCRIPTION DES RETROVIRUS .....	72
<u>FIGURE 6</u> : REACTION D'INTEGRATION DU GENOME HIV DANS LA CHROMATINE DE LA CELLULE INFECTEE .....	73
<u>FIGURE 7</u> : STRUCTURES DES DIFFERENTES FORMES DE L'ADN VIRAL DANS LES CELLULES INFECTEES .....	74
<u>FIGURE 8</u> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS TRANSCRITS DU HIV .....	75
<u>FIGURE 9</u> : PHASE NUCLEAIRE PRECOCE DU CYCLE DE REPLICATION .....	77
<u>FIGURE 10</u> : INFLUENCE DE L'ETAT DE LA CELLULE (ACTIVEE/QUIESCENTE) SUR L'INFECTION PAR HIV .....	82
<u>FIGURE 11</u> : SYSTEME DE PRODUCTION DE VECTEURS LENTIVIRAUX.....	90
<u>FIGURE 12</u> : REPRESENTATION DE LA SEQUENCE 3' DE L'INTEGRASE FUSIONNEE AVEC L'HEMAGGLUTININE .....	90
<u>FIGURE 13</u> : PRINCIPE DE LA REACTION DE LAM-PCR.....	98
<u>FIGURE 14</u> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS DOMAINES FONCTIONNELS DE L'INTEGRASE (IN) ET DES MUTATIONS UTILISEES .....	104
<u>FIGURE 15</u> : EVALUATION DE LA CAPACITE DE TRANSDUCTION DE VECTEURS LENTIVIRAUX MUTANTS POUR L'INTEGRASE IN <sub>N</sub> -HA ET IN <sub>LQ</sub> -HA .....	106
<u>FIGURE 16</u> : EVALUATION DE LA STABILITE DE L'EXPRESSION DE LA GFP DANS LE TEMPS .....	108
<u>FIGURE 17</u> : COMPARAISON DES SEQUENCES DU GENOME VIRAL ET DE LA CHROMATINE, AVANT ET APRES L'INTEGRATION.....	110
<u>FIGURE 18</u> : EFFICACITE DE TRANSDUCTION.....	112
<u>FIGURE 19</u> : ABSENCE DE PSEUDOTRANSDUCTION .....	113
<u>FIGURE 20</u> : EXPRESSION DE LA GFP AU COURS DES DIVISIONS CELLULAIRES.....	114
<u>FIGURE 21</u> : EVALUATION DE L'ACTIVITE D'INTEGRATION RESIDUELLE.....	115
<u>FIGURE 22</u> : PRODUITS DE L'AMPLIFICATION DES REGIONS FLANQUANTES PAR LAM-PCR.....	116
<u>FIGURE 23</u> : SEQUENCES DES REGIONS FLANQUANTES ET MISE EN EVIDENCE DU MECANISME D'INTEGRATION....	116
<u>FIGURE 24</u> : COMPARAISON DU RAPPORT TU/p24 .....	117
<u>FIGURE 25</u> : INFLUENCE DU <i>FLAP</i> SUR L'EFFICACITE DE TRANSDUCTION .....	120
<u>FIGURE 26</u> : STABILITE DE L'EXPRESSION DU TRANSGENE DANS DES CELLULES EN ARRET DE DIVISION APRES TRANSDUCTION PAR UN VECTEUR LENTIVIRAL NON-INTEGRATIF .....	121



<u>FIGURE 27</u> : EXPRESSION DU TRANSGENE <i>IN VIVO</i> DANS LE STRIATUM DE SOURIS.....	122
<u>FIGURE 28</u> : EXPRESSION DU TRANSGENE <i>IN VIVO</i> DANS LA RETINE DE RAT.....	124
<u>FIGURE 29</u> : EXPRESSION DU TRANSGENE <i>IN VIVO</i> DANS LA RETINE CHEZ LE RAT.....	125
<u>FIGURE 30</u> : VECTEURS UTILISES POUR L’EVALUATION DE L’EFFET DES SEQUENCES MAR .....	128
<u>FIGURE 31</u> : EFFET DES SEQUENCES MAR .....	129
<u>FIGURE 32</u> : COMPARAISON DE L’INFLUENCE DES MUTATIONS D’INTEGRASE D64V, N ET LQ SUR L’EXPRESSION DE LA GFP.....	131
<u>FIGURE 33</u> : COMPARAISON DE L’INFLUENCE DES MUTATIONS D’INTEGRASE D64V, N ET LQ SUR L’EXPRESSION DE LA LUCIFERASE.....	133
<u>FIGURE 34</u> : COMPARAISON DE L’INFLUENCE DES MUTATIONS D’INTEGRASE D64V ET N SUR L’EXPRESSION DU GDNF .....	134
<u>FIGURE 35</u> : COMPARAISON DE L’INFLUENCE DES MUTATIONS D’INTEGRASE D64V, N ET LQ, ET DES MUTATIONS DES SEQUENCES ATT DES LTR SUR LA FREQUENCE D’INTEGRATION DES VECTEURS LENTIVIRAUX.....	136
<u>FIGURE 36</u> : COMPARAISON DE L’INFLUENCE DES MUTATIONS D’INTEGRASE D64V, N ET LQ, ET DES MUTATIONS DES SEQUENCES ATT DES LTR SUR LA FREQUENCE D’INTEGRATION DES VECTEURS LENTIVIRAUX.....	137
<u>TABLEAU 1</u> : COMPARATIF DES PROTOCOLES « FRANÇAIS » ET « BRITANNIQUE » DES ESSAIS DE TRANSFERT DE GENES POUR LE TRAITEMENT DU X1-SCID.....	33
<u>TABLEAU 2</u> : INCIDENCE DES CANCERS CHEZ L’ENFANT DE MOINS DE 15 ANS. ....	51
<u>TABLEAU 3</u> : RECAPITULATIF DES CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX VECTEURS VIRALX.....	68
<u>TABLEAU 4</u> : EFFICACITE D’EXPRESSION DU TRANSGENE.....	118
<u>TABLEAU 5</u> : EFFICACITE D’INTEGRATION DES VECTEURS MUTANTS PAR RAPPORT AU VECTEUR IN <sub>WT</sub> . ....	137
<u>TABLEAU 6</u> : COMPARAISON DES TITRES DE VECTEURS PRODUITS EN PARALLELE AVEC UNE INTEGRASE SAUVAGE (WT) OU MUTEE (D64V).....	144

---

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

AAV : adeno-associated virus (virus associé à l'adénovirus)

AAV-S1 : site préférentiel d'intégration du virus associé à l'adénovirus

ADN : acide désoxyribonucléique

ALV : avian leukemia virus (virus de la leucémie aviaire)

APOBEC-3G : apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G

ARN : acide ribonucléique

ASLV : avian sarcoma and leukosis virus (virus de la leuco-sarcomatose aviaire)

*att* : séquence d'attachement

AZT : Azido deoxythimidine

$\beta$ -Gal :  $\beta$ -Galactosidase

BHE : barrière hémato-encéphalique

CAR : coxsackie virus and adenovirus receptor (récepteur du virus de coxsackie et de l'adénovirus)

CAT : choline acétyl-transférase

CAV : canine adenovirus (adénovirus canin)

CPI : complexe de préintégration

cPPT : voir PPT

CSI : common integration site (site fréquent d'intégration)

CTS : central terminaison site (site de terminaison de la rétrotranscription central)

EIAV : equine infectious anemia virus (virus de l'anémie infectieuse équine)

FACS : fluorescence activated cell sorting

FIV : feline immunodeficiency virus (virus de l'immunodéficience félin)

GALV : gibbon ape leukemia virus

GFP : green fluorescent protein (protéine fluorescente verte)

gp : glycoprotéine

HFV : human foamy virus (virus foamy humain)

HIV(-1, -2) : human immunodeficiency virus type 1 or type 2 (virus de l'immunodéficience humain de type 1 ou de type 2)

HLA : human leukocyte antigen

HSV(-1) : herpès simplexe virus (de type 1)

HTLV : human T-lymphotropic virus (virus de la leucémie humaine des cellules T)

I : immediate

IE : immediate early

IFN : interferon

IL : interleukine

IN : intégrase

L : late

LAM- PCR : linear amplification mediated polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne après amplification linéaire)

LCR : locus control region (région de contrôle transcriptionnel du locus)

LEDGF : lens epithelial-derived growth factor

LTR : long terminal repeat (séquence terminale longue répétée)

MA : matrice

MAR : matrix attachment region (région d'attachement à la matrice)

mfi : mean florescence intensity (intensité de fluorescence moyenne)

MLV : murine leukemia virus (virus de la leucémie murine)

MOI : multiplicity of infection (multiplicité d'infection)

nls : nuclear localisation signal (signal de localisation nucléaire)

PBS : primer binding site (site de liaison primaire)

PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PEG : polyéthylène glycol

PEG-ADA : polyéthylène glycol adénosine déaminase

PILS : Polyéthylène glycol-immunoliposome

PPT, cPPT : (central) polypurin tract (séquence riche en purines)

RBE : Rep-binding element (élément de liaison à Rep)

RRS : Rep-recognition sequence (séquence de reconnaissance de Rep)

RSV : Rous sarcoma virus (virus du sarcome de Rous)

RT : rétrotranscriptase

RPE : retinal pigmented epithelium (épithélium pigmentaire de la rétine)

SAR : scaffold attachment region

SCID : severe combined immunodeficiency (déficit immunitaire combiné sévère)

ADA-SCID : Adenosine deaminase - severe combined immunodeficiency (déficit immunitaire combiné sévère lié à une déficience en adénosine déaminase)

CGD-SCID : chronic granulomatous disease - severe combined immunodeficiency (déficit immunitaire combiné sévère, maladie chronique granulomateuse)

X1-SCID : type 1 X-linked severe combined immunodeficiency (déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X de type 1)

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

SIN : self inactivated (auto inactivé, =  $\Delta U3$ )

SIV : simian immunodeficiency virus (virus de l'immunodéficience simien)

SNC : système nerveux central

SNV : spleen necrosis virus (virus de la nécrose de la rate)

SV40 : simian virus 40 (virus simien 40)

SVF : sérum de veau foetal

Tag : transactivating SV40 T antigen

TCR : T cell receptor (récepteur des cellules T)

TU : transducing unit (particule efficace pour la transduction)

UTR : untranslated region (région non traduite)

VSV : virus de la stomatite vésiculaire

VSV-G : glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire

WPRES : Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (élément de régulation post-transcriptionnelle du virus de l'hépatite de la marmotte)

ZFN : zinc finger nuclease (nucléase à doigt de zinc, protéine de fusion)

ZFP : zinc finger protein (protéine à doigt de zinc)

---

# REMERCIEMENTS

---

*Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail :*

*Jacques Mallet, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de réaliser ce travail, mais aussi pour ses conseils et sa relecture attentive de ce manuscrit.*

*Les membres du jury, Madame Hacein-Bey Abina et Messieurs Saïb, Anegon et Cosset pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Che Serguera et Chamsy Sarkis, pour m'avoir fait découvrir le domaine de la recherche avec tant d'enthousiasme. Merci de m'avoir guidée et confié ce projet. Merci pour votre confiance, votre soutien et vos conseils précieux.*

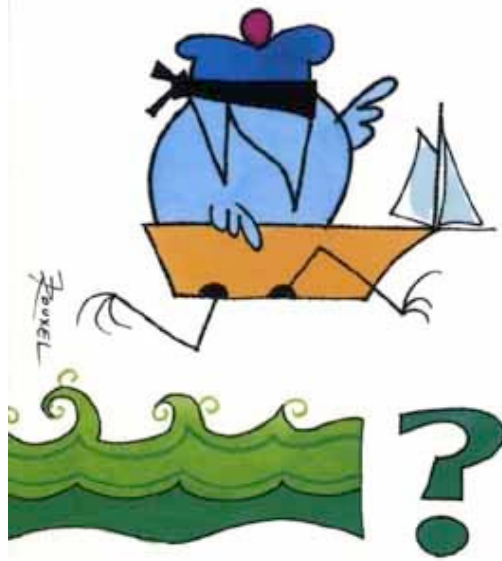
*Dorothee, Nico et Suzanna, les autres membres du labo 4, pour m'avoir supportée et aidée, pour leur bonne humeur quotidienne, et aussi pour leurs pâtisseries !*

*Les compagnons de galère qui nous ont déjà quittés : Olfa, Lahouari, Angéline, Cécile, ou qui pour qui ce sera (plus ou moins) bientôt le tour : Mathieu, Nico et Dorothee. Sans vous, ces dernières années n'auraient pas été pareilles ! Prenez soin de vous !*

*Et merci à tous les autres membres du laboratoire, qui m'ont un jour ou l'autre aidée, conseillée pour une manip, à toutes les personnes qui participent au bon fonctionnement du laboratoire, de la gestion à l'animalerie, en passant par la laverie, ou avec qui j'ai pu discuter de tout et de rien. Merci de faire de ce laboratoire un lieu agréable et convivial, d'égayer et de faciliter le quotidien ! Comme quelqu'un l'a dit un jour, « les citer tous n'est pas possible et n'en citer que quelques-uns, c'est l'assurance de faire des jaloux », je leur laisse donc le soin de se reconnaître !*

*Enfin, merci à tous mes proches, tout particulièrement à mes parents, ma sœur et José. J'espère que vous ne m'en voudrez pas trop (longtemps) de mes faux bonds, mes retards et mes absences... Sans votre aide et votre soutien inestimables, je n'en serais pas là.*

Les devises Shadok



QUAND ON NE SAIT PAS OÙ L'ON VA,  
IL FAUT Y ALLER !!...  
...ET LE PLUS VITE POSSIBLE.

---

## AVANT-PROPOS

---

Le concept de thérapie par les gènes a été évoqué dès les années 1960, à la suite du décryptage de l'information génétique portée par l'ADN et l'identification de mutations pouvant induire des maladies. Les progrès considérables de la virologie et de la biologie moléculaire ont ensuite permis de concrétiser cette idée et d'utiliser des particules virales atténuées pour transférer des gènes d'intérêt et ainsi restaurer des fonctions cellulaires déficientes. Au cours des années 1980, de nombreuses études établissent le bien fondé du transfert de gène par vecteur viral et en 1990, un premier essai chez l'Homme est réalisé pour le traitement d'un déficit immunitaire. Depuis, les protocoles cliniques n'ont cessé de se multiplier et les vecteurs de s'améliorer. Les avancées de la thérapie génique résultent de la convergence de deux grands axes de recherche : (1) la compréhension des mécanismes d'infection virale qui contribue au développement de vecteurs plus efficaces et plus sécurisés, et (2) l'accumulation de données physiopathologiques sur les maladies candidates qui favorisent l'élaboration de stratégies adaptées.

Ces avancées ont conduit à la première démonstration de l'efficacité du traitement par transfert de gènes d'une maladie héréditaire (déficit immunitaire X1-SCID). Néanmoins, cet essai a mis en évidence le manque d'évaluation du risque de mutagenèse insertionnelle lié à l'intégration du génome de certains vecteurs viraux dans la chromatine de la cellule modifiée. La mise en évidence du risque de génotoxicité a conduit à un effort général de la communauté de thérapie génique tant pour la compréhension et l'évaluation de ce risque que pour le développement de nouveaux vecteurs dépourvus de potentiel génotoxique. Deux stratégies ont été adoptées : le développement d'outils permettant l'intégration dans un nombre restreint de loci et l'utilisation de vecteurs qui ne s'intègrent pas. Nos travaux ont porté sur cette dernière stratégie. Nous avons développé des vecteurs lentiviraux déficients pour l'intégration en tirant avantage de la capacité naturelle des rétrovirus à générer des formes épisomales de leur génome dans le noyau des cellules infectées.

Dans un premier temps, nous avons établi que des vecteurs lentiviraux dont le phénotype non-intégratif est induit par une mutation dans la région C-terminale de l'intégrase permettent l'expression d'un transgène *in vitro*. L'expression du transgène est également efficace *in vivo* puisqu'elle a été observée pendant au moins 5 mois chez le rat. Dans un second temps, nous avons entrepris l'amélioration des vecteurs lentiviraux non-intégratifs. Nous avons ainsi pu identifier une mutation de la région C-terminale de l'intégrase présentant une activité d'intégration réduite et permettant une meilleure efficacité de transduction.

Avant de décrire les résultats obtenus, nous présenterons, dans un chapitre d'introduction, l'ensemble des données actuelles concernant le risque de mutagenèse insertionnelle et les moyens disponibles pour contrôler ce risque. Nous considérerons ensuite les vecteurs épisomaux les plus couramment utilisés aujourd'hui, particulièrement du point de vue des défis à relever en vue de leur utilisation clinique. Enfin, nous apporterons l'ensemble des éléments concernant la biologie des lentivirus qui permettent d'étayer la stratégie de développement de vecteurs épisomaux ainsi que les données disponibles au moment où le projet a été initié concernant la stabilité des formes épisomales du génome lentiviral et à leur capacité transcriptionnelle.



---

# INTRODUCTION

---



Ce chapitre Introduction se découpe en deux parties.

Les vecteurs oncorétroviraux, dérivés des oncorétrovirus ainsi que des lentivirus, sont parmi les plus utilisés pour le transfert de gènes, tant en vue de thérapie que dans un contexte fondamental. Je présenterai tout d'abord ces vecteurs, leurs avantages et leurs limites. La limite majeure des vecteurs rétroviraux réside dans le risque de génotoxicité lié à l'intégration « aléatoire » de ces vecteurs dans le génome des cellules transduites. Ce risque a été mis en évidence au cours d'un essai clinique de traitement d'un déficit immunitaire par transfert de gène par un vecteur oncorétroviral. Plusieurs autres déficits immunitaires comparables ont également fait l'objet de stratégie de transfert de gènes similaires. Je récapitulerai les données issues de ces différents essais. Je dresserai également un bilan des données accumulées quant à la réévaluation du risque de génotoxicité.

Une des possibilités les plus sûres afin d'éviter le risque de mutagenèse insertionnelle est l'utilisation de vecteurs non-intégratifs. C'est pourquoi dans une seconde partie, je présenterai les vecteurs viraux épisomaux les plus prometteurs, leurs avantages et leurs limites respectifs. C'est ce bilan, combiné avec la constatation que les vecteurs lentiviraux sont parmi les plus efficaces pour le transfert de gènes, qui nous a conduit à envisager une nouvelle approche et le développement de vecteurs lentiviraux non-intégratifs. Après une description du cycle répliatif des lentivirus, je présenterai les éléments qui nous ont permis d'envisager une telle stratégie.

# 1. TRANSFERT DE GENE, VECTEURS RETROVIRAUX ET GENOTOXICITE

## 1.1. Les vecteurs rétroviraux

Le cycle de vie d'un virus consiste à faire pénétrer son matériel génétique dans une cellule et de détourner la machinerie de cette cellule pour produire ses propres protéines et ainsi se répliquer. Depuis de nombreuses années, les virus ont été détournés et utilisés pour le transfert de matériel génétique dans une cellule cible. Plus ou moins dépourvus des facteurs de virulences initiaux, les vecteurs viraux sont en règle générale incapables de se répliquer, mais permettent l'expression d'un gène d'intérêt, le transgène. Ces méthodes de vectorisation virale sont plus efficaces que les méthodes classiques de transfection d'ADN nu. En effet, elles tirent profit de l'ensemble des stratégies que les virus ont développées pour pénétrer le plus efficacement possible la cellule et détourner ses moyens de protection. Parmi les virus utilisés pour le transfert de gènes figurent les rétrovirus. Leurs applications s'étendent *in vitro* et *in vivo* et couvrent des fins thérapeutiques aussi bien que fondamentales. Ce chapitre a pour objet la présentation de leurs caractéristiques principales.

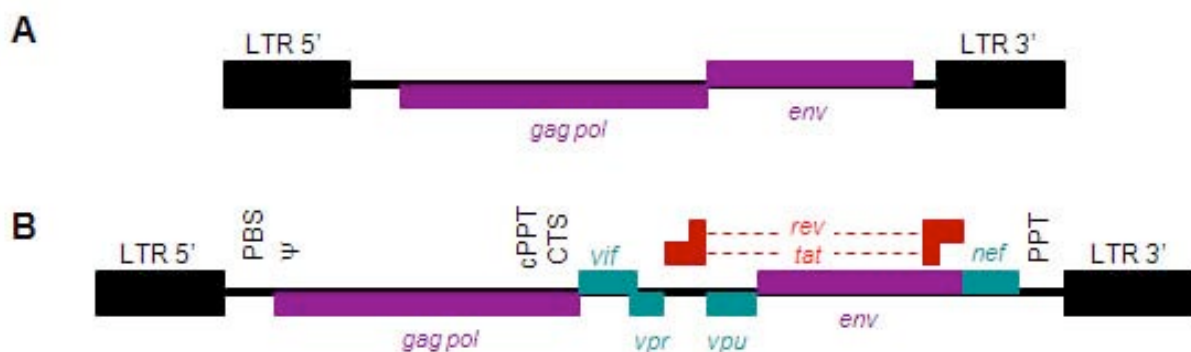
### 1.1.1. Quelques données sur les rétrovirus et les pathologies qui leur sont associés

#### 1.1.1.1. Description

Les rétrovirus sont une famille de virus à ARN enveloppés. Ils sont caractérisés par une enzyme commune, la rétrotranscriptase, qui leur permet de synthétiser une molécule d'ADN à partir du génome ARN dans la cellule infectée. Une fois sous forme ADN, le génome viral est intégré de façon stable dans la chromatine de la cellule-hôte par une seconde enzyme virale, l'intégrase. Le génome viral intégré, ou provirus, pourra alors être transmis à la descendance de cette cellule. Le cycle réplcatif des rétrovirus, en particulier du virus de l'immunodéficience humaine (HIV pour *Human immunodeficiency virus*), sera détaillé dans un chapitre suivant ([chapitre 2.2 p68](#)).

Les rétrovirus<sup>1</sup> peuvent être répartis en trois groupes : les rétrovirus oncogènes, les lentivirus et les spumavirus. Les rétrovirus oncogènes, tels que le virus de la leucémie murine (MLV) ont un génome dit « simple » (voir [Figure 1-A](#)) qui comprend trois phases ouvertes de lecture *gag*, *pol* et *env* codant les protéines de structure et les enzymes nécessaires au cycle de réplication. Au contraire, les lentivirus, comme le HIV, ainsi que les spumavirus, comme le virus foamy humain (HFV) sont dits « complexes » (voir [Figure 1-B](#)) parce qu'ils possèdent, en plus de *gag*, *pol* et *env*, des gènes de régulation et des gènes accessoires (respectivement *tat* et *rev*, et *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* pour le HIV).

En plus des séquences codantes, le génome des rétrovirus contient également un certain nombre de séquences qui agissent en *cis*. Parmi elles, les *long terminal repeat* (LTR), situées aux deux extrémités du génome viral, contiennent notamment des signaux d'initiation et de terminaison de la transcription ; la séquence  $\psi$  correspond au signal d'encapsidation du génome ARN ; certaines séquences interviennent au cours de la rétrotranscription : la séquence *primer binding site* (PBS), les *polypurine tract* (PPT), *central terminaison sequence* (CTS) (voir [chapitre 2.2.2.1 p70](#) pour une description détaillée du mécanisme).



**Figure 1 : Comparaison des génomes rétroviraux simples et complexes.** **A** : génome des rétrovirus oncogènes, exemple du MLV. **B** : génome des lentivirus, exemple du HIV. Les rectangles correspondent aux phases ouvertes de lecture : gènes communs ■, gènes accessoires ■, gènes de régulation ■. ■ : éléments agissant en *cis* : les *long terminal repeat* (LTR) 5' et 3' dont les séquences sont identiques mais qui remplissent des fonctions différentes, notamment d'initiation de la transcription (5') et de fin de transcription (3'), ils sont également impliqués dans l'intégration ; la séquence  $\psi$ , signal d'encapsidation du génome ARN ; les séquences *primer binding site* (PBS), *polypurine tract* 3' (PPT) et centrale (cPPT), *central terminaison site* (CTS) qui interviennent au cours de la rétrotranscription.

<sup>1</sup> **Rétrovirus** : chaque fois qu'il sera fait mention de « rétrovirus », il faudra entendre « oncorétrovirus + lentivirus + spumavirus », et pas uniquement « oncorétrovirus » auxquels il sera toujours fait référence par « oncorétrovirus » ou « rétrovirus oncogènes ».

### 1.1.1.2. Les rétrovirus oncogènes

Les premiers rétrovirus décrits ont été le virus de la leucémie aviaire (ALV) et le virus du sarcome de Rous (RSV). Ces virus sont tous deux responsables de tumeurs chez le poulet. D'autres rétrovirus oncogènes ont par la suite été isolés dans un grand nombre d'espèces, comme le MLV chez la souris ou le HTLV (*Human T-lymphotropic virus*) chez l'Homme.

Deux processus définissent le pouvoir oncogène de ces rétrovirus : le virus exprime lui-même un oncogène ou il induit l'activation d'oncogènes cellulaires par différents mécanismes. Dans ce dernier cas, deux modes d'action majeurs ont été décrits : la transcription d'un oncogène cellulaire à partir de la région promotrice du LTR (5' ou 3') ou l'activation à distance d'un promoteur d'oncogène par l'*enhancer* du LTR. Cette deuxième voie est de loin la plus fréquente puisqu'elle est efficace sur de très grandes distances et quelle que soit l'orientation du provirus par rapport à l'oncogène. C'est donc le LTR du virus, et plus particulièrement la nature de la séquence *enhancer*, qui détermine le potentiel oncogénique du virus et la nature du/des cancers qu'il déclenche (voir Majors, 1990 pour revue).

Ce pouvoir transformant des oncorétrovirus a été très largement utilisé. Par exemple, l'étude des gènes impliqués dans les leucémies induites chez la souris par le MLV a permis l'identification de nombreux oncogènes cellulaires. Ces informations sont regroupées au sein de la base de données *Mouse retroviral tagged cancer gene database* (<http://rtcgd.abcc.ncifcrf.gov/>). Les oncorétrovirus ont également été utilisés comme agents mutagènes, *in vitro* et *in vivo* (voir Stocking *et al.*, 1993 ; Suzuki *et al.*, 2002 et les références citées dans ces articles).

### 1.1.1.3. Les lentivirus

Tous les rétrovirus ne sont pas oncogènes et contrairement au premier groupe décrit ci-dessus, les lentivirus, comme le HIV, ne sont généralement pas directement associés à la formation de tumeurs chez leur hôte. Les patients atteints du SIDA sont fréquemment touchés par différents types de cancers, mais cette fréquence élevée est généralement attribuée à l'état général du patient et à l'immunodéficience induite par l'infection plutôt qu'à un effet oncogène direct du virus (voir Gallagher *et al.*, 2001 pour revue).

Néanmoins, cette « non-observation » est à prendre avec précautions. En effet, peu d'études ont réellement posé la question du potentiel oncogène des lentivirus et il est important de noter que plusieurs événements de transformation liés aux lentivirus ont déjà été rapportés, impliquant le virus d'immunodéficience simien (SIV pour *simian immunodeficiency virus*) (Maggiorella *et al.*, 1998), son équivalent félin (FIV pour *felin immunodeficiency virus*) (Beatty *et al.*, 1998) ou le HIV (Killebrew *et al.*, 2004 ; Shiramizu *et al.*, 1994). La capacité du HIV à activer la transcription des gènes cellulaires à proximité du site d'intégration a également été mise en évidence (Raineri *et al.*, 1992), plus particulièrement par le biais du LTR (résultats présentés par Mack *et al.* à la 2<sup>nd</sup>

*National AIDS Malignancy Conference, 1998*). Il a aussi été rapporté que dans des cellules infectées de façon stable par le HIV, l'expression de nombreux gènes est altérée, dont un quart est impliqué dans la régulation transcriptionnelle (résultats présentés par Meehan *et al.* à la 10<sup>th</sup> *Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, 2003*). Ajoutons également que des phénomènes d'expansion clonale de cellules ayant subi un événement d'intégration ont été observés chez des patients infectés par le HIV (Mack *et al.*, 2003). Un nombre croissant de données attestent donc d'un rôle possible des lentivirus dans les mécanismes de transformation (voir Killebrew et Shiramizu, 2004 ; Killebrew *et al.*, 2004 pour revue). L'allongement de la durée de vie des patients atteints du SIDA pourrait mettre en évidence une certaine pathogénicité du HIV liée à un effet de mutagenèse insertionnelle.

### **1.1.2. Caractéristiques des vecteurs rétroviraux**

De nombreux vecteurs de transfert de gènes ont été développés à partir des rétrovirus. Ces vecteurs présentent la caractéristique de former un provirus intégré de façon stable dans la chromatine des cellules transduites. Ainsi, même si les cellules se divisent, l'information génétique est conservée. Les premiers vecteurs de ce type ont été développés à partir des rétrovirus oncogènes, en particulier le MLV. Le développement des vecteurs MLV a permis d'accumuler un ensemble de connaissances en « vectorologie ». Il a nécessité, par exemple, l'identification des éléments viraux nécessaires à l'encapsidation du génome ARN. Les vecteurs MLV ont, par la suite, servi de modèle au développement des vecteurs lentiviraux, en premier lieu à partir du HIV (Poznansky *et al.*, 1991). D'autres vecteurs lentiviraux ont été développés à partir du virus simien (SIV) (Mangeot *et al.*, 2000 ; Negre *et al.*, 2000 ; Schnell *et al.*, 2000), félin (FIV) (Poeschla *et al.*, 1998), équin (EIAV pour *equine infectious anemia virus*) (Olsen, 1998), bovin ou encore caprin (voir Olsen, 2001 pour revue). Enfin, le troisième groupe de rétrovirus, les spumavirus, a lui aussi été utilisé pour le développement de vecteurs (Russell et Miller, 1996 ; voir Rethwilm, 2007 pour revue).

Tous ces vecteurs partagent un certain nombre de caractéristiques, propres aux rétrovirus. Ils ont aussi hérité des virus dont ils dérivent certaines spécificités, en particulier le lien étroit entre leur capacité de transduction et le cycle cellulaire. Ces différents éléments sont détaillés ci-dessous.

#### **1.1.2.1. Transduction et cycle cellulaire**

La transduction par les vecteurs rétroviraux, tout comme l'infection par les virus dont ils dérivent, est étroitement liée au cycle cellulaire. Ce lien diffère selon qu'il s'agisse de vecteurs oncorétroviraux ou lentiviraux. Les premiers ne transduisent que les cellules mitotiquement

actives, alors que les seconds transduisent efficacement les cellules en arrêt de division mais sont bloqués dans les cellules en phase G<sub>0</sub> (quiescentes<sup>2</sup>).

Les bases moléculaires qui sous-tendent ces restrictions ne sont pas clairement identifiées. Il est classiquement admis que les lentivirus sont pourvus de signaux de localisation nucléaire (*nls* pour *nuclear localisation signal*) et sont donc capables d'un import nucléaire actif, tandis que les oncorétrovirus accèdent à la chromatine de façon passive à la faveur de la désorganisation de la membrane nucléaire qui se produit lors de la mitose.

L'incapacité des vecteurs MLV à transduire les cellules qui ne se divisent pas constitue une des limites majeures à leur application. En effet, si les vecteurs MLV sont adaptés à la transduction de cellules tumorales, ils sont d'une efficacité quasi nulle pour le transfert de gènes dans le système nerveux central adulte. Ils transduisent faiblement les progéniteurs neuronaux en division (Burrows *et al.*, 1997) et ne transduisent pas les cellules différenciées telles que les neurones (Blomer *et al.*, 1997).

Plusieurs stratégies ont été évaluées en vue de surmonter cette limite des vecteurs oncorétroviraux. Par exemple, l'augmentation du titre (Nanmoku *et al.*, 2003) ou la présence de facteurs trophiques qui stimulent la division cellulaire (King *et al.*, 2000) permettent d'augmenter l'efficacité de transduction. Plusieurs équipes ont également décrit des versions « enrichies » en signaux de localisation nucléaire de vecteurs SNV (*spleen necrosis virus*) (Parveen *et al.*, 2000) ou plus récemment MLV (Yu et Schaffer, 2006). Ces vecteurs transduisent des cellules neuronales ou hématopoïétiques qui ne se divisent pas. Toutefois, l'efficacité reste faible et ces résultats n'ont pas été reproduits. En effet, Caron et coll. ont introduit des *nls* dans une des protéines d'un vecteur SNV (Caron et Caruso, 2005). Les auteurs rapportent l'incapacité de ces vecteurs modifiés à transduire des cellules qui ne se divisent pas.

Contrairement aux rétrovirus oncogènes, les lentivirus infectent indifféremment des cellules qui se divisent et des cellules qui ne se divisent pas. Il en est de même pour les vecteurs qui en dérivent. Cette propriété a été établie pour les vecteurs HIV simultanément par plusieurs groupes dans les cellules souches hématopoïétiques à potentiel de repopulation à long terme, difficilement transductibles par les vecteurs MLV (Akina *et al.*, 1996 ; Reiser *et al.*, 1996 ; Sirven *et al.*, 2000 ; Uchida *et al.*, 1998). Les vecteurs HIV sont également efficaces dans le système nerveux central où ils permettent l'expression d'un transgène dans des neurones terminaux (Naldini *et al.*, 1996b ; Zennou *et al.*, 2001). Des résultats comparables ont ensuite été obtenus pour les vecteurs SIV (Mangeot *et al.*, 2000 ; Schnell *et al.*, 2000), FIV (Poeschla *et al.*, 1998) ou EIAV (Mitrophanous *et al.*, 1999).

---

<sup>2</sup> Cellules quiescentes : par abus de langage, les cellules différenciées, qui ne se divisent plus, sont parfois qualifiées de « quiescentes ». Ce terme ne désignera ici que des cellules en phase G<sub>0</sub> du cycle cellulaire.

Un des déterminants majeurs de l'import nucléaire propre aux lentivirus été décrit simultanément par les équipes de P. Charneau et de L. Naldini (Follenzi *et al.*, 2000 ; Zennou *et al.*, 2000) pour le HIV. Il s'agit du *flap*, une structure d'ADN à 3 brins formée dans le génome viral au niveau de la séquence cPPT-CTS au cours de la rétrotranscription. Le mécanisme d'action de cette structure n'est pas connu, mais l'incorporation de cette séquence cPPT-CTS améliore grandement l'efficacité de transduction (Zennou *et al.*, 2001). Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes pour les vecteurs dérivés du HIV (Ao *et al.*, 2004 ; Logan *et al.*, 2004b ; Park et Kay, 2001 ; Van Maele *et al.*, 2003), ainsi que dans des vecteurs dérivés du SIV (Mangeot *et al.*, 2000) ou de l'EIAV (O'Rourke *et al.*, 2005). En ce qui concerne les FIV, une séquence cPPT a été décrite (Whitwam *et al.*, 2001) mais elle n'est pas totalement identique à la séquence PPT située en 3' du génome. Or, Charneau et coll. ont établi, pour le HIV, que si les séquences centrale et 3' ne sont pas identiques, le *flap* n'est pas actif (Charneau *et al.*, 1992 ; Zennou *et al.*, 2000). L'efficacité du système dans le contexte du FIV est donc à vérifier.

Un certain nombre de données ne s'intègrent cependant pas dans la théorie classiquement admise de l'import nucléaire actif des lentivirus et passif des oncorétrovirus, en particulier le fait que les lentivirus, eux aussi, sont dépendants par le cycle cellulaire : ils ne transduisent pas les cellules en phase G<sub>0</sub>. En outre, plusieurs cas de transduction de MLV en absence de désorganisation de la membrane nucléaire ont été décrits. Ces éléments sont développés ci-dessous.

Comme cela a été décrit pour le HIV sauvage (Stevenson *et al.*, 1990b, voir [chapitre 2.3.3.1 p79](#)), les vecteurs lentiviraux ne transduisent pas efficacement les cellules quiescentes (G<sub>0</sub>). Naldini et coll. l'ont montré avec des fibroblastes (Naldini *et al.*, 1996b). Si les cellules sont mises en contact avec le vecteur après 3 semaines d'arrêt en phase G<sub>0</sub>, le pourcentage de cellules exprimant le transgène est relativement faible (8%), mais ce pourcentage peut être significativement augmenté si le blocage du cycle cellulaire est levé quelques jours après infection (environ 50% de cellules exprimant le transgène, jusqu'à 8 jours de culture entre la transduction et la reprise du cycle). De la même façon, il a été démontré que les vecteurs lentiviraux ne transduisent pas efficacement les progéniteurs hématopoïétiques en phase G<sub>0</sub> (Sutton *et al.*, 1999). Enfin, les vecteurs HIV sont beaucoup plus efficaces dans le foie si les hépatocytes sont réactivés par hépatectomie partielle (Park *et al.*, 2000).

Concernant les vecteurs MLV, deux articles attirent l'attention. Tout d'abord, l'expression d'un transgène après transduction de macrophages par des vecteurs Mo-MLV (Moloney-MLV) et F-MLV (Friend-MLV) a été observée en absence de prolifération cellulaire détectable (Jarrosson-Wuillemme *et al.*, 2006). D'autre part, les données publiées par Roe et coll. suggèrent que l'intégration du génome oncorétroviral ne se produit pas dans des cellules en métaphase – alors que la membrane nucléaire est déjà désagrégée – et nécessite l'achèvement complet de la mitose (Roe *et al.*, 1993). Dans le même article, les auteurs observent également une faible quantité de génomes viraux dans le noyau de cellules bloquées avant la mitose par un traitement à l'aphidicoline. Ainsi, bien qu'infection et transduction soient effectivement liées au cycle

cellulaire, ces données suggèrent que la barrière de la membrane nucléaire n'est pas le (seul) facteur qui limite l'infection des oncorétrovirus en absence de division cellulaire.

Notons également que bien que longtemps recherchés, les signaux de localisation nucléaire (*nls*) n'ont pas encore été clairement identifiés chez les lentivirus. En effet, plusieurs *nls* putatifs ont été décrits dans différentes protéines virales, mais ces séquences supposées ont été successivement modifiées, sans inhiber la réplication virale dans les cellules qui ne se divisent pas. Ceci est valable pour Matrice ou Vpr, aussi bien que pour l'intégrase (voir Suzuki et Craigie, 2007 pour revue). Le *flap* peut également être supprimé sans éliminer totalement la réplication. D'autre part, certaines modifications du HIV, notamment de l'intégrase (Bouyac-Bertoia *et al.*, 2001) ou de la capsid (Dvorin *et al.*, 2002 ; Yamashita et Emerman, 2004 ; Yamashita et Emerman, 2005), ont conduit à l'inhibition de la réplication dans des cellules en division ou non. Citons également les résultats concernant l'étude du rôle de LEDGF (*Lens epithelium-derived growth factor*) dans la réplication et l'import nucléaire. Ce facteur cellulaire favoriserait l'import nucléaire du CPI *via* son interaction avec l'intégrase, qui, elle-même, ne posséderait donc pas de signaux d'import nucléaire (voir Llano *et al.*, 2006 ; Busschots *et al.*, 2007). Ces travaux, ainsi que d'autres impliquant le facteur de restriction à l'infection MLV Fv1 (Pryciak et Varmus, 1992), la protéine p12 du MLV (Yuan *et al.*, 2002) ou encore la protéine matrice (Mannioui *et al.*, 2005), suggèrent également que la localisation nucléaire n'est pas un gage de réplication et qu'un blocage supplémentaire peut intervenir entre l'import nucléaire et l'intégration.

Le nouveau modèle émergent propose donc que les lentivirus de même que les oncorétrovirus atteignent la chromatine via un mécanisme actif fondé sur l'intervention de nombreux partenaires cellulaires, tels que le LEDGF (Busschots *et al.*, 2007) et/ou inhibiteurs cellulaires, tels que APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*) (Chiu *et al.*, 2005). Ces facteurs sont propres à chaque virus, par exemple l'interaction du LEDGF est restreinte aux intégrases lentivirales (Llano *et al.*, 2004 ; Busschots *et al.*, 2007). Enfin, la présence, l'activité et/ou l'accessibilité de ces facteurs seraient modulées par le cycle cellulaire (voir Yamashita et Emerman, 2006 pour revue).

Cette théorie reste à vérifier, mais elle est d'autant plus séduisante qu'elle permet d'expliquer le peu de succès des tentatives d'amélioration des vecteurs MLV par une approche d'« enrichissement en *nls* » citées précédemment (Parveen *et al.*, 2000 ; Caron et Caruso, 2005 ; Yu et Schaffer, 2006). La détermination des acteurs et des mécanismes impliqués dans l'import nucléaire représente un enjeu capital pour le développement de vecteurs rétroviraux plus performants.

### 1.1.2.2. Réaction immunitaire

Il est question dans ce chapitre de la réaction de l'hôte contre le vecteur, déclenchée à la suite d'un transfert de gène par un vecteur rétroviral *in vivo*. Nous aborderons dans un premier temps la



réaction immunitaire innée non spécifique puis la réaction immunitaire acquise, spécifiquement dirigée contre l'un des composants du vecteur ou contre le transgène.

#### 1.1.2.2.1. Réaction immunitaire innée

Blomer et coll. ont décrit la réaction inflammatoire induite par les vecteurs rétroviraux, MLV ou HIV, après injection dans le système nerveux central (SNC) de souris (Blomer *et al.*, 1997). Les auteurs observent une infiltration de lymphocytes, de macrophages et une prolifération astrocytaire qui font suite à l'injection stéréotaxique des vecteurs. Néanmoins, cette réaction n'est pas plus importante qu'après injection d'une solution saline et elle disparaît dans les deux semaines qui suivent l'injection, contrairement à ce qui est observé avec un vecteur adénoviral.

Une autre des composantes du système immunitaire est le système du complément. Ce système est composé d'un ensemble de protéines circulantes et qui sont activées en cascade. Les particules virales sont sensibles à la neutralisation par le complément. Les éléments de l'enveloppe virale (membrane plasmique et glycoprotéines) sont responsables de cette sensibilité (Takeuchi *et al.*, 1994). Plusieurs stratégies ont été proposées afin d'échapper à la neutralisation des particules comme le masquage de l'enveloppe par l'enrobage des virions avec du PolyÉthylène glycol (PEG) (Yamada *et al.*, 2003) ou l'humanisation du système de production des particules (Cosset *et al.*, 1995 ; DePolo *et al.*, 1999 ; Takahashi *et al.*, 1999 ; Takahashi *et al.*, 2007).

Il a par ailleurs été démontré récemment que l'injection systémique d'un vecteur lentiviral induit la production d'interféron ( $IFN\alpha\beta$ ), en réponse à la stimulation d'une certaine classe de cellules dendritiques (Brown, Sitia *et al.*, 2007). De telles observations avaient déjà été réalisées *in vitro* sur des cellules dendritiques en culture (Fonteneau *et al.*, 2004 ; Beignon *et al.*, 2005), les résultats obtenus par l'équipe de L. Naldini confirment ces observations chez la souris avec des vecteurs lentiviraux dérivés du HIV. Les auteurs établissent également que cette réponse des cellules dendritiques est responsable d'une inhibition de la transduction dans les phases précoces du processus. En effet, le pourcentage de cellules exprimant le transgène dans le foie est très nettement supérieur après injection dans la circulation générale chez des souris  $IFN\alpha\beta R^{-/-}$  par rapport à des souris sauvages. Les mécanismes induisant une telle diminution de l'efficacité des vecteurs ne sont pas encore clairement identifiés. Il apparaît toutefois important d'approfondir leur étude afin de trouver des pistes pour en limiter les effets.

Si le groupe de Naldini a démontré que la réaction observée est propre au mécanisme de transduction par les particules lentivirales, les résultats de Pichlmair et coll. suggèrent qu'une fraction contaminante des vecteurs produits est également responsable d'une activation des cellules dendritiques, accompagnées d'une production d'interféron (Pichlmair *et al.*, 2007). Les auteurs ont en effet mis en évidence que, lors de la production de particules pseudotypées par la glycoprotéine VSV, des structures tubulo-vésiculaires sont formées et récupérées avec les particules vecteurs lors de la concentration par ultracentrifugation. Ces structures, composées

entre autre, d'acides nucléiques cellulaires et plasmidiques, sont spécifiquement responsables du déclenchement d'une réaction interféron après injection chez la souris. Les auteurs suggèrent également qu'il est possible d'éviter la formation de ces structures contaminantes en utilisant une méthode de production indépendante de la transfection. Les stocks produits n'induisent alors plus de production d'interféron. Cette étude met en évidence l'importance de la mise au point de méthodes de production standardisées en vue d'une application clinique des vecteurs lentiviraux.

#### **1.1.2.2.2. Réaction immunitaire acquise**

La réaction immunitaire acquise est spécifique et se fonde d'une part sur la production d'anticorps dirigés spécifiquement contre un antigène (réaction humorale), d'autre part sur une réaction cellulaire impliquant les lymphocytes T. Plusieurs éléments du vecteur peuvent déclencher une telle réaction : l'enveloppe, la capsid ou le produit du transgène, dans la mesure où celui-ci n'est pas reconnu comme faisant partie du soi. Par exemple, dans une stratégie de protection des neurones, où l'on surexprimera localement un facteur trophique déjà exprimé chez le patient, aucune réaction ne devrait être déclenchée contre le produit du transgène. Par contre, dans le cas de certaines maladies génétiques, le produit du transgène pourra être reconnu comme non soi, comme les facteurs de coagulation pour le traitement des hémophilies. Nous distinguerons la réaction préexistante à tout traitement de la réaction qui peut être induite à la suite de l'injection du vecteur.

La réaction préexistante, ou préimmunisation, concerne essentiellement l'enveloppe avec laquelle le vecteur a été produit. Par exemple, la préimmunisation contre la glycoprotéine du lyssavirus Mokola est quasi inexistante puisque très peu de cas de transmission à l'Homme de ce virus sont rapportés chaque année (Guseo *et al.*, 1981 ; von Teichman *et al.*, 1998 ; Inoue *et al.*, 2003). Par contre, l'utilisation de l'enveloppe d'un virus très répandu ou contre lequel la population est vaccinée, comme les virus de la varicelle ou de la rougeole, pourra être compromise à cause de la présence d'anticorps neutralisants dirigés contre leur enveloppe dans la population générale.

En absence de réaction préexistante, le système immunitaire peut développer une réponse spécifique suite à l'injection du vecteur. La production d'anticorps dirigés contre la capsid et l'enveloppe a été décrite par plusieurs groupes, après injection dans le cerveau (Baekelandt *et al.*, 2002 ; Abordo-Adesida *et al.*, 2005 et Sarkis *et al.*, données non publiées) ou après injection en périphérie (Park *et al.*, 2000 ; Follenzi *et al.*, 2004 ; Di Domenico *et al.*, 2005). Cette réaction n'est toutefois pas suffisante pour neutraliser les particules et empêcher la transduction.

De plus, il est possible de réadministrer le vecteur dans le cerveau avec la même efficacité de transduction, après une première injection dans le cerveau (Baekelandt *et al.*, 2002 ; Abordo-Adesida *et al.*, 2005 et Sarkis *et al.*, données non publiées), mais aussi après injection en périphérie (Kafri *et al.*, 1997 ; Abordo-Adesida *et al.*, 2005).

Il n'en va pas de même si l'on considère la périphérie. Il se produit après injection une réaction d'immunisation qui conduit rapidement à l'élimination des cellules qui expriment un gène rapporteur qui ne fait pas partie du soi et qui empêche toute nouvelle transduction en cas de réadministration du vecteur (Park *et al.*, 2000 ; Follenzi *et al.*, 2004 ; Di Domenico *et al.*, 2005).

Cette réaction est en partie dirigée contre la capsid - production d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid (p24) et la protéine matrice (p17) - mais surtout contre le produit du transgène puisque l'injection d'un même vecteur exprimant un transgène différent est efficace (Abordo-Adesida *et al.*, 2005). Cette réaction contre le transgène s'explique par le fait que l'injection systémique du vecteur permet la transduction des cellules présentatrices d'antigènes qui peuvent alors déclencher une réaction immunitaire très forte (Brown *et al.*, 2006 ; Brown *et al.*, 2007). Une telle réaction peut être mise à profit dans le cadre de stratégies de vaccination, mais elle sera délétère si l'objectif du transfert de gène est l'expression prolongée d'un transgène.

Afin de contrecarrer cette réaction, il est possible de supprimer l'expression du transgène dans les cellules présentatrices d'antigènes. Plusieurs stratégies ont été proposées, notamment par l'équipe de L. Naldini. Tout d'abord, l'utilisation de promoteur spécifique permet de restreindre l'expression du transgène aux cellules cibles (Follenzi *et al.*, 2004 ; Di Domenico *et al.*, 2006 ; van der Wegen *et al.*, 2006). D'autre part, en incorporant dans le 3' UTR du transgène une séquence reconnue par un microARN spécifique du lignage hématopoïétique, il est possible d'éteindre l'expression du transgène spécifiquement dans ces cellules (Brown *et al.*, 2006 ; Brown *et al.*, 2007). Ces deux approches réduisent considérablement l'induction d'une réponse immunitaire contre le vecteur ou contre les cellules exprimant le transgène. Elles permettent ainsi une expression persistante, même après injection systémique du vecteur.

### 1.1.2.3. Tropisme

Les rétrovirus sont des virus enveloppés, il est donc très aisé, par rapport aux vecteurs adénoviraux par exemple, de modifier leur tropisme en les pseudotypant, c'est-à-dire en les produisant avec une enveloppe différente de leur enveloppe originale (voir Bartosch et Cosset, 2004 pour revue). Initialement, les vecteurs rétroviraux ont été produits avec les enveloppes écotropes (n'infectent que les cellules murines) ou amphotropes (infectent les cellules murines et d'autres espèces) du MLV. Par la suite la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) a été utilisée pour (i) élargir leur tropisme et (ii) permettre la concentration des particules par ultracentrifugation. Puis, une multitude d'autres enveloppes ont été utilisées, pour pseudotyper tant les vecteurs oncorétroviraux que les vecteurs lentiviraux (HIV, SIV, FIV, EIAV). Chaque pseudotype présente des propriétés de tropisme variées. Quelques exemples sont décrits ci-dessous.

Comme mentionné précédemment, il peut être nécessaire de limiter la transduction des cellules hématopoïétiques afin de limiter la réponse immunitaire contre le transgène. Le pseudotypage

par la glycoprotéine gp64 du Baculovirus (Kumar *et al.*, 2003 ; Schaubert *et al.*, 2004 ; Kang *et al.*, 2005) ou du virus de la rivière Ross (Kahl *et al.*, 2005) permet de diminuer la transduction du lignage hématopoïétique, ce qui favorise l'échappement du vecteur et/ou transgène au système immunitaire. Au contraire, pour améliorer la transduction des cellules hématopoïétiques, par exemple dans le cadre de traitement de déficits immunitaires, on pourra utiliser un vecteur rétroviral pseudotypé par l'enveloppe du GALV (*Gibbon ape leukemia virus*) (Horn *et al.*, 2002 ; Muhlebach *et al.*, 2003) ou par l'enveloppe du virus endogène félin RD114 (Hanawa *et al.*, 2002 ; Sandrin *et al.*, 2002).

Concernant le système nerveux, l'utilisation de diverses enveloppes permet d'obtenir des profils d'expression très différents après injection du vecteur *in vivo* (Duisit *et al.*, 2002 ; Watson *et al.*, 2002 ; Bemelmans *et al.*, 2005 ; Balaggan *et al.*, 2006 ; Pertusa *et al.*, 2007). Ainsi, dans le cerveau l'enveloppe du virus rabique Mokola permettra un tropisme majoritairement glial (Pertusa *et al.*, 2007). De même, dans l'œil après injection dans l'espace sous-rétinien, les cellules transduites sont presque exclusivement celles de l'épithélium pigmentaire, cellules assimilées à la glie (Auricchio *et al.*, 2001 ; Duisit *et al.*, 2002 ; Bemelmans *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que la combinaison d'une enveloppe particulière et d'un promoteur spécifique permet de restreindre la transduction à un certain type cellulaire et de cibler précisément les neurones ou la glie. De plus, le pseudotypage des vecteurs lentiviraux par certaines enveloppes de virus rabiques peut leur conférer la propriété d'être transportés rétrogradement le long des axones. Cela a été observé plus particulièrement avec des vecteurs EIAV par le groupe OxfordBiomedica (Mazarakis *et al.*, 2001 ; Wong *et al.*, 2004) et plus récemment par un autre groupe avec un vecteur HIV, bien que moins efficacement qu'avec l'EIAV (Mentis *et al.*, 2006).

Au-delà de la simple substitution d'enveloppe, il est également possible de générer des glycoprotéines chimériques en combinant des éléments (domaines transmembranaire et cytoplasmique) de différentes origines, naturels ou chimériques, afin d'augmenter la stabilité de la glycoprotéine et l'infectiosité des particules ou d'en modifier le tropisme original (voir Bartosch et Cosset, 2004 et Waehler *et al.*, 2007 pour revue). Par exemple, la fusion avec des fragments d'anticorps reconnaissant certains antigènes particuliers, permet d'orienter les particules vers des récepteurs membranaires et ainsi cibler très spécifiquement, par exemple, des cellules tumorales (Chowdhury *et al.*, 2004) ou certaines cellules hématopoïétiques (Maurice *et al.*, 2002). Dans ce dernier exemple, l'anticorps ajouté est spécifique du TCR (*T cell receptor*). Il permet ainsi de conférer une spécificité pour les lymphocytes T mais aussi d'activer les cellules cibles, ce qui augmente l'efficacité de transduction. Suivant le même principe, des facteurs de croissance ont également été incorporés dans l'enveloppe afin d'augmenter la transduction des cellules hématopoïétiques (Verhoeyen *et al.*, 2003 ; Verhoeyen *et al.*, 2005).

### 1.1.3. Applications et perspectives

Les vecteurs oncorétroviraux ont été les premiers et sont restés pendant longtemps les vecteurs les plus utilisés dans les essais de transfert de gènes chez l'homme : 23% des essais menés ou en cours les ont utilisés ou les utilisent. Leur utilisation est néanmoins en recul dans les études précliniques actuelles, notamment au profit des vecteurs lentiviraux plus récemment développés et qui présentent l'avantage de transduire efficacement des cellules qui ne se divisent pas. De récentes données suggèrent la possibilité de faire évoluer les vecteurs oncorétroviraux afin de leur conférer cette propriété. Cette évolution sera dépendante de la réévaluation du dogme selon lequel l'infection des cellules qui ne se divisent pas par les oncorétrovirus est bloquée par la barrière infranchissable que constitue la membrane nucléaire pour le complexe de préintégration. Ils font également l'objet de nouveaux développements qui renforceront leur utilisation dans certains domaines : les particules semi répliquatives pour la cancérothérapie et les pseudo-particules vides (ne contenant pas de génome) pour la vaccination (Dalba *et al.*, 2007).

Ces vecteurs ont permis la première démonstration de l'efficacité de la thérapie génique dans le traitement de maladie métabolique génétique. Une dizaine d'enfants atteints d'un déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X de type 1 (X1-SCID) ont été traités avec succès par un vecteur MLV. Néanmoins, ce succès a également ébranlé la communauté des « thérapeutes géniques » en mettant à jour le potentiel oncogène de ces vecteurs. Bien qu'amplement décrit pour les virus dont ils dérivent, ce risque avait été largement sous-estimé pour les vecteurs oncorétroviraux. Les cancers survenus chez les patients au cours de l'essai X1-SCID ont déclenché un grand mouvement en vue de l'évaluation du risque de mutagenèse insertionnelle lié aux vecteurs rétroviraux. C'est probablement ce potentiel génotoxique qui limitera la généralisation de leur utilisation en l'état chez l'Homme. Le problème de mutagenèse insertionnelle sera développé en détail par la suite (voir [chapitre 1.3 p36](#)).

Développés beaucoup plus récemment que les vecteurs MLV, les vecteurs lentiviraux ne font actuellement l'objet que de 8 essais cliniques déclarés, dont la majorité sont des protocoles de vaccination (dont 5 contre le HIV) et un pour traiter une mucopolysaccharidose (type VII)<sup>3</sup>. Les premiers résultats d'un des essais contre le HIV sont positifs et confirment l'aptitude des vecteurs lentiviraux à transduire les cellules hématopoïétiques (Levine *et al.*, 2006). Ces résultats seront commentés plus en détail dans le [chapitre 4.2 p168](#).

L'efficacité de ces vecteurs a été démontrée chez l'animal dans le contexte de nombreuses pathologies, y compris des pathologies du système nerveux (voir Wong *et al.*, 2006 pour revue). Les vecteurs lentiviraux devraient donc faire l'objet de différentes études cliniques dans les années à venir. Les vecteurs lentiviraux sont aussi très largement utilisés pour des études plus

---

<sup>3</sup> Source : <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>, mise à jour janvier 2007

fondamentales, par exemple pour la création de lignées transgéniques, chez la souris, le rat, le porc et le mouton (voir Pfeifer, 2006 pour revue).

Un des intérêts majeurs des lentivirus réside dans leur capacité d'intégration dans le génome de la cellule transduite. De cette propriété résulte la stabilité de l'expression d'un transgène dans des cellules en division (ex : modification des cellules souches hématopoïétiques ou fabrication de lignées transgéniques). Toutefois, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, cette caractéristique est aussi à l'origine d'une de leurs principales limites : le risque de mutagenèse insertionnelle. Tout comme pour les vecteurs oncorétroviraux, ce risque n'a été investigué que récemment. Bien que les premiers résultats suggèrent que ce potentiel est bien moindre qu'avec les vecteurs oncorétroviraux, il ne doit certainement pas être négligé.

## 1.2. Mise en évidence du risque de génotoxicité

Le potentiel mutagène des oncorétrovirus est parfaitement connu depuis des décennies. Pourtant, les vecteurs dérivés de ces virus ont, pendant longtemps, été les plus utilisés. Ils étaient en effet les seuls à permettre l'expression stable d'un transgène dans des cellules en division du fait de leur intégration dans la chromatine de la cellule transduite. Pour bon nombre de pathologies, cette propriété est indispensable, notamment pour le traitement des déficits immunitaires qui requiert la modification des cellules souches hématopoïétiques.

Le risque de mutagenèse insertionnelle associé aux vecteurs rétroviraux est évoqué depuis de nombreuses années, notamment par Mulligan dans une revue datant de 1993 (Mulligan, 1993). Ce risque a pourtant été pendant longtemps considéré comme essentiellement théorique (Moolten et Cupples, 1992) et attribué exclusivement aux particules répliquatives. En effet, les seuls signes de génotoxicité rapportés étaient systématiquement associés à la formation de particules recombinantes (Donahue *et al.*, 1992 ; Vanin *et al.*, 1994 ; Purcell *et al.*, 1996). Ce n'est que très récemment qu'il a été mis en évidence au cours d'un essai clinique de traitement par transfert de gène d'un déficit immunitaire (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003a ; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b).

Les syndromes d'immunodéficience héréditaires ont été considérés comme modèle idéal pour la démonstration de l'efficacité de la thérapie génique chez l'Homme. Plusieurs essais de transfert de gènes, à l'aide de vecteurs rétroviraux, ont été menés pour le traitement de différents syndromes immunitaires : X1-SCID, CGD-SCID et ADA-SCID. Ces essais ont été positifs et suivis de résultats cliniques probants. Ils ont également, dans un certain nombre de cas, mis en évidence le risque de mutagenèse insertionnelle lié à l'intégration « aléatoire » des vecteurs rétroviraux. Ce chapitre rassemble les données cliniques accumulées sur ce risque.

### 1.2.1. Essais de thérapie génique du déficit immunitaire sévère lié à l'X de type 1

Le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X de type 1 (X1-SCID) est une déficience du système immunitaire induite par une mutation dans le gène  $\gamma C$  correspondant à une sous-unité commune de plusieurs récepteurs à interleukines. Cette mutation entraîne une absence de signalisation et en conséquence de profonds défauts de différenciation des cellules T et *natural killer*, ainsi que des perturbations des fonctions immunitaires remplies par les lymphocytes B. Concrètement, les patients ne possèdent pas de système immunitaire fonctionnel et sont condamnés à vivre dans un environnement stérile pour éviter tout contact avec un pathogène quelconque, contre lequel ils seraient totalement incapables de se défendre. En absence de prise en charge, ce déficit entraîne le décès dans la première année de vie. Le seul traitement efficace est une greffe de moelle osseuse d'un donneur HLA-identique, envisageable pour moins de 20% des malades. Dans certains cas, la greffe est pratiquée avec un donneur qui n'est pas totalement compatible, mais la reconstitution du lignage hématopoïétique n'est pas toujours complète ni stable, et le taux de mortalité reste élevé. C'est donc une pathologie pour laquelle le rapport bénéfice/risque est tout à fait en faveur d'un traitement par thérapie génique.

Depuis le début des années 1990, plusieurs équipes ont travaillé à la validation d'une approche par transfert de gènes, fondée sur l'utilisation de vecteurs MLV, les premiers vecteurs intégratifs disponibles. Les résultats obtenus au cours de ces différentes études furent tout à fait encourageants. Elles montrent effectivement que la greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues transduites *ex vivo* par un vecteur exprimant le gène  $\gamma c$  permet la reconstitution d'un système immunitaire fonctionnel. Les résultats sont d'autant plus probants que les cellules greffées et modifiées bénéficient d'un fort avantage sélectif.

Plusieurs essais cliniques ont donc été lancés, dans un premier temps par l'équipe de A. Fischer en France (Hôpital Necker Enfants Malade, Paris), puis par l'équipe de A. Thrasher en Grande Bretagne (University College London, Londres). Les premiers patients atteints de X1-SCID ont été traités par transfert de gène en 1999 et le succès de l'approche a été confirmé puisque les enfants traités ont récupéré un système immunitaire fonctionnel après la greffe (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000 ; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002 ; Gaspar *et al.*, 2004). Sur les 14 patients traités entre 1999 et 2002, 12 ont pu retrouver une vie normale après reconstitution de leur système immunitaire. Ils ont été suivis régulièrement après le traitement. En particulier, l'analyse des sites d'intégration du vecteur a révélé à la fois la modification des cellules CD34+ pluripotentes par le vecteur et une colonisation polyclonale de leur système hématopoïétique.

Néanmoins, l'émergence d'un clone particulier de lymphocytes a été observée au printemps 2002 chez un des patients « français » traités en 1999. La prolifération de ce clone s'est accélérée et le patient a déclaré un syndrome de type leucémique. Un second cas très similaire a été observé

quelques mois plus tard (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003a). Les deux patients ont été traités par chimiothérapie.

L'analyse des cellules hématopoïétiques de ces deux patients a rapidement révélé une prolifération clonale de cellules ayant subi une intégration du vecteur dans ou à proximité du même proto-oncogène LMO-2, un facteur de transcription hématopoïétique fréquemment impliqué dans les leucémies T aiguës de l'enfant. Ces intégrations ont conduit à une expression aberrante du gène LMO2 dans les cellules matures, expression qui est vraisemblablement à l'origine de l'effet indésirable (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b). Plusieurs altérations chromosomiques ont également été identifiées dans les clones leucémiques : trisomie 6 partielle, fusion SIL-TAL1 et trisomie 10. D'autres facteurs ont probablement aussi joué un rôle, notamment des stimulations antigéniques particulières et/ou une prédisposition familiale.

Un troisième patient a, à son tour, déclaré un syndrome comparable aux deux premiers, également environ 3 ans après la greffe (Frederickson *et al.*, 2005). Plusieurs intégrations ont été caractérisées dans les cellules leucémiques – dont une au locus LMO2 – si bien qu'il est difficile d'identifier précisément la contribution des différents événements (Frederickson *et al.*, 2005). D'autre part, l'analyse des sites d'intégration chez l'ensemble des patients traités révèle que deux autres patients présentent un clone ayant une intégration au locus LMO2 (Deichmann, Hacein-Bey-Abina, Schmidt, Garrigue *et al.*, 2007). Enfin, un quatrième cas a été rapporté récemment, environ 6 ans après la greffe (voir Baum, 2007). Les analyses sont en cours pour identifier le/les événements impliqués dans la transformation leucémique.

De façon surprenante, aucun événement de ce type n'est décrit chez les quatre patients « britanniques » avec maintenant plus de 3 ans de recul (les complications se sont manifestées 30 mois et 60 mois après le traitement chez les patients « français »). De plus, ni l'analyse du locus LMO2 chez les 4 patients « britanniques » ni le séquençage de plus de 200 régions flanquantes de provirus n'ont révélé d'intégration dans ce locus, contrairement aux cinq événements isolés dans ce locus chez les dix patients « français » (Gaspar *et al.*, 2004 ; Schwartzwaelder, Howe, Schmidt *et al.*, 2007). De façon plus générale, l'étude de la répartition des sites d'intégration révèle des profils distincts dans les deux études. En effet, en dehors de l'absence d'intégration au locus LMO2 chez les patients « britanniques », les sites fréquents d'intégration (CSI pour *common integration sites*, définis comme les loci où des événements d'intégration distincts ont pu être mis en évidence dans différentes cellules) identifiés chez les patients « français » présentent plus d'intégrations que ceux identifiés chez les patients « britanniques ».

Qu'elles qu'en soient les causes, la transduction n'a donc pas eu les mêmes conséquences sur les cellules dans les deux essais. Une autre illustration de cette différence réside dans la cinétique de reconstitution du système hématopoïétique. La reconstitution des lymphocytes T a été beaucoup plus rapide chez les patients « français » (3 à 4 mois pour les patients ayant déclaré un syndrome leucémique, 4 à 6 mois pour les autres (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b)) que chez les patients « britanniques » (jusqu'à 10 mois de multiplication (Gaspar *et al.*, 2004)).



Quelques différences sont observées entre les deux protocoles X1-SCID français et britannique, notamment l'utilisation de sérum de veau fœtal (SVF) dans le milieu de conditionnement utilisé pour la culture des cellules, la concentration d'interleukine 3 (IL 3) ou l'enveloppe du vecteur (voir [Tableau 1](#)), mais ces différences ne sont pas, selon les auteurs, la piste privilégiée pour expliquer les écarts de toxicité observés (Gaspar *et al.*, 2004). En ce qui concerne le conditionnement, aucune donnée ne permet de trancher. Quant à l'enveloppe, une étude a comparé le profil des sites d'intégration de vecteurs HIV produits avec l'enveloppe VSV ou l'enveloppe sauvage et aucune différence n'a été mise en évidence (Barr *et al.*, 2006).

**Tableau 1 : Comparatif des protocoles « français » et « britannique » des essais de transfert de gènes pour le traitement du X1-SCID.** D'après Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000 et Gaspar *et al.*, 2004. \* : âge des patients ayant déclaré un syndrome de type leucémique ; \*\* : âge de tous les patients inclus dans l'essai.

	Essai « français »	Essai « britannique »
Age des patients	1 mois, 3 mois, 9 mois *	4 mois, 10 mois, 10 mois, 33 mois **
Cellules	Cellules CD34+ du patient mises en culture à 0,5.10 <sup>6</sup> cellules / mL	Cellules CD34+ du patient mises en culture à 0,5.10 <sup>6</sup> cellules / mL
Milieu de conditionnement	Milieu « X vivo 10 »	Milieu « X vivo 10 »
	4% sérum de veau foetal	
		1% sérum albumine humaine
	300ng/mL Stem cell factor	300ng/mL Stem cell factor
	100ng/mL polyéthylène glycol-megakaryocyte differentiation factor	
	60ng/mL interleukine 3	20ng/mL interleukine 3
	300ng/mL Flt3 ligand	
	100ng/mL thrombopoïétine	
Durée du conditionnement	24h à 37°C	40h à 37°C
Vecteur	pMFG-ampho	pMFG-GALV
Transduction	3x en 72h	3x en 56h
Durée totale de culture	96h	96h

D'autres facteurs peuvent être considérés. L'âge des patients, par exemple, est un facteur déterminant puisque les patients X1-SCID, s'ils sont traités jeunes, sont guéris, alors que le traitement de patients plus âgés (15/20 ans) est infructueux (Thrasher *et al.*, 2005). Le transgène lui-même peut être impliqué puisqu'en rétablissant la signalisation interleukine, il participe à la prolifération des cellules transduites. Il confère un avantage prolifératif fort, ce qui constitue également un facteur important du succès de la thérapie.

On peut également se demander pourquoi rien de tel n'avait été décrit au cours des essais précliniques ? *A posteriori*, deux éléments de réponses peuvent être proposés. Tout d'abord, les quantités de cellules utilisées chez l'Homme ne sont en rien comparables au nombre de cellules greffées chez la souris. Statistiquement, la possibilité d'observer ce type d'événements est donc accrue chez l'Homme. Par exemple, si l'on considère le nombre de cellules greffées (> 10<sup>6</sup> cellules

/ kg) et la fréquence d'intégration aléatoire dans un locus donné ( $< 10^{-5}$ ), chaque patient peut théoriquement avoir reçu entre 1 et 10 cellules ayant subi une intégration dans un même locus (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b) Le facteur « temps » peut également être invoqué : les premiers effets ont été observés au minimum 30 mois après la greffe chez les patients X1-SCID, soit bien au-delà de l'espérance de vie d'une souris. Ces résultats ont donc mis en évidence le manque de pertinence des modèles utilisés pour valider l'absence de toxicité et le besoin de réévaluation précise du risque de mutagenèse insertionnelle.

### 1.2.2. Essai de thérapie génique de la maladie granulomateuse chronique

La maladie granulomateuse chronique (CGD-SCID) est un déficit immunitaire lié à l'X, assez proche du X1-SCID décrit précédemment. Elle affecte la population des cellules neutrophiles. Une approche similaire de thérapie génique a été mise en place pour cette maladie : des cellules CD34+ du patient sont prélevées et transduites *ex vivo* par un vecteur oncorétroviral dérivé du MLV pour rétablir l'expression de la NADPH-oxydase déficiente et ainsi rétablir la production des radicaux libres nécessaires à l'activité anti-microbienne. Deux patients ont été traités avec un bénéfice thérapeutique (Malech *et al.*, 2004). L'analyse des sites d'intégration dans les différentes lignées hématopoïétiques a mis en évidence un profil de repopulation initialement polyclonal.

Toutefois, il a récemment été rapporté que le profil de cellules hématopoïétiques tend vers une diminution de la polyclonalité (Ott *et al.*, 2006). Les clones émergents ont été analysés et il s'avère que 80% d'entre eux présentent des événements d'intégration dans trois sites fréquents d'intégration (CSI) précédemment décrits (Suzuki *et al.*, 2002) dont une très grande majorité dans le locus MDS1-EV11. Ces CSI ont été identifiés dans des modèles de lymphomes murins et sont donc potentiellement impliqués dans l'apparition de cancers. En particulier, MDS1-EV11 est fréquemment impliqué dans des translocations associées à des leucémies myéloïdes chez l'homme et chez la souris. L'analyse de la transcription de ces gènes dans les cellules des patients par rapport à des cellules contrôles montre que, dans certains cas, l'intégration induit une surexpression. Toutefois, après mise en culture, aucun des prélèvements des patients n'a montré un potentiel d'auto-renouvellement anormal.

Bien que les patients n'aient pas développé de cancers, cette description n'est pas sans rappeler les observations faites au cours de l'essai de thérapie génique X1-SCID « français ». En effet, les patients ayant déclaré une leucémie après le traitement montraient initialement un profil diversifié, progressivement de plus en plus restreint jusqu'à ce qu'un des clones devienne finalement majoritaire et évolue définitivement en tumeur (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b).

Il serait nécessaire de suivre les patients à plus long terme afin de valider l'absence de toxicité. Or seuls 2 patients ont été traités par ce protocole et l'un des deux est décédé 2,5 ans après la greffe,

après un effondrement de l'expression du transgène (résultats présentés par Grez *et al.* au 14<sup>th</sup> annual meeting of the European Society of Gene Therapy, 2006). Les auteurs ont démontré que l'extinction du transgène est la conséquence de la méthylation du LTR 5' (voir chapitre 1.3.2.3 p43). Les conclusions de cet essai quant à l'absence de génotoxicité, suggérées par les auteurs, sont donc à considérer avec beaucoup de précautions.

### 1.2.3. Essais de thérapie génique de la déficience en adénosine déaminase

La déficience en adénosine déaminase se traduit par un déficit immunitaire combiné sévère (ADA-SCID). Ce fut la première maladie initialement considérée pour un traitement par thérapie génique. Plusieurs essais *ex vivo* ont été menés en suivant une approche similaire à celle décrite précédemment : transduction *ex vivo* de cellules souches hématopoïétiques du patient par un vecteur dérivé du MLV et infusion de ces cellules (Blaese *et al.*, 1995 ; Bordignon *et al.*, 1995 ; Kohn *et al.*, 1995 ; Hoogerbrugge *et al.*, 1996 ; Onodera *et al.*, 1998). Ces différentes études rapportent des résultats encourageants avec une persistance plus ou moins longue du génome viral chez les patients traités par transfert de gène. Cependant, les bénéfices directs de la thérapie génique sont difficiles à identifier puisque tous les patients recevaient également un traitement de remplacement de l'enzyme par de la polyéthylène glycol-adénosine déaminase bovine (PEG-ADA).

Afin de palier au manque d'efficacité du traitement observé au cours des différents essais décrits, le groupe de C. Bordignon a adopté le protocole optimisé de transduction des cellules hématopoïétiques décrit par l'équipe de A. Fischer (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Trois patients ont été traités avec ce nouveau protocole et ont pu retrouver une vie normale, en absence de traitement complémentaire PEG-ADA (Aiuti *et al.*, 2002 ; Gaspar *et al.*, 2006).

Les sites d'intégration ont été analysés pour un de ces patients et l'analyse révèle, 2 ans après greffe, une constitution polyclonale du lignage hématopoïétique. Aucune donnée n'est disponible sur les patients greffés antérieurement, si ce n'est que la quantité d'ADN vecteur est stable. De plus, aucune complication comparable à celles rapportées par l'équipe de A. Fischer n'a été observée. Toutefois, le nombre de patients ayant été traités avec succès (4) est faible et n'est peut-être pas suffisant pour observer d'éventuels effets délétères. Toute conclusion est donc également à considérer avec prudence.

Les sites d'intégration ont été analysés chez les patients traités par Kohn et coll. (Kohn *et al.*, 1995 ; Kohn *et al.*, 1998). Les analyses ont été réalisées sur des prélèvements effectués régulièrement pendant huit ans après la greffe (Schmidt *et al.*, 2003). De la même façon qu'au cours des essais X1-SCID et CGD, les événements d'intégration sont initialement polyclonaux puis le profil évolue vers la monoclonalité. Cependant, l'analyse des TCR de ces cellules montre de

multiples réarrangements. Il est donc vraisemblable que ces cellules ne sont pas issues d'une expansion clonale périphérique comme cela a été observé chez les autres patients des essais X1-SCID et CGD, mais de l'expansion d'une cellule immature au niveau de la moelle osseuse ou du thymus. De plus, les événements d'intégration isolés ne sont pas communs aux deux patients.

### 1.3. Réévaluation du risque de génotoxicité

Les différents résultats cliniques décrits présentent un certain nombre de disparités. Sont-elles dues à des différences entre les protocoles ou à des facteurs propres aux différentes maladies ? En particulier, les divergences entre les protocoles « français » et « britannique » de traitement du X1-SCID restent à expliquer. Ces études ont donc surtout soulevé beaucoup de questions, comme celle de l'existence de points chauds ou *hot spot* d'intégration (LMO2, EVI1). Elles ont mis en évidence le besoin d'évaluation des risques de génotoxicité et plus encore de compréhension des mécanismes impliqués.

Une des plus grandes craintes dans le domaine de la thérapie génique par vecteurs viraux est la formation de particules recombinantes répliquatives. De façon surprenante, le risque de mutagenèse insertionnelle, bien qu'envisagé, est longtemps resté une préoccupation de second ordre, surtout théorique. Pourtant, le pouvoir oncogène des rétrovirus, comme le MLV, était parfaitement connu, en particulier le rôle du LTR dans le processus de transformation. Les effets observés chez les patients atteints de X1-SCID traités avec un vecteur MLV ne sont donc, *a posteriori*, pas surprenants. Toutefois, la transformation d'une cellule humaine ne peut être le résultat de la seule activation d'un oncogène suite à l'intégration d'un génome rétroviral. Il faut la coïncidence de plusieurs « accidents génétiques » pour qu'il y ait apparition d'une tumeur. Ces accidents supplémentaires ont pu, en partie, être favorisés par le contexte X1-SCID des patients, mais ils peuvent également être liés à des facteurs indépendants, comme le vecteur, son profil d'intégration ou encore le transgène.

Le chapitre suivant dresse un bilan des données disponibles sur un certain nombre de ces facteurs de risques. En premier lieu, nous aborderons la répartition des sites d'intégration, les différentes méthodes d'analyse et les résultats obtenus. Nous nous attacherons ensuite à décrire les facteurs qui influencent les conséquences de la transduction. Nous traiterons d'abord la question du contexte particulier de X1-SCID et de l'importance du transgène  $\gamma$ c, puis des facteurs liés aux vecteurs, que ce soit sa nature (oncorétrovirale ou lentivirale) ou les éléments qu'il contient, notamment la nature du promoteur. Enfin, il sera question de l'importance de la nature des cellules cibles et des risques de dissémination du transgène.

### 1.3.1. Étude de la répartition des sites d'intégration

L'analyse des sites d'intégration des rétrovirus ainsi que l'interprétation des données recueillies ont longtemps été ralenties pour plusieurs raisons :

- les protocoles expérimentaux étaient particulièrement lourds et ne permettaient de caractériser que quelques sites (Mooslehner *et al.*, 1990 ; Scherdin *et al.*, 1990) à quelques dizaines de sites (Carteau *et al.*, 1998) ;
- les protocoles expérimentaux se fondaient sur la sélection de cellules résistantes avant l'analyse des sites d'intégration, cette sélection pouvait introduire des biais (ex : résistance au G418) ;
- les génomes humain et murin n'étaient pas séquencés en totalité et ils étaient peu annotés (positionnement des différents éléments tels que les îlots CpG, les régions transcrites, les sites d'initiation de la transcription ou encore les régions d'hypersensibilité à la DNase).

La description des événements de mutagenèse insertionnelle chez l'homme a eu pour conséquence un effort de recherche accru en vue du développement des outils nécessaires à l'évaluation de la répartition des sites d'intégration des rétrovirus. Parallèlement à l'augmentation permanente du nombre de données de séquençage et des annotations génomiques, de nombreuses avancées ont été réalisées, tant en biologie moléculaire qu'en bioinformatique. Elles ont permis d'identifier des centaines de sites d'intégration et d'analyser les données générées. Les différentes techniques mises au point et les résultats de ces études font l'objet du présent chapitre.

#### 1.3.1.1. Les techniques d'analyse des sites d'intégration

Différentes approches ont été utilisées, fondées sur le séquençage des régions flanquantes des sites d'intégration ou sur l'utilisation de vecteurs dépourvus de promoteur pour évaluer la capture de promoteur dans les cellules transduites. Différents vecteurs ont été analysés : oncorétrovirus (MLV), lentivirus (HIV-1 et -2, SIV, FIV, EIAV, ASLV) ou foamy virus. L'influence de l'enveloppe a également été évaluée. Les études ont été réalisées *in vivo* (chez l'Homme, le primate non-humain ou la souris) ou *in vitro* sur des lignées établies ou des cultures primaires de diverses origines (murines, aviaires, humaines), dans des cellules en division ou en arrêt de division. Les cellules ont été analysées avec ou sans sélection. Toutes ces données ont été rassemblées dans plusieurs revues (voir Bushman *et al.*, 2005 ; Mitchell *et al.*, 2004 et Berry *et al.*, 2006 pour revue). Enfin, les résultats d'une méta-analyse approfondie des événements d'intégration identifiés chez les patients inclus dans les différents essais cliniques décrits précédemment ont été publiés très récemment (Aiuti *et al.*, 2007 ; Deichmann, Hacein-Bey-Abina, Schmidt, Garrigue *et al.*, 2007 ; Schwartzwaelder, Howe, Schmidt *et al.*, 2007).

Les premiers travaux publiés ont été ceux de Schroder et coll. et Wu et coll.. Ils concernaient l'analyse des sites d'intégration des vecteurs MLV et HIV dans le génome humain (Schroder *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2003). Par la suite, deux groupes ont particulièrement contribué à l'accumulation des données. Tout d'abord l'équipe de C. von Kalle et M. Schmidt qui a largement participé à l'identification des sites d'intégration par la technique de LAM-PCR (*Linear amplification mediated PCR*) (Schmidt *et al.*, 2001 ; Schmidt *et al.*, 2002), notamment en collaboration avec l'équipe de A. Fischer (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b ; Bester *et al.*, 2006) ou le groupe de DB. Kohn (Schmidt *et al.*, 2003). Cette technique dérive des méthodes développées, en partie au laboratoire, pour l'analyse des ARNm (Frohman *et al.*, 1988 ; Delort *et al.*, 1989), et permet l'amplification de séquences dont une seule extrémité est connue. L'amplification est réalisée à l'aide d'un *linker* de séquence connue ajouté à l'extrémité inconnue de la séquence d'intérêt. Le laboratoire de F. Bushman a également proposé une technique de séquençage des régions flanquantes à haut débit (Margulies *et al.*, 2005) et a grandement participé à l'analyse de l'ensemble des données publiées (Mitchell *et al.*, 2004 ; Berry *et al.*, 2006).

La plupart de ces études ont comparé le profil d'intégration des vecteurs avec un profil d'intégration « au hasard » généré *in silico* (par informatique). Elles concluent à l'existence d'un biais d'intégration dans certaines régions du génome. Ce biais d'intégration a également été confirmé par comparaison à un profil d'événements d'intégration générés par transfection (De Palma *et al.*, 2005 ; Trobridge *et al.*, 2006). Ces observations attestent donc d'un déterminisme lié à la machinerie virale dans le choix des sites d'intégration qui n'est donc pas le simple résultat d'une accessibilité variable de la chromatine, comme on a pu le penser initialement.

Avec le recul, certains biais propres aux méthodes employées ont été mis en évidence. Par exemple, l'équipe de F. Bushman a montré que l'analyse des sites d'intégration avant ou après une éventuelle sélection ne donne pas tout à fait les mêmes résultats (Berry *et al.*, 2006 ; Lewinski *et al.*, 2006). Toutefois, les différences observées sont faibles et ne changent pas les grandes tendances décrites.

### **1.3.1.2. Les résultats**

#### **1.3.1.2.1. Résultats généraux**

En résumé, les résultats convergent vers une corrélation positive entre intégration et expression, quel que soit le vecteur. Plus précisément, les vecteurs MLV s'intègrent à proximité des sites d'initiation de la transcription, tandis que les intégrations des lentivirus et des foamy virus semblent réparties de façon plus homogène sur l'ensemble de l'unité transcriptionnelle. Les vecteurs ASLV présentent le biais le plus faible pour les régions transcrites. Au contraire, les régions de chromatine fermée comme les télomères ou les centromères sont très défavorisées. Cette préférence des rétrovirus pour les régions transcrites est accentuée dans les cellules en division et l'intégration est plus fréquente dans les séquences effectivement transcrites dans la

cellule considérée au moment de l'infection (voir Berry *et al.*, 2006 pour revue ; Deichmann, Hacein-Bey-Abina, Schmidt, Garrigue *et al.*, 2007).

D'autre part, les caractéristiques décrites sont conservées quelle que soit l'origine des cellules transduites. Par exemple, le profil d'intégration des vecteurs ASLV est identique dans des cellules humaines et dans des cellules de poulet, de la même façon, l'intégration du MLV est similaire dans des cellules murines et humaines.

#### **1.3.1.2.2. Hot spots ?**

Une analyse plus précise des sites d'intégration identifiés chez les patients des deux essais de thérapie génique X1-SCID ainsi que de nouveaux sites générés par transduction de cellules HeLa suggère que le MLV s'intègre plus préférentiellement dans des sites dits fragiles (Bester *et al.*, 2006). Ces sites ont été précédemment décrits par Popescu et coll. et correspondent à des loci où de fréquentes modifications (élongation, translocation, intégration de virus oncogènes ADN) ont été décrites et associées à des cancers (Popescu, 2003). Le gène LMO2 appartient à un de ces sites fragiles et plusieurs autres intégrations ont été identifiées dans cette même région.

Toujours concernant les vecteurs MLV, Calmels et coll. rapportent une analyse de sites d'intégration chez des singes normaux greffés avec des cellules transduites par un vecteur exprimant un gène rapporteur donc n'apportant, en principe, aucun avantage sélectif (Hematti *et al.*, 2004 ; Calmels *et al.*, 2005). Les auteurs mentionnent la surreprésentation du locus MDS1/EV11, ciblé par 14 intégrations sur les 702 identifiées chez 9 animaux, soit 2% des événements. La probabilité théorique d'un tel événement dans le cas d'une intégration aléatoire est de  $1,7 \cdot 10^{-34}$  ! Le locus EV11 a également été identifié dans d'autres études (Morishita *et al.*, 1988 ; résultats présentés par Brugman *et al.* au 14th annual meeting of the European Gene Therapy, 2006 ; résultats présentés par Modlich *et al.* au 14th annual meeting of the European Gene Therapy, 2006b) et de façon tout à fait surprenante, il s'agit aussi du locus majoritaire retrouvé chez les patients de l'essai CGD décrit précédemment (Ott *et al.*, 2006).

Une telle surreprésentation de ces loci particuliers ne peut être le résultat de phénomènes aléatoires et implique l'existence de certains mécanismes, dont l'action peut se situer à plusieurs niveaux. Un premier mécanisme peut agir au niveau de la sélection des sites et biaiser l'intégration dans ces loci particuliers. Il peut également s'agir d'une pression de sélection qui induit la prolifération préférentielle des cellules ayant subi une intégration dans ces sites, LMO2 ou EV11. Ces mécanismes seront discutés dans les chapitres suivants.

#### **1.3.1.2.3. Capture de promoteur**

De Palma et coll. ont réalisé des expériences de capture de promoteurs. Ils ont utilisé des vecteurs MLV et HIV dépourvus de promoteur pour transduire des cellules. Dans ces conditions,

l'expression du transgène nécessite l'intégration à proximité d'un promoteur cellulaire. Ces travaux révèlent que le MLV s'intègre beaucoup plus fréquemment que le HIV à proximité de promoteurs cellulaires (De Palma *et al.*, 2005). Ceci est en accord avec le fait que le MLV s'intègre préférentiellement à proximité des sites d'initiation de la transcription. De façon intéressante, les auteurs rapportent également que l'expression du transgène par le promoteur capturé est plus efficace pour les vecteurs MLV que pour les vecteurs HIV. Ces résultats sont confirmés dans des cellules souches hématopoïétiques. Bien que les vecteurs HIV transduisent plus efficacement ces cellules, la capture de promoteur reste plus efficace avec les vecteurs MLV.

#### **1.3.1.2.4. Influence de l'enveloppe**

Une étude de Barr et coll. a également évalué l'influence de la voie d'entrée du vecteur dans la cellule sur son profil d'intégration (Barr *et al.*, 2006). Les auteurs ont comparé la répartition des sites d'intégration d'un vecteur HIV produit avec son enveloppe sauvage et d'un vecteur HIV pseudotypé par l'enveloppe VSV (voie des endosomes). Aucune différence dans le profil d'intégration n'a été mise en évidence.

#### **1.3.1.2.5. Mécanismes viraux de sélection des sites d'intégration**

Contrairement à ce qui était initialement admis, il se dégage des analyses de répartition des sites d'intégration que certains contextes chromatinien sont plus favorables que d'autres à l'intégration des rétrovirus. De plus, ces sites préférentiels sont dépendants de la nature du virus. Ce choix est probablement crucial pour la réplication du virus. L'intégration étant largement favorisée dans les régions transcrites et plus particulièrement dans les régions transcrites au moment de la transduction (Aiuti *et al.*, 2007 ; Deichmann, Hacein-Bey-Abina, Schmidt, Garrigue *et al.*, 2007 ; Schwartzwelder, Howe, Schmidt *et al.*, 2007), le risque de mutagenèse insertionnelle est en réalité beaucoup plus élevé que ce qui avait été initialement estimé.

Des données ont été apportées sur les mécanismes qui favorisent ces biais d'intégration (voir Ciuffi *et al.*, 2005 ; Lewinski *et al.*, 2006 ; Van Maele *et al.*, 2006 pour revue). En ce qui concerne les éléments viraux, l'intégrase joue un rôle majeur ainsi que, dans une moindre mesure, la polyprotéine *gag* (Lewinski *et al.*, 2006). Des facteurs cellulaires sont également impliqués, en particulier le LEDGF pour le HIV (Ciuffi *et al.*, 2005 ; Emiliani *et al.*, 2005 ; Llano *et al.*, 2006). Il jouerait un rôle de « pont » entre le CPI, *via* une interaction directe avec l'intégrase, et la chromatine à laquelle il se fixe en tant que facteur de la transcription.

L'identification récente de certains de ces mécanismes qui orientent l'intégration des lentivirus (voir Lewinski *et al.*, 2006 ; Van Maele *et al.*, 2006 pour revue) devrait faciliter le développement d'outils de transfert de gènes plus sécurisés dont le profil d'intégration serait contrôlé. Par exemple, l'équipe de F. Bushman a récemment publié l'utilisation d'une fusion du facteur LEDGF



avec le fragment de liaison à l'ADN du répresseur du phage  $\lambda$  afin de diriger l'intégration dans la séquence cible du répresseur (Ciuffi *et al.*, 2006). Le ciblage de l'intégration, réalisée *in vitro*, est encore extrêmement limité, mais ces premiers résultats sont encourageants.

## 1.3.2. Autres facteurs de risque

### 1.3.2.1. Les modèles d'étude

Le développement d'une tumeur fait intervenir plusieurs événements au sein de la même cellule qui, ensemble, conduisent à son immortalisation. La cellule possède de multiples moyens de contrôle afin d'éviter toute transformation. Dans les lymphocytes, par exemple, la surexpression du gène *c-myc* induit la voie Arf qui conduit la cellule vers la voie de l'apoptose avant qu'elle ne prolifère (Zindy *et al.*, 1998). Le gène Arf est dit suppresseur de tumeur. Dès lors, si dans cette même cellule, cette voie n'est pas fonctionnelle, la cellule échappe à tout contrôle et prolifère. Ainsi, des mutations de cette voie sont fréquemment impliquées dans des tumeurs chez l'Homme.

Dans le cas des enfants X1-SCID, un événement de cet ordre est envisageable. Un événement initial, comme l'insertion du vecteur dans un locus particulier, engendre une prolifération clonale. Cette prolifération est d'autant plus favorisée que les cellules bénéficient d'un avantage sélectif avéré. Dans la plupart des cas, cette prolifération pourra être enrayée par apoptose, par exemple par la voie Arf/p53. Cependant, les cellules dans lesquelles un autre « accident génétique » (mutation spontanée, autre événement d'intégration) aura inactivé les mécanismes de déclenchement de l'apoptose, pourront survivre et proliférer.

La coïncidence des diverses altérations génétiques nécessaires est trop faible chez la souris pour permettre une évaluation précise du risque de mutagenèse insertionnelle. En effet, aucun des essais préalables n'a rapporté de tels événements en raison, probablement, du nombre trop faible de cellules greffées et/ou de la durée de vie des animaux. De nouveaux modèles plus prédictifs, permettant de mettre en évidence ces événements et les mécanismes impliqués, ont récemment été proposés.

Ces nouvelles approches ont pour but d'augmenter la sensibilité des essais. Une première stratégie a pour but d'« allonger » artificiellement la durée de vie des souris en greffant les cellules dans une première souris, puis de la première à une deuxième souris, *etc* (Li *et al.*, 2002 ; Kustikova *et al.*, 2005 ; Kustikova *et al.*, 2007). Une deuxième stratégie consiste à augmenter la fréquence des tumeurs en utilisant des modèles de prédisposition au cancer qui présentent des déficiences dans les voies de l'apoptose (Lund *et al.*, 2002 ; Montini *et al.*, 2006 ; Shou *et al.*, 2006).

Ces modèles animaux, ainsi que des modèles d'étude de prolifération cellulaire *in vitro*, ont permis l'identification de nombreux facteurs de risque. Certains facteurs sont propres à la thérapie du SCID- X1. L'implication directe du transgène a par exemple été suggérée (voir Baum

*et al.*, 2006 ; Nienhuis *et al.*, 2006 pour revue). D'autres facteurs sont directement liés aux vecteurs rétroviraux ou aux éléments qu'ils contiennent, comme le promoteur. Les résultats de ces études sont présentés ci-après.

### 1.3.2.2. Cas particulier du traitement X1-SCID

Chez les patients X1-SCID, le transgène lui-même a été un facteur de risque important. En effet, le locus IL2RG ( $\gamma$ C) est lui-même connu pour être un oncogène. La base de donnée *Mouse Retroviral Tagged Cancer Gene Database* qui regroupe environ 3 000 sites d'intégration de rétrovirus, isolés à partir de tumeurs hématopoïétiques chez la souris, répertorie 2 tumeurs impliquant ce locus. De façon tout à fait intéressante, Dave et coll. soulignent qu'une de ces deux tumeurs implique également le locus LMO2 (Dave *et al.*, 2004). Ces deux gènes, LMO2 et IL2RG, sont également impliqués dans les cas de leucémie chez les patients X1-SCID traités par transfert de gènes. Une telle coïncidence, hautement improbable statistiquement, pourrait s'expliquer par une coopération des deux oncogènes. Ces deux gènes pourraient s'activer mutuellement et finalement induire la transformation de la cellule. Bien qu'ils ne soient pas très bien compris, de tels mécanismes de co-sélection ont déjà été observés dans des leucémies chez la souris, par exemple avec MEISS1 et HOXA9 (Nakamura *et al.*, 1996). Un phénomène de coopération comparable pourrait aussi être impliqué dans le cas de l'essai de thérapie génique CGD où il aurait conduit à la présence systématique d'événements d'intégration dans le locus EVI1 chez les patients. Toutefois, Hacein-Bey et coll. ont rapporté que l'expression de  $\gamma$ C à la surface des cellules leucémiques était d'un niveau normal (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003b).

Par la suite, une communication publiée dans Nature par Woods et coll. a suggéré une implication directe du transgène dans les complications observées chez les patients (Woods *et al.*, 2006). Les auteurs ont comparé la fréquence de tumeurs dans un modèle de souris X1-SCID après greffe de cellules hématopoïétiques non-modifiées (contrôle négatif) ou transduites par un vecteur lentiviral exprimant un gène rapporteur GFP (contrôle négatif), le facteur de transcription LMO2 (contrôle positif) ou le gène  $\gamma$ C. Les auteurs ne rapportent aucune tumeur dans les groupes témoins négatifs, même après 18 mois d'observation des animaux. L'incidence de tumeurs dans le groupe témoin positif est de 50% et de 33% dans le groupe  $\gamma$ C. Il est important de noter que les premières tumeurs se sont manifestées à partir du 6<sup>e</sup> mois après greffe, soit au-delà de la durée de la plupart des expérimentations antérieures. Ces résultats révèlent deux éléments importants. Tout d'abord, la transduction par un vecteur lentiviral elle-même ne semble pas modifier la prolifération des cellules, point qui sera abordé plus en détail dans le chapitre relatif aux vecteurs lentiviraux (voir [chapitre 1.3.2.4 p46](#)). De plus, ils suggèrent que l'expression de  $\gamma$ C en elle-même est responsable de la formation de tumeurs.

Ces résultats sont complétés par les travaux de Shou et coll. (Shou *et al.*, 2006) qui confirment le rôle de  $\gamma$ C dans la formation de tumeurs, mais spécifiquement dans le contexte  $\gamma$ C<sup>-/-</sup>. Les auteurs

ont récemment proposé un modèle combinant une mutation du gène *Arf* et une mutation du gène  $\gamma C$  pour l'évaluation du potentiel génotoxique d'un vecteur candidat pour un traitement des maladies hématopoïétiques. Ils ont comparé l'incidence de leucémies après greffe de cellules hématopoïétiques de souris *Arf*<sup>-/-</sup>  $\gamma C$ <sup>-/-</sup> ou *Arf*<sup>-/-</sup>  $\gamma C$ <sup>+/+</sup> transduites par un vecteur MLV exprimant le gène  $\gamma C$  et le gène rapporteur GFP ou pour un vecteur contrôle GFP. Ils observent que, dans le contexte  $\gamma C$ <sup>-/-</sup>, la surexpression de  $\gamma c$  favorise la formation de tumeurs, ce qui n'est pas le cas dans le contexte  $\gamma C$ <sup>+/+</sup>. Ces résultats confirment donc une forte influence du transgène, mais suggèrent aussi une influence encore plus importante du contexte  $\gamma C$ <sup>-/-</sup> des patients dans l'essai de thérapie génique X1-SCID.

De façon intéressante, une analyse du phénotype des cellules de moelle osseuse de souris X1-SCID  $\gamma C$ <sup>-/-</sup> montre la présence d'une population de cellules particulières qui n'est pas présente - ou pas dans une proportion équivalente - dans la moelle des souris sauvages. Ces cellules ne sont pas matures, mais ne correspondent pas à des cellules souches hématopoïétiques multipotentes. Il s'agit d'une population de cellules lymphoïdes bloquées à un stade intermédiaire entre l'état de progéniteur et l'état différencié. La présence de cette population dans les modèles X1-SCID est la conséquence de l'absence de  $\gamma c$ , directement impliqué dans la maturation des lymphocytes. Les auteurs proposent une hypothèse selon laquelle ces cellules pourraient être plus sensibles à la génotoxicité. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable qu'elle explique pourquoi la surexpression de  $\gamma c$  conduit à la formation de tumeurs dans les cellules d'animaux  $\gamma C$ <sup>-/-</sup>, et non dans les cellules  $\gamma C$ <sup>+/+</sup>. Une caractérisation plus approfondie de cette population est nécessaire, elle permettra peut-être de comprendre la particularité de la pathologie X1-SCID et de déterminer si les effets secondaires observés au cours de l'essai clinique de l'équipe de A. Fischer sont à craindre pour l'ensemble des pathologies hématopoïétiques.

### 1.3.2.3. Les vecteurs dérivés de rétrovirus oncogènes

Depuis 2002, le risque de génotoxicité lié aux vecteurs oncorétroviraux, et plus particulièrement au MLV, a été très largement évalué. La plupart des données concernent les cellules hématopoïétiques. De nombreux modèles ont été utilisés, tant animaux que cellulaires. Concernant les études *in vivo*, deux types d'approche ont été considérés : les premières sont fondées sur la greffe successive de cellules souches transduites, les secondes sur l'utilisation de modèles de prédisposition au cancer. Les modèles d'étude *in vitro* portent sur l'analyse de la survie des cellules. Le potentiel génotoxique des vecteurs oncorétroviraux n'a pas été précisément évalué en dehors du système hématopoïétique. Ce point sera abordé à la fin de ce chapitre.

Le premier type d'approche est fondé sur la greffe successive des cellules souches hématopoïétiques transduites dans plusieurs animaux. Cette approche permet de suivre l'évolution des cellules transduites *in vivo* pendant de longues périodes, au-delà de l'espérance de vie d'une souris (Li *et al.*, 2002 ; Kustikova *et al.*, 2005 ; Kustikova *et al.*, 2007). Ces études ont

révélé un fort taux de leucémies induites par le vecteur, en absence d'avantage prolifératif ou de coopération possible lié au transgène (gène rapporteur). Dans le cadre de la seconde approche, plusieurs groupes ont travaillé sur le modèle de souris *Cdkn2a*<sup>-/-</sup> qui présente une déficience dans les voies de suppression de tumeur p53 et Rb1 (Lund *et al.*, 2002 ; Montini *et al.*, 2006a). Ces études n'ont pas montré de prolifération leucémique, mais la perte du profil polyclonal initial suite à l'expansion préférentielle de certains clones.

Les études mentionnées ci-dessus s'accordent sur le fait que l'intégration des vecteurs MLV est très favorisée dans une certaine classe de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la signalisation ou précédemment associés à des cancers. Ces résultats sont à rapprocher du fait que le provirus peut augmenter significativement l'expression du gène auprès duquel il s'est intégré (Kustikova *et al.*, 2005 ; Modlich *et al.*, 2006a ; Tsukahara *et al.*, 2006). Ce mécanisme d'activation de l'expression passe plus probablement par l'effet du *enhancer* que par le promoteur du provirus. En effet, Montini et coll. (Montini *et al.*, 2006) ont montré que la plupart des cellules tumorales observées dans un essai de greffe de cellules modifiées n'expriment plus le transgène.

Ces résultats sont corroborés par l'évaluation du potentiel d'auto-renouvellement des cellules primaires *in vitro*. Le simple fait de transduire ces cellules avant de les mettre en culture leur confère une capacité de prolifération anormale et peut induire l'immortalisation (Du *et al.*, 2005 ; Modlich *et al.*, 2006a). Les gènes dans lesquels sont retrouvées les intégrations appartiennent aux mêmes classes que celles décrites précédemment. Ils sont liés au cycle cellulaire, à la signalisation ou encore à la prolifération.

Dans leur ensemble, ces données suggèrent le schéma suivant : (1) l'intégration des vecteurs MLV est favorisée dans certaines classes de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la prolifération, la signalisation ou encore l'auto-renouvellement, (2) l'intégration du vecteur a pour conséquence la dérégulation de l'expression de ces gènes par cisactivation, (3) l'activation de l'expression des gènes induit une prolifération accrue des cellules, (4) la prolifération accrue des cellules favorise leur transformation tumorale. Ce schéma est corroboré par les résultats des analyses des sites d'intégration isolés au cours des essais cliniques de thérapie génique X1-SCID et ADA-SCID (Aiuti *et al.*, 2007 ; Deichmann, Hacein-Bey-Abina, Schmidt, Garrigue *et al.*, 2007 ; Schwartzwelder, Howe, Schmidt *et al.*, 2007). Ces trois études s'accordent sur le fait que l'intégration n'est pas aléatoire mais bien favorisée dans une certaine classe de gènes, en particulier les gènes qui influencent la prolifération cellulaire. D'autre part, ce biais est plus important dans les cellules après greffe par rapport au profil d'intégration dans les cellules avant greffe. Ceci traduit le fait que l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ciblés par l'intégration du vecteur a été perturbée, conférant ainsi un avantage prolifératif à ces cellules.

Ce mécanisme est d'autant plus favorisé que le vecteur porte un LTR intact. En effet, comme mentionné précédemment, le LTR et plus particulièrement les régions *enhancer* qu'il contient sont les principaux acteurs du pouvoir oncogénique des rétrovirus oncogènes (voir [chapitre 1.1.1 p18](#)). L'implication du *enhancer* dans la pathogénicité des vecteurs rétroviraux a également été

établie *in vitro* et *in vivo*. La présence d'un LTR intact dans les vecteurs oncorétroviraux est donc un paramètre particulièrement critique.

Calmels et coll. ont rapporté, après greffe de cellules souches hématopoïétiques modifiées par un vecteur oncorétroviral une fréquence importante d'intégration dans le locus MDS-EV11, ce qui n'est pas observé avec le vecteur SIN (*self inactivated*, c'est-à-dire dépourvus des régions promotrice et *enhancer* du LTR) équivalent (Calmels *et al.*, 2005). Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'intégration d'un vecteur contenant le *enhancer* dans ce locus a conduit à la surexpression de ce gène, et donc l'accentuation de la prolifération cellulaire et la surreprésentation de ces événements. Un nombre équivalent d'intégrations du vecteur SIN a probablement eu lieu dans ce locus. Mais en absence de l'élément *enhancer* du LTR, le gène n'a pas été activé, la prolifération ne s'est donc pas accélérée. De façon comparable, dans un essai *in vitro* Modlich et coll. rapportent une modification du potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques environ dix fois moins importante avec un vecteur SIN qu'avec un vecteur non-SIN (Modlich *et al.*, 2006a). Le même groupe a également obtenu des données *in vivo* en faveur d'un potentiel génotoxique réduit des vecteurs SIN (résultats présentés par Modlich *et al.* au 14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy, 2006b).

Une des premières mesures à prendre en matière de biosécurité est donc de toute évidence la suppression de cet élément *enhancer* et l'utilisation des vecteurs SIN. Bien qu'il ait été démontré que l'utilisation du LTR en tant que promoteur interne dans un vecteur SIN atténue la fréquence de transformation (1/10), celle-ci n'est pas nulle (Modlich *et al.*, 2006a). Il est donc préférable de les éliminer totalement. Néanmoins, la suppression de la région U3 du LTR peut avoir d'autres conséquences qu'il ne faut pas négliger, en particulier l'augmentation du *readthrough* (Yang *et al.*, 2007), c'est-à-dire la poursuite de la transcription au-delà du signal de polyadénylation affaibli. Ce point sera abordé dans le [chapitre Discussion 4.1.2 p166](#).

Les données présentées ci-dessus concernent la génotoxicité des vecteurs oncorétroviraux dans les cellules hématopoïétiques. Ce risque n'a pas précisément été évalué dans d'autres types cellulaires. En dehors du système hématopoïétique, les applications des vecteurs oncorétroviraux concernent essentiellement la cancérologie. Plusieurs sources de risque peuvent être identifiées dans ce contexte. Tout d'abord, on pourrait craindre la transduction par le vecteur de cellules voisines de la tumeur et le risque de leur transformation. Néanmoins, la transduction des vecteurs oncorétroviraux est limitée par la division cellulaire, il est donc peu probable que le vecteur transduise efficacement d'autres cellules que les cellules tumorales qui se divisent activement.

Un second risque réside dans le fait que le génome oncorétroviral peut être soumis à un phénomène de restriction transcriptionnelle (par méthylation du promoteur du LTR) tout en conservant son pouvoir activateur (Montini *et al.*, 2006). Ce phénomène a déjà été décrit depuis de nombreuses années pour les MLV (Teich *et al.*, 1977 ; Speers *et al.*, 1980 ; Jahner *et al.*, 1982) ainsi que pour les vecteurs qui en dérivent (Challita et Kohn, 1994 ; voir Ellis, 2005 pour revue). Les modifications qui ont été apportées à aux vecteurs MLV ont permis de limiter ce phénomène

sans toutefois le supprimer totalement (Riviere *et al.*, 1995 ; Baum *et al.*, 1996 ; Robbins *et al.*, 1998 ; Swindle *et al.*, 2004, voir Pannell et Ellis, 2001 ; Ellis, 2005 pour revue). De façon générale, quelle que soit la nature des cellules cibles, le scénario suivant est donc à craindre : l'expression du transgène est perdue par méthylation du promoteur du LTR tandis que l'élément *enhancer* conserve son activité et peut activer un oncogène voisin. Un tel phénomène est d'ailleurs survenu chez un des patients inclus dans l'essai de thérapie génique du CGD-SCID (résultats présentés par Grez *et al.* au 14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy, 2006).

#### 1.3.2.4. Les vecteurs dérivés de lentivirus

Contrairement aux rétrovirus oncogènes, il est généralement admis que les lentivirus ne sont pas ou peu associés à des tumeurs (voir Killebrew et Shirzmirzu, 2004 pour revue). En conséquence, le risque de mutagenèse insertionnelle lié aux vecteurs lentiviraux n'était pas considéré. Ce n'est que très récemment que quelques groupes ont entrepris son évaluation. Les conclusions ne sont pas encore très claires.

Tout d'abord, Themis et coll. ont évalué le potentiel oncogène de vecteurs EIAV et HIV après injection chez la souris *in utero* ou nouveau-né (Themis *et al.*, 2005). Cette étude suggère que l'EIAV peut induire des tumeurs dans le foie et les poumons (les deux tissus analysés). Bien que les auteurs n'observent aucune tumeur dans le groupe HIV, il est difficile de conclure à l'absence de génotoxicité de ces vecteurs, les injections n'ayant pas été réalisées tout à fait dans les mêmes conditions que pour les vecteurs EIAV.

Le potentiel transformant des vecteurs HIV a également été évalué dans le modèle murin de prédisposition au cancer *Cdkn2a*<sup>-/-</sup> après greffe de cellules hématopoïétiques transduites (Montini *et al.*, 2006). Le vecteur utilisé exprimait la GFP sous contrôle du promoteur ubiquitaire PGK et était dépourvu de la région promotrice du LTR (SIN). Même aux doses élevées, la transduction n'accélère pas la formation de tumeur dans ce modèle, contrairement au groupe MLV (non-SIN) dans les mêmes conditions, et ce bien que le pourcentage de cellules transduites soit plus élevé avec les vecteurs HIV. Les auteurs ont également analysé la nature des gènes ciblés par l'intégration. Dans le cas du vecteur MLV, les auteurs ont noté une sur-représentation de gènes impliqués dans la prolifération et la survie des cellules. Aucun biais significatif n'a été mis en évidence dans les cellules transduites avec le vecteur HIV. De plus, les auteurs n'observent pas de différence entre le profil d'intégration dans les cellules avant greffe et dans les tumeurs analysées, comme cela a pu être décrit pour les vecteurs MLV. Ces données suggèrent que l'intégration d'un vecteur HIV n'induit pas la surexpression des gènes voisins.

L'absence de toxicité propre aux vecteurs lentiviraux est également suggérée par les travaux de Woods et coll. (Woods *et al.*, 2006). La formation des tumeurs est indépendante du vecteur, les auteurs rapportent un lien avec le transgène exprimé. Ils ont évalué l'incidence de tumeurs dans

un modèle de souris X1-SCID après greffe de cellules souches hématopoïétiques transduites par un vecteur lentiviral. Si le transgène est un gène rapporteur, aucune leucémie n'est observée tandis qu'un tiers des animaux présentent des leucémies si le vecteur exprime le gène  $\gamma$ C. Ces résultats suggèrent à nouveau une absence de toxicité induite par les vecteurs lentiviraux.

Des résultats contradictoires ont toutefois été publiés. Par exemple, les résultats récents de Bartholomae et coll. suggèrent que la transduction des cellules souches hématopoïétiques par un vecteur lentiviral SIN influence la survie des cellules. En effet, les auteurs observent que la répartition des sites d'intégration n'est pas constante dans le temps après transduction (résultats présentés par Bartholomae *et al.* au 14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy, 2006). Cette variation des sites d'intégration pourrait traduire une influence du vecteur sur l'expression de certains gènes cellulaires, avec pour conséquence un ralentissement de croissance dans certains cas et/ou au contraire l'accélération de la croissance dans d'autres cas.

Ces travaux sont à rapprocher des observations récemment publiées par Evans-Galea et coll. (Evans-Galea *et al.*, 2007). Les auteurs rapportent l'émergence de plusieurs clones au sein d'une population de cellules transduites par un vecteur lentiviral SIN. Cette émergence suggère l'existence de phénomènes comparables à ce qui est observé après transduction par un vecteur MLV, c'est-à-dire que l'intégration du vecteur lentiviral a pu avoir lieu dans ou à proximité de gènes impliqués dans la croissance cellulaire et en activer la transcription, conduisant ainsi à la prolifération de certaines cellules.

Ainsi, ces résultats démontrent que les vecteurs lentiviraux sont moins toxiques que les vecteurs MLV, d'autant plus s'ils sont SIN. Bien que les résultats disponibles ne permettent pas de tirer des conclusions définitives, ils suggèrent aussi que ces vecteurs ne sont pas totalement dénués de tout potentiel génotoxique. Il est donc nécessaire de poursuivre cette évaluation.

### **1.3.2.5. Promoteur et efficacité d'expression**

Les vecteurs MLV utilisés dans l'essai clinique du groupe de A. Fischer contiennent un LTR sauvage constitutif et fort, particulièrement actif au cours de la prolifération des lymphocytes. Cette caractéristique a joué en faveur du succès de la thérapie en permettant une expression forte du transgène, mais elle a probablement également participé à la transformation des cellules par transactivation. L'utilisation du promoteur LTR en tant que promoteur interne réduit les risques de transactivation, sans pour autant les éliminer totalement. Il est donc nécessaire de ne pas utiliser de LTR viral pour diriger l'expression du transgène.

Différents niveaux d'action sont envisageables pour l'amélioration de l'efficacité d'expression, qu'il s'agisse de l'augmentation de l'efficacité de transcription ou d'une stabilisation des ARN messagers transcrits. Toutefois, d'une manière générale, on préférera une action au niveau post-transcriptionnel plutôt que transcriptionnel. En effet, l'ajout dans le vecteur d'éléments

augmentant la transcription pourra avoir des répercussions sur l'environnement chromatinien par propagation des effets transactivateurs tandis qu'un effet post-transcriptionnel sera exclusivement restreint à l'expression du transgène.

Une séquence de stabilisation post-transcriptionnelle issue du virus de l'hépatite de la marmotte, nommée WPRE (*Woodchuck hepatitis virus post transcriptional element*), est très fréquemment utilisée pour le transfert de gène pour son effet positif sur l'expression du transgène. Cet effet a été démontré dans les vecteurs lentiviraux (Zufferey *et al.*, 1999 ; Brun *et al.*, 2003), oncorétroviraux (Hlavaty *et al.*, 2005) ainsi que dans les vecteurs AAV (Paterna *et al.*, 2000). L'effet positif d'autres séquences non traduites d'origine humaine (Brun *et al.*, 2003 ; Hlavaty *et al.*, 2005) ou virale (Yilmaz *et al.*, 2006) a également été démontré dans les vecteurs rétroviraux. Les séquences de ce type peuvent être utilisées seules ou en combinaison, avec parfois un effet synergique. Certaines d'entre elles présentent une spécificité cellulaire (Brun *et al.*, 2003). Excepté le WPRE, l'utilisation de ces éléments n'est pas encore généralisée dans les vecteurs rétroviraux, mais cette voie devrait être amenée à se développer.

Il a cependant récemment été suggéré que la séquence WPRE pourrait être toxique. En effet, cette séquence contient une phase ouverte de lecture qui correspond à un peptide de 60 acides aminés, qui est une forme tronquée de la protéine WHV-X, dont l'implication dans des cancers du foie a été établie chez la marmotte et dans des souris transgéniques (Dandri *et al.*, 1996 ; Flajolet *et al.*, 1998). Kingsmann et coll. suggèrent dans une lettre aux éditeurs du journal *Gene Therapy* que ce peptide pourrait être exprimé dans les cellules transduites et pourrait être un facteur oncogène, plus particulièrement dans sa forme tronquée (Kingsman *et al.*, 2005).

Themis et coll. ont tenté d'apporter des éléments de réponse à la question du potentiel oncogénique de la séquence WPRE soulevée par Kingsmann et coll.. Dans le but de vérifier l'influence de l'expression du peptide sur la formation de tumeurs, ils ont injecté *in utero* des vecteurs HIV portant la séquence WPRE « sauvage » ou une séquence mutée (Themis *et al.*, 2005). Ils n'ont observé aucune tumeur dans les deux groupes. Peut-on pour autant conclure que ni la séquence WPRE sauvage ni la séquence mutée, ni les vecteurs HIV n'induisent de risque ? Ou doit-on remettre en question la prédictivité du modèle utilisé ? La question du potentiel oncogénique du WPRE reste donc ouverte. Il est cependant possible de contourner ce risque et d'utiliser une séquence WPRE mutée, qui ne permet pas l'expression du peptide supposément incriminé tout en conservant la capacité d'amélioration de l'expression du transgène (Schambach *et al.*, 2006 ; résultats présentés par Galy *et al.* au 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007).

Une autre famille de séquences non traduites, les séquences insulatrices, est également connue pour améliorer l'expression d'un transgène dans les vecteurs rétroviraux (Recillas-Targa *et al.*, 2002). Cette famille comprend les séquences d'attachement à la matrice nucléaire (S/MAR) (Park et Kay, 2001 ; Park *et al.*, 2003 ; Ramezani *et al.*, 2003 ; Puthenveetil *et al.*, 2004). Elles agissent par modification de la structure chromatinienne et peuvent former une barrière à la propagation



des effets transcriptionnels (Emery *et al.*, 2000), qu'ils soient positifs ou négatifs. Cette action protège donc l'environnement chromosomique du provirus d'éventuels effets activateurs. De la même façon, elle protège le provirus de l'environnement chromosomique et de potentiels effets répresseurs. Les éléments insulateurs confèrent donc aux vecteurs rétroviraux un niveau d'expression du transgène directement proportionnel au nombre de copies en éliminant les effets de position, comme la séquence HS4 du *locus control region* de la  $\beta$ -globine de poulet (Recillas-Targa *et al.*, 2002).

Ces séquences, en particulier la séquence cHS4, permettraient également de réduire le pouvoir activateur des éléments *enhancer* contenus dans les LTR rétroviraux (Robert-Richard *et al.*, 2007). Les auteurs ont utilisé un vecteur lentiviral portant deux cassettes d'expression : une première composée d'un gène de résistance à une drogue placé sous le contrôle d'un LTR oncorétroviral, une seconde composée du gène rapporteur GFP placé sous contrôle d'un promoteur érythroïde spécifique. L'effet du LTR sur le promoteur érythroïde mime alors son effet sur la chromatine environnante. Les auteurs observent dans un premier temps que le LTR rétroviral induit la perte de spécificité du promoteur érythroïde spécifique. L'ajout de la séquence cHS4, complète ou non, permet de restaurer en partie la spécificité du promoteur voisin. La fuite est réduite d'environ 2 fois et représente encore jusqu'à 20% de cellules non-érythroïdes exprimant le transgène. Des résultats similaires ont été obtenus par Evans-Galea et coll. (Evans-Galea *et al.*, 2007). Les auteurs ont mis en évidence des effets de la transduction par un vecteur lentiviral sur la survie et la prolifération de cellules *in vitro* et ont montré que ces effets étaient atténués par la présence de la séquence cHS4 dans le vecteur.

Toutefois, ces éléments sont à manipuler avec précautions puisque leur intégration dans une région chromosomique donnée peut avoir d'importantes conséquences sur l'état de la chromatine (ouverte ou fermée) et donc sur l'activation ou l'extinction de la transcription des gènes environnants, et ce sur de longues distances (Bode *et al.*, 2000 ; Burgess-Beusse *et al.*, 2002 ; West *et al.*, 2002).

#### **1.3.2.6. Dose de vecteur et efficacité de transduction**

Indépendamment de la nature du vecteur, la dose de vecteur utilisée est un paramètre critique. Dans l'ensemble des protocoles de traitement des déficits immunitaires, la difficulté à transduire les cellules souches hématopoïétiques avec un vecteur MLV a conduit à conditionner préalablement les cellules par un traitement de cytokines et à utiliser des doses très élevées de vecteur. Ces conditions de transduction favorisent la multiplicité des événements de transduction par cellule, donc le risque de mutagenèse insertionnelle. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, un des patients de l'essai X1-SCID « français » présente plusieurs sites d'intégration potentiellement impliqués dans la transformation leucémique dans une même cellule. De façon comparable, plusieurs groupes ont également mis en évidence la possibilité d'un

effet combiné de plusieurs événements d'intégration au sein d'une même cellule (Li *et al.*, 2002 ; Baum *et al.*, 2003 ; Modlich *et al.*, 2005). Il est donc important d'optimiser les conditions de transduction sans recourir à l'augmentation de la dose afin de réduire la possibilité de transductions multiples.

Des modifications ont été apportées aux vecteurs MLV classiques afin d'améliorer la transduction des cellules qui ne se divisent pas, notamment des modifications de l'enveloppe (voir [chapitre 1.1.2.3 p27](#)). Toutefois, en particulier pour les cellules souches hématopoïétiques qui se divisent peu, l'utilisation des vecteurs lentiviraux pourra être considérée préférentiellement aux vecteurs MLV (voir Logan *et al.*, 2004b), puisqu'ils sont bien plus efficaces pour le transfert de gènes dans ces cellules. Toutes ces dispositions permettront de réduire la dose de vecteur à utiliser, de diminuer le conditionnement préalable des cellules, et ainsi de réduire le risque génotoxique.

### 1.3.2.7. Les cellules cibles

Comme nous l'avons vu précédemment, le risque de génotoxicité a été très largement évalué dans les cellules souches du système hématopoïétique. La génotoxicité des vecteurs lentiviraux a également été étudiée après injection chez la souris *in utero*. La formation de cancers a été mise en évidence dans le foie et les poumons. Ces conditions s'apparentent, là encore, à un contexte de cellules souches puisque les tissus ne sont pas totalement différenciés chez l'embryon. Aucune donnée n'est disponible pour d'autres tissus, ou concernant les conséquences de l'intégration dans des tissus différenciés. On peut s'attendre à ce que le risque soit du même ordre si l'on cible des cellules souches autres que les cellules souches hématopoïétiques, par exemple des cellules souches neurales pour le traitement de maladies neurodégénératives, et plus généralement si les cellules cibles ont un certain pouvoir prolifératif.

Très peu de données sont disponibles quant à la génotoxicité dans des cellules différenciées. Citons les travaux de Tabata et coll. qui ont analysé les sites d'intégration d'un vecteur SIV dans une lignée de cellules dérivant de l'épithélium pigmentaire de la rétine (résultats présentés par Tabata *et al.* au *14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy*, 2006). Les résultats obtenus sont en accord avec les publications précédentes, c'est-à-dire une forte proportion d'intégration dans les régions à haute densité génique. Plus particulièrement, certains sites ont été identifiés dans ou à proximité de gènes impliqués dans des cancers. On peut néanmoins se demander dans quelle mesure ces données sont pertinentes puisque la lignée étudiée se divise activement tandis que les cellules de l'épithélium pigmentaire *in vivo* sont en arrêt de division. Les données récemment présentées par Bartholomae et coll. nuancent ces résultats (résultats présentés par Bartholomae *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007). En comparaison avec le profil d'intégration dans des fibroblastes en croissance (*in vitro*), l'intégration dans les cellules de l'épithélium pigmentaire *in vivo* est

moins favorisée dans les régions transcrites (environ 40% contre environ 60% dans les fibroblastes). L'intégration pourrait donc être plus aléatoire dans les cellules différenciées.

Le potentiel génotoxique des vecteurs rétroviraux doit donc être investigué au cas par cas dans les différents tissus ciblés par le transfert de gène. Rappelons toutefois que l'intégration des rétrovirus n'est qu'un des éléments qui participe à la transformation tumorale d'une cellule parmi d'autres « accidents génétiques ». Les rétrovirus ne font donc qu'accentuer une « tendance naturelle » à la formation de cancers. La fréquence de cancers dans un tissu donné représente donc un paramètre pertinent pour la prédiction de la génotoxicité des vecteurs rétroviraux dans ce tissu. Le [Tableau 2](#) donne, à titre d'exemple, quelques chiffres concernant les cancers chez l'enfant de moins de 15 ans.

**Tableau 2: Incidence des cancers chez l'enfant de moins de 15 ans.** Source : <http://www.med.univ-rennes1.fr/edu/pediatrie/cancer.htm>.

Cancer	Incidence
Leucémies, lymphomes	6/100 000
Tumeurs cérébrales	2,6/100 000
Neuroblastomes	1/100 000
Tumeurs des tissus mous	1/100 000
Néphroblastomes	1/100 000
Rétinoblastomes	0,4/100 000
<b>Total</b>	<b>13/100 000</b>

### 1.3.2.8. Dispersion du transgène

Dans le cas du traitement des déficits immunitaires présentés, les risques de dispersion du vecteur sont limités. En effet, la transduction est réalisée *ex vivo* et aucune particule virale n'est injectée dans l'organisme. Dans le cas d'injection du vecteur *in vivo*, ce risque est à prendre en considération afin d'éviter la transduction de cellules autres que les cellules cibles. Le contrôle de la dissémination du vecteur est d'autant plus important que le transgène est potentiellement impliqué dans prolifération cellulaire (facteur de croissance, trophique, de différenciation...). Comme nous l'avons vu précédemment, cela est possible par l'utilisation d'enveloppes particulières (voir [chapitre 1.1.2.3 p27](#)) et/ou de promoteurs spécifiques pour restreindre par exemple l'expression aux astrocytes (Jakobsson *et al.*, 2004), aux cellules de l'épithélium pigmentaire dans la rétine (Bemelmans *et al.*, 2005) ou à certaines cellules hématopoïétiques (Charrier *et al.*, 2007). Il est également possible d'inclure un système de contrôle de la transcription afin de bloquer l'expression du transgène en cas de complication (voir Vilaboa et Voellmy, 2006 pour revue). Enfin, l'utilisation d'un système suicide pourra également être envisagée. Il permettra, en cas de besoin, d'éliminer les cellules transduites (voir Spencer, 2000

pour revue). Un tel système sera particulièrement avantageux pour le transfert de gènes dans les tissus non-prolifératifs. L'utilisation d'un système suicide spécifique de cellules prolifératives comme le système HSV-TK/gancyclovir, par exemple, permettra d'éliminer des cellules tumorales (Blumenthal *et al.*, 2007).

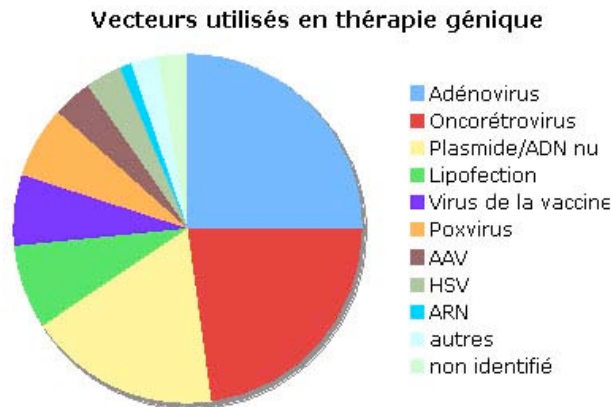
Bien que de nombreuses voies d'améliorations soient possibles, il est raisonnable de se demander si le risque de mutagenèse insertionnelle n'est pas inhérent aux vecteurs intégratifs, quels qu'ils soient. En absence de système efficace permettant une intégration ciblée dans un locus prédéfini, n'est-il pas plus sûr d'éliminer ce risque en utilisant des vecteurs qui ne s'intègrent pas dans la chromatine de la cellule transduite. Bien évidemment, de tels vecteurs ne sont pas maintenus de façon stable dans les cellules en division, ne permettant qu'une expression transitoire du transgène. Néanmoins, ils peuvent avantageusement être utilisés dans des cellules qui ne se divisent pas, comme la majorité des cellules du système nerveux ou le foie, le muscle, l'épithélium pigmentaire, ou dans des stratégies anti-tumorales. De nombreux vecteurs non-intégratifs sont disponibles, leur description fait l'objet du chapitre suivant.

## 2. LES VECTEURS NON-INTEGRATIFS

Les vecteurs rétroviraux, bien qu'efficaces, présentent un risque de mutagenèse insertionnelle non négligeable qui peut limiter leur application chez l'Homme. Comme nous l'avons évoqué précédemment, plusieurs stratégies visent à contrôler les sites d'intégration afin de réduire ce risque. Ces stratégies ne sont cependant qu'à l'état de développement et des améliorations sont encore nécessaires. En attendant la maîtrise de ces outils, il est possible, pour certaines applications, de se tourner vers d'autres vecteurs qui ne s'intègrent pas dans la chromatine. Un certain nombre de vecteurs non-intégratifs sont déjà disponibles. Nous verrons pourtant, dans la première partie de ce chapitre, qu'ils présentent des limites, que ce soit en termes d'efficacité ou de biosécurité, qui les rendent impropres à une application à grande échelle chez l'Homme, et ce bien qu'ils fassent déjà tous l'objet d'essais de thérapie génique clinique. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers le développement d'un nouvel outil de transfert de gènes non-intégratif, dérivé des lentivirus. Nous détaillerons, dans la seconde partie de ce chapitre, les données qui nous permettent d'étayer cette stratégie.

### 2.1. Les vecteurs non-intégratifs

Un certain nombre de vecteurs non-intégratifs sont disponibles, qu'ils soient viraux ou non-viraux. Ils sont utilisés dans près de 60% des essais cliniques (voir [Figure 2](#)). Les plus utilisés sont les vecteurs adénoviraux, les vecteurs dérivés des virus associés à l'adénovirus et les vecteurs herpétiques. En ce qui concerne les vecteurs non-viraux, différentes formes sont possibles : ADN ou ARN nu ou complexés à des liposomes. Ce chapitre a pour objectif d'évaluer l'adéquation de ces vecteurs avec une utilisation clinique à grande échelle. Pour chacun d'eux, nous dresserons donc un bilan des limites majeures et des perspectives envisageables pour les contourner. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur les vecteurs dérivés des virus associés à l'adénovirus. En effet, ces vecteurs sont très fréquemment proposés comme l'alternative de choix aux vecteurs lentiviraux. Pourtant, ils présentent un certain nombre de zones d'ombre qui ne peuvent être négligées, en particulier le risque de mutagenèse insertionnelle. Nous aborderons ensuite de façon plus succincte les vecteurs adénoviraux, herpétiques et ADN.



**Figure 2 : Les vecteurs viraux en thérapie génique.** Utilisation des vecteurs de transfert de gènes dans l'ensemble des essais de thérapie génique répertoriés dans le monde entre 1989 et 2006 (n = 1 283). D'après <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>, mise à jour janvier 2007.

### 2.1.1. Les vecteurs dérivés des virus associés à l'adénovirus

Les virus associés à l'adénovirus (AAV) sont des virus à ADN simple brin, non enveloppés, qui ne sont associés à aucune pathologie chez l'Homme. Ils ont besoin de certaines fonctions de l'adénovirus pour réaliser leur cycle répliatif. Neuf sérotypes d'AAV humains ont été décrits, les premiers vecteurs ont été développés à partir du sérotype 2. Il est aussi possible de produire des particules mixtes associant le génome AAV-2 et la capsid d'un autre sérotype.

Les vecteurs dérivés des AAV présentent un certain nombre de propriétés qui en font des outils séduisants pour le transfert de gènes. Ils sont capables de transduire un très large panel de types cellulaires, indépendamment de la division cellulaire. Ils n'induisent pas de toxicité et permettent l'expression stable du transgène. Ils sont également aisément produits à haut titre. Leur potentiel a été démontré dans de nombreuses études précliniques (Narfstrom *et al.*, 2003a ; Narfstrom *et al.*, 2003b ; Harding *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2006a ; Le Meur *et al.*, 2007) mais également chez l'Homme (Manno *et al.*, 2006). Toutefois, certaines caractéristiques, intrinsèques aux virus dont ils dérivent, limitent leur application, en particulier la taille des séquences qui peuvent être transportées, l'existence d'une pré-immunité importante, et surtout le risque de génotoxicité. Ces différents points sont développés ci-dessous.

#### 2.1.1.1. Pré-immunité, immunisation

Une des limites majeures à l'efficacité des vecteurs AAV en clinique réside dans l'existence d'une pré-immunité dans une forte majorité de la population. Ce problème a été illustré par Moskalenko et coll. chez la souris (Moskalenko *et al.*, 2000). Les auteurs ont injecté un vecteur AAV-2 permettant l'expression du facteur IX chez des souris préalablement immunisées avec le

même sérotype. Aucune expression du facteur IX n'a été détectée, alors que le transgène est systématiquement exprimé après la même injection chez des souris naïves.

Des résultats similaires ont été obtenus chez l'Homme par Manno et coll. (Manno *et al.*, 2006). Cette étude porte sur un essai clinique de thérapie de l'hémophilie par injection systémique de vecteurs AAV-2 exprimant le facteur IX. Les auteurs ont démontré le potentiel des vecteurs AAV à transduire les cellules du foie et à diriger l'expression du transgène. Chez les patients ayant reçu les doses les plus élevées, la présence du facteur IX dans le sang a permis un bénéfice thérapeutique significatif. Cependant, cette amélioration n'a été que transitoire. En effet, dans les 8 semaines suivant le traitement, les cellules exprimant le transgène ont été détruites. Les auteurs attribuent cette disparition à une réponse du système immunitaire contre les antigènes de la capsid AAV-2, et non contre le transgène (Manno *et al.*, 2006 ; Mingozi *et al.*, 2007). D'autre part, ils observent une corrélation entre le taux d'anticorps contre la capsid AAV-2 avant le traitement et le taux de facteur IX circulant.

De façon intéressante, la même équipe a mis en évidence l'expression du facteur IX plusieurs années après injection du même vecteur dans le muscle de plusieurs patients (Jiang *et al.*, 2006b). Toutefois, l'efficacité de transfert de gène dans le muscle n'ayant pas été suffisante pour atteindre une expression thérapeutique du transgène, aucune amélioration des symptômes n'avait été observée chez les patients. Ces résultats montrent néanmoins que ces vecteurs peuvent échapper au système immunitaire et que la réaction diffère suivant que le vecteur est injecté dans la circulation générale ou localement.

L'utilisation de sérotypes rares a été proposée pour contourner le problème de la pré-immunité. Cependant, des résultats contradictoires ont été publiés sur la possibilité de réaction croisée entre différents sérotypes. Une étude récente montre que les anticorps dirigés contre l'AAV-2 sont capables de neutraliser les capsides d'AAV-6 et -8 (Scallan *et al.*, 2006). Parallèlement, cette réaction croisée n'a pas été observée entre les sérotypes 1, 2 et 5 après injection dans le muscle (Riviere *et al.*, 2006) ou 2, 4 et 5 dans les glandes salivaires (Katano *et al.*, 2006). En ce qui concerne le cerveau, si la pré-immunisation limite la transduction, aucune réaction n'a été mise en évidence entre les sérotypes 2 et 5 (Peden *et al.*, 2004). Ces résultats ont été obtenus chez le rongeur (rat ou souris). Toutefois, les résultats récemment obtenus par Mingozi et coll. établissent l'existence d'une population de cellules CD8+ mémoires spécifiques de la capsid AAV-2. Ce sont ces cellules qui ont initié la réaction immunitaire contre le vecteur observé au cours de l'essai clinique publié précédemment par la même équipe (Manno *et al.*, 2006). Les auteurs établissent que ces cellules ne sont pas détectées par les méthodes d'analyse classiques et qu'elles sont présentes chez au moins la moitié des individus analysés. D'autre part, ces cellules sont capables de réagir (sécrétion d'interféron  $\gamma$ ) aux capsides AAV-1 et AAV-8. Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation de sérotypes humains, même rares, ne sera probablement pas une solution au problème de la réaction immunitaire pré-existante.

Un certain nombre de recherches s'orientent vers les sérotypes non-humains. Les premiers résultats sont encourageants : les travaux de De et coll. montrent qu'un vecteur dérivé d'un virus de primate non-humain (AAVrh.10) permet l'expression efficace d'un transgène, à un niveau thérapeutique, et indépendamment de la pré-immunisation des animaux avec les sérotypes humains 2 et 5 (De *et al.*, 2006). Arbetman et coll. ont également montré que le sérotype caprin AAV-Go.1 transduit efficacement le muscle sans être affecté par la présence chez la souris d'immunoglobulines humaines issues de plusieurs individus (*human intravenous immunoglobulines*) (Arbetman *et al.*, 2005).

### 2.1.1.2. Génotoxicité

Un second point est à considérer dans le cadre de l'utilisation chez l'Homme des vecteurs AAV : leur potentiel génotoxique. Ce point représente une zone d'ombre à l'heure actuelle. Il est en effet admis que les vecteurs AAV ne s'intègrent pas, ou de façon très sporadique et uniquement dans certaines conditions. Pourtant, la question de la génotoxicité des vecteurs AAV a été soulevée par un certain nombre d'observations.

Le potentiel oncogénique des vecteurs AAV a en effet été suggéré par l'observation chez la souris de plusieurs tumeurs apparues entre 35 et 78 semaines après l'injection néonatale de vecteur AAV (Donsante *et al.*, 2001). Après analyse des tissus, les auteurs écartent l'hypothèse d'un événement de mutagenèse insertionnelle, mais sans apporter d'autre d'explication à cette fréquence élevée de tumeurs. Plus récemment, Schuettrumpf et coll. apportent de nouveaux éléments en faveur de l'absence de risque lié aux vecteurs AAV (résultats présentés par Schuettrumpf *et al.* au 10<sup>th</sup> annual meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007). Les auteurs rapportent une survie comparable entre deux groupes de souris p53<sup>-/-</sup> (modèle de prédisposition au cancer) injectées avec un vecteur AAV ou une solution saline. Toutefois, Donsante et coll. présentent parallèlement des résultats contraires. Les auteurs ont de nouveau observé une fréquence de tumeurs élevée dans des groupes d'animaux traités par un vecteur AAV par rapport aux animaux n'ayant pas subi de traitement AAV (fréquence 8 fois plus élevée chez des animaux atteints d'un déficit lysosomal (33% vs 4%) et 7 fois plus élevée chez des animaux sauvages (56% vs 8%)) (Donsante *et al.*, 2007). Les auteurs établissent également la présence de génomes AAV dans les cellules tumorales et non dans les tissus sains adjacents. Quatre sites d'intégration ont pu être identifiés dans les six tumeurs analysées. De façon surprenante, ces quatre sites sont situés dans une région unique de 6 kilobases du chromosome 12. L'analyse de l'expression des gènes voisins montre une augmentation significative de la transcription de façon comparable dans les tissus analysés. Ce locus particulier, présent également chez l'Homme, contient, entre autres, de nombreux microARN dont le rôle n'est pas encore identifié mais dont la dérégulation pourrait avoir de larges répercussions. L'ensemble de ces éléments impliquent cette fois très clairement l'intégration du vecteur AAV dans le processus de tumorigenèse.



Ces résultats mettent l'accent sur la nécessité d'évaluation du statut du génome des vecteurs AAV, épisomal ou intégré. Cette question fait l'objet de nombreux débats. Si l'on pensait initialement que les vecteurs, tout comme les virus, s'intégraient de façon spécifique dans un site unique du chromosome 9, le site AAV-S1, il est maintenant clair que ce n'est pas le cas. En effet, la majorité des génomes vecteurs persiste sous forme épisomale dans le noyau des cellules infectées (Duan *et al.*, 1999 ; Schnepp *et al.*, 2005). Ces génomes forment de grands concatémères qui sont capables de s'intégrer dans la chromatine d'une manière non-spécifique. L'intégration des génomes AAV a été observée *in vivo* dans de nombreux types cellulaires. Il est vrai que la fréquence d'intégration est augmentée dans les cellules en division, comme les cellules souches hématopoïétiques (voir Zhong *et al.*, 2006 et les références citées dans cet article). Mais l'intégration des vecteurs AAV a également été détectée dans des hépatocytes non activés (Nakai *et al.*, 2003) ainsi que dans des cellules neurales en arrêt de division (Wu *et al.*, 1998) et dans le muscle (Song *et al.*, 2001).

Tout comme pour les intégrations des rétrovirus, de nombreuses études ont porté sur la caractérisation des événements d'intégration des génomes AAV. Ces études révèlent trois éléments importants. (1) Les événements d'intégration surviennent préférentiellement dans les séquences de régulation des gènes (Miller *et al.*, 2002 ; Nakai *et al.*, 2003 ; Miller *et al.*, 2005) ; (2) ces événements induisent de fréquents réarrangements chromosomiques (délétions ou translocations) (Nakai *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 1997) qui peuvent altérer un gène ou son expression. (3) Les génomes AAV s'intègrent sous forme de grands concatémères. Or il a été montré, dans d'autres contextes, que l'intégration de séquences répétées peut faire apparaître des régions d'hétérochromatine anormale (Dorer et Henikoff, 1994 ; Dorer et Henikoff, 1997) et ainsi dérégler l'expression des gènes sur plusieurs centaines de kilobases. Ces caractéristiques ne sont pas surprenantes. En effet, le génome AAV sauvage s'intègre également sous forme de concatémères et après de nombreux réarrangements (Berns, 1996). L'intégration du virus est toutefois restreinte à un site particulier du chromosome IX, le site AAV-S1, propriété dont sont dépourvus les vecteurs AAV.

De nombreuses études ont été menées afin d'élucider le mécanisme d'intégration site-spécifique de l'AAV, dans le but d'utiliser cette propriété unique en transfert de gène. Il est admis que ce mécanisme fait intervenir la protéine virale Rep qui interagit avec des motifs *Rep recognition sequences* (RRS) ou *Rep binding elements* (RBE) qui sont situés d'une part sur le génome viral (deux dans les ITR et un dans le promoteur p5) et d'autre part sur le génome de la cellule infectée, notamment dans le site AAV-S1. Certains travaux plus récents suggèrent que la séquence du promoteur p5 est suffisante pour l'intégration site-spécifique (Philpott *et al.*, 2002 ; Feng *et al.*, 2006). Mais de nombreuses questions restent posées. Par exemple, pourquoi un site est ciblé en particulier, le site AAV-S1, alors que le génome humain contient  $10^5$  RBE potentiels ? Ces sites potentiels ont été en partie décrits et leur interaction avec Rep a été démontrée (Wonderling et Owens, 1997). Ils correspondent, entre autres, à des loci impliqués dans des translocations chromosomiques, des facteurs intervenants dans la régulation du cycle cellulaire, impliqués dans

des cancers, ou encore à des facteurs de transcription. Il est donc capital de caractériser les déterminants de la spécificité afin conférer cette propriété aux vecteurs sans risquer de cibler l'ensemble des sites RBE.

Les vecteurs AAV sont encore aujourd'hui considérés comme des vecteurs strictement épisomaux et qui ne s'intègrent que très rarement et uniquement dans les cellules en division. Paradoxalement, un certain nombre de résultats soulève le risque de génotoxicité lié à ces vecteurs. Ces données doivent dicter une grande prudence et inciter à mener des études approfondies sur ces points cruciaux de biosécurité.

### **2.1.1.3. Limites de clonage**

Une autre limite des vecteurs AAV concerne leur capacité de clonage : 4,5 kb maximum. Si les deux premiers points mentionnés constituent de réels problèmes de biosécurité, celui-ci ne représente qu'une limite technique qui restreint la taille des séquences qui peuvent être vectorisées et donc les applications envisageables. De nombreuses stratégies ont été évaluées pour surmonter cette limite et exprimer de grandes protéines *via* les vecteurs AAV, comme le découpage de la protéine en plusieurs sous-unités réparties dans plusieurs vecteurs (Burton *et al.*, 1999). D'autres approches tirent profit de la concatémérisation des génomes pour reconstituer une cassette fonctionnelle à partir de vecteurs chevauchants ou par *trans-splicing* (Reich *et al.*, 2003 ; Yan *et al.*, 2000 ; Duan *et al.*, 2001 ; Nakai *et al.*, 2000). Bien que ces approches soient particulièrement élégantes, elles restent d'une efficacité limitée. Elles seront difficilement transposables d'une manière générale en clinique et resteront probablement essentiellement à l'état de preuve de principe.

### **2.1.1.4. Tropisme**

Les AAV ne sont pas des virus enveloppés, la modification du tropisme des vecteurs AAV peut donc être obtenue par modification de la capsid ou par l'utilisation de différents sérotypes. Différentes pistes ont été explorées dans le cadre de la première stratégie, notamment l'introduction d'anticorps spécifiques (voir Choi *et al.*, 2005 pour revue). Dans le cadre de la seconde voie, de nombreux sérotypes sont disponibles, humains ou non. Ces diverses capsides présentent des tropismes variables permettent de cibler un type cellulaire en particulier ou au contraire d'obtenir un tropisme large. En particulier dans la rétine, le sérotype classique AAV-2 n'est pas le plus efficace. L'AAV-5 permet de transduire à la fois les photorécepteurs et les cellules de l'épithélium pigmentaire, tandis que l'AAV-6 permet de cibler très spécifiquement l'épithélium pigmentaire. Quant à l'AAV-3, il s'est montré totalement inefficace à transduire les cellules de la rétine (Yang *et al.*, 2002). Les données disponibles concernent essentiellement la caractérisation de sérotypes humains, qui s'avéreront probablement non utilisables chez l'Homme en raison de la

pré-immunisation mentionnée précédemment. L'évaluation systématique des sérotypes non-humains est donc nécessaire.

### 2.1.2. Les vecteurs dérivés des adénovirus

Les adénovirus sont des virus à ADN double brins. Ils sont responsables de pathologies respiratoires, de maladies gastro-intestinales, urogénitales ou oculaires. Ils ont également été largement étudiés en tant que vecteur de transfert de gènes. Plusieurs générations ont été développées. Les vecteurs adénoviraux dits de « première génération » sont dépourvus de la région E1 codant le facteur transactivateur des gènes tardifs de l'adénovirus. Ils sont facilement produits à hauts titres. Ils présentent également l'intérêt, contrairement aux vecteurs oncorétroviraux, de transduire efficacement des cellules qui ne se divisent pas, comme les neurones différenciés du système nerveux central (Le Gal La Salle *et al.*, 1993). Les vecteurs adénoviraux présentent également l'avantage d'être transporté rétrogradement le long des axones. Les vecteurs adénoviraux seront donc des outils de choix pour certaines applications dans le système nerveux.

Les vecteurs adénoviraux sont les vecteurs les plus utilisés dans les essais cliniques à l'heure actuelle, devant les rétrovirus : 320 essais<sup>4</sup> lancés (soit plus de 25% des essais). La grande majorité de ces essais concerne le traitement de cancers (134 essais sur 162 en cours). Ces travaux ont par ailleurs abouti à la commercialisation du premier produit de thérapie génique : l'adénovirus p53 (voir Peng, 2005 pour revue). Approuvé par la *State Food and Drug Administration* chinoise en janvier 2004, le Gendicine est commercialisé en Chine par SiBiono depuis 2005 pour le traitement des cancers du cou et de la tête. Après l'application en cancérothérapie, la seconde application des vecteurs adénoviraux concerne le traitement de la fibrose kystique.

Ils présentent cependant un grand nombre de limites, principalement d'ordre immunologique. Deux paramètres sont à considérer dans l'analyse de la réaction immunitaire dirigée contre les vecteurs adénoviraux : la réaction déclenchée suite à l'expression des protéines virales dans les cellules transduites et la réaction dirigée contre les protéines de la capsid qui peut neutraliser les particules lors de l'injection. Cette réaction est à prendre en compte (1) en cas d'utilisation d'une capsid à laquelle le patient a déjà été exposé et (2) en cas de réadministration du traitement. Les deux aspects de cette réaction, contre les protéines virales exprimées et contre la capsid au moment de l'injection, sont décrits ci-dessous.

---

<sup>4</sup> Source : <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>, mise à jour janvier 2007

### 2.1.2.1. Immunité induite par l'expression de protéines virales

Les vecteurs adénoviraux de première génération sont encore aujourd'hui les plus utilisés. Ils sont pourtant très immunogènes et toxiques. Cette toxicité a été dramatiquement mise en évidence au cours d'un des premiers essais de thérapie génique avec les vecteurs adénoviraux de première génération. Cet essai portait sur le traitement du déficit héréditaire en ornithine transcarbamylase. Au cours d'un essai en dose croissante, un des patients ayant reçu la dose la plus élevée de particules est décédé dans les jours suivant l'injection, d'une très forte réaction inflammatoire induite par le vecteur (voir Marshall *et al.*, 1999). En effet, malgré la délétion de la région E1, qui code le facteur transactivateur des gènes tardifs, ils expriment la majorité des gènes viraux. Une réaction immunitaire se met donc en place contre les cellules transduites, qui sont donc rapidement éliminées. L'expression du transgène n'est alors que transitoire. Afin de réduire ce phénomène, de nouvelles générations de vecteurs adénoviraux ont été développées par délétion des régions E2, E3 et/ou E4. Ces vecteurs partiellement délétés représentent un progrès, mais présentent toujours un niveau élevé de toxicité et d'immunogénicité. Il faut attendre la quatrième et dernière génération de ces vecteurs pour que le problème soit résolu.

Ces vecteurs de quatrième génération, dits *gutless*, sont totalement dépourvus de gènes viraux (Mitani *et al.*, 1995) et permettent une expression à long terme du transgène, notamment dans le système nerveux central (Thomas *et al.*, 2000). D'autre part, ces vecteurs ont une capacité de transport d'ADN exogène accrue par rapport aux premières générations : jusqu'à 36kb contre 8kb, du fait de la délétion de la totalité des gènes viraux. Ceci permet d'envisager la vectorisation de plusieurs transgènes ou de toute autre séquence très longue comme un locus complet incluant les éléments de régulation de la transcription. La limite de ces vecteurs réside dans la contamination systématique des productions par des particules répliquatives. La mise au point des systèmes de production représente un enjeu capital dans l'application des vecteurs *gutless*.

Les systèmes utilisés aujourd'hui pour la production des vecteurs *gutless* sont fondés sur la complémentation de l'ensemble des éléments viraux nécessaires à la formation des particules par des particules *helper* répliquatives. L'excision du signal d'encapsidation des génomes *helper* lors de l'amplification du vecteur se fait par une recombinaison, Cre ou FLP. Or cette excision n'est pas totalement efficace et une contamination de particules *helper* répliquatives persiste. Du fait d'une efficacité de recombinaison supérieure de la FLP par rapport à la Cre ( $\approx 100\%$  vs  $\approx 80\%$ ) les systèmes FLP présentent une contamination moindre en particules *helper* (Umana *et al.*, 2001). Les particules *helper* représentent de 0,01 à 1% pour les systèmes Cre (Palmer et Ng, 2003 ; Sakhujia *et al.*, 2003) et jusqu'à  $10^{-5}\%$  de contamination (soit  $10^5$  à  $10^6$  particules *helper* pour  $10^{12}$  particules totales) avec le système FLP (Candolfi *et al.*, 2006). Cependant, au cours des différents essais cliniques, des doses de vecteur de première génération comprises entre  $10^{10}$  et  $10^{12}$  particules sont couramment utilisées, et peuvent atteindre près de  $10^{14}$  particules, ce qui équivaldrait à  $10^3$  à  $10^8$  particules *helper* dans le cas des vecteurs *gutless*. Ainsi, même si des

améliorations sont réalisées, de tels vecteurs sont difficilement utilisables en clinique à grande échelle puisqu'ils seront fortement immunogéniques.

Une solution à ce problème de contamination pourrait être l'utilisation de baculovirus pour l'apport des fonctions *helper*, proposée par Cheshenko et coll. (Cheshenko *et al.*, 2001). Dans le système décrit, le baculovirus contient entre deux sites Lox le génome adénoviral dépourvu de la séquence  $\psi$  d'encapsidation. Les cellules sont infectées avec le baculovirus et le génome adénoviral *helper*  $\Delta\psi$  est formé par recombinaison entre les sites Lox. Il permet d'exprimer les protéines nécessaires à l'encapsidation du génome vecteur, mais sans être encapsidé lui-même. Néanmoins, après quelques cycles d'amplification, des particules recombinantes répliquatives émergent, suite à des recombinaisons entre les génomes *helper* et vecteur.

En utilisant un promoteur de mammifère, et non le promoteur natif du baculovirus qui n'est efficace que dans les cellules d'insectes, le génome du baculovirus pourrait être efficacement transcrit dans les cellules de mammifère. Le système de recombinaison tel qu'il a été décrit n'est donc pas nécessaire et il devrait être possible de produire les protéines nécessaires directement à partir du baculovirus. En limitant le plus possible les homologues entre les séquences de transcomplémentation et le génome vecteur, particulièrement au niveau des ITRs, la production devrait être exempte de toute particule recombinante répliquative.

### 2.1.2.2. Immunité contre la capsid

La première exposition à une capsid adénovirale induit une réaction immunitaire importante. Ce phénomène d'immunisation, que nous avons déjà évoqué avec les vecteurs rétroviraux, implique que le patient doit être séronégatif pour la capsid utilisée avant le traitement. Or la plupart des vecteurs ont été développés à partir des virus humains, en particulier à partir du sérotype 5, un des sérotypes les plus répandus dans la population humaine mondiale (Horwitz, 1996). Les particules injectées sont donc bloquées par les anticorps neutralisants, ce qui réduit fortement l'efficacité du traitement. Cette réaction n'empêche cependant pas la transduction après injection directe dans le cerveau (Thomas *et al.*, 2001). De la même façon, la première injection du vecteur, qu'il y ait ou non expression de protéines virales, est suffisante pour déclencher une réaction immunitaire. Cette réaction ne réduit pas l'efficacité du vecteur lors d'une première injection, mais induit la production d'anticorps neutralisants qui empêche la ré-administration du traitement.

Il est néanmoins possible d'échapper à cette réaction de vaccination, qu'elle soit préexistante ou consécutive à un premier traitement. Plusieurs stratégies ont été proposées, parmi lesquelles la « PEGylation », c'est-à-dire la conjugaison des protéines de la capsid avec des polymères de polyéthylène glycol (PEG). Ce « masquage » des particules conduit à un détournement des épitopes. Les particules peuvent alors échapper aux anticorps neutralisants et transduire les

cellules cibles avec une efficacité élevée (O'Riordan *et al.*, 1999 ; Croyle *et al.*, 2002 ; Eto *et al.*, 2005 ; Mok *et al.*, 2005).

Une autre approche consiste en l'utilisation de vecteurs dérivés d'autres sérotypes, humains ou non-humains. Plus de 50 sérotypes humains ont été décrits et l'immunisation par le sérotype 5, le plus couramment utilisé en transfert de gène, n'est pas efficace pour neutraliser d'autres capsides (Mastrangeli *et al.*, 1996 ; Mack *et al.*, 1997). Des adénovirus ont été isolés chez de nombreuses espèces telles que la grenouille, le serpent, la souris, le porc ou encore les primates non humains. D'autres vecteurs ont ainsi pu être développés, par exemple à partir de l'adénovirus canin (CAV) (voir Perreau *et al.*, 2007 pour revue). En particulier, des vecteurs dérivés du CAV-2 sont étudiés depuis plusieurs années et sont très efficaces pour exprimer un transgène dans le système nerveux central (Soudais *et al.*, 2004). Toutefois, si les virus ne sont pas pathogènes dans leur espèce d'origine, il n'est pas exclu qu'ils infectent d'autres espèces de façon asymptomatique, mais suffisante pour mettre en place une réaction immunitaire mémoire. En particulier des anticorps neutralisants contre le CAV ont déjà été trouvés dans le sérum humain (Horwitz, 1996).

### 2.1.2.3. Tropisme

Les adénovirus n'étant pas des virus enveloppés, les vecteurs qui en dérivent ne peuvent pas être pseudotypés, comme nous l'avons vu précédemment avec les rétrovirus. Les possibilités de modifier leur tropisme sont donc restreintes, l'utilisation des différents sérotypes en est une. Certains sérotypes humains, par exemple, permettent de cibler les cellules de l'intestin, des voies respiratoires ou du système nerveux y compris la rétine. Une autre stratégie se fonde sur la modification de la capside du vecteur, afin de détourner les interactions avec les récepteurs naturels. La première étape du mécanisme d'infection par les adénovirus consiste en la formation d'un complexe entre les fibres de la capside et le récepteur du virus Cocksackie et de l'adénovirus (CAR). Dans un second temps, la capside interagit avec les intégrines. Modifier le tropisme naturel des vecteurs dérivés des adénovirus implique donc forcément l'abolition de ces interactions naturelles d'une part et la création d'une nouvelle interaction d'autre part.

De nombreuses équipes ont déjà travaillé sur cette piste et montré qu'il était possible de réduire l'import CAR-dépendant des particules virales et de les orienter vers des récepteurs particuliers. La preuve de principe de cette théorie a été apportée, notamment par des systèmes artificiels : incorporation dans la capside de petites séquences d'acides aminés (étiquette hémagglutinine ou histidine) et l'incorporation à la surface de cellules cibles d'anticorps spécifiques de ces motifs (Douglas *et al.*, 1999 ; Einfeld *et al.*, 1999). Ainsi, il est virtuellement possible de cibler n'importe quel type cellulaire. Concrètement, une telle approche a surtout été utilisée pour améliorer le ciblage des cellules cancéreuses, pauvres en CAR (Seki *et al.*, 2002 ; Stoff-Khalili *et al.*, 2005). Elle permet également de diminuer le tropisme hépatique des particules (Vigne *et al.*, 2003 ; Yun *et al.*, 2005). Ceci peut s'avérer particulièrement intéressant en cas d'injection systémique du

vecteur pour cibler un autre organe que le foie. En effet, par cette voie d'administration la très grande majorité des particules est captée par le foie. L'incorporation dans la capsid d'un motif spécifique des intégrines, récepteurs secondaires des adénovirus, permet également d'augmenter le tropisme pour les cellules CAR-négatives (Mizuguchi *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2002), comme les cellules vasculaires (Hay *et al.*, 2001), ou cancéreuses (Koizumi *et al.*, 2003).

Dans le cerveau, des particules dont la capacité de liaison à CAR a été abolie sont toujours efficaces, mais si cette abolition est combinée avec une modification des interactions intégrines, la transduction chute dramatiquement (Thomas *et al.*, 2002). La modification de la capsid des adénovirus n'est donc pas une solution universelle et il faudra encore déterminer dans quelle mesure ces particules modifiées seront utilisables et intéressantes et pour quelles applications.

### **2.1.3. Les vecteurs dérivés du virus herpes simplex de type 1**

Le virus herpes simplex de type 1 (HSV-1) est un virus à ADN double brin au génome complexe de plus de 150kb. Les différentes protéines virales sont sous le contrôle de différents promoteurs qui régulent finement l'expression des différents facteurs dans le temps, selon que le virus est en phase de latence ou de réplication. Le HSV-1 présente également un tropisme naturel pour les neurones et une capacité au transport rétrograde. Ces caractéristiques le rendent particulièrement intéressant pour le développement de vecteurs de transfert de gènes dans le système nerveux.

Trois types de vecteurs ont été développés à partir du HSV-1 :

- *les vecteurs recombinants atténués* qui sont capables d'induire la lyse des cellules spécifiquement en division, comme les cellules cancéreuses ;
- *les vecteurs recombinants non réplicatifs* qui sont délétés ou mutés dans des gènes essentiels afin de réduire l'expression des protéines virales. Ils transduisent efficacement les cellules. Ils sont également utilisés pour des stratégies de vaccination ;
- *les vecteurs amplicons* qui sont également non réplicatifs et totalement dépourvus de gènes viraux. Ils sont donc dépendants de la transcomplémentation pour leur production. Leur intérêt majeur réside dans l'absence de toute séquence virale codante, ce qui leur confère par ailleurs une capacité de clonage accrue : 150 kb.

Ces trois types de vecteurs présentent un certain nombre de caractéristiques communes, telles que la conservation du tropisme neuronal du virus sauvage, leur caractère épisomal et une capacité de clonage incomparable à tout autre vecteur (plus de 100 kb) qui leur permet de transporter des loci entiers (Wade-Martins *et al.*, 2001 ; Wade-Martins *et al.*, 2003 ; voir Hibbitt et Wade-Martins, 2006 pour revue).

En dépit de leurs nombreux intérêts, les applications cliniques des vecteurs HSV restent très limitées. On dénombre aujourd'hui 43 (soit 3,4%) essais cliniques<sup>5</sup>, réalisés ou en cours de réalisation, avec un vecteur herpétique, dont 42 pour des applications anti-tumorales. Le dernier porte sur le traitement de douleurs chroniques avec un vecteur exprimant une pro-enképhaline humaine. Aucun résultat n'est actuellement disponible sur cet essai.

Un certain nombre d'études précliniques prometteuses sont pourtant menées dans le cadre d'autres pathologies du système nerveux, notamment la maladie de Parkinson (During *et al.*, 1994 ; Geller *et al.*, 1995 ; Yamada *et al.*, 1999 ; Sun *et al.*, 2003). Les vecteurs HSV sont des vecteurs de choix dans le contexte de maladies neurodégénératives puisqu'ils permettent d'apporter plusieurs facteurs trophiques simultanément et ainsi cumuler leurs effets protecteurs (Marconi *et al.*, 1999 ; Marconi *et al.*, 2005). D'autre part, leur capacité à être transportés le long des axones représente, par rapport à d'autres vecteurs, lentiviraux ou AAV, un avantage non négligeable en cas de besoin d'un traitement global du cerveau, comme pour les maladies lysosomales (Martino *et al.*, 2005). En effet, l'injection de HSV dans le cerveau permet une expression beaucoup plus étendue qu'avec les vecteurs dérivés des lentivirus ou des AAV (voir Berges *et al.*, 2007 pour revue). Cette capacité permet également aux vecteurs HSV d'atteindre de façon non invasive par injection périphérique certaines régions centrales. Néanmoins, l'avancée de ces études est ralentie par la toxicité des vecteurs, qu'elle soit due à l'expression non maîtrisée de protéines virales ou à la contamination des productions par des particules *helper*. Ces deux aspects sont développés ci-dessous.

### 2.1.3.1. Vecteurs amplicons et production

Tout comme les vecteurs adénoviraux de quatrième génération, les vecteurs herpétiques amplicons sont déletés des gènes viraux et nécessitent donc la complémentation des fonctions virales lors de la production. Deux méthodes de transcomplémentation sont utilisées. Une première méthode se fonde sur l'utilisation de particules *helper*. Un deuxième type de systèmes a été développé à l'aide de cosmides ou de chromosomes bactériens.

La première méthode repose sur l'utilisation de particules *helper* qui apportent en *trans* toutes les fonctions virales nécessaires à la propagation des particules non répliquatives. Cette méthode est efficace et permet de produire des vecteurs à haut titres, mais ces vecteurs sont contaminés par des particules *helper* répliquatives qui participent à la réaction immunitaire induite après l'injection (Olschowka *et al.*, 2003). Le groupe d'A. Epstein a permis de réduire la contamination des particules répliquatives par une approche similaire à celle adoptée pour la production des vecteurs adénoviraux *gutless*. Les auteurs ont ajouté des sites *Lox* dans les particules *helper*

---

<sup>5</sup> Source : <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>, mise à jour janvier 2007



permettant l'excision du signal d'encapsidation par la recombinaise Cre (Logvinoff et Epstein, 2001). Ce système permet l'obtention de hauts titres de transduction et une contamination réduite de particules *helper* répliquatives, mais ces dernières représentent tout de même environ de 0,01 % des particules produites. La même équipe a ensuite proposé une amélioration du système en partageant les fonctions des particules *helper* entre de nouvelles particules *helper* et une lignée cellulaire. Les particules *helper* ne sont donc répliquatives que dans la lignée de cellules utilisée pour la production. La contamination représente environ 0,5% des particules produites (Zaupa *et al.*, 2003). Les résultats ne sont toutefois pas satisfaisants pour envisager une application clinique des vecteurs amplicons.

La deuxième approche pour la production des vecteurs amplicons est dite *helper-free* puisqu'elle ne fait pas appel à des particules *helper* (voir Kasai et Saeki, 2006 pour revue). La transcomplémentation est réalisée par plusieurs cosmides ou chromosomes bactériens artificiels qui recouvrent l'ensemble du génome HSV, mais sont dépourvus de signaux d'encapsidation. Les stocks produits sont donc totalement exempts de contaminants, mais présentent un titre peu élevé. De plus, cette méthode n'est pas propice au changement d'échelle nécessaire en vue d'une application clinique.

Les méthodes de production disponibles ne sont pas satisfaisantes. Tout comme pour les vecteurs adénoviraux, elles sont en grande partie limitées par l'efficacité de la recombinaise Cre. L'utilisation de systèmes fondés sur l'utilisation du baculovirus, comme décrits pour les vecteurs adénoviraux, pourrait représenter un compromis intéressant entre les systèmes *helper* et *helper-free*. Cette approche reste à évaluer.

### **2.1.3.2. Vecteurs recombinants non-répliquatifs et toxicité**

Les gènes du HSV sont répartis en trois groupes : les gènes IE (*immediate early* ou très précoces), qui sont exprimés très rapidement après l'infection, et les gènes E (*early* ou précoces) et L (*late* ou tardifs) qui sont exprimés plus tardivement et nécessitent l'activation par le produit des gènes IE. Les vecteurs recombinants ont tout d'abord été développés par délétion d'un seul des 5 gènes IE. Ces premiers vecteurs sont efficaces mais cytotoxiques et l'expression du transgène n'est que transitoire. Dans un second temps, tout ou partie des 5 gènes IE ont été supprimés. La délétion partielle des gènes n'est pas suffisante pour éliminer la réaction immunitaire de façon suffisante pour ne pas altérer l'efficacité d'expression du transgène. En effet, celle-ci peut être améliorée par un traitement immunosuppresseur (Mabon *et al.*, 1999). Les vecteurs totalement dépourvus des gènes IE présentent une cytotoxicité très réduite et permettent une expression stable du transgène. Mais cette amélioration a été réalisée au détriment de l'efficacité, tant au niveau de la production que de l'expression du transgène. Cette réduction de l'efficacité peut être attribuée à la déstabilisation des mécanismes complexes de régulation de la transcription induite par la délétion

des gène IE. L'équilibre entre efficacité et non-toxicité n'est donc pas encore satisfaisant et des progrès doivent être faits pour concilier les deux (voir Berto *et al.*, 2005 pour revue).

### 2.1.4. Les vecteurs non-viraux

Les vecteurs dont il a été question jusqu'ici dérivent de virus. Toutefois, de nombreux systèmes non-viraux ont été développés et font l'objet d'essais cliniques. Si l'on considère les différentes formes et modes d'administration (*gene gun* (projection de particules recouvertes d'ADN), plasmide nu, transfert d'ARN, lipofection), ces essais représentent 349 essais sur 1260 soit 28%<sup>6</sup>. Différentes applications sont décrites, essentiellement en cancérologie, vaccination (modification *ex vivo* de cellules dendritiques) et maladies vasculaires, le transfert de gènes par plasmides est en effet particulièrement efficace et stable dans le muscle.

Les intérêts de ces stratégies sont multiples par rapport aux vecteurs viraux, que ce soit la simplicité du système, l'absence de protéines exogènes susceptibles d'induire une réponse immunitaire ou le coût de production. L'efficacité de ces approches demeure cependant très limitée. Particulièrement adaptés au transfert de gènes dans le muscle, les vecteurs non-viraux sont relativement décevants dans le système nerveux central et surtout, ne permettent qu'une expression transitoire du transgène.

Plusieurs voies sont actuellement à l'étude pour stabiliser l'expression et ont pour but l'intégration site-spécifique du vecteur plasmidique dans le génome de la cellule cible. Une première approche est fondée sur l'utilisation de recombinases site-spécifiques, en particulier les recombinases de phage qui reconnaissent un nombre restreint de sites dans le génome humain. Une seconde consiste en l'utilisation de protéines à doigt de zinc (ZFP) synthétiques qui reconnaissent une séquence particulière choisie dans le génome. Ces stratégies sont prometteuses, mais ne sont cependant qu'au stade de développement et nécessitent encore plusieurs améliorations avant d'être utilisées chez l'Homme. Elles seront abordées de façon plus détaillée dans le chapitre Discussion 3.3 p159.

#### 2.1.4.1. Cas particulier des immuno-liposomes « PEGylés » ou PILS

Parmi les différents systèmes développés, les immuno-liposomes « PEGylés » (PILS) développés par l'équipe de WM. Pardridge représentent une avancée incontestable dans l'efficacité du transfert de gènes dans le système nerveux central. Ce système permet de façon unique d'atteindre le cerveau et la rétine par injection systémique, sans aucune altération de la barrière hémato-encéphalique. Il système repose sur l'encapsulation d'ADN plasmidique dans des

---

<sup>6</sup> Source : <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>, mise à jour janvier 2007

liposomes en présence d'anticorps monoclonaux qui reconnaissent la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les particules injectées par voie systémique reconnaissent les récepteurs transferrine de la BHE et sont transportées dans le cerveau. De nombreux travaux de l'équipe WM. Pardridge ont déjà démontré l'intérêt et l'efficacité de ce système, notamment dans des modèles animaux des maladies de Parkinson (Pardridge, 2005) ou d'Alzheimer (Boado *et al.*, 2007) ou pour cibler la rétine (Zhang *et al.*, 2003).

Ces différentes études ont parfaitement illustré la possibilité de cibler une population de cellules particulières sans expression ectopique du transgène, malgré l'injection systémique des particules. Deux niveaux sont accessibles : (i) l'utilisation d'anticorps spécifiques d'une population particulière permet de limiter le tropisme des particules, (ii) l'utilisation de promoteur spécifique permet une restriction transcriptionnelle qui oriente encore l'expression du transgène.

La principale limite de cette approche réside dans l'instabilité de l'expression du transgène, conséquence de la dégradation rapide des plasmides par les endonucléases cellulaires (Chu *et al.*, 2006). Cette limite peut être contournée par l'administration régulière du traitement, sans effets secondaires notables ou diminution de l'efficacité (Zhang *et al.* 2003). Toutefois les méthodes de production ne permettent pas les changements d'échelle qu'impliquerait la répétition du traitement chez l'Homme. De plus, les particules produites sont particulièrement instables et perdent plus de 50% de leur efficacité dans les 24h suivant leur production. Des améliorations du protocole de production sont donc nécessaires (données présentées par Gjetting *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007). Il pourrait également être possible de stabiliser l'expression du transgène par la combinaison du système PILS avec les systèmes d'intégration ciblée décrits ci-dessus. Cette approche n'a toutefois pas encore été envisagée.

### **2.1.5. Besoin de solutions alternatives**

En conclusion, aucun des vecteurs épisomaux disponibles à l'heure actuelle n'est pleinement satisfaisant. Qu'ils soient viraux ou non, les vecteurs décrits présentent un ensemble de limites en termes de biosécurité ou d'efficacité qui les rendent peu adaptés au transfert de gènes, en particulier dans le système nerveux central. Des solutions sont envisageables pour chacun des problèmes soulevés, mais ces optimisations ne seront pas disponibles dans un avenir immédiat.

Nous avons donc considéré une nouvelle approche pour éliminer le risque de mutagenèse insertionnelle. Nous nous sommes intéressés aux vecteurs lentiviraux. En effet, ces vecteurs sont parmi les vecteurs viraux les plus efficaces et les plus flexibles (voir [Tableau 3](#)). Comme mentionné précédemment, ils sont aisément produits, ne sont pas toxiques, ils peuvent être pseudotypés, transporter des séquences codantes relativement longues, inclure des éléments de régulation de la transcription. Leur principale limite réside dans le risque de génotoxicité lié à l'intégration du génome vecteur dans la cellule. Or, après infection d'une cellule, la très grande

majorité des génomes lentiviraux est sous forme épisomale, en partie sous forme de cercles. Nous avons donc évalué la possibilité de tirer avantage de cette particularité afin de développer des vecteurs lentiviraux non-intégratifs, dépourvus du potentiel génotoxique dû à l'intégration « aléatoire » de leur génome dans la chromatine de la cellule transduite. Le chapitre qui suit présente les différents éléments qui nous permettent d'étayer cette stratégie. Nous détaillerons dans un premier temps le cycle de réplication du HIV et les possibilités qu'il offre pour le développement d'un vecteur lentiviral non-intégratifs. Nous traiterons ensuite des résultats antérieurs sur l'expression et la stabilité des formes épisomales des génomes lentiviraux.

**Tableau 3 : Récapitulatif des caractéristiques des principaux vecteurs viraux.** En gras : les caractéristiques pouvant constituer une limite à l'application clinique. \* : une réaction immunitaire peut pré-exister contre l'enveloppe choisie pour le pseudotypage.

	Capacité de clonage	Production	Transduction de cellules qui ne se divisent pas	Modification du tropisme	Pré-immunité	Génotoxicité
Oncorétroviraux	≈ 8 kb	Aisée	Non	Aisée	Non*	Oui
Lentiviraux	≈ 8 kb	Aisée	Oui	Aisée	Non*	Oui
Adénoviraux <i>Gutless</i>	> 30 kb	Particules répliquatives	Oui	Limitée	Oui	Non
AAV	≈ 4,5 kb	Aisée	Oui	Limitée	Oui	Oui
HSV	> 100 kb	Particules répliquatives	Oui	Non	Oui	Non

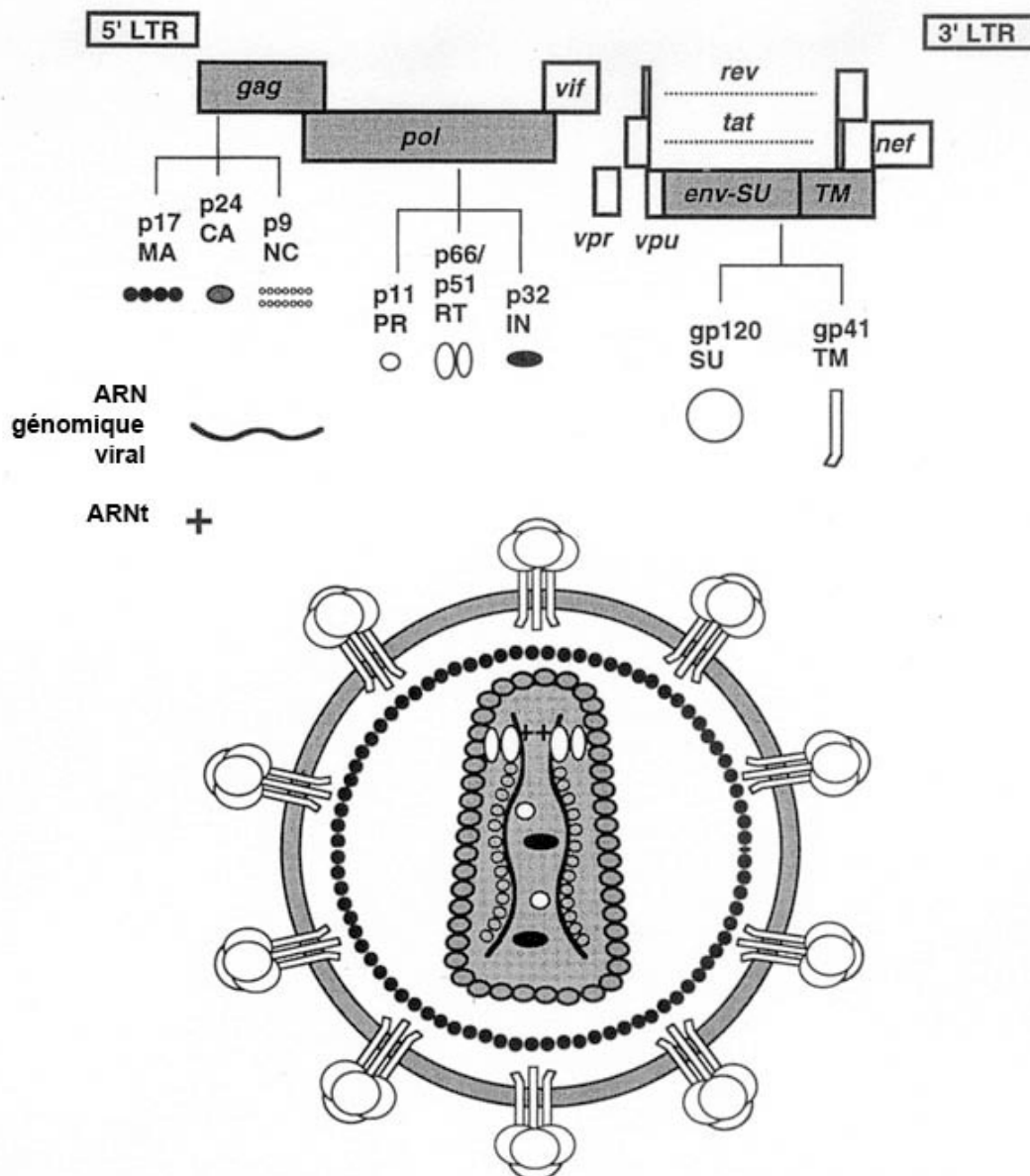
## 2.2. Biologie du HIV et formation des cercles

### 2.2.1. Présentation des virions

Comme mentionné précédemment, le HIV est un virus à ARN. Le génome viral est constitué de plusieurs phases ouvertes de lecture ainsi que de séquences agissant en *cis*. Ces éléments ont été décrits de façon détaillée précédemment (voir chapitre 1.1.1.1 p18 et Figure 1 p19).

La particule virale est formée de plusieurs protéines, qui ont une fonction enzymatique ou participent à la structure du virion ou à sa virulence (voir Figure 3) :

- Matrice (MA), Capside (CA), Nucléocapside (NC), les protéines de structure du core du virion issues du gène *gag*,
- Protéase (PR), Rétrotranscriptase (RT) et Intégrase (IN), les enzymes nécessaires au cycle de réplication issues du gène *pol*,
- SU et TM, les deux sous unités, respectivement extérieure et transmembranaire, de la glycoprotéine de surface, issues du gène *env*,
- Tat et Rev, deux facteurs de régulation de la réplication,
- Vif, Vpr, Vpu et Nef, protéines accessoires qui participent à la pathogénicité du virus.

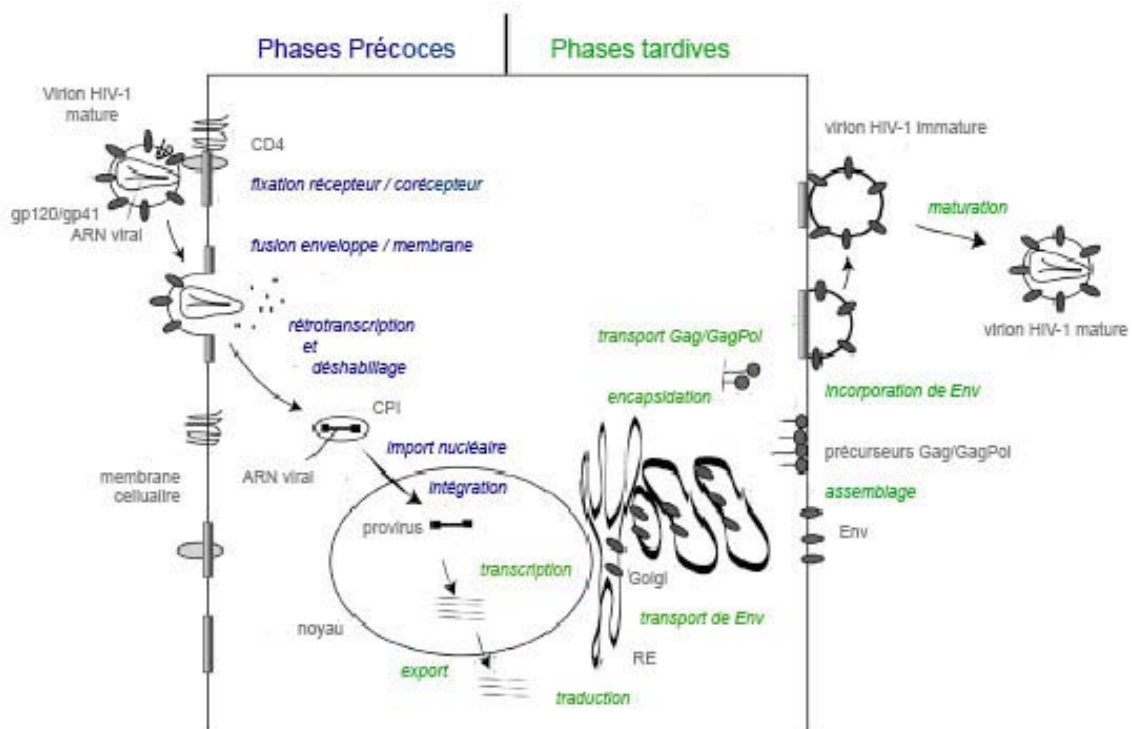


**Figure 3 : Structure d'un virion HIV-1.** La partie supérieure (A) de la figure reprend la structure du génome HIV sous sa forme ADN et les différentes protéines produites, avec en gris les gènes de structure (gag, pol et env), en blanc les gènes accessoires (nef, vif, vpu, et vpr) et de régulation (tat et rev) et les LTR 5' et 3' à chaque extrémité. Les précurseurs polyprotéiques Gag-Pol (Pr160), Gag (Pr55) et Env (gp160) sont clivés par une réaction enzymatique pour former les protéines matures du virion. Gag-Pol et Gag subissent plusieurs stades de clivages catalysés par la protéase PR pour produire : la matrice (MA, p17), la capside (CA, p24), la nucléocapside (NC, p7), la protéase (PR, p11), la rétrotranscriptase (RT, p66/p55), et enfin l'intégrase (IN, p32). L'enveloppe (ENV) composée de deux éléments : la sous-unité de surface (SU, gp120) et la sous-unité transmembranaire (TM, gp41). Les particules typiques (B) sont sphériques, d'environ 110nm de diamètre et consistent en une bicouche lipidique membranaire entourant une capside ou "core" conique qui renferme 2 molécules d'ARN génomique associées en duplex ainsi que les différentes enzymes virales et autres facteurs de virulence. D'après Coffin *et al.*, 1996.

## 2.2.2. Le cycle répliatif du HIV

Le cycle répliatif du HIV se déroule en deux phases (voir Figure 4 ; voir Greene et Peterlin, 2002 pour revue) :

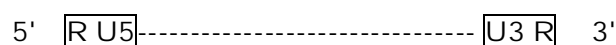
- les étapes précoces qui aboutissent à l'intégration de l'ADN génomique viral dans la chromatine de la cellule infectée ;
- les phases tardives qui, à partir de la transcription de la forme ADN du génome viral, permettent la formation d'une nouvelle particule virale infectieuse.



**Figure 4 :** Représentation schématique du cycle de réplication du HIV-1. En bleu : les phases précoces, en vert : les phases tardives, en gris : les éléments cellulaires et viraux. D'après Freed et Mouland, 2006.

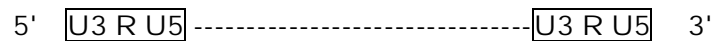
### 2.2.2.1. Phases précoces

Les particules virales sont présentes à l'extérieur de la cellule et portent leur information génétique sous la forme d'un dimère d'ARN. Chacun des génomes présente la structure suivante :



Le virion se fixe sur des récepteurs de la membrane cellulaire et pénètre dans la cellule. Le génome viral est alors acheminé vers le noyau au sein d'un complexe nucléoprotéique dit complexe de rétrotranscription. C'est au cours de cette migration vers le noyau que le génome

ARN est rétrotranscrit par la rétrotranscriptase (RT) en une molécule ADN double brin linéaire (voir [Figure 5](#)). La rétrotranscription débute par la synthèse du brin – initiée en 5' du génome ARN, au niveau des régions R et U5. Puis un premier saut de brin s'effectue et la région R du brin - s'apparie à la région R située en 3' du génome ARN. La synthèse du brin – se poursuit alors sur la totalité du génome ARN. La synthèse du brin + est ensuite initiée en deux points : le PPT 3' et le PPT central. Le mécanisme de la rétrotranscription permet ainsi la duplication des régions U3 et U5 à chaque extrémité du génome. Les LTR sont donc identiques en 5' et en 3' :

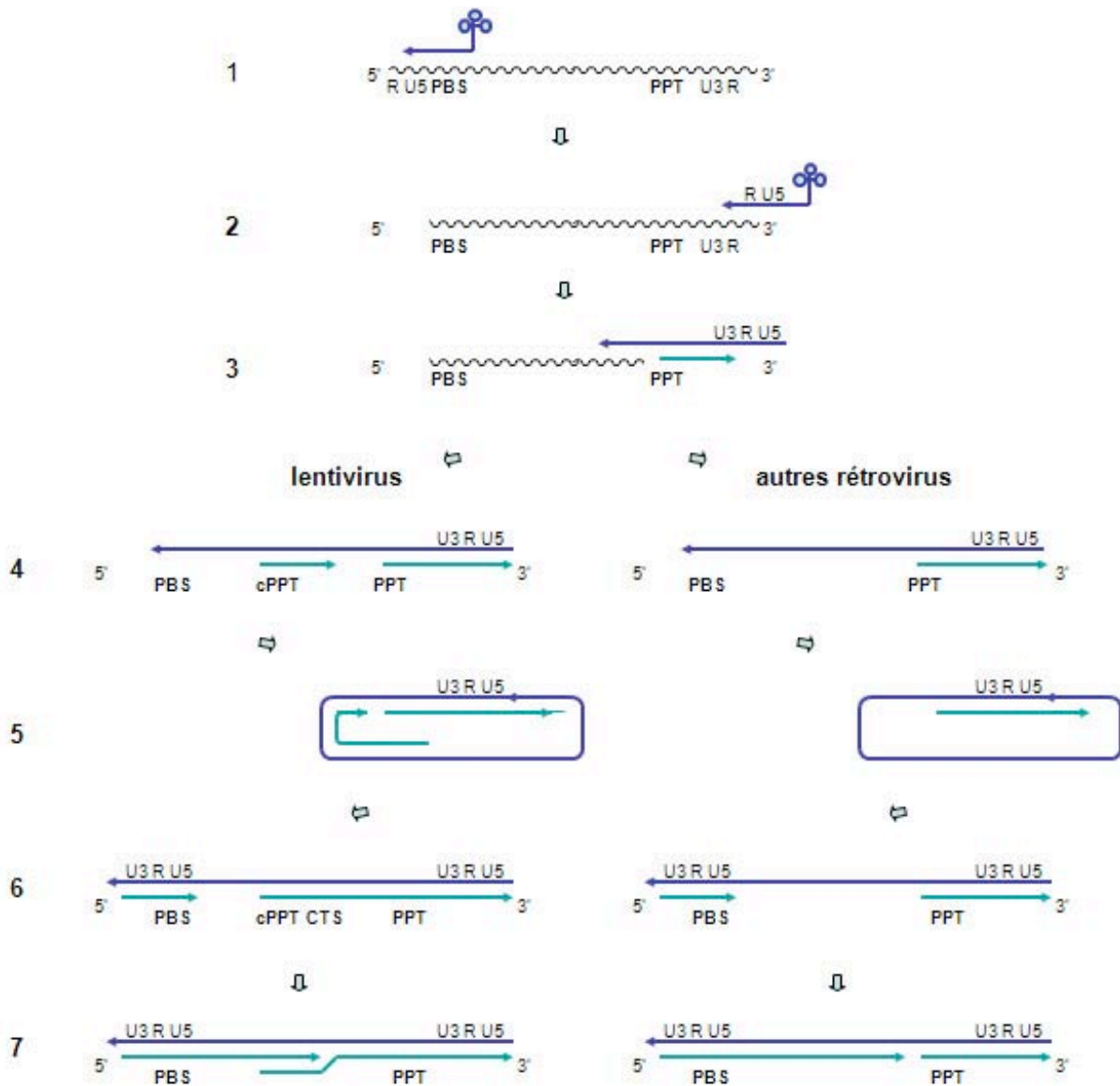


L'initiation de la rétrotranscription en deux points conduit à la formation au centre du génome ADN d'une structure particulière à trois brins (voir [Figure 5](#) ; Charneau *et al.*, 1992 ; Charneau *et al.*, 1994). Cette structure triple brin sur une région de 99 nucléotides, le *flap*, constitue un déterminant majeur du mécanisme actif de l'import nucléaire du HIV (Follenzi *et al.*, 2000 ; Zennou *et al.*, 2000). Le schéma de la rétrotranscription des rétrovirus oncogènes n'est pas tout à fait identique et n'aboutit pas à la formation de ce triplex (voir [Figure 5](#)). Comme mentionné précédemment (voir [chapitre 1.1.2.1 p21](#)), cette différence pourrait participer au fait que les oncorétrovirus n'infectent que des cellules en division alors que les lentivirus sont indépendants du cycle cellulaire.

Sous sa forme ADN linéaire double brin, le génome proviral est encore associé à de nombreuses de protéines virales, telles que l'intégrase (IN), la rétrotranscriptase (RT), la matrice (MA), et vpr, ainsi qu'à plusieurs facteurs cellulaires tels que HMGA1, BAF ou LEDGF. Cet amas nucléo-protéique est alors appelé complexe de pré-intégration (CPI) et poursuit la translocation vers le noyau de la cellule. Différents facteurs sont supposés participer à la localisation nucléaire du CPI, en particulier MA, IN et vpr qui portent des motifs *nls* (voir Sherman et Greene, 2002 pour revue).

Une fois dans le noyau, le génome peut être intégré dans la chromatine de la cellule. Cette étape fait intervenir en *trans* une protéine du CPI : l'intégrase, et en *cis* les extrémités des séquences LTR qui bordent le génome : les séquences d'attachement ou *att*. Ces deux éléments sont nécessaires à l'intégration, mais d'autres éléments interviennent également. Ces facteurs peuvent être d'origine cellulaire (voir Van Maele *et al.*, 2006 pour revue) comme LEDGF (Cherepanov *et al.*, 2003) ou virale, tels que MA (Mannioui *et al.*, 2005). Le rôle de chacun de ces facteurs dans l'intégration n'est pas encore élucidé, en particulier le rôle de MA.

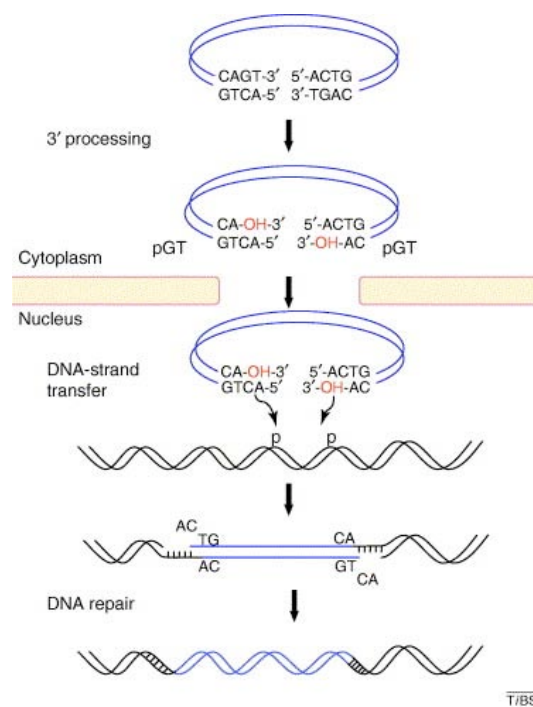




**Figure 5: Mécanisme de rétrotranscription des rétrovirus :** Comparaison lentivirus vs autres rétrovirus. Les premières étapes sont communes : la synthèse du brin (-) est initiée par la fixation de l'ARN de transfert sur la séquence *primer binding site* (PBS). Les régions U5 et R en 5' sont synthétisées, la matrice ARN est dégradée par la RNaseH (1). Le premier fragment synthétisé en 3' du génome ARN, l'appariement se fait sur les séquences R (2). La synthèse du brin (-) reprend sur toute la longueur du génome jusqu'au PBS. La matrice ARN est dégradée par la RNaseH (3). Les lentivirus divergent alors des autres rétrovirus pour la synthèse du brin (+). Cette synthèse est initiée au niveau de la séquence *polypurine tract* (PPT) située en 3' du génome, pour les rétrovirus non-lentivirus (4-droite). Le LTR synthétisé saute en 5' (5-droite) et la synthèse reprend (6-droite). Le génome est alors sous forme double brin et les LTR sont présents et identiques à chaque extrémité du génome (7-droite). Les lentivirus présentent un site d'initiation central (cPPT) en plus de la séquence située en 3' (PPT 3'). La synthèse du brin (+) est donc initiée en deux points (4-gauche). Lors du second saut de brin (5-gauche), la synthèse se poursuit jusqu'à la séquence de terminaison centrale (CTS), située juste après le PPT central (cPPT) (6,7-gauche). La région cPPT-CTS est donc constituée de trois brins.



Le résultat de la réaction d'intégration, qui se déroule en trois temps, est l'insertion stable du provirus dans la chromatine cellulaire (voir Rice *et al.*, 1996 pour revue). La première étape de cette réaction consiste en un clivage de deux nucléotides aux extrémités 3' du génome. La deuxième étape, le transfert de brin, consiste en l'insertion covalente des extrémités 3' modifiées dans l'ADN génomique de la cellule hôte. Ces deux étapes sont catalysées par l'intégrase virale, qui agit sous forme tétramérique, et nécessitent la reconnaissance des séquences *att*. La dernière étape de la réaction consiste en l'élimination des bases non appariées des extrémités 5' du génome viral et la réparation de la jonction ADN viral - cellule hôte (voir Figure 6).



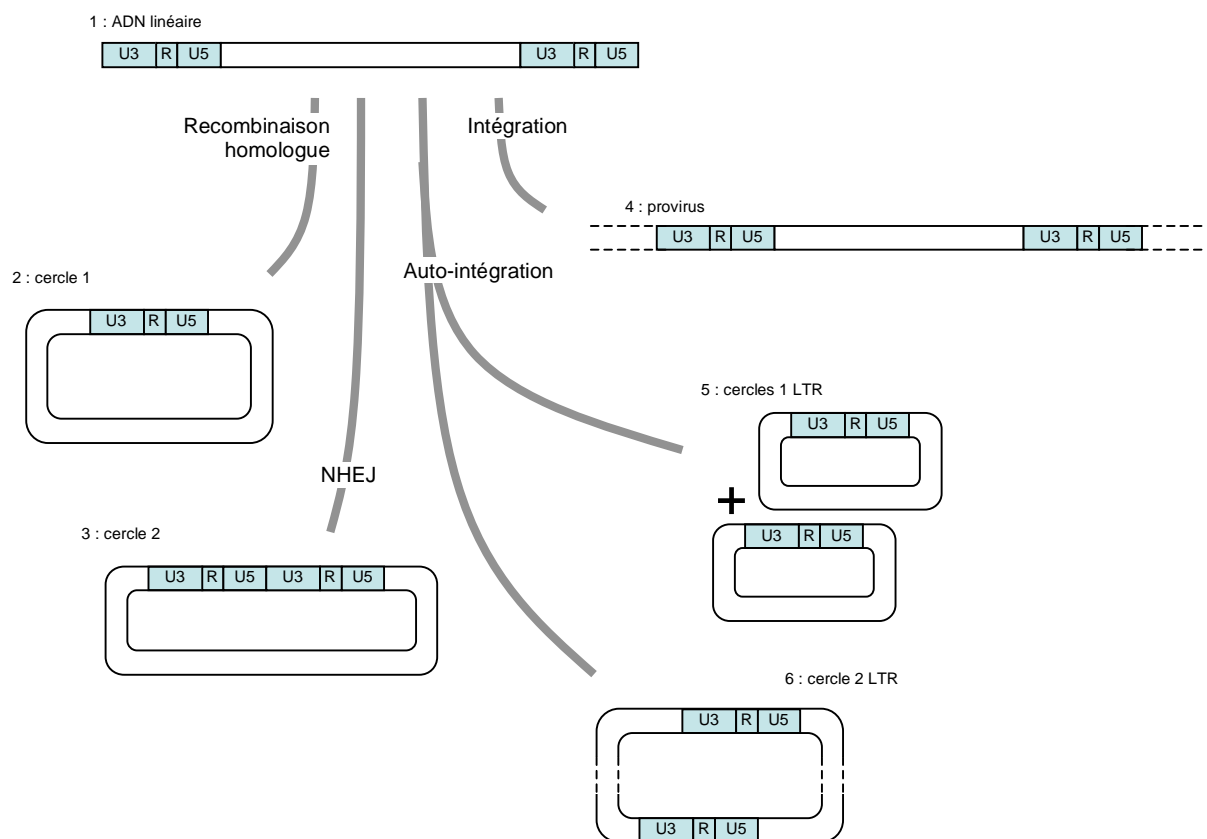
**Figure 6 :** Réaction d'intégration du génome HIV dans la chromatine de la cellule infectée. (i) L'ADN viral est associé aux protéines virales et cellulaires qui forment le CPI. (ii) L'intégrase (composant viral du CPI) élimine deux nucléotides à chaque extrémité 3' du génome, laissant les extrémités 5' protubérantes. (iii) L'intégrase ouvre l'ADN cellulaire cible sur 5 nucléotides, casse la molécule et lie les extrémités libres aux extrémités 3' virales. (iv) La structure intermédiaire contient des bases non appariées de part et d'autre de la jonction ADN cellulaire – ADN viral. (v) La machinerie cellulaire répare la jonction et lie les extrémités 5' virales. Le provirus intégré est encadré par une duplication sur 5 paires de bases du site d'intégration. D'après Van Maele *et al.*, 2006.

Parallèlement aux formes intégrées dans la chromatine de la cellule infectée peuvent exister plusieurs formes épisomales du génome viral (voir Figure 7) :

- une première fraction des formes linéaires peut être circularisée par liaison des extrémités, formant ainsi des cercles à 2 LTR (Smith *et al.*, 1990 ; Whitcomb *et al.*, 1990 ; Hong *et al.*, 1991). Cette réaction est indépendante de l'intégrase virale et fait intervenir des facteurs cellulaires, notamment la voie de recombinaison non-homologue (NHEJ pour *non-homologous end joining*) (Li *et al.*, 2001) ;

- une seconde fraction des formes linéaires peut être circularisée, également par l'intermédiaire de facteurs cellulaires, par un mécanisme de recombinaison homologue des LTR et ainsi former des cercles à 1 LTR (Farnet et Haseltine, 1991) ;
- une dernière partie des formes linéaires peut s'intégrer sur elle-même par une réaction intramoléculaire d'auto-intégration. Il résulte de cette réaction une forme circulaire de structure aléatoire (Shoemaker *et al.*, 1980 ; Farnet et Haseltine, 1991).

Ces formes non-intégrées ont longtemps été considérées comme les « déchets » de l'infection, inutiles et non fonctionnelles. Comme nous le verrons dans le [chapitre 2.3 p76](#), ce statut a depuis été reconsidéré.

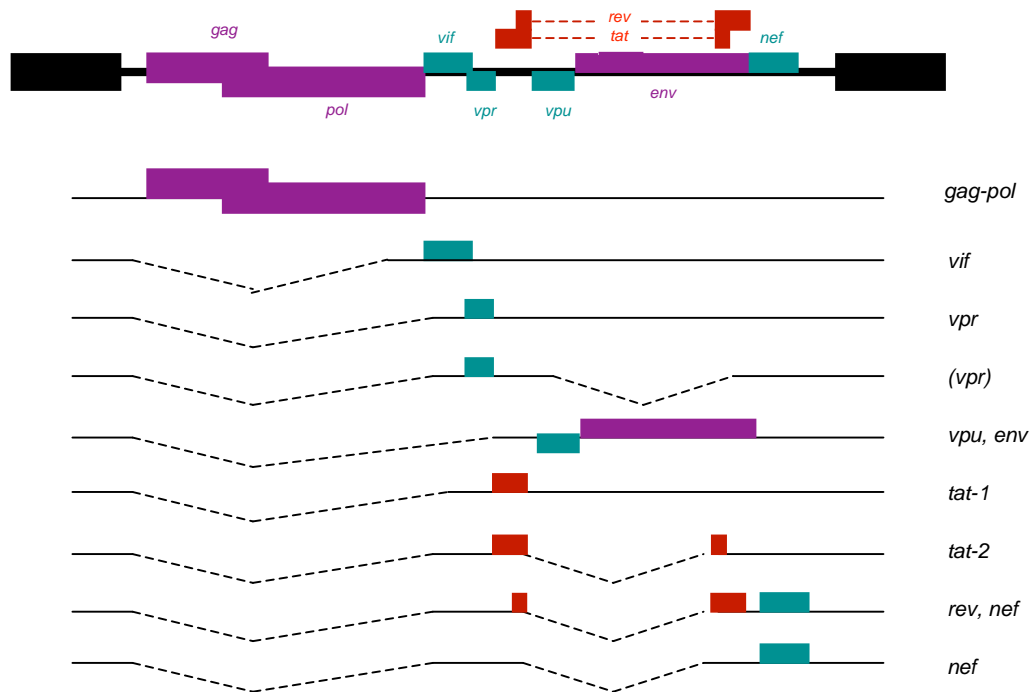


**Figure 7 : Structures des différentes formes de l'ADN viral dans les cellules infectées.** La forme linéaire (structure 1) est synthétisée dans le cytoplasme. Cette molécule peut être circularisée en cercles 1-LTR (structure 2), ou 2-LTR (structure 3). La molécule linéaire peut également être intégrée à la chromatine de la cellule (structure 4) ou s'intégrer sur elle-même (structures 5 et 6). D'après Farnet et Haseltine, 1991.

### 2.2.2.2. Phases tardives

La transcription du HIV est initiée par le LTR 5' qui recrute de nombreux facteurs de transcription cellulaires. Les ARN messagers viraux peuvent être épissés de nombreuses façons et générer de multiples transcrits matures qui permettront la formation des différents composants

protéiques du virus (voir Figure 8). Ils peuvent également n'être ni épissés ni traduits, mais encapsidés dans les particules nouvellement formées.



**Figure 8 :** Représentation schématique des différents transcrits du HIV. D'après Coffin, 1996.

Dans un premier temps, les ARN messagers sont épissés de sorte à permettre la synthèse des protéines *tat* et *rev*. Ces deux protéines s'accumulent donc progressivement. *tat*, en jouant son rôle de transactivateur du LTR, accélère la transcription des ARN messagers viraux qui sont alors épissés en vue de la production de l'ensemble des protéines virales. Dans un troisième temps, *rev*, qui s'est suffisamment accumulé, interagit avec les ARN messagers non épissés, par l'intermédiaire de la séquence *rev responsive element* (RRE). Il résulte de cette interaction un export vers le cytoplasme des génomes entiers, qui pourront être encapsidés dans les particules formées par l'assemblage des polyprotéines.

Les particules virales prématures sont alors évacuées de la cellule par bourgeonnement. Elles emportent une partie de la membrane cellulaire où se sont incorporées les glycoprotéines d'enveloppe. C'est une fois que la particule est à l'extérieur de la cellule que s'achève la maturation finale. Les précurseurs protéiques issus des gènes *gag* et *pol* sont clivés par la protéase virale pour générer l'ensemble des protéines virales, notamment l'intégrase et la rétrotranscriptase, issues du produit du gène *pol* (voir Figure 3 p69).

## 2.3. Les vecteurs lentiviraux non-intégratifs

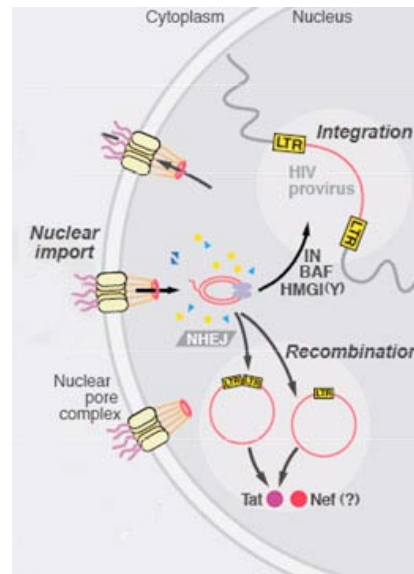
### 2.3.1. Hypothèse de travail

Trois critères doivent être satisfaits pour le développement d'un vecteur lentiviral non-intégratif : (1) la formation de génomes ADN épisomaux dans le noyau des cellules transduites, (2) la stabilité de ces formes épisomales, (3) l'activité transcriptionnelle de ces formes épisomales.

Comme nous l'avons vu précédemment, différentes formes du génome lentiviral sont produites au cours du processus d'infection : provirus intégré et cercles 1 et 2 LTR (voir [Figure 9](#)). Si l'un des éléments requis pour l'intégration n'est pas fonctionnel, les génomes peuvent être majoritairement dirigés vers la circularisation, comme c'est le cas pour les virus portant une mutation de classe I de l'intégrase ou dans les séquences *att*.

Toutefois, les formes épisomales du génome rétroviral ont pendant longtemps été tenues pour instables et inaptes à la transcription. En effet, la plupart des virus HIV mutés dans l'intégrase et les séquences *att* ne sont pas répliquatifs. Cette observation a conduit à poser l'intégration comme une étape centrale de la réplication virale et à considérer les formes épisomales comme les « déchets » de l'intégration. Ces formes étaient supposées ne pas permettre la transcription et être très rapidement dégradées et dépourvues de rôle dans la réplication.

C'est la confusion initiale entre intégrase et intégration, c'est-à-dire entre la protéine et sa fonction, qui a placé l'intégration au centre de la réplication virale et qui est à l'origine de ce statut de « rebut » attribué aux formes non intégrées (et probablement de leur supposée instabilité). Cependant, il a été émis la possibilité que des mutations de l'intégrase induisent des effets pléiotropiques sur la réplication par le biais d'un effet sur la polyprotéine *gag-pol*. L'implication de l'intégrase dans d'autres étapes que l'intégration a également été évoquée. Il a ainsi été admis que des mutations de l'intégrase peuvent avoir pour conséquence l'absence de génome ADN viral. Le rôle des formes épisomales a, dès lors, pu être reconsidéré et l'on suppose aujourd'hui qu'elles ont une fonction propre dans la pathogenèse du SIDA (voir [Wu, 2004](#) et [Cara et Klotman, 2006](#) pour revue). Il a en effet été démontré qu'elles sont stables dans le noyau des cellules après infection et qu'elles peuvent être transcrites par la machinerie cellulaire et donner lieu à la production de l'ensemble des protéines virales. L'ensemble de ces données, concernant la stabilité et l'activité transcriptionnelle des formes épisomales du génome lentiviral, sont détaillées dans ce chapitre.



**Figure 9 : Phase nucléaire précoce du cycle de réplication.** Import nucléaire du complexe de préintégration, puis (i) intégration de l'ADNc double brin viral dans la chromatine de la cellule hôte et formation du provirus stable ou (ii) circularisation et formation de cercles à 1 ou 2 LTR. D'après Greene et Peterlin, 2002.

### 2.3.2. Stabilité des formes épisomales

Les formes non intégrées du génome viral ont été initialement considérées comme très instables car rapidement dégradées par les endonucléases cellulaires. La présence de cercles 2 LTR était donc supposée être le signe d'une activité répliquative récente du virus. La mesure de leur taux chez les patients infectés par le HIV avait, de ce fait, été proposée comme indicateur de la présence de particules répliquatives (Pauza *et al.*, 1994). De nombreuses études ont ainsi utilisé la présence des cercles comme marqueur de l'infection HIV et plus particulièrement comme contrôle de l'efficacité d'un traitement antiviral (Furtado *et al.*, 1999 ; Panther *et al.*, 1999 ; Panther *et al.*, 1998 ; Zazzi *et al.*, 1997). Notons toutefois que Furtado et coll. rapportent une demi-vie des formes épisomales comparables à celle des formes intégrées. Ce résultat traduit une cinétique de dégradation des formes épisomales et intégrées équivalente. Cette dégradation pourrait donc être attribuée à la mort cellulaire plutôt qu'à la dégradation des formes non-intégrées. Ce point n'a pourtant pas été soulevé et la supposée instabilité des formes épisomales a persisté.

Les travaux de Sharkey en 2000 (Sharkey *et al.*, 2000) avaient validé l'instabilité des formes épisomales au niveau moléculaire. Différentes lignées lymphocytaires ont été infectées par des virus sauvages puis traitées par des inhibiteurs de rétrotranscriptase qui bloquent la réplication. L'ADN des cellules a ensuite été extrait et analysé par PCR afin de quantifier les jonctions LTR-LTR des cercles 2-LTR et l'ADN viral total. Les auteurs avaient alors observé que la quantité totale de génomes, exprimée par million de cellules, était stable dans le temps, contrairement au nombre de cercles qui diminuait de façon drastique. Ils avaient donc conclu que les cercles sont instables et très rapidement dégradés après leur formation et que leur présence traduit une

réplication en cours du virus. Un certain nombre d'observations semblaient corroborer cette hypothèse. Les auteurs avaient par exemple noté, chez des patients infectés par le HIV sous traitement antiviral, une diminution parallèle des cercles et des génomes ARN viraux, alors que dans le même temps, la quantité d'ADN génomique viral était stable. De plus, chez des patients pour lesquels le niveau de génomes ARN était depuis plus de 6 mois au-dessous du seuil de détection, une concordance avait pu être établie entre la détection de cercles et la présence de virus répliquatifs.

Deux ans plus tard, ces résultats ont été contredits par deux études publiées en parallèle par Butler et coll. (Butler *et al.*, 2002) et Pierson et coll. (Pierson *et al.*, 2002a). Ces travaux démontrent que, dans un contexte où la mort cellulaire est fortement réduite, l'élimination des cercles est majoritairement fonction de la division cellulaire. Cette réinterprétation de l'instabilité apparente des formes épisomales permet aux auteurs d'établir que, *in vitro*, les formes épisomales ne sont pas dégradées par les endonucléases cellulaires mais, au contraire, très stables. Pierson propose un temps de demi-vie de 100 jours à 1 an, en fonction des différentes expériences. La disparition des cercles, observée par Sharkey et coll., peut donc être expliquée par deux facteurs, dont les auteurs n'ont pas tenu compte : (i) la division cellulaire qui induit la perte des formes épisomales par dilution alors que les formes intégrées sont répliquées de façon stable avec l'ADN génomique cellulaire et (ii) la mort cellulaire due à la toxicité du virus. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par une étude de Brussel et coll. (Brussel *et al.*, 2003). Les auteurs proposent également une estimation de la demi-vie des cercles. Elle varie selon les patients et dans le temps, suivant que le patient est sous traitement antiviral ou non, et peut atteindre 361 mois (par extrapolation de l'étude).

### 2.3.3. Transcription des formes épisomales

Le second point qui a longtemps retardé le développement des vecteurs lentiviraux non-intégratifs est la supposée non-permissivité des cercles à la transcription. Le raisonnement qui a conduit à cette conclusion se fonde sur deux observations (1) l'intégrase est responsable de la catalyse de la réaction d'intégration du génome viral dans la chromatine de la cellule infectée ; (2) la délétion de tout ou partie de cette enzyme conduit à l'absence de toute production de protéines virales ; en conclusion, l'intégration est nécessaire à la transcription du génome viral. Ce raisonnement omet toutefois plusieurs points importants, notamment (1) l'intégrase est produite en tant que composante de la polyprotéine *gag-pol*, et (2) la catalyse de l'intégration n'est pas la seule fonction de l'intégrase.

Il faudra attendre que les études de mutagenèse se raffinent pour qu'émerge le concept de mutations de classe I et de classe II. À lumière de ces distinctions est apparue une corrélation entre la présence de cercles et l'expression de protéines virales : des virus portant une mutation dans l'intégrase peuvent produire des protéines virales dès lors que la mutation n'affecte pas, par

exemple, la rétrotranscription, et que des molécules d'ADN viral sont synthétisées et atteignent le noyau.

### 2.3.3.1. Transcription des formes épisomales dans le contexte viral

Les premières études portant sur des virus mutants pour l'intégrase montrent généralement que les virus mutants pour l'intégrase ne sont pas répliatifs (Clavel *et al.*, 1989 ; Haseltine, 1989 ; Stevenson *et al.*, 1990a ; Adachi *et al.*, 1991). L'intégrase étant responsable de l'intégration, l'interprétation de ces résultats aboutit rapidement au dogme selon lequel l'intégration est nécessaire à la répliation puisque que l'intégration est nécessaire à la transcription. Or ces études sont fondées sur la caractérisation de diverses mutations importantes de l'intégrase : délétions, insertions, substitutions, induisant ou non un décalage du cadre de lecture. Ces différentes mutations laissent intacte une plus ou moins grande partie de la protéine et ont souvent des répercussions sur l'ensemble de la polyprotéine *gag-pol*. De telles mutations ont donc potentiellement des conséquences sur l'ensemble de la particule et des étapes de la répliation.

Une étude publiée en 1993 avait effectivement confirmé que la non-infectivité des particules portant une mutation dans l'intégrase s'explique par l'absence de transcription des formes épisomales (Sakai *et al.*, 1993). Les auteurs ont utilisé un virus HIV qui porte une mutation dans l'intégrase induisant un décalage du cadre de lecture. Le virus porte également, dans la région du gène *nef*, le gène rapporteur de la chloramphénicol acétyl-transférase (CAT). Après infection de cellules CD4+, les virus mutants ne montrent aucune activité CAT significative par rapport aux virus sauvages. Les auteurs concluent donc à l'inefficacité des formes épisomales du génome viral pour la synthèse de protéines virales. Ils n'ont cependant pas établi la présence de ces formes épisomales et ont supposé, trop rapidement, que la seule conséquence de leur mutation était l'absence d'intégration.

Parallèlement, plusieurs études montrent des résultats tout à fait contraires. À titre d'exemple, dans des conditions proches de celles de Sakai et coll. en 1993, Stevenson et coll. (Stevenson *et al.*, 1990a) démontrent en 1990 la possibilité de produire des antigènes viraux à partir des formes épisomales du génome. Leur étude compare plusieurs virus HIV portant différentes délétions et/ou substitutions dans la région de l'intégrase. Les auteurs décrivent, après infection de cellules CD4+, l'absence de répliation, en accord avec les résultats précédents, mais néanmoins la production des protéines p24 et d'enveloppe à partir des formes non intégrées. De façon comparable, d'autres travaux décrivent l'expression de *tat* (Stevenson *et al.*, 1990b ; Ansari-Lari *et al.*, 1995 ; Engelman *et al.*, 1995 ; Wiskerchen et Muesing, 1995), *nef* (Wu et Marsh, 2001) ou p24 et RT (Cara *et al.*, 1995) ou une immunoréactivité au sérum anti-HIV (Vogel *et al.*, 1993) après infection avec différents HIV mutants d'intégrase.

L'analyse de l'intégrase est de plus en plus précise. Les études ne portent plus sur des délétions qui entraînent des décalages du cadre de lecture et de profondes perturbations du virus et de sa

réplication, mais sur les conséquences de la substitution ponctuelle des résidus conservés, notamment le motif (D,D-35-E), qui constitue le site catalytique. Différents phénotypes se distinguent en fonction des mutations : répercussions sur l'assemblage des particules, sur le bourgeonnement, l'entrée dans la cellule ou encore la synthèse de l'ADN génomique viral. L'implication de l'intégrase dans des étapes autres que la catalyse de l'intégration se précise (Cannon *et al.*, 1994 ; Shin *et al.*, 1994 ; Taddeo *et al.*, 1994 ; Englund *et al.*, 1995 ; Leavitt *et al.*, 1996).

Malgré la description de ces différents phénotypes et la mise en évidence des répercussions possibles des mutations de l'intégrase sur l'ensemble du cycle viral, la question de l'expression des cercles reste toujours en suspens. Finalement, A. Engelman propose une explication en 1999 (Engelman, 1999). En considérant que l'intégrase fait partie du précurseur polyprotéique *gag-pol* et que la séquence codante contient également la séquence cPPT agissant en *cis*, il est attendu que certaines mutations de l'intégrase aient des répercussions pléiotropiques sur la particule et le cycle de réplication. Il propose alors la distinction de deux classes de mutations d'intégrase : les mutations de la première classe induisent un blocage spécifique de l'intégration, tandis que les conséquences des mutations de classe II sont pléiotropiques. Ainsi, lors d'une infection avec un mutant de classe I, le génome viral est correctement rétrotranscrit et importé dans le noyau, où il peut être transcrit par la machinerie cellulaire. Au contraire, les virus mutants de classe II peuvent présenter un défaut à bien d'autres étapes du cycle, comme l'assemblage des particules, l'import nucléaire ou la rétrotranscription. En conséquence, aucun génome viral n'est présent dans le noyau, il ne peut donc y avoir transcription.

*A posteriori*, cette classification permet d'expliquer pourquoi au cours de nombreuses études, les mutations d'intégrase étaient associées à une absence d'expression, notamment dans l'étude de Sakai et coll. décrite ci-dessus (Sakai *et al.*, 1993). Cette distinction a été largement vérifiée par la suite. Citons par exemple les travaux de Wu et coll. qui établissent une corrélation entre la présence de formes épisomales et l'expression (Wu *et al.*, 1999). Ils mettent également en évidence une implication de l'intégrase dans l'étape de rétrotranscription. De la même façon, Nakajima et coll. (Nakajima *et al.*, 2001) observent que la présence de cercles dans le noyau est associée à la production d'antigènes viraux (RT). Cette expression à partir des formes épisomales est même suffisante pour permettre la réplication, dans certaines conditions et dans une moindre mesure par rapport au virus sauvage.

L'article de Masuda et coll. demeure cependant inexplicable et est en désaccord avec les résultats présentés ci-dessus (Masuda *et al.*, 1995). Les auteurs ont comparé différents HIV mutants : mutations ponctuelles du site catalytique, de la région N-terminale de l'intégrase ainsi que des séquences *att*. Les virus produits portent le gène de la Luciférase à la place de *nef* et sont dépourvus d'enveloppe. Ils sont produits par transfection avec transcomplémentation de l'enveloppe et sont donc non-réplicatifs. La comparaison porte sur plusieurs points, dont la synthèse d'ADN génomique, l'intégration et l'expression qui est facilement évaluée par un dosage



d'activité Luciférase. L'analyse de la synthèse d'ADN génomique révèle que les mutations de la région N-terminale induisent un grave défaut de rétrotranscription, contrairement aux mutations du site catalytique ou des séquences *att* avec lesquelles la quantité de génomes synthétisés est équivalente à celle du contrôle. Toutes ces mutations induisent un phénotype non-intégratif plus ou moins marqué. La fréquence d'intégration d'un des mutants *att* est d'environ 40% de la fréquence observée avec le contrôle, tandis qu'elle est quasiment nulle pour les mutants du site catalytique. Enfin, contrairement à ce qui est décrit par ailleurs, l'analyse de l'expression de la Luciférase met en évidence une corrélation entre l'expression et l'intégration et non entre l'expression et la présence de génomes ADN. En effet, comme attendu, les mutants de la région N-terminale ne permettent pas l'expression du transgène. Toutefois, seul le mutant des séquences *att*, présentant un phénotype intégratif intermédiaire (40% d'intégration) permet une expression de la Luciférase détectable (environ 25% du niveau contrôle). Pour les autres mutants, y compris le mutant du site catalytique, aucune expression n'est détectée.

À l'exception des travaux de Masuda et coll., les données disponibles s'accordent sur le fait que les formes épisomales peuvent être transcrites, mais qu'en est-il de leur fonction ? Au cours de la phase asymptomatique de l'infection HIV, les formes épisomales représentent en effet plus de 90% du génome viral. Il est donc fort probable qu'elles jouent un rôle dans les étapes précoces de l'infection.

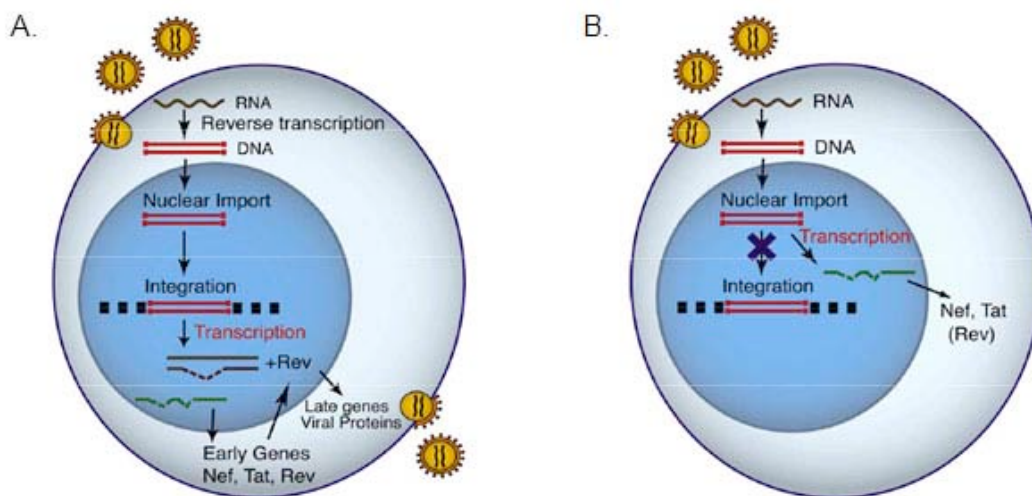
Des éléments de réponses ont été apportés dès 1990 par les travaux de Stevenson et coll. (Stevenson *et al.*, 1990b). Les auteurs démontrent que l'infection de cellules CD4+ non activées ne permet pas la réplication virale. Ils établissent que le blocage de la réplication dans les cellules inactivées se situe en amont de l'intégration. Néanmoins, ils observent la présence de génomes épisomaux, au moins sous forme de cercles (la présence d'ADN linéaire étant plus difficilement mise en évidence), qui permettent la synthèse de *tat*. De manière tout à fait surprenante, ils démontrent également que l'activation des cellules jusqu'à deux semaines après l'infection permet de relancer la réplication en levant le blocage de l'intégration du génome viral. Bukrinsky et coll. observent également la possibilité d'infection « à retardement » sur des lymphocytes de patients quiescents puis activés (Bukrinsky *et al.*, 1991).

Ce phénomène de « latence » semble commun à l'ensemble des rétrovirus puisqu'il a été rapporté avec le MLV, un oncorétrovirus, et le HFV (*Human foamy virus*), un spumavirus : l'arrêt du cycle cellulaire bloque l'infection, mais si la cellule quitte la phase G<sub>0</sub> après mise en contact avec le virus, le cycle est achevé (Bieniasz *et al.*, 1995). Il est également observé avec des vecteurs non-répliatifs dérivés du HIV (Naldini *et al.*, 1996a). Ces différentes observations démontrent la dépendance de l'infection des rétrovirus au cycle cellulaire et suggèrent qu'une partie de l'ADN rétrotranscrit peut persister au sein d'un complexe qui demeure actif et compétent pour l'intégration pendant plusieurs jours.

Bien plus récemment, Wu et Marsh ont émis l'hypothèse que les formes épisomales, présentes après infection dans le noyau de cellules non activées, sont responsables d'une production

précoce des protéines *nef* et *tat* qui, elles-mêmes, agissent sur la cellule pour l'activer (Wu et Marsh, 2001). Une fois la cellule activée, le virus achèverait son cycle et s'intégrerait dans la chromatine de la cellule (voir Figure 10). Par la suite, un examen plus approfondi des transcrits viraux dans les cellules non activées, à partir des formes épisomales, leur a permis de mettre en évidence une production transitoire de l'ensemble des messagers, précoces et tardifs (Wu et Marsh, 2003a). Comme décrit précédemment, seuls *nef* et *tat* sont traduits à un niveau détectable. Cependant, en présence de *rev* (apporté en *trans*), l'ensemble des transcrits est traduit et toutes les protéines sont produites à partir des formes épisomales.

Tout comme la transcription des formes intégrées, la transcription des formes épisomales est soumise à des phénomènes de régulation. En effet, le rôle de *vpr* dans la transactivation du LTR a été décrit (Gummuluru et Emerman, 1999 ; Hrimech *et al.*, 1999). Plus récemment, Poon et Chen (Poon et Chen, 2003) ont établi que la présence de cette protéine dans les cellules infectées, qu'elle soit exprimée en *trans* ou apportée dans la particule virale, permet à un virus déficient pour l'intégration d'exprimer les protéines virales à un niveau comparable à un virus sauvage. En son absence, l'expression à partir du virus non-intégratif est réduite de 10 à 20 fois par rapport au virus sauvage.



**Figure 10 : Influence de l'état de la cellule (activée/quiescente) sur l'infection par le HIV.** Dans la cellule activée (A), le cycle répliatif se déroule dans son ensemble. Dans la cellule quiescente (B), le cycle est bloqué juste avant l'intégration. Seules *nef* et *tat* (et *rev*?) sont exprimées à partir du génome épisomal, l'accumulation de ces protéines pourrait participer à l'activation de la cellule, ce qui permettrait alors l'intégration et l'achèvement du cycle de réplication. D'après Wu et Marsh, 2003b.

Ces résultats suggèrent donc que la transcription des formes épisomales du génome HIV remplit une fonction propre dans le cycle viral (voir Cara et Klotman, 2006 pour revue). Cependant, comme l'ensemble des étapes du cycle viral, elle est soumise à des régulations complexes qui ne sont pas clairement identifiées et qui font intervenir tant des facteurs de la cellule infectée que des

éléments du virus lui-même (voir Wu et Marsh, 2003b ; Wu, 2004 ; Yamashita et Emerman, 2006).

Dans le système de vecteur, contrairement au virus, la transduction n'est pas dépendante de tous ces éléments de régulation complexes, en tout cas dans une moindre mesure. En particulier, l'expression du transgène n'est pas dépendante du LTR qui requiert la transactivation par *tat*, mais est dirigée par un promoteur interne autonome. Il est donc raisonnable de penser qu'un vecteur lentiviral portant une mutation de l'intégrase de classe I, c'est-à-dire favorisant la formation de génomes épisomaux dans le noyau de la cellule transduite, permet l'expression d'un transgène. Cette question a été posée par différents groupes.

### 2.3.3.2. Transcription des formes épisomales dans le contexte vecteur

Parallèlement à ces travaux et observations portant sur le virus HIV, différents vecteurs lentiviraux porteurs de mutations dans l'intégrase ont été décrits. En premier lieu, il convient de citer les travaux de Naldini et coll. qui sont décrits ci-dessous.

Un premier article publié en 1996 (Naldini *et al.*, 1996b) rapporte que des vecteurs dérivés du HIV et produits avec une mutation introduisant un codon stop très tôt dans la séquence codante de l'intégrase ne permettent pas la transduction de cellules. Ces résultats sont en accord avec la description antérieure des effets de cette mutation (Ansari-Lari *et al.*, 1995) puisqu'elle induit un grave défaut de rétrotranscription (mutation *a posteriori* dite de classe II). Par ailleurs, s'il s'agit d'une substitution dans le site catalytique, la substitution D64V (Leavitt *et al.*, 1996), les auteurs décrivent une expression faible mais détectable du transgène. Les titres sont fortement réduits par rapport à l'équivalent sauvage (équivalent à 5 à 10%), mais restent mesurables. Les auteurs attribuent cette expression faible aux formes épisomales du génome. À nouveau, ces résultats sont cohérents avec les observations dans le contexte viral puisque la substitution utilisée sera *a posteriori* dite de classe I, donc compatible avec la transcription. Il est également intéressant de noter que le titre des vecteurs portant la mutation D64V est plus élevé sur cellules en arrêt de division (G1-S) (130 TU/ng p24) que sur cellules en croissance (54 TU/ng p24).

Quelques mois plus tard, les mêmes auteurs publient un article qui affirme que l'intégration est requise pour la transduction *in vivo* (Naldini *et al.*, 1996a). En effet, après injection d'un vecteur portant la mutation D64V, les auteurs n'observent pas de cellules exprimant le transgène. Des résultats tout à fait comparables sont présentés dans l'article publié par la même équipe l'année suivante (Blomer *et al.*, 1997). À la suite de ces publications, les vecteurs lentiviraux mutants pour l'intégrase ont été utilisés comme contrôle négatif, en accord avec le dogme établi de la non-permissivité à la transcription des formes épisomales, mais en contradiction avec la théorie des mutants de classe I (qui ne sera émise qu'en 1999).

En 2002, Baekeland et coll. suggèrent pourtant qu'un vecteur portant la mutation D64V de l'intégrase permet une expression du transgène *in vivo* (Baekelandt *et al.*, 2002). Les auteurs ont injecté dans le striatum de souris un vecteur dérivé du HIV portant cette mutation du site catalytique, initialement comme contrôle négatif du vecteur non-modifié. Ils ont observé l'expression du transgène 2 semaines après injection. Les vecteurs utilisés dans cette étude sont très similaires à ceux utilisés par Naldini et coll., à ceci près que (i) ils comportent la séquence WPRE, connue pour améliorer l'efficacité d'expression du transgène, et (ii) le transgène en question est la GFP, au lieu de la  $\beta$ -Gal, dont la séquence est beaucoup plus longue que celle de la GFP et donc susceptible de réduire l'efficacité de rétrotranscription des vecteurs. L'analyse de ces vecteurs mutants s'est bornée à cette observation de l'expression du transgène et n'a pas été approfondie.

Cette observation est néanmoins passée inaperçue puisqu'en 2003, le groupe de Poeschla confirme à nouveau qu'un vecteur lentiviral portant une mutation d'intégrase de classe I constitue un bon contrôle négatif pour l'étude de la transduction dans le cadre d'injection sous la rétine (Loewen *et al.*, 2003). Les auteurs décrivent non pas un vecteur dérivé du HIV portant une mutation D64V dans l'intégrase, mais un vecteur dérivé du virus de l'immunodéficience félin (FIV) portant une substitution de l'acide aminé D66, équivalent du D64 de HIV (D66V). Ils n'observent pas d'activité  $\beta$ -Gal dans l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE) après injection sous la rétine, alors que l'injection du vecteur sauvage dans les mêmes conditions aboutit à l'expression de la  $\beta$ -Gal dans la rétine. Le dogme de la nécessité de l'intégration du génome vecteur pour l'expression du transgène est donc bien établi, bien qu'il aille à l'encontre des données obtenues avec les virus.

Quelques mois plus tard, la même équipe publie une description plus détaillée du vecteur FIV D66V (Saenz *et al.*, 2004). *In vitro*, sur cellules en division, le titre des vecteurs mutants est drastiquement réduit par rapport aux vecteurs sauvages (3 à 5 log). En accord avec leurs résultats précédents, les auteurs ne détectent aucune expression du transgène *in vivo* après injection sous la rétine. De façon surprenante, les résultats sont différents *in vitro*. En effet, dans des cellules traitées à l'aphidicoline<sup>7</sup>, l'efficacité de transduction des vecteurs mutants est équivalente à celle des vecteurs sauvages. Les auteurs concluent donc qu'il existe une corrélation entre la transduction par un vecteur mutant pour l'intégrase et le cycle cellulaire. Effectivement, 48h après transduction de cellules en division, ils observent une quantité totale de génomes très faible avec le vecteur mutant par rapport au vecteur sauvage, tandis que la même quantification après transduction de cellules traitées à l'aphidicoline indique que le nombre de génomes est comparable avec les deux types de vecteurs.

---

<sup>7</sup> Aphidicoline : molécule induisant le blocage du cycle cellulaire en phase G1/S.

Comme décrit précédemment (voir [chapitre 1.1.2.1 p21](#)), une telle corrélation entre réplication et cycle cellulaire a été clairement établie dans l'infection par HIV des cellules CD4+, cependant, elle est opposée à celle proposée par les auteurs : la réplication est bloquée dans les cellules quiescentes (G<sub>0</sub>) et requiert l'activation de la cellule.

Comme mentionné précédemment, les auteurs décrivent une expression du transgène comparable entre les vecteurs sauvages et mutants si les cellules sont traitées à l'aphidicoline au moment de la transduction. Ils déclarent également devoir attendre 10 jours pour perdre cette expression quand les cellules sont remises en cycle. Il est donc surprenant que, 48h après transduction, ils n'observent pas d'expression du transgène si les cellules sont en division au moment de la transduction.

Dans le même article, des résultats comparables sont obtenus avec des virus FIV et une expression à partir du promoteur du LTR, et non plus un promoteur interne, à la différence près que l'expression du transgène observée dans les cellules traitées à l'aphidicoline avec le virus mutant n'atteint pas le niveau d'expression obtenu avec le virus sauvage. Le promoteur LTR est donc plus affecté par l'état épisomal que le promoteur interne du vecteur.

Par la suite, Vargas et coll. proposent un système d'épisode réplcatif développé à partir de vecteurs dérivés du HIV et portant une mutation de classe I de l'intégrase ainsi que l'origine de réplication du virus SV40 (Vargas *et al.*, 2004). Les auteurs rapportent que les vecteurs déficients pour l'intégration sont capables de diriger l'expression d'un transgène dans des cellules en division, avec une efficacité relativement comparable en termes de pourcentage de cellules exprimant la GFP ou d'intensité de la fluorescence par cellule. De plus, cette fluorescence peut être maintenue au cours des divisions cellulaires, par la combinaison de l'origine de réplication et du TAg (*trans-acting* SV40 T antigen) de SV40. Dans ces conditions, la présence de jonctions 2-LTR est également maintenue plus de 50 jours après transduction.

En résumé, en 2001, de nombreux éléments attestent de la transcription à partir des formes épisomales du génome viral et la distinction des mutations de classes I et II de l'intégrase a été faite. Cependant, ces données ne concernent que les virus. En effet, les vecteurs lentiviraux portant une mutation de classe I dans l'intégrase sont toujours considérés comme contrôles négatifs. C'est dans ce contexte que le projet de développement d'un vecteur lentiviral non-intégratif a été initié dans notre laboratoire.

L'absence d'expression du transgène ayant été rapportée avec des vecteurs D64V, nous nous sommes, dans un premier temps, orientés vers une autre mutation. Nous avons utilisé une mutation de la région N, située dans la région C-terminale de l'intégrase. Nous avons établi que des vecteurs portant cette mutation sont effectivement non-intégratifs et permettent l'expression du transgène *in vitro* ainsi qu'*in vivo*. L'efficacité de transduction observée est cependant moindre pour les vecteurs mutants par rapport aux vecteurs intégratifs et ces vecteurs ne sont pas

totalément dépourvus de leur capacité d'intégration. Ces résultats font l'objet de la première partie du travail que je présente.

Dans une seconde partie, nous nous sommes attachés à améliorer l'efficacité de transduction des vecteurs lentiviraux non-intégratifs, en termes d'efficacité d'expression du transgène et d'activité d'intégration résiduelle. Plusieurs stratégies ont été adoptées, nous avons en particulier comparé les premiers vecteurs avec d'autres portant différentes mutations d'intégrase ou des séquences *att*. Ces travaux constituent la deuxième partie des résultats présentés.

## Les devises Shadok



IL VAUT MIEUX POMPER MÊME S'IL NE SE PASSE  
RIEN QUE RISQUER QU'IL SE PASSE QUELQUE CHOSE  
DE PIÈRE EN NE POMPANT PAS.

---

# MATERIEL ET METHODES

---

Ce chapitre compte trois parties.

Dans une première partie, je décrirai la construction de l'ensemble des plasmides utilisés pour les travaux présentés. Je présenterai également le système de production des vecteurs lentiviraux en place au laboratoire ainsi que les différentes méthodes de titration qui ont été utilisées.

Dans une seconde partie, je récapitulerai l'ensemble des méthodes qui ont servi à la caractérisation des vecteurs *in vitro*.

Enfin, la troisième partie sera consacrée aux méthodes utilisées *in vivo*.



# 1. LES VECTEURS LENTIVIRAUX

## 1.1. Système de production

La production de vecteurs HIV recombinants est réalisée au laboratoire comme décrit précédemment (Naldini *et al.*, 1996a ; Zennou *et al.*, 2001) selon un protocole de transfection transitoire de cellules 293T par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. Brièvement, les cellules sont transfectées par un précipité de phosphate de calcium des 3 plasmides suivants dans les proportions 2 : 2 : 1 (voir Figure 11) :

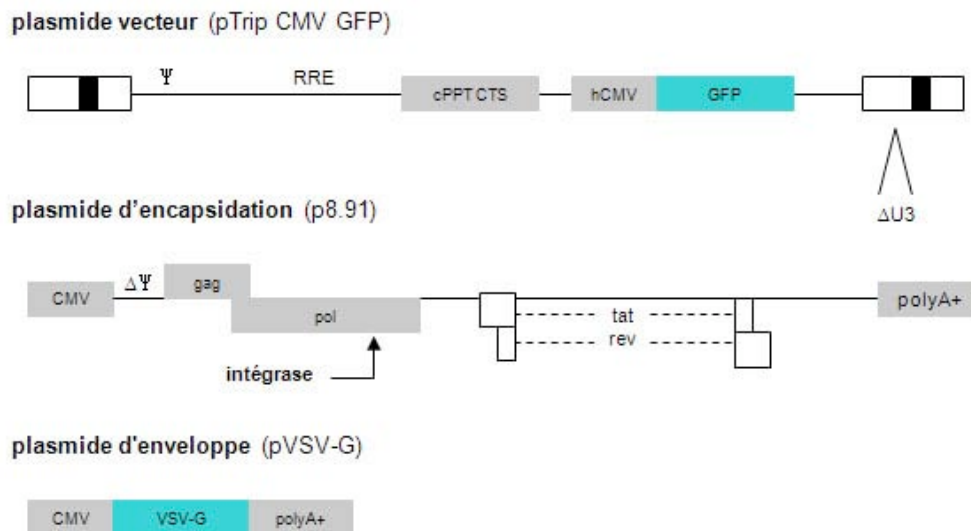
- le plasmide vecteur : il porte la séquence  $\psi$  (signal d'encapsidation). L'ARN transcrit à partir de ce plasmide sera donc encapsidé ;
- le plasmide d'encapsidation ou de transcomplémentation : il permet la production de l'ensemble des protéines de la capsid (protéines de structure et enzymes) ;
- le plasmide d'enveloppe : il permet la synthèse de la glycoprotéine d'enveloppe qui s'associe à la membrane cellulaire pour former l'enveloppe de la particule qui sort de la cellule par bourgeonnement.

Le surnageant des cellules transfectées est récolté après 48 heures de culture, traité à la DNase et filtré (0.45 $\mu$ m). Les particules sont alors concentrées par ultracentrifugation 90 minutes à 22 000 rpm (rotor SW28, rayon 11.82cm) puis resuspendues dans du *phosphate buffered saline* (PBS) 1x. La suspension est enfin clarifiée par centrifugations successives, puis aliquotée et conservée à -80°C.

### 1.1.1. Construction des plasmides

#### 1.1.1.1. Plasmides d'encapsidation

Les plasmides p8.9 IN<sub>WT</sub>-HA, p8.9 IN<sub>N</sub>-HA et p8.91 IN<sub>LQ</sub>-HA permettent, respectivement, l'expression d'une intégrase sauvage (IN<sub>WT</sub>) ou mutée (IN<sub>N</sub> ou IN<sub>LQ</sub>) fusionnée à l'hémagglutinine (HA). La mutation N consiste en une substitution <sup>262</sup>RRK- $\rightarrow$ AAH, la mutation LQ en une substitution <sup>186</sup>K $\rightarrow$ Q, <sup>214</sup>Q $\rightarrow$ L, <sup>216</sup>Q $\rightarrow$ L. Ces plasmides ont été construits par substitution de la séquence de l'intégrase du plasmide p8.9 (fragment BstZ171-SalI) par le fragment correspondant des plasmides pBRU IN<sub>WT</sub>-HA, pBRU IN<sub>N</sub>-HA et pBRU IN<sub>LQ</sub>-HA. Ces plasmides nous ont été fournis par C. Petit (Paris) et contiennent le génome complet du HIV-1 avec une intégrase sauvage fusionnée à l'hémagglutinine (IN<sub>WT</sub>-HA) ou une intégrase fusionnée mutée dans la région N (IN<sub>N</sub>-HA) ou dans les régions L et Q (IN<sub>LQ</sub>-HA) (Petit *et al.*, 1999 ; Petit *et al.*, 2000).



**Figure 11 : Système de production de vecteurs lentiviraux** par transfection de trois plasmides : **le plasmide vecteur** portant le transgène, par exemple la GFP, sous contrôle du promoteur interne, par exemple le promoteur du cytomégalovirus humain (hCMV), ainsi que la séquence du *flap* central (central polypurine tract (cPPT)) qui intervient dans l'import nucléaire, la séquence RRE (REV Responsive Element) qui interagit avec un élément de régulation REV, la séquence d'encapsidation psi ( $\psi$ ) et dont le *enhancer* de la région U3 du LTR 3' a été déléetée ( $\Delta$ U3 ou SIN) ; deux plasmides de transcomplémentation : **le plasmide d'encapsidation** exprimant les protéines nécessaires à la formation de la capsid (gag et pol), des éléments de régulation (*tat*, *rev*) sous contrôle du promoteur CMV et déléeté de la séquence  $\psi$  ; et **le plasmide d'enveloppe** exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) sous contrôle du promoteur CMV.

Le fragment BstZ171-Sall des plasmides pBRU contient, en plus de la séquence de l'intégrase, la séquence complète du gène *vif*. Cette séquence a donc été introduite dans les plasmides de transcomplémentation p8.9 IN<sub>WT</sub>-HA, p8.9 IN<sub>N</sub>-HA et p8.91 IN<sub>LQ</sub>-HA. Toutefois, cette séquence n'est pas active. En effet, la région 5' de la séquence de *vif* chevauche la région 3' du gène de l'intégrase. La séquence du peptide HA est donc introduite dans la séquence du gène *vif*. De plus, la séquence du peptide HA apporte un codon stop en phase avec le cadre de lecture de *vif* (voir Figure 12).

```

5' ... nnn nnn nnn atg gaa aac aga tgg cag gtg atg att gtg tgg caa gta gac agg atg agg atT
ACC CAT ACG ATG TTC CAG ATT ACG CTA GCC TAG GTt aga aca nnn nnn ... 3'

```

**Figure 12 : Représentation de la séquence 3' de l'intégrase fusionnée avec l'hémagglutinine** (majuscule). La séquence 3' de l'intégrase chevauche la région 5' de la séquence de *vif* (souligné). L'introduction de HA dans *vif* ne décale pas le cadre de lecture, mais introduit un codon stop précoce (gras encadré).

Le plasmide p8.91 IN<sub>N</sub> a été construit par substitution de la séquence de l'intégrase du plasmide du fragment BfuAI-AfIII du p8.9 par le fragment correspondant du plasmide pBRU-HA IN<sub>N</sub>.

Cette substitution introduit la mutation N dans le plasmide mais sans le peptide HA et sans la séquence inactive du gène *vif*.

Le plasmide p8.91 IN<sub>D64V</sub> a été construit par substitution du fragment BclI-AfIII du plasmide p8.91 par le fragment correspondant du plasmide p8.72 IN<sub>D64V</sub> qui nous a été fourni par le laboratoire de DB. Kohn (Los Angeles) (Nightingale *et al.*, 2006).

### 1.1.1.2. Plasmides vecteurs

Différents plasmides vecteurs ont été utilisés au cours des expériences présentées.

Le plasmide pTrip CMV GFP WPRE a été construit à partir du plasmide pΔ500 Trip CMV<sub>min</sub> WPRE décrit par Vogel et coll. (Vogel *et al.*, 2004). Ce plasmide présente une délétion de la région promotrice du LTR. Il contient la séquence cPPT-CTS et l'élément WPRE. Une délétion de 500pb a été réalisée en aval de la séquence RRE.

Le fragment correspondant au promoteur CMV<sub>min</sub> (MluI-SpeI) a été remplacé par une cassette CMV GFP amplifiée par PCR à partir du plasmide pEGFP-N1 (Clontech). Par la suite, le transgène a été remplacé par différentes séquences : gène de résistance à la Néomycine (NEO), Luciférase (LUC) et glial derived neurotrophic factor (GDNF).

Le plasmide pΔTrip CMV GFP WPRE a été construit à partir du plasmide pTrip CMV GFP WPRE par délétion du fragment EcoRI-MluI correspondant à la séquence cPPT-CTS.

Le plasmide plgκMAR Trip CMV LUC a été construit par introduction de la séquence IgκMAR (séquence d'attachement à la matrice du gène de la chaîne légère de l'immunoglobuline de souris), amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique de souris, entre les sites NheI-SalI dans le plasmide pTrip CMV LUC WPRE.

Les plasmides pChLMAR sens Trip CMV LUC et pChLMAR anti-sens Trip CMV LUC ont été construits par introduction de la séquence ChLMAR (séquence d'attachement à la matrice du gène du lysozyme de poulet), fragment KpnI-PstI du plasmide pPGA1 fourni par le laboratoire de N. Mermod (Lausanne), dans le plasmide pTrip CMV LUC WPRE ouvert par SalI.

Le plasmide pTrip CMV NEO *att-* a été construit par remplacement des fragments AfIII-NotI (LTR 5') et SacII-PacI (LTR 3') par les fragments correspondants du plasmide pCCL-c-MNDU3-X-I-EGFP-5'TG3' fourni par le laboratoire de DB. Kohn (Los Angeles) (Nightingale *et al.*, 2006).

## 1.2. Titration des stocks

Nous avons utilisé différentes méthodes afin de titrer nos stocks de vecteurs HIV. Nous avons mesuré la quantité de particules physiques par le biais de (1) la quantification de la protéine de

capside (exprimé en nanogramme de p24 par microlitre, ng p24/ $\mu$ L) et (2) la quantification des génomes ARN. D'autre part, pour les vecteurs dont le transgène est la GFP, nous avons déterminé un titre en particules efficaces pour la transduction (exprimé en unité de transduction par millilitre, TU/mL).

## 1.2.1. Mesure de la quantité de particules physiques

### 1.2.1.1. Mesure de la quantité de capsid

Une première méthode de titration consiste à quantifier la protéine p24 de la capsid des particules. Cette quantification est réalisée par *enzyme linked immuno-sorbent assay* (ELISA). Dans un premier temps, nous avons utilisé le kit Beckman Coulter HIV-1 p24 Antigen Assay, en accord avec les indications du producteur.

Dans un second temps, nous avons utilisé le kit Quick titer lentivirus quantitation kit de Cell Biolabs, INC., en accord avec les indications du producteur.

### 1.2.1.2. Mesure de la quantité de génomes ARN

La quantification de l'ARN vecteur des stocks a été réalisée par Dot blot.

Une extraction d'ARN a été réalisée sur 5 $\mu$ L de solution de vecteur par le kit Qiagen RNeasy Mini kit, selon les données du producteur.

La solution d'ARN dénaturé a été diluée dans une solution de SSC (concentration 5X finale) et déposée sur une membrane Hybond N+. Les ARN ont été fixés par exposition de la membrane aux UV puis la membrane a été pré-incubée dans un tampon Church à 65°C.

La sonde radioactive a été préparée par incorporation de dCTP <sup>$\alpha$ 32</sup> par *random priming* dans un fragment correspondant à la séquence WPRE du vecteur (kit Redi Prime II Random Prime Labelling System, Amersham).

La membrane a été incubée pendant 16h avec la sonde radiomarquée, puis lavée dans un tampon SDS 0,1% SSC 2X.

La quantification du signal a été réalisée après contact de la membrane avec un écran FUJI BAS-MP 2040 et analyse par PhosphoImager FLA 2000 FUJIFILM (logiciel Image Reader FLA-2000 V1.2 et AIDA 2.43).

### 1.2.2. Mesure de la quantité de particules efficaces

Pour les vecteurs permettant l'expression de la GFP, il est possible d'évaluer le titre en particules efficaces en comptant le nombre de cellules exprimant de transgène après transduction par des dilutions en série du stock à titrer.

Des cellules 293T sontensemencées sur plaque de 24 puits à raison de 70 000 cellules par puits. Après 48 heures, elles sont comptées et transduites par des dilutions en série du stock de vecteur à titrer. L'expression du transgène GFP est évaluée après 72 heures de culture. Les cellules sont dissociées dans du PBS 1x et fixées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 2%. Elles sont analysées par cytométrie de flux (*fluorescence activated cell sorter* (FACS), longueur d'onde :  $\lambda_{\text{excitation}} = 488\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 507\text{nm}$ ). Deux types de résultats sont obtenus pour chaque échantillon : le pourcentage de cellules exprimant la GFP et l'intensité de fluorescence moyenne par cellule fluorescente (*mean fluorescent intensity*, mfi). La concentration en particules efficaces pour la transduction ou *transducing unit* (TU) est évaluée à partir des résultats obtenus dans la partie linéaire de la gamme et du nombre de cellules initiales. On obtient ainsi un titre en unité de transduction par unité de volume (TU/mL).

## 2. CARACTERISATION DES VECTEURS

### IN VITRO

#### 2.1. Cultures cellulaires

##### 2.1.1. Lignées cellulaires

Nous avons utilisé trois lignées de cellules : des cellules 293T qui dérivent de cellules rénales d'embryon humain ; des cellules HeLa, une lignée épithéliale humaine ; des cellules MT4, une lignée lymphoïde humaine (non adhérente). Les cellules 293T et les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) contenant de la pénicilline 100 U/mL, de la streptomycine 100 µg/mL et 10% de sérum de veau fœtal (SVF), à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules MT4 ont été cultivées dans du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 contenant de la pénicilline 100 U/mL, de la streptomycine 100 µg/mL et 10% de SVF, à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 2.1.2. Cultures primaires

###### 2.1.2.1. Cultures de neurones et d'astrocytes primaires corticaux murins

Des cultures de neurones et d'astrocytes primaires corticaux ont été réalisées à partir d'embryons de rats (Sprague Dawley) à 17 ou 18 jours de développement. Les embryons sont prélevés et les cerveaux extraits. La dissection du cortex est effectuée sous une loupe binoculaire dans une solution de PBS 1X glucose 0.6%.

Une partie des prélèvements est reprise et dissociée dans 2mL de milieu de culture « neurones » (DMEM, apotransférine 100µg/mL, insuline 25µg/mL, putrescine 6.10<sup>-5</sup> M, sélénite de sodium 3.10<sup>-8</sup> M, progestérone 2.10<sup>-8</sup> M, pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL) pour la culture de neurones. Les cellules sont alorsensemencées à raison de 100 000 cellules par puit d'une plaque 96 puits préalablement traitée par de la polyornitine. Les cultures sont maintenues à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et le milieu est changé au demi tous les trois jours.

Le reste des prélèvements est repris dans du DMEM + SVF 10% et les cellules sont mises en culture dans des boîtes non-traitées, à 37°C, 10%CO<sub>2</sub>. Dans ces conditions, la majorité des cellules sont des astrocytes, qui prolifèrent jusqu'à confluence.

### **2.1.2.2. Cellules souches nerveuses fœtales humaines**

Les cellules souches nerveuses fœtales humaines TFH7 sont issues de la mise en culture de vésicules télencéphaliques, prélevées sur un fœtus âgé de 7 semaines de développement embryonnaire obtenu après interruption volontaire de grossesse (Buc-Caron *et al.*, 1995).

Après amplification en suspension sous forme de neurosphères, les cellules sont dissociées et ensemencées en plaques 96 puits sur substrat adhérent (gélatine/laminine) à une densité de  $1.10^4$  cellules par puits dans un milieu standard « N2 » supplémenté en bFGF (Roche Diagnostics, Nutley, NJ ; 10 ng/ml). Les cellules sont maintenues dans ces conditions pendant 2 jours puis transduites avec les différents vecteurs.

Après 24h, le milieu est remplacé soit par du milieu standard (N2 + bFGF), afin de conserver les cellules à l'état de progéniteurs, soit par du milieu standard supplémenté en SVF, afin de permettre la différenciation des cellules.

Soixante-douze heures après transduction, les cellules sont lysées pour permettre de quantifier l'expression de la Luciférase.

## **2.2. Analyse de l'expression du transgène**

### **2.2.1. Cytométrie en flux à fluorescence (FACS)**

Les cellules transduites par un vecteur exprimant la GFP sont dissociées par la trypsine au temps voulu après transduction, puis fixées dans une solution de PFA 2%. Elles sont ensuite analysées par FACS afin de déterminer, pour chaque échantillon, le pourcentage de cellules exprimant la GFP ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence par cellule (mfi).

### **2.2.2. Immunocytofluorescence**

Les cellules sont fixées dans une solution de PFA 2% au temps déterminé après transduction, puis mises en présence d'un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre la GFP, dilué au  $1/3000^e$  (Abcam, incubation 16 heures à température ambiante), révélé par un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgG de lapin couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dilué au  $1/100^e$  (TEBU, incubation 1 heure à température ambiante). Le marquage est alors visualisé en lumière fluorescente.

### 2.2.3. Activité Luciférase

Les cellules transduites par un vecteur exprimant la Luciférase sont analysées à l'aide du kit Bright Glow Luciferase (Promega), en suivant les indications du producteur. Cette analyse permet de déterminer l'activité Luciférase dans chaque échantillon. Les résultats sont ensuite normalisés par la concentration en protéines totales de l'échantillon. Le dosage de protéines est réalisé par la méthode de Bradford à l'aide du kit Biorad Protein Assay (Biorad), en accord avec les indications du producteur.

### 2.2.4. Dosage du GDNF

L'efficacité de transduction d'un vecteur exprimant le GDNF est déterminée par dosage du GDNF sécrété dans le milieu de culture des cellules, à un temps donné après transduction par ce vecteur. Le milieu de culture des cellules est renouvelé 4h avant le prélèvement pour le dosage. Le dosage est réalisé par ELISA à l'aide du kit GDNF E<sub>max</sub> ImmunoAssay System (Promega), en accord avec les indications du producteur.

## 2.3. Analyse de l'activité résiduelle d'intégration

### 2.3.1. Sélection de clones stables résistants au G418

Des cellules HeLa sont transduites en suspension par une quantité croissante de vecteur exprimant le gène de résistance à la néomycine (NEO). Après 2h de contact, les cellules sontensemencées à très faible densité (30 cellules/mm<sup>2</sup>). Elles sont cultivées pendant 24h à 4 jours dans un milieu normal (DMEM + SVF 10%) puis en présence de G418 1mM à 1.5mM. Le milieu de culture est renouvelé tous les trois jours pendant une semaine. Les cellules sont alors fixées dans une solution de PFA 2% et colorées par une solution de bleu Trypan. Le nombre de clones est évalué et exprimé en fonction de la dose de vecteur, exprimé en p24.

### 2.3.2. LAM-PCR

Le protocole de LAM-PCR a été mis au point à partir de la méthode décrite par Schmidt et coll. (Schmidt *et al.*, 2001). Le principe est récapitulé dans la [Figure 13](#).

#### 1. Extension d'amorce

Une amorce biotinyllée en 5', complémentaire du vecteur dans la région U5 du LTR (RU5s1 : GAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCG), est utilisée pour synthétiser une molécule simple brin complémentaire de la jonction ADN vecteur-ADN cellulaire (99 cycles).



## 2. Capture du brin

Les fragments synthétisés sont capturés sur des billes aimantée couvertes de streptavidine (Dyna, incubation 1h, à température ambiante sous agitation). Les fragments d'intérêt, couplés aux billes, sont ensuite lavés et resuspendus dans de l'eau.

## 3. Synthèse du brin complémentaire

La synthèse du brin complémentaire des fragments d'intérêt est réalisée par la Kleenow en présence d'une solution d'amorces aléatoires et de dNTPs (incubation 1h30 à 37°C sous agitation).

## 4. Digestion MseI

Les fragments double brins, correspondant à la jonction ADN vecteur-ADN cellulaire, sont digérés par l'enzyme MseI, qui reconnaît un site dans la partie ADN cellulaire (incubation 2h à 37°C sous agitation).

## 5. Ligation de l'ancre

Une ancre, complémentaire à l'extrémité cohésive générée par la digestion par MseI, a été générée par hybridation de deux amorces (ANCR1 : TACGCTCCTCTCGCTACCTGCTCACTCTGCGTGACAT ; ANCR2 : ATGTCACGCAGAGTGAGCAGGTAGCGAGAGGAGCGTA). Elle a été liguée au fragment d'intérêt (incubation 3h à température ambiante).

## 6. PCR

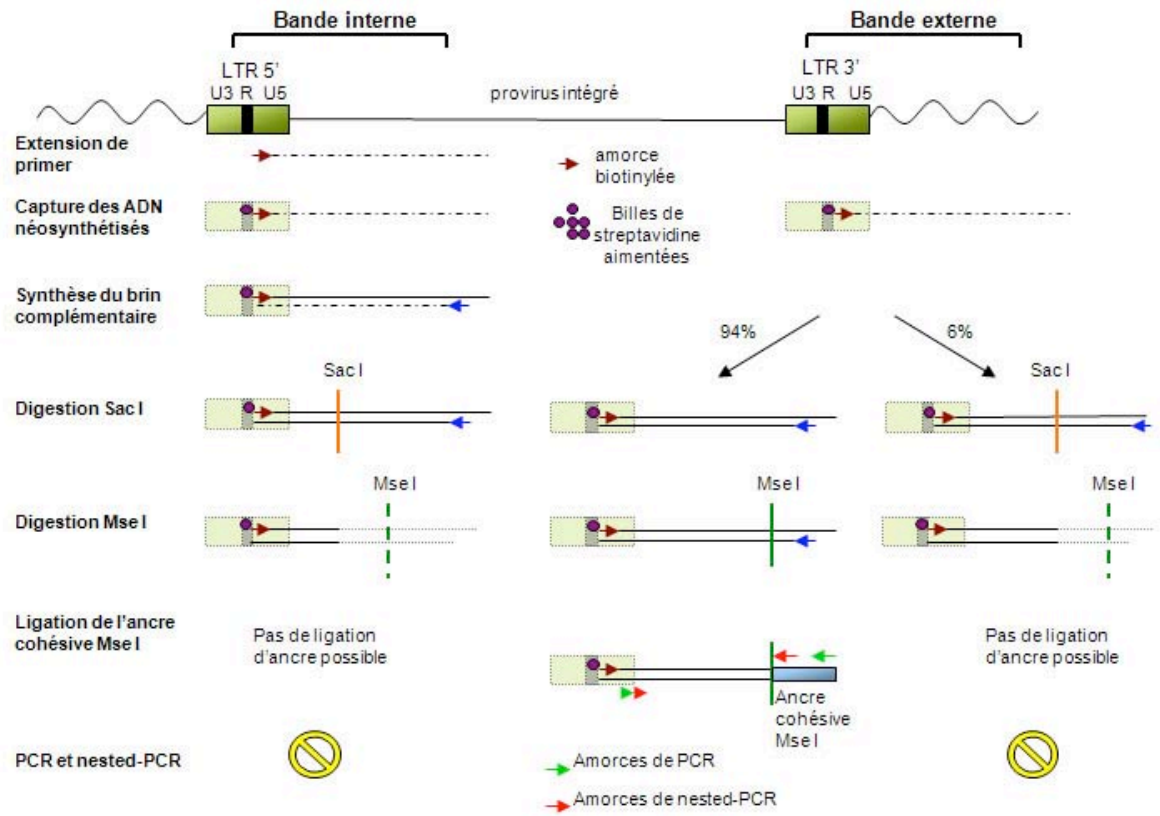
Les jonctions ADN vecteur-ADN cellulaire sont amplifiées par PCR avec une amorce complémentaire du génome vecteur dans la région U5 et une amorce complémentaire de l'ancre (U5Rs2 : CTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCC ; As1 : GATGTCACGCGAAGTGAGCAGGTAG).

## 7. Nested-PCR

Les produits de PCR sont ensuite amplifiés avec des amorces internes aux amorces utilisées précédemment (U5Rs3 : GTCAGTGTGGAAAATCTCTAGC ; As2 : AGAGTGAGCAGGTAGCGAGAGGAG).

## 8. Sous clonage

Les fragments amplifiés par PCR sont clonés dans un plasmide pGEMT easy, linéaire et présentant un nucléotide T protubérant, compatible avec le nucléotide A ajouté par la polymérase utilisée lors de la PCR (incubation 16h à 16°C).



**Figure 13 :** Principe de la réaction de LAM-PCR permettant l'amplification des régions flanquantes du provirus intégrés. D'après Henriot, 2005.

## 3. CARACTERISATION DES VECTEURS

### *IN VIVO*

#### 3.1. Analyse de l'expression dans le cerveau

L'expression d'un transgène par des vecteurs lentiviraux non-intégratifs et intégratifs a été évaluée *in vivo* après injection stéréotaxique des vecteurs IN<sub>WT</sub> CMV GFP WPRE et IN<sub>N</sub> CMV GFP WPRE dans le striatum de souris C3H adultes. Un volume de 1µL de chaque vecteur a été injecté dans chaque hémisphère cérébral d'un animal, correspondant à une dose de 0,5.10<sup>5</sup>TU pour le vecteur IN<sub>WT</sub> et 2,5.10<sup>5</sup>TU pour le vecteur IN<sub>N</sub>. L'injection a été réalisée en 1 site et 2 sous-sites aux coordonnées suivantes, par rapport au bregma : antériorité : +0,6 ; latéralité : ±1,8 ; ventralité : -4,8/-4,4.

Les souris sont anesthésiées à différents temps après injection des vecteurs par administration d'une dose létale d'une solution de kétamine/xylazine. Elles sont ensuite perfusées en intracardiaque par une solution saline PBS 1x puis par une solution de fixation de PFA 4%. Les cerveaux sont prélevés, post-fixés 1 heure dans la PFA 4% et cryoprotégés 16 heures dans une solution de PBS 1x sucrose 15% à 4°C. Ils sont ensuite congelés dans de l'isopentane à -45°C et conservés à -80°C avant d'être coupés au cryostat. Les coupes, de 20µm d'épaisseur, sont ensuite montées sur lame puis traitées par immunohistochimie, pour révéler la présence intracellulaire de GFP.

Les coupes sont mises en présence d'un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre la GFP dilué au 1/3000<sup>e</sup> (Abcam, incubation 16 heures à température ambiante), révéler par un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgG de lapin couplé à la biotine et une solution de peroxydase couplée à l'avidine (VECTASTAIN ABC kit peroxydase standard) suivi d'une révélation par ajout d'un substrat chromogène de la peroxydase (Vector DAB peroxydase substrat kit). Le marquage est visualisé en lumière visible.

#### 3.2. Analyse de l'expression dans la rétine

La capacité d'expression d'un transgène par des vecteurs lentiviraux non-intégratifs et intégratifs a été comparée *in vivo* après injection sous-rétinienne des vecteurs IN<sub>WT</sub> CMV GFP WPRE et IN<sub>N</sub> CMV GFP WPRE chez des rats femelles Fisher de 150g. Une solution de chaque vecteur à différentes concentrations a été injectée dans chaque oeil d'un animal (volume fixe de 4µL). L'injection est réalisée à l'aide d'une aiguille de 34G montée sur une seringue Hamilton de 5µL.

L'expression de la GFP dans la rétine a été suivie dans le temps par angiographie chez les animaux sous anesthésie (kétamine/xylazine). Les animaux ont été sacrifiés par une injection létale de pentobarbital à différents temps après injection pour une analyse histologique des tissus. Les globes oculaires ont été prélevés, énucléés et fixés dans une solution de PFA 4% pendant 1h. Ils ont ensuite été montés à plat sur une lame ou cryoprotégés dans une solution de PBS 1x-sucrose 25%, inclus en PBS 1x-gélatine 7%-sucrose 15%, congelés et coupés au cryostat (14µm). Les coupes ont ensuite été analysées par immunohistochimie de la même façon que les coupes de cerveau (voir chapitre ci-dessus).

*Les devises Shadok*



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT  
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:  
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A  
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

---

**RESULTATS**

---

Ce chapitre est divisé en trois parties.

Dans un premier temps, je présenterai différentes mutations du virus permettant d'obtenir un phénotype non-intégratif de classe I, et plus précisément les mutations que nous avons utilisées. Initialement, deux vecteurs portant différentes mutations dans la région C-terminale de l'intégrase ont été construits et évalués. Les résultats des expériences préliminaires portant sur ces deux vecteurs sont inclus dans cette première partie. Ils nous ont amenés à nous focaliser plus précisément sur une des deux mutations, la mutation N. Les données que nous avons obtenues par la caractérisation *in vitro* et *in vivo* de cette mutation, la mutation N, sont présentées dans la deuxième partie de ce chapitre. Enfin, dans la dernière partie, j'aborderai les résultats que nous avons obtenus en comparant les vecteurs portant la mutation N avec des vecteurs portant d'autres mutations décrites dans la littérature.

Il est important de noter que toutes les expériences présentées ont été réalisées avec des vecteurs mutants et contrôles produits et titrés simultanément. Ceci permet de réduire les biais introduits par la variabilité des productions et titrations et de comparer les vecteurs entre eux de façon plus fiable.

# 1. LES DETERMINANTS VIRAUX DE L'INTEGRATION

La première question que nous nous sommes posée concerne le choix de la (ou des) mutation(s) à introduire dans le système de production des vecteurs lentiviraux en vue d'obtenir des particules épisomales. Comme nous l'avons vu précédemment (voir [chapitre Introduction 2.3.3.1 p79](#)), plusieurs mutants du HIV qui présentent des défauts d'intégration ont été décrits, mais ces défauts s'accompagnent parfois de défaillances supplémentaires, en amont de l'intégration, qui les rendent incompatibles avec le développement d'un vecteur lentiviral non-intégratif. Plus précisément, le phénotype non-intégratif recherché doit permettre la formation de l'ADN génomique viral, l'import nucléaire et l'absence d'intégration. Plusieurs mutants correspondent à ces critères, comme les mutants d'intégrase de classe I (voir [Engelman, 1999](#) pour revue), mais aussi les mutants des séquences *att* situées aux extrémités des LTR ([Masuda et al., 1995](#) ; [Brown et al., 1999](#)). Certaines mutations d'autres éléments viraux permettent également de bloquer spécifiquement l'intégration, comme récemment suggéré par Mannioui et coll. avec un mutant de la protéine matrice ([Mannioui et al., 2005](#)). Dans cette partie, je me consacrerai uniquement sur les éléments que nous avons modifiés : l'intégrase et les séquences *att* des LTR.

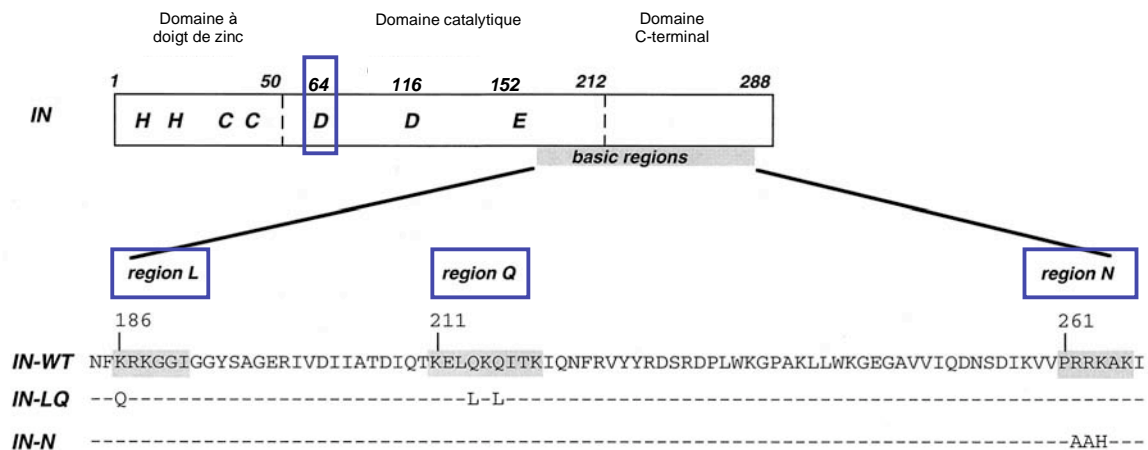
## 1.1. Mutations de l'intégrase

### 1.1.1. Structure de l'intégrase et mutations de classe I

L'intégrase du HIV comprend schématiquement 3 domaines fonctionnels, qui ont été définis par des expériences de complémentation (voir [Figure 14](#)). L'ensemble des données, portant sur ces différents domaines et les fonctions qui leur ont été attribuées, ont été récemment récapitulées dans plusieurs publications de Lu et coll. ([Lu et al., 2005a](#) ; [Lu et al., 2005b](#) ; [Lu et al., 2005c](#)).

- le domaine N-terminal comprend un motif HHCC hautement conservé ([Engelman et Craigie, 1992](#) ; [Bushman et al., 1993](#)). Ce domaine HHCC interagit avec les extrémités LTR du virus ([Vink et al., 1993](#)), mais il pourrait également être impliqué dans la rétrotranscription ([Masuda et al., 1995](#)).
- le domaine central, résistant à la protéase ([Engelman et Craigie, 1992](#)), contient trois résidus remarquablement conservés chez les rétrovirus qui définissent la triade catalytique de l'intégrase : le motif D,D(35)E, dont fait partie le résidu D64 ([Engelman et Craigie, 1992](#) ; [Kulkosky, 1992](#) ; [Bushman et al., 1993](#)).

- le domaine C-terminal est doté d'une fonction de liaison non spécifique à l'ADN (Engelman *et al.*, 1994 ; Vink *et al.*, 1994). Cette région contient également quatre motifs plus ou moins conservés chez les rétrovirus : les régions L, Q, C et N (voir Figure 14 ; Cannon *et al.*, 1996). Elle pourrait intervenir dans la multimérisation de la protéine (Jenkins *et al.*, 1996).



**Figure 14 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de l'intégrase (IN) et des mutations utilisées.** D'après Petit *et al.*, 2000.

Une mutation d'intégrase de classe I typique est une substitution d'un des trois résidus du site catalytique D64, D116 ou E152 (Gaur *et al.*, 1998). La substitution D64V avait été utilisée précédemment pour produire des vecteurs lentiviraux déficients pour l'intégrase (Naldini *et al.*, 1996a ; Naldini *et al.*, 1996b ; Blomer *et al.*, 1997 ; Loewen *et al.*, 2003 ; Saenz *et al.*, 2004). Toutefois, les auteurs rapportent que ces vecteurs ne permettent pas l'expression d'un transgène. Ils concluent donc que l'intégration est requise pour l'expression d'un transgène par un vecteur lentiviral (voir chapitre Introduction 2.3.3.2 p83). En considérant ces résultats négatifs, nous avons préféré ne pas utiliser cette mutation et nous avons recherché une autre mutation d'intégrase présentant un phénotype de classe I.

La plupart des mutations d'intégrase décrites présentent généralement un phénotype de classe II. Il est en effet délicat de modifier cette protéine sans altérer l'ensemble de la réplication. Plusieurs raisons expliquent ces observations. (1) L'intégrase est produite en tant qu'élément de la polyprotéine *pol*. Modifier l'intégrase peut donc avoir des répercussions sur l'ensemble de la polyprotéine. (2) La séquence de l'intégrase correspond à la séquence *cis* cPPT-CTS, responsable de la formation du *flap*. Cette séquence est impliquée dans l'import nucléaire du CPI. (3) En dehors de la catalyse de la réaction d'intégration, l'intégrase est également impliquée dans d'autres étapes du cycle de réplication notamment la rétrotranscription. Son implication dans l'import nucléaire est également très fortement soupçonnée.



L'attribution à l'intégrase d'une fonction dans l'import nucléaire se fonde en grande partie sur les résultats de Gallay et coll. (Gallay *et al.*, 1997). Les auteurs ont suggéré que les régions conservées L, Q et N du domaine C-terminale de la protéine constituent des signaux de localisation nucléaire (*nls*) et dirigent l'interaction de l'intégrase avec les karyophérines. Toutefois, Petit et coll. ont publié des résultats contradictoires. Les auteurs ont analysé le cycle de virus portant des mutations dans les motifs *nls* des régions L, Q et N, décrits (Petit *et al.*, 2000). Tout d'abord, ils confirment l'importance de ces motifs puisque leur modification compromet la réplication virale. Les auteurs ont ensuite analysé les différentes étapes du cycle afin d'identifier le défaut induit par la mutation. Les mutations des régions L et Q affectent la localisation nucléaire de la protéine seule, mais pas celle du CPI. Quant à la mutation N, elle n'affecte ni la localisation de la protéine ni l'import nucléaire du CPI. Aucun défaut de rétrotranscription n'est mis en évidence. De façon surprenante, l'absence de réplication de ces virus est due à un défaut de l'intégration : l'amplification par PCR de jonctions ADN génomique cellulaire – ADN viral intégré (PCR Alu-LTR) ne donne qu'un signal à peine détectable. Ce signal peut être attribué à une activité résiduelle d'intégration et/ou à des événements indépendants de l'intégrase.

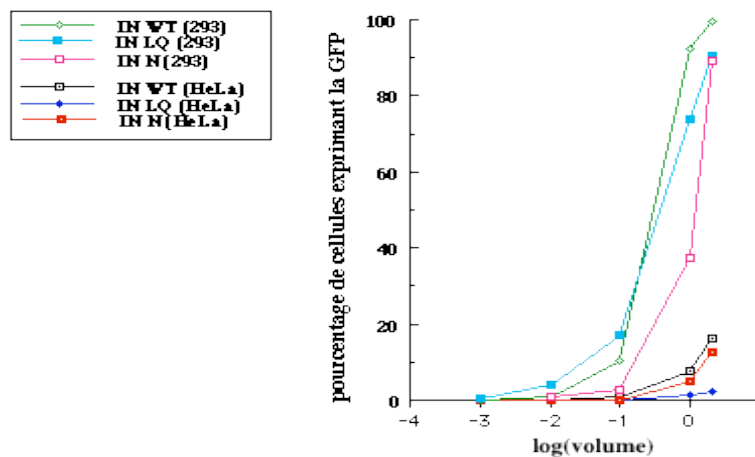
Le phénotype décrit par Petit et coll. pour les mutants des régions L, Q et N est donc en accord avec les critères que nous avons posés pour le développement d'un vecteur HIV non-intégratif : la rétrotranscription et l'import nucléaire se déroulent correctement, mais l'intégration est bloquée. Ce phénotype correspond à un mutant de classe I. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à ces mutations et nous avons réalisé une série d'expérimentations préliminaires dans le but de vérifier si elles étaient compatibles avec le développement d'un vecteur lentiviral non-intégratif. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

### 1.1.2. Mutations de la région C-terminale

Comme présenté dans le chapitre Matériel et Méthodes, nous avons obtenu de C. Petit des plasmides portant les mutations décrites des régions N et LQ (Petit *et al.*, 2000). Nous avons introduit ces mutations dans le plasmide de transcomplémentation utilisé pour la production des vecteurs HIV au laboratoire. Trois vecteurs ont été produits en parallèle à partir des plasmides de transcomplémentation portant une intégrase sauvage (WT) ou mutée (N ou LQ), fusionnée au peptide HA et incluant la séquence du gène *vif* inactive. Le plasmide vecteur utilisé dans ces premières expériences comporte un LTR complet (non-SIN), est dépourvu du WPRE et permet l'expression du gène rapporteur de la GFP sous contrôle du promoteur CMV. Afin d'évaluer leur capacité à diriger l'expression d'un transgène, les vecteurs ont été mis en contact avec différentes lignées cellulaires, des cellules 293T, des cellules HeLa et des cellules MT4. Les résultats obtenus sont présentés [Figure 15](#) et [Figure 16](#).

Dans un premier temps, nous avons incubé les cellules avec une série de dilutions des différents vecteurs mutants IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP, IN<sub>LQ</sub>-HA CMV GFP ou contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP. Après

72h de culture, les cellules ont été analysées par FACS. Nous avons ainsi vérifié la présence de GFP pour chaque condition et déterminé le nombre de cellules GFP+. Comme illustré sur la [Figure 15](#), nous observons, dans les populations de cellules 293T et HeLa, un nombre de cellules GFP positives (GFP+) dépendant de la dose de vecteur appliquée, avec le vecteur contrôle ainsi qu'avec les deux vecteurs mutants. La dose la plus élevée de chaque vecteur, contrôle et mutants, permet d'obtenir plus de 90% de cellules GFP+ dans la lignée 293T. L'efficacité est significativement réduite dans les cellules Hela, de la même façon pour le vecteur contrôle que pour les vecteurs mutants. Cette première expérience suggère donc que les mutations introduites dans l'intégrase des vecteurs lentiviraux permettent l'expression du transgène. Elle nous a également permis de déterminer, pour chaque vecteur, un titre en unités de transduction.



**Figure 15 :** Evaluation de la capacité de transduction de vecteurs lentiviraux mutants pour l'intégrase  $IN_N$ -HA et  $IN_{LQ}$ -HA dans différentes lignées cellulaires. Incubation de cellules (293T ou HeLa) avec des dilutions en série des vecteurs mutants pour l'intégrase  $IN_N$ -HA et  $IN_{LQ}$ -HA et le vecteur contrôle portant une intégrase sauvage  $IN_{WT}$ -HA. Les cellules sont fixées dans une solution de PFA 2% 72h après incubation avec les vecteurs puis analysées par cytométrie en flux à fluorescence pour déterminer le nombre de cellules GFP+.

Dans une seconde expérience, nous avons déterminé la stabilité de l'expression de la GFP dans des cellules en division. En accord avec un phénotype épisomal, il est attendu que le nombre de cellules GFP+ diminue au cours des divisions cellulaires. Différentes lignées cellulaires (293T, HeLa et MT4) ont été mises en présence de la même quantité d'unités de transduction de chaque vecteur contrôle ou mutant. Le nombre de cellules GFP+ a été déterminé à différents temps. Les résultats sont représentés sur la [Figure 16](#).

Soixante-douze heures après l'incubation avec le vecteur, nous observons plus de 90% de cellules 293T GFP+, quel que soit le vecteur considéré (voir [Figure 16-A](#)). Ce pourcentage reste stable dans le temps avec le vecteur contrôle  $IN_{WT}$ -HA CMV GFP. Ceci est en accord avec l'intégration du génome vecteur dans la chromatine de la cellule transduite et son maintien au cours des divisions

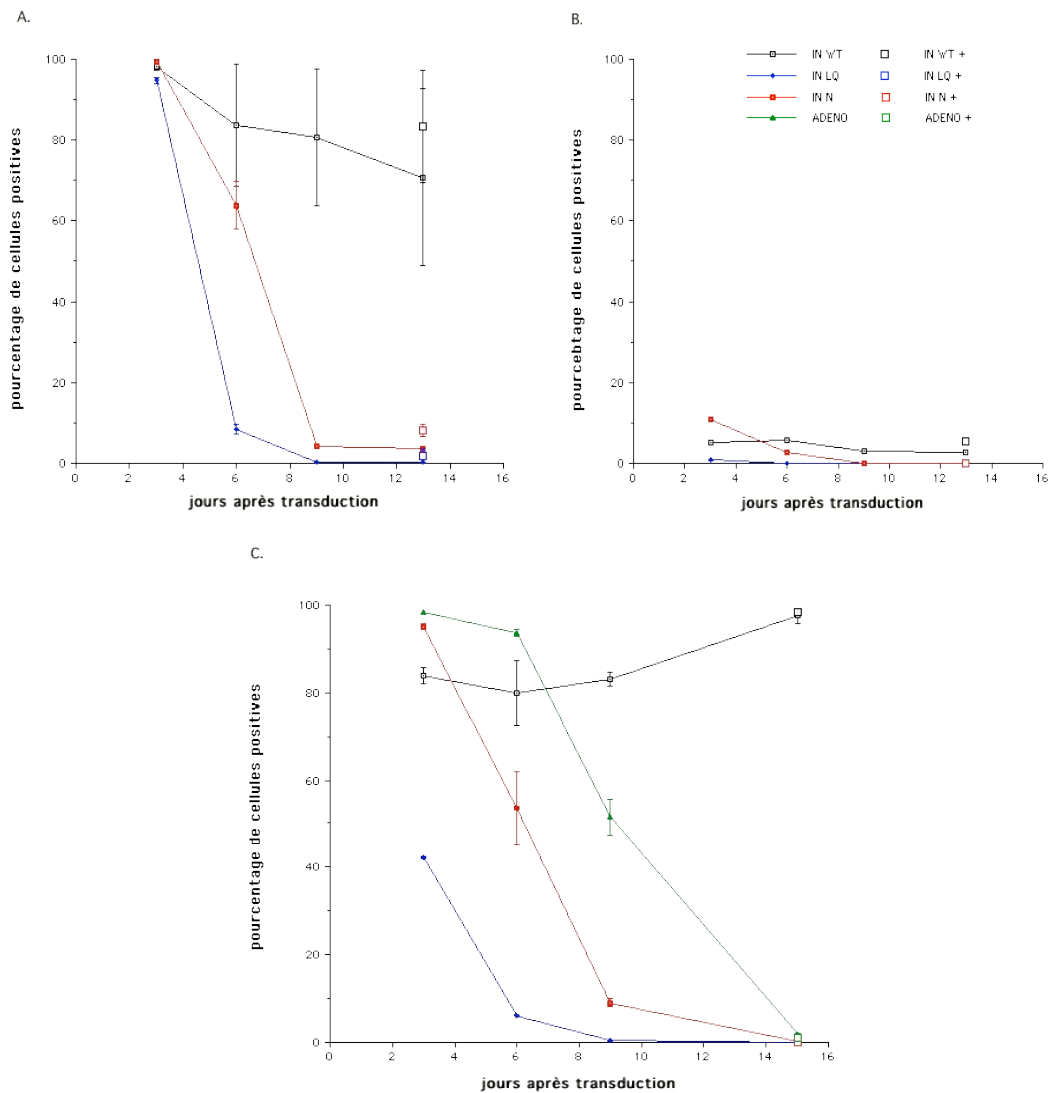
cellulaires. Une partie des cellules analysées 13 jours après transduction a été traitée au butyrate de sodium (Na-But), un inhibiteur des histones déacétylases communément utilisé pour lever les inhibitions de transcription. Le nombre de cellules GFP<sup>+</sup> augmente par rapport aux cellules non-traitées par le Na-But. Ceci démontre que la faible diminution du nombre de cellules GFP<sup>+</sup> (environ 30%) résulte d'une extinction du promoteur CMV, et non de la perte du génome vecteur.

Contrairement à ce qui est observé après transduction avec le vecteur intégratif, le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> chute de plus de 90% dans les 9 premiers jours suivant la transduction avec les deux vecteurs mutants IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP et IN<sub>LQ</sub>-HA CMV GFP. Le traitement au Na-But n'a pas eu d'effet sur le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup>. Ces résultats suggèrent donc que les vecteurs lentiviraux portant les mutations d'intégrase IN<sub>N</sub> et IN<sub>LQ</sub> présentent un phénotype non-intégratif. En effet, les génomes vecteurs n'étant pas associés de façon stable à la chromatine, ils sont perdus par dilution au cours des divisions cellulaires. Le caractère épisomal sera confirmé par la suite.

L'efficacité des vecteurs est fortement réduite dans la population de cellules HeLa par rapport aux cellules 293T (voir [Figure 16-B](#)). Les résultats sont peu interprétables, car le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> est faible pour les trois vecteurs aux doses utilisées (<15%). Les profils observés semblent néanmoins en accord avec les résultats obtenus avec les cellules 293T. La même expérience a été réalisée dans des cellules MT4 (voir [Figure 16-C](#)) avec un vecteur adénoviral exprimant la GFP comme vecteur épisomal contrôle. Comme précédemment, le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> est stable dans le temps avec le vecteur lentiviral contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP. Au contraire, avec les vecteurs mutants IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP et IN<sub>LQ</sub>-HA CMV GFP tout comme avec le vecteur adénoviral, le nombre de cellules GFP<sup>+</sup> diminue rapidement et de façon importante pour être proche de 0 au dernier point d'analyse (15 jours après transduction).

Ces premiers résultats suggèrent donc que les mutations N et LQ introduites dans l'intégrase des vecteurs lentiviraux bloquent l'intégration, mais permettent l'expression du transgène.

Les résultats obtenus avec les deux vecteurs mutants ne sont toutefois pas totalement identiques. Une même quantité de particules efficaces pour la transduction a théoriquement été apportée pour chaque vecteur, pourtant le nombre de cellules MT4 GFP<sup>+</sup> observées après 72h de culture des cellules est beaucoup moins élevé avec le vecteur IN<sub>LQ</sub>-HA CMV GFP (environ 40% de cellules GFP<sup>+</sup>) qu'avec les vecteurs IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP et IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP (environ 90% de cellules GFP<sup>+</sup>) (voir [Figure 16-C](#)). Le comportement des deux vecteurs mutants est également différent dans des cellules 293T (voir [Figure 16-A](#)) : le pourcentage initial de cellules GFP<sup>+</sup> est équivalent pour les deux vecteurs après 72h de culture (plus de 90%), il n'est plus que de 10% environ pour le vecteur IN<sub>LQ</sub>-HA CMV GFP 6 jours après transduction, alors qu'il est encore à 60% environ pour le vecteur IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP.



**Figure 16 :** Evaluation de la stabilité de l'expression de la GFP dans le temps après incubation de différentes lignées cellulaires (293T (A), HeLa (B), MT4 (C)) avec une même quantité d'« unités de transduction » des vecteurs mutants pour l'intégrase IN<sub>N</sub>-HA et IN<sub>LQ</sub>-HA et du vecteur contrôle portant une intégrase sauvage IN<sub>WT</sub>-HA.

Ces observations sont à mettre en parallèle avec celles de Petit et coll. (Petit *et al.*, 2000). Les auteurs rapportaient en effet que, bien que les différents virus mutants L, Q ou N aient un comportement comparable, la mutation N n'affecte pas la localisation nucléaire de l'intégrase comme les mutations L et Q.

La différence d'efficacité que nous observons entre les deux vecteurs mutants IN<sub>N</sub> et IN<sub>LQ</sub> pourrait donc refléter un effet de la mutation LQ sur des étapes de la transduction autres que l'intégration, et plus probablement sur l'import nucléaire. Les vecteurs IN<sub>LQ</sub> présenteraient donc, non pas un phénotype de classe I, mais un phénotype de classe II. Pour cette raison, nous nous sommes dans un premier temps focalisés sur les vecteurs IN<sub>N</sub> et nous avons approfondi leur caractérisation. Les résultats obtenus avec ces vecteurs *in vitro* et *in vivo* sont présentés dans le

chapitre Introduction 2 p110. Nous avons toutefois remis ce premier résultat en question lors d'une analyse plus poussée du vecteur IN<sub>LO</sub>. Ces résultats sont présentés dans les chapitres 3.2 p129 et 3.3 p135.

### 1.1.3. Mutations du site catalytique

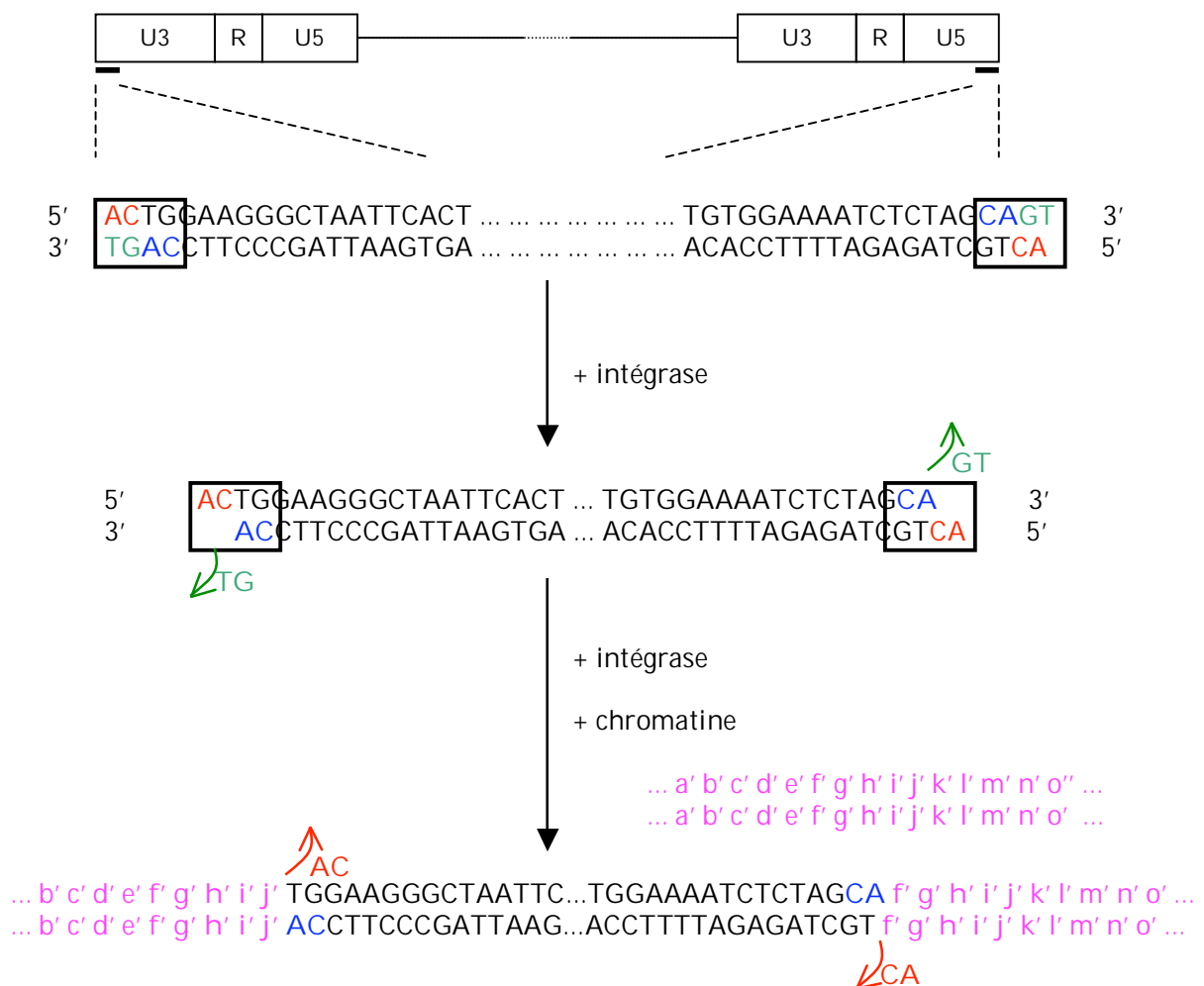
Parallèlement à nos travaux sur la caractérisation de la mutation N est paru un article de Yanez-Munoz et coll. portant sur un vecteur lentiviral portant la substitution D64V. Contrairement à ce qui avait précédemment été décrit (Naldini *et al.*, 1996a ; Naldini *et al.*, 1996b ; Blomer *et al.*, 1997 ; Loewen *et al.*, 2003 ; Saenz *et al.*, 2004), les auteurs rapportent que ce vecteur est efficace pour l'expression d'un transgène, *in vitro* et *in vivo* (Yanez-Munoz *et al.*, 2006). Les résultats présentés dans cet article ne sont pas tout à fait identiques à ceux que nous avons obtenus avec la mutation N, notamment en termes d'activité résiduelle d'intégration et d'efficacité d'expression du transgène. Dans une seconde partie de notre travail, nous avons donc comparé des vecteurs portant ces deux mutations. Nous avons reçu du groupe de DB. Kohn, un plasmide portant la substitution D64V de l'intégrase (Nightingale *et al.*, 2006). Le fragment portant cette mutation a été introduit dans le plasmide de transcomplémentation utilisé au laboratoire, à la place du fragment correspondant. Les résultats de la comparaison de ces vecteurs avec les vecteurs portant la mutation N sont présentés dans les chapitres 3.2 p129 et 3.3 p135.

## 1.2. Mutations des séquences *att* des LTR

Comme nous l'avons vu précédemment, la première étape de la réaction d'intégration est la modification des extrémités 3' du génome rétrotranscrit par l'intégrase. L'enzyme élimine 2 bases à chaque extrémité, générant ainsi des extrémités cohésives. Cette étape nécessite la reconnaissance des extrémités du génome par l'intégrase (voir Figure 17). Ces régions d'attachement (*att*), qui forment des extrémités inversées, sont plus ou moins conservées entre les différents rétrovirus, en particulier le dinucléotide CA, qui est systématiquement présent aux extrémités 3' modifiées du génome.

Les différents résultats publiés suggèrent que la modification du dinucléotide CA présent à l'extrémité 5' du LTR induit une diminution de l'efficacité d'intégration d'un virus HIV (Masuda *et al.*, 1995 ; Brown *et al.*, 1999). Dans une étude plus récente, le groupe de Nightingale et coll. a systématiquement modifié une ou deux bases de ce dinucléotide, sur l'un, l'autre ou les deux LTR et évalué l'impact de ces mutations sur la fréquence d'intégration dans le contexte d'un vecteur dérivé du HIV. Les auteurs observent que la combinaison des 4 substitutions (CA→GT dans le LTR 5' et le LTR 3') réduit le plus efficacement l'intégration du provirus. Dans la seconde partie de notre étude,

nous avons donc comparé l'activité résiduelle d'intégration de différents vecteurs portant des mutations d'intégrase combinées ou non la modification des séquences *att*.



**Figure 17 : Comparaison des séquences du génome viral et de la chromatine, avant et après l'intégration.** L'intégrase élimine 2 nucléotides à chaque extrémité 3' du génome ADN, générant des extrémités 5' protubérantes. La chromatine est clivée et les deux brins sont désappariés sur 5 paires de bases. Ces 5 nucléotides sont dupliqués de chaque côté du site de clivage où s'intègre le génome ADN après avoir perdu les deux nucléotides sortant à chaque extrémité 5'.

Nous avons obtenu du groupe de DB. Kohn un plasmide vecteur portant les 4 substitutions présentées et, comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes, nous avons remplacé dans le plasmide vecteur utilisé au laboratoire les LTR sauvages par les LTR mutés. Ce plasmide a été utilisé avec un plasmide de transcomplémentation exprimant une intégrase sauvage ou mutée pour produire des particules vecteurs exprimant le gène de résistance au G418 afin d'évaluer l'activité résiduelle d'intégration des différentes combinaisons. Les résultats de cette évaluation font l'objet du chapitre 3.3 p135.

## 2. CARACTERISATION DES VECTEURS LENTIVIRAUX EPISOMAUX

Les résultats préliminaires présentés dans le chapitre précédent ont été obtenus avec des vecteurs portant un LTR complet (non-SIN) et dépourvus de la séquence WPRE. Les résultats qui suivent ont été obtenus avec des vecteurs SIN et contenant le WPRE, quel que soit le transgène utilisé.

Deux types de plasmide d'encapsulation ont été utilisés. Les premiers résultats ont été obtenus avec les plasmides décrits dans le chapitre précédent et utilisés dans les expériences préliminaires. Ces plasmides permettent l'expression d'une intégrase sauvage ou mutée, fusionnée au peptide HA et contenant la séquence complète mais inactivée du gène *vif*. Ces vecteurs sont notés IN<sub>i</sub>-HA.

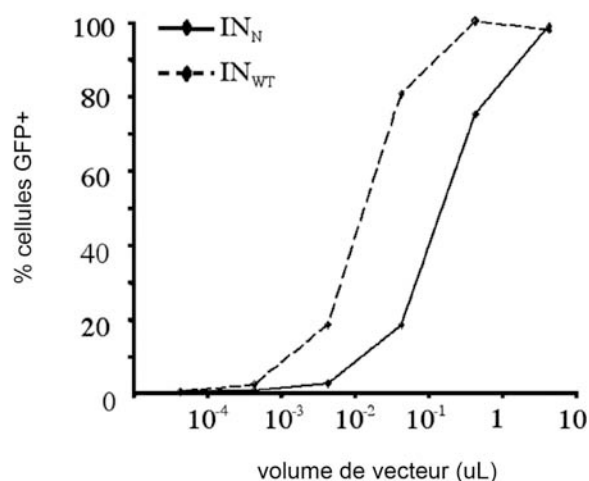
Dans un second temps, en vue d'essais précliniques pour le traitement de dégénérescence rétinienne, nous avons construit un vecteur dépourvu du peptide immunogène HA et de la séquence *vif*. Nous avons donc construit une nouvelle version du plasmide d'encapsulation portant la mutation N. Les vecteurs produits à partir de ce plasmide ont été comparés à des vecteurs sauvages produits à partir du plasmide d'encapsulation couramment utilisé au laboratoire. Ces vecteurs seront respectivement notés IN<sub>N</sub> et IN<sub>WT</sub>.

### 2.1. Expression du transgène *in vitro*

#### 2.1.1. Expression du transgène

Nous avons vérifié la capacité des vecteurs lentiviraux contenant l'intégrase mutée (IN<sub>N</sub>) à transduire des cellules. Pour cela, nous avons dans un premier temps réalisé une expérience de titration dans des cellules 293T avec des volumes croissants de vecteurs IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE, parallèlement avec le vecteur contrôle IN<sub>WT</sub>- HA CMV GFP WPRE.

Soixante-douze heures après la mise en contact des cellules avec les vecteurs, nous avons observé un pourcentage dose-dépendant de cellules GFP positives (GFP<sup>+</sup>) (voir [Figure 18](#)). Avec la dose la plus élevée (5µL de vecteur concentré) du vecteur contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP WPRE et du vecteur mutant IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE, plus de 90% des cellules sont GFP<sup>+</sup>.



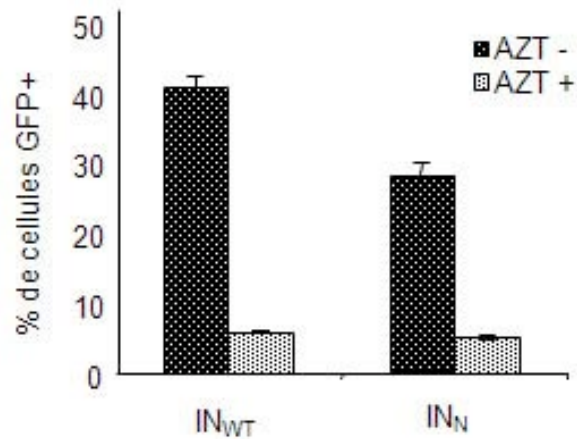
**Figure 18 : Efficacité de transduction** des vecteurs mutant IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE et contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP WPRE, effet dose réponse sur cellules 293T, 72h après transduction.

Nous avons ensuite vérifié que la présence de GFP observée dans les cellules traitées avec le vecteur mutant résulte effectivement d'un mécanisme de transduction et non de pseudo-transduction. La pseudotransduction est le résultat de la contamination des stocks par le plasmide vecteur utilisé pour la production ou par de la GFP qui peut être capturée dans les virions lors de la production et relarguée dans la cellule cible directement sous forme protéique. Nous avons cultivé les cellules en présence du vecteur et d'un inhibiteur de la rétrotranscriptase (RT) : l'azido-deoxythymidine (AZT). Dans ces conditions, si la GFP observée est le résultat de la pseudotransduction, le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> ne sera pas affecté. En revanche, si la GFP résulte effectivement de la transduction par le vecteur, le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> sera fortement réduit en présence d'AZT.

Après transduction de cellules 293T à une multiplicité d'infection (MOI) de 20, on observe 40,7% ( $\pm 1,5$ ) de cellules GFP<sup>+</sup> avec le vecteur contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP WPRE et 28,0% ( $\pm 1,9$ ) avec le vecteur mutant IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE. En présence de 10 $\mu$ M d'AZT, le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> chute respectivement à 5,8% ( $\pm 0,1$ ) et 4,9% ( $\pm 0,4$ ) (voir Figure 19). L'inhibition de la RT permet donc de réduire le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup>, que ce soit après transduction par le vecteur contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP WPRE ou par le vecteur mutant IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE. Les cellules GFP<sup>+</sup> observées en absence de l'inhibiteur de la RT ont donc, pour la grande majorité, été transduites et ne résultent pas d'un mécanisme de pseudo-transduction.

Nous pouvons donc conclure de ces premiers résultats que la mutation N de l'intégrase permet la production des particules (assemblage, encapsidation, bourgeonnement, maturation), le déroulement des premières étapes du cycle viral (entrée, synthèse d'ADN génomique, import nucléaire), et l'expression du transgène.





**Figure 19 : Absence de pseudotransduction.** Inhibition de la transduction par un vecteur contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP WPRE et mutant IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE après traitement des cellules à l'AZT. Le pourcentage de transduction a été déterminé par FACS après 72h d'incubation des cellules 293T en présence de vecteur seul ou de vecteur et d'AZT 10 $\mu$ M.

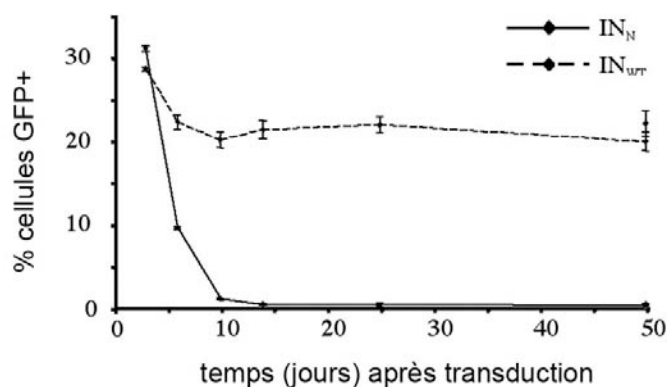
### 2.1.2. Phénotype non-intégratif

Nous avons ensuite vérifié que l'expression du transgène observée après transduction avec le vecteur mutant résulte bien de la transcription de formes non-intégrées du génome vecteur.

Nous avons tout d'abord évalué la stabilité du pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> après transduction de cellules en division (voir Figure 20). Comme attendu, le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> est stable après transduction avec le vecteur contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP WPRE : 28,42% ( $\pm 0,35$ ) à J3 et 19,74% ( $\pm 1,11$ ) à J50. Au contraire, le pourcentage de cellules exprimant le transgène avec le vecteur mutant IN<sub>N</sub> CMV GFP chute rapidement en fonction du temps : 30,91% ( $\pm 0,35$ ) à J3, 0,9% ( $\pm 0,11$ ) à J10 et 0,26% ( $\pm 0,10$ ) à J50.

Nous avons vérifié que cette diminution de l'expression du transgène n'est pas le résultat d'une répression transcriptionnelle. Dans ce but, nous avons traité une partie des cellules à J49 par du butyrate de sodium, un inhibiteur des histones déacétylases communément utilisé pour lever les inhibitions de transcription induites par *silencing*. Ce traitement n'affecte pas le nombre de cellules GFP<sup>+</sup> pour le groupe IN<sub>N</sub> (non-traitées : 0,26% ( $\pm 0,10$ ), traitées : 0,17% ( $\pm 0,05$ )).

Ces résultats convergent donc vers une expression du transgène par transcription des formes épisomales. La perte de l'expression du transgène survient par dilution du génome vecteur non intégré au cours des divisions de la cellule transduite.



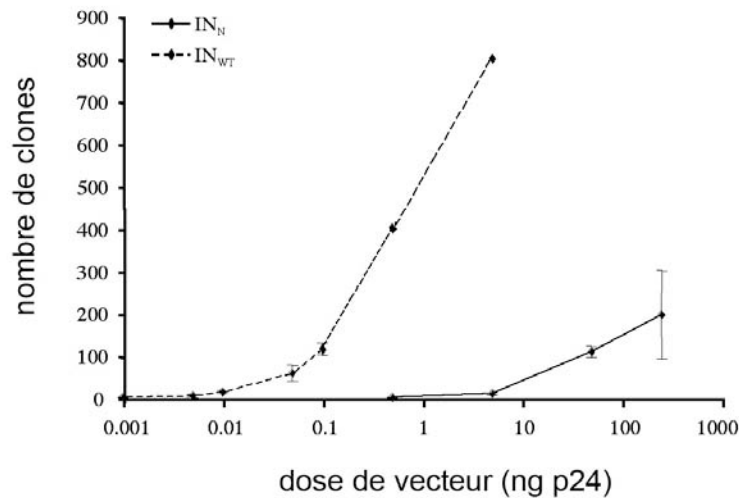
**Figure 20 : Expression de la GFP au cours des divisions cellulaires** après transduction de cellules 293T avec une dose équivalente en TU du vecteur IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE (32 ng) ou du vecteur IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP WPRE (8 ng p24). Les cellules ont été transduites puis cultivées et analysées à chaque passage par FACS pour déterminer le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup>. Pour chaque point, la valeur correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour trois puits  $\pm$  l'écart-type. Quarante-sept jours après transduction, les cellules ont été passées dans deux puits séparés dont l'un a été traité avec 5mM de butyrate de sodium pendant 24h avant l'analyse du dernier point (50 jours après transduction).

Pour confirmer ce phénotype épisomal et quantifier les événements d'intégration résiduelle, nous avons utilisé des vecteurs exprimant le gène de la Néomycine phosphotransférase (NEO) qui confère une résistance au G418. Une faible quantité de cellules a été transduite avec différentes doses de vecteurs contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV NEO WPRE ou mutant IN<sub>N</sub>-HA CMV NEO WPRE, les cellules ont ensuite été traitées pendant 10 jours avec du G418 pour sélectionner les clones ayant subi un événement d'intégration (voir Figure 21).

La dose minimale avec laquelle nous avons observé des clones avec le vecteur mutant est de 0,5ng p24 (1 ( $\pm$ 1) clone) tandis qu'elle est de 0,001ng p24 avec le vecteur contrôle (0,7 ( $\pm$ 0,6) clone). À la dose de 50ng p24 de vecteur mutant, nous avons observé 109  $\pm$ 12,2 clones, ce qui est équivalent au nombre de clones observés avec 0,1ng p24 de vecteur contrôle (115 ( $\pm$ 13,5) clones). La fréquence d'intégration du vecteur muté est donc 500 fois moins élevée que celle du vecteur sauvage. Aux doses plus élevées, le rapport N/WT diminue encore. Le nombre de clones n'a pu être compté pour les deux doses les plus élevées du vecteur contrôle, il a été estimé à respectivement environ 400 et environ 800. Par interpolation sur la courbe dose-réponse obtenue, dans sa partie « approximative », nous estimons que la dose la plus élevée testée pour le vecteur mutant (196 ( $\pm$ 104,5) clones avec 250ng p24) équivaut à 0,2ng p24 du vecteur sauvage, soit un rapport de 1/1250.

Ces vecteurs ne pouvant pas être évalués en TU comme les vecteurs GFP, nous avons évalué *a posteriori* la quantité d'ARN viral présente dans chaque stock par la méthode de Dot blot. Le rapport N/WT pour le titre p24 est de 0,62 ; il est de 1,16 pour le titre en ARN. Pour les vecteurs utilisés dans cette expérience, une quantité équivalente de p24 représente donc une quantité

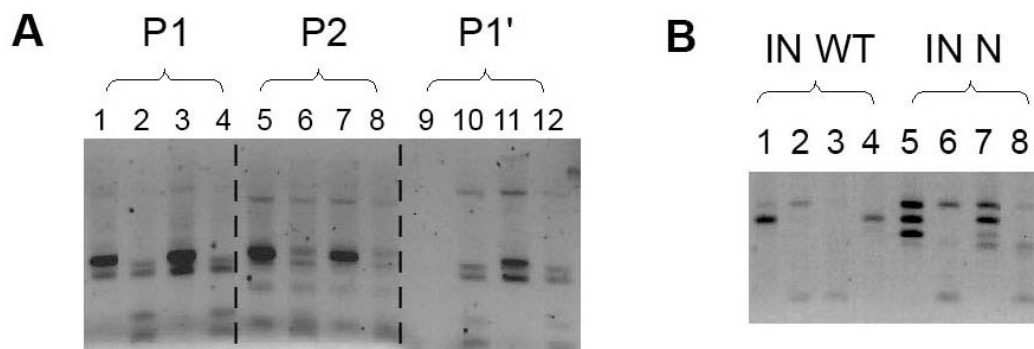
supérieure de génomes ARN du vecteur mutant que du vecteur contrôle. La valeur obtenue tend donc vers une surestimation de l'activité résiduelle d'intégration des vecteurs mutants.



**Figure 21 :** Evaluation de l'activité d'intégration résiduelle du vecteur IN<sub>N</sub>-HA CMV NEO WPRE. Des cellules HeLa ont été transduites avec des quantités croissantes (p24) de vecteur IN<sub>WT</sub>-HA CMV NEO WPRE ou IN<sub>N</sub>-HA CMV NEO WPRE, étalées dans des flasques de 25cm<sup>2</sup> et cultivées en présence de G418 pendant 10 jours. Elles ont ensuite été fixées et colorées au bleu Trypan et les clones ont été comptés. Chaque point est la moyenne du nombre de clones sur 3 boîtes ± l'écart-type. Le nombre de clones pour les doses les plus élevées du vecteur IN<sub>WT</sub>-HA CMV NEO WPRE (points 0,5 et 5ng p24) n'a pu être précisément compté du fait de la confluence des cellules, il a été estimé à ≈400 et ≈800 respectivement.

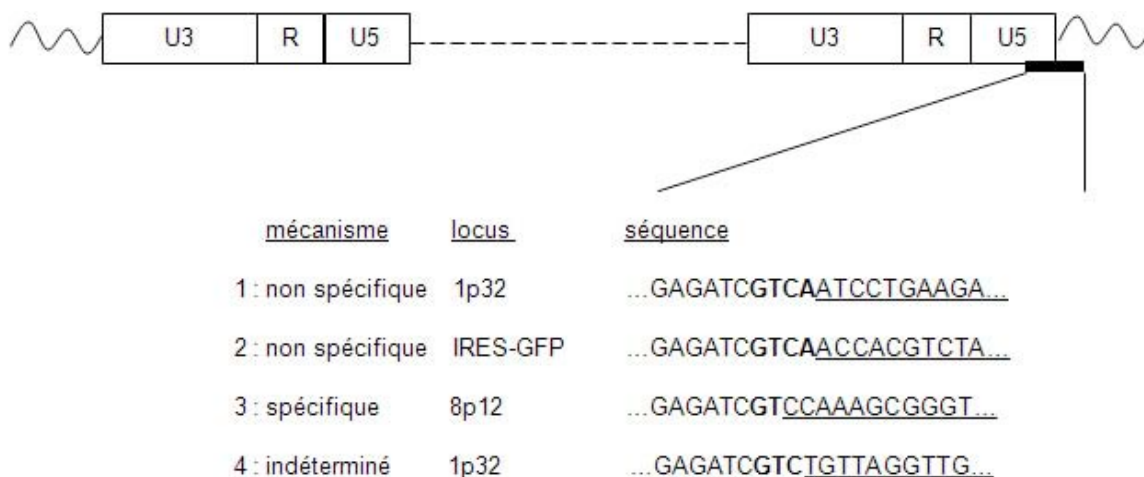
Ces événements d'intégration résiduelle peuvent être attribués à une activité catalytique persistante de l'intégrase mutée ou être la conséquence d'événements de recombinaison illégitimes à partir des formes linéaires ou circulaires du génome rétrotranscrit. Si l'intégration est catalysée par l'intégrase, la jonction entre le génome vecteur et l'ADN cellulaire présente une signature particulière (voir Figure 17 p110) : deux bases à l'extrémité du génome vecteur sont éliminées et 5 bases du site d'intégration sont dupliquées de part et d'autre du provirus. Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons donc analysé la séquence des régions flanquantes des provirus intégrés dans les cellules transduites. Les régions flanquantes ont tout d'abord été amplifiées par LAM-PCR, puis sous-clonées et séquencées.

Dans un premier temps, la méthode a été mise au point sur des populations clonales de cellules transduites par un vecteur lentiviral intégratif. Nous avons obtenu des résultats reproductibles et significatifs. La Figure 22 montre l'analyse d'un clone P issu d'une population transduite par un vecteur lentiviral intégratif. Ce profil est identique à celui du clone P1', qui est issu d'un deuxième clonage à partir du clone P1. Le clone P2 possède des fragments communs avec les clones P1 et P1' et des fragments supplémentaires, comme attendu puisque ce clone est issu du clone P1 transduit par un second vecteur lentiviral intégratif.



**Figure 22 :** Produits de l'amplification des régions flanquantes par LAM-PCR sur cellules transduites par un vecteur lentiviral. **A :** P1 = population clonale obtenue par dilution limite après transduction par un vecteur lentiviral intégratif. P1' = population clonale obtenue par dilution limite à partir de P1. P2 population clonale obtenue par dilution limite après transduction par un second vecteur lentiviral intégratif. **B :** population hétérogène obtenue après transduction par un vecteur lentiviral non-intégratif exprimant le gène de résistance au G418 et sélection.

Cette méthode s'est avérée beaucoup moins efficace sur une population de cellules transduites par le vecteur mutant IN<sub>N</sub>-HA CMV NEO WPRE et sélectionnées pour leur résistance au G418. De plus, une grande partie des fragments sous-clonés séquencés ne correspondait pas à des jonctions ADN cellulaire – provirus. Nous avons toutefois identifié 4 régions flanquantes (pour 49 clones analysés) dont les séquences sont présentées Figure 23.



**Figure 23 :** Séquences des régions flanquantes du site d'intégration (soulignée) et mise en évidence du mécanisme d'intégration.

Le protocole que nous avons utilisé nous permet d'amplifier spécifiquement la région flanquante du LTR 3', mais n'apporte pas d'information sur la région en 5' du provirus. Nous ne pouvons donc pas

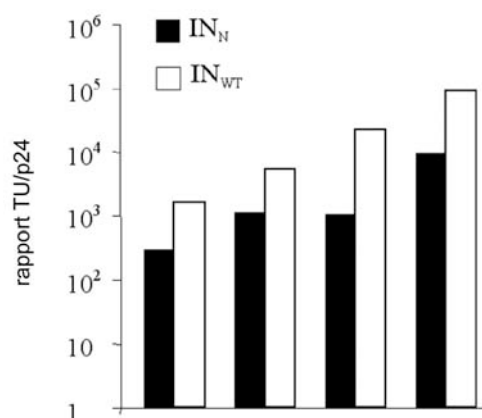
déterminer si le site d'intégration est dupliqué ou non. L'identification du mécanisme d'intégration se fait sur la seule base de la délétion, ou non, du dinucléotide GT à l'extrémité 3' du provirus. Sur ce critère, nous observons 2 (peut-être 3?) événements indépendants de l'intégrase et un événement catalysé par l'intégrase.

Bien que les résultats obtenus ne soient pas quantitatifs, ils suggèrent néanmoins qu'une partie des événements d'intégration sont catalysés par l'intégrase. Une telle activité n'est pas incompatible avec la mutation utilisée ( $^{262}RRK \rightarrow AAH$ ) puisqu'elle laisse le site catalytique (D64, D116, E152) intact.

En résumé, ces résultats montrent que (i) le génome des vecteurs portant la mutation N est majoritairement sous forme épisomale et qu'il est permissif à la transcription du transgène et (ii) la fréquence d'intégration résiduelle des vecteurs portant la mutation N est environ 500 à 1250 fois moins élevée que la fréquence d'intégration des vecteurs sauvages. (iii) Cette activité résiduelle pourrait être en partie catalysée par une activité persistante de l'intégrase mutée.

### 2.1.3. Efficacité

Nous avons constaté que la capacité de transduction des vecteurs GFP mutants par unité de volume, c'est-à-dire le titre en particules efficaces pour la transduction (TU), était inférieure à celle des vecteurs contrôles produits simultanément ( $IN_N$ -HA CMV GFP WPRE :  $\sim 10^8$  TU/mL ;  $IN_{WT}$ -HA CMV GFP WPRE :  $\sim 10^9$  TU/mL). Nous avons comparé ce titre en TU rapporté au titre en p24 pour les différents stocks produits en parallèle. Dans chaque cas, ce rapport est plus élevé pour les vecteurs intégratifs (voir [Figure 24](#)). Le rapport  $IN_{WT}/IN_N$  est compris entre 4,6 et 20,4 (moyenne :  $9,9 (\pm 7,3)$ ). Ce résultat suggère que les particules mutantes sont moins efficaces que les particules contrôles pour la transduction des cellules.



**Figure 24 :** Comparaison du rapport TU/p24 pour les différents stocks de vecteurs CMV GFP WPRE mutants et contrôles produits en parallèle.

Nous avons également comparé l'efficacité d'expression du transgène des deux vecteurs par l'analyse de l'intensité de fluorescence des cellules 72 h après transduction. En effet, dans des conditions de transduction faible (<30% de cellules transduites), nous avons observé que la fluorescence moyenne par cellule GFP<sup>+</sup>, obtenue par l'analyse FACS, est stable pour un vecteur donné au sein d'une même expérience. Dans ces conditions, la probabilité d'infections multiples est négligeable. La valeur de fluorescence moyenne par cellule reflète donc le niveau d'expression d'une copie de génome. Le [Tableau 4](#) récapitule les données obtenues pour deux productions indépendantes et représentatives de deux vecteurs mutant et contrôle.

Nous observons que la valeur moyenne de la fluorescence moyenne par cellule (mfi), exprimée en unités relatives de fluorescence, pour les deux vecteurs mutants est de 63,71 (±2,69) et 72,64 (±3,65) tandis qu'elle est de 499,97 (±21,71) et 499,82 (±33,59) pour les deux vecteurs contrôles. Ces résultats montrent donc que les vecteurs mutants sont moins efficaces pour l'expression d'un transgène que les vecteurs contrôles sauvages. Ceci traduit probablement une activité transcriptionnelle réduite des formes épisomales du génome vecteur.

**Tableau 4 : Efficacité d'expression du transgène.** Comparaison de l'intensité de fluorescence moyenne par cellule GFP<sup>+</sup> après transduction avec différentes doses de vecteurs contrôle IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP WPRE ou mutant IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE produits en parallèle (mfi = mean fluorescence intensity, exprimée en unités relatives de fluorescence)

Vecteur			0,05µL	0,005µL	0,000 5µL	Moyenne
Production A	IN <sub>N</sub> CMV GFP	%	17,9	2,21	-	63,71 (±2,69)
		mfi	61,81	65,61	-	
	IN <sub>WT</sub> CMV GFP	%	-	18,06	1,75	499,97 (±21,71)
		mfi	-	515,32	484,62	
Production B	IN <sub>N</sub> CMV GFP	%	2,25	0,1	-	72,64 (±3,65)
		mfi	70,06	75,22	-	
	IN <sub>WT</sub> CMV GFP	%	-	1,42	0,09	499,82 (±33,59)
		mfi	-	523,57	476,07	

### 2.1.4. Importance du *flap*

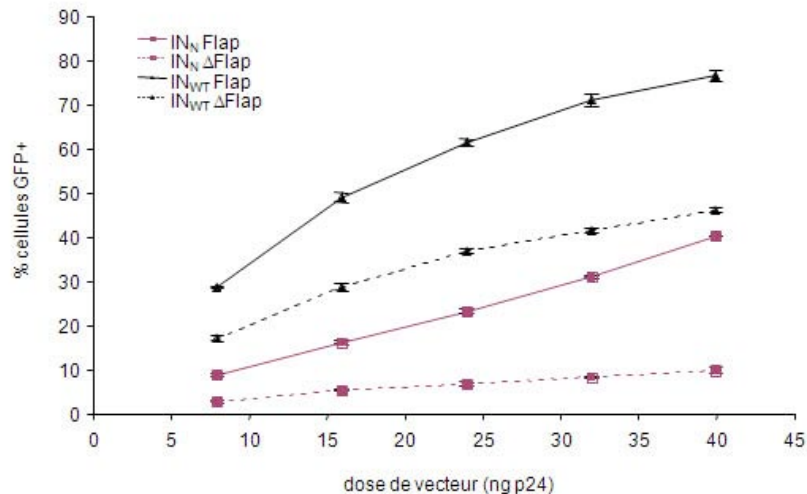
Nous avons montré qu'un vecteur lentiviral non-intégratif permet l'expression d'un transgène, bien que celle-ci soit moins efficace pour un vecteur mutant qu'avec un vecteur intégratif. Ceci est contraire aux données publiées précédemment concernant les vecteurs lentiviraux déficients pour l'intégrase (Naldini *et al.*, 1996a ; Naldini *et al.*, 1996b ; Loewen *et al.*, 2003 ; Saenz *et al.*, 2004). En effet, les auteurs n'observent pas d'expression du transgène. En dehors de la mutation d'intégrase utilisée, une des différences entre les vecteurs précédemment décrits et celui que nous

études est la présence du *flap*. Comme mentionné précédemment, le *flap* est un élément déterminant de l'import nucléaire, il permet d'améliorer d'un facteur 2 à 10 l'efficacité de transduction des vecteurs lentiviraux (Zennou *et al.*, 2001). Nous avons donc testé cette hypothèse en supprimant la séquence cPPT-CTS du vecteur. Des vecteurs CMV GFP WPRE ont été produits, avec ou sans la mutation d'intégrase et avec ou sans la séquence cPPT-CTS (*flap/Δflap*). Ces différents vecteurs ont été utilisés pour réaliser un essai dose-réponse sur des cellules 293T (voir Figure 25).

Comme attendu pour le vecteur intégratif, nous observons un effet positif du *flap* sur le pourcentage de transduction. Avec la plus haute dose testée (40ng), le vecteur *flap* transduit 76,4% ( $\pm 1,23$ ) des cellules, alors que seules 45,8% ( $\pm 0,54$ ) des cellules sont transduites avec le vecteur  $\Delta flap$ . De façon remarquable, l'absence du *flap* diminue la pente de la courbe, ce qui traduit probablement une saturation de l'import nucléaire, comme précédemment décrit (Zennou *et al.*, 2001). Des résultats tout à fait comparables sont obtenus avec les vecteurs mutants : le pourcentage de cellules GFP+ est supérieur avec le vecteur IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE par rapport au vecteur IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE  $\Delta flap$  (39,97% ( $\pm 0,07$ ) et 9,55% ( $\pm 0,75$ ) respectivement) et la pente de la droite obtenue avec l'expression de la GFP en fonction de la dose est plus élevée pour le vecteur IN<sub>N</sub> CMV GFP (4,62 vs 3,88).

De plus, le pourcentage de cellules GFP+ observées après incubation avec le vecteur IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE  $\Delta flap$  résulte effectivement d'un mécanisme de transduction, et non d'un phénomène de pseudotransduction, puisque (i) la réponse est affectée par le traitement des cellules par AZT (données non présentées) et (ii) la fluorescence moyenne par cellule pour les cellules transduites avec ce vecteur est comparable à celle observée avec le vecteur IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE (vecteur *flap* IN<sub>N</sub>: mfi = 37,3  $\pm$  2,4, n=3, cellules GFP+ <25% ; vecteur  $\Delta flap$  IN<sub>N</sub>: mfi = 36,5  $\pm$  2,7, n=5, cellules GFP+ <10%).

La présence du *flap* n'est pas indispensable à l'expression du transgène par un vecteur lentiviral non-intégratif, bien qu'elle améliore l'efficacité de transduction. La présence du *flap* dans les vecteurs que nous avons utilisés n'explique donc pas les discordances entre nos résultats et les résultats décrits antérieurement par Naldini et coll..



**Figure 25 : Influence du flap sur l'efficacité de transduction.** Les cellules ont été transduites avec des doses croissantes de vecteur IN<sub>N</sub>/IN<sub>WT</sub> –HA CMV GFP WPRE, IN<sub>N</sub>/IN<sub>WT</sub> –HA CMV GFP WPRE  $\Delta flap$  (dépourvu du cPPT-CTS). Les cellules sont fixées 72h après transduction et analysées par FACS. Chaque point est la moyenne de 3 puits transduits indépendamment  $\pm$  l'écart-type.

### 2.1.5. Stabilité des cercles

Comme nous l'avons démontré précédemment, l'expression du transgène par les vecteurs lentiviraux non-intégratifs n'est pas stable dans les cellules en division (voir Figure 20). Cette diminution de l'expression au cours du temps a été attribuée au phénotype épisomal des génomes, mais pourrait également être la conséquence de la dégradation des cercles dans la cellule. Afin de vérifier la stabilité des cercles formés dans le noyau des cellules après transduction par un vecteur lentiviral déficient pour l'intégrase, nous avons analysé l'expression du transgène après transduction de cellules qui ne se divisent pas.

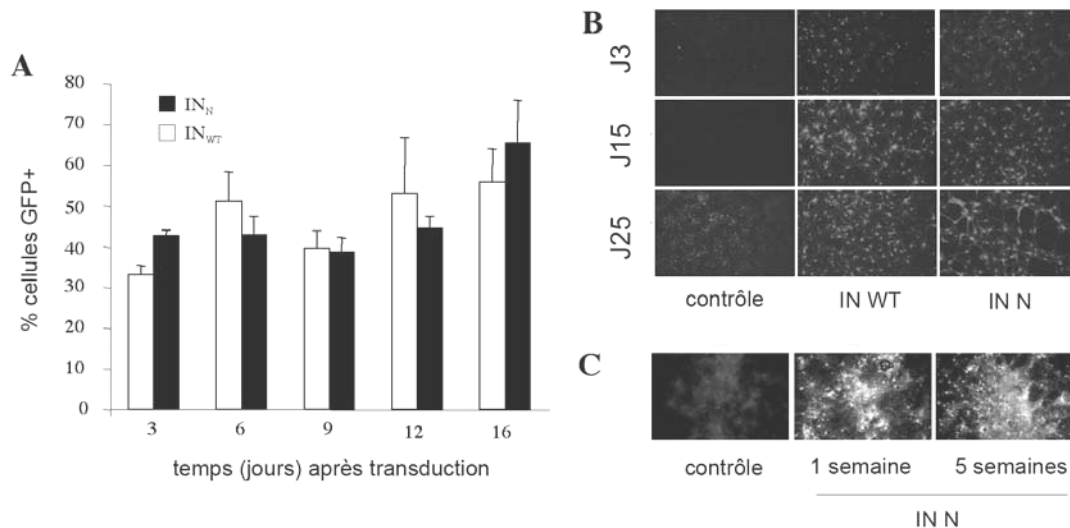
Nous avons choisi de transduire des neurones et des astrocytes primaires, issus de cortex de rat embryonnaire. Les neurones primaires ne se divisent pas et peuvent survivre environ 2 semaines en culture. Les astrocytes se multiplient jusqu'à confluence, puis les inhibitions de contact bloquent leur prolifération, ils peuvent alors être conservés pendant plusieurs semaines en absence de division cellulaire.

Nous avons transduit des neurones et des astrocytes primaires confluentes avec des doses équivalentes en TU de vecteurs non-intégratif IN<sub>N</sub>-HA CMV GFP WPRE ou intégratif IN<sub>WT</sub>-HA CMV GFP WPRE. Les cellules ont été fixées et analysées à différents temps après transduction pour déterminer le pourcentage de cellules exprimant le transgène (voir Figure 26).

Le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> obtenues a été évalué dans les cultures de neurones. Il est équivalent pour les vecteurs intégratif et non-intégratif et stable pendant au moins 16 jours. Dans les astrocytes, l'expression a été observée pendant au moins 5 semaines. La perte de l'expression du transgène, observée dans les cellules en multiplication après



transduction avec les vecteurs déficients pour l'intégration, est donc le résultat de la dilution des génomes non-intégrés. En absence de division cellulaire, les formes épisomales sont stables.



**Figure 26 :** Stabilité de l'expression du transgène dans des cellules en arrêt de division après transduction par un vecteur lentiviral non-intégratif. Des neurones et des astrocytes primaires issus de cortex d'embryons de rat ont été transduits par des doses équivalentes (TU) de vecteur intégratif et non-intégratif et le pourcentage de cellules GFP+ a été évalué à différents temps après transduction. **A**, **B** : expression de la GFP dans les neurones. Chaque point du graphique représente la moyenne du pourcentage de cellules GFP+ évalué sur trois puits par comptage dans chaque puit de trois champs ( $\pm$  l'écart-type). **C** : Expression de la GFP jusqu'à au moins 25 jours après transduction dans les astrocytes.

## 2.2. Expression du transgène *in vivo*

Des publications précédentes ont suggéré que l'intégration du provirus dans la chromatine de la cellule transduite est requise pour l'expression d'un transgène à partir des vecteurs lentiviraux, particulièrement *in vivo* dans le cerveau et la rétine (Naldini *et al.*, 1996a ; Naldini *et al.*, 1996b ; Loewen *et al.*, 2003 ; Saenz *et al.*, 2004). Ces travaux concernent des vecteurs lentiviraux, HIV et FIV, portant une mutation dans l'intégrase au niveau d'un des trois résidus du site catalytique (D64 pour le HIV et D66 pour le FIV). Nous avons donc vérifié si le vecteur que nous avons caractérisé *in vitro* permettait ou non l'expression d'un transgène *in vivo* dans le SNC, plus particulièrement le striatum et la rétine.

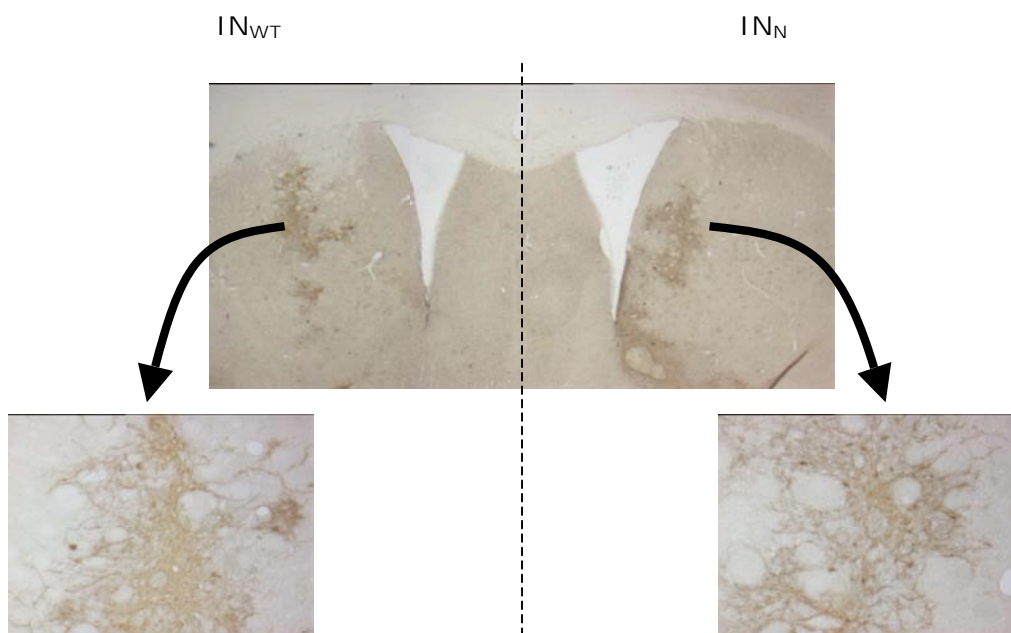
### 2.2.1. Cerveau

Dans un premier temps, nous avons injecté le vecteur non-intégratif IN<sub>N</sub> CMV GFP WPRE par stéréotaxie dans un striatum de souris ; le vecteur contrôle IN<sub>WT</sub> CMV GFP WPRE a été injecté

dans le striatum contralatéral. Les animaux ont été sacrifiés à différents temps après injection, leur cerveau congelé et coupé au cryostat puis analysé par immunohistochimie pour détecter l'expression de la GFP (voir [Figure 27](#)).

Nous observons que les vecteurs lentiviraux non-intégratifs permettent l'expression du transgène *in vivo*, de façon comparable à l'expression obtenue avec un vecteur lentiviral intégratif classique. Cette expression est stable pendant au moins 10 semaines.

L'intégration n'est donc pas requise pour l'expression du transgène par un vecteur lentiviral *in vivo*. De plus, en absence de division cellulaire, les formes épisomales du génome peuvent persister pendant au moins 10 semaines.



**Figure 27 :** Expression du transgène *in vivo* dans le striatum de souris après injection d'un vecteur lentiviral non-intégratif. Analyse immunohistochimique de l'expression de la GFP dans le cerveau de souris après injection de  $10^5$ TU du vecteur  $IN_N$  CMV GFP WPRE (hémisphère gauche) et du vecteur  $IN_{WT}$  CMV GFP WPRE (hémisphère droit), 10 semaines après injection (n=3).

### 2.2.2. Rétine

Les vecteurs  $IN_N$  CMV GFP WPRE et  $IN_{WT}$  CMV GFP WPRE ont également été injectés dans l'espace sous-rétinien chez le rat, en collaboration avec le laboratoire de Y. Arsenijevic (Hôpital Ophtalmique, Lausanne). Le vecteur non-intégratif a été injecté dans l'œil droit, le contrôle intégratif dans l'œil gauche du même animal.

Dans un premier temps, nous avons évalué la dose de vecteur permettant de suivre l'expression de la GFP chez l'animal vivant par angiographie. Comme précédemment, nous avons constaté

---

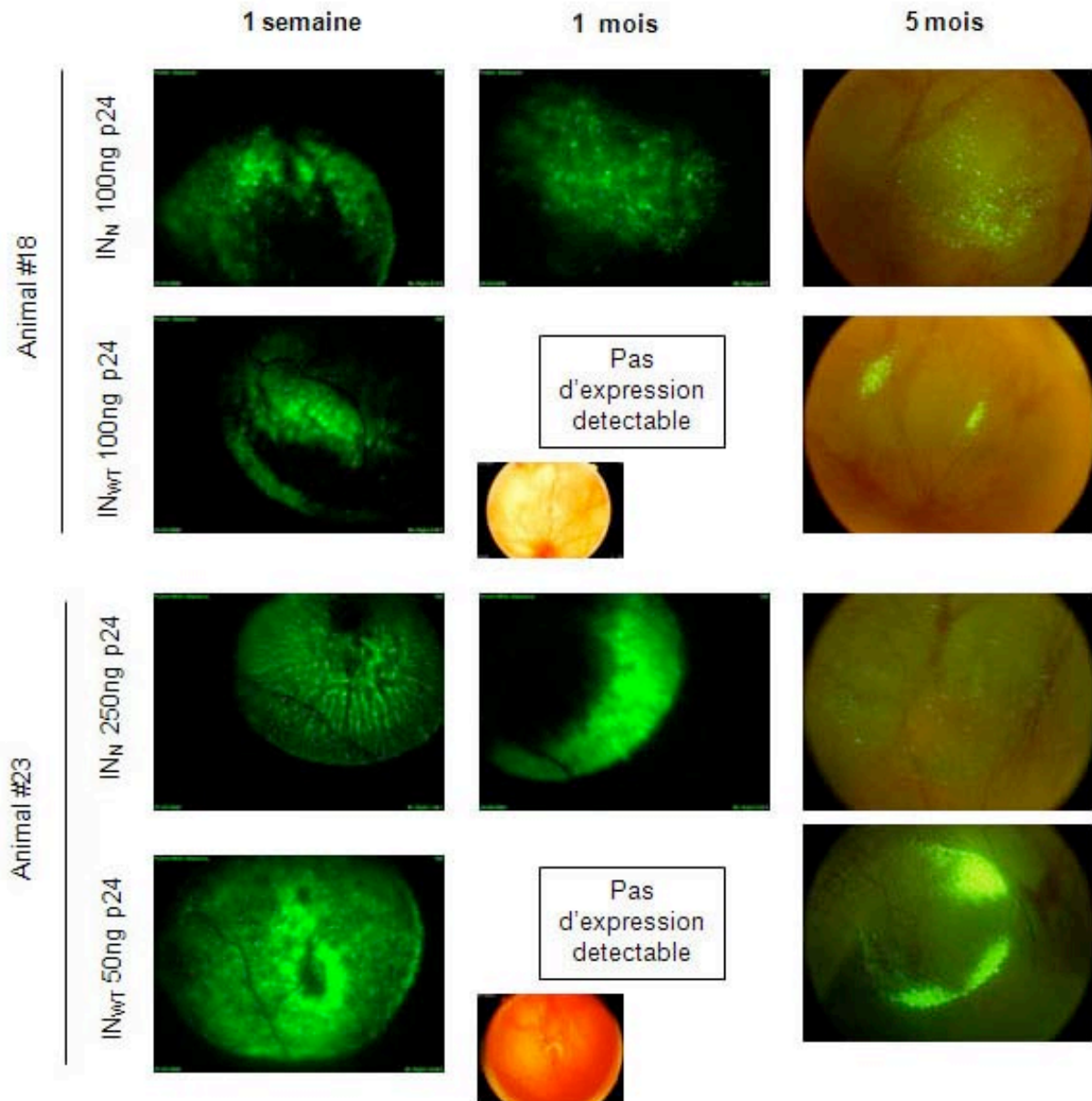
qu'après injection de doses équivalentes en p24, l'expression de la GFP observée avec le vecteur intégratif est supérieure à celle observée avec le vecteur non-intégratif (voir [Figure 28 – animal #18](#)).

Nous avons ensuite injecté les vecteurs avec un rapport 1 : 5 en p24, ce qui correspond à des doses similaires en TU (voir [Figure 28 – animal #23](#)). L'expression de la GFP a pu être visualisée chez l'animal vivant par angiographie pendant 5 mois (voir [Figure 28](#)). Cependant, sur les 4 animaux analysés au dernier point, soit 7 mois après injection, l'expression de la GFP n'a pu être détectée par angiographie que chez un seul animal (œil contrôle).

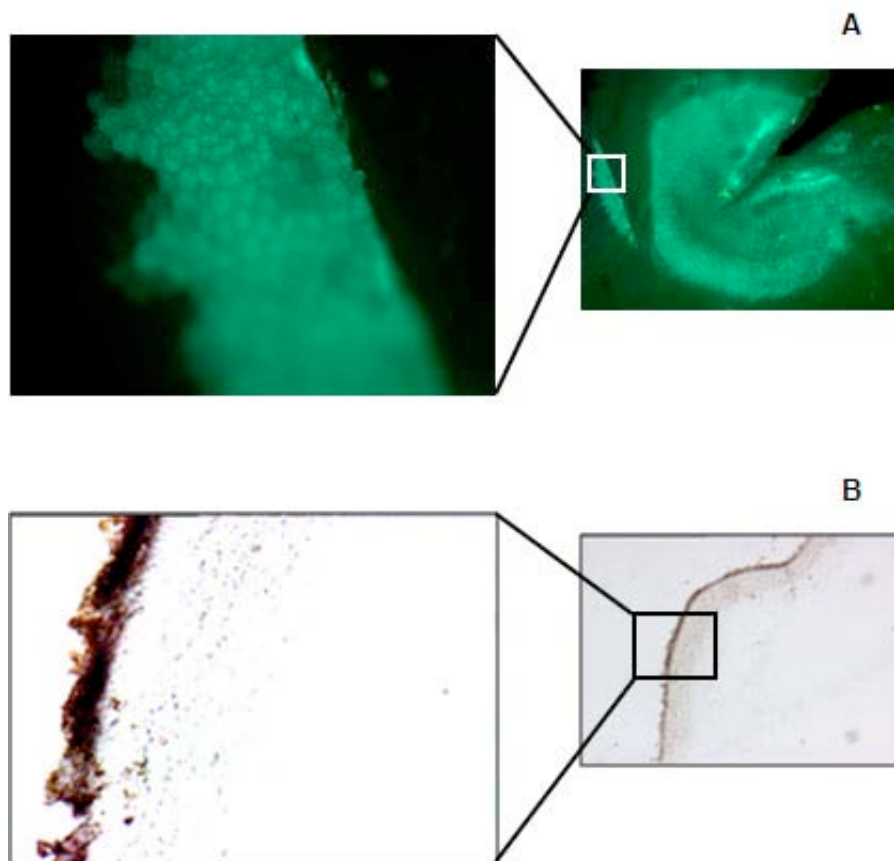
L'expression du transgène dans la rétine, aussi bien avec les vecteurs intégratifs que non-intégratifs, n'est donc pas stable dans le temps. Nous avons observé une diminution, parfois une disparition totale, de la zone de transduction exprimant le transgène, préférentiellement dans l'œil où l'expression initiale était la plus forte et de façon indépendante du vecteur. Nous attribuons cette disparition des cellules exprimant le transgène à une toxicité de la GFP, comme cela a déjà été décrit ([Duisit \*et al.\*, 2002](#)). Néanmoins, l'hypothèse de l'extinction du promoteur CMV, qui dirige l'expression de la GFP dans les vecteurs utilisés, ne peut être totalement écartée. De nouvelles expériences seront nécessaires pour confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Nous avons pu observer l'expression de la GFP en microscopie à fluorescence sur rétine « montée à plat ». La morphologie des cellules exprimant le transgène est tout à fait caractéristique des cellules de l'épithélium pigmentaire (RPE) (voir [Figure 29-A](#)). De même, après analyse immunohistochimique sur des coupes de rétine, l'expression du transgène est restreinte à une couche de cellule, le RPE (voir [Figure 29-B](#)). Ces résultats sont en accord avec les études précédentes de l'expression d'un transgène après injection d'un vecteur lentiviral dans l'espace sous-rétinien ([Duisit \*et al.\*, 2002](#) ; [Bemelmans \*et al.\*, 2005](#)).

En conclusion, nous avons observé l'expression du transgène pendant 5 mois après injection dans l'espace sous-rétinien chez le rat d'un vecteur lentiviral non-intégratif. Cependant, l'expression du transgène n'est pas stable, probablement à cause de la toxicité induite par le niveau élevé de GFP.



**Figure 28 :** Expression du transgène *in vivo* dans la rétine de rat. Observation par angiographie chez l'animal vivant de l'expression de la GFP après injection dans l'espace sous-rétinien chez le rat des vecteurs lentiviraux non-intégratif IN<sub>N</sub> CMV GFP WPRE et contrôle IN<sub>wT</sub> CMV GFP WPRE.



**Figure 29 :** Expression du transgène *in vivo* dans la rétine chez le rat. Analyse histologique de la rétine une semaine après injection d'un vecteur lentiviral IN<sub>N</sub> CMV GFP (250ng p24) (A) Observation au microscope à fluorescence sur rétine montée à plat. (B) Analyse immunohistochimique sur coupe de rétine.

## 2.3. Conclusion

Nous avons démontré, dans cette première partie des résultats, que des vecteurs lentiviraux portant une mutation de la région N de l'intégrase (1) permettent la formation de génomes épisomaux dans le noyau des cellules transduites, (2) que ces formes épisomales peuvent être transcrites et permettent l'expression d'un transgène, quelque soit l'état de la cellule ciblée (en division ou non), (3) que cette expression est perdue par dilution des formes épisomales dans des cellules qui se divisent mais qu'elle est stable dans des cellules qui ne se divisent pas. De plus, (4) l'expression du transgène a été observée dans le SNC de rongeurs, jusqu'à au moins 10 semaines dans le striatum de souris et 5 mois dans le RPE chez le rat. Toutefois, nous avons identifié certains points sur lesquels des améliorations sont possibles.

Tout d'abord, nous avons observé que les vecteurs mutants ne sont pas totalement dépourvus d'activité d'intégration. Cette activité résiduelle a été estimée inférieure de 2 ou 3 log à l'intégration des vecteurs sauvages, et nous avons pu mettre en évidence qu'une partie au moins des événements sont catalysés par l'intégrase. Ceci suggère que l'intégration résiduelle peut encore être réduite.

D'autre part, nous avons pu constater que le niveau d'expression du transgène obtenu avec des vecteurs non-intégratifs est inférieur à celui obtenu avec des vecteurs intégratifs classiques. Pourtant, parallèlement à nos travaux, Yanez-Munoz et coll. ont décrit des vecteurs lentiviraux portant une mutation dans le site catalytique de l'intégrase (substitution D64V) qui seraient aussi efficaces que des vecteurs intégratifs (Yanez-Munoz *et al.*, 2006).

Nous nous sommes donc attachés, dans la seconde partie de nos travaux, à améliorer l'efficacité des vecteurs lentiviraux sur ces deux points particuliers. Nous avons tout d'abord introduit des séquences d'attachement à la matrice dans le génome vecteur et évalué l'impact de ces séquences sur la transcription. Nous avons ensuite comparé la mutation de la région N avec la mutation D64V et la mutation LQ, seules ou en combinaison avec la mutation des régions *att*. Pour ces différents vecteurs, nous avons évalué l'efficacité de transduction et l'intégration résiduelle.

## 3. AMELIORATIONS

### 3.1. Effet des séquences d'attachement à la matrice sur l'expression du transgène

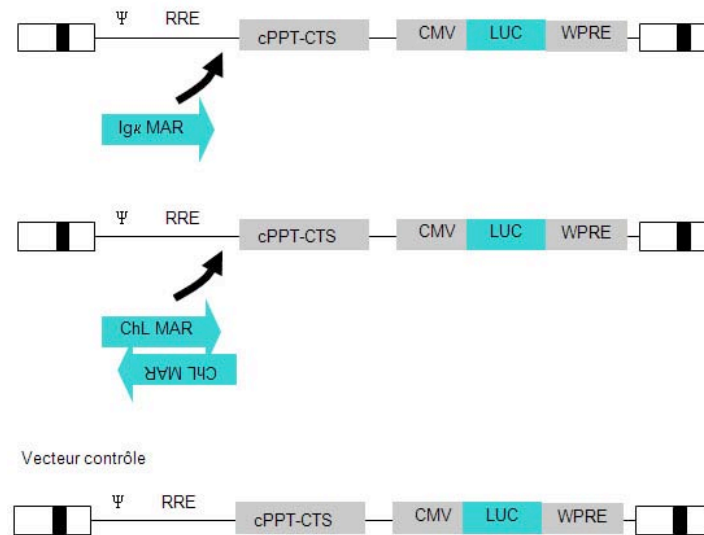
Les séquences d'attachement à la matrice (S/MAR) ont précédemment été utilisées dans les vecteurs lentiviraux. Elles permettent d'améliorer l'expression du transgène, en particulier en réduisant les effets potentiels de *silencing* de la chromatine environnante du provirus (Park et Kay, 2001 ; Park *et al.*, 2003 ; Ramezani *et al.*, 2003 ; Puthenveetil *et al.*, 2004). Nous avons voulu évaluer leur potentiel dans le contexte d'un vecteur lentiviral non-intégratif. Cette démarche est fondée sur l'hypothèse que les différents compartiments du noyau ne sont pas équivalents en ce qui concerne l'accessibilité à la machinerie de transcription. La différence d'efficacité d'expression entre les génomes intégrés et les génomes épisomaux pourrait donc refléter une mauvaise localisation sous-nucléaire des formes non-intégrées. Nous avons donc supposé que par leur action d'attachement à la matrice nucléaire, les séquences MAR pourraient placer les cercles dans un environnement plus favorable à la transcription.

Nous avons évalué l'effet de deux séquences. La première séquence a été décrite par le groupe de M. Kay pour l'expression de facteurs thérapeutiques dans le foie (Park et Kay, 2001 ; Park *et al.*, 2003). Il s'agit de la séquence MAR de la chaîne légère de l'immunoglobuline de souris (Ig $\kappa$  MAR). Cette séquence est courte (300pb), elle nous a donc particulièrement intéressé. En effet, l'augmentation de la longueur du génome lentiviral est connue pour diminuer l'efficacité de la rétrotranscriptase, donc l'efficacité globale des vecteurs. Nous avons également testé une séquence issue du lysozyme de poulet (3 000pb), obtenue par N. Mermod, Lausanne (ChMAR).

Deux vecteurs contrôles ont été envisagés dans ces expériences : un vecteur contenant à la place de la séquence MAR évaluée une autre séquence neutre de taille équivalente ou un vecteur « vide », c'est-à-dire sans séquence MAR ni autre séquence de remplissage. Cette deuxième option ne permet pas de discerner l'effet potentiel du MAR de son éventuel effet sur la réduction de l'efficacité de rétrotranscription. Cependant, le but est l'amélioration de l'efficacité des vecteurs par rapport au vecteur déjà utilisé, c'est à dire « vide », c'est donc ce vecteur que nous avons choisi pour contrôle.

Nous avons utilisé des vecteurs exprimant la Luciférase. Ce transgène permet en effet une évaluation quantitative plus précise que la GFP. Différents vecteurs ont été construits avec les séquences Ig $\kappa$  MAR et ChMAR (voir [Figure 30](#)) et ont été produits en version intégrative et non-intégrative (mutant IN<sub>N</sub>). Les stocks produits ont été testés sur différentes lignées cellulaires. Nous n'avons pas reproduit les résultats précédemment obtenus avec la séquence Ig $\kappa$  MAR dans un

vecteur intégratif et nous n'avons pas observé un effet positif de cette séquence dans un vecteur non-intégratif. Nous avons également noté un effet négatif du ChMAR, probablement par la réduction de l'efficacité de la rétrotranscription (résultats non présentés).

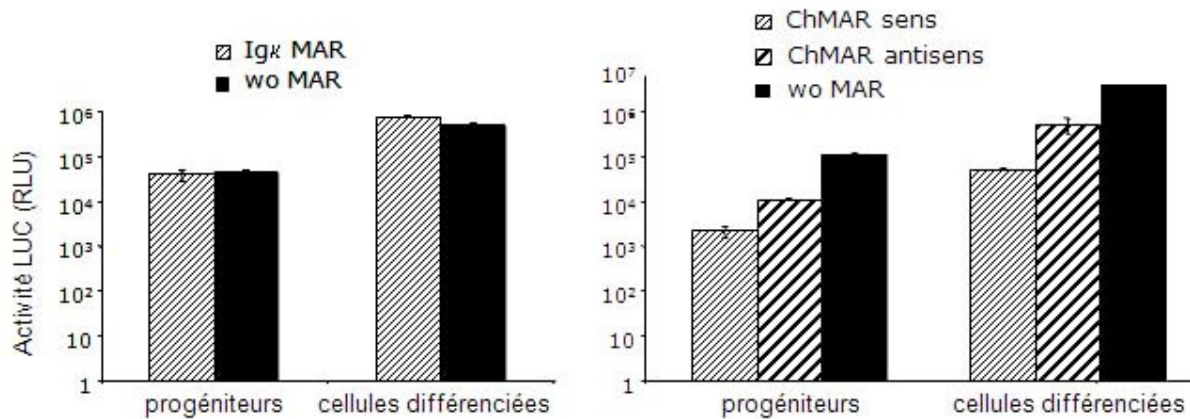


**Figure 30 : Vecteurs utilisés pour l'évaluation de l'effet des séquences MAR sur l'expression d'un transgène par un vecteur lenti-viral.**

Dans un dernier temps, nous avons testé les vecteurs dans des cellules primaires où l'expression des vecteurs lenti-viraux est fortement réprimée afin de favoriser l'éventuel effet positif des séquences MAR. Nous avons choisi des progéniteurs neuraux humains, disponibles au laboratoire et particulièrement réfractaires à l'expression d'un transgène par un vecteur lenti-viral s'ils sont maintenus dans leur état indifférencié. Les résultats, présentés [Figure 31](#), sont représentatifs de ce que nous avons obtenu sur les lignées cellulaires. Encore une fois, nous n'observons pas d'effet significatif de la séquence Igκ MAR et un effet négatif de la séquence ChMAR. Une différence est toutefois observée avec la séquence ChMAR en fonction de son orientation, ce qui pourrait suggérer un effet sur la transcription. Il serait nécessaire, afin de confirmer cet effet, de comparer les vecteurs IN<sub>N</sub> CMV LUC ChMAR WPRE avec un vecteur portant une séquence de remplissage (*stuffer*) de même taille.

En conclusion, les éléments S/MAR que nous avons utilisés ne permettent pas d'améliorer le niveau d'expression d'un transgène à partir des épisomes du génomes HIV.





**Figure 31 :** Effet des séquences MAR sur l'expression du transgène par les vecteurs lentiviraux non-intégratifs (IN<sub>N</sub>). Les cellules sont transduites et le dosage de l'activité LUC est réalisé après 72h de culture. Chaque point est la moyenne obtenue à partir de trois puits, ± l'écart-type.

## 3.2. Utilisation d'autres mutations d'intégrase

Comme mentionné précédemment, Yanez-Munoz et coll. rapportent que des vecteurs lentiviraux portant la substitution D64V permettent un niveau d'expression du transgène équivalent à celui observé avec des vecteurs intégratifs (Yanez-Munoz *et al.*, 2006). Ceci n'est pas en accord avec ce que nous avons observé avec les vecteurs IN<sub>N</sub>. Nous avons donc comparé l'efficacité de transduction de vecteurs portant ces différentes mutations. Nous avons également utilisé, dans ces expériences, des vecteurs portant la mutation LQ que nous avons précédemment décrits comme étant moins efficaces que les vecteurs N (voir chapitre 1.1.2 p105). Plusieurs vecteurs exprimant différents transgènes ont été produits : la GFP, le Luciférase ou le GDNF. Les différents vecteurs utilisés pour une même expérience ont toujours été produits et titrés en parallèle.

### 3.2.1. Influence des mutations d'intégrase sur l'expression de la GFP

Une première série d'expériences a été réalisée avec des vecteurs lentiviraux portant différentes mutations dans la séquence de l'intégrase et exprimant le gène rapporteur de la GFP. Des cellules HeLa ont été transduites avec différentes doses (normalisées en p24) de ces vecteurs mutants ainsi que du vecteur contrôle intégrase sauvage. Les cellules ont été cultivées pendant 72h après transduction puis fixées et analysées par FACS pour déterminer le pourcentage de cellules GFP+ ainsi que l'intensité de fluorescence moyenne par cellule (mfi). Cette expérience a été répétée avec les mêmes stocks de vecteurs ainsi qu'avec des stocks produits indépendamment. Les résultats de ces trois expériences indépendantes sont présentés dans la Figure 32.

Nous observons, pour les trois expériences, que les vecteurs portant une intégrase sauvage  $IN_{WT}$  sont plus efficaces que les trois vecteurs mutants, y compris le vecteur  $IN_{D64V}$ . Pour la première expérience, à la dose la plus faible testée, le pourcentage de cellules exprimant la GFP est supérieur à 90% pour le vecteur  $IN_{WT}$  alors qu'il est inférieur à 30% pour les trois vecteurs mutants  $IN_{D64V}$ ,  $IN_N$  et  $IN_{LQ-HA}$ . Le pourcentage de cellules GFP+ reste élevé pour les doses croissantes de vecteur contrôle intégratif. Cette valeur augmente en fonction de la quantité de p24 pour les trois vecteurs mutants, et atteint un nombre maximum de cellules transduites supérieur à 80%.

Nous observons toutefois que le pourcentage maximum de cellules GFP+ atteint avec le vecteur  $IN_N$  est plus faible qu'avec le vecteur  $IN_{D64V}$ . De façon surprenante par rapport à ce que nous avons conclu des expériences préliminaires, le pourcentage de cellules GFP+ obtenu avec le vecteur  $IN_N$  est également inférieur à celui observé avec le vecteur  $IN_{LQ-HA}$ . La différence n'est pas très importante (environ 20%) mais elle reproductible entre les trois expériences indépendantes.

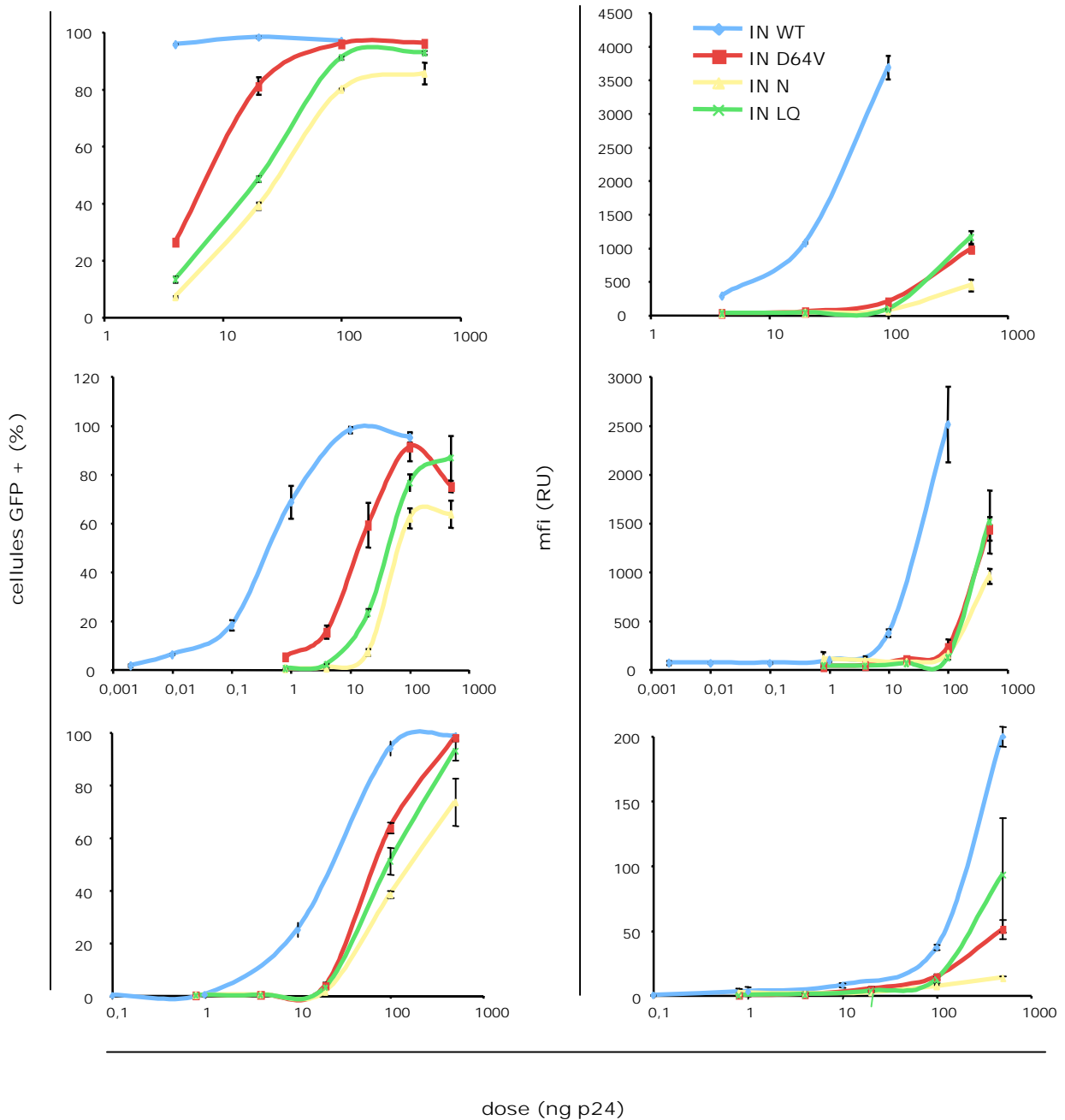
Les résultats obtenus par l'analyse de la mfi montrent que le vecteur contrôle intégratif est significativement plus efficace pour la transduction. En particulier, dans la première expérience, nous observons que cette valeur augmente de façon exponentielle en fonction de la dose, alors que le pourcentage de cellules GFP+ est supérieur à 90%, quelle que soit la dose. Ceci traduit le fait que le nombre de particules par cellule est de plus en plus élevé pour des doses croissantes de vecteur.

Comme pour l'analyse du paramètre « pourcentage de cellules GFP+ », les trois vecteurs mutants  $IN_{D64V}$ ,  $IN_N$  et  $IN_{LQ-HA}$ , sont moins efficaces que le vecteur contrôle. Nous observons également que les vecteurs  $IN_{D64V}$  et  $IN_{LQ-HA}$  se comportent de façon similaire et sont légèrement plus efficaces que le vecteur  $IN_N$ . Cette tendance est reproduite dans les trois expériences indépendantes.

L'ensemble de ces résultats sur l'analyse de l'expression de la GFP démontrent donc que les vecteurs non-intégratifs  $IN_N$ ,  $IN_{LQ}$  et  $IN_{D64V}$  ne permettent pas une expression du transgène aussi efficace que le vecteur contrôle portant une intégrase sauvage.

Ils suggèrent également que, contrairement à notre hypothèse initiale, les vecteurs portant une mutation dans les régions L et Q de l'intégrase sont plus efficaces que les vecteurs mutés dans la région N.

Afin de confirmer ces tendances, nous avons complété notre analyse par la comparaison de vecteurs portant les mêmes mutations dans la séquence de l'intégrase, mais exprimant le gène rapporteur de la Luciférase.



**Figure 32: Comparaison de l'influence des mutations d'intégrase D64V, N et LQ-HA sur l'expression de la GFP.** Présentation de trois expériences indépendantes (en haut et au milieu avec les mêmes stocks de vecteurs, en bas avec une production indépendante de vecteurs). Des cellules HeLa ont été transduites avec des doses croissantes de chaque vecteur et analysées par FACS 72h après transduction, chaque résultat est la moyenne de trois puits,  $\pm$  écart-type. À droite : représentation du pourcentage de cellules exprimant la GFP en fonction de la dose de vecteur utilisée, à gauche : représentation de la fluorescence moyenne par cellules en fonction de la dose de vecteur utilisée (exprimée en unités relatives (RU)).

### 3.2.2. Influence des mutations d'intégrase sur l'expression de la Luciférase

Une seconde série d'expériences a été réalisée avec des vecteurs exprimant la Luciférase. Des cellules HeLa ont été transduites avec des doses croissantes des différents vecteurs contrôle  $IN_{WT}$  ou mutants  $IN_{D64V}$ ,  $IN_N$  ou  $IN_{LQ-HA}$ . Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 72h puis l'activité Luciférase a été évaluée pour chaque condition. Comme pour l'analyse de l'expression de la GFP, une première expérience a été réalisée, répétée de façon indépendante avec les mêmes stocks de vecteurs puis avec une nouvelle production de vecteurs. Les résultats de ces trois expériences indépendantes sont présentés dans la [Figure 33](#).

Tout comme pour les vecteurs exprimant la GFP, nous observons de façon très nette que le vecteur contrôle  $IN_{WT}$  permet l'expression du transgène à un niveau beaucoup plus élevé (environ 1 log) que les trois vecteurs mutants pour l'intégrase.

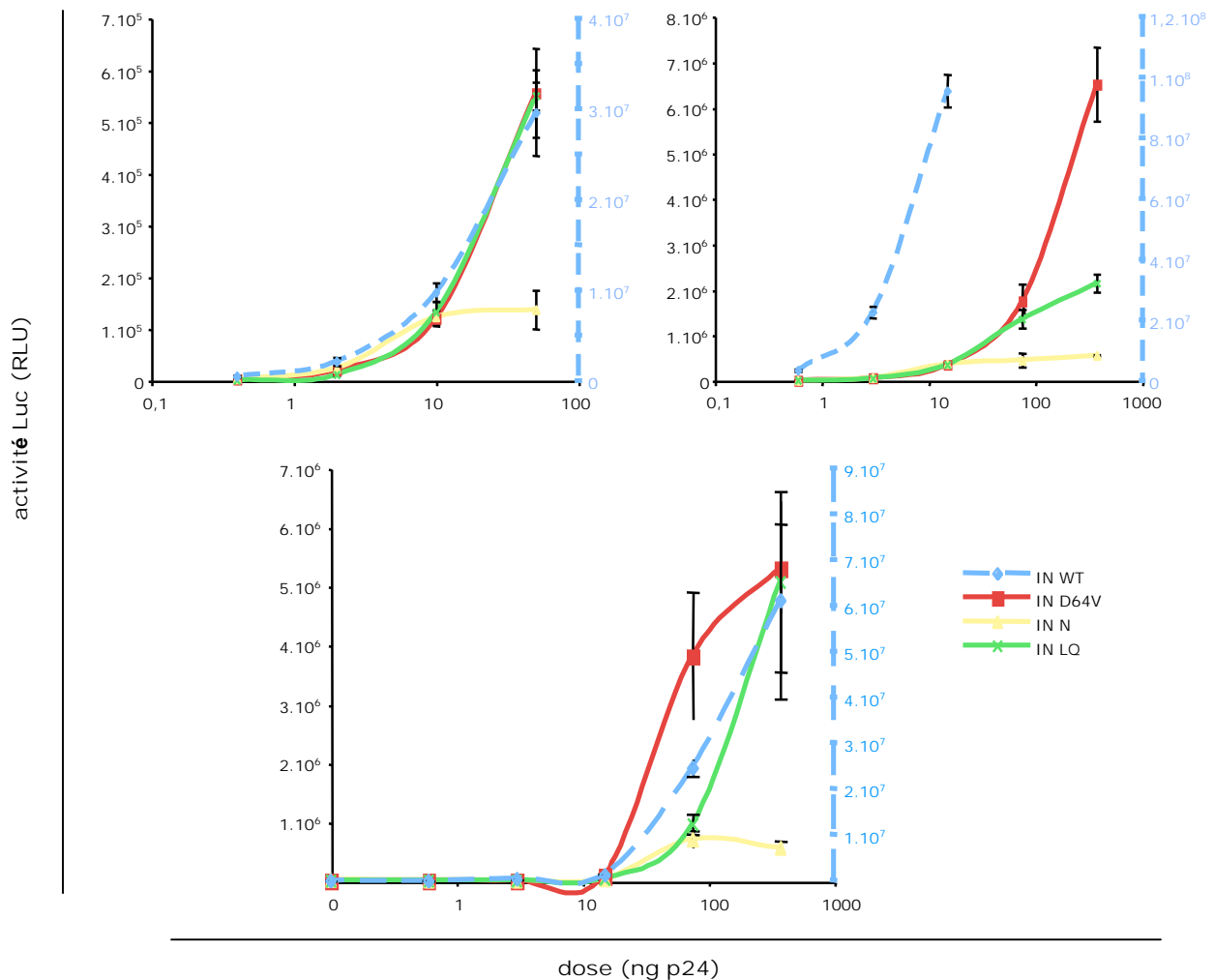
Le comportement du vecteur  $IN_N$  est, cette fois, très nettement différent de celui des deux autres vecteurs mutants  $IN_{D64V}$  et  $IN_{LQ-HA}$ . Non seulement l'expression de la Luciférase est inférieure dans les cellules transduites avec le vecteur  $IN_N$ , mais elle est rapidement saturée. En effet, alors que l'activité Luc augmente en fonction de la dose, jusqu'à 500ng de p24, dans les cellules transduites avec les vecteurs  $IN_{D64V}$  et  $IN_{LQ-HA}$ , cette activité atteint un plateau avec les vecteurs  $IN_N$  dès 10ng de p24. Cet effet de saturation est reproductible et indépendant de la production puisqu'il est observé de façon similaire avec des stocks produits indépendamment.

Les résultats obtenus par le dosage de l'activité Luciférase montrent donc une nouvelle fois que le vecteur intégratif permet une expression du transgène plus efficace que les vecteurs épisomaux (10 à 100 fois). Ces résultats apportent également un élément nouveau : la transduction avec le vecteur  $IN_N$  n'est pas croissante en fonction de la dose, mais rapidement saturée. Ce profil n'est pas sans rappeler les résultats qui ont été obtenus avec des vecteurs lentiviraux dépourvus de la séquence cPPT-CTS (Zennou *et al.*, 2000 ; Zennou *et al.*, 2001). Ces vecteurs seraient soumis à un mécanisme d'import nucléaire passif rapidement saturé. L'efficacité de transduction, au-delà d'une certaine dose, n'est donc plus dépendante du nombre de particules. L'introduction de la séquence cPPT-CTS permet aux CPI de bénéficier d'un autre mécanisme d'import nucléaire qui, lui, n'est pas saturé. En conséquence, l'expression du transgène augmente en fonction de la dose de vecteur, même pour des doses élevées.

Rappelons également qu'un des défauts supposés induits par la modification des régions N, L et Q est un défaut d'import nucléaire : bien que non confirmée par l'étude de Petit et coll. (Petit *et al.*, 2000), l'implication de ces motifs dans l'import nucléaire du CPI avait été proposée par Gallay et coll. (Gallay *et al.*, 1997).

Ainsi, les résultats que nous avons obtenus avec les vecteurs Luciférase suggèrent que l'impact de la mutation de la région N de l'intégrase sur la transduction est plus

important que celui de la mutation des régions L et Q et que le défaut induit pourrait se situer au niveau de l'import nucléaire du CPI. Cette hypothèse, qui demande à être validée, sera discutée plus en détail dans le chapitre Discussion.



**Figure 33 :** Comparaison de l'influence des mutations d'intégrase D64V, N et LQ-HA sur l'expression de la Luciférase. Présentation de trois expériences indépendantes (en haut avec les mêmes stocks de vecteurs, en bas avec une production indépendante). Des cellules HeLa ont été transduites avec des doses croissantes de chaque vecteur et l'activité Luc a été dosée pour chaque condition 72h après transduction, chaque résultat est la moyenne de trois puits,  $\pm$  écart-type. L'activité obtenue pour les cellules transduites avec le vecteur témoin IN<sub>WT</sub> est représentée sur un axe d'ordonnée différent (axe de droite).

### 3.2.3. Influence des mutations d'intégrase sur l'expression du GDNF

Le GDNF (Glial derived neurotrophic factor) est un gène d'intérêt thérapeutique. Il peut être utilisé pour favoriser la survie des neurones dans le cadre de pathologies neurodégénératives, comme les dégénérescences rétiniennes (Frasson *et al.*, 1999 ; McGee Sanftner *et al.*, 2001). Les cellules cibles

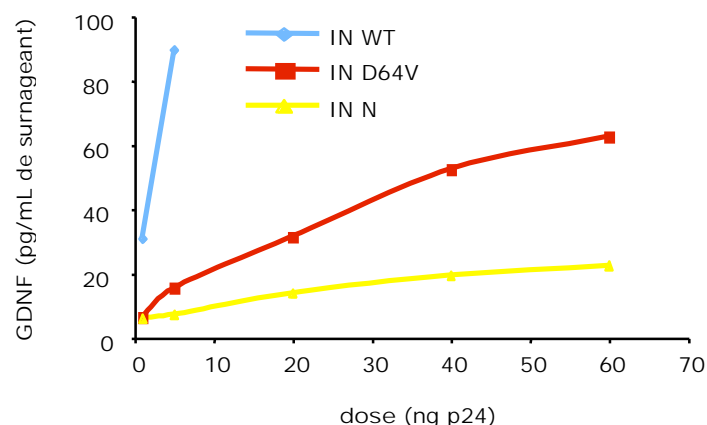
dans de telles stratégies sont des cellules majoritairement en arrêt de division. Le transfert de gène en vue d'une expression stable du GDNF peut alors être réalisé par un vecteur lentiviral non-intégratif. Nous avons donc évalué l'efficacité d'expression du GDNF par des vecteurs lentiviraux mutants pour l'intégrase IN<sub>N</sub> et IN<sub>D64V</sub>.

Différentes doses de ces vecteurs ont été utilisées pour transduire des cellules 293T et la concentration de GDNF a été évaluée par ELISA sur le milieu de culture des cellules pour chaque condition. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la [Figure 34](#).

En accord avec ce que nous avons observé avec les vecteurs exprimant la GFP et la Luciférase, le vecteur intégratif permet un niveau d'expression du GDNF plus élevé que les vecteurs non-intégratifs IN<sub>N</sub> et IN<sub>D64V</sub>. Le rapport WT/mutant est d'environ 3 pour la dose la plus faible. Il est supérieur à 5 pour la dose supérieure testée, et augmente aux doses supérieures.

Pour les doses testées, l'expression de la quantité de GDNF en fonction de la dose de vecteur peut être assimilée à une régression linéaire. Nous avons donc déterminé, pour chaque vecteur mutant, un coefficient de régression qui traduit l'efficacité relative de chaque vecteur. Ce coefficient est environ 3,3 fois plus élevé pour le vecteur IN<sub>D64V</sub> que pour le vecteur IN<sub>N</sub> (0,946,  $r=0,970$  vs 0,288,  $r=0,965$ ).

Ces résultats confirment que, dans une perspective thérapeutique, l'utilisation d'un vecteur lentiviral non-intégratif portant la substitution du site catalytique IN<sub>D64V</sub> est préférable à celle d'un vecteur modifié dans la région N de l'intégrase puisque ce dernier ne permet pas une expression aussi efficace du transgène. Ces résultats suggèrent aussi, à nouveau, que la mutation N affecte plus sévèrement la transduction que nous l'avions initialement supposé, probablement en perturbant une autre étape que l'intégration.



**Figure 34 :** Comparaison de l'influence des mutations d'intégrase D64V et N sur l'expression du GDNF. Des cellules 293T ont été transduites avec des doses croissantes de chaque vecteur et la concentration de GDNF sécrétée dans le milieu de culture a été évaluée par ELISA pour chaque condition, 48h après transduction.

### 3.3. Réduction de l'intégration résiduelle

Nous avons pu mettre en évidence, par séquençage de produits obtenus par LAM-PCR, qu'une partie au moins des événements d'intégration résiduelle observée avec les vecteurs  $IN_N$  est catalysée par l'intégrase. Cette constatation nous a conduit à envisager l'utilisation d'autres mutations, seules ou en combinaison avec la mutation N, en particulier les mutations des séquences *att* des LTR.

Comme mentionné précédemment, les séquences *att* des LTR sont requises pour l'intégration : elles sont reconnues par l'intégrase ce qui permet la prise en charge des LTR par l'intégrase et la catalyse de la réaction d'intégration. Leur mutation, y compris au sein d'un vecteur lentiviral (Nightingale *et al.*, 2006), réduit considérablement la fréquence d'intégration. Nous avons donc produit des vecteurs portant une mutation de la région N de l'intégrase et/ou des régions *att* des LTR et évalué l'activité résiduelle d'intégration de ces vecteurs.

D'autre part, dans une publication récente, Yanez-Munoz et coll. ne détectent pas d'événements d'intégration avec un vecteur lentiviral  $IN_{D64V}$  (Yanez-Munoz *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent donc que la mutation D64V affecte de façon plus drastique l'intégration que la mutation N que nous avons décrite. Nous l'avons donc incorporée dans notre étude afin de la comparer avec la mutation N.

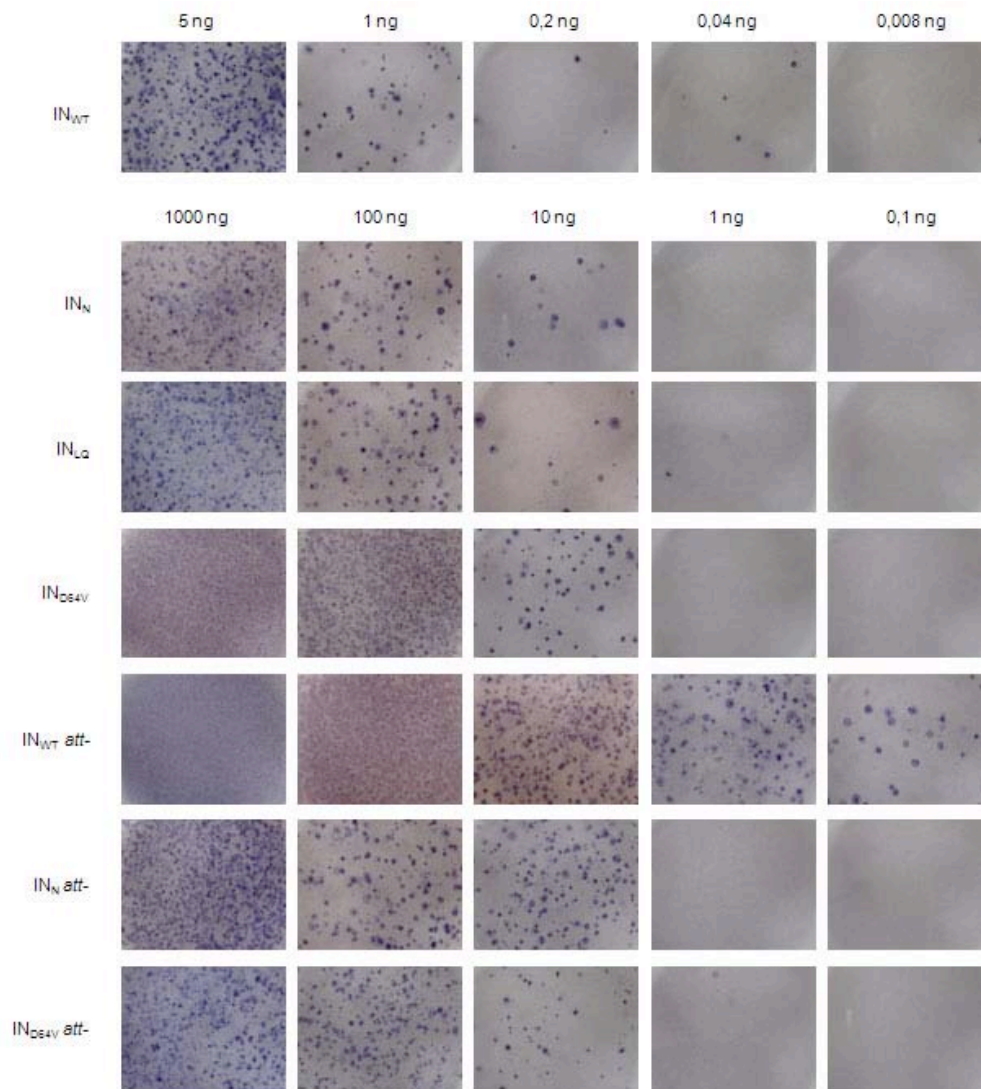
Les différents vecteurs produits, permettant l'expression du gène de résistance NEO, ont été utilisés pour transduire des cellules HeLa. Ces cellules ont ensuite étéensemencées à faible densité puis cultivées en présence de G418 afin de sélectionner les événements d'intégration. Après une semaine de sélection, les cellules ont été fixées et colorées pour comptage. Pour les doses les plus élevées de vecteur, le nombre de clones n'a pu être précisément évalué, les cellules étant trop denses (voir Figure 35). Les résultats des comptages pour les doses les plus faibles de vecteurs sont représentés Figure 36.

Comme attendu, ces résultats montrent que les différentes mutations, de l'intégrase et des séquences *att*, réduisent la fréquence d'intégration des vecteurs lentiviraux par rapport au vecteur contrôle  $IN_{WT}$ . Afin de déterminer plus précisément l'efficacité d'intégration de chaque vecteur, nous avons considéré une portion du graphique et nous l'avons assimilé à une régression linéaire. Nous avons ainsi pu déterminer, par interpolation, la dose nécessaire pour obtenir 59 clones, ce qui correspond au nombre de clones obtenus avec 0,2ng de p24 du vecteur contrôle intégratif  $IN_{WT}$ . Ces points sont représentés par les pointillés sur la Figure 36. Les résultats de cette interpolation sont présentés dans le Tableau 5.

Cette analyse révèle que le vecteur  $IN_N$  est le moins efficace pour l'intégration. Dans l'expérience présentée, il est environ 200 fois moins efficace que le vecteur contrôle. Dans les mêmes conditions, le vecteur  $IN_{D64V}$  apparaît n'être qu'environ 30 fois moins efficace. Toutefois, nous avons déterminé précédemment que les vecteurs  $IN_N$  présentent un défaut dans la transduction,

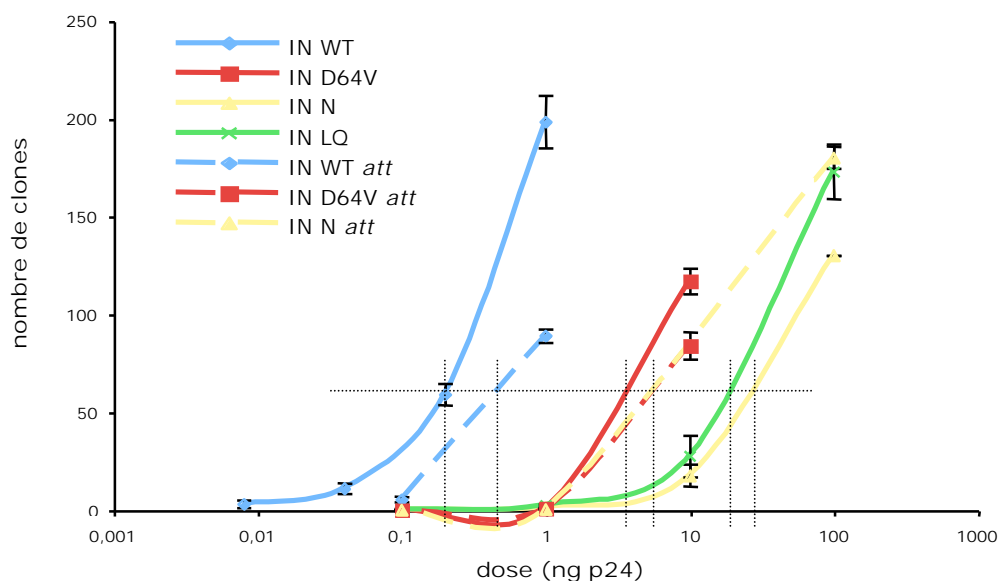


autre que le défaut d'intégration recherché. Bien que ce défaut n'ait pas été clairement identifié, il a induit probablement une diminution du nombre de génomes dans le noyau des cellules transduites par rapport à une dose équivalente en p24 des vecteurs contrôle  $IN_{WT}$  ou mutant  $IN_{D64V}$ . Il serait donc intéressant de pouvoir normaliser cette expérience par rapport à la quantité de génome ADN synthétisés dans la cellule et pas seulement en particules physiques. Ainsi, l'expression de la fréquence d'intégration par génome et non par nanogramme de p24 devrait réduire la différence entre les deux vecteurs mutants  $IN_N$  et  $IN_{D64V}$ .



**Figure 35 :** Comparaison de l'influence des mutations d'intégrase D64V, N et LQ, et des mutations des séquences *att* des LTR sur la fréquence d'intégration des vecteurs lentiviraux. Les cellules (HeLa) sont transduites avec des doses croissantes de vecteurs CMV NEO WPRE et ensemencées à faible densité. Les doses indiquées représentent la dose pour 200 000 cellules. Les cellules sont cultivées en présence de G418 pendant 7 jours, puis fixées, colorées et photographiées.





**Figure 36 :** Comparaison de l'influence des mutations d'intégrase D64V, N et LQ-HA, et des mutations des séquences *att* des LTR sur la fréquence d'intégration des vecteurs lentiviraux. Les cellules (HeLa) sont transduites avec des doses croissantes de vecteurs CMV NEO WPRE et ensemencées à faible densité. Elles sont cultivées en présence de G418 pendant 7 jours, puis fixées et colorées. Le nombre de clones pour chaque condition est compté, chaque résultat est la moyenne de trois puits,  $\pm$  écart-type.

**Tableau 5 :** Efficacité d'intégration des vecteurs mutants par rapport au vecteur  $IN_{WT}$ . soit « x » = la dose de vecteur (ng p24) et « y » = le nombre de clones, la régression linéaire est de la forme  $y = ax + b$ . Les coefficients « a » et « b » ont été déterminés pour chaque vecteur. Nous avons ensuite calculé, à partir de cette équation, la dose de p24 ( $x_{59}$ ) nécessaire pour obtenir 59 clones ( $y = 59$ ).

vecteur	$y = ax + b$	$x_{59}$	$IN_i / IN_{WT}$	$IN_{i, att} / IN_i$
$IN_{WT}$		0,20	1	-
$IN_{WT, att}$	$y = 92,963x - 3,963$	0,68	3,4	3,40
$IN_{D64V}$	$y = 12,926x - 12,259$	5,50	27,5	-
$IN_{D64V, att}$	$y = 9,2222x - 8,222$	7,29	36,4	1,32
$IN_N$	$y = 1,2481x + 5,152$	43,10	215,7	-
$IN_N, att$	$y = 1,8148x - 1,4815$	33,33	166,6	0,77
$IN_{LQ-HA}$	$y = 1,6167x + 11,33$	29,49	147,4	-

De façon intéressante, nous observons que le vecteur  $IN_{D64V}$  s'intègre environ 5 fois plus fréquemment que le vecteur  $IN_{LQ-HA}$ . Or, les expériences conduites précédemment pour évaluer l'efficacité d'expression du transgène de ces deux vecteurs n'ont pas mis en évidence de défaut pour le vecteur  $IN_{LQ-HA}$ . En d'autres termes, nous observons que contrairement au vecteur  $IN_N$ , le vecteur  $IN_{LQ-HA}$  s'intègre moins fréquemment que le vecteur  $IN_{D64V}$  pour une efficacité de transduction similaire.

Au cours de cette expérience, nous avons également évalué l'effet de la mutation des séquences *att* des LTR sur la fréquence d'intégration. Comme il a été décrit précédemment, la modification de ces

bases réduit la fréquence d'intégration d'un vecteur lentiviral portant une intégrase sauvage (Nightingale *et al.*, 2006). Nous observons toutefois un effet nettement moindre que celui décrit par Nightingale et coll. puisque le vecteur IN<sub>WT</sub> *att* n'est qu'environ 3 fois moins intégratif que le vecteur contrôle IN<sub>WT</sub>.

L'effet de la mutation des *att* a également été évalué en combinaison avec les mutations d'intégrase N et D64V. Aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence (IN<sub>D64V</sub> *att*<sup>+/att</sup>- = 1,32 et IN<sub>N</sub> *att*<sup>+/att</sup>- = 0,77).

Nous observons donc que la mutation des séquences *att* des LTR ne permet pas de réduire significativement la fréquence d'intégration des vecteurs lentiviraux mutants pour l'intégrase.

### 3.4. Conclusion

Nous avons identifié, dans la première partie des travaux présentés, deux points sur lesquels les vecteurs lentiviraux non-intégratifs pouvaient être améliorés : l'efficacité d'expression du transgène et l'activité résiduelle d'intégration. Les travaux menés dans cette seconde partie avaient donc pour objectif d'améliorer ces deux points.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de l'incorporation de séquences d'attachement à la matrice dans le génome des vecteurs utilisés. Nous avons supposé que le manque d'efficacité de transcription des génomes non-intégrés pouvait être la conséquence de leur localisation dans un compartiment nucléaire peu permissif. Nous avons donc formulé l'hypothèse que l'ajout des éléments d'ancrage à la matrice nucléaire pouvait favoriser la relocalisation des génomes épisomaux dans un compartiment nucléaire plus propice à la transcription. Aucun de nos résultats ne permet cependant d'attester du bien fondé de cette approche.

Dans un second temps, nous avons comparé des vecteurs portant différentes modifications de l'intégrase, incluant les vecteurs IN<sub>N</sub>. Ces expériences nous ont permis de vérifier que la substitution du résidu D64 du site catalytique permet une expression du transgène plus efficace que la modification de la région N. Nous avons également mis en évidence un défaut important des vecteurs portant cette mutation IN<sub>N</sub>, particulièrement dans les expériences de dosage de l'activité Luciférase. Ces résultats ont été interprétés comme traduisant un défaut d'import nucléaire des vecteurs IN<sub>N</sub>.

Nous avons enfin évalué l'effet de la modification des séquences *att* des LTR sur l'activité résiduelle d'intégration. L'effet que nous avons observé sur le vecteur portant une intégrase non-modifiée est modéré (réduction d'un facteur 3 de la fréquence d'intégration) et aucun effet significatif n'a été mis en évidence sur l'activité résiduelle d'intégration des vecteurs IN<sub>N</sub> et IN<sub>D64V</sub>.

De façon surprenante, les résultats que nous avons obtenus avec le vecteur  $IN_{LQ}$  suggèrent que ce vecteur est au moins aussi intéressant que le vecteur  $IN_{D64V}$  pour le transfert de gène. En effet, contrairement à ce que nous avons initialement supposé, nous avons montré que ces deux vecteurs sont d'une efficacité comparable pour la transduction. De plus, nous avons observé que le vecteur  $IN_{LQ}$  s'intègre moins fréquemment que le vecteur  $IN_{D64V}$ .



---

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Ce chapitre Discussion est organisé en quatre parties.

Dans une première partie, je discuterai les résultats que nous avons obtenus par rapport aux autres vecteurs lentiviraux non-intégratifs décrits dans la littérature. J'aborderai également l'importance du choix de la mutation et l'implication probable de l'intégrase dans différentes étapes de la transduction. Dans une seconde partie, je discuterai des possibilités d'amélioration des vecteurs lentiviraux non-intégratifs, que ce soit en termes d'efficacité d'expression du transgène ou de réduction de l'intégration résiduelle. Ensuite, j'aborderai les perspectives d'évolution de ces vecteurs, notamment en tant que plateforme pour le développement de vecteurs à intégration site-spécifique. Enfin, je soulèverai un certain nombre de points critiques à considérer en vue de l'application des vecteurs lentiviraux, qu'ils soient intégratifs ou non. En effet, l'objet du travail que nous avons réalisé concerne la gestion du risque de mutagenèse insertionnelle, mais ce risque n'est pas le seul et d'autres sont également à prendre en compte. Nous nous focaliserons tout d'abord sur la délétion du *enhancer* du LTR. Nous envisagerons ensuite les risques liés à la formation de particules recombinantes, les conséquences de ce dernier risque dépassent largement le cadre clinique et la formation de particules recombinantes peut avoir de lourdes répercussions d'ordre environnemental.

# 1. LES VECTEURS LENTIVIRAUX NON- INTEGRATIFS

## 1.1. L'intégration n'est pas nécessaire à l'expression d'un transgène par un vecteur lentiviral

Les travaux menés au laboratoire ces dernières années (Philippe *et al.*, 2006), ainsi que par d'autres équipes (Yanez-Munoz *et al.*, 2006 ; Nightingale *et al.*, 2006), démontrent que l'intégration n'est pas une étape indispensable à l'expression d'un transgène par un vecteur lentiviral, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Pourtant, un certain nombre de publications antérieures étaient parvenues à une conclusion opposée, en particulier les travaux de Naldini et coll. (Naldini *et al.*, 1996a ; Naldini *et al.*, 1996b ; Blomer *et al.*, 1997). Les auteurs rapportent des titres proches de 4 500 TU/ng p24 pour les vecteurs intégratifs tandis que les vecteurs portant la mutation D64V dans l'intégrase sont à 54 TU/ng p24, soit un facteur supérieur à 80. En ce qui concerne les titres des vecteurs non-intégratifs, nous obtenons des titres généralement plus élevés que ceux rapportés par Naldini et coll., compris entre  $10^2$  et  $10^4$  TU/ng p24 (voir [Figure 24 p117](#)).

Un certain nombre d'éléments diffèrent dans la construction des vecteurs utilisés par chaque équipe. Plus particulièrement, nous avons incorporé dans les vecteurs utilisés différentes améliorations décrites depuis les travaux de Naldini et coll. :

- la séquence WPRE est connue pour améliorer l'efficacité d'expression d'un transgène dans les vecteurs lentiviraux (Zufferey *et al.*, 1999 ; Baekelandt *et al.*, 2002 ; Brun *et al.*, 2003),
- le *flap* améliore l'efficacité de transduction des vecteurs lentiviraux (Follenzi *et al.*, 2000 ; Zennou *et al.*, 2001 ; Baekelandt *et al.*, 2002),
- la taille du transgène est inférieure pour la GFP par rapport à la séquence  $\beta$ -Gal utilisée par Naldini et coll., or la longueur du vecteur est un point critique pour l'efficacité de la rétrotranscription (Kumar *et al.*, 2001),
- la délétion de la région promotrice du LTR réduit les interférences de transcription et augmente l'efficacité du promoteur interne comme cela a été démontré pour les vecteurs lentiviraux intégratifs (Miyoshi *et al.*, 1998) et aussi non-intégratifs (résultats présentés par Bayer *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007).

La présence de ces différents éléments permet l'amélioration des titres par rapport à ceux obtenus par Naldini et coll. et participe certainement au fait que nous ayons observé l'expression d'un transgène avec les vecteurs non-intégratifs, contrairement à Naldini et coll.. Ces éléments ne sont

cependant pas indispensables puisque nous avons montré que des vecteurs non-SIN et dépourvus de WPRE, de même que des vecteurs dépourvus de *flap* permettent également l'expression du transgène.

De plus, cette augmentation de titre s'est répercutée sur les vecteurs intégratifs aussi bien que non-intégratifs : nous observons des titres compris entre  $10^3$  et  $10^5$  TU/ng p24 (voir [Figure 24 p117](#)). Les titres des vecteurs mutants sont donc effectivement plus faibles que pour les vecteurs sauvages, mais en moyenne d'un facteur 10 (compris entre 4,6 et 20,4). Les titres pris en compte dans cette moyenne ont d'ailleurs été calculés à partir du nombre de cellules GFP+ observées 72 après transduction, soit après plusieurs divisions cellulaires. Ce facteur de 10 peut donc être réduit. En effet, *in vivo* dans un contexte de cellules qui ne se divisent pas, un rapport d'environ 5 est observé entre les vecteurs IN<sub>WT</sub> et IN<sub>N</sub>. Le rapport que nous observons entre les vecteurs intégratifs et non-intégratifs est donc loin du facteur 80 rapporté par Naldini et coll. et qui demeure inexpliqué.

De façon comparable à ce que nous observons, les titres des vecteurs produits récemment par Yanez-Munoz et coll. portant la mutation D64V (identique à celle utilisée par Naldini et coll.) sont inférieurs d'un facteur 2 à ceux obtenus avec les vecteurs intégratifs (Yanez-Munoz *et al.*, 2006 ; résultats récapitulés dans le [Tableau 6](#)). Ce rapport de 2 suggère néanmoins que les vecteurs IN<sub>D64V</sub> sont plus efficaces que les vecteurs IN<sub>N</sub>, puisque ces derniers sont environ 5 à 10 fois moins efficaces que les vecteurs IN<sub>WT</sub>. Nous avons alors supposé que la mutation N pourrait induire plus qu'un défaut d'intégration.

Dans une seconde partie de nos travaux, nous avons donc entrepris une comparaison des deux vecteurs IN<sub>D64V</sub> et IN<sub>N</sub>. Nous avons également intégré à cette analyse des vecteurs portant la mutation LQ. Nous avons utilisé ces vecteurs IN<sub>LQ</sub> dans une série d'expériences préliminaires qui nous avait mené à la conclusion initiale que les vecteurs IN<sub>LQ</sub> étaient moins efficaces que les vecteurs IN<sub>N</sub>. Supposant que le défaut induit par la mutation LQ se situait au même niveau que celui induit par la mutation N, mais de façon plus prononcée, nous avons introduit les vecteurs IN<sub>LQ</sub> afin de faciliter la caractérisation du défaut induit par les mutations de la région C-terminale.

Les résultats obtenus nous ont permis de vérifier que les vecteurs IN<sub>D64V</sub> sont plus efficaces que les vecteurs IN<sub>N</sub>. Nous avons également établi que les vecteurs IN<sub>LQ</sub> sont plus efficaces que les vecteurs IN<sub>N</sub>. Ce résultat a été reproduit par plusieurs expériences indépendantes et avec des stocks de vecteurs produits indépendamment. Ce résultat est surprenant par rapport aux conclusions que nous avons tirées des expériences préliminaires (voir [chapitre Résultats 1.1.2 p105](#)). Toutefois, ces conclusions initiales reposaient sur le résultat d'expériences réalisées avec une production unique de vecteurs et non reproduites avec des stocks produits indépendamment. La confirmation de ces observations été apportée par leur cohérence avec les résultats de Petit et coll. (Petit *et al.*, 2000). Les auteurs avaient en effet suggéré un défaut de localisation nucléaire de

l'intégrase IN<sub>LQ</sub>, tandis que l'intégrase IN<sub>N</sub> présentait une répartition cellulaire indiscernable de celle de l'intégrase IN<sub>WT</sub>.

**Tableau 6 : Comparaison des titres de vecteurs produits en parallèle avec une intégrase sauvage (WT) ou mutée (D64V), d'après les résultats de Yanez-Munoz *et al*, 2006 ; titre « p24 » : déterminé par dosage par ELISA de la protéine de capsid p24 ; titre « TU » (unité de transduction) : déterminé par dilution limite pour les vecteurs exprimant la GFP, 72h après transduction (nd : non déterminé, le transgène n'est pas la GFP) ; titre « ADN » : déterminé par PCR quantitative sur cellules après transduction.**

				TU/ng p24		TU/ADN		ADN/ng p24	
	ng p24 /mL	TU/mL	ADN/mL		D64V/WT		D64V/WT		D64V/WT
D64V	57 400	7,00E+08	1,42E+10	1,22E+04	0,60	4,93E-02	0,88	2,47E+05	0,69
WT	46 800	9,50E+08	1,69E+10	2,03E+04		5,62E-02		3,61E+05	
D64V	38 400	5,50E+08	9,80E+09	1,43E+04	0,46	5,61E-02	0,48	2,55E+05	0,95
WT	36 600	1,15E+09	9,79E+09	3,14E+04		1,17E-01		2,67E+05	
D64V	101 100	7,50E+08	2,58E+10	7,42E+03	0,42	2,91E-02	0,71	2,55E+05	0,59
WT	70 500	1,25E+09	3,06E+10	1,77E+04		4,08E-02		4,34E+05	
D64V	101 800	6,50E+08	2,13E+10	6,39E+03	0,53	3,05E-02	0,54	2,09E+05	0,99
WT	54 100	6,50E+08	1,14E+10	1,20E+04		5,70E-02		2,11E+05	
D64V	99 200	nd	8,04E+09					8,10E+04	0,61
WT	61 000	nd	8,07E+09					1,32E+05	
D64V	92 100	nd	1,14E+10					1,24E+05	1,00
WT	62 900	nd	7,80E+09					1,24E+05	
				moyenne	0,50	moyenne	0,65	moyenne	0,81

À la lumière de ces nouveaux résultats, nous avons réanalysé les résultats préliminaires (voir Figure 15 p106 et Figure 16 p108). Ce que nous avons interprété comme un manque d'efficacité du vecteur IN<sub>LQ</sub> pourrait en fait s'expliquer par une erreur dans la titration des vecteurs (surestimation du titre du vecteur IN<sub>LQ</sub> par rapport au titre du vecteur IN<sub>N</sub>). Nous observons en effet une transduction moins efficace pour une quantité supposée équivalente d'unités de transduction. Cette différence avait été attribuée à un défaut induit par la mutation LQ, alors qu'elle était probablement due au fait que la quantité réelle de particules de vecteur IN<sub>LQ</sub> était inférieure à la quantité de particules IN<sub>N</sub>.

Nous avons également mis en évidence, au cours de ces expériences, un profil particulier du vecteur IN<sub>N</sub>. Nous avons observé un phénomène de saturation de la transduction : pour les doses élevées de vecteurs, la transduction n'est plus proportionnelle à la dose. En considérant ce profil particulier, nous avons réinterprété une des observations qui avait été faite lors de l'évaluation de la fréquence d'intégration des vecteurs IN<sub>N</sub> par rapport aux vecteurs IN<sub>WT</sub> (voir Figure 21 p115). Nous avons observé que le rapport N/WT diminuait en fonction de la dose. Ce résultat traduit effectivement une réduction du nombre d'événements d'intégration pour les doses les plus élevées



de vecteurs  $IN_N$ . Il ne doit toutefois pas conduire à la conclusion que l'évaluation qui a été faite de l'intégration résiduelle du vecteur  $IN_N$  tend à sous-estimer sa valeur réelle, mais être interprété comme étant la conséquence du défaut de saturation observé avec les vecteurs Luc dans la seconde partie des travaux.

L'observation du phénomène de saturation avec le vecteur  $IN_N$  et son manque d'efficacité par rapport aux autres vecteurs mutants suggère que la mutation N induit un défaut dans le cycle autre que l'inhibition de l'intégration. Ce phénomène de saturation n'a pas été observé avec les vecteurs  $IN_{LQ}$ . L'ensemble de ces résultats nous a conduit à réévaluer le statut des mutations  $IN_N$  et  $IN_{LQ}$  et leurs possibles répercussions sur le cycle viral.

## 1.2. Intégrase, import nucléaire et rétrotranscription

Les mutations d'intégrase peuvent avoir, nous l'avons vu précédemment, des répercussions sur de nombreuses étapes de la transduction. Deux phénomènes distincts sont à considérer. D'une part, l'intégrase est produite en tant que composant de la polyprotéine *pol*. Par ce biais, des mutations de l'intégrase altérant la structure de *pol* peuvent avoir des répercussions sur l'ensemble de la particule, notamment dès l'assemblage. D'autre part, l'intégrase elle-même est impliquée dans plusieurs autres étapes du cycle, notamment dans la rétrotranscription et dans l'import nucléaire. Que ce soit directement ou indirectement, des mutations de l'intégrase peuvent donc avoir des conséquences pléiotropiques, ces mutations sont dites de classe II, comme nous l'avons vu précédemment, tandis que les mutations affectant spécifiquement l'intégration sont dites de classe I.

Les descriptions initialement disponibles du phénotype induit par la modification de la région N, bien que peu nombreuses (Cannon *et al.*, 1996 ; Petit *et al.*, 2000), suggèrent un phénotype de classe I. C'est pourquoi cette mutation avait initialement été choisie. Par la suite, alors que nous avons supposé que la mutation LQ affectait plus sévèrement la transduction que la mutation N, les vecteurs  $IN_{LQ}$  se sont avérés plus efficaces que les vecteurs  $IN_N$  qui ont montré un profil de saturation particulier. Les répercussions de la modification des régions L et Q, pourtant fonctionnellement très proches de la région N, ne sont donc pas évidentes. À la lumière des résultats que nous avons obtenus, ainsi que de données supplémentaires publiées de la littérature, nous avons cependant été amenés à reconsidérer la nature des mutations N et LQ et leurs répercussions sur l'ensemble de la particule.

### 1.2.1. Implication de l'intégrase dans l'import nucléaire

La question de l'implication de l'intégrase dans l'import nucléaire est débattue depuis de nombreuses années et sujette à controverse. L'intégrase a tout d'abord été liée à l'import nucléaire

du CPI *via* une fonction *nls* attribuée à la région N, ainsi qu'aux autres motifs conservés du domaine C-terminal, L et Q. L'interaction de l'intégrase avec les karyophérines au niveau des régions L, Q et N a été démontrée (Gallay *et al.*, 1997) et la modification de ces motifs inhibe la réplication des virus (Cannon *et al.*, 1996). Toutefois, Petit et coll. ont montré que le défaut de réplication résulte de l'absence d'intégration et que toutes les étapes en amont, y compris l'import nucléaire, se déroulent correctement (Petit *et al.*, 2000). Ces résultats ont donc remis en question l'implication de l'intégrase dans l'import nucléaire.

Par la suite, un autre motif *nls* a été décrit dans le domaine central de la protéine (Bouyac-Bertoia *et al.*, 2001). Les auteurs ont produit des fusions de différents fragments de l'intégrase avec la pyruvate kinase, une protéine de 55kDa, de sorte à former un complexe qui ne peut diffuser de façon passive dans le noyau (la limite de diffusion passive au travers du pore nucléaire est de 50kDa). L'observation de la localisation cellulaire de ces protéines de fusion confirme l'absence de motif *nls* dans le domaine C-terminal, mais établit la présence d'un signal essentiel dans le domaine central, plus précisément au niveau des résidus 165 et 166. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Wiskerchen & Muesing qui avaient préalablement montré qu'une substitution R166A est délétère pour la réplication virale (Wiskerchen et Muesing, 1995). Par la suite, le groupe de A. Engelman a également observé un défaut d'import nucléaire des CPI dont l'intégrase est mutée pour les résidus 165 et 166 (Limon *et al.*, 2002). Ces résultats ont été reproduits par Armon-Omer et coll. (Armon-Omer *et al.*, 2004). Par ailleurs, des résultats publiés récemment ont mis en évidence que l'intégrase interagit avec un facteur cellulaire, le LEDGF, par l'intermédiaire des résidus 165 et 166 (Busschots *et al.*, 2007). Or ce facteur LEDGF est supposé être impliqué dans l'import nucléaire du CPI. Ainsi, le rôle de l'intégrase dans l'import nucléaire pourrait être indirect et résider dans cette interaction avec le facteur LEDGF.

En résumé, bien que le mécanisme ne soit pas clairement élucidé, ces observations attestent de l'implication de l'intégrase dans l'import nucléaire. D'autre part, ces données convergent vers une localisation des résidus importants dans le domaine central de l'enzyme et non dans son domaine C-terminal, où sont situées les régions L, Q et N.

### 1.2.2. Implication de l'intégrase dans la rétrotranscription

Un défaut de rétrotranscription est fréquemment décrit pour les mutants d'intégrase. Une région a initialement été supposée être impliquée dans cette étape : le domaine N-terminal et plus particulièrement le motif conservé HHCC (Masuda *et al.*, 1995 ; Wu *et al.*, 1999). Les répercussions des mutations de l'intégrase sur la rétrotranscription ne sont toutefois pas clairement élucidées : sont-elles la conséquence d'une déstabilisation de la polyprotéine *pol* ou traduisent-elles un rôle direct de l'intégrase dans cette réaction ?

Quelques données ont été apportées qui éclairent le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) l'intégrase est impliquée dans la rétrotranscription. Il a récemment été établi que l'intégrase et la

rétrotranscriptase sont toutes deux requises pour la maturation correcte des ARN génomiques viraux sous forme de dimère (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2002 ; Buxton *et al.*, 2005). Or, il avait déjà été démontré que la dimérisation de l'ARN génomique viral encapsidé est nécessaire à l'accomplissement de la rétrotranscription, plus particulièrement du premier saut de brin (Berkhout *et al.*, 1998). L'intégrase est donc liée à la rétrotranscription de façon indirecte par le biais de la maturation des génomes ARN.

D'autre part, un certain nombre de données se sont accumulées qui tendent à impliquer le domaine C-terminal de l'intégrase dans le rôle joué par la protéine dans la rétrotranscription. En particulier, la capacité de l'intégrase à se lier à la rétrotranscriptase de façon spécifique a été mise en évidence (Wu *et al.*, 1999). Cette interaction se fait *via* le domaine C-terminal de l'intégrase (Hehl *et al.*, 2004). Enfin, deux articles, portant sur l'étude des régions conservées du domaine C-terminal, les régions L, Q, C et N, établissent clairement un défaut de rétrotranscription des virus dont au moins deux résidus de ces motifs sont mutés (Ao *et al.*, 2005 ; Lu *et al.*, 2005a).

Prises dans leur ensemble, ces données nous permettent de proposer le modèle suivant. Dans un contexte normal, l'intégrase interagit avec la rétrotranscriptase. Ce complexe interagit lui-même avec les deux molécules ARN au sein de la capsid et favorise la structure en dimère mature. La rétrotranscription se déroule alors correctement. Au contraire, la mutation des régions L, Q et N de l'intégrase déstabilise l'interaction de la protéine avec la rétrotranscriptase, induisant ainsi une malformation du dimère d'ARN. En conséquence, la rétrotranscription des génomes non matures est bloquée au premier saut de brin.

### **1.2.3. Mutation N**

Les données de la littérature tendent donc à impliquer l'intégrase à la fois dans l'import nucléaire et dans la rétrotranscription, mais le domaine C-terminal semble plus particulièrement impliqué dans la rétrotranscription. Pourtant, le profil de saturation de la transduction que nous avons observé avec les vecteurs exprimant la Luciférase nous a conduit à émettre l'hypothèse d'un défaut d'import nucléaire. En effet, ce profil est tout à fait comparable au profil d'un vecteur lentiviral dépourvu de la séquence cPPT-CTS, déficient pour l'import nucléaire (Zennou *et al.*, 2000 ; Zennou *et al.*, 2001). Il sera donc nécessaire de réaliser de nouvelles expériences afin d'identifier plus précisément le défaut induit par la modification de la région N de l'intégrase.

Afin de tester l'hypothèse du défaut de rétrotranscription, il sera nécessaire de quantifier le nombre de génomes ADN synthétisés dans la cellule quelques heures après transduction. En ce qui concerne l'évaluation de l'import nucléaire, une méthode communément admise consiste en la quantification des jonctions LTR-LTR des cercles 2LTR. En effet, il est admis que les cercles 2LTR et 1LTR se forment spécifiquement dans le noyau. Cependant, cette méthode suppose que les mutations introduites n'affectent en rien la formation des cercles, en particulier le rapport 2LTR/1LTR, ce qui reste à démontrer. Il serait donc préférable de visualiser directement les CPI

au cours des premières heures après transduction, par exemple par l'incorporation (par fusion) de protéines fluorescentes ou par hybridation *in situ* fluorescente (FISH) sur le génome rétrotranscrit.

### 1.2.4. Mutation LQ

Les données publiées montrent que la modification des régions L et Q peut avoir des répercussions sur l'import nucléaire et/ou la rétrotranscription. Surtout, elles suggèrent que ces conséquences sont plus lourdes que celles de la modification de la région N. Pourtant, nous avons observé dans la seconde partie de notre étude que les vecteurs  $IN_{LQ}$  sont moins affectés que les vecteurs  $IN_N$ . L'efficacité de transduction des vecteurs  $IN_{LQ}$  est, en effet, plus proche de celui des vecteurs  $IN_{D64V}$ .

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette différence. Nous pouvons tout d'abord supposer que la fréquence d'intégration des vecteurs  $IN_{LQ}$  est supérieure à celle des vecteurs  $IN_N$ . En effet, les formes intégrées du génome lentiviral ont une activité transcriptionnelle plus élevée que les formes épisomales. Dès lors, si un même nombre de génomes ADN sont présents dans le noyau avec les vecteurs  $IN_N$  et  $IN_{LQ}$  mais qu'une proportion supérieure s'intègre avec le vecteur  $IN_{LQ}$ , l'expression du transgène est plus efficace. Cette hypothèse est peu probable dans la mesure où (1) nous avons observé une fréquence d'intégration équivalente pour les vecteurs  $IN_N$  et  $IN_{LQ}$ , et (2) cette hypothèse n'explique pas l'absence de phénomène de saturation observé avec le vecteur  $IN_{LQ}$ , dont le profil est proche de celui du vecteur  $IN_{D64V}$ .

Nous devons alors remettre en question les données publiées et supposer que la mutation de la région N a de plus larges répercussions sur la transduction que la mutation LQ. Toutefois, les vecteurs  $IN_N$  et  $IN_{LQ}$ , qui ont été comparés dans la seconde partie des travaux, ne diffèrent pas que par la mutation de l'intégrase. En effet, dans le vecteur  $IN_{LQ}$ , l'intégrase est fusionnée au peptide HA. De plus, le plasmide vecteur utilisé contient la séquence complète du gène *vif*. Comme nous l'avons expliqué précédemment, cette séquence n'est pas active puisque le peptide HA a été introduit dans la région 3' de la séquence de l'intégrase qui correspond à la région 5' de la séquence de *vif*. La séquence HA introduit également un codon *stop* en phase avec le cadre de lecture du *vif*. La protéine *vif* n'est donc, théoriquement, pas synthétisée (voir [Figure 12 p90](#)). Cependant, quelques nucléotides en aval du codon *stop*, la séquence de *vif* contient un second codon *start*. Il n'est donc pas totalement exclu qu'une forme tronquée de la protéine *vif* soit synthétisée lors de la production des vecteurs  $IN_{LQ}$ -HA. Il sera nécessaire de comparer les vecteurs  $IN_N$ -HA,  $IN_N$ ,  $IN_{LQ}$ -HA et  $IN_{LQ}$  avant de remettre en question les données publiées et conclure à une différence entre les deux mutations.

### 1.3. Intégrase, *att* et intégration

Nous avons évalué, dans la première partie de notre étude, la fréquence d'intégration des vecteurs  $IN_N$ . Cette fréquence est faible, inférieure de 2 à 3 log à la fréquence d'un vecteur intégratif, toutefois supérieure à celle qui a été rapportée concernant des virus modifiés dans le site catalytique de l'intégrase. Cette évaluation a été réalisée par différentes équipes et par différentes méthodes, incluant la sélection de colonies résistantes à la guanine hypoxanthine phosphoribosyl transférase (gpt) (Wiskerchen et Muesing, 1995) ou résistantes à l'hygromycine (Leavitt *et al.*, 1996 ; Gaur et Leavitt, 1998). Ces études s'accordent sur une intégration résiduelle réduite de 3 à 4 log par rapport à l'intégration d'un virus sauvage.

Des résultats comparables ont été obtenus plus récemment par deux groupes avec des vecteurs lentiviraux non-intégratifs. Tout d'abord, le groupe de Yanez-Munoz et coll. a utilisé des vecteurs lentiviraux  $IN_{D64V}$  (Yanez-Munoz *et al.*, 2006). Les auteurs n'ont pas précisément évalué l'intégration de ces vecteurs. Ils ont toutefois analysé par la méthode de LAM-PCR des tissus après injection des vecteurs mutants ou contrôles. Ils rapportent l'identification d'un événement d'intégration pour 815 réactions pour le vecteur  $IN_{D64V}$ . Dans les mêmes conditions, ils ont pu identifier 109 événements d'intégration pour 512 réactions pour le vecteur  $IN_{WT}$ . La fréquence d'intégration du vecteur  $IN_{D64V}$  peut ainsi être estimée à  $5,8 \cdot 10^{-3}$  de la fréquence d'intégration du vecteur  $IN_{WT}$ . Ce résultat est donc cohérent avec les publications antérieures.

Parallèlement, Nightingale et coll. ont évalué la fréquence d'intégration de différents vecteurs mutants par sélection de colonies résistantes au G418 (Nightingale *et al.*, 2006). Les vecteurs utilisés portaient une intégrase mutée  $IN_{D64V}$  ou sauvage  $IN_{WT}$ , combinée ou non avec une modification des séquences *att* des LTR. La fréquence d'intégration des vecteurs mutants est comprise entre  $1/1\ 000^e$  et  $1/10\ 000^e$  de la fréquence d'intégration d'un vecteur contrôle. L'effet de la modification des LTR est équivalent à celui de la mutation D64V de l'intégrase et la combinaison de ces deux mutations ne réduit pas la fréquence d'intégration. Les auteurs ont également analysé les provirus dans les clones résistants au G418. Ils n'ont pas été en mesure d'identifier la signature caractéristique d'une activité catalytique de l'intégrase.

En considérant ces données, nous avons supposé que l'activité résiduelle de l'intégrase  $IN_N$  est supérieure à celle de l'intégrase  $IN_{D64V}$ . Un autre argument permettait d'étayer cette hypothèse : la mise en évidence d'un événement d'intégration qui suggère une activité catalytique de l'intégrase. La différence entre nos résultats et les résultats obtenus avec des vecteurs et des virus  $IN_{D64V}$  tenait donc probablement au fait que l'intégrase  $IN_N$  conserve une partie de son activité catalytique alors qu'elle est totalement abolie par la mutation D64V.

Dans le but de réduire cette activité, nous avons combiné la mutation N avec la modification des séquences *att* des LTR. Nous avons évalué la fréquence d'intégration de ces vecteurs,

parallèlement avec des vecteurs portant une intégrase  $IN_{D64V}$ ,  $IN_{LQ}$  ou  $IN_{WT}$ , combinée ou non avec une modification des LTR. Les résultats obtenus sont surprenants à plus d'un titre.

En premier lieu, l'efficacité d'intégration des vecteurs  $IN_{D64V}$  que nous avons observée est beaucoup plus élevée que celle rapportée dans la littérature, elle est aussi plus élevée que celle des vecteurs  $IN_N$  et  $IN_{LQ}$ . En effet, la fréquence d'intégration des vecteurs  $IN_{D64V}$  n'est réduite que d'un facteur 30 environ par rapport à l'intégration d'un vecteur  $IN_{WT}$ , tandis qu'elle est réduite d'un facteur 150 à 200 pour les vecteurs  $IN_N$  et  $IN_{LQ}$ . Dans une expérience indépendante (données non présentées), nous avons observé une réduction d'un facteur 100 environ pour les vecteurs  $IN_{D64V}$  et 1 000 pour les vecteurs  $IN_N$  et  $IN_{LQ}$ . Comme mentionné précédemment, l'évaluation du vecteur  $IN_N$  est à considérer avec précaution dans la mesure où cette mutation entraîne probablement une réduction du nombre de génomes ADN dans le noyau des cellules transduites par rapport à une quantité équivalente en p24 des vecteurs  $IN_{WT}$  ou  $IN_{D64V}$ . Toutefois, aucun défaut comparable n'a été mis en évidence concernant le vecteur  $IN_{LQ}$ . La fréquence d'intégration de ce vecteur est donc effectivement inférieure d'un facteur 10 à celle du vecteur  $IN_{D64V}$ .

En outre, nous n'avons observé qu'un effet très modéré de la modification des séquences *att*, quelle que soit l'intégrase considérée. Ceci est surprenant pour plusieurs raisons : (1) nous ne reproduisons pas l'effet observé par Nightingale et coll. avec l'intégrase  $IN_{WT}$  ; (2) nous n'avons pas aboli l'activité catalytique résiduelle supposée de l'intégrase  $IN_N$  ; (3) l'activité des vecteurs  $IN_{D64V}$  *att*- reste supérieure à celle des vecteurs  $IN_{LQ}$  et  $IN_N$ .

L'ensemble de ces résultats suggèrent ainsi que la réduction de la fréquence d'intégration résiduelle sera limitée si elle se restreint à la modification des déterminants « classiques » de l'intégration, c'est-à-dire l'intégrase et les séquences *att*.

## 1.4. Perspectives d'amélioration

Un des objectifs de l'amélioration des vecteurs lentiviraux non-intégratifs est la réduction de l'intégration tout en minimisant les répercussions sur les différentes étapes de la transduction. Dans cette perspective, l'intégration des vecteurs lentiviraux ne peut se résumer à une réaction faisant intervenir le génome vecteur et l'intégrase. Il est au contraire nécessaire d'inscrire ce processus, et les différents éléments intervenants, à la fois dans le contexte de la particule virale et dans celui de la cellule. Par son rôle central dans la particule, l'intégrase est difficilement modifiable sans autre altération sur la transduction que le blocage de l'intégration. Le choix de la mutation est donc primordial pour le développement d'un vecteur lentiviral non-intégratif puisqu'il définit en grande partie l'efficacité globale du vecteur ainsi que l'activité résiduelle d'intégration.

Nous avons démontré que l'utilisation de la mutation D64V du site catalytique, et probablement de la mutation LQ, permet d'améliorer les performances des vecteurs lentiviraux non-intégratifs,

en termes d'expression du transgène par rapport aux vecteurs IN<sub>N</sub>, vraisemblablement en palliant le défaut induit par la mutation N. Les génomes non intégrés sont toutefois moins efficacement transcrits que leurs équivalents intégrés et la fréquence d'intégration résiduelle que nous avons observée n'a pu être réduite par la combinaison des mutations d'intégrase aux mutations des *att*. Ces limites d'expression et d'intégration peuvent-elles être repoussées ? Quelles sont les possibilités d'amélioration des vecteurs lentiviraux non-intégratifs ?

Nous avons tenté d'améliorer l'efficacité d'expression du transgène par l'ajout de séquences d'attachement à la matrice (MAR) au vecteur. Cette approche se fondait sur l'hypothèse que les formes épisomales nucléaires ne sont peut-être pas localisées dans les compartiments nucléaires les plus propices à la transcription. En ajoutant les séquences d'attachement à la matrice, il s'agissait donc de relocaliser les cercles dans un environnement favorable à la transcription. Cette approche n'a cependant pas eu de succès.

L'hypothèse du défaut de localisation nucléaire est néanmoins vraisemblable et étayée par différents résultats. Par exemple, les travaux récemment présentés par Akita et coll. montrent qu'un transgène apporté dans une cellule par un vecteur adénoviral est beaucoup plus efficacement transcrit qu'un transgène apporté par transfection à la lipofectamine (résultats présentés par Akita *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007). Bien que le nombre de copies dans le noyau de la cellule soit beaucoup plus important par transfection (rapport d'environ 10<sup>4</sup>), le niveau d'expression obtenu est comparable avec les deux méthodes. Une analyse par FISH de la localisation nucléaire de l'ADN exogène révèle une répartition tout à fait distincte pour les deux méthodes de vectorisation. Il est donc tentant d'expliquer la différence d'efficacité de transcription par une répartition nucléaire différente. Une analyse similaire de la localisation des génomes lentiviraux épisomaux après transduction, en particulier la localisation des différentes formes linéaires, cercles 1LTR et 2LTR permettrait de tester cette hypothèse.

Par ailleurs, des résultats obtenus à partir de formes d'ADN mimant les différentes formes épisomales du génome lentiviral suggèrent qu'elles ne sont pas toutes aussi efficaces pour l'expression d'un transgène (Cara *et al.*, 1996). Il est également probable qu'elles n'ont pas une stabilité équivalente. On peut en effet supposer que les formes linéaires sont moins stables que les formes circulaires. Une capacité pro-apoptotique a, par ailleurs, été attribuée aux extrémités double-brins des formes linéaires (Li *et al.*, 2002).

De même, les mécanismes permettant la formation des différentes formes du génome et les proportions dans lesquelles elles sont formées ne sont pas clairement identifiés. Plus particulièrement, l'influence des mutations de l'intégrase, ou d'autres éléments, tels que les séquences *att*, sur ces paramètres est peu connue. Des résultats récents suggèrent par exemple que des vecteurs portant une mutation dans une des séquences *att* permettent une expression du transgène plus importante que des vecteurs mutants pour l'intégrase (résultats présentés par Joseph *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007). La

démonstration du phénotype non-intégratif de ces vecteurs n'est pas totalement convaincante, ni en accord avec les résultats antérieurs (Masuda *et al.*, 1995 ; Nightingale *et al.*, 2006). Mais de façon intéressante, les auteurs établissent une influence de la mutation sur le rapport cercles 1LTR/2LTR : la mutation de la séquence *att* défavorise la formation de cercles 2LTR par rapport aux autres mutations considérées, affectant le site catalytique. Il est également important de noter que l'intégrase et les séquences *att* ne sont pas les seuls éléments impliqués dans les processus d'intégration et de circularisation. En effet, la modification d'autres facteurs, notamment de MA, peut induire une totale absence de cercles combinée avec un défaut d'intégration (Mannioui *et al.*, 2005).

Ces résultats soulignent les zones d'ombre qui persistent autour des processus d'intégration et de circularisation et des facteurs impliqués. L'analyse de la stabilité et de la permissivité transcriptionnelle des différentes formes épisomales d'une part, et d'autre part la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la formation de ces différentes formes épisomales, ouvriront de nouvelles pistes d'optimisation des vecteurs lentiviraux, intégratifs autant que non-intégratifs.



## 2. COMPRENDRE LES PHASES PRECOCES DU CYCLE VIRAL

Il est classiquement admis aujourd'hui que le génome rétrotranscrit est produit sous forme linéaire. Au cours de la réaction d'intégration, les extrémités franches de cette molécule sont modifiées par l'intégrase qui élimine deux nucléotides des extrémités 3' OH et génère ainsi des extrémités cohésives. Le CPI contenant ce génome parvient au noyau et le génome peut alors être intégré dans la chromatine de la cellule ou être circularisé, par différents mécanismes. Les formes circulaires ne sont supposées se former que dans le compartiment nucléaire, elles sont considérées comme marqueur de l'import nucléaire (Shank et Varmus, 1978 ; Brown *et al.*, 1987 ; Bukrinsky *et al.*, 1991). La possibilité qu'elles soient les précurseurs des formes intégrées a été évaluée (Panganiban et Temin, 1984 ; Fujiwara Mizuuchi, 1988), et rejetée. Il a en effet été confirmé que le substrat à l'intégration est la forme linéaire (Brown *et al.*, 1987 ; Brown *et al.*, 1989 ; Zack *et al.*, 1990 ; Zack *et al.*, 1992) et que les formes circulaires retrouvées dans le noyau ne sont que les formes abortives de cette réaction. Il est également admis que deux éléments sont nécessaires et suffisants à cette réaction : l'intégrase rétrovirale et les séquences d'attachement reconnues à chaque extrémité du génome ADN viral. Toutefois, certaines observations, présentées ci-dessous, viennent à l'encontre de ce schéma classique.

### 2.1. Les acteurs de l'intégration

Il est classiquement admis que l'intégrase et les LTR sont les deux éléments nécessaires à l'intégration. Or, ce qui est vrai *in vitro* ne se vérifie pas forcément dans le contexte cellulaire. En effet, d'autres facteurs, tant cellulaires que viraux, ont une influence majeure sur l'intégration. Tout d'abord, d'autres éléments viraux sont impliqués dans l'intégration, notamment Matrice pour le HIV (Mannioui *et al.*, 2005) ou la protéine p12 de *gag* pour le MLV (Yuan *et al.*, 2002 ; Yueh et Goff, 2003). Ces articles décrivent des mutations de Matrice et p12 qui induisent un blocage du cycle entre l'import nucléaire et l'intégration. Des facteurs cellulaires sont également nécessaires à cette réaction d'intégration, comme la protéine LEDGF (Maertens *et al.*, 2003 ; Llano *et al.*, 2004 ; Emiliani *et al.*, 2005). Par ailleurs, Bruce et coll. ont récemment décrit plusieurs lignées cellulaires, obtenues par mutagenèse chimique, dans lesquelles la réplication du MLV est restreinte spécifiquement entre l'import nucléaire et l'intégration (Bruce *et al.*, 2005). Ce résultat traduit probablement l'implication de certains facteurs cellulaires, qui n'ont pas été identifiés, entre ces deux étapes du cycle viral.

Certains facteurs peuvent également intervenir de façon négative et bloquer la réaction d'intégration, comme le facteur de restriction de l'infection MLV Fv1, qui bloque le cycle viral entre l'import nucléaire et l'intégration (Pryciak et Varmus, 1992). Le facteur TRIM $\alpha$ 5 pourrait agir de façon comparable sur le HIV (Wu *et al.*, 2006), en plus de son effet sur la rétrotranscription. Des « facteurs négatifs » similaires sont probablement impliqués dans la restriction de l'infection dans les lymphocytes quiescents. Il a été établi récemment, pour un foamy virus, que la restriction se traduit par une séquestration de la particule au niveau du nucléole (Lehmann-Che *et al.*, 2007). Stevenson et coll. ont toutefois fait état de la présence de génomes ADN dans le noyau de cellules CD4+ quiescentes après infection avec le HIV. Ces formes conservent la capacité de s'intégrer si les cellules sont activées (Stevenson *et al.*, 1990b). Ces observations sont corroborées par les résultats de Pierson et coll. qui observent également que les génomes latents dans le noyau sont sous forme linéaire modifiée par l'intégrase (Pierson *et al.*, 2002b). La restriction pourrait donc intervenir à deux niveaux : pendant la progression vers le noyau et entre l'import nucléaire et l'intégration.

L'identification précise des facteurs intervenant dans l'intégration et/ou la circularisation permettra une optimisation des vecteurs lentiviraux non-intégratifs en termes d'activité résiduelle d'intégration tout en minimisant les répercussions sur les autres étapes de la transduction.

## **2.2. « Prédestination » des CPI ?**

Il est surprenant de noter que les mécanismes qui régissent la formation des cercles ne sont pas connus. Il est classiquement admis que les formes épisomales du génome lentiviral sont les produits abortifs de la réaction d'intégration. Le génome importé dans le noyau s'intègre, ou à défaut est circularisé. Il est vrai que pour certaines mutations d'intégrase, on observe une réduction des formes intégrées au profit des formes circulaires. Pourtant un certain nombre de données tendent à prouver que la circularisation n'est pas l'alternative systématique à l'intégration. Tout d'abord, les formes circulaires ne représentent pas la majorité des formes épisomales. D'autre part, il est possible d'observer, dans certaines conditions, un défaut de circularisation conjointement à un défaut d'intégration (Yuan *et al.*, 2002 ; Mannioui *et al.*, 2005). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la circularisation sont connus : les formes 1LTR sont générées par recombinaison homologue et les formes 2LTR par NHEJ (Li *et al.*, 2001), mais les événements qui orientent le génome vers l'un ou l'autre de ces « destins » possibles restent à élucider.

Li et coll. suggèrent que la formation des cercles 2LTR, qui implique les protéines de réparation de l'ADN (qui interviennent dans la cellule en cas de coupure double brin) permettrait le masquage des signaux apoptotiques que représentent les extrémités double-brins du génome linéaire (Li *et al.*, 2002). Ils soulèvent toutefois le fait que les cercles 2LTR ne représentent qu'une

faible proportion des génomes, la majorité demeurant sous forme linéaire. Ceci pourrait traduire le fait que seule une faible proportion des extrémités des génomes linéaires est « visible » par la cellule.

Cette proportion pourrait correspondre aux génomes qui présentent trop de défauts pour être intégrés. En effet, une partie des jonctions LTR-LTR décrites résulte de la ligation entre deux extrémités qui n'ont pas été modifiées par l'intégrase (sans la délétion des deux bases aux extrémités 3'OH). Le reste des jonctions LTR-LTR présente fréquemment des défauts. Dans certains cas, une séquence additionnelle est insérée entre les LTR, résultant d'une duplication anormale, ou correspondant à un reste d'ARN de transfert, qui permet l'initiation de la rétrotranscription. Dans d'autres cas, les jonctions présentent des délétions, depuis l'extrémité 3' de la région U5 et/ou l'extrémité 5' de la région U3, qui traduisent des défauts d'initiation de la transcription et/ou une activité exonucléasique (Ju et Skalka, 1980 ; Kulkosky *et al.*, 1990 ; Hong *et al.*, 1991 ; Jurriaans *et al.*, 1992 ; Randolph et Champoux, 1993 ; Cara *et al.*, 2002). En résumé, les formes circulaires 2LTR semblent être majoritairement, sinon exclusivement, issues de molécules linéaires non fonctionnelles pour l'intégration tandis que peu/aucune des formes linéaires correctes (dont les extrémités ont été modifiées par l'intégrase) ne semblent être circularisées. Nous pouvons ainsi supposer que les molécules inaptées à l'intégration font partie d'un complexe nucléoprotéique moins structuré qui les rend plus « visibles » pour la cellule. Celle-ci les oriente alors vers la circularisation. Parallèlement, les formes linéaires aptes à l'intégration sont « invisibles », protégées au sein d'un complexe nucléoprotéique compact.

Par ailleurs, certaines données montrent que, dans le noyau, les cercles 2LTR sont associés à des complexes nucléoprotéiques particuliers (Pryciak et Varmus, 1992) qui ne sont pas immunoprécipités par des anticorps anti-IN ou anti-MA (Bukrinsky *et al.*, 1993), alors que le CPI contient ces deux protéines. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec un article présenté par l'équipe de F. Bushman en 2002 (Butler *et al.*, 2002) dont les résultats pourraient être interprétés comme l'existence de différents complexes présentant une susceptibilité particulière à la dégradation par le protéasome. Schwartz et coll. avaient précédemment établi que le protéasome constitue un mécanisme de défense précoce de la cellule contre l'infection HIV et que son inhibition induit une augmentation de la synthèse d'ADN viral et par conséquent une augmentation de l'efficacité d'infection (Schwartz *et al.*, 1998). Par la suite, Butler et coll. ont caractérisé plus précisément le devenir des ADN viraux synthétisés en présence d'un inhibiteur du protéasome et ont montré un effet positif sur la formation des cercles 2LTR, mais sans augmentation de la quantité de provirus intégrés (Butler *et al.*, 2002). Ces observations pourraient donc traduire le fait que les différentes formes d'ADN génomique (intégrée ou circulaire), et/ou leur précurseur, sont incluses dans des complexes qui présentent une sensibilité différente à la dégradation par le protéasome.

Parallèlement, certaines données récentes ont conduit à reconsidérer le fait que les jonctions LTR-LTR sont exclusivement nucléaires. En effet, les jonctions LTR-LTR étaient classiquement

considérées comme le signe de l'import nucléaire du CPI, puisque celles-ci ne se forment que dans le noyau (Shank et Varmus, 1978 ; Brown *et al.*, 1987) ; réciproquement, si l'import nucléaire est correct, il était admis que ces jonctions sont observées puisqu'une partie des génomes linéaires est forcément circularisée. Ces deux points sont actuellement remis en question.

Tout d'abord, l'import nucléaire n'implique pas systématiquement la circularisation. En effet, nous avons vu précédemment que, dans certaines conditions, un défaut peut intervenir dans le cycle viral entre l'import nucléaire et l'intégration et s'accompagner d'un défaut de circularisation (Pryciak et Varmus, 1992 ; Pierson *et al.*, 2002b ; Yuan *et al.*, 2002 ; Yueh et Goff, 2003 ; Mannioui *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2006). Ainsi, si la détection de jonction LTR-LTR traduit un import nucléaire correct, la réciproque n'est pas toujours vraie et l'absence de jonction LTR-LTR ne doit pas être interprétée comme un défaut d'import nucléaire.

Par ailleurs, différentes études ont rapporté récemment la détection de jonctions LTR-LTR dans le cytoplasme à des temps très précoces après infection avec le MLV (Serhan *et al.*, 2004) et avec des spumavirus (Delelis *et al.*, 2003 ; Delelis *et al.*, 2005). De plus, Serhan et coll. montrent qu'un traitement à la protéase est requis pour la détection de ces jonctions dans le cytoplasme. La nécessité du traitement à la protéase est un argument supplémentaire en faveur de l'existence de complexes « prédestinés » à l'intégration ou à la circularisation.

Tous ces éléments demandent à être confirmés, mais soulèvent plusieurs questions relatives à la formation des cercles. En d'autres termes, le schéma classiquement admis - selon lequel la forme linéaire issue de la rétrotranscription entre dans le noyau pour être prise en charge par l'intégrase et être intégrée à la chromatine, ou à défaut prise en charge par des facteurs cellulaires pour être circularisée – ne correspond-il pas à la simplification d'une réalité plus complexe ? Les données présentées dans ce chapitre pourraient, en effet, être interprétées comme une « prédestination précoce » du complexe nucléoprotéique incluant le génome viral, c'est-à-dire l'existence de complexes de pré-intégration et de « complexes de pré-circularisation ». Si ce modèle est vérifié, la compréhension fine des étapes précoces du cycle réplcatif des rétrovirus offrirait la possibilité d'orienter les génomes épisomaux vers la/les formes les plus permissives à la transcription et permettra d'améliorer les performances des vecteurs lentiviraux non-intégratifs. De même, ces informations pourront ouvrir de nouvelles voies pour l'optimisation des vecteurs lentiviraux intégratifs classiques en privilégiant les complexes de pré-intégration par rapport aux « complexes de pré-circularisation ».

## 3. AVENIR DES VECTEURS

### LENTIVIRAUX NON-INTEGRATIFS

#### 3.1. ... et vecteurs AAV

Un des arguments qui peut être opposé à nos travaux est « pourquoi développer des vecteurs lentiviraux non-intégratifs quand les vecteurs AAV existent ? ». Comme nous l'avons vu dans l'introduction (voir [chapitre 2.1.1 p54](#)), deux points majeurs sont à considérer en vue de l'application des vecteurs AAV chez l'Homme : l'immunité préexistante et le risque de génotoxicité. Le problème de l'immunité est reconnu, il peut limiter l'efficacité du traitement, mais il est surmontable par l'utilisation de nouveaux sérotypes. Toutefois, le risque de génotoxicité reste largement ignoré et aujourd'hui encore, l'intégration des vecteurs AAV n'est pas prise en considération. Pourtant, les vecteurs AAV, tout comme les vecteurs lentiviraux non-intégratifs, ne sont pas totalement dépourvus de capacité d'intégration. La comparaison entre leurs fréquences d'intégration respectives n'est pas aisée, en particulier du fait de la difficulté de comparer des doses de vecteurs lentiviraux et AAV. Il sera nécessaire de mener une étude parallèle de ces deux vecteurs et de déterminer leur fréquence d'intégration respective. Deux études, portant sur chacun de ces vecteurs, peuvent être citées.

L'intégration de vecteurs AAV a été évaluée dans les cellules souches hématopoïétiques par Zhong et coll. (Zhong *et al.*, 2006). Ces cellules sont particulièrement peu permissives à la transduction par les vecteurs AAV. Différents facteurs limitants ont été identifiés, comme le faible niveau d'expression de récepteurs particuliers à la surface de ces cellules (voir Zhong *et al.*, 2006 pour revue). Les auteurs ont tout d'abord transduit des cellules souches hématopoïétiques *in vitro* et évalué le pourcentage de cellules GFP+ après 7 jours de culture. Dans les conditions optimales, le pourcentage de cellules GFP+ est d'environ 25%. Ces mêmes cellules ont ensuite été greffées chez des souris létalement irradiées. Après 6 mois, environ 8% des cellules hématopoïétiques expriment toujours la GFP. Les résultats sont comparables 6 mois après greffe dans un receveur secondaire.

Parallèlement, l'intégration des vecteurs lentiviraux IN<sub>D64V</sub> et modifiés dans les séquences *att* des LTR a été évaluée dans des cellules souches hématopoïétiques par Nightingale et coll. (Nightingale *et al.*, 2006). Les cellules ont été transduites et maintenues en culture pendant plus de 30 jours et le pourcentage de cellules GFP+ a été régulièrement évalué. Quatre jours après transduction, plus de 90% de cellules expriment la GFP. Après 7 jours de culture, le pourcentage de cellules GFP+ est comparable à celui observé au même moment dans les cellules transduites

avec le vecteur AAV (environ 20%). Après 30 jours de culture, moins de 0,1% des cellules expriment encore la GFP.

Ces résultats suggèrent donc que, dans les cellules souches hématopoïétiques, l'intégration des vecteurs AAV est environ 100 fois plus fréquente que celle des vecteurs lentiviraux non-intégratifs. Cette conclusion est toutefois à considérer avec précautions dans la mesure où ces études n'ont pas été menées dans les mêmes conditions (*in vitro/in vivo*, cellules sélectionnées sur des marqueurs différents, *etc*). De plus, l'intégration des vecteurs AAV est probablement favorisée dans le contexte des cellules souches hématopoïétiques qui se divisent. Une étude comparative des deux types de vecteurs, dans différents types cellulaires, est donc nécessaire.

### 3.2. ... sous forme de vecteurs épisomaux

Les vecteurs lentiviraux non-intégratifs représentent une avancée considérable en termes de biosécurité puisqu'ils apportent une solution au problème de mutagenèse insertionnelle. Nous avons démontré qu'ils permettent l'expression efficace d'un transgène en absence d'intégration du génome dans la chromatine de la cellule transduite. Le génome vecteur étant épisomal, la persistance de l'expression est liée à la division cellulaire. Deux types d'application peuvent ainsi être envisagés, visant soit l'expression transitoire d'un facteur dans des cellules en division soit son expression stable dans des cellules en arrêt de division.

Depuis que les preuves de principe ont été apportées, l'usage des vecteurs lentiviraux déficients pour l'intégration se répand progressivement. Leur efficacité et leur stabilité ont été démontrées par divers groupes dans plusieurs tissus : le foie (résultats présentés par Bayer *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007), la rétine (Yanez-Munoz *et al.*, 2006 ; chapitre Résultats 2.2.2 p122), dans différentes structures du cerveau (Philippe *et al.*, 2006 ; Yanez-Munoz *et al.*, 2006 ; résultats présentés par Yanez-Munoz *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007), ainsi que dans le muscle (résultats présentés par Yanez-Munoz *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007 ; voir Philpott et Thrasher, 2007). De plus, après injection dans le muscle, il est possible de déclencher une réaction d'immunisation, les vecteurs lentiviraux non-intégratifs sont donc des outils de choix pour la vaccination (Negri *et al.*, 2007).

Les vecteurs lentiviraux non-intégratifs peuvent également être utilisés pour apporter transitoirement certains facteurs dans les cellules souches hématopoïétiques permettant d'induire ou d'orienter la différenciation cellulaire, comme proposé par Nightingale et coll. (Nightingale *et al.*, 2006). Par exemple, il a été démontré que l'amélioration de la greffe de cellules souches hématopoïétiques peut être obtenue par surexpression d'une forme particulière du récepteur CXCR4, impliqué dans la colonisation de la moelle osseuse (*homing*). L'expression permanente de ce facteur dans le système hématopoïétique est délétère, puisqu'elle induit un déficit

immunitaire (le syndrome WHIM, pour *warts, hypogamma globulinemia, recurrent infection and myelokathexis*). Les vecteurs lentiviraux non-intégratifs sont donc particulièrement adaptés à cette stratégie puisqu'ils permettent l'expression transitoire du facteur (stratégie proposée par Kawai *et al.* au 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007).

Pour un certain nombre d'applications nécessitant l'expression stable d'un transgène dans des cellules en division, les vecteurs lentiviraux non-intégratifs ne pourront être utilisés en l'état. Différentes modifications des vecteurs peuvent alors être envisagées pour maintenir le génome au cours des divisions cellulaires et permettre une expression stable du transgène.

Une première approche se fonde sur l'induction de la réplication du génome, comme proposé par Vargas *et coll* avec système SV40 (Vargas *et al.*, 2004). Les auteurs ont introduit dans le vecteur l'origine de réplication du SV40, l'expression de l'antigène T permet la réplication de l'épisome et la persistance de l'expression du transgène malgré la division cellulaire. Ce système n'est toutefois pas envisageable pour une application clinique du fait de l'immunogénicité de l'antigène T. D'autres approches permettent d'induire la réplication d'un épisome dans les cellules de mammifère indépendamment de facteurs protéiques tels que l'antigène T, en particulier le système pEPI. Le plasmide pEPI contient une séquence MAR qui permet sa réplication dans les cellules en division (Jenke *et al.*, 2002). Le plasmide est maintenu à l'état épisomal et répliqué simultanément à la chromatine cellulaire (Schaarschmidt *et al.*, 2004). Il a été utilisé pour l'expression d'un transgène dans des cellules souches hématopoïétiques (Papapetrou *et al.*, 2006) et a également permis de générer un porc transgénique (Manzini *et al.*, 2006). Ce système est particulièrement séduisant, puisqu'il est totalement dépourvu d'activité d'intégration (en dehors des événements de recombinaison illégitime qui se produisent en présence d'une molécule extrachromosomique, quelle qu'elle soit, dans le noyau d'une cellule) et non-immunogène. Il est toutefois encore peu étudié. Il faudrait vérifier si la séquence MAR, qui semble être le seul élément du plasmide responsable de la réplication, conserve son activité au sein d'un vecteur lentiviral non-intégratif.

Une deuxième approche permettant de maintenir l'expression d'un transgène au cours des divisions cellulaires vise à intégrer le génome épisomale dans la chromatine de façon site-spécifique. Ces stratégies sont décrites dans le chapitre suivant.

### 3.3. ... sous forme de vecteurs à intégration ciblée

Nous avons abordé, dans l'introduction, plusieurs points permettant de réduire et/ou de contrôler le potentiel génotoxique des vecteurs rétroviraux. Parmi ces approches, les plus séduisantes, mais aussi les plus complexes à mettre en œuvre, ont pour but de modifier le profil d'intégration de ces vecteurs ou idéalement de réduire l'intégration à un site unique choisi. L'intégration site-spécifique représente depuis toujours un défi en matière de transfert de gènes, réalisable

aujourd'hui par le biais de la recombinaison homologue, c'est-à-dire dans des conditions extrêmement restreintes et avec une efficacité relativement faible.

Plusieurs stratégies émergentes sont toutefois très prometteuses. L'une d'entre elles repose sur l'utilisation de nucléases fusionnées à des protéines à doigt de zinc reconnaissant une séquence nucléotidique particulière (ZFN pour *zinc finger nuclease*); une autre tire profit des recombinases de phage, elles aussi site-spécifiques. Citons également les transposons, tels que *Sleeping Beauty*, dont l'intégration, naturellement aléatoire, peut être orientée par le biais de fusion avec des domaines protéiques de liaison à l'ADN site-spécifique. Ces systèmes constituent des outils particulièrement utiles pour le transfert de gènes, que ce soit pour accroître la sécurité d'une thérapie génique, mais aussi pour la production d'animaux transgéniques. Leur potentiel peut également être accru par leur combinaison à des vecteurs viraux, notamment à une plateforme de vecteurs lentiviraux non-intégratifs.

### 3.3.1. ZFN

Dans le cas de coupure double brin de la chromatine, différents mécanismes de réparation sont activés dans la cellule. La cassure peut être réparée par la voie de *non homologous end joining* (NHEJ), de façon aléatoire en introduisant des délétions ou des insertions d'un ou plusieurs nucléotides. En présence d'une séquence homologue à la région coupée, la réparation peut se faire par le mécanisme de recombinaison homologue. Différentes approches tirent avantage de ces mécanismes en induisant des cassures double-brins dans la chromatine à l'aide de nucléases afin d'augmenter la fréquence de recombinaison homologue (voir Carroll *et al.*, 2004 pour revue). Parmi les nucléases qui peuvent être utilisées, citons les méganucléases naturelles, telles que la méganucléase de levure I-Sce-I (voir Pâques et Duchateau, 2007 pour revue). Un des systèmes les plus prometteurs, à l'heure actuelle, a été développé à partir de la fusion d'une nucléase (FokI) à une protéine à doigt de zinc (ZFP) qui reconnaît un motif nucléique donné (voir Durai *et al.*, 2005 pour revue). Cette fusion est désignée par le sigle ZFN pour *zinc finger nuclease*. La coupure est ainsi réalisée en un endroit précis de la chromatine. Les deux voies de réparation sont ensuite possibles, l'une ou l'autre sera privilégiée en fonction de l'objectif.

Dans une première approche, la coupure est réparée par la voie NHEJ. Les deux extrémités sont alors reliées de façon non spécifique, induisant de façon quasiment systématique une délétion ou une insertion dans le gène coupé. Cette stratégie permet donc d'inactiver le gène ciblé. Une telle approche a été utilisée pour cibler le gène du récepteur CCR5 afin de protéger les lymphocytes de l'infection par HIV (Mani *et al.*, 2005).

Dans une seconde approche, il s'agit d'induire les mécanismes de recombinaison homologue par la présence d'une matrice de réparation suffisamment homologue aux séquences flanquantes du site de coupure. Cette approche permet d'inactiver un gène en y introduisant une séquence choisie, par exemple un gène rapporteur. Elle permet également de réparer des gènes en



remplaçant une région mutée d'un gène donné par la région correcte de ce gène. L'intérêt d'une telle stratégie a été démontré pour la réparation du gène  $\gamma$ c en vue du traitement du X1-SCID (Moehle *et al.*, 2007).

La société Sangamo, en collaboration avec l'équipe de L. Naldini, a fusionné ce système de ZFN à un système de vecteur lentiviral non-intégratif. Ce système repose sur l'utilisation d'au moins un vecteur. Un premier vecteur permet l'expression de la ZFN et, en cas de besoin, un second vecteur apporte la matrice d'ADN à intégrer. Les preuves de principe de la vectorisation du système ont été apportées dans le cadre d'un modèle murin de X1-SCID. Il est ainsi possible de réparer le gène  $\gamma$ c dans les cellules souches hématopoïétiques (résultats présentés par Lombardo *et al.* au *8th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2005a ; résultats présentés par Lombardo *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007). Les auteurs ont également démontré la possibilité d'intégrer une séquence exogène, par exemple une cassette d'expression de la GFP, dans le locus CCR5 pour inactiver son expression et protéger les lymphocytes de l'infection par HIV.

Les deux approches décrites ci-dessus permettent de cibler un gène particulier pour l'éteindre ou au contraire le réparer, une troisième approche a pour but de cibler un site supposé neutre pour surexprimer un facteur. Le choix d'un site neutre est cependant une question délicate et doit prendre en compte d'une part la nécessité d'un environnement chromatinien permissif à la transcription et d'autre part le besoin d'être éloigné le plus possible de tout gène pour limiter la mutagenèse insertionnelle. Ces deux critères sont généralement peu compatibles. De plus, un nombre croissant de fonctions est attribué aux régions non codantes, notamment dans l'ARN interférence, mécanisme qui intervient dans la régulation de nombreux processus essentiels, tels que le développement ou la maturation des cellules. Enfin, la notion de « site neutre » n'est probablement pas universelle et il faudra probablement définir un site en fonction de la nature des cellules cibles, du transgène ou encore de la pathologie. Récemment, la société Sangamo a développé une ZFN dirigée contre le site AAV-S1, locus du chromosome 9 où s'intègre préférentiellement l'AAV sauvage.

Les groupes de L. Naldini et de la société Sangamo ne rapportent pas toxicité de ce système, ou une toxicité très réduite. Des résultats contradictoires ont cependant été annoncés sur ce point, notamment par deux groupes décrivent une cytotoxicité induite par une activité non-spécifique de la nucléase (Porteus *et al.*, 2003 ; Alwin *et al.*, 2005). De nouvelles versions de ZFN ont été développées, qui induisent une toxicité réduite par rapport aux premières générations (résultats présentés par Miller *et al.* au *10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy*, 2007 ; Szczepek *et al.*, 2007). Cette activité non-spécifique représente un des défis majeurs pour l'utilisation des ZFN chez l'Homme (voir Pâques et Duchateau, 2007 pour revue).

### 3.3.2. Recombinases de phage

Parallèlement aux ZFN, un autre système d'intégration site-spécifique a récemment été décrit, fondé sur l'utilisation de recombinases de phage. Ces recombinases catalysent naturellement l'intégration d'un génome de phage au sein d'un génome bactérien. La recombinaison intervient spécifiquement entre deux séquences reconnues par l'enzyme sur les deux partenaires : les sites *attB* (séquence d'attachement bactérienne) et *attP* (séquence d'attachement phagique). Certaines de ces enzymes, en particulier l'enzyme du phage  $\phi$ C31, sont fonctionnelles dans un contexte eucaryote et peuvent recombiner une séquence *att* et une séquence qui respecte certains critères d'homologie nommée pseudo-*att*. Une telle réaction peut intervenir, par exemple, entre un élément extrachromosomique, tel qu'un plasmide portant un site *att* naturel et un pseudo-site reconnu dans le génome d'une cellule transfectée. Cette réaction aboutit alors à l'intégration stable du plasmide dans le génome de la cellule transfectée.

De nombreux résultats ont d'ores et déjà été obtenus avec cette approche (voir Calos, 2007 pour revue). En particulier, l'équipe de MP. Calos a démontré l'efficacité de la recombinase du phage  $\phi$ C31 à intégrer des plasmides dans différents génomes de mammifères, notamment chez la souris (Thyagarajan *et al.*, 2001 ; Olivares *et al.*, 2002 ; Held *et al.*, 2005), le lapin (Keravala *et al.*, 2006), le rat (Chalberg *et al.*, 2005) ou encore dans des cellules humaines (Ortiz-Urda *et al.*, 2002 ; Ortiz-Urda *et al.*, 2003 ; Quenneville *et al.*, 2004). La spécificité d'intégration n'est pas aussi parfaite que dans le génome de bactérie, mais permet néanmoins de réduire les événements d'intégration à quelques loci. Deux pseudo-sites majoritaires ont été décrits chez la souris et environ 20 dans les cellules humaines. De plus, il est possible de soumettre la protéine à un processus d'évolution dirigée et ainsi augmenter son efficacité et sa spécificité (Sclimenti *et al.*, 2001). L'équipe de MP. Calos, en collaboration avec d'autres, a démontré l'intérêt de cette stratégie pour le traitement de nombreuses pathologies, telles que l'hémophilie (Olivares *et al.*, 2002), l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (Ortiz-Urda *et al.*, 2002 ; Ortiz-Urda *et al.*, 2003), tyrosinémie (Held *et al.*, 2005), les dystrophies musculaires (Quenneville *et al.*, 2007), mais aussi pour le transfert de gènes dans la rétine (Chalberg *et al.*, 2005) ou dans des lignées de lymphocytes (Ishikawa *et al.*, 2006). Dans l'ensemble des publications mentionnées ci-dessus, la recombinase de phage ainsi que la séquence à intégrer ont été vectorisées sous forme de plasmide. Plusieurs approches de vectorisation virale de ce système ont été réalisées.

Une première tentative a été décrite par l'équipe de L. Naldini (résultats présentés par Lombardo *et al.* au 8th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, 2005b). De la même façon que pour la vectorisation des ZFP décrite précédemment, les auteurs ont combiné les vecteurs lentiviraux non-intégratifs au système  $\phi$ C31. Un premier vecteur porte la séquence à intégrer et la séquence *att* et un second vecteur permet l'expression de la recombinase de phage. Toutefois, aucun événement de recombinaison n'a pu être mis en évidence par cette approche. Le faible niveau de transcription du génome lentiviral épisomal a vraisemblablement été le facteur

limitant. En effet, si la recombinaison est apportée par transfection, elle est exprimée à un niveau supérieur à celui obtenu avec le vecteur lentiviral non-intégratif ; le système est alors fonctionnel.

L'équipe de M. Kay a récemment publié un nouveau système fondé sur l'utilisation d'un vecteur adénoviral (Ehrhard *et al.*, 2007). Ce système s'est avéré efficace, mais peu spécifique : parmi 40 événements d'intégration analysés, un seul correspond à un des pseudo-sites majoritaires décrits par l'équipe de MP. Calos, tous les autres sites d'intégration ont été retrouvés dans des régions géniques.

Ce système de recombinaison est séduisant, mais doit être manipulé avec précautions dans la mesure où la recombinaison peut reconnaître plusieurs pseudo-sites dans le génome de la cellule cible et induire la recombinaison de ces deux sites, conduisant à des réarrangements chromosomiques. De tels phénomènes ont été décrits par différentes équipes dont le groupe de M. Kay qui rapporte que jusqu'à 15% des sites d'intégration identifiés sont flanqués de régions issues de chromosomes distincts (Ehrhardt *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2006). Il a par ailleurs été démontré que les recombinaisons sites-spécifiques, au-delà d'une certaine concentration, perdent leur spécificité (Loonstra *et al.*, 2001). Il est donc nécessaire de limiter le niveau et la durée de l'expression de la recombinaison. Bien que le système de recombinaison de phage soit séduisant, de nombreux développements sont encore nécessaires avant de pouvoir l'utiliser chez l'Homme de façon sûre et efficace.

### 3.3.3. Transposons

Les transposons, tels que *Sleeping Beauty*, sont utilisés depuis une dizaine d'années pour le transfert de gènes (voir Ivics et Izsvac, 2006 pour revue). Ces vecteurs consistent en une séquence d'ADN d'intérêt flanquée de deux régions répétées inversées (IR). Les séquences IR sont reconnues par une transposase, naturellement codée par le transposon, mais dont la séquence est apportée en *trans* dans le cadre des vecteurs, qui permet l'excision du transposon et son intégration dans un nouveau locus. La transposase de *Sleeping Beauty* n'est pas site spécifique cependant, le profil d'intégration de ce transposon est significativement moins favorisé dans les régions codantes par rapport aux vecteurs rétroviraux. Cette caractéristique en fait des vecteurs de transfert de gènes plus sécurisés du point de vue du risque de mutagenèse insertionnelle. Ce domaine fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches qui visent d'une part à modifier le profil d'intégration. La transposase de *Sleeping Beauty* a récemment été fusionnée à différents domaines de liaison à l'ADN site-spécifique (Wilson *et al.*, 2005 ; Yant *et al.*, 2007 ; Ivics *et al.*, 2007). D'autre part, en vue d'améliorer l'efficacité du transfert de gène par ce vecteur non-viral, le système de transposon a été combiné avec différents vecteurs viraux dont les vecteurs adénoviraux et herpétiques. L'utilisation de vecteurs lentiviraux non-intégratifs comme plateforme au transposon *Sleeping Beauty* a également été récemment proposée (résultats présentés par Staunstrup *et al.* au 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy,

2007). Le perfectionnement de ces approches et leur utilisation combinée devrait faire des transposons des outils de choix en matière de transfert de gènes dans les années à venir.

## 4. PRECAUTIONS D'EMPLOI DES VECTEURS LENTIVIRAUX

Que ce soit sous forme intégrative ou non-intégrative, un certain nombre de précautions s'imposent à l'utilisation des vecteurs lentiviraux. L'attention est aujourd'hui focalisée sur le risque de mutagenèse insertionnelle des vecteurs rétroviraux. Dans le but de réduire les conséquences de l'intégration du génome dans la chromatine, les vecteurs rétroviraux ont été déléétés de la région promotrice du LTR (vecteurs SIN), limitant ainsi les effets d'activation à distance. Pourtant, le bien-fondé de l'utilisation de ces vecteurs SIN a récemment été remis en question et certains arguments ont été avancés en faveur de l'utilisation de vecteurs non-SIN (Buchholz et al., 2006). Un autre point critique dans l'utilisation des vecteurs lentiviraux réside dans la formation de particules recombinantes, que ce soit pendant la production ou lors de la « rencontre » des vecteurs avec des particules lentivirales sauvages répliquatives. Les différents aspects de la biosécurité des vecteurs rétroviraux, qui peuvent avoir des répercussions cliniques et/ou environnementales, sont développés ci-dessous.

### 4.1. Risques cliniques

#### 4.1.1. Activation de la transcription à distance

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le pouvoir oncogène des oncorétrovirus est connu depuis plusieurs dizaines d'années, de même que le mécanisme et le rôle de l'élément *enhancer* du LTR dans le processus de transformation (voir [chapitre Introduction 1.1.1 p18](#)). Dans le but de réduire ce risque, les vecteurs SIN ont été développés. Les premiers ont été décrits il y a plus de 20 ans. En 1986, Yu et coll. suppriment les séquences promotrice et *enhancer* du LTR du MLV, mais conservent la boîte TATA (Yu et al., 1986). Un faible niveau de transcription persiste donc. Les auteurs observent que les transcrits générés à partir du LTR 5' représentent de l'ordre de 1% de la totalité des transcrits. Par la suite, Miyoshi et coll. développent un vecteur lentiviral SIN dans lequel ils ont supprimé la boîte TATA (Miyoshi et al., 1998). Cette fois, aucun transcrit initié par le LTR 5' n'est détectable.

Le potentiel oncogène des vecteurs SIN n'a été que peu étudié par rapport aux vecteurs classiques, pourtant un certain nombre de données sont disponibles. Tout d'abord, les différentes informations tirées des essais cliniques utilisant un vecteur MLV attestent d'un rôle de la séquence *enhancer* dans la surexpression des gènes voisins du site d'intégration dans les cellules hématopoïétiques ainsi que d'un mécanisme de sélection de certains clones et de l'évolution du

profil de repopulation vers l'oligoclonalité (voir [chapitre Introduction 1.3.2.3 p43](#)). Ces effets ont par la suite été mis en évidence *in vitro* et chez l'animal à de nombreuses reprises (voir [chapitre Introduction 1.3.2.3 p43](#)). Quelques études ont également démontré que ces effets sont moindres avec un vecteur SIN (Calmels *et al.*, 2005 ; Modlich *et al.*, 2006a ; résultats présentés par Modlich *et al.* au 14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy, 2006b). Mais la délétion n'abolit pas totalement le pouvoir oncogène du vecteur. En effet, l'apparition de tumeurs ou la modification de certaines caractéristiques cellulaires *in vitro* a été décrite après utilisation de vecteurs rétroviraux SIN dérivés du MLV et de l'EIAV (Calmels *et al.*, 2005 ; Themis *et al.*, 2005).

Il est important de noter qu'aucune des évaluations de la capacité oncogénique des vecteurs lentiviraux n'a pris en compte l'éventualité de la transactivation du promoteur. En effet, le LTR du HIV est sous contrôle du transactivateur *tat*. En absence de ce facteur, le promoteur n'est donc pas actif. Il ne s'agit que de fuite de la transcription. En revanche, en présence de *tat*, le promoteur peut être environ 1000 fois plus actif (Jeang *et al.*, 1999). La totalité des études ayant été réalisée en absence de *tat*, il est très probable qu'à l'état activé, en présence de *tat*, le LTR lentiviral ait un pouvoir oncogène bien plus important que celui rapporté aujourd'hui. L'activation du promoteur pourrait avoir lieu si la cellule transduite est infectée par une particule lentivirale sauvage. Il faut également envisager l'éventualité d'un effet *tat-like* induit par un facteur viral (lentiviral ou non) ou cellulaire. Des effets de ce type ont, par exemple, été observés avec les vecteurs adénoviraux de premières générations. En effet, dans certaines conditions, malgré la délétion de la région E1 qui dirige l'expression des gènes tardifs, la production de ces gènes a été observée, traduisant un effet transactivateur d'un facteur mimant E1 (Spergel *et al.*, 1992). Il ne peut être exclu que des facteurs cellulaires ou viraux jouent un rôle comparable vis-à-vis du LTR lentiviral et permettent son activation.

#### 4.1.2. Transcription des séquences voisines du site d'intégration

L'augmentation du *readthrough* - c'est-à-dire de la capacité de poursuivre la transcription au-delà du signal de fin de transcription - constitue un argument qui peut être opposé à l'utilisation de vecteurs lentiviraux SIN. En effet, la délétion des signaux de transcription affaiblit également les signaux de fin de transcription. La transcription donne donc lieu à la formation d'ARN chimériques et réduit l'efficacité d'expression du transgène. Ce problème a récemment été soulevé par Zaiss et coll. pour les vecteurs lentiviraux SIN (Zaiss *et al.*, 2002). Les auteurs montrent cependant que la réintroduction d'une partie de la région délétée, plus précisément la région de liaison au facteur NF $\kappa$ B, permet d'améliorer significativement l'arrêt de la transcription. L'absence d'évaluation des conséquences de ce phénomène de *readthrough* dans les vecteurs lentiviraux pourrait donc être un argument en faveur de l'utilisation des versions non-SIN de ces vecteurs.

Le *readthrough* dans les vecteurs lentiviraux est lié à la délétion de certaines séquences du LTR, mais ce phénomène était déjà décrit pour les oncorétrovirus - virus et vecteurs - portant un LTR complet (Herman et Coffin, 1987). Ce mécanisme participe au potentiel oncogène des vecteurs oncorétroviraux puisqu'il permet la transduction de nouveaux oncogènes cellulaires (Majors, 1990). En effet, si le provirus est intégré dans un oncogène cellulaire, la transcription peut donner lieu à la formation d'un ARN génomique chimérique contenant cet oncogène et qui pourra être encapsidé. Le *readthrough* est donc équivalent pour les vecteurs oncorétroviraux SIN et non SIN. Le phénomène *readthrough* ne représente donc pas un argument recevable en faveur de l'utilisation des vecteurs MLV non-SIN.

### 4.1.3. Efficacité de transcription

Une des raisons qui ont motivé l'utilisation du LTR viral pour diriger l'expression du transgène dans les cellules souches hématopoïétiques par un vecteur MLV est la difficulté à identifier un promoteur suffisamment actif dans ces cellules pour permettre un niveau d'expression thérapeutique du transgène. Ainsi, un des arguments à l'encontre de l'utilisation de vecteurs SIN est la contrainte de recourir à des promoteurs forts et/ou des *enhancers*, qui peuvent avoir les mêmes effets que le LTR viral. Toutefois, la plupart des études ont été menées avec un vecteur non-SIN et un promoteur interne dont l'activité a pu être perturbée par des interférences transcriptionnelles avec le LTR. Il est important de réévaluer la nécessité de l'utilisation d'un LTR oncorétroviral au sein d'un vecteur SIN.

Les résultats récemment publiés par Robert-Richard et coll. (Robert-Richard *et al.*, 2007) remettent en effet en question cet argument et rapportent que, dans un contexte lentiviral, il existe une alternative à l'utilisation d'un promoteur interne LTR pour atteindre un niveau d'expression élevé dans les cellules souches hématopoïétiques. Ils démontrent également que le niveau d'activité transcriptionnelle d'un promoteur n'est pas corrélé avec son effet sur les promoteurs voisins. Au cours de cette étude, les auteurs ont utilisé un vecteur lentiviral SIN portant un premier transgène (gène de résistance) placé sous contrôle de différents promoteurs constitutifs : LTR du MLV, PGK ou EF1 $\alpha$ , ainsi qu'un gène rapporteur (GFP) placé sous contrôle d'un promoteur érythroïde spécifique. Ces vecteurs ont été utilisés pour transduire des cellules souches hématopoïétiques. Deux paramètres ont été analysés : (1) le niveau d'expression du premier gène par le promoteur constitutif ainsi que (2) la spécificité d'expression de la GFP par le promoteur érythroïde. Ce dernier paramètre peut être considéré, avec toutes les réserves nécessaires, comme un indicateur de l'effet du promoteur constitutif sur la chromatine environnante. Le niveau thérapeutique du premier transgène est obtenu avec le LTR. L'interférence, comme attendu, est très importante puisque la GFP est fortement exprimée dans de nombreuses lignées non-érythroïdes (entre 60 et 90%). L'ajout de la séquence cHS4 (complète ou non) permet de limiter les effets du LTR interne, sans toutefois rétablir parfaitement la

spécificité du promoteur puisque la fuite n'est réduite que de 2 à 6 fois. Au contraire, le promoteur EF1 $\alpha$  ne perturbe pas l'expression spécifique de la GFP (<1% de fuite dans les lignées non-érythroïdes), tout en permettant un niveau thérapeutique d'expression du premier transgène. Ces résultats démontrent donc que (1) le LTR viral n'est pas nécessaire à l'expression élevée d'un transgène, puisqu'un promoteur endogène permet un niveau d'expression comparable et (2) le LTR, même en tant que promoteur interne, induit une forte interférence avec un promoteur voisin, interne au vecteur. Cette interférence peut suggérer une influence importante sur les promoteurs cellulaires voisins. Une telle interférence du promoteur LTR, en tant que promoteur interne, avec les promoteurs cellulaires voisins a déjà été démontrée. Modlich et coll. ont en effet rapporté qu'un vecteur MLV SIN comportant un LTR interne conserve 1/10 de la capacité oncogène du vecteur non SIN (Modlich *et al.*, 2006a).

Il est également important de noter que, même si le LTR permet un niveau de transcription élevé dans les cellules hématopoïétiques, cette expression peut n'être que transitoire. En effet, le LTR viral est sensible à la méthylation, la transcription est alors significativement réduite. Ce phénomène d'extinction a en particulier été illustré chez l'Homme au cours de l'essai de traitement par transfert de gène du CGD-SCID (résultats présentés par Grez *et al.* au 14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy, 2006 ; voir [chapitres Introduction 1.2.2 p34 et 1.3.2.3 p43](#)). L'utilisation du LTR oncorétroviral pour diriger l'expression d'un transgène est donc à proscrire, même en tant que promoteur interne. Il est préférable de s'orienter vers l'utilisation de promoteurs permettant un niveau d'expression plus physiologique. De tels promoteurs peuvent être développés à partir d'éléments de régulation transcriptionnelle cellulaires. Ils permettent également de restreindre l'expression au type cellulaire ciblé, par exemple les cellules  $\beta$  productrices d'insuline dans le pancréas (Castaing *et al.*, 2005) ou dans les hématies pour la production d'hémoglobine (May *et al.*, 2000 ; May *et al.*, 2002).

## 4.2. Risques environnementaux

Nous aborderons ce chapitre par le biais de l'exemple du premier essai clinique utilisant un vecteur lentiviral. Cet essai, dont les résultats ont été récemment décrits par Levine et coll., concerne le traitement de l'infection HIV par une stratégie d'ARN anti-sens dirigés contre l'enveloppe (Levine *et al.*, 2006). Cet essai permet d'illustrer différents niveaux de risques environnementaux : (1) le risque de formation de particules recombinantes lors de la production ; (2) le risque de formation de particules recombinantes avec des particules sauvages ; (3) le risque d'émergence de particules résistantes suite à la pression de sélection. Ce dernier risque est lié à toute stratégie anti-infectieuse, indépendamment de la nature du vecteur utilisé.



### 4.2.1. Description de l'essai VRX496

Le vecteur utilisé, le VRX496, est dérivé du HIV et permet l'expression d'une longue séquence d'ARN anti-sens dirigée contre l'enveloppe sauvage du HIV. La construction du vecteur conserve beaucoup d'éléments communs avec le HIV sauvage, en particulier les LTR. Le vecteur contient une séquence du gène de la GFP afin de pouvoir la distinguer du génome sauvage. Par contre, les homologies ont été réduites au maximum avec le plasmide de transcomplémentation utilisé lors de la production, afin de limiter les risques d'apparition de particules recombinantes. Le même plasmide apporte les fonctions d'encapsidation *gag* et *pol* ainsi que la glycoprotéine d'enveloppe VSV. Les particules ont été utilisées pour transduire *ex vivo* des cellules CD4<sup>+</sup> de 5 patients infectés par le HIV et n'ayant pas répondu à plusieurs traitements antiviraux classiques. Dans les cellules transduites, l'antisens est exprimé à partir du LTR du vecteur. Le LTR n'a pas été modifié, il reste donc sous le contrôle de *tat*. Ceci a deux conséquences : (1) l'expression de l'antisens est activée par la présence d'un génome HIV sauvage dans la cellule (2) la mobilisation, c'est-à-dire la transcomplémentation, du génome vecteur est possible par une particule sauvage. Le vecteur se réplique donc de façon conditionnelle dépendante de l'infection par le HIV sauvage.

Avec un recul de près de 3 ans après l'injection de cellules CD4<sup>+</sup> modifiées, les auteurs n'observent pas de prolifération clonale et un profil TCR constant. L'analyse des sites d'intégration révèle un profil en accord avec publications antérieures. Aucune particule recombinante n'a été détectée, ni de glycoprotéine VSV ou d'anticorps dirigés contre cette protéine. La mobilisation a été observée pendant moins de 60 jours après infusion des cellules modifiées. *A priori*, le système est séduisant. Il est auto-régulé, c'est-à-dire que la réplication du vecteur est dépendante de la réplication virale. Même si un phénomène de recombinaison survient, le virus produit sera inhibé par l'ARN anti-sens.

### 4.2.2. Système de production et recombinaison

Un des risques liés à la production de vecteurs par transfection (transitoire ou en lignée stable) concerne la formation de particules recombinantes répliquatives par recombinaison entre le vecteur et les éléments de transcomplémentation. Dans le but de réduire ce risque, les différentes fonctions de transcomplémentation sont généralement séparées sur plusieurs plasmides. Cette séparation physique permet d'augmenter le nombre d'événements de recombinaison requis pour la formation de particules répliquatives. Les systèmes de production les plus utilisés se composent d'au moins trois plasmides : un plasmide vecteur, un plasmide d'encapsidation et un plasmide d'enveloppe. Il est surprenant qu'une telle mesure n'ait pas été appliquée dans le cadre de l'essai VRX496. En effet, bien que les homologies de séquences aient été réduites entre le plasmide vecteur et le plasmide de transcomplémentation, celui-ci apporte les fonctions *gag-pol* ainsi que

l'enveloppe. Ceci est d'autant plus surprenant que l'enveloppe utilisée est l'enveloppe pantropique de VSV.

Au cours de l'évaluation préclinique du vecteur, les auteurs ont recherché la présence de particules répliquatives, sans pouvoir en mettre en évidence. Toutefois, les stocks produits ne semblent pas totalement dépourvus de particules recombinantes. Les auteurs ont préparé un stock de vecteurs par transfection transitoire de cellules 293 et récolté le surnageant. Ce surnageant a été utilisé pour transduire des cellules qui ont été passées 6 fois avant d'être analysées par PCR quantitative pour détecter la présence de la séquence VSV. De façon surprenante, cette réaction s'est avérée positive. Ce résultat traduit une contamination des stocks par la séquence de VSV, que ce soit par un événement de recombinaison ou par contamination de plasmide dans le surnageant. Cette contamination est importante (Pichlmair *et al.*, 2006) et difficile à éliminer et peut permettre le transfert des plasmides dans les cellules transduites. Nous avons en effet mis en évidence au laboratoire l'intégration du plasmide vecteur après transduction dans des cellules sélectionnées sur expression du transgène GFP. L'intégration des plasmides de transcomplémentation et/ou d'enveloppe n'a pas été recherchée, mais elle n'est pas moins probable que celle du plasmide vecteur. Ainsi, quelle que soit la raison de la présence d'ADN VSV dans les cellules après transduction, les conséquences peuvent être dramatiques dans ce contexte puisque des événements de recombinaison entre ces séquences et le HIV sauvage pourraient donner lieu à la formation de particules HIV répliquatives pantropiques.

La contamination des stocks de vecteurs par les plasmides utilisés pour la production démontre l'intérêt de développer de nouvelles méthodes de purification, par exemple par chromatographie. De telles méthodes de purification sont notamment utilisées pour la production de vecteurs AAV. Il est également possible de produire les vecteurs à partir de lignées stables. Cette méthode ne permet pas d'éviter la formation de particules recombinantes, mais élimine la contamination sous forme de plasmides.

### **4.2.3. Mobilisation par les lentivirus sauvages**

Le phénomène de mobilisation se définit par la transcomplémentation du génome d'un vecteur par une particule virale répliquative sauvage. Ce phénomène a été mis à profit dans le cadre de la stratégie VRX496, mais il est généralement à éviter. En effet, outre la dispersion incontrôlée du transgène, le phénomène de mobilisation accroît significativement les risques de recombinaison entre vecteur et virus et la formation de particules chimériques aux propriétés imprévisibles.

Le risque de mobilisation est particulièrement aggravé dans le cas de traitements d'infection VIH par un vecteur lentiviral, et là encore, il semble surprenant que de tels essais soient engagés sans précautions supplémentaires. Dans le cas particulier de l'essai VRX496, si le plasmide transcomplémentant est d'une manière ou d'une autre, introduit dans une cellule infectée par le virus HIV sauvage, il pourrait récupérer une séquence Psi, et créer ainsi un virus répliquatif

pseudotypé par VSV. Rappelons que VSV est une enveloppe pantropique, et qu'il a été démontré que le pseudotypage d'un vecteur baculoviral par cette enveloppe le rend infectieux par voie transdermique (Boyce, 2000).

La mobilisation peut survenir, par exemple, chez l'Homme si une cellule transduite par un vecteur HIV est infectée par une particule de HIV sauvage. Il faut également en tenir compte dans le cadre d'applications vétérinaires. En effet, il est envisageable de produire des animaux transgéniques à l'aide de vecteurs lentiviraux ; si cette méthode est un jour appliquée pour la production d'animaux d'élevage, il faudra considérer le risque d'infection par le lentivirus écotope sauvage, par exemple par le BIV pour les bovins. D'autre part, il pourra également être envisagé de vacciner à grande échelle des animaux d'élevage ou domestiques ; là encore, il faudra tenir compte de ce risque. Les travaux récents publiés par Zhu et coll. montrent que des particules chimériques HIV-BIV peuvent être produites (Zhu *et al.*, 2005). Les auteurs suggèrent également que certaines de ces chimères peuvent achever un cycle de réplication. Des études approfondies seront donc nécessaires afin d'évaluer précisément le risque de formation de particules nouvelles par recombinaison entre les vecteurs lentiviraux et les lentivirus sauvages.

L'inactivation du LTR par délétion du site de reconnaissance du transactivateur *tat* permet de réduire le risque de mobilisation (vecteur SIN). Une équipe a récemment montré que la modification des LTR telle qu'elle est utilisée à l'heure actuelle n'est pas suffisante et qu'une fuite transcriptionnelle est détectable, permettant la synthèse de génomes ARN qui peuvent être encapsidés (Logan *et al.*, 2004a). Les auteurs établissent que la délétion d'une séquence supplémentaire dans la région Leader (L), qui contient différents éléments de régulation de la transcription, permet de supprimer la transcription. Le problème n'est cependant pas totalement solutionné puisque la transcription peut également être initiée par un promoteur cellulaire voisin (Hanawa *et al.*, 2005).

Le problème de la mobilisation a également été soulevé à propos des vecteurs lentiviraux non-intégratifs. Les résultats, même s'ils ne sont que préliminaires, suggèrent que la mobilisation est possible à partir des formes épisomales du génome lentiviral (résultats présentés par Zeithaml *et al.* au 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy, 2007). La transcription du génome vecteur est initiée à partir du LTR dans le noyau de la cellule transduite. En présence des protéines nécessaires à la formation d'une particule (*gag*, *pol* et VSVg), ces transcrits peuvent être encapsidés et former de nouvelles particules efficaces pour la transduction. L'efficacité de cette mobilisation peut atteindre jusqu'à  $10^3$  TU/mL pour des cellules à 5 passages après transduction avec un vecteur lentiviral non-intégratif. Par contre, avec un vecteur lentiviral non-intégratif SIN, l'efficacité de mobilisation est nulle. Pour comparaison, si les cellules sont transduites avec un vecteur intégratif non-SIN ou SIN, les titres sont respectivement de  $10^5$  et  $10^3$  TU/mL. Ces résultats demandent confirmation, mais ils soulignent l'importance du LTR, même dans un contexte épisomal. L'absence de mobilisation observée avec les vecteurs épisomaux SIN est un

argument supplémentaire de poids en faveur de l'utilisation des vecteurs lentiviraux non-intégratifs, en particulier pour certaines applications à grandes échelles, comme la vaccination.

La pertinence de la question de la mobilisation peut toutefois être soulevée. En effet, le tropisme naturel des lentivirus, en particulier du HIV est majoritairement restreint aux lymphocytes. Ne peut-on pas considérer ce risque comme nul dès lors que ces cellules ne sont pas les cibles du transfert de gènes ? Deux éléments de réponse sont à considérer : (1) quelles que soient les cellules cibles, il est très probable que les cellules immunitaires soient transduites, surtout si le vecteur est injecté dans la circulation générale (Brown *et al.*, 2006) ; (2) le tropisme du HIV n'est pas exclusivement restreint aux lymphocytes et certains variants ont un tropisme différent qui leur permet d'infecter les macrophages dans le cerveau ou dans le foie (Dunfee *et al.*, 2006a) ; l'infection de la microglie (Dunfee *et al.*, 2006b) et d'astrocytes (Neil *et al.*, 2005) a également été décrite.

L'utilisation des virus non humains, puis non-primates pour le développement de vecteurs lentiviraux à usage clinique a été proposée afin de contourner le problème de mobilisation (Bukovsky *et al.*, 1999). Mais toutes les études menées ont montré la possibilité d'encapsulation croisée des différents virus, HIV, SIV et FIV (Rizvi et Panganiban, 1993 ; White *et al.*, 1999 ; Browning *et al.*, 2001 ; Sachdeva *et al.*, 2007) avec le risque de formation de particules chimériques aux propriétés nouvelles et inconnues. Seules les combinaisons lentivirus/autres rétrovirus sont inefficaces (Browning *et al.*, 2001).

Les résultats diffèrent si l'on considère non pas des virus mais des vecteurs non-répliatifs. Strappe et coll. ont montré l'absence de mobilisation avec des particules chimériques combinant des éléments de HIV1/HIV2/SIV (Strappe *et al.*, 2005). Toutefois, les résultats obtenus montrent que les ARN de SIV et de HIV2 peuvent être encapsidés par HIV1, ce qui correspond à la configuration la plus probable dans le cadre d'une application chez l'Homme. Des résultats similaires concernant l'encapsulation de génome HIV-2 par un vecteur HIV-1 ont été obtenus par Corbeau et coll. (Corbeau *et al.*, 1998).

Ces différentes études portent sur la possibilité d'encapsulation croisée entre deux virus ou deux vecteurs et l'encapsulation croisée entre un virus répliatif et un vecteur non-répliatif n'a pas été évaluée. Néanmoins, une des seules stratégies permettant de contourner efficacement ce risque est la modification du LTR, qui permet de limiter la transcription d'un génome ARN qui pourrait être encapsidé.

#### **4.2.4. Pression de sélection et émergence de nouveaux virus**

Un autre risque concerne l'apparition de particules résistantes. En considération de ce risque, les auteurs ont utilisé une séquence anti-sens qui couvre un large fragment du gène *env*. L'apparition de formes résistantes par une sélection sur l'enveloppe n'a que peu été évaluée dans la mesure où

les traitements antiviraux classiques sont dirigés contre les enzymes, intégrase, rétrotranscriptase ou protéase. Une pression de sélection est toutefois induite par la production d'anticorps neutralisants. Sous cette pression, l'enveloppe semble évoluer rapidement. Ces évolutions permettent généralement l'échappement à l'anticorps neutralisant sans modifier la liaison aux récepteurs cellulaires (Richman *et al.*, 2003 ; Wei *et al.*, 2003) ; dans un certain nombre de cas cependant, il est possible que le tropisme des particules soit modifié et qu'elles infectent plus efficacement de nouveaux types cellulaires (Takeuchi *et al.*, 1991). La sélection sur l'enveloppe pourrait donner lieu à l'émergence de souches résistantes à la stratégie anti-sens. L'anti-sens étant dirigé contre l'enveloppe, un tel phénomène pourrait induire une évolution de la structure du virus et générer des variants à l'enveloppe modifiée, dont les propriétés de tropisme pourraient elles-mêmes être très modifiées.

Tous ces événements sont d'une probabilité extrêmement réduite et n'ont pas été mis en évidence, que ce soit lors de l'essai clinique VRX496, ni au cours des phases précliniques. Toutefois, dans le cadre d'une vaccination contre le HIV, des millions de patients pourraient potentiellement être traités. Ces événements, aussi peu probables soient-ils, pourront alors être observés puisque leur probabilité sera multipliée par  $10^6$  par rapport à l'essai clinique présenté. Rappelons que le risque de mutagenèse insertionnelle n'a été mis en évidence qu'au passage de la souris à l'Homme, soit avec un changement d'échelle comparable du point de vue du nombre d'événements de transduction. Le dernier effet secondaire grave rapporté à la suite d'un transfert de gène est de plus survenu environ 6 ans après le traitement (voir Baum, 2007). Le recul de 3 ans n'est donc pas suffisant pour attester de la biosécurité de cet essai d'un point de vue environnemental.

### 4.3. Conclusion

En conclusion, les vecteurs SIN MLV représentent, de toute évidence, un progrès en matière de biosécurité, par rapport aux MLV classiques. L'utilisation de promoteur LTR en interne est également à proscrire. L'utilisation de promoteurs cellulaires est en effet préférable puisqu'ils permettent, s'ils sont bien choisis, une efficacité transcriptionnelle équivalente et sont généralement moins sensibles aux phénomènes de méthylation.

En ce qui concerne les vecteurs lentiviraux, la question est plus délicate. En effet, d'une part le potentiel activateur du LTR décrit est bien inférieur à celui des oncorétrovirus, d'autre part la délétion induit une forte augmentation du *readthrough*, dont les conséquences n'ont pas été précisément évaluées. Le bénéfice des vecteurs SIN n'est donc pas évident. Toutefois, aucune de ces évaluations n'a envisagé la possibilité de transactivation du LTR lentiviral par un effet *tat-like*. Enfin, l'utilisation de vecteurs lentiviraux SIN est la seule stratégie permettant de contrôler le risque de mobilisation. La question posée ne devrait donc pas être « Doit-on abandonner les vecteurs rétroviraux classiques et utiliser les vecteurs SIN ? » mais bien déjà « Comment peut-on

réduire les risques associés aux vecteurs rétroviraux SIN ? ». En effet, même les vecteurs SIN restent associés à des perturbations de la cellule. D'autre part, nous avons également mentionné un certain nombre de risques associés à la production des vecteurs rétroviraux ou au phénomène de mobilisation par des virus sauvages. Différents moyens sont d'ores et déjà disponibles afin de contrôler ou réduire ces risques. Il sera nécessaire de les mettre en œuvre lors des essais cliniques à venir.



---

# CONCLUSION

---

De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années concernant l'évaluation des risques liés aux vecteurs viraux et le développement de vecteurs plus sécurisés. Toutefois, bien que les données concernant l'évaluation de ce risque suggèrent que le risque de mutagenèse insertionnelle est bien moins important avec les vecteurs lentiviraux qu'avec les vecteurs oncorétroviraux, il ne peut être négligé. Ces résultats doivent inciter à continuer la caractérisation de ce risque, et à développer de nouveaux outils encore plus sécurisés. Les vecteurs lentiviraux non-intégratifs sont une des voies possibles, l'intégration ciblée en est une autre.

Toutefois, un certain nombre de considérations sur le risque de recombinaison et les conséquences que pourrait avoir la formation de particules chimériques à partir d'un vecteur et d'un lentivirus sauvage sont particulièrement inquiétantes, d'autant plus que ces risques ne sont pas ou peu caractérisés aujourd'hui. Effectivement, à l'échelle d'un essai clinique n'incluant qu'une dizaine de patients, l'incidence de ces risques est telle qu'aucun événement ne sera observé. Mais l'avenir de la thérapie génique n'est-il pas de dépasser un jour le stade de l'essai clinique ?

A l'heure où les risques sanitaires et environnementaux doivent être évalués pour chaque nouvelle molécule chimique utilisée par l'industrie (plan REACH de la Commission Européenne) et où les maladies infectieuses émergentes sont une des craintes de l'Organisation Mondiale de la Santé, il serait nécessaire que les communautés de thérapie génique veillent à ce que ces risques soient anticipés, étudiés et pris en compte dans le développement des vecteurs de transfert de gènes et des stratégies thérapeutiques. L'adoption de standards supérieurs aux standards actuels lors des phases précliniques donnera une nouvelle impulsion à la thérapie génique. Ce n'est qu'ainsi qu'elle passera du stade de science expérimentale à celui de véritable option thérapeutique.



Les devises Shadok



S'IL N'Y A PAS DE SOLUTION  
C'EST QU'IL N'Y A PAS DE PROBLÈME.

---

**ANNEXES**

---

# 1. BREVET

Mallet J, Serguera C, Philippe S, Lentivirus non-intégratifs et non-réplicatifs, préparation et utilisations, demande déposée le 25 juin 2004, référence FR 2 872 170-A1, publié le 30 décembre 2005.

Les données qui appuient ce brevet sont présentées dans les [chapitres Résultats 1.1.2 p105 et 2 p111](#).

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
2 février 2006 (02.02.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2006/010834 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C12N 15/867, 5/10, A61K 35/76, 39/21, 48/00

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2005/001604

(22) Date de dépôt international : 24 juin 2005 (24.06.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0407017 25 juin 2004 (25.06.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris  
Cédex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MALLET,  
Jacques [FR/FR]; 18, rue Charcot, 75013 Paris (FR). SER-  
GUERA, Che [FR/IT]; 71, via Flaminia, apt. 11, I-00196  
Rome (IT). PHILIPPE, Stéphanie [FR/FR]; 178, rue Saint  
Maur, F-75010 Paris (FR).

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Becker & Asso-  
ciés, 25, rue Louis le Grand, F-75002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,  
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,  
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: NON-INTEGRATIVE AND NON-REPLICATIVE LENTIVIRUS, PREPARATION AND USES THEREOF

(54) Titre : LENTIVIRUS NON INTEGRATIF ET NON REPLICATIF, PREPARATION ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a non-integrative and non-replicative recombinant lentivirus as well as its uses, in particular for preparing a composition for transferring genes *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*. The invention is useful for transferring genes in any mammal organism, for example in liver, muscle, pancreas or central nervous system (including the ocular sphere) tissues or cells, and in particular for treating disorders or pathologies such as, for example, central nervous system, including the ocular sphere, disorders.

(57) Abrégé : La présente invention décrit un lentivirus recombinant non intégratif et non répliatif ainsi que ses utilisations, notamment pour la préparation d'une composition destinée au transfert de gènes *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. L'invention est utilisable pour le transfert de gènes dans tout organisme mammifère, par exemple dans les tissus ou cellules du foie, muscle, pancréas et du système nerveux central (y compris de la sphère oculaire), et notamment pour le traitement de désordres et pathologies tels que par exemple des désordres du système nerveux central, y compris de la sphère oculaire.

WO 2006/010834 A1

## 2. ARTICLE 1

S. Philippe, C. Sarkis, M. Barkats, H. Mammeri, C. Ladroue, C. Petit, J. Mallet et C. Serguera, *Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo in the central nervous system*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 21 ; 103(47) : 17684-9.

Cet article regroupe une partie des résultats décrits dans le [chapitre Résultats 2 p111](#).

# Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo*

Stéphanie Philippe\*, Chamsy Sarkis\*, Martine Barkats\*, Hamid Mammeri\*, Charline Ladroue†, Caroline Petit†, Jacques Mallet\*‡, and Che Serguera\*

\*Laboratoire de Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des Processus Neurodégénératifs, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7091, 83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France; and †Laboratoire de Génétique des Virus, U 567, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, 22 Rue Méchain, 75014 Paris, France

Communicated by Etienne-Emile Baulieu, Collège de France, Le Kremlin-Bicetre Cedex, France, July 31, 2006 (received for review January 30, 2006)

Lentivirus-derived vectors are among the most promising viral vectors for gene therapy currently available, but their use in clinical practice is limited by the associated risk of insertional mutagenesis. We have overcome this problem by developing a nonintegrative lentiviral vector derived from HIV type 1 with a class 1 integrase (IN) mutation (replacement of the 262RRK motif by AAH). We generated and characterized HIV type 1 vectors carrying this deficient enzyme and expressing the GFP or neomycin phosphotransferase transgene (NEO) under control of the immediate early promoter of human CMV. These mutant vectors efficiently transduced dividing cell lines and nondividing neural primary cultures *in vitro*. After transduction, transient GFP fluorescence was observed in dividing cells, whereas long-term GFP fluorescence was observed in nondividing cells, consistent with the viral genome remaining episomal. Moreover, G418 selection of cells transduced with vectors expressing the NEO gene showed that residual integration activity was lower than that of the intact IN by a factor of 500–1,250. These nonintegrative vectors were also efficient *in vivo*, allowing GFP expression in mouse brain cells after the stereotactic injection of IN-deficient vector particles. Thus, we have developed a generation of lentiviral vectors with a nonintegrative phenotype of great potential value for secure viral gene transfer in clinical applications.

HIV-1-derived vector | integrase deficient | stable transgene expression

Some of the viral vectors used for gene transfer integrate into the host cell chromatin, whereas others remain episomal. The most commonly used nonintegrative vectors are derived from adenoviruses (AdV), herpes virus (HSV) or adeno-associated virus (AAV). The integrative vectors in current use are derived from type C retroviruses, such as murine leukemia virus (MLV), or lentiviruses such as HIV.

Vectors derived from AdV and HSV have already proved to be efficient in many experimental models, but technical limitations make it extremely difficult to obtain vector stocks devoid of replication-competent particles. In general, the production systems for these vectors require helper viruses or genomes that cannot be totally eliminated from stocks, accounting for 0.01–1% of all of the viral particles present (1, 2). Stocks may therefore be strongly immunogenic, thereby hindering their general use in clinical applications.

Lentivirus-derived vectors appear to be among the most promising alternatives: they can transport up to 8 kb of DNA of interest, they can be pseudotyped so that they present the chosen tropism (broad or specific), they transduce both dividing and nondividing cells, they are produced easily without the need for helper particles, and they are only weakly immunogenic (3, 4). However, like all integrative systems, lentivirus-derived vectors present a risk of insertional mutagenesis, which also limits their clinical application. This risk was recently highlighted in an X-linked severe combined immunodeficiency *ex vivo* gene therapy trial based on a murine

leukemia virus (MLV)-derived vector (5). Several studies have since pointed out that integration is not totally random for MLV (6) and lentiviral vectors (6, 7), which preferentially integrate into or close to transcriptionally active genome sequences. Moreover, macrophage cancers have been associated with HIV integration in some AIDS patients (8). Actually, AIDS has also been correlated with various types of cancer (9). Recently, Themis *et al.* (10) have reported the oncogenic potential of equine infectious anemia virus (EIAV) lentiviral vectors after the transduction of fetal and neonatal tissues. These findings clearly demonstrate the need to find means to prevent deleterious effects of integration of lentiviral vectors.

Two strategies for reducing the risk of insertional mutagenesis could be considered: the integration process could be rendered site-specific, or novel nonintegrative vectors could be developed. The development of new nonintegrative vectors, for targeting nondividing cells or for transient transgene expression in cycling cells, is simpler and could take advantage of an interesting feature of lentivirus biology. These viruses are normally present in various forms in the nucleus of infected cells: as integrated proviruses and as nonintegrated linear molecules and circular molecules with one or two long terminal repeat (LTR) sequence (11). Class 1 HIV integrase (IN) mutations prevent the IN reaction without disturbing other Gag-Pol functions, thereby favoring the circularization of the genome by host enzymes (12). These circular genomes have been shown to be functional templates for transcription by host cell machinery (refs. 13–16; see ref. 17 for a review).

In this article, we investigate the efficiency of nonintegrative HIV vectors for expressing transgenes *in vitro* and *in vivo*. We have developed a HIV type 1 (HIV-1)-derived vector carrying a class 1 IN mutation (18), and we have shown that this vector drives efficient transgene expression in dividing and nondividing cells *in vitro*. These vectors are episomal and retain only a negligible integration capacity. We have estimated that the mutant vectors integrated 500–1,250 times less frequently than the WT vectors. Furthermore, in contrast to previous reports (19–23), we have shown that these vectors efficiently drove transgene expression *in vivo* after intrastriatal injection into mice. Thus, the generation of lentiviral vectors described has great potential to overcome insertional mutagenesis, the main limitation to the clinical application of gene therapy with retroviral vectors.

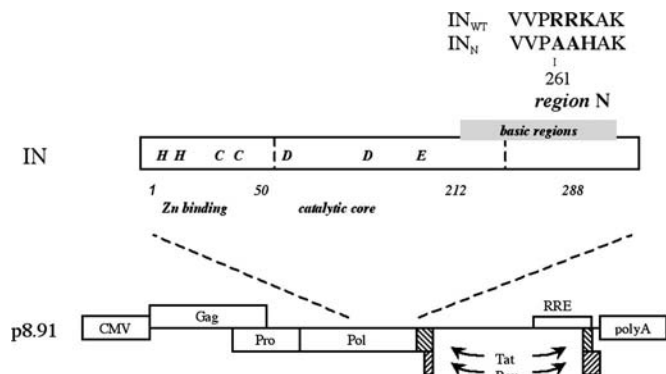
Author contributions: S.P., C. Sarkis, M.B., J.M., and C. Serguera designed research; S.P., C. Sarkis, M.B., H.M., C.L., C.P., and C. Serguera performed research; C.L. and C.P. contributed new reagents/analytic tools; S.P., C. Sarkis, M.B., C.P., J.M., and C. Serguera analyzed data; and S.P., C. Sarkis, C.P., J.M., and C. Serguera wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations: IN, integrase; LTR, long terminal repeat; HIV-1, HIV type 1; NEO, neomycin phosphotransferase; TU, transducing unit.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: mallet@chups.jussieu.fr.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

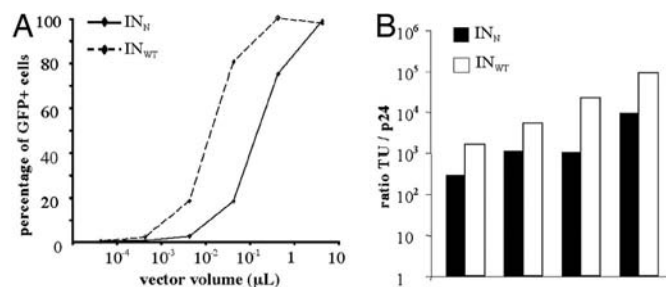


**Fig. 1.** Schematic representation of the intact (WT) and mutant (N) INs and of the encapsidation plasmids. (Upper) Schematic representation of the HIV-1 IN domains and the N region containing the modified amino acids (bold). Numbers correspond to amino acid position. (Lower) Schematic representation of the encapsidation plasmid encoding the intact IN (p8.91 IN<sub>WT</sub>) or the mutant IN (p8.91 IN<sub>N</sub>).

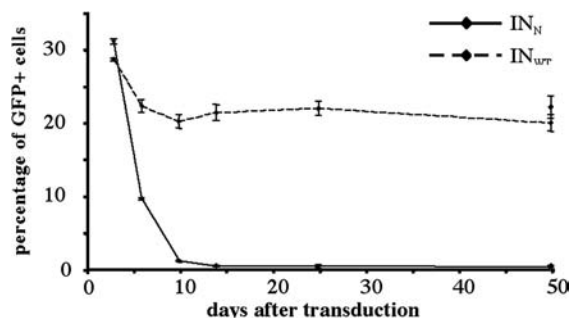
## Results

**Design of HIV1-Derived Vectors with a Class I IN Mutation.** We used a class I IN mutation for the development of a nonintegrative lentiviral vector. This mutation does not prevent reverse transcription, nuclear import of the preintegration complex, or circularization of the viral genome in the cell nucleus (18). The mutation consists of replacement by AAH of the <sup>262</sup>RRK motif, which is part of the N region of the HIV IN. For the production of lentiviral vectors containing this mutant IN, the mutant allele (IN<sub>N</sub>) was introduced into the encapsidation plasmid in place of the WT allele (IN<sub>WT</sub>). Two types of vector were produced: one containing an expression cassette for the GFP (IN<sub>WT</sub> GFP and IN<sub>N</sub> GFP) and the other containing an expression cassette of for the neomycin phosphotransferase (NEO) gene (IN<sub>WT</sub> NEO and IN<sub>N</sub> NEO) (Fig. 1).

**Class I IN Mutation Does Not Prevent Transgene Expression.** We evaluated the capacity of the mutant HIV-vector to transduce cells by titrating it on 293T cells with increasing doses of IN<sub>WT</sub> GFP or IN<sub>N</sub> GFP. After 72 h, the transduction rate was shown to be dose-dependent. Up to 90% of transduction efficiency is obtained with the highest volume of concentrated stock (5 μl) of both the control and the mutant vectors (Fig. 2A). This finding indicates that the selected IN mutation does not affect particle production or transduction process (encapsidation, reverse transcription, and nuclear translocation) or prevent transgene expression from vectors.



**Fig. 2.** Compared transduction efficiency of mutant and WT vectors. (A) GFP expression in 293T cells transduced with the mutant (IN<sub>N</sub> GFP) or the WT (IN<sub>WT</sub> GFP) vector. The 293T cells were transduced with serial dilutions of either mutant vector (IN<sub>N</sub> GFP) or WT vector (IN<sub>WT</sub> GFP). At 72 h after transduction, cells were fixed in PFA, and GFP expression was analyzed by FACS. (B) Ratio of titers expressed in TU/ng p24 of IN<sub>WT</sub> GFP (black) and IN<sub>N</sub> GFP (white) of four separate stocks of vectors produced simultaneously.



**Fig. 3.** GFP expression in time in dividing cells. The 293T cells were transduced with equivalent TU amounts of the IN<sub>N</sub> GFP (32 ng of p24 per μl) or the IN<sub>WT</sub> GFP (8 ng of p24 per μl) vector. Cells were cultured and analyzed by FACS at various times after transduction to determine the percentage of GFP-positive cells. Cells were transduced in three replicate wells for each condition, and results are expressed as the mean of the three measurements ± 5D. At day 47 after transduction, cells were passaged into two wells and left untreated or treated with 5 mM sodium butyrate for 24 h before the last harvesting, 50 days after transduction.

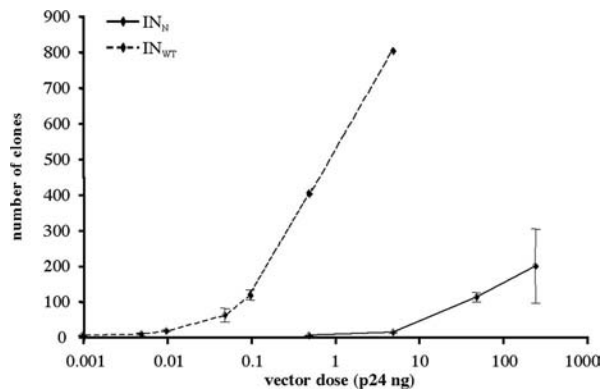
With a lower dose (0.5 μl) of the mutant vector, we observed 29% of GFP-positive cells, whereas the same volume of the control vector transduced 87% of cells. These results suggest that the mutant vector expresses transgenes less efficiently than the control vector. This hypothesis was confirmed by comparing the p24 and transducing units (TU) titers of various stocks of mutant and WT vectors produced simultaneously (Fig. 2B). In simultaneous IN<sub>WT</sub> and IN<sub>N</sub> vector productions, the TU/p24 ratio was higher for WT vectors than for mutant vectors by a factor of 4.6–20.4 (mean factor:  $9.9 \pm 7.3$ ), showing that the WT vector allows a more efficient transgene expression than does the mutant vector in 293T cells.

We then ascertained that the observed fluorescence resulted from *de novo* transcription rather than from a pseudotransduction mechanism. The 293T cells were transduced with various doses of mutant vector in the presence of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), a reverse-transcriptase inhibitor. AZT treatment resulted in a drastic reduction of GFP expression (data not shown). Thus, the GFP fluorescence observed with the mutant vector was clearly due to genuine transcription from newly formed vector genomes.

**Transgene Expression from the Mutant Vector Is Transient in Dividing Cells.** We then verified that GFP expression from IN<sub>N</sub> vectors did not result from integrated provirus. If this were the case, then GFP fluorescence levels would remain stable through successive passages. Cells initially transduced with equal TU amounts of the IN<sub>WT</sub> GFP and IN<sub>N</sub> GFP vectors were cultured and passaged for up to 50 days. The cells were regularly analyzed by FACS to evaluate the stability of GFP expression through divisions. The percentage of GFP-positive cells was stable after transduction with the WT integrative vector:  $28.42 \pm 0.21\%$  after 3 days and  $19.74 \pm 1.11\%$  after 50 days of growth (Fig. 3). In contrast, GFP fluorescence rapidly decreased in cells transduced with the mutant IN<sub>N</sub> GFP vector: from  $30.91 \pm 0.35\%$  after 3 days, to  $0.9 \pm 0.11\%$  after 10 days, and  $0.26 \pm 0.10\%$  after 50 days of growth. This progressive loss of transgene expression in dividing cells observed with the mutant vector is consistent with a nonintegrative phenotype.

To confirm that this disappearance of transgene expression results from the dilution of the vector genome through cell division rather than from promoter silencing, we treated the cells with sodium butyrate, an inhibitor of histone deacetylases commonly used to reverse transgene silencing. This treatment, performed 50 days after transduction, did not significantly affect GFP expression level in IN<sub>N</sub>-transduced cells, because  $0.17 \pm 0.05\%$  of untreated cells expressed GFP, whereas  $0.26 \pm 0.10\%$  of the treated cells were





**Fig. 4.** Evaluation of residual IN activity of the mutant enzyme. HeLa cells were transduced with increasing amounts of mutant vector  $IN_N$  *NEO* or WT vector  $IN_{WT}$  *NEO* and plated in T25 flasks. Cells were grown in the presence of G418 for 3 weeks, with the medium replaced every 3 days. Cells were transduced in three replicate wells for each condition, and results are expressed as the mean of the three measurements  $\pm$ SD. For the highest doses tested with the integrative vector (0.5 and 5 ng of p24), the number of clones per flask was  $\approx$ 400 and 800, respectively. Precise evaluation was not possible because of the confluence of the clones.

GFP positive (Fig. 3). Promoter silencing is, therefore, unlikely to be responsible for the disappearance of transgene expression.

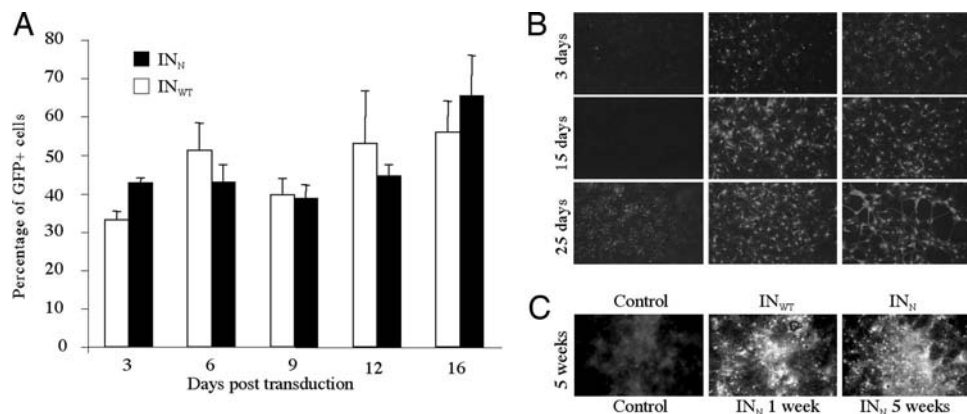
These results strongly suggest that the IN mutation used in this study prevented integration of the vector genome and allowed the formation of episomes and their efficient transcription.

**The Residual Integration Activity of  $IN_N$  Is Lower than That of  $IN_{WT}$  by a Factor of 500–1,250.** We precisely evaluated the residual integration activity of the mutant IN by means of an approach based on the expression of a *NEO* gene, conferring G418 resistance on cells. Proliferative HeLa cells were transduced with various amounts (normalized for p24) of mutant or control vectors expressing the *NEO* gene and were grown in the presence of G418. Thus, the number of clones formed after several days of selection reflects the frequency of integration events of the proviral vector. Because we could not determine the TU titer of the *NEO* vectors, stocks were evaluated by RNA dot blot analysis showing that equivalent amounts of p24 corresponded to equivalent numbers of RNA

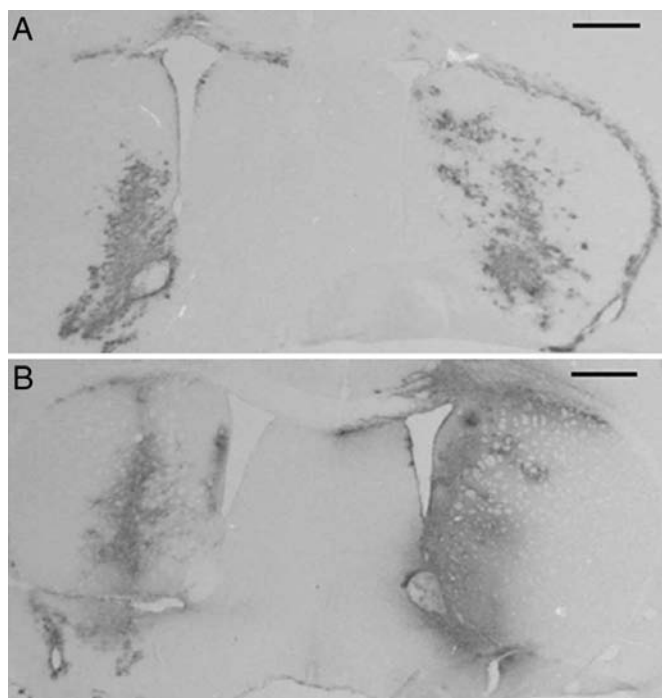
genomes (data not shown), as described for simultaneously produced stocks of lentiviral vectors (24). Transduced cells were cultured for 3 weeks in the presence of G418, and the number of clones obtained for each dose was determined (Fig. 4). The minimal dose required for clones to grow with the mutant vector was 0.5 ng of p24 ( $1 \pm 1$  clone), whereas the minimal dose required to observe clones with the WT vector was 0.001 ng of p24 ( $0.7 \pm 0.6$  clone). With 50 ng of p24 of the mutant vector, we observed  $109 \pm 12.2$  clones. This dose was equivalent to 0.1 ng of p24 of the control vector ( $115 \pm 13.5$  clones). The mutant enzyme is, therefore, at least 500 times less efficient at integration than is the WT enzyme. This difference in efficiency was even greater for the higher doses tested, because we could estimate, by extrapolation of the dose–response curve, that the highest dose tested for the mutant vector ( $196 \pm 104.5$  clones with 250 ng of p24) was equivalent to 0.2 ng of p24 of the WT vector. At this dose, the mutant vector integrates 1,250 times less frequently than does the WT vector.

**Episomal Genomes Allow Stable Transgene Expression in Nondividing Cells.** We investigated the stability of extrachromosomal forms of HIV vector genomes and their ability to drive long-term transgene expression by studying GFP expression in nondividing primary neurons and astrocytes after transduction with equivalent TU amounts of mutant or control vectors. GFP expression was observed for at least 16 days after transduction in neurons, with no evident decrease. Moreover, no significant difference was observed between the percentages of GFP-expressing cells after transduction with the mutant  $IN_N$  or the control  $IN_{WT}$  vectors (Fig. 5A) at any time point analyzed (two-way repeated measures ANOVA,  $P = 0.9321$ ), indicating that transgene expression levels were equivalent for control and mutant vectors at the doses used. GFP expression was observed in such cultures for up to 25 days (Fig. 5B). Similar results were obtained for postmitotic astrocytes in which GFP expression was shown to be stable for 5 weeks (Fig. 5C). We can, therefore, conclude that the nonintegrative lentiviral vectors developed are stable *in vitro* in nondividing cells and allow sustained transgene expression for at least 5 weeks.

**$IN$ -Mutant Lentiviral Vectors Are Able to Transduce Neural Cells *in Vivo*.** Control  $IN_{WT}$  GFP vector ( $10 \times 10^4$  TU) and mutant  $IN_N$  GFP vector ( $5 \times 10^4$  TU) were injected into the mouse brain, and GFP expression was analyzed by immunohistochemistry (Fig. 6). One week after injection ( $n = 2$ ) transgene expression with the



**Fig. 5.** GFP expression in nondividing primary neural cells *in vitro*. GFP expression in cortical primary neurons and astrocytes was evaluated after transduction with equal TU amounts of mutant vector  $IN_N$  GFP or control vector  $IN_{WT}$  GFP. Primary neurons were transduced and fixed with PFA at various times after transduction. GFP expression was visualized by immunocytochemistry. (A) The percentage of GFP-expressing cells in neurons was evaluated up to 16 days. Three replicate wells were analyzed for each condition, and results are expressed as the mean of the three measurements  $\pm$ SD. (B and C) Immunocytofluorescence analyses of GFP expression up to 25 days in neurons (B) and 5 weeks in astrocytes (C). Control wells (untransduced) at 25 days for neurons and 5 weeks for astrocytes show high background because of cell death. The endogenous fluorescence is easily differentiated from the high GFP fluorescence by looking at the cells through the red filter highlighting dying cells but not true GFP expression.



**Fig. 6.** GFP expression *in vivo*. Immunocytochemical analysis of GFP expression in mouse brain 1 week (A) and 4 weeks (B) after stereotactical injection of  $5 \times 10^4$  TU of the mutant  $IN_N$  GFP vector (left) or  $10 \times 10^4$  TU of the control  $IN_{WT}$  GFP vector (right). (Scale bars, 0.5 mm.)

mutant vector was significant and could be compared with expression from the control vector, according to the difference of doses. GFP expression was observed for 1 month after injection of the nonintegrative vector ( $n = 2$ ). Levels of expression at this time appeared to be equivalent to those observed 1 week after injection, with both the mutant  $IN_N$  or control and the control  $IN_{WT}$  vectors. Thus, the nonintegrative vector efficiently and stably directed transgene expression in the brain.

### Discussion

Safety concerns are the major obstacle to the use of viral vectors for gene therapy in clinical practice. Lentiviral vectors present a promising alternative to the vectors currently used, because they transduce many types of cells efficiently and can be produced in the absence of replication-competent particles. However, their potential to induce insertional mutagenesis continues to limit their clinical use.

In this study, we show that lentiviral vectors containing a class I IN mutation integrate only very poorly into the target cell chromatin and, yet, can transduce cells both *in vitro* and *in vivo*.

**Gene Expression from Circular Forms of HIV.** Although efficient viral replication seems to be associated with integration events, HIV transcription was shown to be supported by circular molecules. Expression of viral proteins, e.g., *tat*, *nef*, or reverse transcriptase as well as indicator genes linked to the LTR promoter, have been reported in many assays using virus particles containing class I nonpleiotropic IN mutations (13–16).

In contrast, lentivirus-derived vectors containing a class I IN mutation have been described in several studies that reported an absence of transgene expression. The first such studies (19–21) described an HIV-1-derived vector containing a substitution in the catalytic domain of the IN (D64V mutant IN) that transduced only rare cells *in vitro* and *in vivo*. These studies concluded that lentiviral-vector genome integration was necessary for transgene expression.

Two recent articles described feline immunodeficiency virus-derived vectors containing a D66V substitution in the IN sequence (22, 23), the D66 residue being equivalent to the D64 residue of HIV IN. Surprisingly, these vectors allowed transgene expression only in nondividing cells *in vitro* (aphidicolin cell cycle-arrested cell lines or primary postmitotic neurons). Very little or no transgene expression was observed in dividing cells *in vitro* or *in vivo* in the rat eye, after subretinal injection. The authors thus concluded that transduction efficiency with feline immunodeficiency virus vectors containing a class 1 IN mutant is cell-cycle dependent.

Although class 1 IN mutant lentivirus-derived vectors were used in the above studies, none of the results obtained are consistent with what we observed with HIV vectors or what was observed with HIV viruses containing class 1 IN mutant (13–16). These discrepancies may be accounted for by the absence of the central flap (cPPT-CTS) in the HIV vectors used. This sequence is now known to be critical for nuclear import of the preintegration complex in lentiviruses and lentivirus-derived vectors (24–26). This element is present in the feline immunodeficiency virus vectors, but its implication in nuclear translocation has not yet been precisely described. However, it may not be as efficient as in HIV counterparts, because the cPPT sequence is not a repetition of the PPT (27). Indeed, both PPT and cPPT sequences have to be similar for efficient HIV nuclear transport (24). HIV integrative vectors lacking this element express transgenes less efficiently because most of the reverse-transcribed genomes are not imported into the nucleus of the transduced cell. Thus, expression from episomal genomes, which is weaker than from integrated proviruses, may not have been detected in these experiments.

We tested this hypothesis by producing  $IN_N$  lentiviral vectors devoid of the central flap and comparing them with  $IN_N$  vectors containing the central flap. Although we observed that the absence of the central flap resulted in a decrease in transgene expression by a factor of 2–4 *in vitro*, GFP expression remained significant in dividing cells. However, it should be noted that the GFP-expression cassette in this experiment was driven by a strong promoter (CMV) and contained the WPRE element that has been shown to increase transgene expression by a factor of  $\approx 5$  (28, 29).

We thus conclude that the discrepancy between our results, showing efficient expression from the HIV-1 derived  $IN_N$  vector, regardless of the cell cycle, and those of studies from other groups can be explained by the optimization of our vectors. This optimization involved (i) incorporation of the flap sequence, (ii) a deleted U3 region in the LTR, shown to improve transgene expression (30, 31), and/or (iii) a very strong expression cassette through combination of the CMV promoter and the WPRE sequence (28, 29). In other words, the absence of one or several of these elements in the vectors used in previous studies may have resulted in a transgene expression under the threshold of detection.

After this manuscript was submitted, a study describing nonintegrative lentiviral vectors was published by Yanez-Munoz *et al.* (32). In contrast to the  $^{262}RKR$  mutant IN vector, this group used a D64V mutated IN. In line with the current study, the D64V vectors exhibit an episomal phenotype, a negligible residual IN-mediated recombination, and efficient *in vivo* transduction.

The transduction efficiency of the D64V vector was reported by Yanez-Munoz *et al.* (32) to be equivalent to the WT integrative vector, whereas the  $^{262}RKR$  mutant vectors described in this study exhibited lower transduction efficiency. Although further comparison studies are needed, this discrepancy may be explained by a pleiotropic effect of the  $^{262}RKR$  IN mutation. Indeed, in addition to catalyzing integration reactions, the IN enzyme is involved in various steps of the virus life cycle. Thus, the IN mutation we used may impair transduction efficiency at any step upstream of the recombination (e.g., virion maturation, uncoating, or nuclear import).



**Residual Integrase Activity.** We have shown that IN<sub>N</sub> vectors retain a very weak integration capacity. Using a *NEO*-expression cassette, we showed that this activity was weaker than that of similar vectors containing a WT IN by a factor up to  $\approx 1,000$ . This method has the advantage of taking into account integration events that can arise only after extensive cell divisions. IN<sub>N</sub> vector integration may result from both illegitimate recombination of the linear and circular forms of the vector genomes and/or residual catalytic activity of the mutant IN. In all retrovirus integration processes, IN-mediated catalysis is characterized by the deletion of two base pairs at the extremities of the LTRs. Thus, if integration is mediated by IN activity, the sequence at the end of the LTR is CA rather than CAGT. We analyzed the extremities of integrated IN<sub>N</sub> vectors (selected by G418) by the linear amplification-mediated PCR technique [adapted from Schmidt *et al.* (33)], and showed that four of five clones had a CA sequence at the extremity, demonstrating that integration resulted from residual activity of the mutated IN (data not shown). However, the possibility that integration also occurs through illegitimate recombination of the circular forms of the vector is not excluded. Moreover, this finding suggests that the residual integration frequency observed could be further reduced, e.g., by alteration of *att* sequences of the LTR (34).

**Potential Use of Episomal Lentiviral Vectors.** These newly developed IN<sub>N</sub> vectors represent a step forward in the clinical application of lentiviral vectors for gene transfer. Because these vectors retain very weak, almost negligible, integration activity, the risk of insertional mutagenesis is almost totally abolished. Moreover, the combined use of a class I mutant IN and deletion of the U3 region (SIN vectors) decreases the risk of activation or deregulation of nearby genes if integration occurs. This may, therefore, ensure safe gene transfer. These vectors can thus be used both for stable transgene expression in nondividing cells and for transient expression in proliferating cells. We recently observed that stable expression over a 6-month period could be obtained in the dog eye after the subretinal injection of an IN mutant vector encoding GFP and could be monitored by angioretinography (S. Bonnel, S.P., C. Vetu, M. Abitbol, J.M., and C. Sarkis, unpublished data). Stable transgene expression in the retina by using a D64V nonintegrative lentiviral vector was also reported by Yanez-Munoz *et al.* (32), confirming the ability of episomal forms of HIV genomes to stably drive transgene expression.

Expression from these vectors could be increased, making them more suitable for clinical gene transfer, by incorporating regulatory cis sequences. A few studies have demonstrated the possibility of enhancing transgene expression from an episome by the incorporation of an insulator into the vector genome (35–37). In combination with other sequences, such as the APP 5' UTR or TH 3' UTR, as described for integrative lentiviral vectors (29), these modifications may result in very strong transgene expression from IN<sub>N</sub> vectors, if required.

## Conclusion

We have developed an IN-mutant lentivirus-derived vector that is nonintegrative and allows the formation of circular episomal genomes in the nucleus of transduced cells. We have shown that these nonintegrated forms are efficiently transcribed by the cellular machinery, consistent with previous reports based on virus observation and in contrast to vector-based studies. However, transgene expression with the mutant vector did not appear to be as efficient as with its WT counterparts. This transgene expression was transient in dividing cells and stable in nondividing cells. We have confirmed an absence of integration and, more importantly, we have demonstrated that these vectors drove transgene expression in the mouse striatum *in vivo* as efficiently as an integrative vector. This newly developed nonintegrative lentiviral vector retains all of the interesting features of lentiviral vectors but does not present the most important drawback to the clinical application of these

vectors: the risk of insertional mutagenesis. Moreover, the IN mutation also increases the safety of this vector by reducing the risk of formation of replication-competent recombinant particles. Because the viruses containing such a mutation are defective for replication (18, 38), recombinant particles would also be expected to be replication-defective. This generation of lentivirus-derived vectors thus overcomes a major hurdle to gene therapy and offers many application perspectives. It could be used in gene therapy strategies requiring transient transgene expression in dividing cells and in long-term treatments targeting nondividing cells, such as all treatments of CNS diseases.

## Methods

**Plasmids.** Two plasmids encoding an epitope-flagged IN, described by Petit *et al.* (18), were used to generate encapsidation plasmids: the plasmid BRU-IN<sub>WT</sub>, in which the IN is functional, and the plasmid BRU-IN<sub>N</sub>, in which the <sup>262</sup>RRK motif of the N region of the IN coding sequence is replaced by AAH, the equivalent motif of the Moloney murine leukemia virus IN. The BstZ171-SalI fragments of these two plasmids were inserted into the transcomplementation plasmid p8.91 described in ref. 39, replacing the original IN sequence and generating two plasmids, p8.91 IN<sub>WT</sub> and p8.91 IN<sub>N</sub>, encoding INs with and without the N substitution, respectively.

The plasmid pTrip-CMV-GFP-WPRE is derived from the plasmid p $\Delta$ 500 Trip-CMV<sub>min</sub>-WPRE described by Vogel *et al.* (40). The CMV-GFP fragment was amplified by PCR from the pEGFP N1 (Clontech, Mountain View, CA) with primers modified to add a MluI restriction site in 5' of the CMV (5'-GGGACGCGTATTA-ATAGTAATCAATTACGG-3') and a SpeI restriction site in 3' of the GFP (5'-CCCACTAGTTATGGCTGATTATGATCTAGA-3') (restriction sites are italicized). The PCR product was subcloned into the plasmid p $\Delta$ 500-Trip-CMV<sub>min</sub>-WPRE in place of the CMV<sub>min</sub> fragment by using MluI and SpeI restriction enzymes to generate the plasmid pTrip-CMV-GFP-WPRE.

The plasmid pTrip-CMV-NEO-WPRE is derived from the plasmid pTrip-CMV-GFP-WPRE. The NEO coding sequence was amplified by PCR from the pCDNA 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) with primers modified to add a AflIII restriction site in 5' (5'-GAGGACTTAAGCGCATGATTGAACAAGATGGATTGAC-3') and a EcoRI restriction site in 3' (5'-CCCAAGA-ATTCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGG-3'). This fragment was subcloned into the plasmid pIRES-EGFP (Clontech) in 3' of the CMV by using the AflIII and EcoRI restriction enzymes. The expression cassette CMV-NEO-IRES-GFP was then subcloned into the pTrip-CMV-GFP-WPRE in place of the GFP coding sequence by using the SnaBI and BsrGI restriction enzymes, generating the pTrip-CMV-NEO-IRES-GFP-WPRE. Finally, because the GFP appeared to be expressed very weakly, the IRES-GFP fragment was removed by using the SpeI restriction sites flanking this region to obtain the plasmid pTrip-CMV-NEO-WPRE.

**Cell Lines and Primary Cultures.** Human epithelial HeLa and 293T cells were grown in Dulbecco's modified medium supplemented with antibiotics and 10% FCS.

Primary cultures of cortical cells were set up from embryonic day 17 Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Female rats were killed by CO<sub>2</sub> asphyxiation, and embryos were removed from the uterine horns. Cortical tissue was dissected and rinsed in PBS supplemented with 0.6% glucose. For astrocyte culture, the PBS-glucose solution was removed and replaced with pyruvate-free DMEM containing 4.5 g/liter glucose and 0.58 g/liter L-glutamine supplemented with 10% FBS. The cells were plated and cultured in a humidified incubator at 37°C in a 10% CO<sub>2</sub>/90% air atmosphere. For neuron culture, the PBS-glucose solution was replaced with pyruvate-free DMEM containing 4.5 g/liter glucose and 0.58 g/liter L-glutamine supplemented with 100

g/ml transferrin, 25 g/ml insulin, 10 g/ml putrescine, 5 ng/ml sodium selenite, and 6.3 ng/ml progesterone (all from Sigma, St. Louis, MO). Tissue was mechanically dissociated in the serum-free culture medium, and cells were counted by trypan blue exclusion, plated at a density of 100,000 cells per cm<sup>2</sup> in polyornithine-coated cell-culture dishes, and cultured in a humidified incubator at 37°C, in a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere.

**Lentiviral Vectors.** Lentiviral vectors were generated by the transient transfection of 293T cells by using the calcium phosphate precipitation method. For all experiments, the IN<sub>N</sub> vector and the corresponding control IN<sub>WT</sub> vector were produced simultaneously. Cells were cotransfected with the vector plasmid (pTrip-CMV-GFP, pTrip-CMV-GFP-WPRE, or pTrip-CMV-NEO-WPRE), the transcomplementation plasmid (p8.91 IN<sub>WT</sub> or p8.91 IN<sub>N</sub>), and the plasmid encoding the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein (pMD-G). The medium was replaced 12 h after transfection and collected 36 h later. Supernatants were either used directly to transduce cell lines or concentrated. Supernatants were treated with DNase and passed through a filter with 0.45-μm pores. Viral particles were then concentrated by ultracentrifugation (90 min, 22,000 rpm, rotor SW28) and resuspended in 0.1 M PBS.

The HIV p24 Gag antigen was quantified for each stock by ELISA (HIV-1 P24 antigen assay; Beckman Coulter, Fullerton, CA) for titration.

In addition, GFP-expressing vectors were titered by transducing 80,000 293T cells in 24-well plates with serial dilution (5 μl, 5 × 10<sup>-1</sup> μl, 5 × 10<sup>-2</sup> μl, 5 × 10<sup>-3</sup> μl, and 5 × 10<sup>-4</sup> μl). Cells were harvested by centrifugation and resuspended in a fixative solution of 1% PFA 72 h after transduction. The number of GFP-positive cells was determined in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

For *NEO* stocks, RNA genomes were evaluated by dot blot assay. Genomic RNA was extracted from *NEO*-expressing vectors with the RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). Serial dilutions of RNA were blotted on a Hybond membrane (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), hybridized with a <sup>32</sup>P-labeled vector-specific DNA probe and quantified with a PhosphorImager using AIDA 2.43 software.

**Evaluation of Residual Integration Activity.** HeLa cells were seeded at a density of 50,000 cells per dish (3-cm diameter dish). The cells were transduced 24 h later with serial dilutions of IN<sub>N</sub> *NEO* vector (250, 50, 5, and 0.5 ng of p24), and of the IN<sub>WT</sub> *NEO* vectors (5, 5 × 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-1</sup>, 5 × 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-2</sup>, 5 × 10<sup>-3</sup>, and 10<sup>-3</sup> ng of p24). The

medium was removed 24 h later and replaced with medium supplemented with 1 mM G418. The medium was replaced every 3 days. Cells were grown until clones developed and were then stained with neutral red and fixed with ethanol. Clones on each flask were counted. We transduced cells in three replicate dishes for each condition, and results are expressed as the mean of three measurements.

**Transduction of Primary Cortical Cultures and Evaluation of the Rate of Transduction.** Confluent cells were transduced with equivalent numbers of TU of IN<sub>N</sub> GFP and IN<sub>WT</sub> GFP vectors. The cells were fixed at various times after transduction with 1% PFA in PBS. GFP-expressing cells were immunostained by using a rabbit polyclonal anti-GFP primary antibody (1:3,000; Abcam, Cambridge, U.K.) and a goat anti-rabbit FITC-conjugated secondary antibody (1:100; Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Both nonimmunoreactive and immunoreactive cells were counted in triplicate, in three representative fields per well. The results were expressed as a mean of the three experiments ± SEM. The statistical significance of the results was evaluated by one-way ANOVA.

**Stereotactic Injections and Histological Analysis.** We stereotactically injected 2 μl of IN<sub>WT</sub> GFP (10 × 10<sup>4</sup> TU) or IN<sub>N</sub> GFP (5 × 10<sup>4</sup> TU) into the brain of C3H adult mice (Janvier). Injections were performed in two subsites for each vector (from bregma: anteriority, +0.5; laterality, ±1.6; ventrality, -3.5/-4). Animals were anesthetized with pentobarbital and intracardially perfused with 4% PFA 1 week and 4 weeks after inoculation. Brains were removed, cryopreserved in 15% sucrose, and frozen in cold isopentane. Immunohistochemical analysis was performed on 20-μm cryostat sections by using a rabbit polyclonal primary antibody (1:3,000; Abcam). Primary antibodies were detected with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody coupled with an avidin-biotin amplification system (Vectastain ABC kit) and the VIP kit from Vector Laboratories (Burlingame, CA). All animals were maintained and treated according to the European Community guidelines.

We thank Pierre Charneau for his useful comments and advice and Pierre Sonigo for his contribution. We thank the Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie, the Institut pour la Recherche sur la Moëlle Épineière (IRME), and Retina France for supporting this work. S.P. was supported by a fellowship from Université Denis Diderot Paris 7, H.M. by a fellowship from IRME, and C. Serguera by France Alzheimer.

1. Sakhuja K, Reddy PS, Ganesh S, Cantiani F, Pattison S, Limbach P, Kayda DB, Kadan MJ, Kaleko M, Connelly S (2003) *Hum Gene Ther* 14:243–254.
2. Logvinoff C, Epstein AL (2001) *Hum Gene Ther* 12:161–167.
3. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM (1997) *Nat Genet* 17:314–317.
4. Abordo-Adesida E, Follenzi A, Barcia C, Sciascia S, Castro MG, Naldini L, Lowenstein PR (2005) *Hum Gene Ther* 16:741–751.
5. Haccin-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A (2003) *N Engl J Med* 348:255–256.
6. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM (2003) *Science* 300:1749–1751.
7. Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F (2002) *Cell* 110:521–529.
8. Killebrew DA, Troelstrup D, Shiramizu B (2004) *Cell Mol Biol* 50:581–589.
9. Gallagher B, Wang Z, Schymura MJ, Kahn A, Fordyce EJ (2001) *Am J Epidemiol* 154:544–556.
10. Themis M, Waddington SN, Schmidt M, von Kalle C, Wang Y, Al-Alfai F, Gregory LG, Nivskar M, Holder MV, Buckley SM, et al. (2005) *Mol Ther* 12:763–771.
11. Coffin JM (1996) in *Fields Virology*, eds Fields NB, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (Lippincott-Raven, Philadelphia), pp 1767–1847.
12. Farnet CM, Haseltine WA (1991) *J Virol* 65:6942–6952.
13. Stevenson M, Haggerty S, Lamonica CA, Meier CM, Welch SK, Wasiak AJ (1990) *J Virol* 64:2421–2425.
14. Engelman A, Englund G, Orenstein JM, Martin MA, Craigie R (1995) *J Virol* 69:2729–2736.
15. Wiskerchen M, Muesing MA (1995) *J Virol* 69:376–386.
16. Nakajima N, Lu R, Engelman A (2001) *J Virol* 75:7944–7955.
17. Wu Y (2004) *Retrovirology* 1:13.
18. Petit C, Schwartz O, Mammano F (2000) *J Virol* 74:7119–7126.
19. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) *Science* 272:263–267.
20. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11382–11388.
21. Blomer U, Naldini L, Verma IM, Trono D, Gage FH (1996) *Hum Mol Genet* 5:1397–1404.
22. Loewen N, Leske DA, Chen Y, Teo WL, Saenz DT, Peretz M, Holmes JM, Poeschla EM (2003) *J Gene Med* 5:1009–1017.
23. Saenz DT, Loewen N, Peretz M, Whitwam T, Barraza R, Howell KG, Holmes JM, Good M, Poeschla EM (2004) *J Virol* 78:2906–2920.
24. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhass U, Montagnier L, Charneau P (2000) *Cell* 101:173–185.
25. Zennou V, Serguera C, Sarkis C, Colin P, Perret E, Mallet J, Charneau P (2001) *Nat Biotechnol* 19:446–450.
26. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L (2000) *Nat Genet* 25:217–222.
27. Whitwam T, Peretz M, Poeschla E (2001) *J Virol* 75:9407–9414.
28. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) *J Virol* 73:2886–2892.
29. Brun S, Faucon-Biguet N, Mallet J (2003) *Mol Ther* 7:782–789.
30. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1998) *J Virol* 72:8150–8157.
31. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998) *J Virol* 72:9873–9880.
32. Yanez-Munoz RJ, Balagan KS, MacNeil A, Howe SJ, Schmidt M, Smith AJ, Buch P, MacLaren RE, Anderson PN, Barker SE, et al. (2006) *Nat Med* 12:348–353.
33. Schmidt M, Zickler P, Hoffmann G, Haas S, Wissler M, Muessig A, Tisdale JF, Kuramoto K, Andrews RG, Wu T, et al. (2002) *Blood* 100:2737–2743.
34. Chen H, Engelman A (2000) *J Virol* 74:8188–8193.
35. Ehrhardt A, Peng PD, Xu H, Meuse L, Kay MA (2003) *Hum Gene Ther* 14:215–225.
36. Chancham, P van Tjerperen T, McDoom I, Hughes JA (2003) *J Drug Target* 11:205–213.
37. Papapetrou EP, Ziros PG, Micheva ID, Zoumbos NC, Athanassassiadou A (2006) *Gene Ther* 13:40–51.
38. Cannon PM, Byles ED, Kingsman SM, Kingsman AJ (1996) *J Virol* 70:651–657.
39. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997) *Nat Biotechnol* 15:871–875.
40. Vogel R, Amar L, Thi AD, Saillour P, Mallet J (2004) *Hum Gene Ther* 15:157–165.

### 3. ARTICLE 2

Meunier A, Latremoliere A, Dominguez E, Mauborgne A, Philippe S, Hamon M, Mallet J, Benoliel JJ, Pohl M. Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB Blockade in Dorsal Spinal Cord Glia Attenuates Sciatic Nerve Injury-induced Neuropathic Pain in the Rat. Mol Ther. 2007 Apr ; 15(4) : 687-97

Les travaux décrits dans cet article ont été réalisés essentiellement par l'équipe Michel Pohl (INSERM UMR 713, Paris). Ma contribution à cet article se situe dans la production des vecteurs lentiviraux, qui a été réalisée au laboratoire en collaboration avec Alice Meunier. L'équipe de Michel Pohl nous a contacté dans le but de développer des vecteurs pour le transfert de gènes dans la moelle épinière. Lors des premières productions des vecteurs NF-kappaB, nous avons été confrontées à l'effet du transgène sur la production des particules lentivirales. Les titres obtenus étaient faibles. Nous avons donc été amenées à modifier le protocole standard, notamment en changeant les rapports des plasmides transfectés, afin d'améliorer les titres des vecteurs et de permettre leur utilisation *in vivo*.

# Lentiviral-mediated Targeted NF- $\kappa$ B Blockade in Dorsal Spinal Cord Glia Attenuates Sciatic Nerve Injury-induced Neuropathic Pain in the Rat

Alice Meunier<sup>1,2</sup>, Alban Latrémolière<sup>3</sup>, Elisa Dominguez<sup>1,2</sup>, Annie Mauborgne<sup>1,2</sup>, Stéphanie Philippe<sup>4</sup>, Michel Hamon<sup>3</sup>, Jacques Mallet<sup>4</sup>, Jean-Jacques Benoliel<sup>1,2</sup> and Michel Pohl<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR S 713, Paris, France; <sup>2</sup>Université Pierre et Marie Curie—Paris VI, Paris, France; <sup>3</sup>INSERM, UMR S 677, Paris, France; <sup>4</sup>LGN, UMR 7091, CNRS, Paris, France

Neuropathic pain developing after peripheral nerve injury is associated with altered neuronal and glial cell functions in the spinal cord. Activated glia produces algogenic mediators, exacerbating pain. Among the different intracellular pathways possibly involved in the modified glial function, the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) system is of particular interest, as numerous genes encoding inflammation- and pain-related molecules are controlled by this transcription factor. NF- $\kappa$ B is a pleiotropic factor also involved in central nervous system homeostasis. To study its role in chronic pain, it is thus essential to inhibit the NF- $\kappa$ B pathway selectively in activated spinal glial cells. Here, we show that when restricted to spinal cord and targeted to glial cells, lentiviral vector-mediated delivery of NF- $\kappa$ B super-repressor I $\kappa$ B $\alpha$  resulted in an inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway activated in the rat spinal cord after sciatic nerve injury (chronic constriction injury, CCI). Concomitantly, I $\kappa$ B $\alpha$  overproduction prevented the enhanced expression of interleukin-6 and of inducible nitric oxide synthase associated with chronic constriction injury and resulted in prolonged antihyperalgesic and antiallodynic effects. These data show that targeted blockade of NF- $\kappa$ B activity in spinal glia efficiently alleviates pain behavior in CCI rats, demonstrating the active participation of the glial NF- $\kappa$ B pathway in the development of neuropathic pain after peripheral nerve injury.

Received 11 September 2006; accepted 28 December 2006; advance online publication 13 February 2007. doi:10.1038/mt.sj.6300107

## INTRODUCTION

In addition to altering neuronal networks, peripheral nerve injury leads to the activation of spinal glial cells, resulting in increased production of inflammation- and pain-related molecules, including pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6), nitric oxide (NO), prostaglandins, and ATP (for reviews, see refs. 1, 2). Activated glial cells thus appear to be an important spinal site for the production of algogenic

mediators, and several mitogen-activated protein kinase pathways have been suggested to participate in the functional changes of glial cells.<sup>3–5</sup> The nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) system may contribute to these changes as it plays a key role in the regulated production of pro-inflammatory cytokines and in the cytokine-induced expression of major proteins of inflammatory and immune responses (for review, see ref. 6). In addition to the involvement of NF- $\kappa$ B in inflammation,<sup>7,8</sup> several recent reports suggest the NF- $\kappa$ B pathway has a more direct pain-related role. For example, in models of peripheral inflammation-induced pain or pharmacologically induced central pain, intrathecal administration of NF- $\kappa$ B inhibitors resulted in transitory attenuation of pain.<sup>9–11</sup> Repeated systemic administration of an inhibitor of the NF- $\kappa$ B-associated kinase complex (I $\kappa$ B kinase), which prevents NF- $\kappa$ B activation, also reduced hyperalgesia in rats.<sup>12</sup>

NF- $\kappa$ B is a pleiotropic factor also involved in transcriptional control of a wide variety of genes. Convergent studies demonstrated that it participates in central nervous system homeostasis, playing an important antiapoptotic and antiexcitotoxic role in neurons (for review, see refs. 13 and 14). Therefore, to evaluate the role of NF- $\kappa$ B in functional changes of glial cells, in the increased production of pain-related molecules, and in chronic neuropathic pain, cell category non-discriminating inhibition of NF- $\kappa$ B appears inadequate and we hypothesized that a viral vector-targeted blockade of NF- $\kappa$ B restricted to spinal glial cells would be a valuable approach.

In most cells, NF- $\kappa$ B is kept inactive in the cytoplasm by an inhibitory protein of the I $\kappa$ B family. Numerous stimuli may trigger the activation of I $\kappa$ B kinase, which phosphorylates I $\kappa$ B, leading to its ubiquitination and proteasomal degradation. Subsequently, NF- $\kappa$ B translocates into the nucleus and induces transcription of target genes. I $\kappa$ B thus offers one possible means to block the NF- $\kappa$ B pathway. In particular, the “super-repressor” (sr) I $\kappa$ B $\alpha$ , a degradation-resistant form of I $\kappa$ B $\alpha$ , has been shown to block NF- $\kappa$ B activity.<sup>15</sup> We generated pseudotyped lentiviral (LV) vectors to drive expression of srI $\kappa$ B $\alpha$ , and we assessed the possibility of a local and glial cell-oriented blockade of the NF- $\kappa$ B pathway as well as its impact in a well-characterized rat model of neuropathic pain.

Correspondence: Michel Pohl, INSERM, U 713, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 91, Boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France. E-mail: pohl@ext.jussieu.fr



## RESULTS

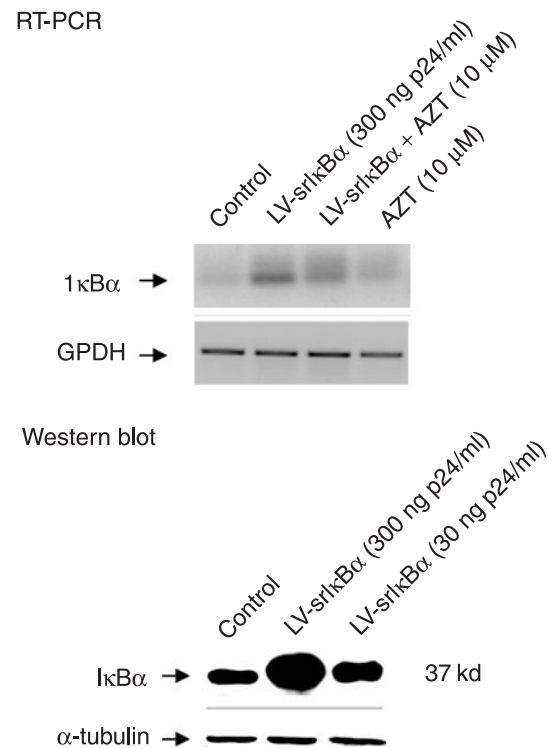
### SrI $\kappa$ B $\alpha$ production from LV-srI $\kappa$ B $\alpha$

Infection of 293T cells with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  resulted in an accumulation of I $\kappa$ B $\alpha$  that was strongly attenuated when cells were incubated in the presence of reverse-transcriptase inhibitor AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine) (**Figure 1**). Production of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ -derived I $\kappa$ B $\alpha$ -like immunoreactive material (I $\kappa$ B $\alpha$ -IR) was further demonstrated in both 293T cells and rat glial cell primary cultures (data not shown). Western blot analysis of total proteins extracted from glial cells infected with increasing concentrations of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  revealed viral titer-dependent production of I $\kappa$ B $\alpha$  protein (**Figure 1**).

### LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ prevents lipopolysaccharide-evoked NF- $\kappa$ B intranuclear translocation

In lipopolysaccharide (LPS)-treated mixed glial cell cultures, NF- $\kappa$ B-like immunoreactive material (NF- $\kappa$ B-IR) massively translocated from the cytoplasm to the nucleus (**Figure 2a,b**, in red). In contrast, in glial cells infected with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  (**Figure 2c**, I $\kappa$ B-IR in green), LPS failed to induce NF- $\kappa$ B translocation, as demonstrated by the cytoplasmic localization of NF- $\kappa$ B-IR (**Figure 2d**, in red) and its co-localization with I $\kappa$ B $\alpha$ -IR (**Figure 2e**, in yellow). This cytoplasm-restricted localization of NF- $\kappa$ B-IR under LPS activation was observed in all cells infected with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ . Infection of glial cells with equivalent concentrations of control LV-enhanced green fluorescent protein (LV-EGFP) vector (**Figure 2f**, green fluorescence) did not affect the LPS-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B (**Figure 2g**, in red), supporting the specific inhibitory effect of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ . The co-localization of transgene-derived EGFP and NF- $\kappa$ B-IR accumulating in nuclei of LPS-stimulated cells was demonstrated in double-labeling experiments (**Figure 2h**, in yellow). Western blot analysis of nuclear fraction proteins extracted from glial cell culture (**Figure 2i**) confirmed that pre-treatment of cells with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  completely inhibited the LPS-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. The potency of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  to inhibit NF- $\kappa$ B-induced gene expression was demonstrated in the luciferase reporter gene assay. LPS stimulation of glial cells co-transfected with plasmid bearing 2 X NF $\kappa$ B-FLuc reporter gene and plasmid containing Renilla luciferase gene driven by herpes simplex virus thymidine kinase promoter resulted in a selective induction of NF $\kappa$ B-FLuc expression. Compared with controls (non-infected or control LV-EGFP-infected cells), infection of cells with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  48 hours before LPS addition specifically inhibited the evoked 2 X NF $\kappa$ B-FLuc reporter gene activity (**Figure 2j**).

Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments performed on RNA extracted from glial cells (**Figure 3**) showed that a 3-hour incubation of cell cultures in the presence of LPS resulted in a large increase of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and inducible nitric oxide synthase (iNOS) messenger RNA (mRNA) concentrations. Infection of cells with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  48 hours before LPS stimulation prevented or significantly reduced the LPS-induced enhancement of cytokines and iNOS mRNA levels compared with controls. Comparable results were obtained in LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ -infected glial cells stimulated for 1 hour with TNF $\alpha$  (data not shown). On the other hand, infection of cells with the same amount of LV-EGFP



**Figure 1** LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  drives the production of srI $\kappa$ B $\alpha$  in glial cells *in vitro*. Control (non-infected) or LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ -infected (300 of p24/ml) glial cell primary cultures were incubated (or not) in the presence of 10  $\mu$ M reverse-transcriptase inhibitor AZT. The presence of mRNA encoding srI $\kappa$ B $\alpha$  was assessed using semi-quantitative RT-PCR on 0.5  $\mu$ g total RNA extracted from cell cultures 48 hours after infection. srI $\kappa$ B $\alpha$  specific amplification was compared with amplification from control GPDH mRNA. Production of srI $\kappa$ B $\alpha$  protein was further verified in glial cells infected with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  (300 or 30 ng of p24/ml) using western blot analysis, which showed a viral titer-dependent accumulation of srI $\kappa$ B $\alpha$ .

had no inhibitory effect on LPS-evoked accumulation of any of the analyzed mRNA (**Figure 3**).

### LV vectors allow dorsal horn-restricted transgene expression in glial cells

Saline or control LV-EGFP (60 ng of p24) micro-injection using a glass capillary needle induced limited lesion (250  $\mu$ m rostral-caudally) of the spinal cord. As shown in **Figure 4a**, injection of 2  $\mu$ l LV-EGFP into the right dorsal horn of the spinal cord resulted 1 week later in EGFP fluorescence strictly restricted to the dorsal horn parenchyma. EGFP production remained constant throughout the 4 weeks of the experimental procedure and was still present 6 months after injection (data not shown). In the lumbar enlargement, transgene-derived protein was visualized approximately 2–3 mm rostral and 2–3 mm caudal to the site of injection (**Figure 4b**). One week after LV-EGFP injection, most of the EGFP staining co-labeled with the astrocyte-specific marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) (**Figure 4c–e**). Numerous EGFP-positive cells also co-stained for the microglial marker Ox42 (**Figure 4f–h**). However, only 8.1% of cells were double-labeled with EGFP and the neuronal marker NeuN (**Figure 4i–k**). This pattern of labeling remained similar throughout the 4 weeks of observation (data not shown). Moreover, in neurons, EGFP

fluorescence was always weaker. These *in vivo* observations are comparable to those from *in vitro* experiments using primary neuron/glia (50%/50%) co-cultures prepared from rat spinal cord. Indeed, infection of cell co-cultures with LV-EGFP also resulted in EGFP fluorescence localized mainly in GFAP-positive astrocytes and rarely in NeuN-positive neurons (data not shown).

Sensitive RT-PCR experiments failed to detect EGFP transcripts in right lumbar (L3–L5) dorsal root ganglion or brainstem, suggesting that neurons projecting to the dorsal spinal cord were not infected by LV vectors (data not shown).

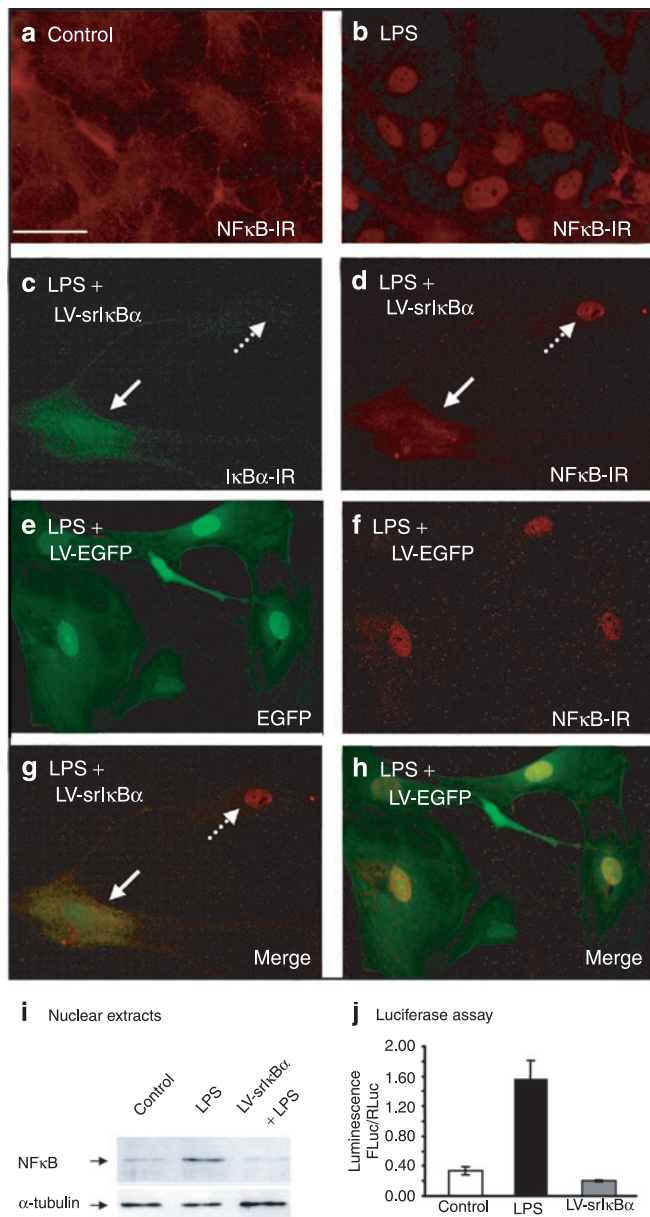
Similarly, injection of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  (60 ng of p24) into the right dorsal horn of the spinal cord resulted in accumulation of I $\kappa$ B $\alpha$ -IR restricted to the ipsilateral side of the injection (Figure 5a), and the pattern of I $\kappa$ B $\alpha$ -IR distribution was comparable to the pattern of EGFP staining in control LV-EGFP-infected animals (astrocytes and microglial cells; data not shown). Western blot analysis performed 1 week after viral vector injection revealed

overproduction of I $\kappa$ B $\alpha$  protein in the spinal cord dorsal horn of rats injected with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  (Figure 5b).

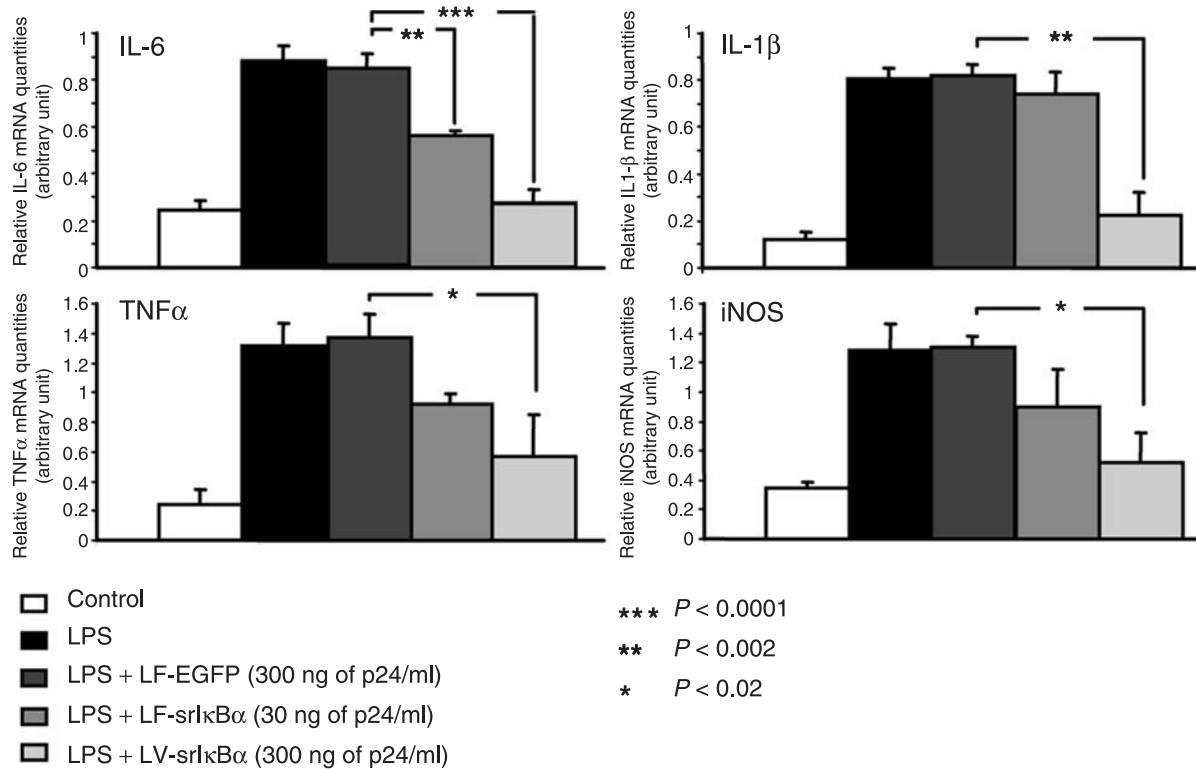
### srI $\kappa$ B $\alpha$ inhibits NF- $\kappa$ B nuclear translocation and attenuates IL-6 and iNOS expression

Western blot analysis of nuclear fraction proteins extracted from ipsilateral lumbar dorsal spinal cord showed that, compared with sham animals, chronic constriction injury (CCI) induced an early (after 6 hours) NF- $\kappa$ B nuclear translocation that was still present 48 hours after CCI (Figure 6a). As shown in Figure 6b, CCI-evoked enhanced NF- $\kappa$ B nuclear translocation (48 hours after the nerve lesion) was inhibited in animals infected with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  (60 ng of p24) 1 week before nerve lesion.

Real-time RT-PCR experiments (Figure 7) showed that 7 days after the sciatic nerve constriction, relative concentrations of IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA in the dorsal horn of the spinal cord (ipsilateral to the lesion) were approximately 7- ( $P < 0.005$ ,  $n = 3$ ) and 2.5-fold ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ) higher, respectively, than in naïve rats ( $n = 3$ ). On the other hand, TNF $\alpha$  and iNOS mRNA levels remained comparable to those measured in naïve rats (data not shown). Interestingly, 4 weeks after CCI, iNOS mRNA levels were markedly increased in the dorsal horn of the spinal cord, almost eightfold ( $P < 0.02$ ,  $n = 3$ ) those measured in naïve rats ( $n = 4$ ). At this time point, IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA levels were no longer significantly different from those determined in the dorsal spinal cord of naïve rats (data not shown). Whereas IL-1 $\beta$  mRNA levels remained unaffected by viral vector injection ( $P = 0.59$ ,  $n = 4$ ), the CCI-induced increased levels of IL-6 mRNA at 7 days ( $P < 0.005$ ,  $n = 4$ ) and the enhanced concentration of iNOS mRNA at 28 days after sciatic nerve injury ( $P < 0.02$ ,  $n = 3$ ) were almost completely suppressed by LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  treatment (Figure 7a,b).



**Figure 2** LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ -mediated overexpression of srI $\kappa$ B $\alpha$  in primary cultures of glial cells blocks intranuclear translocation of NF- $\kappa$ B and luciferase reporter gene activity evoked by LPS. **(a)** In control (untreated) glial cell cultures, NF- $\kappa$ B-like immunoreactive material (NF- $\kappa$ B-IR, p65 subunit, in red) is distributed throughout the cytoplasm. **(b)** After treatment with LPS (1  $\mu$ g/ml, 1 hour) NF- $\kappa$ B-IR is detected mainly in cell nuclei. **(c)** Forty-eight hours after infection with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  (300 ng of p24/ml), the majority of the cells (bold arrows) showed transgene-derived I $\kappa$ B $\alpha$ -IR (in green). Dashed arrows point to cells without detectable I $\kappa$ B $\alpha$ -IR (presumably non-infected). **(d)** Double-labeling experiments revealed that LPS treatment evoked NF- $\kappa$ B-IR (in red) translocation and accumulation only in the nucleus of uninfected cells, devoid of I $\kappa$ B $\alpha$ -IR (dashed arrow). In contrast, in cells overproducing I $\kappa$ B $\alpha$ -IR, nuclear translocation of NF- $\kappa$ B-IR was completely abolished and NF- $\kappa$ B-IR was sequestered in the cell cytoplasm (bold arrow). After stimulation with LPS, LV-EGFP pre-treated glial cell cultures (300 ng of p24/ml, 48 hours; EGFP green fluorescence) **(e)** showed strict nuclear localization of NF- $\kappa$ B-IR (in red) **(f)**. Panels **(g)** and **(h)** represent combined I $\kappa$ B $\alpha$ -IR/NF- $\kappa$ B-IR immunofluorescence and EGFP fluorescence/NF- $\kappa$ B immunofluorescence, respectively. Scale bar = 20  $\mu$ m. **(i)** In a comparable set of experiments, we analyzed nuclear protein fraction by western blotting. LPS-induced accumulation of NF- $\kappa$ B-IR in nuclear fraction was prevented in LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ -infected cells. **(j)** In cells transfected with 2 X NFB-FLuc reporter gene plasmid and TK-RLuc plasmid, and infected (or not) with control LV-EGFP, LPS treatment (1 hour) induced Luc activity. On the other hand, infection of transfected cells with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  completely prevented the LPS-induced Luc activity. Results represent ratios of luminescence from the NFB-FLuc to TK-RLuc luminescence (means  $\pm$  SEM from three independent experiments).



**Figure 3** Infection of glial cell cultures with LV-srIκBα reduces LPS-induced expression of pro-inflammatory cytokines and iNOS. Semi-quantitative RT-PCR was performed with specific primers on 0.5 μg of total RNA extracted from control, LV-EGFP, and LV-srIκBα-infected cells incubated with LPS (1 μg/ml, 3 hours). Data (n = 3 for each group) are expressed in arbitrary units representing 260 nm optical density of cytokines or iNOS specific RT-PCR products/260 nm optical density of GPDH RT-PCR products. Data represent means ± SEM of three independent experiments.

**srIκBα attenuates CCI-evoked thermal hyperalgesia and mechanical and cold allodynia**

Hindpaw skin temperatures, measured with a JADE Middle Wave Infra-Red (3–5 μm) camera, did not significantly differ between naïve (27.5 ± 1.5 °C), CCI (contralateral paw 27.2 ± 1.6 °C; ipsilateral paw 27.0 ± 1.4 °C), and spinal cord injected CCI (contralateral paw 27.5 ± 0.7 °C; ipsilateral paw 27.3 ± 0.7 °C) rats. Injection of LV-EGFP or LV-srIκBα into the dorsal horn of the spinal cord of control (non-CCI) animals did not affect their sensitivity to mechanical or thermal stimulations. The right hindpaw (lesioned side) of CCI animals showed reduced paw withdrawal latencies (PWLs) to heat stimulation compared with baseline latency (before CCI; **Figure 8a**). Indeed, a significant (P < 0.001) and constant thermal hyperalgesia was established at 7 days (ΔPWL = -4.02 ± 0.42 seconds, n = 10), 14 days (ΔPWL = -4.45 ± 0.55 seconds, n = 10), and 21 days (ΔPWL = -4.51 ± 0.32 seconds, n = 10) after the sciatic nerve constriction. Starting from the first time point of behavioral evaluation (i.e., 7 days after sciatic nerve constriction), rats infected with LV-srIκBα showed significantly reduced CCI-evoked thermal hyperalgesia (ΔPWL = -2.48 ± 0.30 seconds, P < 0.02, n = 18) compared with paired control-CCI rats. This reduction of CCI-induced thermal hyperalgesia in rats injected with LV-srIκBα persisted during the whole observation period, i.e., for 3 weeks (14 days ΔPWL = -1.98 ± 0.42 seconds, P < 0.005, n = 15; 21 days ΔPWL = -2.22 ± 0.39 seconds, P < 0.01, n = 15). Two-factor analysis of variance revealed a significant effect of treatments (control, control-CCI, and

LV-srIκBα-CCI; F = 68.7, P < 0.0001) but neither a significant effect of time (7 days, 14 days, 21 days; F = 0.016, P = 0.98) nor a treatment–time interaction (F = 0.44, P = 0.78).

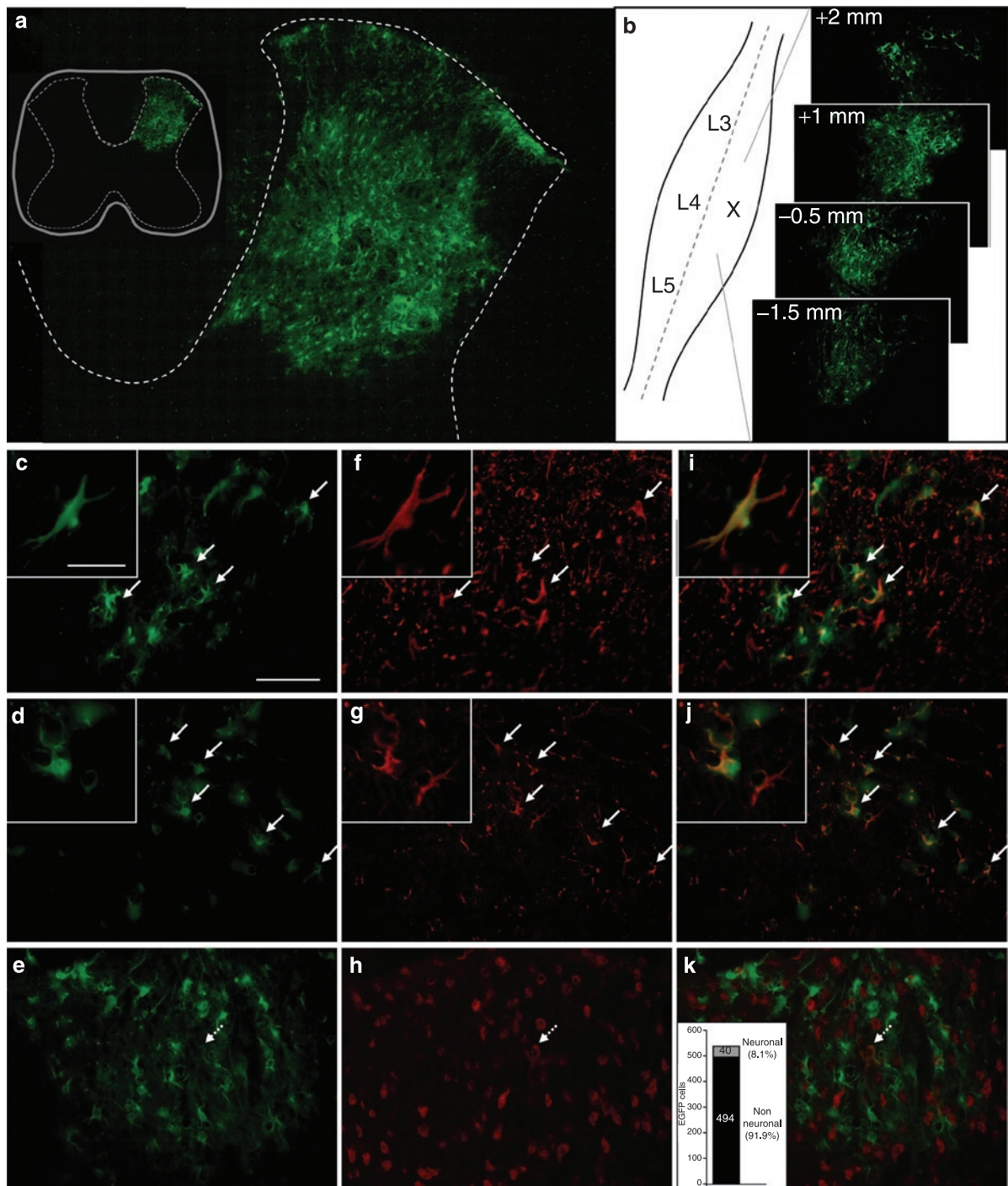
Mechanical hypersensitivity to stimulation with von Frey filaments was fully developed 14 days after the lesion (7 days ΔPWT = -3.1 ± 2.2%, n = 8; 14 days ΔPWT = -53.8 ± 5.4%, n = 8; 21 days ΔPWT = -42.8 ± 2.6%, n = 8) compared with the baseline thresholds before CCI (**Figure 8b**). In comparison with paired control-CCI rats, LV-srIκBα-treated animals exhibited reduced mechanical allodynia 14 days (ΔPWT = -33.6 ± 3.3%, P < 0.01, n = 8) and 21 days (ΔPWT = -24.7 ± 6.8%, P < 0.02, n = 7) after CCI.

Finally, as shown in **Figure 8c**, 7, 14, and 21 days after CCI, right ipsilateral paws were hypersensitive to cold stimuli (duration of paw withdrawal (PWt) at 7 days = 86.8 ± 8.1 seconds, n = 7; 14 days PWt = 74.8 ± 9.1 seconds, n = 7; 21 days PWt = 35.7 ± 4.6 seconds, n = 7). Infection of CCI rats with LV-srIκBα reduced significantly the nerve injury-evoked cold allodynia at 7 days (PWt = 59.8 ± 9 seconds, P < 0.05, n = 9) and 14 days (PWt = 48.5 ± 7.1 seconds, P < 0.05, n = 9) compared with paired control-CCI rats. This effect was no longer significant 21 days after CCI (PWt = 27.3 ± 7.2 seconds, P > 0.05, n = 9).

**DISCUSSION**

The present study shows that local, targeted LV-mediated production of srIκBα, inhibiting NF-κB activity strongly



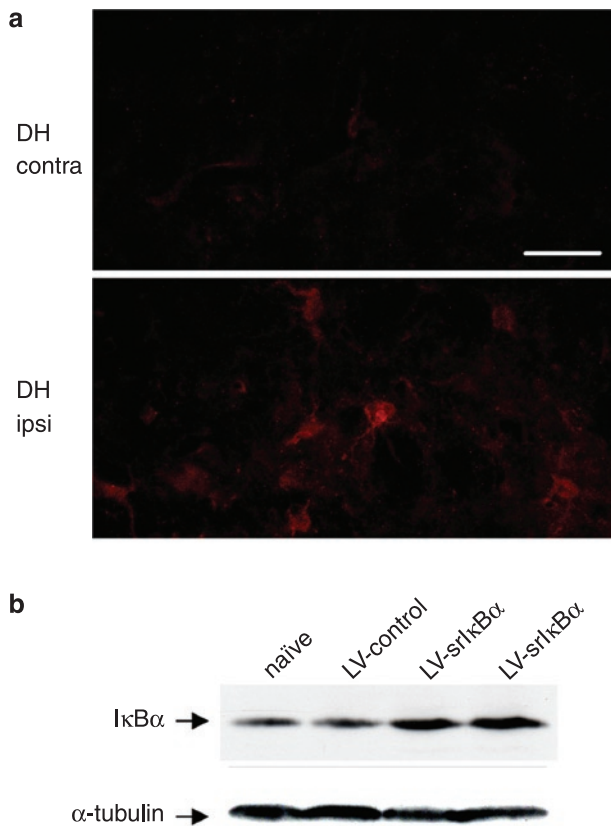


**Figure 4** *In vivo* injection of lentiviral-derived vectors into the rat spinal cord allowed dorsal horn–restricted expression of transgene preferentially in glial cells. **(a)** Micro-injection of LV-EGFP resulted in EGFP fluorescence restricted to the ipsilateral dorsal horn of the spinal cord. **(b)** Single injections of viral suspension resulted in a rostro-caudal distribution of the vector through approximately 5 mm. Immunofluorescence experiments performed with antibodies raised against specific markers of astrocytes (GFAP), microglia (Ox42) or neurons (NeuN) showed that most EGFP fluorescent cells **(c,d,e)** contained also GFAP-LM **(f)** or Ox42-LM **(g)**. Only scarce cells with weak EGFP fluorescence (dashed arrow, **e**) were colabeled with NeuN antibodies **(h)**. Panels **i, j** and **k** represent combined fluorescence for EGFP and GFAP, Ox-42 or NeuN immunofluorescence, respectively. Scale bar = 50  $\mu$ m or 20  $\mu$ m in small windows. Estimated from spinal cords of four LV-EGFP–injected rats, neuronal profiles containing EGFP represented approximately 8% of total EGFP expressing cells (graph in **k**).

preferentially in glial cells of the dorsal horn of the spinal cord, resulted in prolonged antihyperalgesic and antiallodynic effects in a rat model of CCI-induced neuropathic pain. Furthermore, the sciatic nerve injury–induced enhanced intranuclear translocation

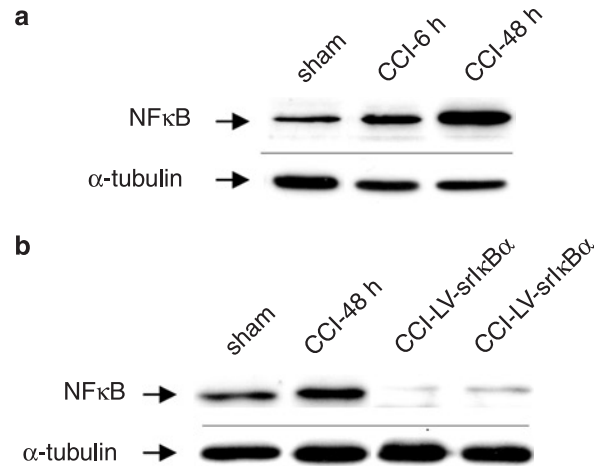
of NF- $\kappa$ B in the spinal cord was inhibited after local administration of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ , which also prevented the CCI-evoked early accumulation of pro-inflammatory cytokine IL-6 mRNA and the delayed increase of iNOS mRNA.





**Figure 5** LV-srIκBα delivery into the rat spinal cord resulted in IκBα-IR accumulation in the dorsal horn of the spinal cord. **(a)** IκBα-IR-positive cellular profiles were observed only in LV-srIκBα-infected right (ipsilateral) dorsal horn 2 weeks after vector injection. Scale bar = 25 μm. **(b)** Western blot analysis of protein extracts from the right dorsal part of the lumbar spinal cord (L3–L5) of naive, control LV vector-injected rats or animals (two distinct rats) injected with LV-srIκBα was performed 1 week after injection. The blot was successively incubated with IκBα and α-tubulin antibodies.

In contrast to the known anti-inflammatory potency of NF-κB inhibition (for review, see ref. 6), several recent reports have suggested that this transcription factor might also be related to exaggerated pain. For example, the NF-κB inhibitor pyrrolidinedithiocarbamate, a free radical scavenger with moderate specificity, showed an antiallodynic effect in models of pain evoked by intrathecal dynorphin or perisciatic zymosan administration.<sup>9,11</sup> Intrathecal delivery of NF-κB “decoy” oligodeoxynucleotides also revealed NF-κB to be implicated in peripheral inflammation-associated hyperalgesia.<sup>10</sup> Repeated intraperitoneal administration of a specific inhibitor of IκB kinase also showed anti-allodynic potency in a CCI model of neuropathic pain.<sup>12</sup> However, in these studies, the contribution of peripheral compared with central inhibition of NF-κB and the impact of the anti-inflammatory effect of the NF-κB blockade remain unclear. Moreover, the approaches used in these latter studies lead to global NF-κB blockade without considering the clearly deleterious consequences of NF-κB inhibition in neurons,<sup>14,16</sup> making it difficult to evaluate the specific role of NF-κB in spinal glial cells and its implication in neuropathic pain, as assessed in our study. Using a spinal micro-injection procedure and LV-derived vector, we were able strongly and with

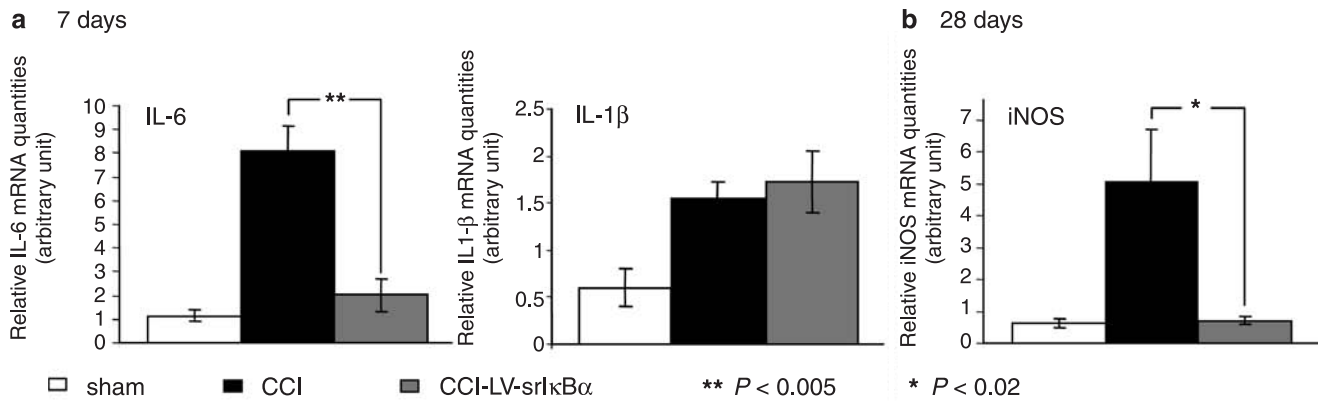


**Figure 6** Chronic constriction injury (CCI)-induced nuclear accumulation of NF-κB in the dorsal lumbar spinal cord was abolished in rats injected with LV-srIκBα. **(a)** Western blot analysis of nuclear fraction proteins extracted from the right dorsal part of the lumbar spinal cord (L3–L5) of naive animals or animals 6 and 48 hours after CCI. **(b)** In animals injected with LV-srIκBα (CCI-LV-srIκBα, two distinct rats) and subjected 1 week later to CCI, western blot analysis revealed complete inhibition of NF-κB accumulation in nuclear extracts (48 hours after the nerve lesion) from the right dorsal horn of the spinal cord. The blot was successively incubated with NF-κB and α-tubulin antibodies.

an important selectivity to inhibit NF-κB activity in glial cells of the dorsal spinal cord.

Consistent with previous reports showing that primo-injection of LV vectors into the brain evoked a negligible inflammatory reaction,<sup>17</sup> we found that direct injection of LV vector into the rat spinal cord induced only minor injury of the spinal parenchyma without glial activation and scar formation far from the injection site. The harmlessness of intraspinal delivery was further supported by the lack of behavioral alterations in rats injected with saline or control LV-EGFP vector. Although human immunodeficiency virus (HIV)-1-derived vectors pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope and conveying cytomegalovirus (CMV) promoter were originally reported to transduce mostly neuronal cells in brain structures,<sup>17,18</sup> several recent reports have also demonstrated an important proportion of infected astrocytes.<sup>19,20</sup> Combining fluorescence and immunohistochemistry studies, we show here that injection of LV-(CMV)-EGFP into the dorsal horn of the rat spinal cord led to strong and preferential EGFP expression in astrocytes and microglial cells, with only approximately 8% of neurons expressing EGFP. Our observations fit well with a recent report showing that administration of similar vesicular stomatitis virus-pseudotyped HIV-1-derived vector into the spinal cord mainly resulted in transduction of glial cells,<sup>21</sup> suggesting that the vector’s tropism may be different in distinct regions of the central nervous system.

Although CCI of the sciatic nerve has been reported to be associated with NF-κB activation in dorsal root ganglion neurons and in Schwann cells,<sup>22</sup> we also observed accumulation of NF-κB-IR in dorsal spinal cord nuclear extracts of CCI rats, which suggests a rapid and prolonged spinal activation of NF-κB as well as an early implication of NF-κB in the spinal response to peripheral nerve injury. At the spinal level, activation of NF-κB



**Figure 7** Injection of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  into the dorsal spinal cord prevented chronic constriction injury (CCI)-evoked enhanced expression of IL-6 and iNOS but not of IL-1 $\beta$  in the dorsal lumbar spinal cord. Real-time RT-PCR was performed on total RNA extracted from the right dorsal horn of the lumbar (L3–L5) spinal cord of naive, CCI, or LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ -treated CCI rats ( $n = 3$ –4 for each group). **(a)** IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA relative quantities 7 days after CCI. LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  treatment prevented the CCI-induced accumulation of IL-6 mRNA. **(b)** The late increase of iNOS mRNA relative concentrations observed 28 days after CCI was also abolished in LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ -treated CCI rats. Each sample, PCR-amplified in triplicate, was normalized with GPDH as reporter gene. Data represent mean  $\pm$  SEM.

has also been reported in peripheral inflammation-induced pain and after intrathecal administration of HIV envelope glycoprotein gp120, which evokes behavioral changes characteristic of ongoing pain.<sup>10–12</sup> Interestingly, after spinal cord injury associated with NF- $\kappa$ B activation, transgenic mice expressing the I $\kappa$ B $\alpha$  inhibitory protein under the control of the GFAP promoter show a complete loss of NF- $\kappa$ B signaling and of upregulation of pro-inflammatory cytokines at the spinal level, suggesting that, in such conditions, NF- $\kappa$ B activation occurred essentially in spinal cord astrocytes.<sup>23</sup>

Peripheral nerve injury is also associated with rapid and enhanced production of pro-inflammatory cytokines in the spinal cord, where they clearly contribute to nociceptive processing (for review, see ref. 24). In agreement with a previous study,<sup>25</sup> IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA levels in the dorsal spinal cord were strongly enhanced 7 days after CCI. However, we observed that CCI was associated with a strong but delayed increase of iNOS mRNA concentration 4 weeks after nerve lesion. We thus assessed both the early and prolonged possible effects of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  administration on the spinal expression of these proteins. Interestingly, LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  injection almost completely prevented the CCI-induced increase of IL-6 mRNA concentrations in the dorsal spinal cord but not that of IL-1 $\beta$  mRNA. Even though *in vitro* observations do not always translate to *in vivo* conditions, we found that the intrinsic efficacy of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  could not explain this marked differential effect *in vivo*, as LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  prevented with similar efficacy the LPS (or TNF $\alpha$ )-evoked expression of both cytokines in primary glial cell cultures. Our data rather suggest that CCI-induced IL-1 $\beta$  overproduction may be mediated/compensated for by a distinct signaling pathway or that IL-1 $\beta$  expression was induced in cell types different from those infected with LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ . Participation of an NF- $\kappa$ B-independent mechanism in the regulation of IL-1 $\beta$  expression was also shown in human synoviocytes, where adenoviral vector-mediated production of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibited IL-6 but not IL-1 $\beta$  overproduction.<sup>26</sup> The p38 mitogen-activated protein kinase, known to participate in the control of IL-1 production, may represent such a parallel pathway independent of NF- $\kappa$ B

signaling,<sup>27</sup> especially as p38 mitogen-activated protein kinase is activated in spinal glial cells after peripheral nerve injury.<sup>4</sup> Given that the CCI-induced overproduction of IL-1 $\beta$  precedes that of IL-6,<sup>25</sup> that IL-1 $\beta$  is an important inducer of IL-6, and that IL-1 $\beta$  requires NF- $\kappa$ B binding sites to induce IL-6 production in several cell types, including rat astrocytes,<sup>28–30</sup> we can speculate that the CCI-evoked IL-6 overexpression in spinal glia is NF- $\kappa$ B dependent and that IL-1 $\beta$  represents an important link.

In addition to cytokine expression upregulation, we observed that CCI was also associated with a strong but delayed increase of iNOS mRNA concentrations in dorsal spinal cord 4 weeks after nerve lesion. At the spinal level, overproduction of iNOS expression also has been demonstrated in activated astrocytes after peripheral inflammation.<sup>31</sup> In fact, the presence of reactive astrocytes producing NO in response to the induced iNOS expression, in particular by IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ , appears to be a hallmark of traumatic, neurotoxic, or inflammatory brain injury (for review, see ref. 32). The CCI-associated late increase of iNOS mRNA concentrations was also markedly reduced in LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ -injected rats, suggesting the involvement of an NF- $\kappa$ B-dependent pathway, and supporting the long-term efficacy of LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ . These latter data are consistent with previous reports showing that *in vitro* the induction of transcription of the iNOS gene in human primary astrocytes by various cytokines is NF- $\kappa$ B dependent and requires IL-1 $\beta$ ,<sup>33</sup> and that *in vivo* intrathecal administration of IL-1 $\beta$  induces iNOS expression in rat spinal cord.<sup>34</sup>

The LV-srI $\kappa$ B $\alpha$ -mediated strong inhibition of NF- $\kappa$ B together with the almost complete prevention of CCI-induced increase of IL-6 and iNOS expression at the spinal level strongly supports our behavioral results. Indeed, both IL-6 and iNOS are known to participate in pain processing. In addition to directly sensitizing nociceptors and spinal cord neurons,<sup>35,36</sup> IL-6 stimulates glial cells through a positive feedback loop, promoting its own production and participating in glial activation.<sup>37,38</sup> The nitric oxide synthase product NO has also been shown to play an important role in spinal nociceptive processing (for review, see ref. 39). Spinal glia-derived NO, in particular, has been proposed

to participate in long-term presynaptic facilitation of primary afferent fibers.<sup>40</sup> In addition to the enhanced expression of spinal iNOS after peripheral inflammation,<sup>31</sup> the participation of spinal NO in inflammatory pain is further supported by data showing that iNOS contributes to the late phase of thermal hyperalgesia.<sup>41</sup> Our demonstration of a peripheral nerve injury-associated increase of iNOS mRNA concentrations in the dorsal spinal cord suggests that the putatively glial cell-derived NO might also participate in CCI-induced prolonged pain.

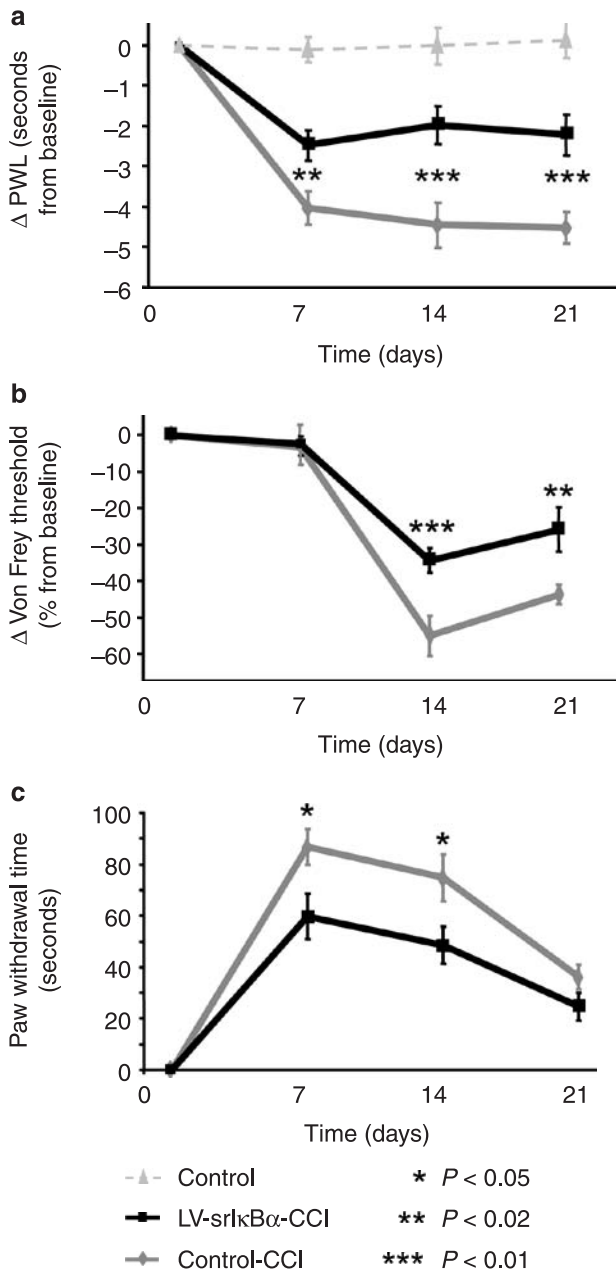
An important finding of our study is that local inhibition of NF-κB activity in glial cells of the dorsal spinal cord was sufficient to attenuate the thermal hyperalgesia and mechanical allodynia that develop after CCI of the sciatic nerve. The antihyperalgesic and antiallodynic effects of LV-srIκBα, mediated, at least in part, through the prevention of IL-6 and

iNOS overexpression, remained constant for 21 days after lesion. A moderate but significant antiallodynic effect to cold stimulus was also observed 7 and 14 days after CCI but not 21 days after the nerve injury. LV-mediated transgene production was sustained throughout the 4 weeks of experimental procedure and was still detected 6 months after spinal administration. However, further experiments are necessary to evaluate the long-term impact of NF-κB blockade in spinal glial cells. Although LV-srIκBα treatments strongly inhibited the CCI-associated increase of NF-κB activity and the enhanced expression of IL-6 and iNOS, single administrations of LV-srIκBα attenuated but did not completely abolish nociceptive behavior in CCI rats. In fact, in addition to the persistent overexpression of IL-1β, known as a potent hyperalgesic agent,<sup>42,43</sup> NF-κB-independent signaling pathways may also have contributed to the spinal plastic changes that participate in the development of neuropathic pain.<sup>4,44</sup>

The activation of the NF-κB signaling pathway in neurons has been shown to have important consequences for neuronal survival and plasticity.<sup>14,16</sup> The effect of its activation in glial cells is, however, less clear. It was thus important to assess its role in the production of glial pro-algesic molecules and its impact on neuropathic pain. Our study shows that selective inhibition of NF-κB activity in glial cells of the dorsal spinal cord resulted in prolonged antihyperalgesic and antiallodynic effects, possibly through the prevention of CCI-associated expression of IL-6 and iNOS. Thus, our results demonstrate the active role of this glial pathway in exaggerated pain states that develop after a peripheral nerve lesion.

**MATERIALS AND METHODS**

**Plasmids.** The expression plasmid pTrip-CMV-WPRE<sup>45</sup> (gift from Dr. Hamid Mammeri, UMR CNRS 7091, Paris, France) was used to produce LV vectors. The plasmid containing the IκBα super-repressor (srIκBα, *i.e.*, IκBα in which Ser-32 and Ser-36 were substituted by alanine) was a gift from Dr. Anning Lin (University of Chicago, IL). The coding sequence of srIκBα or EGFP was inserted (*Bam*HI/*Xho*I) under the transcriptional control of CMV promoter into pTrip-CMV-WPRE. The encapsidation



**Figure 8** Rats injected with LV-srIκBα into the dorsal horn of the spinal cord exhibited attenuated chronic constriction injury (CCI)-induced thermal hyperalgesia and mechanical and cold allodynia. Behavioral studies were performed in control (representing both naïve and LV-EGFP-injected animals), control-CCI (representing both naïve and LV-EGFP-injected rats with CCI surgery), and LV-srIκBα-infected CCI rats. **(a)** Nociceptive responses elicited by radiant heating were measured as paw withdrawal latencies (PWLs) in seconds, and for each animal ΔPWL was calculated as the difference between PWL at days 7, 14, and 21 and the baseline PWL (day 0 before CCI). Seven days after LV vector spinal injection (day 0 before CCI), PWLs were comparable between different groups. Starting at day 7 and then throughout the experimental procedure (21 days), ΔPWLs were significantly different between control and control-CCI groups ( $P < 0.0001$ ). Note that single LV-srIκBα injection resulted in constant significant antihyperalgesic effect throughout the 21 days of experiment. **(b)** Sensitivity to mechanical stimulation was assessed using von Frey filaments. The mean of first reaction (increasing testing) and lowest test result (decreasing testing) was taken as the mechanical paw withdrawal threshold (PWT). These data were log transformed, and the percentage decrease of the withdrawal threshold was then calculated in relation to the withdrawal threshold before surgery (baseline):  $\Delta PWT = (CCI\ paw - baseline\ paw) / baseline\ paw \times 100$ . **(c)** Reactivity of animals to cold stimulus was measured after application of acetone (100 μl) onto the right footpad. The time that animals spent with paw withdrawn (PWt) was measured during the next 120-second period. Data represent mean ± SEM.



plasmid, p8.91, and the vesicular stomatitis virus-G-encoding plasmid, pMD-G, have been described previously.<sup>46</sup>

**Lentiviral vector production.** Pseudotyped HIV vector encoding EGFP (LV-EGFP) was produced as described previously.<sup>19</sup> Because of the capacity of srI $\kappa$ B $\alpha$  to interfere with HIV-derived vector production,<sup>47</sup> the protocol for LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  production was slightly modified. Co-transfection of 293T cells with p8.91 and pTrip-srI $\kappa$ B $\alpha$  was performed in the proportion 2:1. The S1 supernatants with LV vectors were harvested 40 hours later and stored at 4 °C. Cultures were further incubated in fresh medium, and 24 hours later (64 hours after transfection), S2 supernatants were harvested and pooled with S1 before final vector concentration. LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  titers were thus increased at least 10-fold. Viral suspension was titrated and normalized for the capsid p24 antigen, assayed by enzyme-linked immunosorbent assay to approximately 35 ng of p24/ $\mu$ l (Beckman Coulter, Roissy, France). The efficacy of LV-EGFP and LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  in driving the expression of transgene-derived respective mRNA was confirmed in infected 293T cell cultures treated or not with 10  $\mu$ M reverse-transcriptase inhibitor AZT (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

**Glial cell primary cultures and neuron/glia co-cultures.** Primary mixed glial cultures were prepared, as described in Supplementary Materials and Methods, from the cerebral cortex or the spinal cord of 4-day-old rat pups (Sprague-Dawley, Centre d'Élevage R. Janvier, Le Genest-St. Isle, France) following the procedure of Goslin *et al.*<sup>48</sup> with slight modifications. Spinal cord neuron/glia co-cultures were prepared, as described in Supplementary Materials and Methods, using essentially the same protocol as for glial cells, from embryonic (E17–18) spinal cords.

**Luciferase reporter gene assay.** The luciferase reporter gene assay was performed on primary glial cells using the Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) as described in Supplementary Materials and Methods.

**Animal treatments and behavioral analysis.** Rats (200 g) were deeply anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.). The thoracic T13 vertebra<sup>49</sup> was accessed through skin (20 mm) and dorsal muscle (10 mm) incisions under semi-sterile conditions. Surgery was then continued under a Zeiss operation microscope (10–25 $\times$ ). A hole of 1 mm diameter was carefully drilled through the vertebra without disrupting protective layers of the spinal cord. A hole of approximately 150  $\mu$ m was then opened through dura mater and arachnoid mater with a micro-fine point scalpel. Saline or LV vectors were delivered using an automatic micro-injection device (KDS 310; KD Scientific, Holliston, MA) via a heat-pulled glass capillary needle (external diameter 60  $\mu$ m) introduced into the spinal cord parenchyma at an angle of 50°, parallel with the sagittal plane. Two microliters of vector (approximately 60 ng of p24) was injected at a rate of 0.5  $\mu$ l/min, 0.5 mm aside from the midline of the cord and at a depth of 0.8 mm. The needle was then left for 2 minutes in the parenchyma before gentle withdrawal. Muscles were sutured using resorbable 4/0 ethicon stitches, and regular 5/0 ethicon perma-hand sutures were used to close the skin (Johnson and Johnson, New Brunswick, NJ). If necessary, CCI<sup>50</sup> surgery was performed 1 week later. Thermal hyperalgesia, mechanical and cold allodynia were evaluated as described in Supplementary Materials and Methods. At the end of the behavioral experiments, correct placement of the injection capillary needle was verified by histological examination. All experiments were performed in conformity with the institutional guidelines, which are in compliance with national and international law and policies for use of animals in neuroscience research (European Communities Council directive No. 87848, October 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; Permission No. 75-1179 to M.P.).

**Antibodies.** Primary antibodies used in this study included goat anti-NF- $\kappa$ B p65 and rabbit anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (1:100 and 1:250; Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit anti-glia fibrillary acidic protein (anti-GFAP; 1:150; DAKO, Glostrup, Denmark), monoclonal anti-Ox42 (1:100; Serotec, Oxford, UK), and monoclonal anti-NeuN (1:1000; Chemicon International, Temecula, CA). Secondary antibodies were CY3-conjugated donkey anti-goat immunoglobulin G (IgG) and Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:800 for cells or 1:400 for tissues; Interchim, Montluçon, France). Slides with cells or tissue sections were observed and images were generated using a Leica DMRD microscope.

**Quantification of infected neurons.** The proportion of neurons expressing EGFP was determined in spinal cords from four LV-EGFP-injected rats at different (1- to 4-week) intervals after viral injection. Twenty-micrometer serial sections were prepared from the lumbar enlargement of the spinal cord, and every fourth section was stained and examined. A total of 40 sections were analyzed with Photoshop software (Adobe Systems ver. 7.0, San Jose, CA) and the proportion of infected neurons was determined by counting the total number of EGFP-stained cells (total infected cells) and those co-labeled with the neuronal marker NeuN (infected neurons).

**Conventional RT-PCR and real-time RT-PCR analyses.** Rats were killed by decapitation and the lumbar enlargement of the spinal cord (L3–L5) was divided into left and right parts and then into their dorsal and ventral zones in cold conditions (0–4 °C). Tissues were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at –80 °C until they were used. Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA II Purification Kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) and its concentration was evaluated by optical density at 260 nm. Conventional RT-PCRs were performed on 0.5  $\mu$ g of each RNA sample in the presence of 40 pmol of specific primers using the Access RT-PCR system (Promega, Charbonnières, France) as described in Supplementary Materials and Methods. For the real-time PCR application, first-stranded cDNA synthesis (0.5  $\mu$ g total RNA per 20  $\mu$ l reaction) was carried out with the SuperScrip III reverse-transcriptase and random primers (ribosomal phosphoprotein at 0.25  $\mu$ g per reaction), as recommended by the manufacturer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Real-time PCR amplification of each sample in triplicate was performed on the ABI Prism 7300 apparatus according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using ABgene Absolute QPCR ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) and the Assays-on-Demand Gene Expression probes (Applied Biosystems) for target genes: IL-6 (Rn00561420-m1), IL-1 $\beta$  (Rn00580432-m1), TNF $\alpha$  (Rn00562055-m1), iNOS (Rn00561646-m1), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) (Rn99999916-s1). To perform semi-quantitative studies, GPDH was used as reporter gene.

**Western blot analysis.** Total and nuclear proteins were extracted from glial cells or from the dorsal part of the rat lumbar spinal cord as described in ref. 12. Equal concentrations of proteins, as determined by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Paris, France), were mixed with standard Laemmli buffer, sonicated, heated at 95 °C for 5 minutes, then separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (12% acrylamide) and electrotransferred (Trans-Blot SD, Bio-Rad) onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were saturated in blocking solution (5% non-fat dry milk, 0.1% Tween 20 in PBS 1 $\times$ ) for 1 hour at room temperature and then incubated (overnight, 4 °C) with primary antibodies directed against I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65 (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Tebu, Le Perray en Yvelines, France), or  $\alpha$ -tubulin (1:10,000; Amersham Biosciences, Paris, France) in the blocking solution. After rinsing in blocking solution, blots were incubated (40 minutes at room temperature) with horseradish peroxidase–linked secondary antibodies (anti-goat IgG (1:10,000; Interchim), anti-rabbit IgG (1:5,000), or anti-mouse IgG (1:25,000; Sigma-Aldrich)). Blots were finally washed in PBS containing 0.1% Tween 20, and then in PBS. Membranes were processed with the ECL Plus kit and exposed to MP-ECL film (Amersham Biosciences).

**Statistical analyses.** Data are presented as means  $\pm$  SEM. One-way analysis of variance used for RT-PCR data revealed statistically significant differences between different groups (control, LPS, LV-srI $\kappa$ B $\alpha$  + LPS;  $F = 34.7$ ,  $P < 0.0001$  for IL-6;  $F = 23$ ,  $P < 0.0005$  for IL-1 $\beta$ ;  $F = 7.2$ ,  $P < 0.02$  for TNF $\alpha$ ;  $F = 5.1$ ,  $P < 0.02$  for iNOS). Fisher PLSD was used as *post hoc* test. Behavioral data were subjected to Student's *t*-test or to the two-factor analysis of variance followed by unpaired Fisher's PLSD tests. Statistical evaluation was carried out using the StatView 5.2 software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). When  $P > 0.05$ , the corresponding difference was considered to be non-significant.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Materials and Methods.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to François Cesselin, André Bogdan, Joao Braz and Chamsy Sarkis for critical reading of the manuscript and helpful discussions. We thank Justine Masson for her assistance with primary neuron-glia co-cultures. We thank Anning Lin and Hedi Mammeri for providing us with plasmids. This work was supported by grants from INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Fondation pour la Recherche Médicale, Institut UPSA de la Douleur, and Institut pour la Recherche sur la Moelle épinière et l'Encéphale.

## REFERENCES

- Watkins, LR, Milligan, ED and Maier, SF (2003). Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol* **521**: 1–21.
- Tsuda, M, Inoue, K and Salter, MW (2005). Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci* **28**: 101–107.
- Ma, W and Quirion, R (2002). Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. *Pain* **99**: 175–184.
- Jin, SX, Zhuang, ZY, Woolf, CJ and Ji, RR (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* **23**: 4017–4022.
- Zhuang, ZY, Wen, YR, Zhang, DR, Borsello, T, Bonny, C, Strichartz, GR *et al.* (2006). A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci* **26**: 3551–3560.
- Makarov, SS (2000). NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol Med Today* **6**: 441–448.
- Auphan, N, DiDonato, JA, Rosette, C, Helmsberg, A and Karin, M (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappaB activity through induction of I kappaB synthesis. *Science* **270**: 286–290.
- Yin, MJ, Yamamoto, Y and Gaynor, RB (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**: 77–80.
- Laughlin, TM, Bethea, JR, Yezierski, RP and Wilcox, GL (2000). Cytokine involvement in dynorphin-induced allodynia. *Pain* **84**: 159–167.
- Lee, KM, Kang, BS, Lee, HL, Son, SJ, Hwang, SH, Kim, DS *et al.* (2004). Spinal NF- $\kappa$ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci* **19**: 3375–3381.
- Ledeboer, A, Gamanos, M, Lai, W, Martin, D, Maier, SF, Watkins, LR *et al.* (2005). Involvement of spinal cord nuclear factor kappaB activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation. *Eur J Neurosci* **22**: 1977–1986.
- Tegeder, I, Niederberger, E, Schmidt, R, Kunz, S, Cühhing, H, Ritzler, O *et al.* (2004). Specific inhibition of I(kappa)B kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *J Neurosci* **24**: 1637–1645.
- Karin, M and Lin, A (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**: 221–227.
- Bhakar, AL, Tannis, LL, Zeindler, C, Russo, MP, Jobin, C, Park, DS *et al.* (2002). Constitutive nuclear factor-kappaB activity is required for central neuron survival. *J Neurosci* **22**: 8466–8475.
- Purcell, NH, Tang, G, Yu, C, Mercurio, F, DiDonato, JA and Lin, A (2001). Activation of NF-kappaB is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6668–6673.
- Fridmacher, V, Kaltschmidt, B, Goudeau, B, Ndiaye, D, Rossi, FM, Pfeiffer, J *et al.* (2003). Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci* **23**: 9403–9408.
- Naldini, L, Blomer, U, Gage, FH, Trono, D and Verma, IM (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11382–11388.
- Blomer, U, Naldini, L, Kafri, T, Trono, D, Verma, IM and Gage, FH (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* **71**: 6641–6649.
- Zennou, V, Serquera, C, Sarkis, C, Colin, P, Perret, E, Mallet, J *et al.* (2001). The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* **19**: 446–450.
- Baekelandt, V, Claves, A, Eggermont, K, Lauwers, E, De Strooper, B, Nuttin, B *et al.* (2002). Characterization of lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse brain. *Hum Gene Ther* **13**: 841–853.
- Pezet, S, Krzyzanowska, A, Wong, LF, Grist, J, Mazarkis, ND, Georgievska, B *et al.* (2006). Reversal of neurochemical changes and pain-related behavior in a model of neuropathic pain using modified lentiviral vectors expressing GDNF. *Mol Ther* **13**: 1101–1109.
- Ma, W and Bisby, MA (1998). Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. *Brain Res* **797**: 243–254.
- Brambilla, R, Bracchi-Ricard, V, Hu, WH, Frydel, B, Bramwell, A, Karmally, S *et al.* (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor  $\kappa$ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* **202**: 145–156.
- Marchand, F, Perretti, M and McMahon, SB (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* **6**: 521–532.
- Lee, HL, Lee, KM, Son, SJ, Hwang, SH and Cho, HJ (2004). Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport* **15**: 2807–2811.
- Amos, N, Lauder, S, Evans, A, Feldmann, M and Bondeson, J (2006). Adenoviral gene transfer into osteoarthritis synovial cells using the endogenous inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  reveals that most, but not all, inflammatory and destructive mediators are NF $\kappa$ B dependent. *Rheumatology* **45**: 1201–1209.
- Wu, CY, Hsieh, HL, Jou, MJ and Yang, CM (2004). Involvement of p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK and nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocytes. *J Neurochem* **90**: 1477–1488.
- Sparacio, SM, Zhang, Y, Vilcek, J and Benveniste, EN (1992). Cytokine regulation of interleukin-6 gene expression in astrocytes involves activation of an NF-kappa B-like nuclear protein. *J Neuroimmunol* **39**: 231–242.
- Tsukahara, S, Harada, T, Deura, I, Mitsunari, M, Yoshida, S, Iwabe, T *et al.* (2004). Interleukin-1beta-induced expression of IL-6 and production of human chorionic gonadotropin in human trophoblast cells via nuclear factor-kappaB activation. *Am J Reprod Immunol* **52**: 218–223.
- Zhang, YH, Lin, JX and Vilcek, J (1990). Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of nuclear factor binding to a kappa-B like sequence. *Mol Cell Biol* **10**: 3818–3823.
- Maihöfner, C, Euchenhofer, C, Tegeder, I, Beck, KF, Pfeilschifter, J and Geisslinger, G (2000). Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in mouse spinal cord following nociceptive stimulation. *Neurosci Lett* **290**: 71–75.
- Saha, RN and Pahan, K (2006). Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* **8**: 929–947.
- Jana, M, Anderson, JA, Saha, RN, Liu, X and Pahan, K (2005). Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. *Free Radic Biol Med* **38**: 655–664.
- Sung, CS, Wen, ZH, Chang, WK, Ho, ST, Tsai, SK, Chang, YC *et al.* (2004). Intrathecal interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. *Brain Res* **1015**: 145–153.
- Obreja, O, Biasio, W, Andratsch, M, Lips, KS, Rathee, PK, Ludwig, A *et al.* (2005). Fast modulation of heat-activated ionic current by proinflammatory interleukin 6 in rat sensory neurons. *Brain* **128**: 1634–1641.
- Wang, S, Lim, G, Zeng, Q, Sung, B, Yang, L and Mao, J (2005). Central glucocorticoid receptors modulate the expression and function of spinal NMDA receptors after peripheral nerve injury. *J Neurosci* **25**: 488–495.
- Campbell, IL, Abraham, CR, Masliah, E, Kemper, P, Inglis, JD, Oldstone, MB *et al.* (1993). Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10061–10065.
- Okada, S, Nakamura, M, Mikami, Y, Shimazaki, T, Mihara, M, Ohsugi, Y *et al.* (2004). Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res* **76**: 265–276.
- Meller, ST and Gebhart, GF (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* **52**: 127–136.
- Ikedo, H and Murae, K (2004). Glial nitric oxide-mediated long-term presynaptic facilitation revealed by optical imaging in rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* **24**: 888–896.
- Osborne, MG andCoderre, TJ (1999). Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol* **126**: 1840–1846.
- Sommer, C, Petrusch, S, Lindenlaub, T and Toyka, KV (1999). Neutralizing antibodies to interleukin-1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. *Neurosci Lett* **270**: 25–28.
- Samad, TA, Moore, KA, Sapirstein, A, Billet, S, Alichorne, A, Poole, S *et al.* (2001). Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* **410**: 471–475.
- Zhuang, ZY, Gerner, P, Woolf, CJ and Ji, RR (2005). ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* **114**: 149–159.
- Bemelmans, AP, Bonnel, S, Houhou, L, Dufour, N, Nandrot, E, Helmlinger, D *et al.* (2005). Retinal cell type expression specificity of HIV-1-derived gene transfer vectors upon subretinal injection in the adult rat: influence of pseudotyping and promoter. *J Gene Med* **7**: 1367–1374.

46. Zufferey, R, Nagy, D, Mandel, RJ, Naldini, L and Trono, D (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**: 871–875.
47. Kwon, H, Pelletier, N, DeLuca, C, Genin, P, Cisternas, S, Lin, R *et al.* (1998). Inducible expression of IkappaBalpha repressor mutants interferes with NF-kappaB activity and HIV-1 replication in Jurkat T cells. *J Biol Chem* **273**: 7431–7440.
48. Goslin, K, Asmussen, H and Banker, G (1998). Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: Banker, G and Goslin, K (eds). *Culturing Nerve Cells*. MIT Press: Cambridge, MA. pp. 339–370.
49. Waibl, H (1973). Contribution to the topography of the spinal cord of the albino rat (*Rattus norvegicus*). *Adv Anat Embryol Cell Biol* **47**: 1–42.
50. Bennett, GJ and Xie, YK (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**: 87–107.

*Les devises Shadok*



SI GA FAIT MAL C'EST QUE  
GA FAIT DU BIEN !!

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abordo-Adesida, E., Follenzi, A., Barcia, C., Sciascia, S., Castro, M. G., Naldini, L., and Lowenstein, P. R. (2005). Stability of lentiviral vector-mediated transgene expression in the brain in the presence of systemic antivector immune responses. *Hum Gene Ther* 16, 741-751.
- Adachi, A., Ono, N., Sakai, H., Ogawa, K., Shibata, R., Kiyomasu, T., Masuike, H., and Ueda, S. (1991). Generation and characterization of the human immunodeficiency virus type 1 mutants. *Arch Virol* 117, 45-58.
- Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M.G., and Bordignon, C. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-2413.
- Aiuti, A., Cassani, B., Andolfi, G., Mirolo, M., Biasco, L., Recchia, A., Urbinati, F., Valacca, C., Scaramuzza, S., Aker, M., Slavin, S., Cazzola, M., Sartori, D., Ambrosi, A., Di Serio, C., Roncarolo, M. G., Mavilio, F., and Bordignon, C. (2007). Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J Clin Invest* 117, 2233-2240.
- Akita, H., Hama, S., Mizuguchi, H., and Hatashima, H. (2007). Mechanism of difference in the transcription activity of nucleus delivered transgene introduced by adenovirus and lipoplex, Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Akkina, R. K., Walton, R. M., Chen, M. L., Li, Q. X., Planelles, V., and Chen, I. S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70, 2581-2585.
- Alwin, S., Gere, M. B., Guhl, E., Effertz, K., Barbas, C. F., 3rd, Segal, D. J., Weitzman, M. D., and Cathomen, T. (2005). Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol Ther* 12, 610-617.
- Alwin, S., Gere, M. B., Guhl, E., Effertz, K., Barbas, C. F., 3rd, Segal, D. J., Weitzman, M. D., and Cathomen, T. (2005). Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol Ther* 12, 610-617.
- Ansari-Lari, M. A., Donehower, L. A., and Gibbs, R. A. (1995). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants. *Virology* 213, 680.
- Ao, Z., Yao, X., and Cohen, E. A. (2004). Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system. *J Virol* 78, 3170-3177.
- Ao, Z., Fowke, K. R., Cohen, E. A., and Yao, X. (2005). Contribution of the C-terminal tri-lysine regions of human immunodeficiency virus type 1 integrase for efficient reverse transcription and viral DNA nuclear import. *Retrovirology* 2, 62.
- Arbetman, A. E., Lochrie, M., Zhou, S., Wellman, J., Scallan, C., Doroudchi, M. M., Randlev, B., Patarroyo-White, S., Liu, T., Smith, P., *Lehmkuhl, H.*, Hobbs, L.A., Pierce, G.F., and Colosi, P. (2005). Novel caprine adeno-associated virus (AAV) capsid (AAV-Go.1) is closely related to the primate AAV-5 and has unique tropism and neutralization properties. *J Virol* 79, 15238-15245.
- Armon-Omer, A., Graessmann, A., and Loyter, A. (2004). A synthetic peptide bearing the HIV-1 integrase 161-173 amino acid residues mediates active nuclear import and binding to importin alpha: characterization of a functional nuclear localization signal. *J Mol Biol* 336, 1117-1128.
- Auricchio, A., Kobinger, G., Anand, V., Hildinger, M., O'Connor, E., Maguire, A. M., Wilson, J. M., and Bennett, J. (2001). Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet* 10, 3075-3081.
- Baekelandt, V., Claeys, A., Eggermont, K., Lauwers, E., De Strooper, B., Nuttin, B., and Debyser, Z. (2002). Characterization of lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse brain. *Hum Gene Ther* 13, 841-853.



- Balaggan, K. S., Binley, K., Esapa, M., Iqball, S., Askham, Z., Kan, O., Tschernutter, M., Bainbridge, J. W., Naylor, S., and Ali, R. R. (2006). Stable and efficient intraocular gene transfer using pseudotyped EIAV lentiviral vectors. *J Gene Med* 8, 275-285.
- Barr, S. D., Ciuffi, A., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R., and Bushman, F. D. (2006). HIV integration site selection: targeting in macrophages and the effects of different routes of viral entry. *Mol Ther* 14, 218-225.
- Bartholomae, C., Deichmann, A., Schmidt, M., Yanez-Munoz, R. J., Howe, S., Schmidt, S., Prinz, C., Thrasher, A. J., and von Kalle, C. (2006). Lentiviral SIN-LTR vectors exhibits target site selection and clonal survival, Paper presented at: 14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy (Athens).
- Bartholomae, C., Yanez-Munoz, R. J., Balaggan, K. S., Howe, S., MacNeil, A., Ali, R. R., Thrasher, A. J., von Kalle, C., and Schmidt, M. (2007). In vivo lentiviral SIN-LTR vector is nearly random and shows a preponderance of satellite DNA in post mitotic rodent eyes, Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Bartosch, B., and Cosset, F. L. (2004). Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses. *Curr Gene Ther* 4, 427-443.
- Baum, C. (2007). What Are the Consequences of the Fourth Case? *Molecular Therapy* 15, 1401-1402.
- Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D. A., and von Kalle, C. (2003). Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 101, 2099-2114.
- Baum, C., Eckert, H. G., Stockschlader, M., Just, U., Hegewisch-Becker, S., Hildinger, M., Uhde, A., John, J., and Ostertag, W. (1996). Improved retroviral vectors for hematopoietic stem cell protection and in vivo selection. *J Hematother* 5, 323-329.
- Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z., and Fehse, B. (2006). Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 17, 253-263.
- Bayer, M. A., Zeithaml, B., Kantor, B., MacCown, T., Ma, H., and Kafri, T. (2007). Characterizing the molecular mechanism for robust, sustained hepatic expression from lentiviral vectors., Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Beatty, J. A., Callanan, J. J., Terry, A., Jarrett, O., and Neil, J. C. (1998). Molecular and immunophenotypical characterization of a feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a direct role for FIV in B-lymphocyte transformation? *J Virol* 72, 767-771.
- Beignon, A. S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D. G., Larsson, M., Gorelick, R. J., Lifson, J. D., and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 115, 3265-3275.
- Bemelmans, A. P., Bonnel, S., Houhou, L., Dufour, N., Nandrot, E., Helmlinger, D., Sarkis, C., Abitbol, M., and Mallet, J. (2005). Retinal cell type expression specificity of HIV-1-derived gene transfer vectors upon subretinal injection in the adult rat: influence of pseudotyping and promoter. *J Gene Med* 7, 1367-1374.
- Berges, B. K., Wolfe, J. H., and Fraser, N. W. (2007). Transduction of brain by herpes simplex virus vectors. *Mol Ther* 15, 20-29.
- Berkhout, B., Das, A. T., and van Wamel, J. L. (1998). The native structure of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is required for the first strand transfer of reverse transcription. *Virology* 249, 211-218.
- Berns, I. B. (1996). Parvoviridae: The viruses and Their Replication; Latent infection, In *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers), pp. 2188-2190.
- Berry, C., Hannenhalli, S., Leipzig, J., and Bushman, F. D. (2006). Selection of target sites for mobile DNA integration in the human genome. *PLoS Comput Biol* 2, e157.

- Berto, E., Bozac, A., and Marconi, P. (2005). Development and application of replication-incompetent HSV-1-based vectors. *Gene Ther* 12 *Suppl* 1, S98-102.
- Bester, A. C., Schwartz, M., Schmidt, M., Garrigue, A., Hacein-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M., Ben-Porat, N., Von Kalle, C., Fischer, A., and Kerem, B. (2006). Fragile sites are preferential targets for integrations of MLV vectors in gene therapy. *Gene Ther* 13, 1057-1059.
- Bieniasz, P. D., Weiss, R. A., and McClure, M. O. (1995). Cell cycle dependence of foamy retrovirus infection. *J Virol* 69, 7295-7299.
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., and Anderson, W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.
- Blomer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. M., and Gage, F. H. (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71, 6641-6649.
- Blumenthal, M., Skelton, D., Pepper, K. A., Jahn, T., Methangkool, E., and Kohn, D. B. (2007). Effective suicide gene therapy for leukemia in a model of insertional oncogenesis in mice. *Mol Ther* 15, 183-192.
- Boado, R. J., Zhang, Y., Zhang, Y., Xia, C. F., and Pardridge, W. M. (2007). Fusion antibody for Alzheimer's disease with bidirectional transport across the blood-brain barrier and abeta fibril disaggregation. *Bioconjug Chem* 18, 447-455.
- Bode, J., Benham, C., Knopp, A., and Mielke, C. (2000). Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10, 73-90.
- Bordignon, C., Notarangelo, L. D., Nobili, N., Ferrari, G., Casorati, G., Panina, P., Mazzolari, E., Maggioni, D., Rossi, C., Servida, P., Ugazio, A. G., and Mavilio, F. (1995). Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* 270, 470-475.
- Boyce, F. M., and Barsoum, J. G. (2000). Expression of an exogenous gene in a mammalian cell by use of a non-mammalian DNA virus having an altered coat protein. (US: The General Hospital Corporation).
- Bouyac-Bertoia, M., Dvorin, J. D., Fouchier, R. A., Jenkins, Y., Meyer, B. E., Wu, L. I., Emerman, M., and Malim, M. H. (2001). HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* 7, 1025-1035.
- Brown, B. D., Cantore, A., Annoni, A., Sergi, L., Lombardo, A., Della Valle, P., D'Angelo, A., and Naldini, L. (2007). A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood*, epub August 28.
- Brown B. D., Sitia G., Annoni A., Hauben E., Sergi L. S., Zingale A., Roncarolo, M. G., Guidotti, L. G., and Naldini, L. (2007). In vivo administration of lentiviral vectors triggers a type I interferon response that restricts hepatocyte gene transfer and promotes vector clearance. *Blood* 109, 2797-805.
- Brown, B. D., Venneri, M. A., Zingale, A., Sergi, L., and Naldini, L. (2006). Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 12, 585-591.
- Brown, H. E., Chen, H., and Engelman, A. (1999). Structure-based mutagenesis of the human immunodeficiency virus type 1 DNA attachment site: effects on integration and cDNA synthesis. *J Virol* 73, 9011-9020.
- Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1987). Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 49, 347-356.

- Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1989). Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 2525-2529.
- Browning, M. T., Schmidt, R. D., Lew, K. A., and Rizvi, T. A. (2001). Primate and feline lentivirus vector RNA packaging and propagation by heterologous lentivirus virions. *J Virol* *75*, 5129-5140.
- Bruce, J. W., Bradley, K. A., Ahlquist, P., and Young, J. A. (2005). Isolation of cell lines that show novel, murine leukemia virus-specific blocks to early steps of retroviral replication. *J Virol* *79*, 12969-12978.
- Brugman, M. H., Pike-Overzet, K., Schmidt, M., Oerlemans-Bergs, C., Swagemakers, S., de Rider, D., Staal, F. J., von Kalle, C., Verstegen, M. M., and Wagemaker, G. (2006). Retroviral vector integrations relate to hematopoietic stem cell gene expression patterns, Paper presented at: 14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy (Athens).
- Brun, S., Faucon-Biguët, N., and Mallet, J. (2003). Optimization of transgene expression at the posttranscriptional level in neural cells: implications for gene therapy. *Mol Ther* *7*, 782-789.
- Brussel, A., Mathez, D., Broche-Pierre, S., Lancar, R., Calvez, T., Sonigo, P., and Leibowitch, J. (2003). Longitudinal monitoring of 2-long terminal repeat circles in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic HIV-1 infection. *Aids* *17*, 645-652.
- Buc-Caron, M. H. (1995). Neuroepithelial progenitor cells explanted from human fetal brain proliferate and differentiate in vitro. *Neurobiology of disease* *2*, 37-47.
- Buchholz, C. J., and Cichutek, K. (2006). Is it going to be SIN?: a European Society of Gene Therapy commentary. Phasing-out the clinical use of non self-inactivating murine leukemia virus vectors: initiative on hold. *J Gene Med* *8*, 1274-1276.
- Bukovsky, A. A., Song, J. P., and Naldini, L. (1999). Interaction of human immunodeficiency virus-derived vectors with wild-type virus in transduced cells. *J Virol* *73*, 7087-7092.
- Bukrinsky, M. I., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., and Stevenson, M. (1991). Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* *254*, 423-427.
- Bukrinsky, M., Sharova, N., and Stevenson, M. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 2-LTR circles reside in a nucleoprotein complex which is different from the preintegration complex. *J Virol* *67*, 6863-6865.
- Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A., and Felsenfeld, G. (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99 Suppl 4*, 16433-16437.
- Burrows, R. C., Wancio, D., Levitt, P., and Lillien, L. (1997). Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGFR expression in the cortex. *Neuron* *19*, 251-267.
- Burton, M., Nakai, H., Colosi, P., Cunningham, J., Mitchell, R., and Couto, L. (1999). Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 12725-12730.
- Bushman, F. D., Engelman, A., Palmer, I., Wingfield, P., and Craigie, R. (1993). Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 3428-3432.
- Bushman, F., Lewinski, M., Ciuffi, A., Barr, S., Leipzig, J., Hannenhalli, S., and Hoffmann, C. (2005). Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol* *3*, 848-858.
- Busschots, K., Voet, A., De Maeyer, M., Rain, J. C., Emiliani, S., Benarous, R., Desender, L., Debyser, Z., and Christ, F. (2007). Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase. *J Mol Biol* *365*, 1480-1492.
- Butler, S. L., Johnson, E. P., and Bushman, F. D. (2002). Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-long terminal repeat circles. *J Virol* *76*, 3739-3747.

- Calmels, B., Ferguson, C., Laukkanen, M. O., Adler, R., Faulhaber, M., Kim, H. J., Sellers, S., Hematti, P., Schmidt, M., von Kalle, C., *et al.* (2005). Recurrent retroviral vector integration at the Mds1/Evi1 locus in nonhuman primate hematopoietic cells. *Blood* 106, 2530-2533.
- Calos, M. P. (2006). The phiC31 integrase system for gene therapy. *Curr Gene Ther* 6, 633-645.
- Candolfi, M., Curtin, J. F., Xiong, W. D., Kroeger, K. M., Liu, C., Rentsendorj, A., Agadjanian, H., Medina-Kauwe, L., Palmer, D., Ng, P., Lowenstein, P. R., and Castro, M. G. (2006). Effective high-capacity gutless adenoviral vectors mediate transgene expression in human glioma cells. *Mol Ther* 14, 371-381.
- Cannon, P. M., Wilson, W., Byles, E., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effect on viral replication of mutations at highly conserved residues. *J Virol* 68, 4768-4775.
- Cannon, P. M., Byles, E. D., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1996). Conserved sequences in the carboxyl terminus of integrase that are essential for human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 70, 651-657.
- Cara, A., Guarnaccia, F., Reitz, M. S., Gallo, R. C., and Lori, F. (1995). Self-limiting, cell type-dependent replication of an integrase-defective human immunodeficiency virus type 1 in human primary macrophages but not T lymphocytes. *Virology* 208, 242-248.
- Cara, A., Cereseto, A., Lori, F., and Reitz, M. S., Jr. (1996). HIV-1 protein expression from synthetic circles of DNA mimicking the extrachromosomal forms of viral DNA. *J Biol Chem* 271, 5393-5397.
- Cara, A., Vargas, J., Jr., Keller, M., Jones, S., Mosoian, A., Gurtman, A., Cohen, A., Parkas, V., Wallach, F., Chusid, E., Gelman, I. H., and Klotman, M. E. (2002). Circular viral DNA and anomalous junction sequence in PBMC of HIV-infected individuals with no detectable plasma HIV RNA. *Virology* 292, 1-5.
- Cara, A., and Klotman, M. E. (2006). Retroviral E-DNA: persistence and gene expression in nondividing immune cells. *J Leukoc Biol* 80, 1013-1017.
- Caron, M. C., and Caruso, M. (2005). A nuclear localization signal in the matrix of spleen necrosis virus (SNV) does not allow efficient gene transfer into quiescent cells with SNV-derived vectors. *Virology* 338, 292-296.
- Carroll, D. (2004). Using nucleases to stimulate homologous recombination. *Methods Mol Biol* 262, 195-207.
- Carteau, S., Hoffmann, C., and Bushman, F. (1998). Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target. *J Virol* 72, 4005-4014.
- Castaing, M., Guerci, A., Mallet, J., Czernichow, P., Ravassard, P., and Scharfmann, R. (2005). Efficient restricted gene expression in beta cells by lentivirus-mediated gene transfer into pancreatic stem/progenitor cells. *Diabetologia* 48, 709-719.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., and Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.
- Chalberg, T. W., Genise, H. L., Vollrath, D., and Calos, M. P. (2005). phiC31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2140-2146.
- Challita, P. M., and Kohn, D. B. (1994). Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2567-2571.
- Charneau, P., Alizon, M., and Clavel, F. (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* 66, 2814-2820.

- Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H., and Clavel, F. (1994). HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol* 241, 651-662.
- Charrier, S., Dupre, L., Scaramuzza, S., Jeanson-Leh, L., Blundell, M. P., Danos, O., Cattaneo, F., Aiuti, A., Eckenberg, R., Thrasher, A. J., Roncarolo, M. G., and Galy, A. (2007). Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* 14, 415-428.
- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E., and Debysse, Z. (2003). HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 278, 372-381.
- Cheshenko, N., Krougliak, N., Eisensmith, R. C., and Krougliak, V. A. (2001). A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Ther* 8, 846-854.
- Chiu, Y. L., Soros, V. B., Kreisberg, J. F., Stopak, K., Yonemoto, W., and Greene, W. C. (2005). Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 435, 108-114.
- Choi, V. W., McCarty, D. M., and Samulski, R. J. (2005). AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 5, 299-310.
- Chowdhury, S., Chester, K. A., Bridgewater, J., Collins, M. K., and Martin, F. (2004). Efficient retroviral vector targeting of carcinoembryonic antigen-positive tumors. *Mol Ther* 9, 85-92.
- Chu, C., Zhang, Y., Boado, R. J., and Pardridge, W. M. (2006). Decline in exogenous gene expression in primate brain following intravenous administration is due to plasmid degradation. *Pharm Res* 23, 1586-1590.
- Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R., and Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* 11, 1287-1289.
- Ciuffi, A., Mitchell, R. S., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R., and Bushman, F. D. (2006). Integration site selection by HIV-based vectors in dividing and growth-arrested IMR-90 lung fibroblasts. *Mol Ther* 13, 366-373.
- Clavel, F., Hoggan, M. D., Willey, R. L., Strebel, K., Martin, M. A., and Repaske, R. (1989). Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol* 63, 1455-1459.
- Coffin, J. M. (1996). *Retroviridae: The Viruses and Their Replication*, In Fields Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers), pp. 1767-1847.
- Corbeau, P., Kraus, G., and Wong-Staal, F. (1998). Transduction of human macrophages using a stable HIV-1/HIV-2-derived gene delivery system. *Gene Ther* 5, 99-104.
- Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A., and Collins, M. K. (1995). High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 69, 7430-7436.
- Croyle, M. A., Chirmule, N., Zhang, Y., and Wilson, J. M. (2002). PEGylation of E1-deleted adenovirus vectors allows significant gene expression on readministration to liver. *Hum Gene Ther* 13, 1887-1900.
- Dalba, C., Bellier, B., Kasahara, N., and Klatzmann, D. (2007). Replication-competent Vectors and Empty Virus-like Particles: New Retroviral Vector Designs for Cancer Gene Therapy or Vaccines. *Mol Ther* 15, 457-466.
- Dandri, M., Schirmacher, P., and Rogler, C. E. (1996). Woodchuck hepatitis virus X protein is present in chronically infected woodchuck liver and woodchuck hepatocellular carcinomas which are permissive for viral replication. *J Virol* 70, 5246-5254.
- Dave, U. P., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2004). Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science* 303, 333.

- De, B. P., Heguy, A., Hackett, N. R., Ferris, B., Leopold, P. L., Lee, J., Pierre, L., Gao, G., Wilson, J. M., and Crystal, R. G. (2006). High levels of persistent expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10 adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses. *Mol Ther* 13, 67-76.
- De Palma, M., Montini, E., Santoni de Sio, F. R., Benedicenti, F., Gentile, A., Medico, E., and Naldini, L. (2005). Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells. *Blood* 105, 2307-2315.
- Deichmann, A., Hacein-Bey-Abina, S., Schmidt, M., Garrigue, A., Brugman, M. H., Hu, J., Glimm, H., Gyapay, G., Prum, B., Fraser, C. C., Fischer, N., Schwarzwaelder, K., Siegler, M. L., de Ridder, D., Pike-Overzet, K., Howe, S. J., Thrasher, A. J., Wagemaker, G., Abel, U., Staal, F. J., Delabesse, E., Villeval, J. L., Aronow, B., Hue, C., Prinz, C., Wissler, M., Klanke, C., Weissenbach, J., Alexander, I., Fischer, A., von Kalle, C., and Cavazzana-Calvo, M. (2007). Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest* 117, 2225-2232.
- Delelis, O., Petit, C., Leh, H., Mbemba, G., Mouscadet, J. F., and Sonigo, P. (2005). A novel function for spumaretrovirus integrase: an early requirement for integrase-mediated cleavage of 2 LTR circles. *Retrovirology* 2, 31.
- Delelis, O., Saib, A., and Sonigo, P. (2003). Biphasic DNA synthesis in spumaviruses. *J Virol* 77, 8141-8146.
- Delort, J., Dumas, J. B., Darmon, M. C., and Mallet, J. (1989). An efficient strategy for cloning 5' extremities of rare transcripts permits isolation of multiple 5'-untranslated regions of rat tryptophan hydroxylase mRNA. *Nucleic Acids Res* 17, 6439-6448.
- DePolo, N. J., Harkleroad, C. E., Bodner, M., Watt, A. T., Anderson, C. G., Greengard, J. S., Murthy, K. K., Dubensky, T. W., Jr., and Jolly, D. J. (1999). The resistance of retroviral vectors produced from human cells to serum inactivation in vivo and in vitro is primate species dependent. *J Virol* 73, 6708-6714.
- Di Domenico, C., Di Napoli, D., Gonzalez, Y. R. E., Lombardo, A., Naldini, L., and Di Natale, P. (2006). Limited transgene immune response and long-term expression of human alpha-L-iduronidase in young adult mice with mucopolysaccharidosis type I by liver-directed gene therapy. *Hum Gene Ther* 17, 1112-1121.
- Di Domenico, C., Villani, G. R., Di Napoli, D., Reyero, E. G., Lombardo, A., Naldini, L., and Di Natale, P. (2005). Gene therapy for a mucopolysaccharidosis type I murine model with lentiviral-IDUA vector. *Hum Gene Ther* 16, 81-90.
- Donahue, R. E., Kessler, S. W., Bodine, D., McDonagh, K., Dunbar, C., Goodman, S., Agricola, B., Byrne, E., Raffeld, M., Moen, R., and et al. (1992). Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 176, 1125-1135.
- Donsante, A., Vogler, C., Muzyczka, N., Crawford, J. M., Barker, J., Flotte, T., Campbell-Thompson, M., Daly, T., and Sands, M. S. (2001). Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* 8, 1343-1346.
- Donsante, A., Miller, D. G., Li, Y., Vogler, C., Brunt, E. M., Russell, D. W., and Sands, M. S. (2007). AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317, 477.
- Dorer, D. R., and Henikoff, S. (1994). Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 77, 993-1002.
- Dorer, D. R., and Henikoff, S. (1997). Transgene repeat arrays interact with distant heterochromatin and cause silencing in cis and trans. *Genetics* 147, 1181-1190.
- Douglas, J. T., Miller, C. R., Kim, M., Dmitriev, I., Mikheeva, G., Krasnykh, V., and Curiel, D. T. (1999). A system for the propagation of adenoviral vectors with genetically modified receptor specificities. *Nat Biotechnol* 17, 470-475.
- Du, Y., Spence, S. E., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2005). Cooperating cancer-gene identification through oncogenic-retrovirus-induced insertional mutagenesis. *Blood* 106, 2498-2505.

- Duan, D., Yan, Z., Yue, Y., and Engelhardt, J. F. (1999). Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates. *Virology* 261, 8-14.
- Duan, D., Yue, Y., and Engelhardt, J. F. (2001). Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Mol Ther* 4, 383-391.
- Duisit, G., Conrath, H., Saleun, S., Folliot, S., Provost, N., Cosset, F. L., Sandrin, V., Moullier, P., and Rolling, F. (2002). Five recombinant simian immunodeficiency virus pseudotypes lead to exclusive transduction of retinal pigmented epithelium in rat. *Mol Ther* 6, 446-454.
- Dunfee, R., Thomas, E. R., Gorry, P. R., Wang, J., Ancuta, P., and Gabuzda, D. (2006). Mechanisms of HIV-1 neurotropism. *Curr HIV Res* 4, 267-278.
- Dunfee, R. L., Thomas, E. R., Gorry, P. R., Wang, J., Taylor, J., Kunstman, K., Wolinsky, S. M., and Gabuzda, D. (2006). The HIV Env variant N283 enhances macrophage tropism and is associated with brain infection and dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15160-15165.
- Durai, S., Mani, M., Kandavelou, K., Wu, J., Porteus, M. H., and Chandrasegaran, S. (2005). Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 33, 5978-5990.
- During, M. J., Naegele, J. R., O'Malley, K. L., and Geller, A. I. (1994). Long-term behavioral recovery in parkinsonian rats by an HSV vector expressing tyrosine hydroxylase. *Science* 266, 1399-1403.
- Dvorin, J. D., Bell, P., Maul, G. G., Yamashita, M., Emerman, M., and Malim, M. H. (2002). Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol* 76, 12087-12096.
- Ehrhardt, A., Engler, J. A., Xu, H., Cherry, A. M., and Kay, M. A. (2006). Molecular analysis of chromosomal rearrangements in mammalian cells after phiC31-mediated integration. *Hum Gene Ther* 17, 1077-1094.
- Ehrhardt, A., Yant, S. R., Giering, J. C., Xu, H., Engler, J. A., and Kay, M. A. (2007). Somatic integration from an adenoviral hybrid vector into a hot spot in mouse liver results in persistent transgene expression levels in vivo. *Mol Ther* 15, 146-156.
- Einfeld, D. A., Brough, D. E., Roelvink, P. W., Kovetski, I., and Wickham, T. J. (1999). Construction of a pseudoreceptor that mediates transduction by adenoviruses expressing a ligand in fiber or penton base. *J Virol* 73, 9130-9136.
- Ellis, J. (2005). Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 16, 1241-1246.
- Emery, D. W., Yannaki, E., Tubb, J., and Stamatoyannopoulos, G. (2000). A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9150-9155.
- Emiliani, S., Mousnier, A., Busschots, K., Maroun, M., Van Maele, B., Tempe, D., Vandekerckhove, L., Moisan, F., Ben-Slama, L., Witvrouw, M., Christ, F., Rain, J. C., Dargemont, C., Debyser, Z., and Benarous, R. (2005). Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication. *J Biol Chem* 280, 25517-25523.
- Engelman, A. (1999). In vivo analysis of retroviral integrase structure and function. *Adv Virus Res* 52, 411-426.
- Engelman, A., and Craigie, R. (1992). Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J Virol* 66, 6361-6369.
- Engelman, A., Hickman, A. B., and Craigie, R. (1994). The core and carboxyl-terminal domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 each contribute to nonspecific DNA binding. *J Virol* 68, 5911-5917.
- Engelman, A., Englund, G., Orenstein, J. M., Martin, M. A., and Craigie, R. (1995). Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J Virol* 69, 2729-2736.

- Englund, G., Theodore, T. S., Freed, E. O., Engleman, A., and Martin, M. A. (1995). Integration is required for productive infection of monocyte-derived macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* *69*, 3216-3219.
- Eto, Y., Gao, J. Q., Sekiguchi, F., Kurachi, S., Katayama, K., Maeda, M., Kawasaki, K., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Tsutsumi, Y., Mayumi, T., and Nakagawa, S. (2005). PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J Gene Med* *7*, 604-612.
- Evans-Galea, M. V., Wielgosz, M. M., Hanawa, H., Srivastava, D. K., and Nienhuis, A. W. (2007). Suppression of clonal dominance in cultured human lymphoid cells by addition of the cHS4 insulator to a lentiviral vector. *Mol Ther* *15*, 801-809.
- Farnet, C. M., and Haseltine, W. A. (1991). Circularization of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *J Virol* *65*, 6942-6952.
- Farson, D., Witt, R., McGuinness, R., Dull, T., Kelly, M., Song, J., Radeke, R., Bukovsky, A., Consiglio, A., and Naldini, L. (2001). A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* *12*, 981-997.
- Feng, D., Chen, J., Yue, Y., Zhu, H., Xue, J., and Jia, W. W. (2006). A 16bp Rep binding element is sufficient for mediating Rep-dependent integration into AAVS1. *J Mol Biol* *358*, 38-45.
- Flajolet, M., Tiollais, P., Buendia, M. A., and Fourel, G. (1998). Woodchuck hepatitis virus enhancer I and enhancer II are both involved in N-myc2 activation in woodchuck liver tumors. *J Virol* *72*, 6175-6180.
- Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M., and Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* *25*, 217-222.
- Follenzi, A., Battaglia, M., Lombardo, A., Annoni, A., Roncarolo, M. G., and Naldini, L. (2004). Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* *103*, 3700-3709.
- Fonteneau, J. F., Larsson, M., Beignon, A. S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y. J., Lifson, J. D., Littman, D. R., and Bhardwaj, N. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* *78*, 5223-5232.
- Frederickson, R. M. (2005). Report from the 2nd stem cell clonality and genotoxicity retreat. *Molecular Therapy* *12*, 379-383.
- Freed, E. O., and Mouland, A. J. (2006). The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* *3*, 77.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 8998-9002.
- Fujiwara, T., and Mizuuchi, K. (1988). Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell* *54*, 497-504.
- Furtado, M. R., Callaway, D. S., Phair, J. P., Kunstman, K. J., Stanton, J. L., Macken, C. A., Perelson, A. S., and Wolinsky, S. M. (1999). Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* *340*, 1614-1622.
- Gallagher, B., Wang, Z., Schymura, M. J., Kahn, A., and Fordyce, E. J. (2001). Cancer incidence in New York State acquired immunodeficiency syndrome patients. *Am J Epidemiol* *154*, 544-556.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 9825-9830.



- Galy, A., Charrier, S., Mantovani, J., Perea, J., Zanta-Boussif, M.-A., Liabeuf, M., Montus, M., Thrasher, A. J., Marangoni, E., Scaramuzza, S., Villa, A., Aiuti, A., Dupre, L., and Roncarolo, M. G. (2007). Pre-clinical evaluations of the biosafety of a lentiviral vector developed for the gene therapy of Wiskott Aldrich syndrome, Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Gaspar, H. B., Bjorkegren, E., Parsley, K., Gilmour, K. C., King, D., Sinclair, J., Zhang, F., Giannakopoulos, A., Adams, S., Fairbanks, L. D., Gaspar, J., Henderson, L., Xu-Bayford, J. H., Davies, E. G., Veys, P. A., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. (2006). Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther* 14, 505-513.
- Gaspar, H. B., Parsley, K. L., Howe, S., King, D., Gilmour, K. C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., Jakobsen, M. A., Christensen, H. O., Al Ghonaium, A., White, H. N., Smith, J. L., Levinsky, R. J., Ali, R. R., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364, 2181-2187.
- Gaur, M., and Leavitt, A. D. (1998). Mutations in the human immunodeficiency virus type 1 integrase D,D(35)E motif do not eliminate provirus formation. *J Virol* 72, 4678-4685.
- Geller, A. I., During, M. J., Oh, Y. J., Freese, A., and O'Malley, K. (1995). An HSV-1 vector expressing tyrosine hydroxylase causes production and release of L-dopa from cultured rat striatal cells. *J Neurochem* 64, 487-496.
- Gjetting, T., Andresen, T. L., and Jensen, T. G. (2007). Towards non-viral gene therapy with plasmid DNA encapsulated in pegylated immunoliposomes (PILs), Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Greene, W. C., and Peterlin, B. M. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8, 673-680.
- Grez, M., Ott, M. G., Schmidt, M., Stein, C. S., Siler, U., Schwarzwaelder, K., Koehl, U., Schilz, A., Kuehlcke, K., von Kalle, C., Hoelzer, D., and Seger, R. (2006). Gene therapy of Chronic Granulomatous Disease, Paper presented at: 14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy (Athens).
- Gummuluru, S., and Emerman, M. (1999). Cell cycle- and Vpr-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression in primary and transformed T-cell lines. *J Virol* 73, 5422-5430.
- Guseo, A., Nador, G., and Palffy, G. (1981). Imported lyssa in Hungary. *Acta Neuropathol Suppl (Berl)* 7, 150-151.
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., Fischer, A., Davies, E. G., Kuis, W., Leiva, L., and Cavazzana-Calvo, M. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346, 1185-1193.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003a). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-256.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2003b). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.

- Hanawa, H., Kelly, P. F., Nathwani, A. C., Persons, D. A., Vandergriff, J. A., Hargrove, P., Vanin, E. F., and Nienhuis, A. W. (2002). Comparison of various envelope proteins for their ability to pseudotype lentiviral vectors and transduce primitive hematopoietic cells from human blood. *Mol Ther* 5, 242-251.
- Hanawa, H., Persons, D. A., and Nienhuis, A. W. (2005). Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors. *J Virol* 79, 8410-8421.
- Harding, T. C., Koprivnikar, K. E., Tu, G. H., Zayek, N., Lew, S., Subramanian, A., Sivakumaran, A., Frey, D., Ho, K., VanRoey, M. J., *et al.* (2004). Intravenous administration of an AAV-2 vector for the expression of factor IX in mice and a dog model of hemophilia B. *Gene Ther* 11, 204-213.
- Haseltine, W. A. (1989). Development of antiviral drugs for the treatment of AIDS: strategies and prospects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2, 311-334.
- Hay, C. M., De Leon, H., Jafari, J. D., Jakubczak, J. L., Mech, C. A., Hallenbeck, P. L., Powell, S. K., Liao, G., and Stevenson, S. C. (2001). Enhanced gene transfer to rabbit jugular veins by an adenovirus containing a cyclic RGD motif in the HI loop of the fiber knob. *J Vasc Res* 38, 315-323.
- Hehl, E. A., Joshi, P., Kalpana, G. V., and Prasad, V. R. (2004). Interaction between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase proteins. *J Virol* 78, 5056-5067.
- Held, P. K., Olivares, E. C., Aguilar, C. P., Finegold, M., Calos, M. P., and Grompe, M. (2005). In vivo correction of murine hereditary tyrosinemia type I by phiC31 integrase-mediated gene delivery. *Mol Ther* 11, 399-408.
- Hematti, P., B. K. Hong, Ferguson, C., Adler, R., Hanawa, H., Sellers, S., Holt, I. E., Eckfeldt, C. E., Sharma, Y., Schmidt, M., von Kalle, C., Persons, D. A., Billings, E. M., Verfaillie, C. M., Nienhuis, A. W., Wolfsberg, T. G., Dunbar, C. E., and Calmels, B. (2004). Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS Biol* 2, e423.
- Henriot, D. (2005). Développement de vecteurs lentiviraux non-intégratifs et de vecteurs lentiviraux à intégration site-spécifique pour la thérapie génique. Analyse de leurs sites d'intégration par LAM-PCR, Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse.
- Herman, S. A., and Coffin, J. M. (1987). Efficient packaging of readthrough RNA in ALV: implications for oncogene transduction. *Science* 236, 845-848.
- Hibbitt, O. C., and Wade-Martins, R. (2006). Delivery of large genomic DNA inserts >100 kb using HSV-1 amplicons. *Curr Gene Ther* 6, 325-336.
- Hlavaty, J., Schittmayer, M., Stracke, A., Jandl, G., Knapp, E., Felber, B. K., Salmons, B., Gunzburg, W. H., and Renner, M. (2005). Effect of posttranscriptional regulatory elements on transgene expression and virus production in the context of retrovirus vectors. *Virology* 341, 1-11.
- Hong, T., Drlica, K., Pinter, A., and Murphy, E. (1991). Circular DNA of human immunodeficiency virus: analysis of circle junction nucleotide sequences. *J Virol* 65, 551-555.
- Hoogerbrugge, P. M., van Beusechem, V. W., Fischer, A., Debree, M., le Deist, F., Perignon, J. L., Morgan, G., Gaspar, B., Fairbanks, L. D., Skeoch, C. H., Moseley, A., Harvey, M., Levinsky, R. J., and Valerio, D. (1996). Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther* 3, 179-183.
- Horn, P. A., Topp, M. S., Morris, J. C., Riddell, S. R., and Kiem, H. P. (2002). Highly efficient gene transfer into baboon marrow repopulating cells using GALV-pseudotype oncoretroviral vectors produced by human packaging cells. *Blood* 100, 3960-3967.
- Horwitz, S. H. (1996). Adenoviruses; Epidemiology, In *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers), pp. 2163-2164.

- Hrimech, M., Yao, X. J., Bachand, F., Rougeau, N., and Cohen, E. A. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection. *J Virol* **73**, 4101-4109.
- Inoue, S., Sato, Y., Hasegawa, H., Noguchi, A., Yamada, A., Kurata, T., and Iwasaki, T. (2003). Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific anti-rabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. *Pathol Int* **53**, 525-533.
- Ishikawa, Y., Tanaka, N., Murakami, K., Uchiyama, T., Kumaki, S., Tsuchiya, S., Kugoh, H., Oshimura, M., Calos, M. P., and Sugamura, K. (2006). Phage phiC31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines. *J Gene Med* **8**, 646-653.
- Ivics, Z. and Z. Izsvak (2006). Transposons for gene therapy! *Curr Gene Ther* **6**: 593-607.
- Ivics, Z., Katzer, A., Stuwe, E. E., Fiedler, D., Knepfel, S., and Izsvak, Z. (2007). Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells. *Mol Ther* **15**, 1137-1144.
- Jahner, D., Stuhlmann, H., Stewart, C. L., Harbers, K., Lohler, J., Simon, I., and Jaenisch, R. (1982). De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* **298**, 623-628.
- Jakobsson, J., Georgievska, B., Ericson, C., and Lundberg, C. (2004). Lesion-dependent regulation of transgene expression in the rat brain using a human glial fibrillary acidic protein-lentiviral vector. *Eur J Neurosci* **19**, 761-765.
- Jarrosson-Wuilleme, L., Goujon, C., Bernaud, J., Rigal, D., Darlix, J. L., and Cimorelli, A. (2006). Transduction of nondividing human macrophages with gammaretrovirus-derived vectors. *J Virol* **80**, 1152-1159.
- Jeang, K. T., Xiao, H., and Rich, E. A. (1999). Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* **274**, 28837-28840.
- Jenke, B. H., Fetzer, C. P., Stehle, I. M., Jonsson, F., Fackelmayer, F. O., Conradt, H., Bode, J., and Lipps, H. J. (2002). An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep* **3**, 349-354.
- Jenkins, T. M., Engelman, A., Ghirlando, R., and Craigie, R. (1996). A soluble active mutant of HIV-1 integrase: involvement of both the core and carboxyl-terminal domains in multimerization. *J Biol Chem* **271**, 7712-7718.
- Jiang, H., Lillcrap, D., Patarroyo-White, S., Liu, T., Qian, X., Scallan, C. D., Powell, S., Keller, T., McMurray, M., Labelle, A., Nagy, D., Vargas, J. A., Zhou, S., Couto, L. B., and Pierce, G. F. (2006a). Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood* **108**, 107-115.
- Jiang, H., Pierce, G. F., Ozelo, M. C., de Paula, E. V., Vargas, J. A., Smith, P., Sommer, J., Luk, A., Manno, C. S., High, K. A., and Arruda, V. R. (2006b). Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther* **14**, 452-455.
- Joseph, G., Jasti, A., Sastri, L., Guo, C., Thompson, E., Vasko, M., and Cornetta, K. (2007). LTR attachment site mutant non-integrating vectors provide greater levels of gene expression, Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Ju, G., and Skalka, A. M. (1980). Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat (LTR) of avian retroviruses: structural similarities with transposable elements. *Cell* **22**, 379-386.
- Jurriaans, S., de Ronde, A., Dekker, J., Goudsmit, J., and Cornelissen, M. (1992). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 LTR-LTR junctions in peripheral blood mononuclear cells of infected individuals. *J Gen Virol* **73** (Pt 6), 1537-1541.
- Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* **17**, 314-317.

- Kahl, C. A., Pollok, K., Haneline, L. S., and Cornetta, K. (2005). Lentiviral vectors pseudotyped with glycoproteins from Ross River and vesicular stomatitis viruses: variable transduction related to cell type and culture conditions. *Mol Ther* 11, 470-482.
- Kang, Y., Xie, L., Tran, D. T., Stein, C. S., Hickey, M., Davidson, B. L., and McCray, P. B., Jr. (2005). Persistent expression of factor VIII in vivo following nonprimate lentiviral gene transfer. *Blood* 106, 1552-1558.
- Kasai, K., and Saeki, Y. (2006). DNA-based methods to prepare helper virus-free herpes amplicon vectors and versatile design of amplicon vector plasmids. *Curr Gene Ther* 6, 303-314.
- Katano, H., Kok, M. R., Cotrim, A. P., Yamano, S., Schmidt, M., Afione, S., Baum, B. J., and Chiorini, J. A. (2006). Enhanced transduction of mouse salivary glands with AAV5-based vectors. *Gene Ther* 13, 594-601.
- Kawai, T., Choi, U., Liu, P. C., Lantz L. M., and Malech, H. L. (2007). Transient expression of WHIM-type mutant CXCR4 in human hematopoietic stem cells mediated by integration defective lentivirus vector enhances engraftment in the NOD/SCID mouse xenograft model, Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Keravala, A., Portlock, J. L., Nash, J. A., Vitrant, D. G., Robbins, P. D., and Calos, M. P. (2006). PhiC31 integrase mediates integration in cultured synovial cells and enhances gene expression in rabbit joints. *J Gene Med* 8, 1008-1017.
- Killebrew, D., and Shiramizu, B. (2004). Pathogenesis of HIV-associated non-Hodgkin lymphoma. *Curr HIV Res* 2, 215-221.
- Killebrew, D. A., Troelstrup, D., and Shiramizu, B. (2004). Preferential HIV-1 integration sites in macrophages and HIV-associated malignancies. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50, OL581-589.
- King, L. A., Mitrophanous, K. A., Clark, L. A., Kim, V. N., Rohll, J. B., Kingsman, A. J., and Colello, R. J. (2000). Growth factor enhanced retroviral gene transfer to the adult central nervous system. *Gene Ther* 7, 1103-1111.
- Kingsman, S. M., Mitrophanous, K., and Olsen, J. C. (2005). Potential oncogene activity of the woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element (WPRE). *Gene Ther* 12, 3-4.
- Kohn, D. B., Hershfield, M. S., Carbonaro, D., Shigeoka, A., Brooks, J., Smogorzewska, E. M., Barsky, L. W., Chan, R., Burotto, F., Annett, G., Nolta, J. A., Crooks, G., Kapoor, N., Elder, M., Wara, D., Bowen, T., Madsen, E., Snyder, F. F., Bastian, J., Muul, L., Blaese, R. M., Weinberg, K., and Parkman, R. (1998). T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 4, 775-780.
- Kohn, D. B., Weinberg, K. I., Nolta, J. A., Heiss, L. N., Lenarsky, C., Crooks, G. M., Hanley, M. E., Annett, G., Brooks, J. S., el-Khoureiy, A., et al. (1995). Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1, 1017-1023.
- Koizumi, N., Mizuguchi, H., Utoguchi, N., Watanabe, Y., and Hayakawa, T. (2003). Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 5, 267-276.
- Kulkosky, J., Katz, R. A., and Skalka, A. M. (1990). Terminal nucleotides of the preintegrative linear form of HIV-1 DNA deduced from the sequence of circular DNA junctions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3, 852-858.
- Kulkosky, J., Jones, K. S., Katz, R. A., Mack, J. P., and Skalka, A. M. (1992). Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol* 12, 2331-2338.
- Kumar, M., Bradow, B. P., and Zimmerberg, J. (2003). Large-scale production of pseudotyped lentiviral vectors using baculovirus GP64. *Hum Gene Ther* 14, 67-77.

- Kumar, M., Keller, B., Makalou, N., and Sutton, R. E. (2001). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12, 1893-1905.
- Kustikova, O., Fehse, B., Modlich, U., Yang, M., Dullmann, J., Kamino, K., von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Li, Z., and Baum, C. (2005). Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* 308, 1171-1174.
- Kustikova, O. S., Geiger, H., Li, Z., Brugman, M. H., Chambers, S. M., Shaw, C. A., Pike-Overzet, K., de Ridder, D., Staal, F. J., von Keudell, G., Cornils, K., Nattamai, K. J., Modlich, U., Wagemaker, G., Goodell, M. A., Fehse, B., and Baum, C. (2007). Retroviral vector insertion sites associated with dominant hematopoietic clones mark "stemness" pathways. *Blood* 109, 1897-1907.
- Le Gal La Salle, G., Robert, J. J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M., and Mallet, J. (1993). An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259, 988-990.
- Le Meur, G., Stieger, K., Smith, A. J., Weber, M., Deschamps, J. Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Pereon, Y., Cherel, Y., Ali, R. R., Hamel, C., Moullier, P., and Rolling, F. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 14, 292-303.
- Leavitt, A. D., Robles, G., Alesandro, N., and Varmus, H. E. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants retain in vitro integrase activity yet fail to integrate viral DNA efficiently during infection. *J Virol* 70, 721-728.
- Lehmann-Che, J., Renault, N., Giron, M. L., Roingeard, P., Clave, E., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Toubert, A., de The, H., and Saib, A. (2007). Centrosomal latency of incoming foamy viruses in resting cells. *PLoS Pathog* 3, e74.
- Levine, B. L., Humeau, L. M., Boyer, J., MacGregor, R. R., Rebello, T., Lu, X., Binder, G. K., Slepishkin, V., Lemiale, F., Mascola, J. R., Bushman, F. D., Dropulic, B., and June, C. H. (2006). Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17372-17377.
- Lewinski, M. K., Yamashita, M., Emerman, M., Ciuffi, A., Marshall, H., Crawford, G., Collins, F., Shinn, P., Leipzig, J., Hannenhalli, S., Berry, C. C., Ecker, J. R., and Bushman, F. D. (2006). Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog* 2, e60.
- Li, L., Olvera, J. M., Yoder, K. E., Mitchell, R. S., Butler, S. L., Lieber, M., Martin, S. L., and Bushman, F. D. (2001). Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *Embo J* 20, 3272-3281.
- Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., Ostertag, W., Kuhlcke, K., Eckert, H. G., Fehse, B., and Baum, C. (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296, 497.
- Limon, A., Devroe, E., Lu, R., Ghory, H. Z., Silver, P. A., and Engelman, A. (2002). Nuclear localization of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes (PICs): V165A and R166A are pleiotropic integrase mutants primarily defective for integration, not PIC nuclear import. *J Virol* 76, 10598-10607.
- Liu, J., Jeppesen, I., Nielsen, K., and Jensen, T. G. (2006). Phi c31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts. *Gene Ther* 13, 1188-1190.
- Llano, M., Saenz, D. T., Meehan, A., Wongthida, P., Peretz, M., Walker, W. H., Teo, W., and Poeschla, E. M. (2006). An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science* 314, 461-464.
- Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M., and Poeschla, E. M. (2004). LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J Virol* 78, 9524-9537.

- Loewen, N., Leske, D. A., Chen, Y., Teo, W. L., Saenz, D. T., Peretz, M., Holmes, J. M., and Poeschla, E. M. (2003). Comparison of wild-type and class I integrase mutant-FIV vectors in retina demonstrates sustained expression of integrated transgenes in retinal pigment epithelium. *J Gene Med* 5, 1009-1017.
- Logan AC, Haas DL, Kafri T, Kohn DB. (2004a). Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. *J Virol* 78, 8421-36.
- Logan, A. C., Nightingale, S. J., Haas, D. L., Cho, G. J., Pepper, K. A., and Kohn, D. B. (2004b). Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 15, 976-988.
- Logvinoff, C., and Epstein, A. L. (2001). A novel approach for herpes simplex virus type 1 amplicon vector production, using the Cre-loxP recombination system to remove helper virus. *Hum Gene Ther* 12, 161-167.
- Lombardo, A., Beausejour, C. M., Genovese, P., Colleoni, S., Galli, C., Urnov, F. D., Gregory, P. D., Holmes-Son, M. L., and Naldini, L. (2007). Efficient gene correction and targeted gene addition in human stem cells using engineered zinc finger nucleases and integrase defective lentiviral vectors, Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Lombardo, A., Beausejour, C. M., Urnov, F. D., Miller, J. C., Holmes-Son, M. L., Gregory, P. D., and Naldini, L. (2005a). Gene correction of X-linked SCID using engineered zinc finger nucleases and integration defective lentiviral delivery, Paper presented at: 8th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Saint Louis, MO).
- Lombardo, A., Calos, M. P., and Naldini, L. (2005b). Development of a new lentiviral vector for site-specific integration into mammalian genomes, Paper presented at: 8th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Saint Louis, MO).
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., and Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9209-9214.
- Lu, R., Ghory, H. Z., and Engelman, A. (2005a). Genetic analyses of conserved residues in the carboxyl-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol* 79, 10356-10368.
- Lu, R., Limon, A., Ghory, H. Z., and Engelman, A. (2005b). Genetic analyses of DNA-binding mutants in the catalytic core domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol* 79, 2493-2505.
- Lu, R., Vandegraaff, N., Cherepanov, P., and Engelman, A. (2005c). Lys-34, dispensable for integrase catalysis, is required for preintegration complex function and human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 79, 12584-12591.
- Lund, A. H., Turner, G., Trubetskoy, A., Verhoeven, E., Wientjens, E., Hulsman, D., Russell, R., DePinho, R. A., Lenz, J., and van Lohuizen, M. (2002). Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice. *Nat Genet* 32, 160-165.
- Mabon, P. J., Weaver, L. C., and Dekaban, G. A. (1999). Cyclosporin A reduces the inflammatory response to a multi-mutant herpes simplex virus type-1 leading to improved transgene expression in sympathetic preganglionic neurons in hamsters. *J Neurovirol* 5, 268-279.
- Mac Gee Sanftner, L. H., Abel, H., Hauswirth, W. W., and Flannery, J. G. (2001). Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 4, 622-629.
- Mack, C. A., Song, W. R., Carpenter, H., Wickham, T. J., Kovesdi, I., Harvey, B. G., Magovern, C. J., Isom, O. W., Rosengart, T., Falck-Pedersen, E., Hackett, N. R., Crystal, R. G., and Mastrangeli, A. (1997). Circumvention of anti-adenovirus neutralizing immunity by administration of an adenoviral vector of an alternate serotype. *Hum Gene Ther* 8, 99-109.

- Mack, K., Wei, R., Shiramizu, B., Herndier, B., Elbaggari, A., Gascon, R., Hurt, M., and McGrath, M. (1998). Evidence of HIV mediated cis-activation of the c-fes protooncogene in a subset of AIDS associated lymphomas., Paper presented at: The second National AIDS Malignancy Conference (Bethesda, MD).
- Mack, K. D., Jin, X., Yu, S., Wei, R., Kapp, L., Green, C., Herndier, B., Abbey, N. W., Elbaggari, A., Liu, Y., and McGrath, M. S. (2003). HIV insertions within and proximal to host cell genes are a common finding in tissues containing high levels of HIV DNA and macrophage-associated p24 antigen expression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33, 308-320.
- Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debysier, Z., and Engelborghs, Y. (2003). LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* 278, 33528-33539.
- Maggiorella, M. T., Monardo, F., Koanga-Mogtomo, M. L., Cioe, L., Sernicola, L., Corrias, F., Baroni, C. D., Verani, P., and Titti, F. (1998). Detection of infectious simian immunodeficiency virus in B- and T-cell lymphomas of experimentally infected macaques. *Blood* 91, 3103-3111.
- Majors, J. (1990). The structure and function of retroviral long terminal repeats. *Curr Top Microbiol Immunol* 157, 49-92.
- Malech, H. L., Choi, U., and Brenner, S. (2004). Progress toward effective gene therapy for chronic granulomatous disease. *Jpn J Infect Dis* 57, S27-28.
- Mangeot, P. E., Negre, D., Dubois, B., Winter, A. J., Leissner, P., Mehtali, M., Kaiserlian, D., Cosset, F. L., and Darlix, J. L. (2000). Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* 74, 8307-8315.
- Mani M, Kandavelou K, Dy FJ, Durai S, Chandrasegaran S. (2005) Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 447-57.
- Mannioui, A., Nelson, E., Schiffer, C., Felix, N., Le Rouzic, E., Benichou, S., Gluckman, J. C., and Canque, B. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 KK26-27 matrix mutants display impaired infectivity, circularization and integration but not nuclear import. *Virology* 339, 21-30.
- Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, V. R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J. J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Rustagi, P. K., Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J. F., Lessard, R. R., Sommer, J. M., Tigges, M., Sabatino, D., Luk, A., Jiang, H., Mingozzi, F., Couto, L., Ertl, H. C., High, K. A., and Kay, M. A. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12, 342-347.
- Manzini, S., Vargiolu, A., Stehle, I. M., Bacci, M. L., Cerrito, M. G., Giovannoni, R., Zannoni, A., Bianco, M. R., Forni, M., Donini, P., Papa, M., Lipps, H. J., and Lavitrano, M. (2006). Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17672-17677.
- Marconi, P., Simonato, M., Zucchini, S., Bregola, G., Argnani, R., Krisky, D., Glorioso, J. C., and Manservigi, R. (1999). Replication-defective herpes simplex virus vectors for neurotrophic factor gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther* 6, 904-912.
- Marconi, P., Zucchini, S., Berto, E., Bozac, A., Paradiso, B., Bregola, G., Grassi, C., Volpi, I., Argnani, R., Marzola, A., Manservigi, R., and Simonato, M. (2005). Effects of defective herpes simplex vectors expressing neurotrophic factors on the proliferation and differentiation of nervous cells in vivo. *Gene Ther* 12, 559-569.

- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembien, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J. B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F., and Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380.
- Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286, 2244-2245.
- Martino, S., Marconi, P., Tancini, B., Dolcetta, D., De Angelis, M. G., Montanucci, P., Bregola, G., Sandhoff, K., Bordignon, C., Emiliani, C., Manservigi, R., and Orlacchio, A. (2005). A direct gene transfer strategy via brain internal capsule reverses the biochemical defect in Tay-Sachs disease. *Hum Mol Genet* 14, 2113-2123.
- Mastrangeli, A., Harvey, B. G., Yao, J., Wolff, G., Kovesdi, I., Crystal, R. G., and Falck-Pedersen, E. (1996). "Sero-switch" adenovirus-mediated in vivo gene transfer: circumvention of anti-adenovirus humoral immune defenses against repeat adenovirus vector administration by changing the adenovirus serotype. *Hum Gene Ther* 7, 79-87.
- Masuda, T., Planelles, V., Krogstad, P., and Chen, I. S. (1995). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 att site: unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain. *J Virol* 69, 6687-6696.
- Maurice, M., Verhoeyen, E., Salmon, P., Trono, D., Russell, S. J., and Cosset, F. L. (2002). Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood* 99, 2342-2350.
- Mazarakis, N. D., Azzouz, M., Rohll, J. B., Ellard, F. M., Wilkes, F. J., Olsen, A. L., Carter, E. E., Barber, R. D., Baban, D. F., Kingsman, S. M., Kingsman, A. J., O'Malley, K., and Mitrophanous, K. A. (2001). Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum Mol Genet* 10, 2109-2121.
- May, C., Rivella, S., Callegari, J., Heller, G., Gaensler, K. M., Luzzatto, L., and Sadelain, M. (2000). Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature* 406, 82-86.
- May, C., Rivella, S., Chadburn, A., and Sadelain, M. (2002). Successful treatment of murine beta-thalassaemia intermedia by transfer of the human beta-globin gene. *Blood* 99, 1902-1908.
- Meehan, A., Llano, M., Peretz, M., Raghavakaimal, S., Charleton, M., and Poeschla, E. (2003). Differential gene expression in chronically HIV-1-infected monocyte-derived macrophages., Paper presented at: Proceedings of the 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Foundation of retrovirology and Human Health (Alexandria, VA).
- Mentis, G. Z., Gravell, M., Hamilton, R., Shneider, N. A., O'Donovan, M. J., and Schubert, M. (2006). Transduction of motor neurons and muscle fibers by intramuscular injection of HIV-1-based vectors pseudotyped with select rabies virus glycoproteins. *J Neurosci Methods* 157, 208-217.
- Miller, D. G., Rutledge, E. A., and Russell, D. W. (2002). Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet* 30, 147-148.
- Miller, D. G., Trobridge, G. D., Petek, L. M., Jacobs, M. A., Kaul, R., and Russell, D. W. (2005). Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. *J Virol* 79, 11434-11442.
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., Beausejour, C. M., Waite, A. J., Wang, N. S., Kim, K. A., Gregory, P. D., Pabo, C. O., and Rebar, E. J. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 25, 778-85.



- Mingozzi, F., Maus, M. V., Hui, D. J., Sabatino, D. E., Murphy, S. L., Rasko, J. E., Ragni, M. V., Manno, C. S., Sommer, J., Jiang, H., et al. (2007). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* 13, 419-422.
- Mitani, K., Graham, F. L., Caskey, C. T., and Kochanek, S. (1995). Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3854-3858.
- Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., Ecker, J. R., and Bushman, F. D. (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2, E234.
- Mitrophanous, K., Yoon, S., Rohll, J., Patil, D., Wilkes, F., Kim, V., Kingsman, S., Kingsman, A., and Mazarakis, N. (1999). Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther* 6, 1808-1818.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72, 8150-8157.
- Mizuguchi, H., Koizumi, N., Hosono, T., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Utoguchi, N., Watanabe, Y., and Hayakawa, T. (2002). CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther* 9, 769-776.
- Modlich, U., Bohne, J., Schmidt, M., von Kalle, C., Knoss, S., Schambach, A., and Baum, C. (2006a). Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 108, 2545-2553.
- Modlich, U., Kustikova, O. S., Schmidt, M., Rudolph, C., Meyer, J., Li, Z., Kamino, K., von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Kuehlicke, K., Bunting, K. D., Schmidt, S., Deichmann, A., von Kalle, C., Fehse, B., and Baum, C. (2005). Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* 105, 4235-4246.
- Modlich, U., Schambach, A., Wicke, D., Knoess, S., and Baum, C. (2006b). Improved vector design and low hematopoietic stress reduce the risk of severe adverse events caused by gene-modified hematopoietic cells, Paper presented at: 14th annual meeting of the European Society of Gene Therapy (Athens).
- Moehle, E. A., Rock, J. M., Lee, Y. L., Jouvenot, Y., DeKolver, R. C., Gregory, P. D., Urnov, F. D., and Holmes, M. C. (2007). Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3055-3060.
- Mok, H., Palmer, D. J., Ng, P., and Barry, M. A. (2005). Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses. *Mol Ther* 11, 66-79.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., Doglioni, C., von Kalle, C., and Naldini, L. (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* 24, 687-696.
- Moolten, F. L., and Cupples, L. A. (1992). A model for predicting the risk of cancer consequent to retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 3, 479-486.
- Mooslehner, K., Karls, U., and Harbers, K. (1990). Retroviral integration sites in transgenic Mov mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA regions. *J Virol* 64, 3056-3058.
- Morishita, K., Parker, D. S., Mucenski, M. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Ihle, J. N. (1988). Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* 54, 831-840.
- Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B. A., Snyder, R. O., McArthur, J. G., and Patel, S. D. (2000). Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* 74, 1761-1766.

- Muhlebach, M. D., Schmitt, I., Steidl, S., Stitz, J., Schweizer, M., Blankenstein, T., Cichutek, K., and Uckert, W. (2003). Transduction efficiency of MLV but not of HIV-1 vectors is pseudotype dependent on human primary T lymphocytes. *J Mol Med* 81, 801-810.
- Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926-932.
- Nakai, H., Montini, E., Fuess, S., Storm, T. A., Grompe, M., and Kay, M. A. (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34, 297-302.
- Nakai, H., Storm, T. A., and Kay, M. A. (2000). Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors. *Nat Biotechnol* 18, 527-532.
- Nakai, H., Wu, X., Fuess, S., Storm, T. A., Munroe, D., Montini, E., Burgess, S. M., Grompe, M., and Kay, M. A. (2005). Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol* 79, 3606-3614.
- Nakajima, N., Lu, R., and Engelman, A. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of integrase-mediated dna recombination: definition of permissive and nonpermissive T-cell lines. *J Virol* 75, 7944-7955.
- Nakamura, T., Largaespada, D. A., Shaughnessy, J. D., Jr., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (1996). Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nat Genet* 12, 149-153.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., and Verma, I. M. (1996a). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11382-11388.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996b). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
- Nanmoku, K., Kawano, M., Iwasaki, Y., and Ikenaka, K. (2003). Highly efficient gene transduction into the brain using high-titer retroviral vectors. *Dev Neurosci* 25, 152-161.
- Narfstrom, K., Bragadottir, R., Redmond, T. M., Rakoczy, P. E., van Veen, T., and Bruun, A. (2003a). Functional and structural evaluation after AAV.RPE65 gene transfer in the canine model of Leber's congenital amaurosis. *Adv Exp Med Biol* 533, 423-430.
- Narfstrom, K., Katz, M. L., Bragadottir, R., Seeliger, M., Boulanger, A., Redmond, T. M., Caro, L., Lai, C. M., and Rakoczy, P. E. (2003b). Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1663-1672.
- Negre, D., Mangeot, P. E., Duisit, G., Blanchard, S., Vidalain, P. O., Leissner, P., Winter, A. J., Rabourdin-Combe, C., Mehtali, M., Moullier, P., Darlix, J. L., and Cosset, F. L. (2000). Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* 7, 1613-1623.
- Negri, D. R., Michelini, Z., Baroncelli, S., Spada, M., Vendetti, S., Buffa, V., Bona, R., Leone, P., Klotman, M. E., and Cara, A. (2007). Successful Immunization with a Single Injection of Non-integrating Lentiviral Vector. *Mol Ther* 15, 1716-1723.
- Neil, S. J., Aasa-Chapman, M. M., Clapham, P. R., Nibbs, R. J., McKnight, A., and Weiss, R. A. (2005). The promiscuous CC chemokine receptor D6 is a functional coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 on astrocytes. *J Virol* 79, 9618-9624.
- Nienhuis, A. W., Dunbar, C. E., and Sorrentino, B. P. (2006). Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther* 13, 1031-1049.
- Nightingale, S. J., Hollis, R. P., Pepper, K. A., Petersen, D., Yu, X. J., Yang, C., Bahner, I., and Kohn, D. B. (2006). Transient gene expression by nonintegrating lentiviral vectors. *Mol Ther* 13, 1121-1132.

- O'Riordan, C. R., Lachapelle, A., Delgado, C., Parkes, V., Wadsworth, S. C., Smith, A. E., and Francis, G. E. (1999). PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 10, 1349-1358.
- O'Rourke, J. P., Olsen, J. C., and Bunnell, B. A. (2005). Optimization of equine infectious anemia derived vectors for hematopoietic cell lineage gene transfer. *Gene Ther* 12, 22-29.
- Olivares, E. C., Hollis, R. P., Chalberg, T. W., Meuse, L., Kay, M. A., and Calos, M. P. (2002). Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat Biotechnol* 20, 1124-1128.
- Olschowka, J. A., Bowers, W. J., Hurley, S. D., Mastrangelo, M. A., and Federoff, H. J. (2003). Helper-free HSV-1 amplicons elicit a markedly less robust innate immune response in the CNS. *Mol Ther* 7, 218-227.
- Olsen, J. C. (1998). Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. *Gene Ther* 5, 1481-1487.
- Olsen, J. C. (2001). EIAV, CAEV and other lentivirus vector systems. *Somat Cell Mol Genet* 26, 131-145.
- Onodera, M., Ariga, T., Kawamura, N., Kobayashi, I., Ohtsu, M., Yamada, M., Tame, A., Furuta, H., Okano, M., Matsumoto, S., Kotani, H., McGarrity, G. J., Blaese, R. M., and Sakiyama, Y. (1998). Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91, 30-36.
- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D. R., Lin, Q., Calos, M. P., and Khavari, P. A. (2003). PhiC31 integrase-mediated nonviral genetic correction of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 14, 923-928.
- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D. R., Lin, Q., Fang, M., Calos, M. P., and Khavari, P. A. (2002). Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat Med* 8, 1166-1170.
- Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A., Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Luthi, U., Hassan, M., Thrasher, A. J., Hoelzer, D., von Kalle, C., Seger, R., and Grez, M. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12, 401-409.
- Palmer, D., and Ng, P. (2003). Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Mol Ther* 8, 846-852.
- Panganiban, A. T., and Temin, H. M. (1984). Circles with two tandem LTRs are precursors to integrated retrovirus DNA. *Cell* 36, 673-679.
- Pannell, D., and Ellis, J. (2001). Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors. *Rev Med Virol* 11, 205-217.
- Panther, L. A., Coombs, R. W., Aung, S. A., dela Rosa, C., Gretch, D., and Corey, L. (1999). Unintegrated HIV-1 circular 2-LTR proviral DNA as a marker of recently infected cells: relative effect of recombinant CD4, zidovudine, and saquinavir in vitro. *J Med Virol* 58, 165-173.
- Panther, L. A., Coombs, R. W., Zeh, J. E., Collier, A. C., and Corey, L. (1998). Unintegrated circular HIV-1 DNA in the peripheral mononuclear cells of HIV-1-infected subjects: association with high levels of plasma HIV-1 RNA, rapid decline in CD4 count, and clinical progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 17, 303-313.
- Papapetrou, E. P., Ziros, P. G., Micheva, I. D., Zoumbos, N. C., and Athanassiadou, A. (2006). Gene transfer into human hematopoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an S/MAR element. *Gene Ther* 13, 40-51.
- Paques, F. and P. Duchateau (2007). Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther* 7, 49-66.

- Pardridge, W. M. (2005). Tyrosine hydroxylase replacement in experimental Parkinson's disease with transvascular gene therapy. *NeuroRx* 2, 129-138.
- Park, F., and Kay, M. A. (2001). Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression in vitro and in vivo. *Mol Ther* 4, 164-173.
- Park, F., Ohashi, K., Chiu, W., Naldini, L., and Kay, M. A. (2000). Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet* 24, 49-52.
- Park, F., Ohashi, K., and Kay, M. A. (2003). The effect of age on hepatic gene transfer with self-inactivating lentiviral vectors in vivo. *Mol Ther* 8, 314-323.
- Parveen, Z., Krupetsky, A., Engelstadter, M., Cichutek, K., Pomerantz, R. J., and Dornburg, R. (2000). Spleen necrosis virus-derived C-type retroviral vectors for gene transfer to quiescent cells. *Nat Biotechnol* 18, 623-629.
- Paterna, J. C., Moccetti, T., Mura, A., Feldon, J., and Bueler, H. (2000). Influence of promoter and WHV post-transcriptional regulatory element on AAV-mediated transgene expression in the rat brain. *Gene Ther* 7, 1304-1311.
- Pauza, C. D., Trivedi, P., McKechnie, T. S., Richman, D. D., and Graziano, F. M. (1994). 2-LTR circular viral DNA as a marker for human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo. *Virology* 205, 470-478.
- Peden, C. S., Burger, C., Muzyczka, N., and Mandel, R. J. (2004). Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J Virol* 78, 6344-6359.
- Peng, Z. (2005). Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* 16, 1016-1027.
- Perreau, M., Mennechet, F., Serratrice, N., Wodrich, H., and Kremer, E. J. (2007). Contrasting effects on the phenotypical and functional maturation of human dendritic cells by human, canine and hybrid adenovirus vectors: implication for clinical efficacy. *J Virol*.
- Pertusa, M., Garcia-Matas, S., Mammeri, H., Adell, A., Rodrigo, T., Mallet, J., Cristofol, R., Sarkis, C., and Sanfeliu, C. (2007). Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats. *Neurobiol Aging*, epub March 29.
- Petit, C., Schwartz, O., and Mammano, F. (1999). Oligomerization within virions and subcellular localization of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol* 73, 5079-5088.
- Petit, C., Schwartz, O., and Mammano, F. (2000). The karyophilic properties of human immunodeficiency virus type 1 integrase are not required for nuclear import of proviral DNA. *J Virol* 74, 7119-7126.
- Pfeifer, A. (2006). Lentiviral transgenesis: a versatile tool for basic research and gene therapy. *Curr Gene Ther* 6, 535-542.
- Philippe, S., Sarkis, C., Barkats, M., Mammeri, H., Ladroue, C., Petit, C., Mallet, J., and Serguera, C. (2006). Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17684-17689.
- Philpott, N. J., Gomos, J., Berns, K. I., and Falck-Pedersen, E. (2002). A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12381-12385.
- Philpott, N. J., and Thrasher, A. J. (2007). Use of Nonintegrating Lentiviral Vectors for Gene Therapy. *Hum Gene Ther*.
- Pichlmair, A., Diebold, S. S., Gschmeissner, S., Takeuchi, Y., Ikeda, Y., Collins, M. K., and Reis e Sousa, C. (2007). Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via Toll-like receptor 9. *J Virol* 81, 539-547.

- Pierson, T. C., Kieffer, T. L., Ruff, C. T., Buck, C., Gange, S. J., and Siliciano, R. F. (2002). Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* *76*, 4138-4144.
- Poeschla, E. M., Wong-Staal, F., and Looney, D. J. (1998). Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med* *4*, 354-357.
- Poon, B., and Chen, I. S. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr enhances expression from unintegrated HIV-1 DNA. *J Virol* *77*, 3962-3972.
- Popescu, N. C. (2003). Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Lett* *192*, 1-17.
- Porteus, M. H., and Baltimore, D. (2003). Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* *300*, 763.
- Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* *65*, 532-536.
- Pryciak, P. M., and Varmus, H. E. (1992). Fv-1 restriction and its effects on murine leukemia virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* *66*, 5959-5966.
- Purcell, D. F., Broscious, C. M., Vanin, E. F., Buckler, C. E., Nienhuis, A. W., and Martin, M. A. (1996). An array of murine leukemia virus-related elements is transmitted and expressed in a primate recipient of retroviral gene transfer. *J Virol* *70*, 887-897.
- Puthenveetil, G., Scholes, J., Carbonell, D., Qureshi, N., Xia, P., Zeng, L., Li, S., Yu, Y., Hiti, A. L., Yee, J. K., and Malik, P. (2004). Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood* *104*, 3445-3453.
- Quenneville, S. P., Chapdelaine, P., Rousseau, J., Beaulieu, J., Caron, N. J., Skuk, D., Mills, P., Olivares, E. C., Calos, M. P., and Tremblay, J. P. (2004). Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with phiC31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts. *Mol Ther* *10*, 679-687.
- Quenneville, S. P., Chapdelaine, P., Rousseau, J., and Tremblay, J. P. (2007). Dystrophin expression in host muscle following transplantation of muscle precursor cells modified with the phiC31 integrase. *Gene Ther* *14*, 514-522.
- Raineri, I., and Senn, H. P. (1992). HIV-1 promotor insertion revealed by selective detection of chimeric provirus-host gene transcripts. *Nucleic Acids Res* *20*, 6261-6266.
- Ramezani, A., Hawley, T. S., and Hawley, R. G. (2003). Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold attachment region and the chicken beta-globin insulator. *Blood* *101*, 4717-4724.
- Randolph, C. A., and Champoux, J. J. (1993). The majority of simian immunodeficiency virus/mne circle junctions result from ligation of unintegrated viral DNA ends that are aberrant for integration. *Virology* *194*, 851-854.
- Recillas-Targa, F., Pikaart, M. J., Burgess-Beusse, B., Bell, A. C., Litt, M. D., West, A. G., Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2002). Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 6883-6888.
- Reich, S. J., Auricchio, A., Hildinger, M., Glover, E., Maguire, A. M., Wilson, J. M., and Bennett, J. (2003). Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* *14*, 37-44.
- Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R. O., Karlsson, S., and Schubert, M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 15266-15271.
- Rethwilm, A. (2007). Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* *7*, 261-271.

- Rice, P., Craigie, R., and Davies, D. R. (1996). Retroviral integrases and their cousins. *Curr Opin Struct Biol* 6, 76-83.
- Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J., and Petropoulos, C. J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4144-4149.
- Riviere, C., Danos, O., and Douar, A. M. (2006). Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther* 13, 1300-1308.
- Riviere, I., Brose, K., and Mulligan, R. C. (1995). Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6733-6737.
- Rizvi, T. A., and Panganiban, A. T. (1993). Simian immunodeficiency virus RNA is efficiently encapsidated by human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 67, 2681-2688.
- Robbins, P. B., Skelton, D. C., Yu, X. J., Halene, S., Leonard, E. H., and Kohn, D. B. (1998). Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10182-10187.
- Robert-Richard, E., Richard, E., Malik, P., Ged, C., de Verneuil, H., and Moreau-Gaudry, F. (2007). Murine Retroviral but not Human Cellular Promoters Induce In Vivo Erythroid-specific Dereglulation that can be Partially Prevented by Insulators. *Mol Ther* 15, 173-182.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., and Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* 12, 2099-2108.
- Russell, D. W., and Miller, A. D. (1996). Foamy virus vectors. *J Virol* 70, 217-222.
- Sachdeva, G., D'Costa, J., Cho, J. E., Kachapati, K., Choudhry, V., and Arya, S. K. (2007). Chimeric HIV-1 and HIV-2 lentiviral vectors with added safety insurance. *J Med Virol* 79, 118-126.
- Saenz, D. T., Loewen, N., Peretz, M., Whitwam, T., Barraza, R., Howell, K. G., Holmes, J. M., Good, M., and Poeschla, E. M. (2004). Unintegrated lentivirus DNA persistence and accessibility to expression in nondividing cells: analysis with class I integrase mutants. *J Virol* 78, 2906-2920.
- Sakai, H., Kawamura, M., Sakuragi, J., Sakuragi, S., Shibata, R., Ishimoto, A., Ono, N., Ueda, S., and Adachi, A. (1993). Integration is essential for efficient gene expression of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67, 1169-1174.
- Sakhuja, K., Reddy, P. S., Ganesh, S., Cantaniag, F., Pattison, S., Limbach, P., Kayda, D. B., Kadan, M. J., Kaleko, M., and Connelly, S. (2003). Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 14, 243-254.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Negre, D., Le Grand, R., Trono, D., and Cosset, F. L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100, 823-832.
- Scallan, C. D., Jiang, H., Liu, T., Patarroyo-White, S., Sommer, J. M., Zhou, S., Couto, L. B., and Pierce, G. F. (2006). Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* 107, 1810-1817.
- Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I. M., Lipps, H. J., and Knippers, R. (2004). An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *Embo J* 23, 191-201.
- Schambach, A., Bohne, J., Baum, C., Hermann, F. G., Egerer, L., von Laer, D., and Giroglou, T. (2006). Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression. *Gene Ther* 13, 641-645.

- Schauber, C. A., Tuerk, M. J., Pacheco, C. D., Escarpe, P. A., and Veres, G. (2004). Lentiviral vectors pseudotyped with baculovirus gp64 efficiently transduce mouse cells in vivo and show tropism restriction against hematopoietic cell types in vitro. *Gene Ther* 11, 266-275.
- Scherdin, U., Rhodes, K., and Breindl, M. (1990). Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol* 64, 907-912.
- Schmidt, M., Carbonaro, D. A., Speckmann, C., Wissler, M., Bohnsack, J., Elder, M., Aronow, B. J., Nolta, J. A., Kohn, D. B., and von Kalle, C. (2003). Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 9, 463-468.
- Schmidt, M., Hoffmann, G., Wissler, M., Lemke, N., Mussig, A., Glimm, H., Williams, D. A., Ragg, S., Hesemann, C. U., and von Kalle, C. (2001). Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther* 12, 743-749.
- Schmidt, M., Zickler, P., Hoffmann, G., Haas, S., Wissler, M., Muessig, A., Tisdale, J. F., Kuramoto, K., Andrews, R. G., Wu, T., Kiem, H. P., Dunbar, C. E., and von Kalle, C. (2002). Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. *Blood* 100, 2737-2743.
- Schnell, T., Foley, P., Wirth, M., Munch, J., and Uberla, K. (2000). Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther* 11, 439-447.
- Schnepp, B. C., Jensen, R. L., Chen, C. L., Johnson, P. R., and Clark, K. R. (2005). Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* 79, 14793-14803.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-529.
- Schuettrumpf, J., Baila, S., Khazi, F., Liu, J., Bunte, R., and Arruda, V. R. (2007). AAV vectors do not increase the risk of tumor formation in p53 deficient models, Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Schwartz, O., Marechal, V., Friguet, B., Arenzana-Seisdedos, F., and Heard, J. M. (1998). Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72, 3845-3850.
- Schwarzwaelder, K., Howe, S. J., Schmidt, M., Brugman, M. H., Deichmann, A., Glimm, H., Schmidt, S., Prinz, C., Wissler, M., King, D. J., Zhang, F., Parsley, K. L., Gilmour, K. C., Sinclair, J., Bayford, J., Peraj, R., Pike-Overzet, K., Staal, F. J., de Ridder, D., Kinnon, C., Abel, U., Wagemaker, G., Gaspar, H. B., Thrasher, A. J., and von Kalle, C. (2007). Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest* 117, 2241-2249.
- Sclimenti, C. R., Thyagarajan, B., and Calos, M. P. (2001). Directed evolution of a recombinase for improved genomic integration at a native human sequence. *Nucleic Acids Res* 29, 5044-5051.
- Seki, T., Dmitriev, I., Suzuki, K., Kashentseva, E., Takayama, K., Rots, M., Uil, T., Wu, H., Wang, M., and Curiel, D. T. (2002). Fiber shaft extension in combination with HI loop ligands augments infectivity for CAR-negative tumor targets but does not enhance hepatotropism in vivo. *Gene Ther* 9, 1101-1108.
- Serhan, F., Penaud, M., Petit, C., Leste-Lasserre, T., Trajcevski, S., Klatzmann, D., Duisit, G., Sonigo, P., and Moullier, P. (2004). Early detection of a two-long-terminal-repeat junction molecule in the cytoplasm of recombinant murine leukemia virus-infected cells. *J Virol* 78, 6190-6199.
- Shank, P. R., and Varmus, H. E. (1978). Virus-specific DNA in the cytoplasm of avian sarcoma virus-infected cells is a precursor to covalently closed circular viral DNA in the nucleus. *J Virol* 25, 104-104.

- Sharkey, M. E., Teo, I., Greenough, T., Sharova, N., Luzuriaga, K., Sullivan, J. L., Bucy, R. P., Kostrikis, L. G., Haase, A., Veryard, C., Davaro, R. E., Cheeseman, S. H., Daly, J. S., Bova, C., Ellison, R. T., 3rd, Mady, B., Lai, K. K., Moyle, G., Nelson, M., Gazzard, B., Shaunak, S., and Stevenson, M. (2000). Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 6, 76-81.
- Shehu-Xhilaga, M., Hill, M., Marshall, J. A., Kappes, J., Crowe, S. M., and Mak, J. (2002). The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. *J Virol* 76, 4331-4340.
- Sherman, M. P., and Greene, W. C. (2002). Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect* 4, 67-73.
- Shin, C. G., Taddeo, B., Haseltine, W. A., and Farnet, C. M. (1994). Genetic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein. *J Virol* 68, 1633-1642.
- Shiramizu, B., Herndier, B. G., and McGrath, M. S. (1994). Identification of a common clonal human immunodeficiency virus integration site in human immunodeficiency virus-associated lymphomas. *Cancer Res* 54, 2069-2072.
- Shoemaker, C., Goff, S., Gilboa, E., Paskind, M., Mitra, S. W., and Baltimore, D. (1980). Structure of a cloned circular Moloney murine leukemia virus DNA molecule containing an inverted segment: implications for retrovirus integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3932-3936.
- Shou, Y., Ma, Z., Lu, T., and Sorrentino, B. P. (2006). Unique risk factors for insertional mutagenesis in a mouse model of XSCID gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11730-11735.
- Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., Dubart-Kupperschmitt, A., and Charneau, P. (2000). The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 96, 4103-4110.
- Smith, J. S., Kim, S. Y., and Roth, M. J. (1990). Analysis of long terminal repeat circle junctions of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 64, 6286-6290.
- Song, S., Laipis, P. J., Berns, K. I., and Flotte, T. R. (2001). Effect of DNA-dependent protein kinase on the molecular fate of the rAAV2 genome in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4084-4088.
- Soudais, C., Skander, N., and Kremer, E. J. (2004). Long-term in vivo transduction of neurons throughout the rat CNS using novel helper-dependent CAV-2 vectors. *Faseb J* 18, 391-393.
- Speers, W. C., Gautsch, J. W., and Dixon, F. J. (1980). Silent infection of murine embryonal carcinoma cells by Moloney murine leukemia virus. *Virology* 105, 241-244.
- Spencer, D. M. (2000). Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications. *Curr Opin Mol Ther* 2, 433-440.
- Spergel, J. M., Hsu, W., Akira, S., Thimmappaya, B., Kishimoto, T., and Chen-Kiang, S. (1992). NF-IL6, a member of the C/EBP family, regulates E1A-responsive promoters in the absence of E1A. *J Virol* 66, 1021-1030.
- Staunstrup, N. H., M. Jakobsen, Moldt, B., and Mikkelsen, J. G. (2007). Integation-defective lentiviral vectors as platform for Sleeping Beauty transposase-mediated gene insertion. Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Stevenson, M., Haggerty, S., Lamonica, C. A., Meier, C. M., Welch, S. K., and Wasiak, A. J. (1990a). Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products. *J Virol* 64, 2421-2425.
- Stevenson, M., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., and Lamonica, C. A. (1990b). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *Embo J* 9, 1551-1560.
- Stocking, C., Bergholz, U., Friel, J., Klingler, K., Wagener, T., Starke, C., Kitamura, T., Miyajima, A., and Ostertag, W. (1993). Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. *Growth Factors* 8, 197-209.



- Stoff-Khalili, M. A., Rivera, A. A., Glasgow, J. N., Le, L. P., Stoff, A., Everts, M., Tsuruta, Y., Kawakami, Y., Bauerschmitz, G. J., Mathis, J. M., Pereboeva, L., Seigal, G. P., Dall, P., and Curiel, D. T. (2005). A human adenoviral vector with a chimeric fiber from canine adenovirus type 1 results in novel expanded tropism for cancer gene therapy. *Gene Ther* 12, 1696-1706.
- Strappe, P. M., Hampton, D. W., Brown, D., Cachon-Gonzalez, B., Caldwell, M., Fawcett, J. W., and Lever, A. M. (2005). Identification of unique reciprocal and non reciprocal cross packaging relationships between HIV-1, HIV-2 and SIV reveals an efficient SIV/HIV-2 lentiviral vector system with highly favourable features for in vivo testing and clinical usage. *Retrovirology* 2, 55.
- Sun, M., Zhang, G. R., Kong, L., Holmes, C., Wang, X., Zhang, W., Goldstein, D. S., and Geller, A. I. (2003). Correction of a rat model of Parkinson's disease by coexpression of tyrosine hydroxylase and aromatic amino acid decarboxylase from a helper virus-free herpes simplex virus type 1 vector. *Hum Gene Ther* 14, 415-424.
- Sutton, R. E., Reitsma, M. J., Uchida, N., and Brown, P. O. (1999). Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent. *J Virol* 73, 3649-3660.
- Suzuki, T., Shen, H., Akagi, K., Morse, H. C., Malley, J. D., Naiman, D. Q., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2002). New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet* 32, 166-174.
- Suzuki, Y., and Craigie, R. (2007). The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 5, 187-196.
- Swindle, C. S., Kim, H. G., and Klug, C. A. (2004). Mutation of CpGs in the murine stem cell virus retroviral vector long terminal repeat represses silencing in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 279, 34-41.
- Szczepiek M, Brondani V, Buchel J, Serrano L, Segal DJ, Cathomen T. (2007) Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 25(7):786-93.
- Tabata, T., Mitomo, K., Inoue, M., Yoshizaki, M., Ikeda, Y., Yonemitsu, Y., and Hasegawa, H. (2006). Retinitis Pigmentosa gene therapy: Characterization of the integration sites of a Simian lentivirus vector (SIVagm) in the target cells, Paper presented at: 14th anual meeting of the European Society of Gene Therapy (Athens).
- Taddeo, B., Haseltine, W. A., and Farnet, C. M. (1994). Integrase mutants of human immunodeficiency virus type 1 with a specific defect in integration. *J Virol* 68, 8401-8405.
- Takahashi, M., Miyoshi, H., Verma, I. M., and Gage, F. H. (1999). Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J Virol* 73, 7812-7816.
- Takahashi, R., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Hashimoto, S., Miyoshi, I., Kasai, N., Hakamata, Y., Kobayashi, E., and Ueda, M. (2007). Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. *Transgenic Res* 16, 115-120.
- Takeuchi, Y., Akutsu, M., Murayama, K., Shimizu, N., and Hoshino, H. (1991). Host range mutant of human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at the neutralization epitope in the env gene. *J Virol* 65, 1710-1718.
- Takeuchi, Y., Cosset, F. L., Lachmann, P. J., Okada, H., Weiss, R. A., and Collins, M. K. (1994). Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* 68, 8001-8007.
- Teich, N. M., Weiss, R. A., Martin, G. R., and Lowy, D. R. (1977). Virus infection of murine teratocarcinoma stem cell lines. *Cell* 12, 973-982.
- Themis, M., Waddington, S. N., Schmidt, M., von Kalle, C., Wang, Y., Al-Allaf, F., Gregory, L. G., Nivsarkar, M., Holder, M. V., Buckley, S. M., Dighe, N., Ruthe, A. T., Mistry, A., Bigger, B., Rahim, A., Nguyen, T. H., Trono, D., Thrasher, A. J., and Coutelle, C. (2005). Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice. *Mol Ther* 12, 763-771.

- Thomas, C. E., Edwards, P., Wickham, T. J., Castro, M. G., and Lowenstein, P. R. (2002). Adenovirus binding to the coxsackievirus and adenovirus receptor or integrins is not required to elicit brain inflammation but is necessary to transduce specific neural cell types. *J Virol* *76*, 3452-3460.
- Thomas, C. E., Schiedner, G., Kochanek, S., Castro, M. G., and Lowenstein, P. R. (2000). Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 7482-7487.
- Thomas, C. E., Schiedner, G., Kochanek, S., Castro, M. G., and Lowenstein, P. R. (2001). Preexisting antiadenoviral immunity is not a barrier to efficient and stable transduction of the brain, mediated by novel high-capacity adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* *12*, 839-846.
- Thrasher, A. J., Hacein-Bey-Abina, S., Gaspar, H. B., Blanche, S., Davies, E. G., Parsley, K., Gilmour, K., King, D., Howe, S., Sinclair, J., Hue, C., Carlier, F., von Kalle, C., de Saint Basile, G., le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2005). Failure of SCID-X1 gene therapy in older patients. *Blood* *105*, 4255-4257.
- Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Hollis, R. P., Ginsburg, D. S., and Calos, M. P. (2001). Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol* *21*, 3926-3934.
- Trobridge, G. D., Miller, D. G., Jacobs, M. A., Allen, J. M., Kiem, H. P., Kaul, R., and Russell, D. W. (2006). Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1498-1503.
- Tsukahara, T., Agawa, H., Matsumoto, S., Matsuda, M., Ueno, S., Yamashita, Y., Yamada, K., Tanaka, N., Kojima, K., and Takeshita, T. (2006). Murine leukemia virus vector integration favors promoter regions and regional hot spots in a human T-cell line. *Biochem Biophys Res Commun* *345*, 1099-1107.
- Uchida, N., Sutton, R. E., Frieria, A. M., He, D., Reitsma, M. J., Chang, W. C., Veres, G., Scollay, R., and Weissman, I. L. (1998). HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11939-11944.
- Umana, P., Gerdes, C. A., Stone, D., Davis, J. R., Ward, D., Castro, M. G., and Lowenstein, P. R. (2001). Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination. *Nat Biotechnol* *19*, 582-585.
- van der Wegen, P., Louwen, R., Imam, A. M., Buijs-Offerman, R. M., Sinaasappel, M., Grosveld, F., and Scholte, B. J. (2006). Successful treatment of UGT1A1 deficiency in a rat model of Crigler-Najjar disease by intravenous administration of a liver-specific lentiviral vector. *Mol Ther* *13*, 374-381.
- Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F., and Debyser, Z. (2006). Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem Sci* *31*, 98-105.
- Van Maele, B., De Rijck, J., De Clercq, E., and Debyser, Z. (2003). Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. *J Virol* *77*, 4685-4694.
- Vanin, E. F., Kaloss, M., Broscius, C., and Nienhuis, A. W. (1994). Characterization of replication-competent retroviruses from nonhuman primates with virus-induced T-cell lymphomas and observations regarding the mechanism of oncogenesis. *J Virol* *68*, 4241-4250.
- Vargas, J., Jr., Gusella, G. L., Najfeld, V., Klotman, M. E., and Cara, A. (2004). Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* *15*, 361-372.
- Verhoeven, E., Dardalhon, V., Ducrey-Rundquist, O., Trono, D., Taylor, N., and Cosset, F. L. (2003). IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes. *Blood* *101*, 2167-2174.

- Verhoeven, E., Wiznerowicz, M., Olivier, D., Izac, B., Trono, D., Dubart-Kupperschmitt, A., and Cosset, F. L. (2005). Novel lentiviral vectors displaying "early-acting cytokines" selectively promote survival and transduction of NOD/SCID repopulating human hematopoietic stem cells. *Blood* 106, 3386-3395.
- Vigne, E., Dedieu, J. F., Brie, A., Gillardeaux, A., Briot, D., Benihoud, K., Latta-Mahieu, M., Saulnier, P., Perricaudet, M., and Yeh, P. (2003). Genetic manipulations of adenovirus type 5 fiber resulting in liver tropism attenuation. *Gene Ther* 10, 153-162.
- Vilaboa, N., and Voellmy, R. (2006). Regulatable gene expression systems for gene therapy. *Curr Gene Ther* 6, 421-438.
- Vink, C., Oude Groeneger, A. M., and Plasterk, R. H. (1993). Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type I integrase protein. *Nucleic Acids Res* 21, 1419-1425.
- Vink, C., Lutzke, R. A., and Plasterk, R. H. (1994). Formation of a stable complex between the human immunodeficiency virus integrase protein and viral DNA. *Nucleic Acids Res* 22, 4103-4110.
- Vogel, M., Cichutek, K., Norley, S., and Kurth, R. (1993). Self-limiting infection by int/nef-double mutants of simian immunodeficiency virus. *Virology* 193, 115-123.
- Vogel, R., Amar, L., Thi, A. D., Saillour, P., and Mallet, J. (2004). A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. *Hum Gene Ther* 15, 157-165.
- von Teichman, B. F., de Koker, W. C., Bosch, S. J., Bishop, G. C., Meredith, C. D., and Bingham, J. (1998). Mokola virus infection: description of recent South African cases and a review of the virus epidemiology. *J S Afr Vet Assoc* 69, 169-171.
- Wade-Martins, R., Saeki, Y., and Chiocca, E. A. (2003). Infectious delivery of a 135-kb LDLR genomic locus leads to regulated complementation of low-density lipoprotein receptor deficiency in human cells. *Mol Ther* 7, 604-612.
- Wade-Martins, R., Smith, E. R., Tyminski, E., Chiocca, E. A., and Saeki, Y. (2001). An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. *Nat Biotechnol* 19, 1067-1070.
- Waehler, R., Russell, S. J., and Curiel, D. T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 8, 573-587.
- Watson, D. J., Kobinger, G. P., Passini, M. A., Wilson, J. M., and Wolfe, J. H. (2002). Targeted Transduction Patterns in the Mouse Brain by Lentivirus Vectors Pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV Envelope Proteins. *Mol Ther* 5, 528-537.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D., and Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307-312.
- West, A. G., Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev* 16, 271-288.
- Whitcomb, J. M., Kumar, R., and Hughes, S. H. (1990). Sequence of the circle junction of human immunodeficiency virus type 1: implications for reverse transcription and integration. *J Virol* 64, 4903-4906.
- White, S. M., Renda, M., Nam, N. Y., Klimatcheva, E., Zhu, Y., Fisk, J., Halterman, M., Rimel, B. J., Federoff, H., Pandya, S., Rosenblatt, J. D., and Planelles, V. (1999). Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. *J Virol* 73, 2832-2840.
- Whitwam, T., Peretz, M., and Poeschla, E. (2001). Identification of a central DNA flap in feline immunodeficiency virus. *J Virol* 75, 9407-9414.
- Wilson, M. H., J. M. Kaminski, and George, A.L., Jr. (2005). Functional zinc finger/sleeping beauty transposase chimeras exhibit attenuated overproduction inhibition. *FEBS Lett* 579, 6205-9.

- Wiskerchen, M., and Muesing, M. A. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells. *J Virol* *69*, 376-386.
- Wonderling, R. S., and Owens, R. A. (1997). Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome. *J Virol* *71*, 2528-2534.
- Wong, L. F., Azzouz, M., Walmsley, L. E., Askham, Z., Wilkes, F. J., Mitrophanous, K. A., Kingsman, S. M., and Mazarakis, N. D. (2004). Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system. *Mol Ther* *9*, 101-111.
- Wong, L. F., Goodhead, L., Prat, C., Mitrophanous, K. A., Kingsman, S. M., and Mazarakis, N. D. (2006). Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Hum Gene Ther* *17*, 1-9.
- Woods, N. B., Bottero, V., Schmidt, M., von Kalle, C., and Verma, I. M. (2006). Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* *440*, 1123.
- Wu, H., Seki, T., Dmitriev, I., Uil, T., Kashentseva, E., Han, T., and Curiel, D. T. (2002). Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum Gene Ther* *13*, 1647-1653.
- Wu, P., Phillips, M. I., Bui, J., and Terwilliger, E. F. (1998). Adeno-associated virus vector-mediated transgene integration into neurons and other nondividing cell targets. *J Virol* *72*, 5919-5926.
- Wu, X., Anderson, J. L., Campbell, E. M., Joseph, A. M., and Hope, T. J. (2006). Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 7465-7470.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., and Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* *300*, 1749-1751.
- Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J. A., Hehl, E., Kalpana, G. V., Prasad, V., and Kappes, J. C. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J Virol* *73*, 2126-2135.
- Wu, Y. (2004). HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* *1*, 13.
- Wu, Y., and Marsh, J. W. (2001). Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*, 1503-1506.
- Wu, Y., and Marsh, J. W. (2003a). Early transcription from nonintegrated DNA in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* *77*, 10376-10382.
- Wu, Y., and Marsh, J. W. (2003b). Gene transcription in HIV infection. *Microbes Infect* *5*, 1023-1027.
- Yamada, K., McCarty, D. M., Madden, V. J., and Walsh, C. E. (2003). Lentivirus vector purification using anion exchange HPLC leads to improved gene transfer. *Biotechniques* *34*, 1074-1078, 1080.
- Yamada, M., Oligino, T., Mata, M., Goss, J. R., Glorioso, J. C., and Fink, D. J. (1999). Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine-induced degeneration of neurons in the substantia nigra in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 4078-4083.
- Yamashita, M., and Emerman, M. (2004). Capsid is a dominant determinant of retrovirus infectivity in nondividing cells. *J Virol* *78*, 5670-5678.
- Yamashita, M., and Emerman, M. (2005). The cell cycle independence of HIV infections is not determined by known karyophilic viral elements. *PLoS Pathog* *1*, e18.
- Yamashita, M., and Emerman, M. (2006). Retroviral infection of non-dividing cells: old and new perspectives. *Virology* *344*, 88-93.

- Yan, Z., Zhang, Y., Duan, D., and Engelhardt, J. F. (2000). Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 6716-6721.
- Yanez-Munoz, R. J., Balagan, K. S., MacNeil, A., Howe, S. J., Schmidt, M., Smith, A. J., Buch, P., MacLaren, R. E., Anderson, P. N., Barker, S. E., Duran, Y., Bartholomae, C., von Kalle, C., Heckenlively, J. R., Kinnon, C., Ali, R. R., and Thrasher, A. J. (2006). Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* *12*, 348-353.
- Yanez-Munoz, R. J., Foster, E., Yip, P., MacMahon, S. B., Waddington, S. N., and Antoniou, M. (2007). Integration-deficient lentiviral vectors mediate efficient gene transfer to the nervous system and muscle, Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Yang, C. C., Xiao, X., Zhu, X., Ansardi, D. C., Epstein, N. D., Frey, M. R., Matera, A. G., and Samulski, R. J. (1997). Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* *71*, 9231-9247.
- Yang, G. S., Schmidt, M., Yan, Z., Lindbloom, J. D., Harding, T. C., Donahue, B. A., Engelhardt, J. F., Kotin, R., and Davidson, B. L. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* *76*, 7651-7660.
- Yang, Q., Lucas, A., Son, S., and Chang, L. J. (2007). Overlapping enhancer/promoter and transcriptional termination signals in the lentiviral long terminal repeat. *Retrovirology* *4*, 4.
- Yilmaz, A., Fernandez, S., Lairmore, M. D., and Boris-Lawrie, K. (2006). Coordinate enhancement of transgene transcription and translation in a lentiviral vector. *Retrovirology* *3*, 13.
- Yu, J. H., and Schaffer, D. V. (2006). High-throughput, library-based selection of a murine leukemia virus variant to infect nondividing cells. *J Virol* *80*, 8981-8988.
- Yu, S. F., von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., and Gilboa, E. (1986). Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 3194-3198.
- Yuan, B., Fassati, A., Yueh, A., and Goff, S. P. (2002). Characterization of Moloney murine leukemia virus p12 mutants blocked during early events of infection. *J Virol* *76*, 10801-10810.
- Yueh, A., and Goff, S. P. (2003). Phosphorylated serine residues and an arginine-rich domain of the moloney murine leukemia virus p12 protein are required for early events of viral infection. *J Virol* *77*, 1820-1829.
- Yun, C. O., Yoon, A. R., Yoo, J. Y., Kim, H., Kim, M., Ha, T., Kim, G. E., Kim, H., and Kim, J. H. (2005). Coxsackie and adenovirus receptor binding ablation reduces adenovirus liver tropism and toxicity. *Hum Gene Ther* *16*, 248-261.
- Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A., and Chen, I. S. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* *61*, 213-222.
- Zack, J. A., Haislip, A. M., Krogstad, P., and Chen, I. S. (1992). Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. *J Virol* *66*, 1717-1725.
- Zaiss, A. K., Son, S., and Chang, L. J. (2002). RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J Virol* *76*, 7209-7219.
- Zaupa, C., Revol-Guyot, V., and Epstein, A. L. (2003). Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. *Hum Gene Ther* *14*, 1049-1063.
- Zazzi, M., Romano, L., Catucci, M., Venturi, G., De Milito, A., Almi, P., Gonnelli, A., Rubino, M., Occhini, U., and Valensin, P. E. (1997). Evaluation of the presence of 2-LTR HIV-1 unintegrated DNA as a simple molecular predictor of disease progression. *J Med Virol* *52*, 20-25.

- Zeithaml, B., Ma, H., and Kafri, T. (2007). A mechanistic study of HIV-1 SIN mobilization to address unanticipated biosafety risks, Paper presented at: 10th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Seattle, WA).
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* *101*, 173-185.
- Zennou, V., Serguera, C., Sarkis, C., Colin, P., Perret, E., Mallet, J., and Charneau, P. (2001). The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* *19*, 446-450.
- Zhang, Y. F., Boado, R. J., and Pardridge, W. M. (2003). Absence of toxicity of chronic weekly intravenous gene therapy with pegylated immunoliposomes. *Pharm Res* *20*, 1779-1785.
- Zhong, L., Li, W., Li, Y., Zhao, W., Wu, J., Li, B., Maina, N., Bischof, D., Qing, K., Weigel-Kelley, K. A., Zolotukhin, I., Warrington, K. H., Jr., Li, X., Slayton, W. B., Yoder, M. C., and Srivastava, A. (2006). Evaluation of primitive murine hematopoietic stem and progenitor cell transduction in vitro and in vivo by recombinant adeno-associated virus vector serotypes 1 through 5. *Hum Gene Ther* *17*, 321-333.
- Zhu, Y. X., Liu, C., Liu, X. L., Qiao, W. T., Chen, Q. M., Zeng, Y., and Geng, Y. Q. (2005). Construction and characterization of chimeric BHIV (BIV/HIV-1) viruses carrying the bovine immunodeficiency virus gag gene. *World J Gastroenterol* *11*, 2609-2615.
- Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* *12*, 2424-2433.
- Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., and Hope, T. J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* *73*, 2886-2892.

Les vecteurs lentiviraux sont parmi les plus efficaces et les plus aisés à manipuler en vue du transfert de gènes. Leur application est toutefois fortement compromise par le risque de mutagenèse qui résulte de l'intégration de leur génome dans la chromatine de la cellule cible. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin de contourner ce risque, l'une d'entre elle est de bloquer l'intégration du génome vecteur et d'utiliser des vecteurs lentiviraux sous forme épisomale.

Nous avons introduit une mutation dans la région C-terminale de l'intégrase de vecteurs dérivés du HIV (262RRK->AAH). Nous avons démontré que ces vecteurs permettent l'expression d'un transgène dans différentes lignées cellulaires *in vitro* ainsi que dans des cultures primaires de cellules en arrêt de division (astrocytes et neurones). L'expression du transgène est perdue par dilution des génomes non intégrés au cours de la division cellulaire. Elle est au contraire stable dans des cellules en arrêt de division. Nous avons également évalué l'activité résiduelle d'intégration des vecteurs mutants exprimant le gène de résistance au G418 (NEO), elle est réduite de 2 à 3 log par rapport au vecteur contrôle. Enfin, nous avons démontré la capacité de ces vecteurs lentiviraux non-intégratifs à diriger l'expression d'un transgène *in vivo* dans le système nerveux central de rongeur, pendant au moins 10 semaines après injection dans le striatum de souris et pendant au moins 5 mois après injection sous-rétinienne chez le rat.

Nous avons ensuite entrepris l'amélioration de l'efficacité d'expression du transgène et la réduction de l'activité résiduelle d'intégration. En premier lieu, dans le but d'augmenter l'activité transcriptionnelle des formes épisomales du génome lentiviral, nous avons incorporé des séquences d'attachement à la matrice nucléaire (séquence MAR de la chaîne légère de l'immunoglobuline de souris et séquence MAR du lysozyme de poulet). Nous avons transduit *in vitro* différentes lignées cellulaires ainsi que des progéniteurs neuraux humains avec des vecteurs lentiviraux non-intégratifs permettant l'expression de la Luciférase. Nous n'avons pas observé d'amélioration significative du niveau d'expression du transgène en présence des séquences MAR.

Parallèlement, nous avons produit des vecteurs portant différentes mutations de l'intégrase (N : <sup>262</sup>RRK->AAH, ou LQ : <sup>186</sup>K->Q, <sup>214</sup>Q->L, <sup>216</sup>Q->L, ou <sup>64</sup>D->V) permettant l'expression de différents transgènes (GFP, LUC, GDNF). Nous avons comparé *in vitro* l'efficacité de transduction de ces différents vecteurs. Nous avons établi que le vecteur N est moins efficace que les vecteurs D64V et LQ. Nous avons en effet observé un phénomène de saturation de la transduction par le vecteur N. Les vecteurs D64V et LQ permettent une expression comparable du transgène.

Nous avons également produit des vecteurs permettant l'expression du gène NEO portant ces différentes mutations d'intégrase, seules ou en combinaison avec la modification des séquences d'attachement des LTR. Nous avons comparé la fréquence d'intégration résiduelle de ces différents vecteurs et observé que le vecteur D64V présente l'intégration la plus élevée parmi les vecteurs mutants. La fréquence d'intégration est réduite de 1 à 2 log par rapport au vecteur contrôle intégratif tandis qu'elle est réduite de 2 à 3 log pour les vecteurs N et LQ. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de réduction significative de l'intégration par la modification des LTR, qu'elle que soit l'intégrase mutée considérée.