



HAL
open science

Étude du potentiel des pFAR4, miniplasmides dépourvus de gène de résistance à un antibiotique, comme vecteurs pour la thérapie génique

Marie Pastor

► **To cite this version:**

Marie Pastor. Étude du potentiel des pFAR4, miniplasmides dépourvus de gène de résistance à un antibiotique, comme vecteurs pour la thérapie génique. Biotechnologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB043 . tel-02562452

HAL Id: tel-02562452

<https://theses.hal.science/tel-02562452>

Submitted on 4 May 2020

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Ecole doctorale : Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (HOB)

Spécialités : Biothérapies et Biotechnologies

Présentée par :

Marie PASTOR

Pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université Paris Descartes

Sujet de la thèse :

Étude du potentiel des pFAR4, miniplasmides dépourvus de gène de résistance à un antibiotique, comme vecteurs pour la thérapie génique

Soutenance prévue le 12 juillet 2016

Devant le jury composé de :

Mme Chantal PICHON	Professeur des Universités, CNRS, Orléans	Rapporteur
M. Régis SODOYER	Directeur Innovation & Technologie, IRT Bioaster, Lyon	Rapporteur
Mme Marie-Pierre ROLS	Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse	Examineur
M. Emmanuel PAYEN	Directeur de Recherche, CEA, Fontenay aux Roses	Examineur
M. Daniel SCHERMAN	Directeur de Recherche, CNRS, Paris	Directeur de thèse
Mme Corinne MARIE	Maitre de conférences, ENSCP, Paris	Examineur

Préface

Ces travaux de thèse portent sur un plasmide dépourvu de gène de résistance à un antibiotique nommé pFAR4, et sur son utilisation comme vecteur pour la thérapie génique non virale. Ils ont été réalisés au sein de l'Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS) dirigée par le Dr Daniel Scherman et ont été financés par une allocation de la Commission Européenne.

La thérapie génique consiste en l'administration d'acides nucléiques pour le traitement de maladies génétiques héréditaires ou acquises. L'effet thérapeutique peut être généré par des acides nucléiques de différentes natures, pouvant consister en un gène codant une protéine thérapeutique ou en des oligonucléotides ayant la capacité de réguler l'expression de gènes endogènes impliqués dans la maladie.

Diverses techniques de vectorisation virales ou non virales ont été développées afin de favoriser leur transfert aux cellules ou tissus ciblés. En fonction de la maladie traitée, l'utilisation de systèmes insertionnels peut favoriser l'expression sur le long terme du facteur thérapeutique en conduisant à l'intégration des acides nucléiques dans le génome des cellules hôtes.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier le potentiel du vecteur plasmidique pFAR4 dans deux contextes de thérapie génique non virale.

La première partie de cette thèse sera consacrée à une introduction bibliographique permettant de situer ce travail dans le contexte scientifique actuel. Cette introduction présentera, dans un premier temps, les différents outils et systèmes de vectorisation employés en thérapie génique. Puis, nous décrirons dans un second temps, les caractéristiques des vecteurs plasmidiques ainsi que les optimisations dont ils ont fait l'objet afin de favoriser leur efficacité, leur production et leur application comme outil de thérapie génique. Enfin, nous présenterons les systèmes de transposition employés pour des approches insertionnelles, et plus particulièrement le système *Sleeping Beauty* qui a été utilisé dans notre étude.

La partie décrivant les résultats sera divisée en deux chapitres :

Un premier chapitre sera consacré à l'étude du potentiel du vecteur pFAR4 pour l'expression dans le foie, d'un gène thérapeutique, *Sgsh*, codant une protéine défectueuse chez les patients atteints de la maladie de Sanfilippo de type A, une maladie génétique de surcharge lysosomale.

Le second chapitre sera dédié à l'étude du potentiel du pFAR4 comme vecteur du système de transposition *Sleeping Beauty*, dans une approche *in vitro* insertionnelle. La combinaison de ces technologies sera par la suite employée dans le cadre d'essais cliniques visant à traiter la Dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Une conclusion générale clôturera ce manuscrit en replaçant notre étude dans le contexte scientifique et économique actuel.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Daniel Scherman pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour ses conseils scientifiques avisés.

Je souhaite remercier Madame Chantal Pichon et Monsieur Régis Sodoyer pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi que Madame Marie-Pierre Rols et Monsieur Emmanuel Payen pour avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examineurs.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Corinne Marie, qui a encadré ces travaux avec beaucoup d'attention et de patience. Je te remercie de m'avoir permis de réaliser cette thèse, pour tes conseils toujours pertinents, ton partage scientifique, ta disponibilité, ton écoute et ta gentillesse ainsi que pour ta relecture attentive et ô combien précieuse de ce manuscrit.

Je remercie les membres du projet TargetAMD, Gabriele Thumann, Zsuzsanna Izsvák, et tout particulièrement Sandra Johnen, Nina Harmening et Martina Kropp pour nos échanges scientifiques et amicaux.

Un sincère merci à Frédérique Peronnet pour m'avoir initiée au ChIP et pour avoir pris le temps de m'aider à la fois dans la mise en place de mes essais et également dans l'analyse des résultats.

Je ne remercierai jamais assez Mickael Quiviger pour mes deux premières années de thèse au cours desquelles il m'a tout appris (enfin presque...l'injection hydro, ce n'est pas encore vraiment ça !). Je te remercie tout particulièrement pour les expériences *vivo*, mais aussi pour tes conseils tous domaines confondus, pour ta patience, pour tous nos fous rires et pour ton amitié qui m'est très chère.

Un grand merci à Julie Pailloux et Alison Makhoul pour leur précieuse contribution à ces travaux. Merci pour votre aide et votre soutien !

Je remercie tous les membres de l'Unité, en particulier Virginie Escriou pour ses conseils en culture cellulaire et pour avoir été mon fournisseur officiel de liposomes et Nathalie Mignet qui m'a initié à leur synthèse (j'attends toujours d'apercevoir la fameuse « goutte » !). Je remercie également Michel Bessodes, Michel Bureau, Cyrille Richard, Pascal Bigey, Céline Hoffman, Lionel Quentin, Segar Virapin (merci d'avoir sauvé mon ordinateur !), Evelyne Lucas, Alfucène Trauaré (merci pour ton accueil à grand éclat de rire chaque matin et allez l'OM !), Lisa Ferreira, Hélène Dhôtel et Emilie Couprianoff. A tous : merci pour votre accueil et votre sympathie !

Je remercie Magali Pederzoli-Ribeil, Stéphanie Bessoles et Lydia Aldaz-Caroll pour leurs précieux conseils en matière d'extraction d'ARN, de cytométrie en flux et pour nos discussions sur la recherche.

Je tiens à remercier l'équipe de l'Animalerie Centrale et plus particulièrement Iharilalao Dubail et Inès Lassoued pour leurs conseils et leur aide dans la gestion de la lignée.

Merci à tous les doctorants, étudiants et ingénieurs de passage, Simona Manta, Nelly El Shafey, Danielle Arruda, Gonzalo Ramirez, Graciele Andrade, Dimitri Kornblum, Inès Malenica, Federica Novelli, Antoine Rousseau, Caroline Thebault et Ni Zheng pour les bons moments passés ensemble et les discussions autour d'un verre, d'un repas le midi dans l'herbe ou au détour d'un couloir.

Merci à Lauréline Delacotte et Thomas Maldiney pour leur soutien et leur écoute, et pour avoir partagé avec moi leurs passionnantes réflexions sur la science, la recherche, l'éducation et la vie.

Merci à Alice Rochard, pour tous les bons moments et pour cette forte amitié qui n'a cessé de grandir depuis notre rencontre au labo !

Mille mercis à Johanne Seguin pour ses conseils techniques mais aussi humains. Merci pour ton amitié, pour ton aide, ton écoute, les coups de pieds aux fesses, pour les précieuses pauses café et les soirées !

Un immense merci à Eliott Teston pour ces trois années de doctorat traversées ensemble. Trois années au cours desquelles s'est forgée notre amitié. Merci pour ton soutien, ton écoute, pour tes idées livres et films, pour nos longues et passionnantes discussions, enfin...merci pour tout !

Je tiens également à remercier Ange Ansur et toute l'équipe des Savanturiers, pour m'avoir permis de vivre cette superbe expérience avec les élèves de l'école Arago, pour m'avoir montré la puissance de la recherche comme outil pédagogique et pour m'avoir permis de trouver ma voie.

Enfin, je remercie ma famille, mes amis et Kenrich, pour leur amour, leurs encouragements et leur soutien infaillible.

SOMMAIRE

Préface	3
Remerciements	5
Sommaire	7
Liste des abréviations.....	11
Liste des Figures et Tableaux.....	13
Introduction.....	17
I La thérapie génique.....	19
I.1 Généralités	19
I.1.1 Applications de la thérapie génique	19
I.2 Vecteurs viraux.....	25
I.3 Vecteurs non viraux.....	31
II Des plasmides pour la thérapie génique	46
II.1 Structure générale d'un plasmide	46
II.2 Eléments clés pour un transfert et une expression du transgène efficaces	47
II.3 Maintien ou extinction de l'expression du transgène à partir d'un plasmide: mécanismes et stratégies.....	54
II.4 Nouvelle génération de vecteurs non viraux dépourvus de gène de résistance à un antibiotique.....	59
II.5 Les miniplasmides biosécurisés pFAR.....	70
II.6 Production de vecteurs plasmidiques Pour une application clinique.....	75
III Les transposons comme outils de thérapie génique	79
III.1 Présentation générale des transposons	79
III.2 Le système de transposition <i>Sleeping Beauty</i>	81
III.3 Les systèmes de transposition <i>piggyBac</i> et <i>Tol2</i>	91
IV Utilisation des plasmides pFAR4 dans deux approches de thérapie génique	93
Chapitre I : Approche de thérapie génique non virale pour la maladie de Sanfilippo de type A.....	95
I Introduction.....	97
I.1 Description de la maladie	97
I.2 Approches thérapeutiques.....	98
I.3 Traitement par thérapie génique	99
II Thérapie génique non virale pour MPSIIIA – Contexte de l'étude.....	101

III Résultats	105
III.1 L'expression de la sulfamidase à partir du pFAR4 est maintenue dans le temps.....	105
III.2 Hypothèses	107
III.3 Statut du plasmide pFAR4 dans le foie	109
III.4 Comparaison des quantités de plasmides dérivés de pFAR4 et de pKAR4	111
III.5 Comparaison du niveau de transcription du gène <i>Sgsh</i>	112
III.6 Comparaison du profil épigénétique des vecteurs pFAR4 et pKAR4 :	114
IV Discussion	124
V Conclusion.....	129
Chapitre II : Evaluation de la combinaison pFAR4/<i>Sleeping Beauty</i> pour des applications dans le domaine de la thérapie génique	131
I Introduction.....	133
I.1 La dégénérescence maculaire liée à l'âge	134
I.2 Approches thérapeutiques	136
I.3 Traitement de la DMLA par thérapie génique	137
I.4 Projet TargetAMD : Approche de thérapie génique non virale pour le traitement de la DMLA humide	138
II Résultats.....	140
II.1 La combinaison pFAR4/ <i>SB</i> conduit à une transposition efficace dans le génome des cellules HeLa.....	140
II.2 Etude de la combinaison des technologies pFAR4/ <i>SB</i> en système non sélectif.....	146
II.3 Etude de la combinaison pFAR4/ <i>SB</i> en cellules primaires.....	158
II.4 Production des plasmides pFAR4-CMV-SB100X et pFAR4-ITRs-CMV-PEDF en conditions « BPF »	160
III Discussion	163
IV Conclusion	170
Conclusion générale	171
Matériel et Méthodes.....	177
I Techniques de biologie moléculaire.....	179
I.1 Clonages et production de plasmides.....	179
I.2 Extraction et quantification d'acides nucléiques.....	184
I.3 Immunoprécipitation de la chromatine	194
II Techniques de biologie cellulaire	198
II.1 Culture cellulaire	198
II.2 Cytométrie en flux	200

III Dosages biochimiques.....	201
III.1 Dosage de l'activité sulfamidase.....	201
III.2 Dosage des protéines totales	202
IV Expérimentation animale	202
IV.1 Les animaux	202
IV.2 Anesthésie.....	203
IV.3 Prélèvements	203
IV.4 Injections.....	203
V Statistiques	205
Bibliographie	207
Article	237

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV	Virus associé à l'adénovirus
Ad	Adénovirus
ADA	Adénosine désaminase
AND	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BET	Bromure d'éthidium
BGH	Bovine Growth Hormone
BHE	Barrière hémato-encéphalique
bp	Paire de bases
BPF	Bonnes pratiques de fabrication
CAR	Chimeric Antigen Receptor
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CMV	Cytomegalovirus
CNV	Néovascularisation choroïdale
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Desoxuribonucléase
dNTP	Désoxyribonucléides
DO	Densité optique
DR	Directed repeat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
EP	Produit d'Excision
GAGs	Glycosaminoglycanes
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
hAAT	Human alpha-antitrypsin
H3K4me2/3	Di-/tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3
H3K27me3	Tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HS	Sulfate d'héparane
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
HSV	Virus de l'herpès
IP	Immunoprécipitation
IPE	Epithélium pigmentaire de l'iris
ITRs	Inverted Terminal Repeats
LB	Milieu Luria Bertani
LB APS	Milieu Luria Bertani avec source de protéines végétale
LSD	Lysosomal storage disease
LV	Lentivirus
MH	Milieu Mueller Hinton
MPS III	Mucopolysaccharidose de type III (Maladie de Sanfilippo)

NeoR	Gène de résistance à la néomycine
NLS	Signal de localisation nucléaire
nt	Nucléotide
pb	Paire de bases
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
pCOR	Plasmide à origine de répllication conditionnelle
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PCRq	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
PFA	Paraformaldéhyde
pFAR	Plasmide sans gène de résistance à un antibiotique
PRC2	Polycomb repression complex 2
rAAV	AAV recombinant
RNAPII (RPII)	ARN polymérase II
RNase	Ribonucléase
RPE	Epithélium pigmentaire de la rétine
rpm	Rotation par minute
RPPH1	Ribonuclease P RNA component H1
RT	Transcription inverse
SB	<i>Sleeping Beauty</i>
SB100X	Transposase <i>Sleeping Beauty</i> hyperactive
SCID	Déficit immunitaire combiné sévère (ou alymphocytose)
siRNA	Petit ARN interférent
SGSH	<i>N</i> -sulfo-glucosamine sulfohydrolase (Sulfamidase)
SNC	Système nerveux central
SV/SV40	Virus simien 40
TM#47-9a	Souche d' <i>E. coli</i> triple mutante <i>thyA endA recA</i> -
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: PROPORTIONS DES MALADIES CIBLEES PAR DES ESSAIS CLINIQUES DE THERAPIE GENIQUE EN JANVIER 2015	20
FIGURE 2: FONCTION DES GENES UTILISES DANS LE CADRE D'ESSAIS CLINIQUES DE THERAPIE GENIQUE EN JANVIER 2015	22
FIGURE 3: STRATEGIES DE THERAPIE GENIQUE EX VIVO ET IN VIVO.....	23
FIGURE 4 : BARRIERES EXTRA- ET INTRACELLULAIRES AU TRANSFERT DE GENE.....	24
FIGURE 5 : TYPES DE VECTEURS UTILISES DANS DES ESSAIS CLINIQUES DE THERAPIE GENIQUE EN JANVIER 2015	25
FIGURE 6 : PRINCIPE DE PRODUCTION D'UN VECTEUR VIRAL POUR LA THERAPIE GENIQUE.	26
FIGURE 7: LES DIFFERENTS TYPES D'OLIGONUCLEOTIDES SYNTHETIQUES ET LEURS CIBLES	32
FIGURE 8: CARACTERISTIQUES D'UNE TECHNOLOGIE IDEALE DE TRANSFERT DE GENE ET LISTE DES METHODES EXISTANTES.	34
FIGURE 9: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN LIPIDE CATIONIQUE	35
FIGURE 10: TRANSFECTION PAR ELECTROTRANSFERT.	41
FIGURE 11: INJECTION HYDRODYNAMIQUE CHEZ LA SOURIS.....	42
FIGURE 12: STRUCTURE GENERALE D'UN VECTEUR PLASMIDIQUE.	47
FIGURE 13: DIFFERENTES TOPOLOGIES D'UN PLASMIDE.	48
FIGURE 14 : INFLUENCE DE LA TAILLE DU PLASMIDE SUR L'EFFICACITE D'EXPRESSION DE LA LUCIFERASE.	50
FIGURE 15: INTRODUCTION DE SEQUENCES DTS FAVORISANT L'IMPORT DU PLASMIDE DANS LE NOYAU.	53
FIGURE 16: LES DIFFERENTS ETATS DE LA CHROMATINE.	56
FIGURE 17: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PRODUCTION DE MINICERCLES.	61
FIGURE 18: SELECTION ET MAINTENANCE D'UN PLASMIDE PAR COMPLEMENTATION D'AUXOTROPHIE.....	63
FIGURE 19: SYSTEME TOXINE/ANTITOXINE.....	64
FIGURE 20: SYSTEME DE SELECTION PORT.	65
FIGURE 21: SYSTEMES DE SELECTION BASES SUR L'INTERACTION ARN/ARN.	66
FIGURE 22: SELECTION ET MAINTIEN D'UN PLASMIDE PAR SUPPRESSION D'UNE MUTATION NON-SENS.....	66
FIGURE 23: DESCRIPTION DU SYSTEME pFAR.	71
FIGURE 24 : VISUALISATION DU PLASMIDE pFAR4-LUC (3.7 KB) SUR UN GEL D'AGAROSE 1%.	72
FIGURE 25 : EFFICACITE DE TRANSFECTION DU pFAR4-LUC IN VITRO.	73
FIGURE 26 : LE PLASMIDE pFAR4 CONDUIT A UNE EXPRESSION ELEVEE ET PROLONGEE DE LA LUCIFERASE APRES ADMINISTRATION PAR ELECTROTRANSFERT DANS DIFFERENTS TISSUS.	74
FIGURE 27: VUE D'ENSEMBLE DU PROCESSUS DE PRODUCTION DE PLASMIDES EN CONDITIONS BPF.	76
FIGURE 28: MECANISMES D'ACTION DES TRANSPOSONS DE CLASSE I ET II.	80
FIGURE 29: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX COMPOSANTS DU SYSTEME SLEEPING BEAUTY.	82
FIGURE 30: LE SYSTEME SLEEPING BEAUTY A UNE OU DEUX COMPOSANTES.....	83
FIGURE 31 : MECANISME DE TRANSPOSITION.....	84
FIGURE 32: ETAPES D'EXCISION ET D'INTEGRATION DANS LE PROCESSUS DE TRANSPOSITION DE SB.	85
FIGURE 33 : PROFIL D'INTEGRATION DU TRANSPOSON SLEEPING BEAUTY DANS LE GENOME EUCARYOTE.....	86
FIGURE 34: PRODUCTION DE CELLULES T SPECIFIQUEMENT DIRIGEEES CONTRE L'ANTIGENE CD19.....	90

FIGURE 35: PROJET DE THESE	93
FIGURE 36: TRAFIC DES ENZYMES LYSOSOMALES ET CORRECTION CROISEE.	98
FIGURE 37: L'ACTIVITE DE LA SULFAMIDASE DANS LE SERUM DE SOURIS MPS IIIA EST DOSE DEPENDANTE.....	102
FIGURE 38 : MESURE DE L'ACTIVITE SULFAMIDASE ET DE LA QUANTITE DE GAGS DANS DIFFERENTS ORGANES DE SOURIS MPS III A TRAITEES OU NON.....	103
FIGURE 39: CARTES DES PLASMIDES DERIVES DU pFAR4 ET DU pKAR4 UTILISES COMME VECTEURS D'EXPRESSION DE LA SULFAMIDASE DANS LE FOIE.	105
FIGURE 40: MESURE DE L'ACTIVITE DE LA SULFAMIDASE SERIQUE APRES ADMINISTRATION DES PLASMIDES pFAR4-HAAT- SGSH ET pKAR4-HAAT-SGSH AU FOIE DES SOURIS.....	106
FIGURE 41: HYPOTHESES DE TRAVAIL	108
FIGURE 42: MESURE DE L'ACTIVITE SULFAMIDASE APRES INDUCTION D'UNE MULTIPLICATION CELLULAIRE RAPIDE PAR INJECTION INTRAPERITONEALE DE CCl ₄	110
FIGURE 43: NOMBRE DE COPIES DE PLASMIDE PAR GENOME DIPLOÏDE.....	112
FIGURE 44: QUANTIFICATION DES TRANSCRITS SGSH.	113
FIGURE 45: PRINCIPE GENERAL D'UN ESSAI DE CHIP (CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION).	116
FIGURE 46: CHOIX DES SEQUENCES DE LA CASSETTE D'EXPRESSION CIBLEES PAR L'ESSAI DE CHIP.....	117
FIGURE 47: VERIFICATION DES ETAPES D'EXTRACTION ET DE SONICATION DE LA CHROMATINE ISSUE DU FOIE DES SOURIS SACRIFIEES A J15 POST-INJECTION.	119
FIGURE 48 : FACTEUR D'ENRICHISSEMENT EN SEQUENCES CIBLES HAAT ET SGSH DANS LES FRACTIONS D'ADN IMMUNOPRECIPITEES.	121
FIGURE 49: COMPARAISON DES MODIFICATIONS DE LA CHROMATINE DU pFAR4 ET DU pKAR4 AU NIVEAU DU PROMOTEUR HAAT ET DU GENE SGSH.....	122
FIGURE 50 : COMPARAISON DE L'EXPRESSION DU GENE HAAT A PARTIR D'UN MINICERCLE ET D'UN PLASMIDE ET DE LEUR ENRICHISSEMENT RESPECTIF EN MARQUE D'HISTONE H3K27me3.	125
FIGURE 51: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU COMPLEXE PRC2 (POLYCOM REPRESSIVE COMPLEX 2) ET DE SON INTERACTION AVEC LA CHROMATINE	126
FIGURE 52: RECYCLAGE DE L'ARN POLYMERASE II PAR « GENE LOOPING ».....	128
FIGURE 53: SCHEMA D'UN ŒIL ET COUPE DE LA RETINE AU NIVEAU DE LA MACULA.....	134
FIGURE 54: DEGENERESCENCE MACULAIRE LIEE A L'AGE.	135
FIGURE 55: PROTOCOLE TARGETAMD POUR LE TRAITEMENT DE LA DMLA HUMIDE.	139
FIGURE 56 : PRINCIPE DE L'ESSAI DE « TRANSPOSITION FORMANT COLONIES ».	140
FIGURE 57: PLASMIDES CONVENTIONNELS ET pFAR4 EMPLOYES POUR L'ESSAI DE "TRANSPOSITION FORMANT COLONIES".	141
FIGURE 58: TAUX DE TRANSPOSITION MOYENS OBTENUS AVEC LES PLASMIDES pFAR4S ET LES PLASMIDES CONVENTIONNELS.	143
FIGURE 59: EFFET DU PLASMIDE TRANSPOSON SUR LE TAUX DE TRANSPOSITION.	144
FIGURE 60: NOMBRE DE COPIES DU TRANSGENE NEOR INTEGREES DANS LE GENOME DES CELLULES HELa.	145
FIGURE 61: ETUDE DE LA COMBINAISON pFAR4/SB EN MILIEU NON SELECTIF.	147
FIGURE 62: PLASMIDES TRANSPOSON pFAR4-RPII-ITRS-SV40-VENUS ET pT2/BH-RPII-SV40-VENUS.....	148

FIGURE 63: POURCENTAGE DE CELLULES EXPRIMANT VENUS DEUX JOURS APRES TRANSFECTION.....	150
FIGURE 64: AMORCES EPPFAR4 ET EPPT2.	152
FIGURE 65: DETECTION ET ANALYSE DU PRODUIT D'EXCISION PAR PCR ET PCRQ.	153
FIGURE 66: COMPARAISON DES POURCENTAGES D'EXCISION DES PLASMIDES TRANSPOSON DERIVES DU pFAR4 ET DU pT2.	154
FIGURE 67: COMPARAISON DE L'EFFICACITE DE TRANSPOSITION ET DU NIVEAU DE FLUORESCENCE.	155
FIGURE 68: NOMBRE D'INTEGRATIONS DU TRANSGENE VENUS.	157
FIGURE 69 : COURBES DE CROISSANCE DE LA SOUCHE BACTERIENNE TRIPLE-MUTANTE TM#47-9A ET RENDEMENT DE PRODUCTION D'UN DERIVE DU pFAR4.....	162
FIGURE 70 : MODELE DE FORMATION DU COMPLEXE SYNAPTIQUE.....	164
FIGURE 71 : ACTIVITE PROMOTRICE DES SEQUENCES ITRS DU TRANSPOSON.	166
FIGURE 72: STRATEGIES POUVANT ETRE ENVISAGEES POUR LE CIBLAGE DE L'INTEGRATION DU TRANSPOSON SB.	168
FIGURE 73: CARTES DES VECTEURS PLASMIDIQUES VIDES pFAR4, pT2/BH ET pKAR4.	181
FIGURE 74: PROFIL DE MIGRATION ATTENDU SUITE A L'EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE A PARTIR DE CELLULES HELA.....	185
FIGURE 75: PROFIL DE MIGRATION ATTENDU SUITE A L'EXTRACTION D'ADN TOTAL A PARTIR DE FOIE DE SOURIS.....	185
FIGURE 76: PROFIL DE MIGRATION ATTENDU SUITE A L'EXTRACTION DES ARNS TOTAUX A PARTIR DE FOIE DE SOURIS	186
FIGURE 77: SUIVI DE L'AMPLIFICATION EN TEMPS REEL PAR MESURE DE LA FLUORESCENCE.	188
FIGURE 78: SUIVI DE L'AMPLIFICATION EN TEMPS REEL AVEC LA TECHNOLOGIE SYBR® GREEN	188
FIGURE 79: SUIVI DE L'AMPLIFICATION EN TEMPS REEL AVEC LA TECHNOLOGIE TAQMAN®	189
FIGURE 80: PROGRAMME DE PCRQ FAST SYBR® GREEN.....	192
FIGURE 81: EXEMPLE DE COURBE STANDARD ET DE COURBE DE DISSOCIATION DE PCRQ REALISEE EN UTILISANT LA TECHNOLOGIE « FAST SYBR® GREEN ».....	193
FIGURE 82: VERIFICATION DE LA SONICATION DE LA CHROMATINE SUR GEL D'AGAROSE.	196
FIGURE 83 : ESSAI DE « TRANSPOSITION FORMANT COLONIES »	200
FIGURE 84: DOSAGE DE L'ACTIVITE SULFAMIDASE	201

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LES DIFFERENTS TYPES DE VECTEURS VIRAUX EMPLOYES POUR LA THERAPIE GENIQUE	30
TABLEAU 2: AVANTAGES ET LIMITES DES DIFFERENTES FAMILLES DE VECTEURS CHIMIQUES EMPLOYES POUR LA THERAPIE GENIQUE	38
TABLEAU 3: PRINCIPALES METHODES PHYSIQUES DE TRANSFERT DE GENE.....	45
TABLEAU 4: STRATEGIES D'OPTIMISATION D'UN VECTEUR PLASMIDIQUE POUR LA THERAPIE GENIQUE	59
TABLEAU 5: RESUME DES STRATEGIES DE PROPAGATION DE PLASMIDES SANS RECOURS A DES ANTIBIOTIQUES.	68
TABLEAU 6 : LISTE DES VECTEURS BIOSECURISES EMPLOYES DANS LE CADRE D'ESSAIS CLINIQUES DE THERAPIE GENIQUE OU DE VACCINATION GENETIQUE.	69
TABLEAU 7: CONTROLE QUALITE DU PRODUIT PLASMIDIQUE FINAL: TESTS ET SPECIFICATIONS.	78
TABLEAU 8 : CARACTERISTIQUES DES SYSTEMES DE TRANSPOSITION LES PLUS EMPLOYES DANS LE DOMAINE DE LA THERAPIE GENIQUE.	92
TABLEAU 9 : VECTEURS ET PROMOTEURS AYANT CONDUIT A L'EXPRESSION D'UN TRANSGENE SUR LE LONG TERME.....	102

TABLEAU 10: MODIFICATIONS EPIGENETIQUES CIBLEES PAR LES ESSAIS DE CHIP.	117
TABLEAU 11: PROFILS D'ENRICHISSEMENT EN MODIFICATIONS EPIGENETIQUES ATTENDUS AU NIVEAU DES SEQUENCES CIBLES CONTENUES DANS LES PLASMIDES pFAR4 ET pKAR4.	118
TABLEAU 12: IMMUNOPRECIPITATIONS REALISEES PAR ESSAI POUR CHAQUE ECHANTILLON DE CHROMATINE.	120
TABLEAU 13: NOMBRES DE SITES DE LIAISON DE JARI2 ET AEBP2, PROTEINES DE LIAISONS ASSOCIEES A PRC2, PRESENTS SUR LES SQUELETTES PLASMIDIQUES pFAR4 ET pKAR4.	127
TABLEAU 14: PLASMIDES TRANSPOSASE ET TRANSPOSON NEO, TAILLES ET QUANTITES TRANSFECTEES	142
TABLEAU 15: PLASMIDES TRANSPOSASE ET TRANSPOSON VENUS, TAILLES ET QUANTITES TRANSFECTEES	149
TABLEAU 16: EFFICACITE DE TRANSFECTION DE LA COMBINAISON pFAR4/SB EN CELLULES PRIMAIRES RPE HUMAINES. 10 000 CELLULES RPE (EPITHELIUM PIGMENTAIRE DE LA RETINE) FRAICHEMENT ISOLEES D'YEUX DE DONNEURS HUMAINS SAINS ONT ETE TRANSFECTEES PAR ELECTROPORATION AVEC D'UNE PART (i) LE PLASMIDE pFAR4-CMV- SB100X ET LE PLASMIDE pFAR4-ITRS-CAGGS-VENUS OU UNE QUANTITE EQUIMOLAIRE DE PLASMIDE PT2-CAGGS- VENUS ; ET D'AUTRE PART, (ii) AVEC LE PLASMIDE pFAR4-CMV-SB100X ET LE PLASMIDE pFAR4-ITRS-CMV-PEDF OU UNE QUANTITE EQUIMOLAIRE DE PT2-CMV-PEDF. DEUX JOURS APRES TRANSFECTION LE POURCENTAGE DE CELLULES FLUORESCENTES OU LA QUANTITE DE PEDF SECRETEE ONT ETE DETERMINES. TRANSGENE VENUS : VALEURS ISSUES DE 15 TRANSFECTIONS REALISEES SUR LES CELLULES ISOLEES A PARTIR DE 3 DONNEURS. LES DONNEES ONT ETE ANALYSEES PAR UN TEST DE T. TRANSGENE PEDF : VALEURS ISSUES DE 35 TRANSFECTIONS REALISEES SUR LES CELLULES ISOLEES A PARTIR DE 7 DONNEURS. LES VALEURS ONT ETE COMPAREES EN REALISANT UNE ANALYSE DE LA VARIANCE A UN FACTEUR (ONE-WAY ANOVA).	159
TABLEAU 17: COMPOSITION DES MILIEUX MH, SELECT APS™ LB ET LB VEGITONE.	160
TABLEAU 18: EVALUATION DE LA SELECTIVITE DES MILIEUX SELECT APS™ LB ET LB VEGITONE.	161
TABLEAU 19: PLASMIDES UTILISES AU COURS DE LA THESE, CARACTERISTIQUES ET STRATEGIES DE CLONAGE.	183
TABLEAU 20 : AMORCES UTILISEES POUR LA PCR QUANTITATIVE.	193
TABLEAU 21: LISTE DES ANTICORPS UTILISES POUR LES ESSAIS DE CHIP	197
TABLEAU 22 : NOMBRE DE CELLULES ENSEMENCEES EN MILIEU SELECTIF.	199

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I LA THERAPIE GENIQUE

I.1 GENERALITES

Ces dernières décennies de recherche en biologie et en génétique ont permis de réaliser une avancée considérable dans la compréhension des processus cellulaires et du développement des maladies. Celle-ci a conduit à considérer l'ADN non seulement comme une cible thérapeutique mais également comme un outil thérapeutique et un médicament. Le développement de techniques de biologie moléculaire sophistiquées ainsi que l'achèvement du « Projet Génome Humain » ont permis l'identification d'un nombre croissant de gènes cibles ainsi que le développement de nouvelles voies thérapeutiques telles que les stratégies de thérapie génique.

I.1.1 Définition

La thérapie génique peut se définir comme toute stratégie reposant sur le transfert de matériel génétique aux cellules d'un organisme dans le but de réduire ou de traiter une maladie (Mulligan et al.1993).

L'Agence Européenne du Médicament (EMA) définit le produit médicamenteux de thérapie génique (GTMP : Gene Therapy Medicinal Product) comme (Official Journal EMA, 2012) :

- (a) Une substance biologique active contenant ou consistant en une séquence recombinante d'acides nucléiques administrée à l'homme dans le but de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique défectueuse.
- (b) Son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique est directement lié à la séquence d'acides nucléiques qu'il contient ou au produit issu de l'expression de cette séquence (ARN, protéine).

Le champ d'application de cette thérapie se réduit aux seules cellules somatiques. Chez l'homme, les cellules germinales ne peuvent être la cible de modifications par thérapie génique.

I.1.1 Applications de la thérapie génique

Le 14 septembre 1990, la FDA approuvait aux Etats-Unis le premier essai clinique de thérapie génique chez l'homme. Dans le cadre de cet essai, deux enfants atteints de déficience en adénosine désaminase (ADA-SCID), une maladie monogénique conduisant à une immunodéficiência sévère, ont été traités durant deux années avec des lymphocytes T autologues modifiés *ex-vivo* pour

exprimer le gène fonctionnel codant l'adénosine désaminase (Blaese et al. 1995). Cinq ans après le traitement, des lymphocytes circulant ADA+ étaient encore détectés chez ces patients dont l'état clinique s'était amélioré sans détection d'effets secondaires.

A l'image de ce premier essai, la thérapie génique a tout d'abord été focalisée sur les maladies génétiques pour lesquelles elle était considérée comme la seule option thérapeutique durable. Le spectre des maladies pouvant être ciblées par cette thérapie s'est cependant considérablement élargi ces dernières années et comprend non seulement (i) **les maladies génétiques héréditaires** telles que les hémoglobinopathies (Negre et al. 2016), les immunodéficiences ADA (Hacein-Bey-Abina et al. 2010), etc... mais aussi (ii) **les maladies acquises**, telles que certaines maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, etc...) et le cancer, la maladie la plus traitée par thérapie génique de nos jours puisqu'elle représente plus de 60% des essais cliniques actuellement en cours (The Journal of Gene Medicine Wiley and Sons Ltd, 2015).

D'après le site Wiley, le nombre d'essais cliniques approuvés est passé de trois au début des années 90 à 2142 en janvier 2015. Les maladies ciblées par ces essais cliniques à cette date sont répertoriées dans la Figure 1.

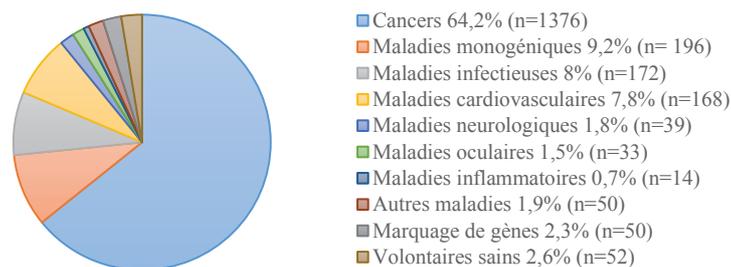


Figure 1: Proportions des maladies ciblées par des essais cliniques de thérapie génique en Janvier 2015 (2015, <http://www.abedia.com/wiley/>).

C'est en 2012, 20 ans après le premier essai clinique de Blaese et al. (Blaese et al. 1995), que l'EMA a approuvé la mise sur le marché du premier médicament de thérapie génique disponible dans le monde occidental : Glybera (alipogene tiparvovec). L'utilisation de ce médicament pour le traitement du Déficit Familial en Lipoprotéine Lipase (LLD) marque un tournant important dans l'histoire de cette thérapie jusqu'alors considérée comme une méthode expérimentale, la faisant ainsi passer au rang des méthodes thérapeutiques pratiquées et valorisées (Büning 2013).

Outre l'outil thérapeutique historique consistant en une séquence d'ADN codant pour une protéine thérapeutique, de nouveaux outils moléculaires aux mécanismes d'actions variés ont été développés. Ces outils, qui seront présentés par la suite, ont permis d'étendre le champ des approches de la thérapie génique. De nos jours, les différentes approches pouvant être utilisées permettent de :

- **Substituer la séquence défectueuse ou manquante du gène responsable de la maladie** par une séquence fonctionnelle et corriger ainsi un défaut de fonction en produisant la protéine déficiente.

Par exemple, le Glybera cité plus haut code pour un variant fonctionnel de la lipoprotéine lipase, une enzyme clé du catabolisme des lipoprotéines du tissu adipeux dont le gène est muté chez les patients atteints de Déficit Familial en Lipoprotéine Lipase. L'administration du Glybera à ces patients permet ainsi de corriger le niveau d'expression de la protéine (Büning 2013).

- **Inhiber l'expression d'un gène ou inactiver une protéine.** Cette approche peut par exemple être utilisée pour inhiber la réplication virale lors d'une infection en ciblant les gènes viraux ou les ARN messagers avec des oligonucléotides anti-sens (Marimani et al. 2015).

- **Corriger un épissage alternatif conduisant à une protéine tronquée en utilisant des oligonucléotides anti-sens.** Cette technique a été largement étudiée pour traiter la Myopathie de Duchenne et deux essais cliniques utilisant les oligonucléotides anti-sens ciblant l'exon 51 du gène codant pour la dystrophine ont atteint la phase IIB/III (Buckland, 2014).

- **Exprimer une protéine ou un facteur à effet thérapeutique.** Par exemple, une approche visant à traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) consiste à faire exprimer à des cellules de la rétine le facteur anti-angiogénique PEDF, afin de diminuer la néo-vascularisation conduisant à la cécité des patients (Johnen et al. 2012). Ce traitement, envisagé dans le cadre du projet d'essai clinique TargetAMD, sera décrit plus loin.

- **Introduire un gène suicide.** Cette approche est notamment employée dans le traitement de cancer pour induire l'apoptose des cellules tumorales ou les rendre plus sensibles à la chimiothérapie (Boyer & Klatzmann 1999; Karjoo et al. 2016).

- **Favoriser une réponse immunitaire.** Egalement employée pour traiter le cancer, cette approche peut par exemple, consister à faire exprimer à des cellules T des récepteurs chimériques à antigènes (CARs) leur permettant de cibler directement et de manière plus spécifiques les cellules cancéreuses (Barrett, et al. 2014). Elle peut également permettre de modifier les cellules cancéreuses pour leur faire exprimer des molécules stimulant la réponse immunitaire telles que des cytokines (Yang et al. 2012).

La figure 2 répertorie les types de gènes utilisés en janvier 2015 dans le cadre d'essais cliniques.

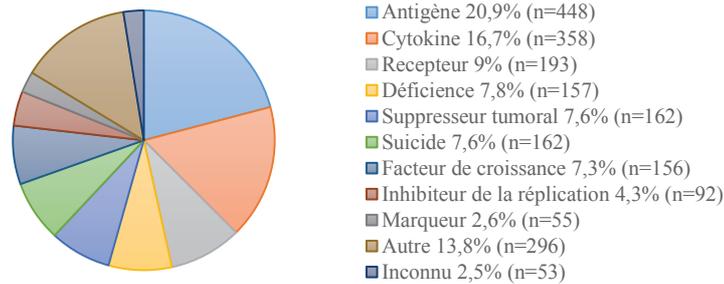


Figure 2: Fonction des gènes utilisés dans le cadre d'essais cliniques de thérapie génique en Janvier 2015 (2015, <http://www.abedia.com/wiley/>).

I.1.2 La thérapie génique : coût versus bénéfices

Le potentiel de la thérapie génique par rapport aux autres approches thérapeutiques réside dans la possibilité de traiter durablement voire définitivement non seulement un organe cible mais également l'organisme entier d'un patient en une seule intervention consistant en l'administration du transgène.

Cet avantage résulte en une diminution des coûts liés à la production du produit thérapeutique (telle que celui des protéines recombinantes par exemples), à l'hospitalisation régulière du patient et également à une réduction des risques liés à l'administration répétée d'un produit pharmaceutique.

Pour le patient, un traitement curatif comparé à un traitement à vie peut apporter un bénéfice considérable en terme de qualité de vie, notamment lorsque le patient est un jeune enfant, ce qui est le cas pour une grande partie des maladies génétiques.

Au-delà de ces bénéfices, existent des risques de développement de malignités, d'infections ou d'autres toxicités comme ce fut le cas pour Jesse Gelsinger, le premier cas de décès lié à un traitement par thérapie génique (Stolberg 1999) et les deux « bébés bulles » traités pour leur immunodéficience en 2000 par l'équipe du Pr Alain Fisher qui ont développé une leucémie suite à l'intégration du vecteur thérapeutique dans un promoteur oncogène (Hacein-Bey-Abina et al. 2003).

I.1.3 Transfert de l'ADN thérapeutique

I.1.3.1 Stratégies d'administration :

Deux stratégies d'administration peuvent être envisagées en fonction de la maladie traitée: une stratégie *in vivo* ou une stratégie *ex vivo* (Figure 3).

Dans l'approche *ex vivo*, les cellules cibles sont tout d'abord isolées du corps du patient, modifiées génétiquement et potentiellement multipliées *in vitro* puis réintroduites dans le patient sous forme de transplant autologue. La stratégie *in vivo* consiste à administrer directement l'ADN

thérapeutique au patient. L'administration peut dans ce cas être locale (injection dans un tissu cible) ou systémique (injection dans la circulation sanguine). (Kaufmann et al. 2013).

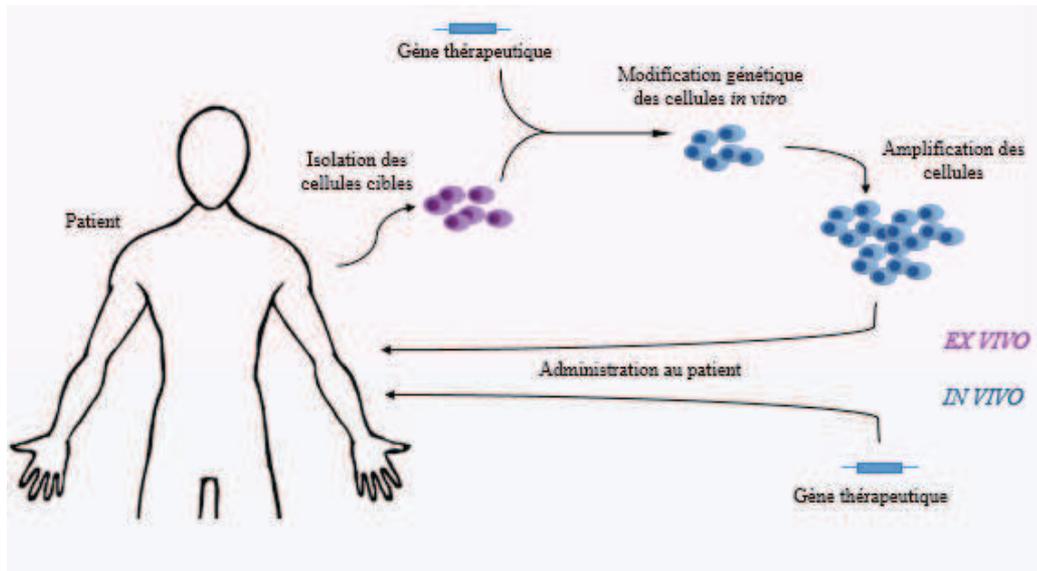


Figure 3: Stratégies de thérapie génique ex vivo et in vivo.

1.1.3.2 Limites au transfert de gène :

Pour ces deux modes d'administration, mais plus particulièrement pour l'approche *in vivo*, le principal challenge réside dans le transfert de l'ADN aux cellules cibles.

Les molécules d'ADN ne s'insèrent pas de façon efficace dans les cellules du fait de leur grande taille et de leur nature anionique liée aux groupes phosphates. Le défi majeur de la thérapie génique consiste à développer des vecteurs facilitant le transfert de l'ADN aux cellules cibles, en favorisant le passage des barrières extra- et intracellulaires et en le protégeant de la dégradation.

❖ Les barrières extracellulaires et intracellulaires :

Les figures 4A et B illustrent les barrières que doit franchir l'ADN avant de pouvoir jouer son rôle thérapeutique (Wang et al. 2013). Lorsqu'il est délivré par voie systémique, l'ADN peut être rapidement dégradé par des nucléases ou capté par le système réticuloendothélial. Afin d'atteindre le tissu cible, l'ADN doit ensuite pouvoir traverser la paroi des vaisseaux. Il se retrouve alors dans la matrice extracellulaire également riche en nucléases susceptibles de le dégrader. Après le passage de la membrane plasmique (permise par la vectorisation ou l'emploi de méthodes physiques), il est nécessaire que l'ADN soit libéré des endosomes et/ou circule dans le cytoplasme en évitant là encore la dégradation par les nucléases. Enfin, l'ADN doit entrer dans le noyau et être exprimé de façon efficace et durable (Wang et al. 2013).

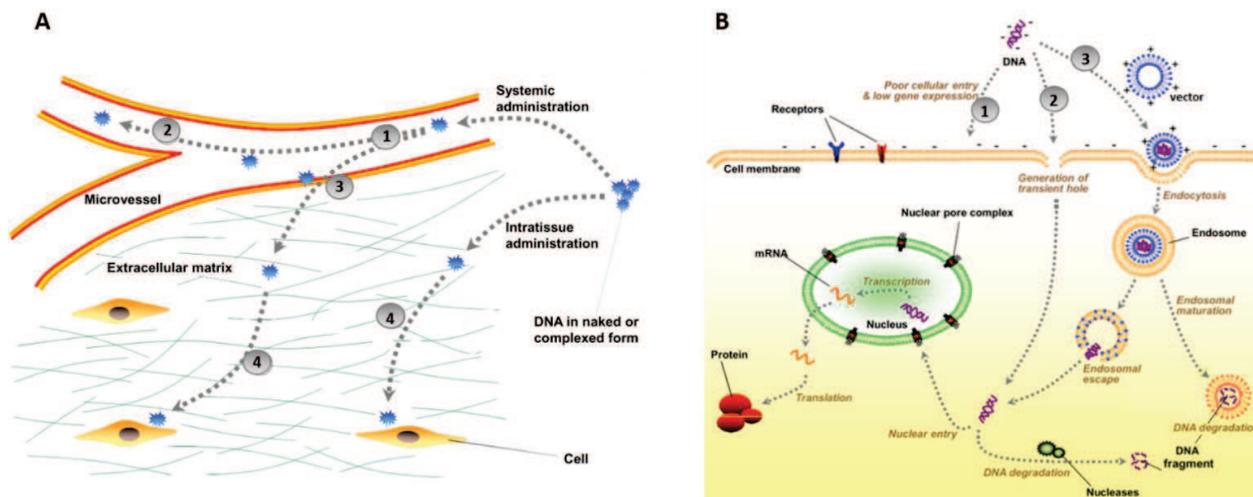


Figure 4 : Barrières extra- et intracellulaires au transfert de gène.

A. Barrières extracellulaires : L'ADN délivré par voie systémique peut être dégradé par des nucléases présentes dans la circulation sanguine (1) ou encore être capté par le système réticuloendothélial (2). Afin d'atteindre les cellules cibles, l'ADN doit franchir la barrière physique que représentent les parois vasculaires (3) et ensuite circuler dans la matrice extracellulaire dans laquelle il peut être sujet à la dégradation par des nucléases (4). B. Barrières cellulaires : A cause de sa nature anionique, la molécule d'ADN nue peut difficilement passer la membrane plasmique chargée négativement (1). Son entrée peut être favorisée par l'utilisation de méthodes physiques générant des pores dans la membrane (2) ou par sa vectorisation (3). Ces méthodes doivent également favoriser le transport de l'ADN jusqu'au noyau en évitant sa dégradation par les nucléases ou dans les endosomes. Une fois dans le noyau l'ADN doit pouvoir être exprimé à un niveau thérapeutique et sur le long terme. (Wang et al. 2013).

Plusieurs systèmes de vectorisation ont été développés et optimisés ces dernières années dans le but de franchir ces barrières. Cependant, tous les problèmes et limitations n'ont pas encore été résolus et de nouvelles limites non anticipées ont été révélées par les nombreux essais cliniques parmi lesquelles (Kay 2011) :

- ❖ **Le transfert non spécifique de l'ADN thérapeutique** qui peut induire une toxicité. Un vecteur optimal doit pouvoir assurer un transfert spécifique de l'ADN au tissu cible.
- ❖ **La persistance de l'ADN thérapeutique dans la cellule** : En fonction du vecteur, l'ADN thérapeutique peut être intégré dans le génome des cellules hôtes ou rester épisomique. Les vecteurs épisomiques peuvent persister et conduire à une expression sur le long terme s'ils sont délivrés à des cellules se divisant très lentement. En revanche, ils ne seront pas maintenus dans les cellules se divisant rapidement pour lesquelles les vecteurs intégratifs représentent de meilleurs candidats malgré les risques de mutagenèse liés à l'insertion dans le génome.
- ❖ **L'expression du transgène efficace et maintenue dans le temps** : en fonction de la maladie traitée, le niveau d'expression du transgène doit pouvoir être maintenu à un niveau thérapeutique sur toute la période du traitement qui peut être limitée ou à vie. Le vecteur doit donc permettre de prévenir l'extinction de l'expression du transgène.

- ❖ **La réponse du système immunitaire :** L'activation du système immunitaire de l'hôte représente l'une des barrières majeures à une thérapie génique efficace. Cette activation peut être due au vecteur ou au produit d'expression du transgène.

I.1.4 Les vecteurs pour la thérapie génique

Les vecteurs de thérapie génique peuvent être séparés en deux groupes majeurs : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Les premiers sont les systèmes de transfert de gène les plus employés (utilisés dans plus de 60% des essais cliniques en cours). Ils sont suivis par les vecteurs non viraux à ADN plasmidiques. La figure 5 répertorie les vecteurs employés dans le cadre d'essais cliniques de thérapie génique en janvier 2015.

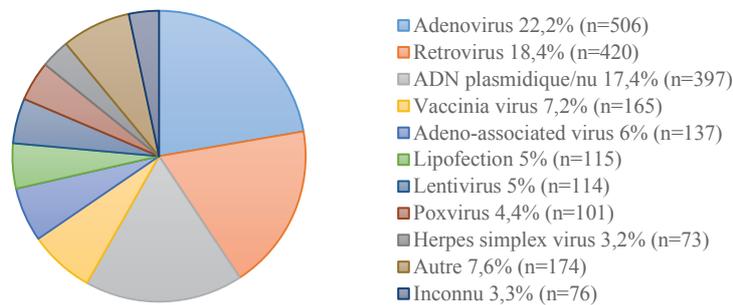


Figure 5 : Types de vecteurs utilisés dans des essais cliniques de thérapie génique en Janvier 2015 (2015, <http://www.abedia.com/wiley/>).

La suite de ce premier chapitre d'introduction sera consacrée à la présentation des différents vecteurs. Cette thèse portant sur deux approches non virales de thérapie génique, les caractéristiques des différents vecteurs non viraux seront donc plus particulièrement développées. Cependant la grande efficacité de transfert de gène des vecteurs viraux constitue une base de comparaison pour de nombreux systèmes non viraux alternatifs, comme par exemple la technologie de transposition *Sleeping Beauty* qui a été utilisée lors de cette étude et sera décrite plus loin. Une courte section de présentation leur est donc consacrée ci-dessous.

I.2 VECTEURS VIRAUX

De par leur nature infectieuse, les virus présentent une capacité naturelle à franchir efficacement les barrières de l'organisme et à utiliser la machinerie des cellules hôte pour se répliquer, d'où l'idée première d'utiliser des virus pour le transfert d'ADN.

1.2.1 Construction de vecteurs dérivés de virus :

De façon très simplifiée, une particule virale est composée d'acide nucléique et de protéines protégeant l'ADN de l'environnement extracellulaire, et interagissant avec les récepteurs cellulaires pour internaliser son cargo génétique (Giacca, 2012).

Un vecteur viral idéal exploite les propriétés biologiques de cette particule en substituant une partie du génome viral par une séquence d'intérêt thérapeutique. Le principe permettant l'obtention de tels vecteurs est le suivant (Giacca, 2012)(Figure 6) :

- (i) Substitution des gènes viraux codant pour certaines protéines virales, et notamment celles ayant un fort pouvoir pathogène, par la cassette d'expression thérapeutique,
- (ii) Maintien des séquences virales requises pour l'encapsulation de l'ADN dans la particule virale et également pour l'intégration du gène d'intérêt dans le génome des cellules hôtes,
- (iii) Utilisation de « cellules d'encapsulation » exprimant à partir d'un ADN dit « auxiliaire » ou « helper » les protéines nécessaires à la réplication virale pour la production de particules virales recombinantes. Ces particules virales recombinantes contiennent le gène d'intérêt mais sont non pathogènes et incapables de se répliquer.

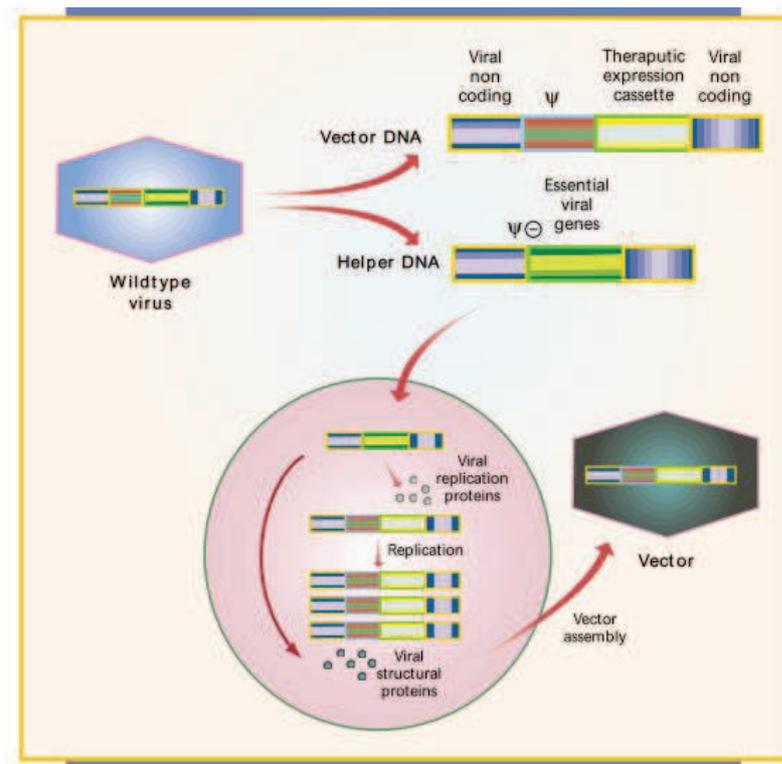


Figure 6 : Principe de production d'un vecteur viral pour la thérapie génique.

L'ADN auxiliaire contient les gènes nécessaires à la réplication virale à l'exception du signal d'encapsulation (ψ). Il peut être délivré sous forme d'ADN ou de virus ou inséré stablement dans le génome des cellules d'encapsulation (rose). L'ADN vecteur contient la séquence d'ADN thérapeutique et des séquences virales non codantes incluant le signal d'encapsulation ψ . L'expression de ces deux ADNs par les cellules d'encapsulation permet la synthèse de plusieurs copies d'ADN vecteur et de protéines de structure virales, reconnaissant l'ADN vecteur (ψ^+) mais non l'ADN auxiliaire (ψ^-), générant ainsi l'encapsulation du vecteur dans des particules virales. (Kay et al. 2001)

1.2.2 Vecteurs viraux pour la thérapie génique

Cinq grands groupes de virus sont majoritairement utilisés comme vecteurs pour la thérapie génique :

- 1) Les γ -rétrovirus
- 2) Les lentivirus
- 3) Les adénovirus
- 4) Les virus associés aux adénovirus
- 5) Le virus Herpes Simplex

1) Les vecteurs basés sur les γ -rétrovirus : et plus particulièrement le MLV (Murine Leukemia Virus) ont été les plus utilisés jusqu'au début de années 2000 et représentent encore aujourd'hui environ 18% des essais cliniques.

L'une des plus importantes caractéristiques de ces vecteurs expliquant leur attrait comme outil de thérapie génique est leur capacité d'intégration du cargo génétique dans le génome des cellules cibles. L'intégration permet la transmission du transgène aux cellules filles et ainsi le maintien de l'expression et de l'effet thérapeutique sur le long terme (Giacca et al., 2012). Cette propriété les rend particulièrement compétents pour le traitement de maladies monogéniques. Un exemple de succès de thérapie génique utilisant ce type de vecteur est le traitement réussi de patients atteints d'immunodéficience sévère ADA par infusion de cellules CD34+ autologues génétiquement modifiées à l'aide d'un γ -rétrovirus contenant le transgène ADA (Aiuti et al. 2009).

Cependant, malgré quelques succès, des désavantages majeurs limitent l'utilisation de cette technologie : leur faible efficacité de transduction dans les cellules quiescentes et leur propension à s'intégrer près des régions promotrices de gènes transcrits et à transactiver l'expression de proto-oncogènes (Wu et al. 2003; Hacein-Bey-Abina et al. 2003).

2) Les lentivirus font partie de la grande famille des rétrovirus et comprennent 9 espèces dont la plus utilisée en thérapie génique est le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1). Les vecteurs lentiviraux (LV) ont été de plus en plus étudiés et utilisés ces dernières années notamment pour les nombreux avantages qu'ils présentent par rapport aux vecteurs dérivés des γ -rétrovirus. Ils possèdent en effet une capacité de clonage plus importante (Ramezani et al. 2002), et sont capables de transduire un large éventail de cellules cibles, qu'elles soient quiescentes ou en division. De plus, le profil d'intégration de ces vecteurs présenterait moins de risque d'oncogenèse insertionnelle bien que ciblant principalement des régions riches en gènes actifs (Schröder et al. 2002).

Ces vecteurs ont subi de nombreuses améliorations au cours des dernières années afin d'augmenter leur biosécurité, telles que la séparation du génome viral en trois cassettes

d'expression indépendantes ou encore la génération de « self-inactivating » lentivirus (SIN-LVs) résultant de la délétion des éléments promoteurs de la séquence LTR (Long Terminal Repeat) située en 3'. L'inactivation transcriptionnelle du « design SIN » permet ainsi de réduire le risque d'activation d'oncogènes après intégration (Tomás et al. 2013; Cesana et al. 2014).

L'utilisation de ces virus reste cependant limitée par le manque de lignées de cellules d'encapsidation stables permettant la production de vecteurs recombinant en grandes quantités.

3) Les vecteurs dérivés d'Adénovirus sont les plus utilisés en essais cliniques de thérapie génique. Contrairement aux deux précédents types, le génome des Adénovirus (Ad) reste épisomique dans la cellule hôte infectée.

Les premières générations de vecteurs Ad présentaient une capacité de clonage d'environ 8 kb et généraient une réponse immunitaire conduisant à une chute d'expression du transgène (Thomas et al. 2003). Deux autres générations de vecteurs ont été réalisées dans le but de diminuer cette immunogénicité. Mais c'est avec la dernière génération de HC-Ad (High Capacity Adenovirus) qu'a été observée la plus grande avancée dans cette voie. Les HC-Ad sont des Ad pour lesquels tous les gènes viraux ont été retirés et sont donc dépendants d'un virus « helper » pour leur réplication. Ils présentent une capacité de clonage nettement supérieure aux précédentes générations (35 kb) et une immunogénicité réduite permettant l'expression du transgène sur le long terme. Leur processus de production est cependant difficile à standardiser (Silva et al. 2010).

La majorité des études cliniques réalisées avec des vecteurs à adénovirus visent à traiter des cancers. Deux vecteurs Ad, dont un exprimant la protéine p53 (Gendicine®)(Wilson 2005), sont à ce jour autorisés et utilisés en Chine.

4) Les virus associés aux adénovirus (AAV) sont caractérisés par une petite capsid contenant un ADN simple brin d'environ 4,7 kb. Leur nom vient du fait qu'ils sont dépendants d'un virus dit « auxiliaire » pour leur réplication. Dans sa forme naturelle, l'AAV possède la capacité de s'intégrer dans une région spécifique du chromosome 19 du génome humain. Les particules recombinantes rAAV ont été générées en enlevant tous les gènes viraux. L'habilité d'intégration n'est pas maintenue dans les rAAV dont le génome reste donc épisomique diminuant ainsi le risque de mutagenèse insertionnelle. Les rAAV ont montré une haute efficacité de transduction et d'expression du transgène à la fois des cellules en division et des cellules quiescentes. De plus, la diversité des sérotypes présentant des sélectivités cellulaires différentes permet le ciblage d'une large gamme de cellules *in vivo* (Giacca & Zacchigna 2012).

Les vecteurs AAV ont jusqu'à présent montré un profil de biosécurité satisfaisant ainsi qu'une bonne efficacité thérapeutique (Mingozzi & High 2011). Malgré ses avantages, l'utilisation de ces vecteurs prometteurs est confrontée à plusieurs limites : leur faible capacité de clonage (bien que plusieurs études soient en cours afin d'augmenter cette capacité), et des difficultés dans la

production en grandes quantités et avec un degré de pureté suffisant pour les essais cliniques (Ayuso et al. 2010).

5) Le virus herpès simplex (HSV-1) est un pathogène de l'homme infectant 40-80% des personnes dans le monde. L'intérêt de l'utilisation de vecteurs dérivés de ces virus repose sur quatre de ses propriétés : Sa large capacité d'incorporation d'ADN thérapeutique, permettant le transfert de séquences allant jusqu'à 150 kb ; son génome reste épisomique limitant ainsi les risques de mutagenèse insertionnelle ; la possibilité de pouvoir éliminer la majorité de ses gènes sans perturber sa production ; et enfin sa remarquable adaptation au système nerveux central (SNC), lui permettant notamment de se propager entre les neurones ou d'y rester latent (Matias E. Melendez et al. 2014).

Trois différents types de vecteurs ont été dérivés de HSV-1 dans le but d'exploiter ses propriétés : les vecteurs recombinants atténués, les vecteurs non recombinants et les vecteurs amplicons. Les deux premiers types utilisent les propriétés d'adaptation du HSV-1 au SNC et ont été utilisés dans des approches de transfert de gène aux neurones et cellules gliales (Wolfe et al. 2009) mais également pour traiter des cancers. Le dernier type exploite la capacité du virus à délivrer des séquences supérieures à 100 kb (Matias E Melendez et al. 2014).

Des études sont en cours afin d'optimiser les vecteurs dérivés d'HSV-1 pour d'obtenir une expression prolongée et contrôlée du transgène et également pour diminuer leurs effets secondaires.

Le tableau ci-dessous résume les principales caractéristiques des différents vecteurs viraux.

Type de vecteur	Intégration	Capacité clonale	Immuno-génicité	Avantages	Inconvénients
γ-rétrovirus	Oui	≤ 8 kb	Faible	- Persistance de l'expression du transgène	- Ne transduit que les cellules en division - Risques de mutagenèse insertionnelle
Lentivirus (HIV)	Oui	≤ 11 kb	Faible	- Transduction efficace de cellules en division ou quiescentes - Persistance de l'expression du transgène - Optimisation: vecteur SIN	- Insertion dans des zones riches en gènes transcrits - Difficile à produire en grande quantité
Adénovirus (Ad)	Non	≤ 8 kb ≤ 35 kb HC-Ad	Elevée	- Episomiques - Transduction efficace de cellules en division ou quiescentes	- Forte immunogénicité - Expression transitoire du transgène
AAV	Oui Non (rAAV)	$\leq 4,7$ kb	Faible	- Transduction efficace de cellules en division ou quiescentes - rAAV épisomiques	- Capacité clonale limitée - Difficile à produire en grande quantité

HSV-1	Non	≤40 kb ≤150 kb amplicon	Elevée	- Transduction efficace de cellules en division ou quiescentes - Tropisme : neurones - Large capacité clonale	- Forte immunogénicité - Expression transitoire pour les cellules différentes des neurones
--------------	-----	-------------------------------	--------	---	---

Tableau 1 : Les différents types de vecteurs viraux employés pour la thérapie génique

1.2.3 Limites à l'utilisation de vecteurs viraux pour la thérapie génique

Malgré leur efficacité de transfert, justifiant leur utilisation dans la majorité des essais cliniques, les vecteurs viraux présentent des inconvénients non négligeables déséquilibrant partiellement la balance bénéfices/risques (European Medecine Agency, CAT 2008). Ces risques englobent :

- **Mutagenèse insertionnelle et activation d'oncogènes** : Depuis le premier cas de leucémie développée par des patients traités par un vecteur rétroviral (Hacein-Bey-Abina et al. 2003), l'intégration d'un transgène est considéré comme présentant un risque de transformation maligne des cellules suite à l'activation d'un proto-oncogène ou l'inactivation d'un répresseur d'un oncogène. Le développement de telles malignités peut se produire plusieurs années après le traitement. Les mesures permettant de réduire ce risque doivent être considérées telles que le recours à des vecteurs épisomiques ou à des outils permettant l'intégration ciblée du transgène à un locus donné.

- **Induction d'une réponse immunitaire** : de par leur nature virale, les vecteurs viraux sont susceptibles d'induire la réponse immunitaire de l'organisme traité et ce parfois de façon dramatique comme ce fut le cas pour Jesse Gelsinger (Stolberg 1999). De nombreux progrès ont été faits dans le but de réduire cette immunotoxicité, notamment en éliminant une grande partie des gènes viraux du génome de ces vecteurs.

- **Capacité de remobilisation virale** : Bien que la majorité des vecteurs viraux n'ait plus la capacité de se répliquer, il existe un risque de réactivation et réplication après la complémentation par un virus sauvage ayant infecté l'hôte, causant ainsi la sortie de la latence de la particule virale recombinante. Ce risque est d'autant plus présent pour les vecteurs oncolytiques (dérivés de HSV-1) ayant gardé la capacité de se répliquer. Il est nécessaire de développer des méthodes permettant de détecter et de prévenir des réactivations virales.

- **Production coûteuse et difficile** : la production de grandes quantités de vecteurs viraux respectant les niveaux de pureté et d'efficacité requis pour les essais cliniques restent un défi à surmonter pour la majorité de ces vecteurs (Ayuso et al. 2010; Silva et al. 2010).

Les vecteurs viraux restent actuellement les outils les plus efficaces pour la thérapie génique, mais les risques liés à leur utilisation ont conduit à considérer les approches non virales comme des approches alternatives prometteuses.

I.3 VECTEURS NON VIRAUX

Par rapport aux vecteurs viraux, les approches de thérapie génique non virales présentent les avantages d'être relativement plus sûres, moins immunogènes, moins toxiques, moins limitées par rapport à la taille du transgène et moins coûteuses. Jusqu'à présent, leur utilisation a été limitée par une faible efficacité de transfection et une persistance limitée de l'effet thérapeutique obtenu à partir de ces vecteurs. Cependant, le développement de nouvelles méthodes de transfert, de nouveaux vecteurs (miniplasmides, oligonucléotides, etc...) et de systèmes insertionnels non viraux (*Sleeping Beauty*, CRISPR/Cas9 etc...) ont permis de repousser ces limites. Cette section décrit les principaux composants et méthodes utilisés pour la thérapie génique non virale.

I.3.1 Le matériel génétique

En fonction de la stratégie envisagée pour traiter une maladie par thérapie génique non virale, plusieurs types d'acides nucléiques peuvent être utilisés :

I.3.1.1 Les plasmides :

Identifiés pour la première fois par Joshua Lederberg en 1952, les plasmides sont des molécules d'ADN double brin extrachromosomiques se répliquant de façon autonome (Hayes 2003). A l'état naturel, ils peuvent se trouver sous forme linéaire ou circulaire et ont une taille allant de 1 à plusieurs centaines de paires de bases. Lorsque la valeur de ces molécules est devenue évidente, un nombre croissant de vecteurs plasmidiques de gène ou de clonage a été développé. Ces vecteurs, pour la majeure partie, dérivés d'*Escherichia coli* sont des molécules circulaires pouvant être produits en grande quantité par les bactéries. L'introduction par clonage d'un gène d'intérêt dans ces vecteurs permet l'expression de différentes molécules thérapeutiques telles que des protéines ou des ARN messagers (dont le mode d'action sera décrit plus loin). Les plasmides peuvent également être utilisés comme vecteurs pour différents systèmes d'« édition » du génome tels que les systèmes de transposition (*Sleeping Beauty*, etc...) ou les systèmes dits de « ciseaux moléculaires » basés sur l'action de nucléases (CRISPR/Cas9, TALENS, etc...).

Les caractéristiques ainsi que l'optimisation des vecteurs plasmidiques seront plus largement décrites dans la section II de l'introduction qui leur est consacrée.

I.3.1.2 Les oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés en thérapie génique sont de courtes séquences d'ADN ou d'ARN synthétique simple ou double brin d'environ 20 à 25 nucléotides de longueur, utilisées pour moduler l'expression de gènes.

La découverte récente des ARN non codants et plus particulièrement des ARN interférents (Fire et al. 1998) a ouvert la voie à de nouvelles approches de thérapie génique utilisant ces outils

Plusieurs approches, illustrées par la Figure 7, peuvent être utilisées.

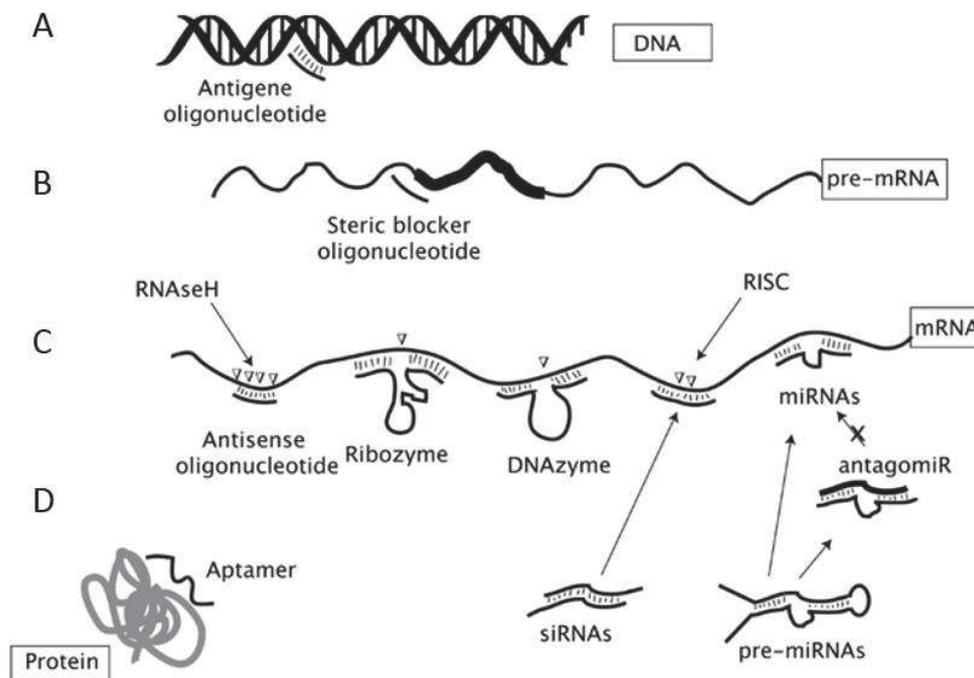


Figure 7: Les différents types d'oligonucléotides synthétiques et leurs cibles (D'après François & Giovannangeli 2014).

- ❖ **Approche « antigène »** (Figure 7A): Dans cette approche, l'oligonucléotide doit atteindre le noyau de la cellule et se lie de façon spécifique à une séquence cible de l'ADN génomique, formant ainsi un « triplex » (Hélène 1991; Praseuth et al. 1999). Le TFO (« Triplex-forming oligonucléotide ») interfère alors avec la transcription du gène ciblé en entrant en compétition avec les facteurs de transcription ou l'ARN polymérase et éteint ainsi l'expression du gène. Ces oligonucléotides peuvent être conjugués avec des agents de modification de l'ADN afin d'induire une modification contrôlée du génome à un site spécifique. L'efficacité de cette approche peut être améliorée en augmentant la stabilité de la triple-hélice formée, notamment en liant de façon covalente le TFO à un agent intercalant tel que la daunomycine (Carbone et al. 2004).
- ❖ **Approche « anti-sens »** : C'est l'approche la plus utilisée dans le cadre d'essais précliniques et cliniques. Elle cible l'ARN messager d'un gène donné dans le but :
 - **de modifier l'épissage de l'ARNm** : l'oligonucléotide reconnaît un site spécifique sur l'ARN pré-messager et bloque par encombrement stérique l'épissage au niveau de ce site (Figure 7B). Cette approche est notamment utilisée pour le traitement de la Myopathie de Duchenne causée par des mutations ponctuelles dans le gène de la dystrophine résultant en une protéine défectueuse. Lorsque la mutation se trouve sur un exon non nécessaire au fonctionnement de la protéine, une approche dite de « saut d'exon » peut être mise en place.

Un oligonucléotide est synthétisé pour cibler l'exon muté et ainsi permettre la production d'une protéine tronquée mais fonctionnelle (Lorain & Garcia 2014).

- **de prévenir la traduction de l'ARNm** dans le but d'éteindre l'expression du gène (Knock-down). Plusieurs molécules peuvent être utilisées pour cela (Figure 7C) :
 - (i) *des oligonucléotides anti-sens* ayant la capacité d'activer la RNase H conduisant au clivage de l'ARNm après leur liaison à ce dernier,
 - (ii) *des Ribozymes*, des molécules d'ARN ayant la capacité de cliver l'ARNm qui leur est complémentaire sans recours à l'action d'une protéine,
 - (iii) *des DNazymes*, molécules d'ADN simple brin qui comme les Ribozymes sont capables de cliver l'ARNm au niveau de la séquence dont ils sont complémentaires,
 - (iv) *des petits ARNs interférents (siRNA)*, de courts ARNs double-brin reconnaissant une séquence spécifique de l'ARNm et induisant son clivage après leur recrutement et l'activation du complexe RISC qui inclue une protéine Argonaute (Ago) responsable du clivage de l'ARNm,
 - (v) *des microRNAs (miRNAs)* qui bloquent la traduction en formant un double brin avec la région non traduite 3' de l'ARNm. L'action de miRNAs endogènes peut être inhibée en utilisant des oligonucléotides anti-sens (antagomiR) qui se lient aux miRNAs et bloquent leur fonction.

La technologie des ARN interférents est notamment utilisée pour le traitement de cancer pour bloquer l'expression de gènes impliqués dans la croissance tumorale tel que le gène codant pour la protéine kinase N3 qui est la cible d'un siRNA développé dans le cadre d'un essai clinique en Allemagne (Schultheis et al. 2014).

- ❖ **Les Aptamers** sont des oligonucléotides pouvant se lier de façon spécifique à une protéine afin d'inhiber son activité ou de bloquer sa liaison avec d'autres partenaires cellulaires (Figure 7D).

1.3.2 Méthodes de transfert non virales

Contrairement aux approches virales reposant sur l'infectiosité des virus pour délivrer de façon efficace le matériel génétique aux cellules, les approches non virales nécessitent la mise en place de techniques permettant d'introduire de façon efficace et sûre l'ADN dans les cellules hôtes *in vitro* et *in vivo*. Cette introduction est nommée « transfection ». La Figure 8 énumère les caractéristiques techniques et biologiques attendues pour une technologie de transfection non virale idéale ainsi que les principales méthodes développées ces dernières années. Ces méthodes

peuvent être divisées en deux grands groupes : les méthodes « chimiques » et les méthodes « physiques » et seront présentées dans la suite de cette section d'introduction.

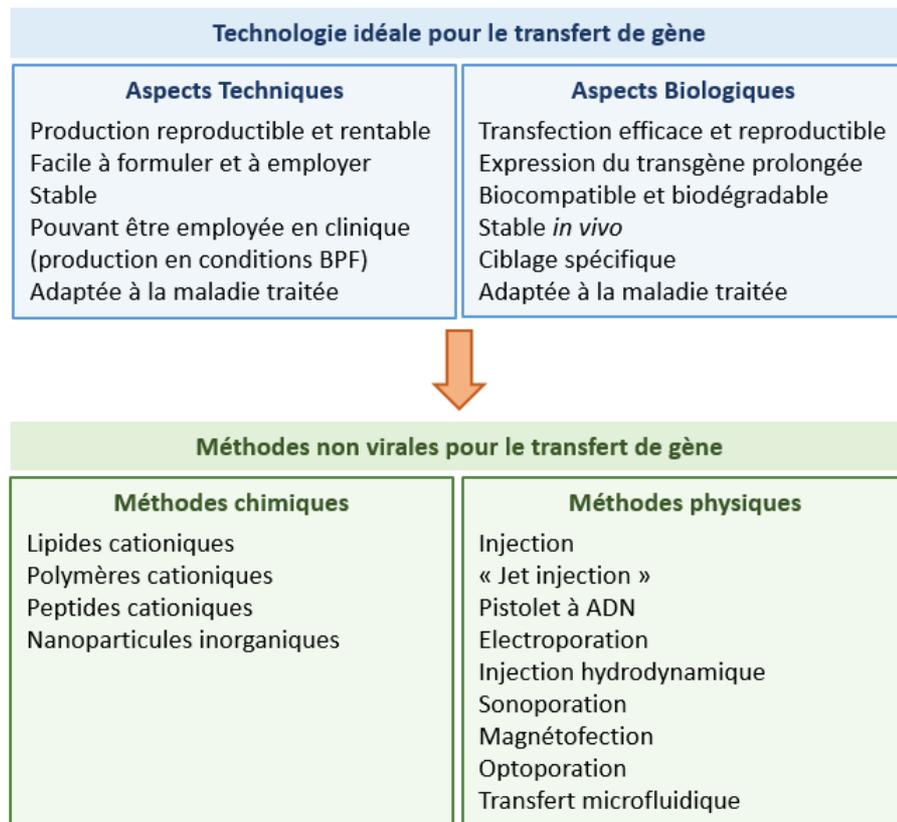


Figure 8: Caractéristiques d'une technologie idéale de transfert de gène et liste des méthodes existantes. BPF : Bonnes pratiques de fabrication. Adapté d'après Gaspar et al. 2015.

1.3.2.1 Méthodes chimiques

Du fait de sa nature anionique, le contact de l'ADN avec les cellules est limité par des répulsions électrostatiques. Les méthodes dites « chimiques » ont pour but de former des complexes avec l'ADN thérapeutique afin de favoriser son transfert dans les cellules tout en le protégeant de l'action des nucléases. Les vecteurs chimiques sont des molécules naturelles ou synthétiques, simples à élaborer et à utiliser, qui représentent une alternative prometteuse aux vecteurs viraux. Cependant, malgré une bonne efficacité *in vitro*, la faible efficacité de ces vecteurs *in vivo* limitent encore leur utilisation. Il est d'ailleurs souvent difficile d'extrapoler les résultats obtenus en culture cellulaire aux essais *in vivo*.

Il existe à ce jour une grande variété de vecteurs chimiques, pouvant être séparés en deux grands groupes : les particules organiques représentées en majorité par les vecteurs cationiques et les nanoparticules inorganiques. Les paragraphes suivants décrivent de manière non exhaustive ces deux familles.

I.3.2.1.1 Les particules organiques cationiques

La formation de particules cationiques repose sur l'attraction électrostatique entre l'ADN et des molécules cationiques. Les complexes formés, de par leur charge positive, favorisent le transfert de l'ADN dans les cellules. Le mécanisme d'entrée principal est la voie de l'endocytose médiée par les clathrines. Après son internalisation, le vecteur se retrouve dans une vésicule intracellulaire évoluant en endosome. Il est alors nécessaire qu'il en soit libéré avant l'évolution de l'endosome en lysosome dont le contenu est ensuite dégradé. Les vecteurs cationiques synthétisés pour le transfert de gène doivent donc protéger l'ADN, favoriser son entrée dans la cellule, favoriser la sortie de l'ADN de l'endosome puis son transfert au noyau.

1- Les lipides cationiques

Le DOTMA fut le premier lipide cationique utilisé avec succès pour la transfection en 1987 (Felgner et al. 1987). Depuis, de nombreux lipides cationiques ont été développés et industrialisés dans ce but.

Un lipide cationique est constitué de trois parties : une tête cationique hydrophile, un espaceur et une chaîne hydrophobe.

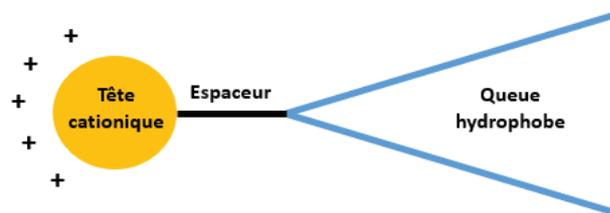


Figure 9: Représentation schématique d'un lipide cationique

Les particules formées par ces lipides en solution aqueuse sont les **liposomes** cationiques. Le mélange d'ADN avec les liposomes conduit à la formation spontanée de complexes, l'ADN chargé négativement s'insérant dans l'espace aqueux des structures formées par les liposomes. Ces complexes sont nommés **lipoplexes**. L'efficacité de cette complexation est importante (généralement 100% de liposomes chargés avec de l'ADN) mais dépend fortement de la concentration en liposome, du ratio liposome/ADN et de la nature du lipide cationique. Plusieurs lipides ont été synthétisés en faisant varier la tête cationique ou la queue hydrophobe. Ils représentent les systèmes synthétiques les plus utilisés *in vitro* et offre pour principaux avantages d'être peu coûteux et de pouvoir transporter de larges molécules l'ADN.

Plusieurs liposomes ont été testés avec succès dans des études pré-cliniques et cliniques (Caplen et al. 1995; Stopeck et al. 2001). Leur utilisation *in vivo* reste cependant limitée par une faible

efficacité de transfection notamment en comparaison aux vecteurs viraux, par leur rapide élimination de la circulation sanguine et par leur forte charge cationique pouvant induire des interactions non spécifiques avec tout type cellulaire et pouvant, par conséquent, entraîner une toxicité cellulaire non négligeable en fonction du lipide employé.

Plusieurs améliorations ont été réalisées dans le but d'augmenter leur efficacité et diminuer leur toxicité. L'utilisation de co-lipides neutres en tant qu'adjuvant, tels que le DOPE (dioleoylphosphatidyléthanolamine), permet en effet de diminuer la charge cationique, de stabiliser les lipoplexes et également de favoriser la sortie des endosomes (Koltover et al. 1998). Le polymère neutre PEG (polyéthylène glycol) est également largement utilisé pour stabiliser les liposomes (Harvie et al. 2000). D'autres formulations incluent des ligands permettant de favoriser le ciblage des liposomes au tissu cible, limitant ainsi leur toxicité. Par exemple, le concept récemment développé de nanoparticules auto-assemblées ABCD consiste en des lipoplexes (ADN thérapeutique (A) complexé avec un liposome cationique (B)), entourés d'une couche de polymère biocompatible (PEG etc...) (C), le tout étant finalement recouvert d'une couche permettant le ciblage des cellules à traiter (D)(ligands etc...)(Kostarelos & Miller 2005).

Les lipides cationiques peuvent également être utilisés comme surfactants pour réaliser des nanoémulsions lipidiques (Verissimo et al. 2010). Les nanoémulsions sont des systèmes dispersés constitués d'eau, de lipides physiologiques (cholestérol, phospholipides ou triglycérides) et de surfactants formant des gouttes d'environ 200 nm chargées positivement. Elles peuvent être produites à l'échelle industrielle plus facilement que des liposomes. Elles présentent également l'avantage de rester stables durant leur stockage et d'être très biocompatibles, générant une toxicité moins élevée que les liposomes *in vivo* (Kwon et al. 2008).

Certains lipides solides à température ambiante, tels que des glycérides ou des cires ayant une température de fusion élevée, peuvent être employés pour synthétiser des nanoparticules solide-lipides (SLN). Ces particules présentent pour principaux avantages d'être hautement biocompatibles, comme les nanoémulsions, et surtout de permettre une libération progressive de l'ADN (Olbrich et al. 2001; Uner & Yener 2007).

2- Les polymères cationiques

Les polymères cationiques sont des nanosphères d'environ 1-1000 nm de diamètre. Les particules formées par la complexation entre l'ADN et les polymères cationiques sont appelés **polyplexes**. L'ADN peut être « encapsulé » dans la matrice polymérique ou bien adsorbé ou conjugué.

Comme pour les vecteurs lipidiques, il existe une multitude de ces vecteurs de nature chimique variée. Parmi eux, le PEI est considéré comme l'un des agents les plus efficaces. Les amines non protonés qu'il contient neutralisent l'acidification des endosomes et causent leurs ruptures

favorisant ainsi la libération du cargo génétique. Plusieurs dérivés PEI biodégradables ont été synthétisés. Le PEI a cependant montré une toxicité non négligeable *in vivo* et *in vitro* (Moghimi et al. 2005). Cette toxicité est également augmentée par l'agrégation des polyplexes qui conduisent à la formation d'amas de taille importante s'accumulant dans les tissus. Une substitution partielle des groupements amines avec des résidus N-acryloyl-l-histidine peut cependant limiter la toxicité cellulaire (Bertrand et al. 2011). De plus, les His-IPEI (Histidinylated linear PEI) ainsi formés conduiraient à une efficacité de transfection augmentée en favorisant notamment le passage de l'endothélium vasculaire (Gomez et al. 2013). La conjugaison avec des polymères neutres tels que le PEG ou anioniques tels que le dextran permettrait également une amélioration des polyplexes en terme d'efficacité et de toxicité (Al-Dosari & Gao 2009).

Le chitosan est un polycation naturel, qui fait également parti des polymères les plus étudiés. Il protège efficacement l'ADN des nucléases et des dérivés optimisés conduisent à des efficacités de transfection comparables à celles du PEI. De plus ses propriétés muco-adhésives le rendent intéressant pour la délivrance d'ADN par voie nasale et orale (Basarkar & Singh 2007).

3- Peptides cationiques

Différents types de peptides cationiques ont été développés pour le transfert d'acides nucléiques (Martin & Rice 2007). Riches en résidus basiques, ils permettent de condenser efficacement l'ADN en de petites particules compactes stables dans le sérum. Complexés à des polyplexes ou des lipoplexes, ils favorisent leur ciblage vers des récepteurs cellulaires spécifiques. Certaines courtes séquences peptidiques peuvent porter un signal de localisation cellulaire (NLS : Nuclear Localization Factor) ou interagir avec les microtubules et permettent ainsi de favoriser la diffusion et le transfert de l'ADN au noyau (Escriou et al. 2003; Pigeon et al. 2013).

I.3.2.1.2 Nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques sont des nanostructures différentes en taille, forme et porosité construites de façon à protéger le matériel génétique qu'elles contiennent de la dégradation ou de la dénaturation. Le matériel inorganique utilisé pour leur synthèse comprend des sels inorganiques (phosphate de calcium, phosphate de magnésium), des nanotubes de carbone, des céramiques (silice), des métaux comme l'or et le fer, des composés magnétiques ou des quantum dots (Sokolova & Epple 2008).

La surface de ces nanoparticules peut être fonctionnalisée afin de faciliter l'adsorption de l'ADN et le ciblage du transfert (Sokolova & Epple 2008). Leur petite taille (1 à 100 nm) leur permet de passer facilement la plupart des barrières, dont la barrière cellulaire et de conduire à une expression efficace de l'ADN. Les nanoparticules magnétiques telles que $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MnO}_2$ peuvent permettre le guidage et le ciblage du transfert en appliquant un champ magnétique (Voir plus loin, le paragraphe I.3.2.2.7: Magnétofection). D'autres nanoparticules ayant des propriétés optiques

permettent de suivre le devenir de l'ADN thérapeutique par imagerie (Srinivasan et al. 2006). La toxicité des nanoparticules inorganiques est fortement étudiée et dépend de leur taille, de leur nature ainsi que de la quantité utilisée (Soenen et al. 2011; Hofmann-Antenbrink et al. 2015).

Le tableau suivant résume les principes, les avantages et les limites des différentes familles de vecteurs chimiques présentées. Il faut cependant noter que la comparaison entre les différents vecteurs est difficile car leur efficacité et toxicité dépendent de nombreux paramètres tels que la structure chimique des vecteurs, leur formulation, leur fonctionnalisation ainsi que la nature des cellules et tissus ciblés. D'autre part, des vecteurs de ces différentes familles sont souvent conjugués afin de favoriser le transfert aux cellules.

Nanoparticules	Principe	Avantages	Limites
Lipides cationiques	Formation de lipoplexes grâce à l'interaction électrostatique entre l'ADN et les lipides	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité <i>in vitro</i> - Large capacité (complexation avec des molécules de grande taille) - Plusieurs formulations et conjugaisons possibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité - Agrégations - Rapide élimination de la circulation
Polymères cationiques	Adsorption, conjugaison ou encapsulation de l'ADN dans les polymères favorisée par l'interaction électrostatique entre l'ADN et les charges cationiques des polymères pour former des polyplexes	<ul style="list-style-type: none"> - Activité endosomolytique - Modulation de la libération de l'ADN - Biodégradable 	<ul style="list-style-type: none"> - Instabilité et faible efficacité <i>in vivo</i> - Toxicité - Agrégations - Rapide élimination de la circulation
Peptides cationiques	Condensation de l'ADN avec le peptide par interaction électrostatiques et ioniques ou covalentes	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation du transfert de l'ADN au noyau par des peptides porteur de séquence de localisation nucléaire ou d'interaction avec les microtubules - Possible conjugaison aux polyplexes ou lipoplexes - Faible toxicité et immunogénicité 	<ul style="list-style-type: none"> - Production et purification chère et difficile - En fonction du mode de conjugaison, peut perturber la transcription ou les propriétés physicochimiques des complexes
Nanoparticules inorganiques	Conjugaison des nanoparticules inorganiques et de l'ADN avec ou sans présence de nanoparticules organiques cationiques	<ul style="list-style-type: none"> - Bonne stabilité <i>in vivo</i> - Transfert ciblé (nanoparticules magnétiques) - Suivi par imagerie (quantum dots) 	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité aiguë ou chronique potentielle - Source potentielle de pollution environnementale

Tableau 2: Avantages et limites des différentes familles de vecteurs chimiques employés pour la thérapie génique

1.3.2.2 Méthodes physiques :

Les méthodes physiques emploient des forces physiques pour créer des pores transitoires dans la membrane plasmique des cellules afin de favoriser l'entrée de l'ADN. Elles n'ont donc, pour la plupart, pas recours à un vecteur/transporteur particulier pour le transfert de l'ADN. Cette partie

décrit les principales techniques physiques ayant été développées ainsi que les avantages et limites de chaque méthode.

I.3.2.2.1 Injection avec une aiguille :

a. Microinjection :

La microinjection implique l'utilisation d'une micropipette pour injecter l'ADN directement dans la cellule à l'échelle microscopique. Une aiguille d'environ 0,1-0,5 μm de diamètre est utilisée pour pénétrer la membrane plasmique puis injecter le matériel génétique (Capecchi 1980). Cette méthode est efficace notamment pour le transfert de molécules de grande taille et a été considérablement améliorée par la mise en place de guidage par ordinateur ou de microinjection automatisée (Pepperkok et al. 1991; Kwon et al. 2015; Chow et al. 2016). Cependant, elle nécessite la manipulation individuelle de chaque cellule et n'est donc pas appropriée pour les applications *in vivo*. Elle est principalement utilisée pour la production de lignée cellulaires recombinantes (Chenuet et al. 2009).

b. Injection locale ou systémique :

L'injection localisée d'ADN nu a tout d'abord été montrée dans le muscle en 1990 (Wolff et al. 1990) et après cela dans différents tissus tels que le foie, la peau, le cerveau ou les tumeurs. Du fait de la simplicité de sa mise en place, cette approche est particulièrement attractive. Le mécanisme de transport de l'ADN semblerait s'expliquer par la diffusion de l'ADN à travers les défauts créés dans la membrane cellulaire par l'injection (André et al. 2006). Bien que limitée, le niveau d'expression du transgène délivré par cette méthode est suffisant pour générer une réponse biologique et notamment immunitaire. L'injection directe d'ADN dans les tissus et le sang a notamment été utile pour évaluer la toxicité potentielle d'un gène thérapeutique ou pour des approches de vaccination à ADN (Lui et al. 2001; Song et al. 2000). Le tatouage à ADN est une amélioration de ce système et consiste en l'administration locale d'ADN en utilisant un dispositif contenant une dizaine d'aiguilles et dont les oscillations permettent de générer plusieurs milliers d'injections (Chiu et al. 2012). L'efficacité de ce système a été montrée *in vivo* chez le primate et *ex vivo* sur des modèles de peau humaine (van den Berg et al. 2009).

I.3.2.2.2 « Jet injection » :

Ce mode d'injection ne requiert pas d'aiguille car la solution d'ADN est dirigée par un gaz à haute pression pour former un flux très fin et à grande vitesse permettant de générer des pores dans la membrane des cellules cibles et de transférer l'ADN. L'ADN ne serait pas endommagé par cette

procédure (Walther et al. 2001) et une comparaison directe de ce mode d'injection avec le précédent montre que le niveau d'expression obtenu par « jet injection » est significativement supérieur à celui obtenu par injection simple (Ren et al. 2002).

I.3.2.2.3 Pistolet à gène :

Le transfert par pistolet à gène, également nommé transfert « biolistique » a tout d'abord été utilisé pour le transfert de gène chez les plantes. Il consiste en l'envoi de particules métalliques (or, tungstène ou argent) recouvertes d'ADN sur les cellules cibles. Les particules sont dirigées par un gaz sous haute pression avec une vitesse suffisante pour permettre leur transfert dans les cellules (O'Brien & Lummis 2004). Il a été montré que cette approche permet de produire une réponse immune plus importante avec une dose plus faible comparée à l'injection simple et est donc intéressante pour une approche de vaccination génétique (Goudy et al. 2008). Malgré des résultats prometteurs en vaccination, l'utilisation de cette méthode en essais cliniques reste un défi du fait notamment de l'efficacité limitée pour transfecter des zones larges ou profondes et également du coût du matériel très spécialisé.

I.3.2.2.4 Electrotransfert :

L'électrotransfert ou le transfert par électroporation a tout d'abord été établi par Neumann et al en 1982 (Neumann et al. 1982). Depuis, cette technique a évolué pour devenir une méthode puissante et couramment utilisée pour le transfert de gène *in vitro* et *in vivo*. Cette méthode consiste à injecter localement une solution saline d'ADN et à appliquer de courtes impulsions d'un champ électrique pour induire une perméabilisation de la membrane cellulaire (Figure 10). La migration de l'ADN serait favorisée par un effet électrophorétique et serait également due à la formation d'agrégats d'ADN au niveau de la membrane plasmidique et à leur internalisation par différentes voies d'endocytoses (Bloquel et al. 2004; Rosazza et al. 2016). L'optimisation des paramètres tels que la durée et le voltage des impulsions a conduit à une expression augmentée et stable sur le long terme du transgène après électroporation de muscles d'animaux de diverses espèces (de la souris au primate) (Mir et al. 1999).

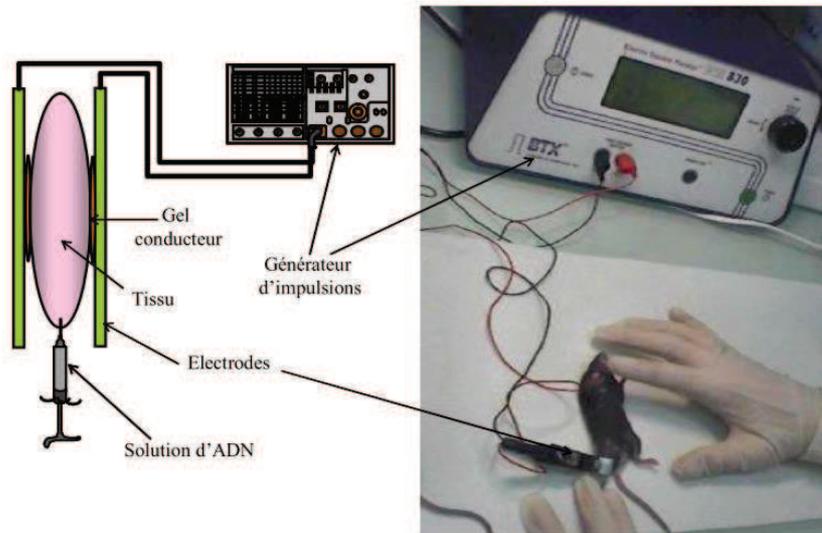


Figure 10: Transfection par électrotransfert.

Après injection d'une solution saline d'ADN thérapeutique dans le tissu ciblé, des impulsions électriques sont appliquées via deux électrodes positionnées de part et d'autre du site d'injection et connectées à un générateur d'impulsions (Trollet 2005)

Les muscles squelettiques, facilement accessibles, sont les tissus ayant été les plus utilisés dans les expériences utilisant l'électroporation à la fois dans des approches de vaccination et de traitement de maladies génétiques (Trollet et al. 2009; Fabre et al. 2008). Cette méthode de transfert a également été appliquée avec succès à d'autres tissus, tels que le foie (Jaichandran et al. 2006), les poumons (Young et al. 2014), le pancréas (Sato et al. 2013), la cornée (Blair-Parks et al.) et les tumeurs (Heller & Heller 2010; Heller & Heller 2015).

En 2015, 85 essais cliniques utilisant l'électroporation étaient en cours (www.clinicaltrials.gov). Parmi ces essais, 28 s'emploient à détruire des tumeurs solides en utilisant « l'électrochimiothérapie » (associée à l'administration de médicaments de chimiothérapie) ou l'électroporation « irréversible », consistant en l'ablation du tissu tumoral en détruisant les membranes cellulaires. Parmi les études restantes, 50 utilisent l'électroporation pour le transfert de gène *in vivo* dont 11 ont déjà atteint la phase 2. Les deux applications majeurs sont la vaccination génétique contre des maladies infectieuses et le traitement de cancer (Heller & Heller 2015).

I.3.2.2.5 L'injection hydrodynamique :

L'injection hydrodynamique est une méthode de transfert établie en 1999 par Liu et al (Liu et al. 1999). Elle consiste en une injection rapide dans la veine de la queue de la souris d'un large volume de solution d'ADN (représentant en volume 10% du poids de la souris)(Figure 11A). L'injection induit une congestion cardiaque transitoire résultant en une pression hydrodynamique élevée dans la veine cave inférieure qui conduit la solution d'ADN dans le foie par la veine hépatique. La pression élargit les pores des fenestreae de l'endothélium du foie et impacte les

hépatocytes générant des pores (hydroporation) dans la membrane cellulaire permettant le transfert de l'ADN (Figure 11B). La pression hydrodynamique et l'efficacité de la transfection dépend du volume et de la vitesse d'injection. Les effets de l'injection sont transitoires et réversibles, le foie retrouvant son fonctionnement normal dans les 24h suivant l'injection. Bien que certains autres organes tels que les reins soient également légèrement transfectés lors de cette procédure, le principal organe cible est le foie pour lequel cette technique est supérieure aux autres techniques non virales en terme d'efficacité, de simplicité et de sûreté (Suda & Liu 2007).

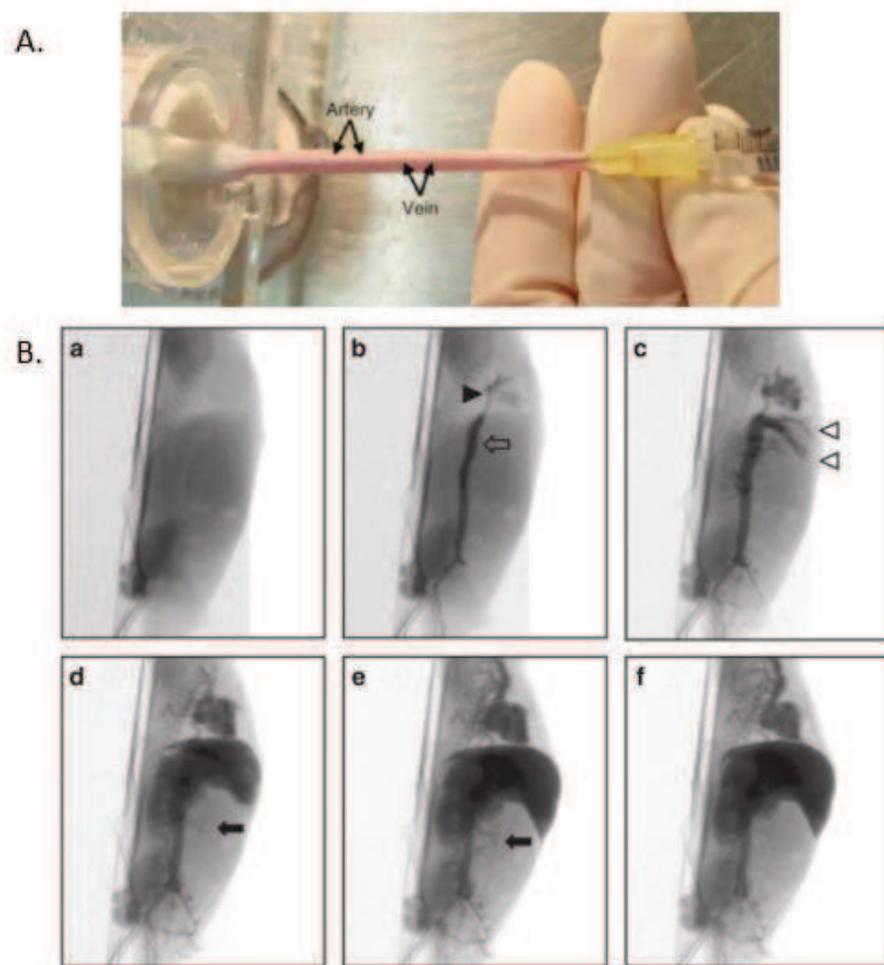


Figure 11: Injection hydrodynamique chez la souris.

A. Dans la pratique, la souris est immobilisée, un volume de solution d'ADN correspondant à 10% de son poids est injecté par la veine de la queue en un temps très court (4-7 sec) (Bell et al. 2008). B. Parcours d'une solution contenant un agent de contraste administrée par injection hydrodynamique : a) avant injection ; b) la solution injectée par la veine caudale atteint tout d'abord le cœur (flèche noire) via la veine cave inférieure (flèche vide), c) puis subit un flux rétrograde dans les veines hépatique (flèches vides) pour atteindre le foie causant son expansion (d), e) et f)). Un faible drainage transitoire par la veine porte est observé (flèche noire) (Kanefuji et al. 2014).

Le transfert par injection hydrodynamique permet de facilement valider des constructions plasmidiques *in vivo* et permet également d'évaluer l'efficacité d'un gène thérapeutique en administrant le vecteur d'expression à un animal modèle d'une maladie (Miao et al. 2001; Aronovich et al. 2009; Bonamassa et al. 2011).

Bien que largement employée dans des études précliniques en utilisant des rongeurs ou des cochons nains, cette technique reste plus difficile à appliquer chez le gros animal tel que le cochon et est également moins efficace (Sendra et al. 2014). Elle nécessite donc une optimisation avant de pouvoir être utilisée chez l'homme. Certaines modifications ont déjà été réalisées pour adapter cette technique aux animaux plus gros, telles que la création d'un système automatisé utilisant la pression intravasculaire comme régulateur (Yokoo et al. 2013) combiné à une injection guidée par imagerie permettant, par exemple, la transfection d'un lobe spécifique du foie chez le cochon et le chien (Kamimura et al. 2013; Kamimura et al. 2014).

I.3.2.2.6 Sonoporation :

La sonoporation est une technique locale non invasive qui utilise les ultrasons pour perméabiliser transitoirement la membrane cellulaire et permettre le transfert de l'ADN. Dans la pratique, le matériel génétique ainsi que des microbulles sont simultanément administrés par voie systémique. Les microbulles sont des particules constituées d'un noyau de gaz entouré d'une capsule stabilisatrice. Après co-injection, des ultrasons sont appliqués extérieurement au niveau du tissu cible. Les microbulles, conduites par les ultrasons à une fréquence proche de leur fréquence de résonance, oscillent et augmentent la perméabilité des cellules environnantes permettant la délivrance de l'ADN (Delalande et al. 2013). L'interaction des microbulles avec les cellules sous l'effet des ultrasons est l'étape clé du processus et peut résulter de différents mécanismes. L'efficacité de la méthode dépend de la concentration en ADN, de la taille et de la concentration des microbulles et des paramètres de sonoporation (Delalande et al. 2015). Le potentiel de cette méthode a été montré par de nombreuses applications *in vitro* et *in vivo* (Noble et al. 2013; Delalande et al. 2011). Une expression élevée et prolongée de la luciférase a notamment été atteinte après administration, par cette technique, d'un plasmide codant la luciférase dans le tendon d'Achille (Delalande et al. 2011). L'application de ce système est cependant limitée par une efficacité de transfection modeste en comparaison à celles obtenues avec d'autres systèmes. Plusieurs études sont en cours afin d'améliorer cette technique en terme d'efficacité de transfection, en utilisant des microbulles cationiques par exemple, ainsi que de ciblage du transfert, en couplant notamment les microbulles avec des anticorps (Delalande et al. 2013).

I.3.2.2.7 Magnétofection :

La magnétofection utilise des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes d'ADN, en présence d'un champ magnétique pour diriger le transfert de gène (Scherer et al. 2002). Cette méthode augmente le transfert de gène en guidant et maintenant les particules recouvertes d'ADN en contact avec les cellules cibles, favorisant leur entrée dans la cellule par endocytose (Huth et al. 2004). La magnétofection a été très utilisée *in vitro* notamment pour favoriser le transfert de gène dans des cellules difficiles à transfecter comme les cellules souches neuronales (Pickard et al. 2011). Moins

employée *in vivo*, elle a tout de même conduit à des résultats prometteurs, comme le transfert intra-tumorale d'un gène anti-métastatique NM23-H1, réduisant considérablement une métastase pulmonaire chez un modèle murin (Li et al. 2009). Plusieurs challenges demeurent cependant pour l'application de cette technique tels qu'une efficacité de transfection encore faible, une rapide clairance systémique des nanoparticules et les risques liés à leur accumulation dans les cellules.

I.3.2.2.8 « Transfection optique » ou « optoporation » :

Cette technique repose sur l'utilisation d'une source laser (argon, titanium sapphire etc..) pour perméabiliser la membrane cellulaire et favoriser le transfert de gène. La solution d'ADN est injectée près de la zone à transférer qui est ensuite exposée quelques secondes au faisceau du laser. Cette méthode non invasive, établie dans les années 80 a été considérablement améliorée et a montré des succès prometteurs *in vitro*. Son application *in vivo* est limitée par son coût, sa capacité de pénétrance réduite, et sa faible surface d'impact et s'est par conséquent limitée jusqu'à présent aux régions exposées tels que les muscles et la peau (Zeira et al. 2007; Zeira et al. 2003).

I.3.2.2.9 Transfert de gène par déformation mécanique :

Cette méthode a été récemment développée pour le transfert *in vitro* de macromolécules et est basée sur la déformation cellulaire (Sharei, Cho, et al. 2013). La solution d'ADN est co-injectée avec les cellules dans un système contenant des canaux étroits qui conduisent les cellules à se déformer, créant ainsi des pores transitoires dans la membrane permettant le transfert des molécules d'ADN entourant les cellules. Cette méthode s'est notamment montrée efficace pour le transfert de siRNA (Sharei, Zoldan, et al. 2013) et pourrait s'avérer prometteuse pour les cellules primaires difficiles à transférer.

Le tableau 3 résume les caractéristiques des différentes techniques physiques de transfert de gène.

Technique	Principe	Matériel	Avantages	Limites
Microinjection	ADN injecté manuellement dans la cellule	Micropipette	Très efficace	Transfection individuelle des cellules, Non applicable <i>in vivo</i>
Injection simple locale ou systémique	ADN injecté avec une seringue dans un vaisseau ou un tissu	Seringue	Méthode simple, Evaluation aisée de la toxicité et de la réponse immunitaire induite par un transgène et son vecteur	Efficacité de transfection insuffisante pour un effet thérapeutique durable
« Jet injection »	ADN administré sous haute pression	« High-speed Jet injector »	Nécessite moins d'ADN et est plus efficace que l'injection simple	Faible pénétration dans les tissus
Pistolet à ADN	Bombardement des cellules par des particules métalliques recouvertes d'ADN	Pistolet, particules	Nécessite moins d'ADN et est plus efficace que l'injection simple	Faible pénétration dans les tissus, Matériel spécifique coûteux.

Electroporation	ADN transféré via un champ électrique perméabilisant la membrane et générant une force électrophorétique	Seringue, électrodes, générateur d'impulsion	Très efficace, notamment pour le transfert dans les muscles, la peau et les tumeurs	Potentielle toxicité transitoire
Injection hydrodynamique	Injection rapide d'un grand volume d'ADN créant des pores permettant le transfert dans les cellules	Seringue	Procédure simple Transfection très efficace des cellules du foie	Encore difficilement applicable chez l'homme
Sonoporation	Perméabilisation des cellules par des ultrasons	Microbulles, sonde à ultrasons	Efficace <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	A optimiser pour une meilleure efficacité et ciblage du transfert Potentielle toxicité
Magnétofection	Nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes d'ADN injectées puis dirigées par un champ magnétique	Nanoparticules, Système magnétique (aimants)	Efficace <i>in vitro</i> Possibilité de ciblage <i>in vivo</i>	Clairance et toxicité des particules
« Optoporation »	Injection d'ADN suivie d'une irradiation laser perméabilisant la membrane cellulaire	Laser	Efficace <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans les tissus peu profonds	Faible pénétration des tissus, matériel spécifique et coûteux
Transfert microfluidique	Perméabilisation de la membrane par déformation cellulaire	Système de déformation	Efficace <i>in vitro</i> Approche <i>ex vivo</i> envisageable	Non applicable <i>in vivo</i>

Tableau 3: Principales méthodes physiques de transfert de gène

Le développement et l'optimisation de ces différentes méthodes de transfert de gène ont conduit à considérer la thérapie génique non virale comme une voie thérapeutique prometteuse. Actuellement, les approches non virales les plus représentées dans les essais cliniques sont les approches employant des plasmides. L'utilisation de ces vecteurs comme outil de thérapie génique sera décrite dans le chapitre suivant de l'introduction

II DES PLASMIDES POUR LA THERAPIE GENIQUE

Les vecteurs plasmidiques sont employés dans près de 20% des essais cliniques de thérapie génique actuels et sont considérés comme plus sûrs et moins coûteux que les vecteurs viraux. Ils restent cependant moins efficaces que ces derniers. Leur application thérapeutique a donc nécessité leur optimisation afin d'assurer un transfert et une expression efficace du transgène sur le long terme, tout en améliorant leur production et en augmentant davantage leur profil de biosécurité.

Ce chapitre rappelle la structure des vecteurs plasmidiques et décrit les éléments génétiques influant sur le transfert et l'expression d'un gène thérapeutique à partir de ces vecteurs ainsi que les stratégies mises en œuvre ces dernières années pour leur optimisation.

II.1 STRUCTURE GENERALE D'UN PLASMIDE

Bien qu'ils aient été optimisés grâce aux outils de biologie moléculaire, les plasmides gardent une construction génétique commune qui contient les éléments suivants (Figure 12):

- **une origine de répllication** : Cette séquence permet l'initiation de la répllication du plasmide par la machinerie de la cellule bactérienne hôte. La répllication générera plusieurs copies de celui-ci qui seront ensuite distribuées aux cellules filles. En fonction de la séquence *ori*, le nombre de copies de plasmides produit diffère. Par exemple, les plasmides contenant une séquence *ori* d'*E. coli* de type ColE1 ou pMB1 sont maintenus à hauteur de 15 à 20 copies par cellules (Casali & Preston 2003). La modification par mutation de ces séquences a permis l'obtention de taux de plasmides plus importants, comme avec l'*ori* pUC générant jusqu'à 700 copies par cellules (Casali & Preston 2003). Un plus haut nombre de copies est généré lorsque *ori* et les gènes adjacents (gène de sélection) sont orientés dans le sens opposé. *Ori* est alors protégée d'une éventuelle poursuite de la transcription du gène de sélection (Mairhofer & Grabherr 2008).

- **un gène de sélection** : La production d'un haut taux de plasmide est coûteux énergétiquement pour la bactérie (Summers 1998). Afin de favoriser la production du plasmide, il est donc nécessaire de maintenir une pression de sélection obligeant la bactérie à le garder. Pour cela, une séquence codant un gène de sélection (souvent un gène de résistance à un antibiotique) est introduite dans le plasmide et la bactérie est cultivée dans un milieu contenant le produit sélectif (l'antibiotique). Seules les cellules maintenant le plasmide pousseront dans ce milieu.

- **une séquence de clonage multiple (MCS)** : tous les plasmides utilisés pour le clonage contiennent généralement une petite séquence d'ADN riche en sites de restriction uniques favorisant l'insertion d'un fragment d'intérêt (Casali & Preston 2003).

- **une unité de transcription** : dans le cas du transfert de gène, cette unité, ou cassette, d'expression contient l'ADN complémentaire d'un gène d'intérêt thérapeutique, un promoteur ubiquitaire ou spécifique d'un type cellulaire et une séquence de polyadénylation modulant la stabilité de l'ARN issu de la transcription du transgène.

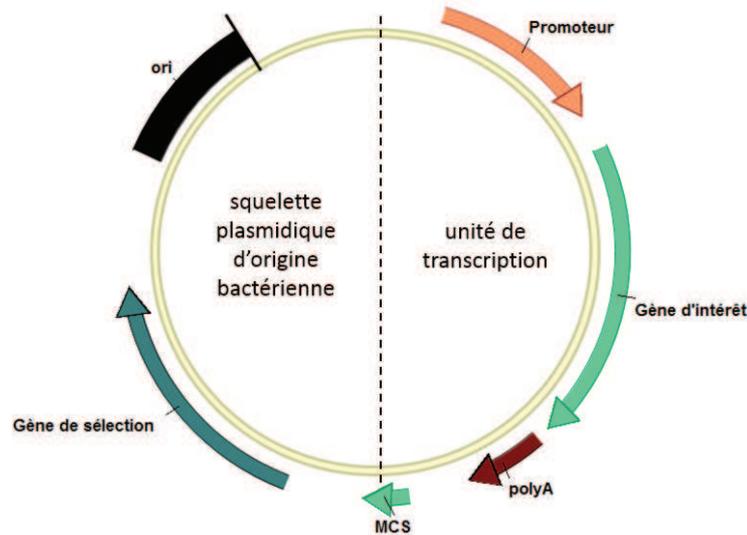


Figure 12: Structure générale d'un vecteur plasmidique.

Elle peut être séparée en deux grandes parties : le squelette plasmidique, d'origine bactérienne, contenant une origine de réplication et un gène de sélection, nécessaires à la réplication et à la production du plasmide par *E. coli*, ainsi qu'un MCS facilitant le clonage de la seconde partie qui est l'unité de transcription. L'unité de transcription consiste en une cassette d'expression contenant un promoteur, le gène d'intérêt thérapeutique et un signal de polyadénylation. Ori : origine de réplication, MCS : site de clonage multiple.

II.2 ELEMENTS CLES POUR UN TRANSFERT ET UNE EXPRESSION DU TRANSGENE EFFICACES

Le succès de l'utilisation d'un plasmide comme vecteur de gène pour la thérapie génique repose avant tout sur un design optimal, à la fois du squelette d'origine bactérienne et de la cassette d'expression eucaryote. Plusieurs éléments doivent être pris en compte pour ce design car ils sont susceptibles d'influencer le rendement de la production du plasmide ainsi que l'efficacité du transfert et de l'expression du transgène. Ce design peut varier en fonction de l'application du plasmide et plus particulièrement entre les approches de vaccination génétique et les autres approches de thérapie génique. Bien que la vaccination génétique soit l'application la plus représentée dans les essais cliniques, ce domaine est cependant éloigné du cadre de cette thèse. La suite de ce chapitre sera donc davantage orientée sur l'utilisation de plasmides dans d'autres approches de thérapie génique.

Cette section décrit les éléments à prendre en compte pour la construction d'un vecteur plasmidique ainsi que les pistes d'optimisation ayant été proposées ces dernières années.

II.2.1 Structure et topologie du plasmide

L'ADN plasmidique peut exister sous différentes formes et conformations en fonction notamment de son intégrité. On peut ainsi le trouver sous forme linéaire ou circulaire. Dans ce dernier cas il peut être fermé de façon covalente (ccc : covalently closed circular) et se trouve alors dans un état surenroulé ou il peut être « ouvert » et se trouve alors dans un état relâché (oc : open circular). Il faut également distinguer la forme monomérique des formes plasmidiques dimérique ou multimérique résultant de la recombinaison de deux ou plusieurs copies d'un même plasmide (Figure 13).

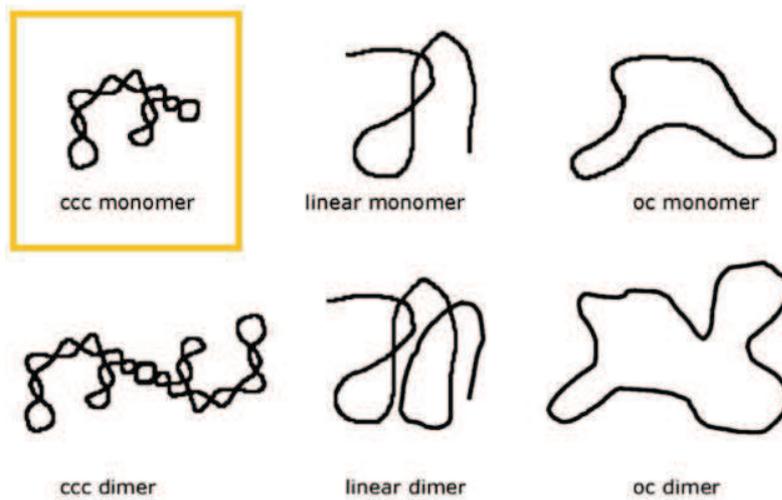


Figure 13: Différentes topologies d'un plasmide.

La topologie encadrée en jaune correspond à la forme dite surenroulée monomérique considérée comme la plus efficace pour le transfert de gène (Schleef et al. 2010).

La forme surenroulée est la conformation la plus physiologiquement active. Elle permet une transfection et une expression efficace du transgène. Cette supériorité par rapport aux autres formes (linéaire ou circulaire « ouvert ») résulte de : (i) une meilleure résistance aux contraintes induites par l'administration (Catanese et al. 2012), (ii) une diffusion plus rapide jusqu'au noyau (due à une meilleure diffusion passive et une meilleure interaction avec les microtubules (Badding & Dean 2013)) et (iii) un passage facilité de la membrane nucléaire (Cherng et al. 1999; Kreiss et al. 1999). De plus, le surenroulement du plasmide augmenterait la distance entre les deux brins d'ADN et faciliterait ainsi l'interaction des facteurs de transcription avec les régions promotrices (Kano et al. 1981).

Les formes circulaires « ouvertes » ou linéaires peuvent apparaître lors du processus de fabrication des plasmides comme produit d'action enzymatiques ou de forces de frottements qui induisent la coupure de l'un ou des deux brins de l'ADN. Ces coupures sont susceptibles d'intervenir dans la cassette d'expression et ainsi de conduire à un produit d'expression défectueux. La forme surenroulée est non seulement la plus efficace mais c'est donc également

la seule considérée comme intacte. Pour ces raisons, les autorités réglementaires demandent aux industriels d'assurer la production d'un produit plasmidique contenant au moins 80 % de forme surenroulée (FDA, 2007).

Les plasmides thérapeutiques doivent également se trouver sous leur forme monomérique (>90%) et résister à la multimérisation. La forme monomérique montre en effet une efficacité de transfection et d'expression supérieure à celles des multimères (Maucksch et al. 2009). De plus, la multimérisation perturbe la production de grandes quantités de plasmides par les bactéries, les multimères étant maintenus en un nombre de copies moins élevé que les monomères. Pour les plasmides à haut nombre de copies tels que les plasmides pUC, les plasmides sont distribués de façon aléatoire entre les cellules filles lors de la division. Tant que le nombre de copies reste élevé, l'obtention de cellules filles vides reste rare. La répartition entre les cellules filles, et donc la stabilité du plasmide, sont en revanche perturbées lors de la formation de multimères (Summers & Sherratt 1984).

La multimérisation est due aux systèmes de recombinaison des bactéries, et notamment à la protéine de recombinaison RecA et peut être évitée en ayant recours à des souches *recA-* (Mairhofer, 2008; Williams, 2009). La multimérisation des plasmides peut également être induite par certaines séquences présentes sur le squelette plasmidique (séquences Chi, séquences répétées (Oliveira, 2009)) qui doivent donc être prises en compte pour une stabilité optimale du plasmide. Une autre stratégie permettant de favoriser la stabilité d'un plasmide consiste en l'introduction dans le squelette plasmidique d'un locus *cer*. Ce locus, présent sur les plasmides ColE1, permet la conversion des multimères en monomères par un événement de recombinaison (Summers & Sherratt 1984; Peubez et al. 2010).

II.2.2 Taille du plasmide

En 1999, Kreiss et al observaient, suite à des essais de transfection utilisant des lipoplexes, que l'efficacité de transfert de gène au noyau des cellules est inversement corrélée avec la taille des plasmides (Kreiss et al. 1999)(Figure 14).

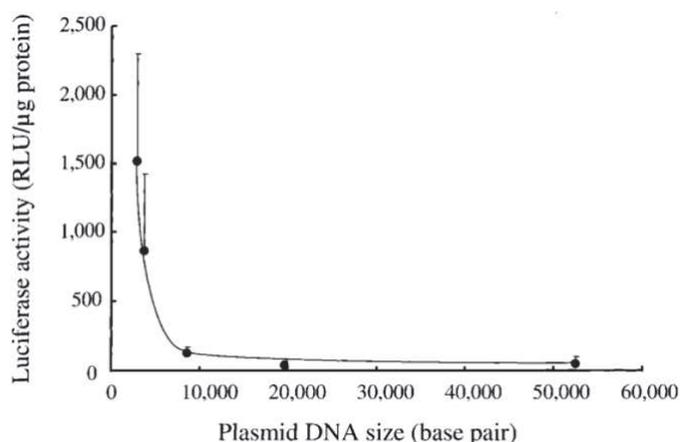


Figure 14 : Influence de la taille du plasmide sur l'efficacité d'expression de la luciférase.

Des cellules NIH 3T3 ont été transfectées avec des quantités équimolaires de plasmides de taille croissante après leur complexation sous forme de lipoplexes avec le lipide RPR120535 (Kreiss et al. 1999).

L'observation de la diffusion dans le cytoplasme de fragments d'ADN de tailles croissantes montre que celle-ci dépend en effet de la taille. Après leur microinjection, les fragments plus petits diffusent plus rapidement que les plus gros jusqu'au noyau et les fragments d'une taille supérieure à 2000 paires de bases ne diffuseraient pas (Lukacs et al. 2000).

Dans le cytoplasme, les molécules d'ADN de taille importante seraient plus sensibles aux collisions et à l'encombrement moléculaire lié notamment au cytosquelette d'actine qui limiteraient leur diffusion passive (Cherng et al. 1999; Mairhofer & Grabherr 2008; Vaughan et al. 2006). Une interaction plus efficace des petites molécules d'ADN avec les éléments du cytosquelette favoriserait également leur transport jusqu'au noyau via le réseau microtubulaire (Vaughan et al. 2006). De plus, la taille influencerait la résistance du plasmide aux forces subies lors de son administration. Les plasmides de taille importante seraient davantage sujets aux coupures (Catanese et al. 2012).

L'influence de la taille du plasmide sur l'efficacité du transfert et de l'expression du transgène est confirmée par les études menées avec les nouvelles générations de plasmides dont la taille du squelette plasmidique a été considérablement réduite tels que les minicercles (Sharma et al. 2013) ou les pFARs (Marie et al. 2010) et qui conduisent tous à une transfection et une expression du transgène plus efficaces que celles obtenues avec des plasmides conventionnels.

II.2.3 Motifs CpG

Les motifs CpG sont des séquences d'ADN constituées de deux nucléotides cytosine et guanine séparés par un phosphate. Ces motifs se trouvent à une fréquence de 1/100 nucléotides dans le génome des mammifères (sauf dans les îlots CpG pour lesquels cette fréquence est d'environ 1/10) et sont pour la majorité méthylés. Dans l'ADN bactérien en revanche, ces motifs sont présents à une fréquence d'environ 1/16 nucléotides et ne sont pas méthylés (Krieg et al. 1995). En 1995, Krieg et al ont montré que ces motifs, contenus par des plasmides ou des

oligonucléotides, conduisaient à l'activation du système immunitaire *in vitro* et *in vivo* et à une élimination des cellules contenant ces acides nucléiques (Krieg et al. 1995). En 2000, Hemmi et al identifiaient le principal effecteur de l'activation du système immunitaire en présence d'ADN bactérien : le récepteur Toll-like TLR9 (Hemmi et al. 2000). L'immunogénicité des CpG différerait en fonction des espèces et dépendrait des deux bases directement situées en 5' et 3'. Ainsi chez l'homme la séquence la plus immunogène s'avère être GTCGTT tandis que chez la souris c'est la séquence GACGTT qui induit la plus forte réponse (Bauer et al. 2001; Krieg 1999). Depuis ces résultats, des équipes ont cherché à élucider le rôle joué par les motifs CpG dans la reconnaissance des plasmides par TLR9 et l'activation du système immunitaire ainsi que sur l'expression des transgènes. Cependant, leurs résultats divergent et le rôle joué par les CpG reste encore controversé :

Certaines études ont ainsi confirmé les travaux de Krieg et al. en montrant que la réduction ou la déplétion des motifs CpG d'un plasmide conduisait à une expression plus élevée et prolongée du transgène (Yew et al. 2002a; Hodges et al. 2004; Hyde et al. 2008). Reyes-Sandoval et al ont également montré que des améliorations similaires pouvaient être obtenues par la méthylation *in vitro* des motifs CpG avant l'administration du plasmide *in vivo* (Reyes-Sandoval & Ertl 2004). Le potentiel pro-inflammatoire de ces motifs est également utilisé dans des approches de vaccination pour le cancer, les allergies ou les maladies infectieuses. Le plasmide codant l'antigène est alors considéré comme un adjuvant (Williams et al. 2009). Des oligonucléotides riches en CpG, co-administrés comme adjuvants, sont également largement utilisés en essais cliniques (Krieg 2012; Scheiermann & Klinman 2014).

Pour les approches de thérapie génique nécessitant l'expression d'une protéine thérapeutique de façon efficace et sur le long terme et pour lesquelles toute stimulation du système immunitaire doit être évitée, des vecteurs ont été optimisés afin de réduire le nombre de motifs CpG (réduction du squelette plasmidique (Chen et al. 2003; Marie et al. 2010), optimisation des séquences bactériennes et des codons de la cassette d'expression...). Plusieurs plasmides totalement dépourvus de motifs CpG (plasmides pCpG) sont notamment disponibles chez Invivogen (Invivogen San Diego, CA, USA).

D'autres études ont cependant montré que l'activation du TLR9 dépendante des CpG est uniquement observée pour les oligonucléotides phosphorothiotates synthétiques et que l'activation par des molécules d'ADN naturelles (phosphodiester) serait en fait liée au squelette désoxyribose et serait indépendante de la séquence d'ADN. La discrimination entre l'ADN du « soi » et l'ADN microbien par TLR9 serait tout d'abord favorisée par une colocalisation de l'ADN microbien avec le TLR9 dans les endosomes (Haas et al. 2008; Li et al. 2012).

L'évaluation de l'impact des motifs CpG est difficile à réaliser car la modification du contenu en CpG d'un plasmide implique généralement de modifier d'autres paramètres tels que la taille du plasmide ou la séquence des gènes, ce qui peut biaiser les résultats. Ainsi, l'effet des motifs CpG sur l'expression d'un gène à partir d'un plasmide reste encore à élucider.

II.2.4 Optimisation de la cassette d'expression

Comme le squelette plasmidique d'origine bactérienne, la cassette d'expression, comprenant un gène d'intérêt, un promoteur contrôlant son expression et un signal de polyadénylation, peut être optimisée dans le but de limiter la réponse immunitaire et la toxicité et afin d'augmenter le niveau de l'expression du transgène.

II.2.4.1 Diminution de la réponse immunitaire et de la toxicité

(i) La réduction du nombre de motifs CpG contenus dans le promoteur ou le transgène peut diminuer les risques de toxicité évoqués précédemment. Cette réduction présente cependant le risque de conduire à une diminution de la stabilité de l'ARNm et à une diminution du niveau d'expression (Bauer et al. 2010).

(ii) Les risques de toxicité et de stimulation du système immunitaire peuvent, d'autre part, être réduits en ayant recours à un promoteur spécifique du tissu ciblé pour la thérapie. En effet, deux types de promoteurs peuvent être utilisés : des promoteurs ubiquitaires fortement actifs dans de nombreux types cellulaires tels que le promoteur CMV (Cytomegalovirus), ou bien des promoteurs spécifiques d'un tissu ou d'un type cellulaire.

L'utilisation d'un promoteur ubiquitaire fort présente pour principaux risques l'expression indésirable d'un transgène dans des cellules de l'immunité telles que les cellules présentatrices d'antigène, ce qui peut conduire à une forte réponse immunitaire (Weeratna, 2001) et la toxicité liée à la présence du produit résultant de l'expression du transgène dans d'autres tissus que le tissu cible.

II.2.4.2 Augmentation du niveau d'expression du transgène

(i) Le niveau d'expression peut être augmenté par l'optimisation de la séquence du transgène en utilisant des codons dont la fréquence d'apparition est élevée dans l'espèce visée par la thérapie (Fath et al. 2011; Wang et al. 2006; Gustafsson et al. 2004).

Les séquences peuvent également être optimisées dans le but de réduire les structure secondaires du plasmide et de l'ARN messager (Fath et al. 2011). Certaines séquences peuvent en effet promouvoir la séparation des brins et la formation de cruciformes sensibles à l'action des nucléases. De telles séquences réduisent la stabilité du plasmide et peuvent conduire à des mutations délétères pour l'expression du transgène et doivent donc être optimisées (Williams 2014). L'optimisation de codons peut cependant présenter des risques, tels que l'altération des

modifications post-transcriptionnelles (telles que l'épissage), et doit être solidement contrôlée (Mauro et al., 2014). Des logiciels de bio-informatique sont disponibles pour un design optimal de la cassette d'expression.

(ii) Il est également possible de favoriser l'expression du transgène et son maintien dans le temps en utilisant un promoteur spécifique du tissu ciblé. Par exemple le promoteur du gène hAAT (human alpha 1-antitrypsin) est un promoteur spécifique du foie et est donc couramment utilisé pour l'expression ciblée d'un transgène dans les hépatocytes (Aliño et al. 2003).

(iii) L'inclusion d'un intron dans la séquence du transgène (consistant généralement en un ADN complémentaire) élèverait également le niveau d'expression du transgène (Lacy-Hulbert et al. 2001) en augmentant notamment l'efficacité de polyadénylation de l'ARNm ainsi que son transport vers le cytoplasme (Lu et al. 2013).

(iv) Enfin, l'expression du transgène peut être augmentée en incluant des séquences favorisant l'import du plasmide dans le noyau. L'enveloppe nucléaire constitue en effet l'une des barrières physiques les plus difficiles à franchir pour l'ADN plasmidique notamment pour les cellules quiescentes et pour lesquelles la mitose ne peut favoriser l'introduction de l'ADN dans le noyau après transfection. Plusieurs études ont suggéré que des séquences spécifiques pourraient augmenter l'accumulation du plasmide dans le noyau. L'une de ces séquences est issue du génome du virus SV40. D'une taille d'environ 70 paires de bases et désignée comme « DTS » (DNA Targeting Sequence) cette séquence contient plusieurs sites de liaisons pour les facteurs de transcription contenant un signal de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localization Signal). L'introduction du DTS du SV40 en amont ou en aval de la cassette d'expression permet d'augmenter le nombre de copies de plasmides atteignant le noyau et par conséquent le niveau d'expression du transgène (Dean et al. 1999; Miller & Dean 2009)(Figure 15).

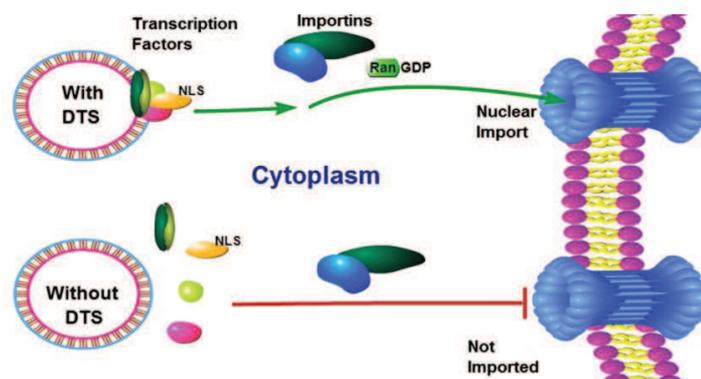


Figure 15: Introduction de séquences DTS favorisant l'import du plasmide dans le noyau.

L'introduction dans le plasmide de séquences DTS (DNA Targeting Sequence) telles que la séquence issue du génome de SV40 (Dean et al. 1999) ou le motif de liaison de NFκB (Gonçalves et al. 2009), permettent la liaison au plasmide de facteurs de transcription porteurs d'un domaine NLS (Nuclear Localization Signal) favorisant ainsi son import dans le noyau. Les importines et Ran sont des protéines impliquées dans ce processus d'import. (Miller & Dean 2009)

Il est également possible d'exploiter la capacité du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B) à transiter entre le noyau et le cytoplasme pour promouvoir l'import nucléaire des plasmides. En effet, NFκB contient un domaine NLS permettant son import dans le noyau ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN se liant à un motif spécifique de 10 paires de bases. L'introduction de part et d'autre de la cassette d'expression d'une séquence optimisée contenant 3 motifs de liaison NFκB séparés de 5 pb conduit à une augmentation significative du nombre de copies du plasmide dans le noyau et à une expression augmentée du transgène (Gonçalves et al. 2009).

II.3 MAINTIEN OU EXTINCTION DE L'EXPRESSION DU TRANSGÈNE A PARTIR D'UN PLASMIDE: MECANISMES ET STRATEGIES

L'utilisation clinique des plasmides est encore limitée, notamment en raison de la nature transitoire de l'expression du transgène. Le développement de vecteurs sûrs et permettant une expression permanente reste l'un des principaux défis dans le domaine de la thérapie génique non virale. Ce paragraphe décrit les principaux mécanismes pouvant conduire à la chute de l'expression d'un transgène ainsi que les stratégies utilisées pour améliorer le niveau et la durée de l'expression.

Généralement, l'expression du transgène délivré par un vecteur plasmidique atteint son niveau maximum un ou deux jours après administration aux cellules en culture ou aux tissus tels que le foie (Herweijer et al. 2001 ; Jacobs et al., 2008) ou les poumons (Belur et al., 2003) puis chute rapidement et persiste rarement au-delà d'une semaine. Ce phénomène d'extinction, appelé « silencing » dans la littérature peut être due à : (1) une diminution du nombre copies du plasmide et/ou (2) à des événements épigénétiques inhibant son expression et enfin (3) à la taille et position du squelette plasmidique.

II.3.1 Diminution du nombre de copies de plasmide

Plusieurs événements peuvent résulter en une diminution du nombre de copies de plasmides :

- (i) La coupure suivie de la dégradation de l'ADN plasmidique dues aux contraintes et forces de cisaillement générées par la procédure d'administration (Catanese et al. 2012; Stenler et al. 2014).
- (ii) L'élimination des cellules endommagées durant l'administration.
- (iii) La réponse immunitaire contre les cellules exprimant le transgène :

La présence intracellulaire ou dans la circulation sanguine de protéines exogènes ou encore la reconnaissance des motifs CpG de l'ADN par les récepteurs TLR9, peuvent induire l'activation du système immunitaire résultant en une élimination des cellules exprimant le transgène (Hemmi et al. 2000).

(iv) La perte du plasmide lors de la division cellulaire:

L'un des intérêts des plasmides par rapport aux vecteurs viraux est l'absence d'intégration dans le génome. Bien que des événements d'intégration aléatoire existent, ils restent rares et les plasmides restent sous forme épisomique dans le noyau des cellules transfectées. Dans les tissus dont les cellules ne se divisent pas ou peu, un plasmide peut demeurer et conduire à une expression prolongée du transgène. Il sera en revanche rapidement perdu par les cellules se divisant.

De nombreux efforts ont été réalisés afin d'identifier des éléments génétiques permettant la persistance sous forme épisomique et la répllication des vecteurs plasmidiques dans les cellules eucaryotes. Par exemple, le vecteur pEPI a été généré en ajoutant dans sa cassette d'expression un élément Scaffold/Matrix Attachment Region (S/MAR) de la région 5' du gène de l'interféron β humain (Piechaczek et al., 1999). Les S/MAR sont des séquences riches en A/T, souvent associées aux origines de répllication bidirectionnelle de l'ADN chromosomique et impliquées dans l'ancrage de la chromatine à la matrice nucléaire, jouant un rôle crucial dans le maintien de la structure des chromosomes (Harraghy et al. 2008). La présence d'un élément S/MAR permet au vecteur pEPI de s'associer à la matrice nucléaire et d'être ainsi conservé lors des mitoses (Jenke et al. 2002). Il a été montré que ce plasmide épisomique peut être stablement conservé sur plusieurs centaines de divisions *in vitro* (Piechaczek et al., 1999) et sur plusieurs mois *in vivo* (Ehrhardt et al. 2003).

II.3.2 Régulation épigénétique de l'expression du transgène

Chez les eucaryotes, l'expression des gènes est très régulée et le phénomène d'extinction de l'expression génique est un processus naturel et essentiel notamment lors du développement.

Le génome des eucaryotes est constitué d'ADN associé à protéines histones et à d'autres protéines constituant ainsi la chromatine. Les nucléosomes correspondent à l'enroulement de l'ADN autour du complexe protéique formé de 8 molécules d'histones (deux paires de :H2A, H2B, H3 et H4). L'histone H1 assure le maintien de cette structure. En fonction de son degré de compaction, l'ADN peut-être plus ou moins accessible aux facteurs et médiateurs de la transcription. Ainsi, une chromatine compactée (hétérochromatine) sera retrouvée pour les gènes dont l'expression est réprimée tandis qu'une chromatine ouverte (euchromatine) sera retrouvée pour les gènes activement transcrits (Kouzarides 2007)(Figure 16). Le changement d'état euchromatine-hétérochromatine est associé à plusieurs modifications épigénétiques :

- (i) la méthylation des motifs CpG de l'ADN, très présents sous forme d'ilots près des régions promotrices, qui conduit à une répression de la transcription d'un gène (Schübeler 2015).
- (ii) les modifications dynamiques post-traductionnelles des queues *N*-terminal des histones, telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation ou l'ubiquitination. La combinaison de différentes modifications des histones présentes dans un nucléosomes

engendre selon le « code histone » un état transcriptionnellement actif ou inactif (Ray-Gallet et al., 2005).

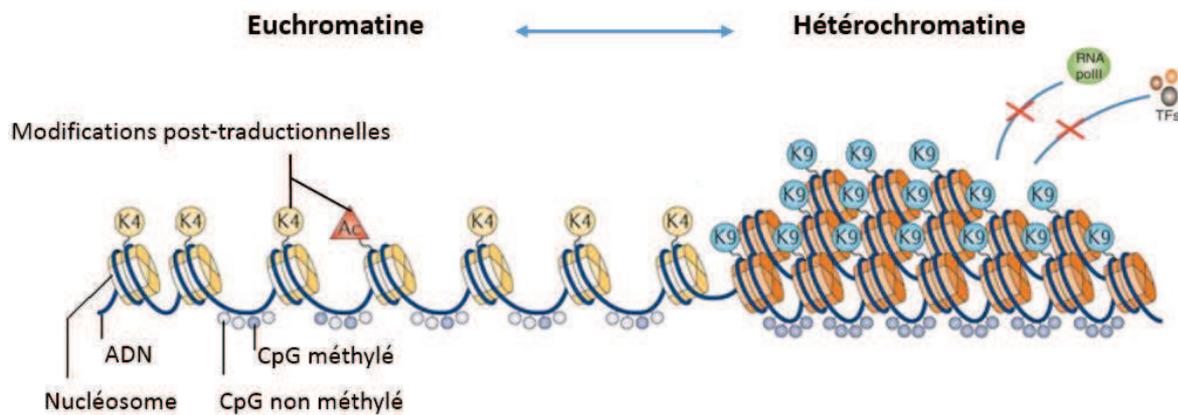


Figure 16: Les différents états de la chromatine.

La chromatine consiste en l'assemblage de l'ADN (filament bleu) avec des protéines dont les protéines histones. L'ADN s'enroule autour de ces dernières, pour former les nucléosomes (cylindres jaunes et oranges). Chaque nucléosome consiste en un octamère d'histones (2x H2A, H2B, H3 et H4). L'état transcriptionnel ouvert (euchromatine) ou fermé (hétérochromatine) de la chromatine est régulé par des modifications épigénétiques. Ces modifications incluent la méthylation des CpG de l'ADN et les modifications post-traductionnelles réversibles des histones. Typiquement, la tri-méthylation de la lysine 4 de H3 (rond K4) et l'acétylation des histones (triangle Ac) sont des marques d'histones associées à la liaison de la RNA polymérase II et des facteurs de transcription et donc à une transcription active. La tri-méthylation des lysines 9 ou 27 (rond K9) de H3 et la méthylation des motifs CpG sont au contraire un signal de répression de la transcription. (Adapté d'après Gaspar-Maia et al., 2011).

Peu d'informations existent sur la nature de la chromatine des plasmides épisomiques délivrés dans les tissus. Cependant la chute d'expression des transgènes délivrés par ces vecteurs a conduit plusieurs équipes à étudier la régulation épigénétique liée à ce phénomène d'extinction.

Les études menées par l'équipe de M. A. Kay ont dans un premier temps démontré que le squelette plasmidique d'origine bactérienne constitue la principale source de l'extinction du transgène. La séparation de la cassette d'expression du squelette plasmidique résulterait en un niveau d'expression 10 à 100 fois supérieur comparé au plasmide circulairement fermé, suite à l'administration de l'ADN par injection hydrodynamique dans le foie. L'extinction de l'expression serait donc indépendante de la séquence constituant le squelette plasmidique mais serait principalement due à la liaison covalente de ce dernier à la cassette d'expression (Z. Y. Chen et al., 2001; Z. Y. Chen et al., 2004; Riu et al., 2005). La comparaison du niveau et de la durée d'expression obtenue à partir d'un minicercle dépourvu d'ADN bactérien ou d'un plasmide conventionnel, après administration par injection hydrodynamique, a également conforté ces résultats. Les minicercles sont en effet moins sujets au phénomène d'extinction et conduisent à une expression prolongée du transgène (Z.-Y. Chen et al., 2003; Schüttrumpf et al., 2011). Le squelette plasmidique constituerait donc une séquence d'ADN transcriptionnellement inerte très

similaire à l'hétérochromatine du génome eucaryote. Son profil de méthylation et de modifications post-traductionnelles des histones a donc été étudié :

- (i) *Etude du profil de méthylation des motifs CpG de l'ADN plasmidique après transfection:* Certaines études ont démontré que la méthylation des CpG de l'ADN bactérien conduirait à la formation d'hétérochromatine qui se propagerait de ces régions méthylées jusqu'à la cassette d'expression réprimant ainsi la transcription (Hodges et al., 2004; Schüttrumpf et al., 2011). L'implication de la méthylation dans le phénomène d'extinction reste cependant encore débattue (Chen et al. 2008; Ochiai et al. 2006).
- (ii) *Etude des modifications post-traductionnelles des histones associées à l'ADN plasmidique après transfection:* L'équipe de M. A. Kay a montré que le phénomène d'extinction observé avec les plasmides conventionnels serait accompagné d'un enrichissement en marque d'histones caractéristiques de l'hétérochromatine et à une diminution des marques d'euchromatine. En comparaison, les marques associées aux minicercles contenant la même cassette d'expression et dépourvus d'ADN bactérien, correspondent à un profil d'euchromatine (Riu et al. 2007; Gracey Maniar et al. 2012)

Les résultats de ces études ont prouvé l'implication des modifications épigénétiques dans le phénomène d'extinction d'expression à partir d'un plasmide. Ces modifications seraient en partie dues à l'ADN procaryote du plasmide, propice à la formation d'hétérochromatine.

Bien que le mécanisme exact n'ait pas encore été complètement élucidé plusieurs stratégies ont été envisagées et testées pour prolonger l'expression du transgène *in vivo* comme (i) l'utilisation de vecteurs réduits ou dépourvus d'ADN bactérien tels que les minicercles (Z.-Y. Chen et al., 2003), (ii) la réduction du nombre de motifs CpG (Hodges et al., 2004) et utilisation de promoteurs eucaryotes contenant moins de motifs CpG que les promoteurs viraux (Gazdhar et al. 2006) et enfin, (iii) l'ajout de séquences insultrices de part et d'autre de la cassette d'expression.

Les insulateurs sont des séquences d'ADN qui constituent des « barrières » en protégeant un gène de la propagation adjacente d'hétérochromatine. Certains insulateurs peuvent également agir comme bloqueurs pour protéger un promoteur de l'influence de séquences amplificatrices associées à d'autres gènes. Parmi les séquences insultrices les plus étudiées : l'insulateur cHS4 consistant en l'extrémité 5' du locus de la β -globine du poulet (chicken β -globin locus) contenant un site d'hypersensibilité à la DNase I (HS)(Chung et al. 1997; Burgess-Beusse et al. 2002). L'introduction de deux unités de cHS4 de part et d'autre de la cassette d'expression permettrait d'éliminer l'interaction avec le squelette bactérien et la propagation de l'hétérochromatine assurant ainsi le maintien de l'expression du transgène (Pikaart et al. 1998; Chen et al. 2008).

Alternativement, les éléments S/MAR présentent également des propriétés insultrices et favoriseraient le maintien de l'expression d'un transgène (Ehrhardt et al. 2003).

II.3.3 Taille et position du squelette plasmidique

L'étude de l'influence du squelette d'origine bactérienne des plasmides sur l'extinction du transgène a conduit l'équipe de M. A. Kay à étudier l'influence de la taille de ce squelette ainsi que l'influence de sa position par rapport à la cassette d'expression. D'après leurs résultats, la taille et non le contenu de la séquence séparant les extrémités 3' et 5' de la cassette d'expression impacterait le phénomène. L'extinction serait d'autant plus importante que la taille de la séquence d'origine bactérienne est grande. Un squelette de petite taille favoriserait le maintien de la transcription en permettant le recyclage de l'ARN polymérase II de l'extrémité 3' de la cassette d'expression au promoteur en 5' (Lu et al. 2012). Suivant cette idée, un nouveau plasmide a été construit : le « mini-intronic-plasmid » (MIP). Dans ce plasmide, le squelette bactérien est situé dans la cassette d'expression sous la forme d'un intron. La faible distance séparant les extrémités 5' et 3' de la cassette d'expression favoriserait le maintien de l'expression et l'inclusion d'un intron dans le transgène augmenterait l'efficacité de polyadénylation et donc le niveau d'expression du transgène (Lu et al. 2013; Diecke et al. 2015).

Le tableau 4 résume les stratégies pouvant être mises en œuvre pour augmenter l'efficacité de transfection et d'expression d'un transgène sur le long terme à partir d'un plasmide. Elles peuvent impliquer le squelette plasmidique et/ou la cassette d'expression du gène thérapeutique.

Plasmide	Optimisation	Résultats
ADN plasmidique d'origine bactérienne	↘ Taille	↘ nombre de motifs CpG ↗ efficacité de transfection ↗ durée d'expression ↗ intégrité du plasmide
	↘ Motifs CpG	↘ réponse inflammatoire ↗ durée d'expression
	↘ Motifs favorisant la multimérisation	↗ rendement de production ↗ efficacité de transfection
	↘ Motifs favorisant la coupure par des endonucléases	↗ stabilité du plasmide ↗ % forme surenroulée ↗ efficacité de transfection
Cassette d'expression	Promoteur spécifique du tissu cible	↘ réponse inflammatoire ↘ toxicité ↗ niveau et durée d'expression
	Optimisation de la séquence et/ou des codons	↗ niveau d'expression ↗ stabilité du plasmide ↘ nombre de motifs CpG
	Ajout d'un intron	↗ niveau d'expression

	Ajout d'une séquence S/MAR	↗ durée d'expression
	Introduction d'insulateurs de part et d'autre de la cassette	↗ durée d'expression
	Introduction de part et d'autre de la cassette de séquences spécifiques favorisant l'import du plasmide dans le noyau (DTS)	↗ niveau d'expression ↗ durée d'expression

Tableau 4: Stratégies d'optimisation d'un vecteur plasmidique pour la thérapie génique

D'autres stratégies d'optimisation, visant à éliminer le gène de résistance à un antibiotique, ont été mises en place dans le but d'augmenter le profil de biosécurité des vecteurs plasmidiques et ainsi de favoriser leur application clinique. La section suivante est consacrée à cette nouvelle génération de plasmides dits « biosécurisés ».

II.4 NOUVELLE GENERATION DE VECTEURS NON VIRAUX DEPOURVUS DE GENE DE RESISTANCE A UN ANTIBIOTIQUE

II.4.1 Risques associés aux plasmides porteurs de gène de résistance à un antibiotique

L'utilisation d'un marqueur de sélection est nécessaire pour la production de plasmide afin d'assurer une sélection efficace des bactéries transformées lors du clonage et une propagation stable lors de la croissance bactérienne. Les gènes conférant la résistance à un antibiotique sont les plus employés comme marqueur de sélection. L'utilisation de ces marqueurs soulève cependant plusieurs problèmes de biosécurité soulignés par les directives des autorités réglementaires internationales.

L'Agence Européenne du médicament (EMA) ainsi que la FDA recommandent ainsi que l'utilisation de tels gènes de sélection soit si possible évitée et sinon justifiée. Plus particulièrement, l'utilisation de β -lactames (tels que la pénicilline ou l'ampicilline), connus pour provoquer des réponses allergiques chez certains individus est jugée indésirable. De plus, il est préférable que l'antibiotique de sélection ne fasse pas partie des antibiotiques couramment utilisés en clinique afin d'éviter le risque de transfert du gène de résistance aux bactéries du patient et compromettre un éventuel traitement (European Medicines Agency, 2015; Food and Drug Administration, 1998).

Actuellement, le gène de résistance à la kanamycine/néomycine (codant la néomycine phosphotransférase II) est le marqueur de sélection le plus couramment utilisé. Du fait de la rare utilisation de la kanamycine en clinique, ce gène de sélection est l'un des seuls tolérés par les autorités réglementaires. Le risque de transfert horizontal reste cependant présent.

L'exclusion de tout gène de résistance à un antibiotique permettant d'augmenter significativement le profil de sûreté des plasmides est donc une nécessité.

II.4.2 Bénéfices liés à l'exclusion des gènes de résistance à un antibiotique

En plus d'augmenter la biosécurité, l'exclusion de gène de résistance à un antibiotique permettrait de :

- (i) Diminuer la taille du plasmide : comme énoncé dans les sections précédentes, une diminution de la taille du plasmide et notamment du squelette plasmidique permet de favoriser le maintien de l'intégrité du plasmide, d'augmenter l'efficacité de transfection des cellules cibles, de diminuer les risques d'immunogénicité liée aux motifs CpG et de limiter l'extinction de l'expression du transgène.
- (ii) D'alléger la charge imposée à la bactérie lors de la production du plasmide : Cette charge causée par la réplication du plasmide et la consommation de métabolites précurseurs se manifeste par une inhibition de la croissance de la biomasse, une instabilité structurelle du plasmide produit et une ségrégation instable. La cause majeure du fardeau imposée à la bactérie reste cependant l'expression constitutive du gène de résistance à l'antibiotique. La protéine issue de l'expression représenterait 20% des protéines cellulaires et mobilise donc considérablement la machinerie cellulaire (Mairhofer et al. 2010; Rozkov et al. 2004).

Afin de répondre aux objectifs combinés d'une amélioration de la biosécurité, d'une augmentation de l'efficacité du produit final et d'un meilleur rendement de production, une nouvelle génération de plasmides dépourvus de gène de résistance à un antibiotique ainsi de souches bactériennes permettant leur production ont vu le jour.

II.4.3 Vecteurs dépourvus de gène de résistance à un antibiotique

Il existe actuellement trois types principaux de vecteurs dépourvus de gène de résistance à un antibiotique : (i) les molécules d'ADN double brin linéarisé, (ii) les minicercles et (iii) les miniplasmides biosécurisés.

II.4.3.1 Les ADN double-brin linéarisés

Les ADN double-brin linéarisés, principalement représentés par les vecteurs MIDGE (Minimalistic Immunogenic Defined Gene Expression) et les ADN Ministrings, sont générés *in vitro* en éliminant par digestion par des endonucléases ou par l'action d'une recombinase, respectivement, le plasmide parental après sa production par des bactéries. Ils ne contiennent que la séquence nécessaire à l'expression du gène d'intérêt (la cassette d'expression) et présente donc l'avantage d'être dépourvus de séquence d'origine procaryote. Les vecteurs MIDGE ont été utilisés avec succès comme vaccins chez le petit animal, notamment le vaccin LEISHDNAVAX dirigé contre les parasites responsables de la Leishmaniose (López-Fuertes et al. 2002; Riede et al. 2015) et comme vecteur de gène thérapeutique *in vivo* et *in vitro* (Schakowski et al. 2001). Les vecteurs à ADN Ministrings, en plus de générer un niveau d'expression du transgène plus élevé

(jusqu'à deux fois plus élevé que celui observé avec le plasmide parental), préserveraient du risque de développement de cellules malignes en conduisant à une cassure du génome en cas d'intégration aléatoire et à une élimination des cellules modifiées (Nafissi et al. 2014).

Les vecteurs linéarisés seraient cependant plus sensibles aux contraintes et forces de cisaillement pouvant être induites par les procédures d'administration, ce qui peut limiter leur utilisation *in vivo* (Catanese et al. 2012).

II.4.3.2 Les minicercles

Les minicercles sont également dépourvus de séquences procaryotes et sont constitués d'une cassette d'expression double-brin circulaire surenroulée (Rischmüller et al. 2013). Ils sont générés chez *E. coli* par recombinaison entre deux sites reconnus par une recombinase, situés de part et d'autre de la cassette d'expression. L'évènement de recombinaison génère le minicercle ainsi qu'un miniplasmide contenant l'ADN plasmidique indésirable (gène de sélection et origine de réplication)(Figure 17). Le plasmide parental est construit en introduisant deux sites de reconnaissance par une recombinase. Il est ensuite introduit et produit par une souche d'*E. coli* capable d'exprimer la recombinase. Le gène codant la recombinase peut également être porté par le plasmide parental. Après production du plasmide, l'expression de la recombinase est induite conduisant à la production *in vivo* de minicercles et de miniplasmides. La purification des minicercles du mélange de produits de recombinaison peut être réalisée suivant différentes méthodes dont l'une des plus efficaces consiste en une chromatographie d'affinité : les miniplasmides contiennent une séquence d'identification permettant leur liaison à des protéines fixées à la matrice solide de la colonne de chromatographie (Mayrhofer et al. 2008). Une autre méthode développée par Chen et al, consiste en la dégradation du miniplasmide et du plasmide encore intacte par la co-expression d'une endonucléase (Chen, He & M. a Kay 2005).

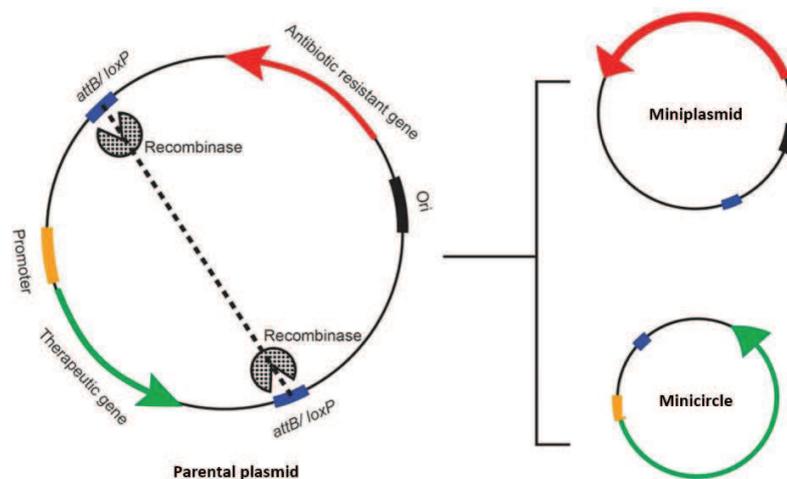


Figure 17: Représentation schématique de la production de minicercles.

Le plasmide parental est construit en introduisant deux sites de reconnaissance d'enzyme recombinase de part et d'autre de la cassette d'expression. Il est ensuite introduit dans une souche d'*E. coli* capable d'exprimer la recombinase. L'induction de la recombinaison conduit à la production d'un miniplasmide et d'un minicercle qui sera ensuite purifié par chromatographie d'affinité. D'après (Nafissi & Foldvari 2015)

Plusieurs intégrases réalisant la recombinaison ont été utilisées jusqu'à présent pour la production des minicercles (Gaspar et al. 2015; Grund & Schleef 2013) : l'intégrase du bactériophage λ (Int) qui reconnaît les séquences *attP/attB* encadrant la cassette d'expression ; la recombinase Cre du bactériophage P1 qui se lie à deux sites *loxP* qui ont été optimisés pour la production des minicercles, la recombinase ParA, et enfin, l'intégrase Φ C31-Int du bactériophage Φ C31 de *Streptomyces*.

Malgré de nombreuses optimisations, la production de minicercles est un processus laborieux encore peu reproductible à échelle industrielle. L'étape de purification, est également un point limitant nécessitant d'être optimisée afin d'éviter la contamination du produit final par le plasmide parental ou le miniplasmide. Le coût des colonnes de chromatographie utilisées pour cette étape est de plus non négligeable.

De nombreux groupes ont à ce jour produit des minicercles pour le transfert d'une grande variété de transgènes *in vitro* et *in vivo*. Chen et al ont ainsi produit des minicercles contenant le gène α 1-antitrypsine humaine (hAAT) ou le gène codant pour le facteur FIX, placés sous le contrôle de différents promoteurs. L'administration de ces minicercles par injection hydrodynamique à des foies de souris a conduit à une expression 200 à 560 fois plus importante que celle obtenue avec une quantité équimolaire de plasmide parental. Alors qu'une chute rapide d'expression était observée avec le plasmide, le niveau d'expression à partir des minicercles s'est maintenu sur plusieurs mois (Chen et al. 2003).

Le transfert par électrotransfert de minicercles exprimant GFP aux muscles de la souris a également conduit à une expression efficace de la protéine fluorescente, à un niveau 2 à 5 fois plus élevé que celui obtenu avec le plasmide parental (Chabot et al. 2013).

De par leur taille, les minicercles peuvent transfecter avec une grande efficacité plusieurs types cellulaires. Les minicercles ont notamment été utilisés pour la génération de cellules souches pluripotentes (iPSC) avec une efficacité supérieure à celle obtenue avec les plasmides (Jia et al. 2010).

Etant également moins propices au phénomène d'extinction d'expression (décrit dans le chapitre II.3), ils permettent de conduire à une expression élevée et sur le long terme de différents transgènes *in vivo* et *in vitro*. Ils constituent donc des outils prometteurs pour le transfert de gène non viral malgré les améliorations à apporter à leurs systèmes de production.

II.4.3.3 Les miniplasmides biosécurisés

Afin de produire des plasmides biosécurisés sans avoir recours à des antibiotiques, différentes stratégies ont été proposées et développées par différents groupes. Toutes sont basées sur le même principe : la croissance de la souche bactérienne est conditionnée par la présence du plasmide à

produire. Ces stratégies, décrites dans cette section, impliquent donc une double optimisation de la souche et du plasmide qui doit conférer un avantage sélectif à la souche modifiée.

II.4.3.3.1 Complémentation d'une souche auxotrophe

L'auxotrophie est l'inhabilité d'un organisme à synthétiser un composé organique nécessaire à sa croissance. Cette première stratégie est basée sur l'introduction d'une mutation dans un gène essentiel d'*E. coli* résultant en une auxotrophie qui pourra être contournée par ajout d'un complément dans le milieu de croissance ou par complémentation génétique (Figure 18).

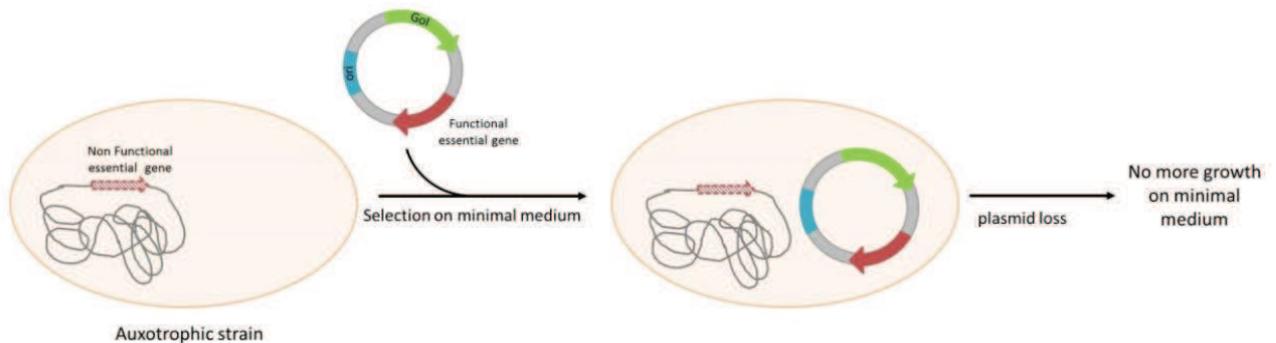


Figure 18: Sélection et maintenance d'un plasmide par complémentation d'auxotrophie.

L'auxotrophie est générée par mutation dans un gène essentiel de la bactérie hôte. Elle est complétement par l'expression du gène fonctionnel à partir du plasmide introduit (GOI : gène d'intérêt) (Mignon et al. 2015).

Plusieurs gènes ont été ciblés pour cette approche. Vidal et al ont ainsi construit une souche auxotrophe à la glycine en introduisant une mutation dans le gène *glyA* codant pour la sérine hydroxyméthyl transférase (Vidal et al. 2008). La complémentation par un plasmide contenant une copie fonctionnelle du gène muté permet de restaurer la croissance bactérienne. Cette même stratégie a également été employée en ciblant le gène *de la QAPRTase*, une enzyme responsable de la synthèse du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) (Dong et al. 2010) ou le gène *infA* conduisant à une auxotrophie pour le facteur 1 de l'initiation de la traduction (Hägg et al. 2004). Cette méthode de sélection, utilisant un gène complétement une auxotrophie à la place d'un gène de résistance à un antibiotique augmente la biosécurité tout en maintenant des taux de production efficace. Cependant, elle ne permet pas de diminuer la taille du plasmide de façon avantageuse.

II.4.3.3.2 Systèmes toxine/antitoxine

Ce système est composé de deux éléments : une protéine biologiquement active et constituant un poison pour la bactérie d'une part, et de l'inhibiteur correspondant (antidote) d'autre part. Un exemple de ce système est basé sur l'utilisation du gène poison *ccd* dont le produit bloque l'ADN gyrase (Szpirer & Milinkovitch 2005). Le gène poison *ccd* est introduit dans le génome d'*E. coli* en aval du promoteur *ccd*. Le gène *ccdA*, codant pour l'antidote, est cloné dans le plasmide. Lorsque le plasmide est perdu, l'antidote est dégradé et la production de la toxine est activée

causant la mort cellulaire (Figure 19B). Des plasmides reposant sur cette stratégie sont notamment commercialisés par la société Delphi Genetic sous le nom de Staby® et ont été utilisés avec succès chez la souris, comme vaccin à ADN dirigé contre le virus Aujeszky (Reschner et al. 2013). Cette approche peut également être réalisée en ne modifiant pas le génome d'*E. coli* et en clonant les deux gènes poison et antidote sur un même plasmide. Le poison utilisé doit alors avoir une durée de vie plus longue que son antidote (Figure 19A). Si le plasmide est perdu, la production des deux composants s'arrête mais la toxine demeurant plus longtemps dans le milieu conduit à la mort cellulaire (Vandermeulen et al. 2011).

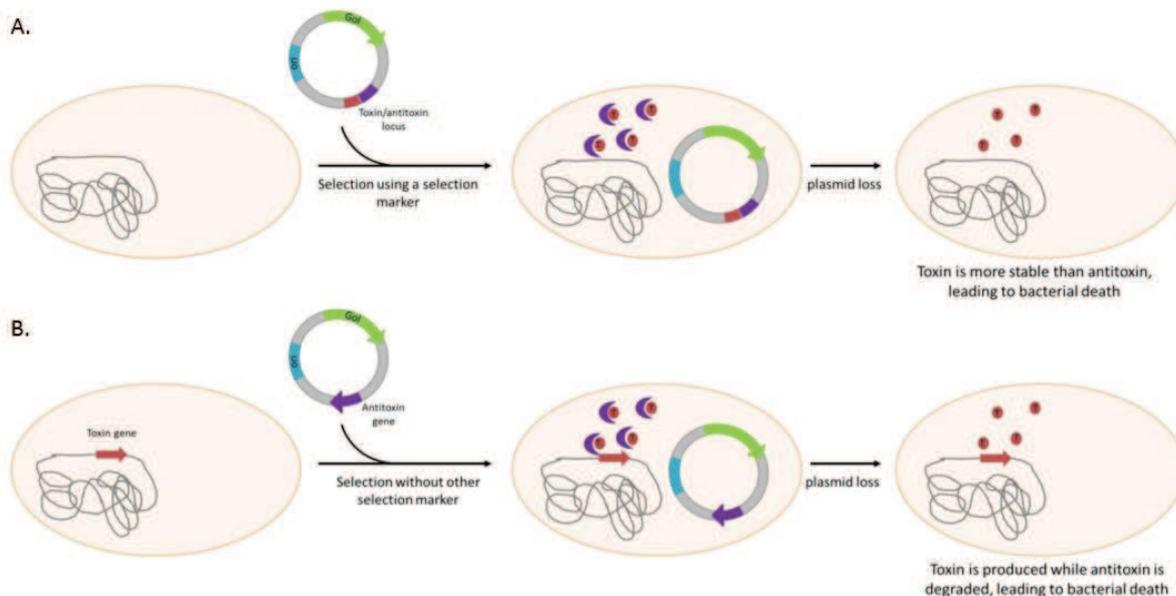


Figure 19: Système Toxine/Antitoxine.

A. Les deux composants toxine et antidote sont exprimés à partir du plasmide. La durée de vie de la toxine étant plus longue que l'antidote, le plasmide doit être maintenu pour permettre la croissance bactérienne. La première étape, cependant, nécessite l'utilisation d'un marqueur de sélection permettant l'identification des transformants. B. Le gène codant pour la toxine est intégré dans le génome. La bactérie ne peut pousser qu'en présence du plasmide codant pour l'antitoxine (Mignon et al. 2015)

Les avantages principaux de cette stratégie reposent sur la petite taille des gènes poison/antidote, sur l'efficacité de sélection du poison et sur l'indépendance par rapport au milieu dont la composition n'impacte pas la sélection.

II.4.3.3.3 Système ORT (Operator-Repressor Titration) :

Le système pORT utilise une souche d'*E. coli* contenant une copie modifiée du gène *dapD* dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur-opérateur *lacO/P* auquel se lie le répresseur LacI (Williams et al. 1998). En absence d'inducteur tel que IPTG, l'expression de *dapD* est inhibée, empêchant la synthèse de la paroi cellulaire et donc la croissance bactérienne. L'introduction de plusieurs copies de plasmides contenant plusieurs copies de l'opérateur *lac*, titre le répresseur, permettant ainsi l'expression du gène *dapD* et la restauration de la croissance bactérienne (Figure 20).

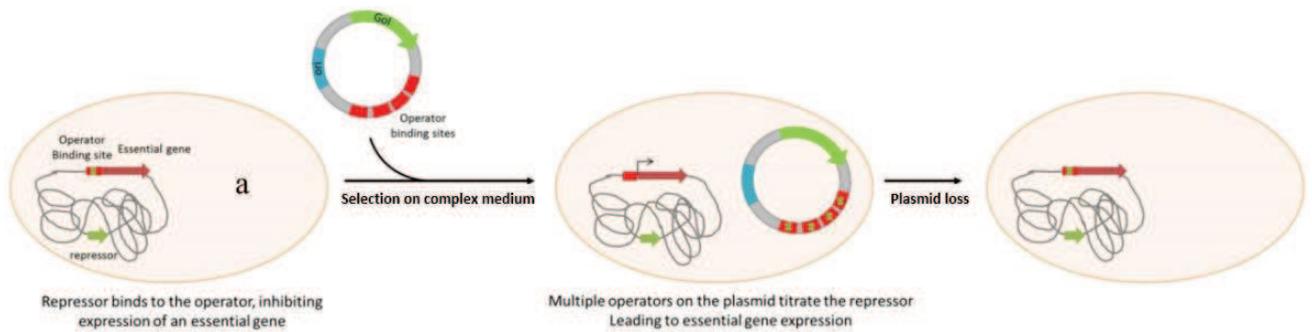


Figure 20: Système de sélection pORT.

Plusieurs séquences opérateur sont clonées dans un plasmide présent en plusieurs copies dans la bactérie, conduisant à un large excès de séquences opérateur en comparaison à la séquence opérateur introduite devant un gène essentiel du chromosome bactérien, le gène *dapD*. Le dosage du répresseur par les plasmides permet l'expression du gène essentiel. En cas de perte du plasmide, l'expression du gène *dapD* est réprimée, empêchant la synthèse de la paroi cellulaire et la croissance bactérienne (Mignon et al. 2015).

Comme le système de sélection précédent, le système pORT a pour avantage le clonage de séquences de petite taille et la possibilité d'utiliser tout type de milieu (Cranenburgh et al. 2001).

Le plasmide pORT a été utilisé dans un essai clinique de vaccination contre le HIV (Guimarães-Walker et al. 2008) et constitue le vecteur de la technologie AMEP™ employée dans le cadre d'un essai clinique pour le traitement du mélanome (Spanggaard et al. 2013).

II.4.3.3.4 Systèmes basés sur l'interaction ARN/ARN:

Ce système est basé sur une interaction ARN/ARN, où la souche d'*E. coli* contient un ARN-IN-*sacB* intégré dans son chromosome et le plasmide code un ARN-OUT anti-sens régulateur. L'ARN-IN-*sacB* agit comme un marqueur de sélection puisque les cellules contenant *sacB* (codant pour la levansucrase) sont tuées en présence de sucrose (Luke et al. 2009). En présence de plasmide, l'ARN-OUT s'hybride à l'ARN-IN réprimant ainsi l'expression de *sacB* et permettant la croissance bactérienne dans le milieu riche en sucrose (Figure 21A). Des plasmides reposant sur ce système de sélection sont commercialisés par la société Nature Technology Corporation (Nanoplasmids™ NTC). Plusieurs des dérivés de ces plasmides sont actuellement employés dans le cadre d'essais cliniques (Voir plus loin : Tableau 6).

Un approche similaire a été développée en utilisant le mécanisme de réplication des plasmides de type ColE1 (Mairhofer et al. 2010). L'origine de réplication de ces plasmides code 2 ARN anti-sens RNAI et RNAII qui régulent le nombre de copies du plasmide. Dans cette seconde approche ARN/ARN, un gène répresseur fusionné à la séquence codant RNAII est introduit dans la région 5' d'un gène essentiel d'*E. coli*. En présence d'un plasmide ColE1, l'ARN anti-sens RNAI codé par l'origine de réplication s'hybride à la séquence RNAII, inhibant la répression de l'expression du gène essentiel (Figure 21B).

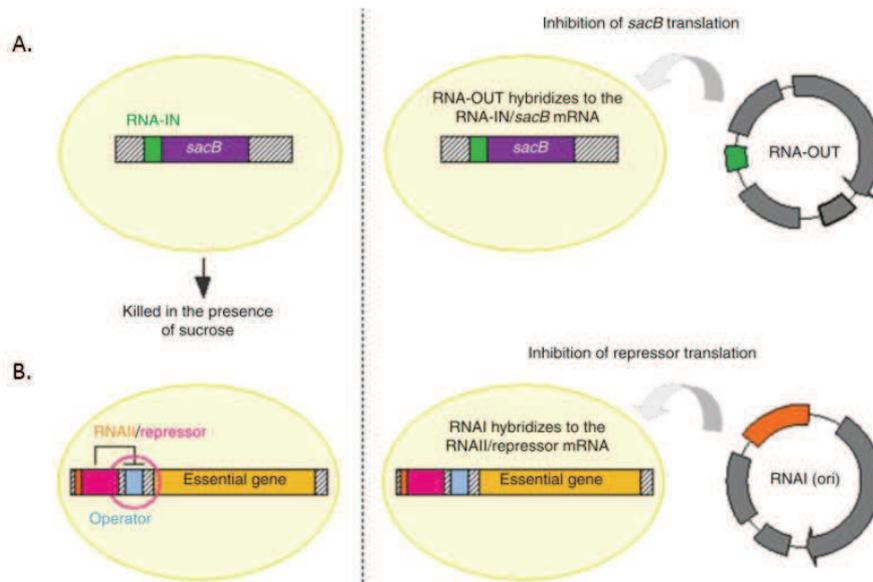


Figure 21: Systèmes de sélection basés sur l'interaction ARN/ARN.

A. Le gène *sacB* fusionné à une séquence ARN-IN est inséré dans le génome d'*E. coli* rendant la souche sensible au sucrose. L'ARN-OUT codé par le plasmide, se lie à l'ARN-IN, inhibant l'expression du gène *sacB* et restaurant la croissance bactérienne en présence de sucrose. B. Un gène essentiel est placé sous le contrôle d'un répresseur fusionné à une séquence RNAII. Le RNAI codé par l'origine de réplication du plasmide se lie à son ARN homologue et inhibe la transcription du répresseur, restaurant la croissance bactérienne (Vandermeulen et al. 2011)

II.4.3.3.5 Suppression d'une mutation non-sens :

Ce système est basé sur la suppression d'une mutation non-sens ambré introduite dans un gène essentiel du chromosome bactérien. Cette mutation conduit à une traduction incomplète d'une protéine impliquée dans le métabolisme de la bactérie, empêchant la croissance bactérienne. La synthèse de la protéine non tronquée et fonctionnelle est permise par l'introduction d'un plasmide codant un ARNt suppresseur de la mutation. Cet ARNt contient un anticodon modifié permettant l'insertion d'un acide aminé en réponse au codon stop (Figure 22).

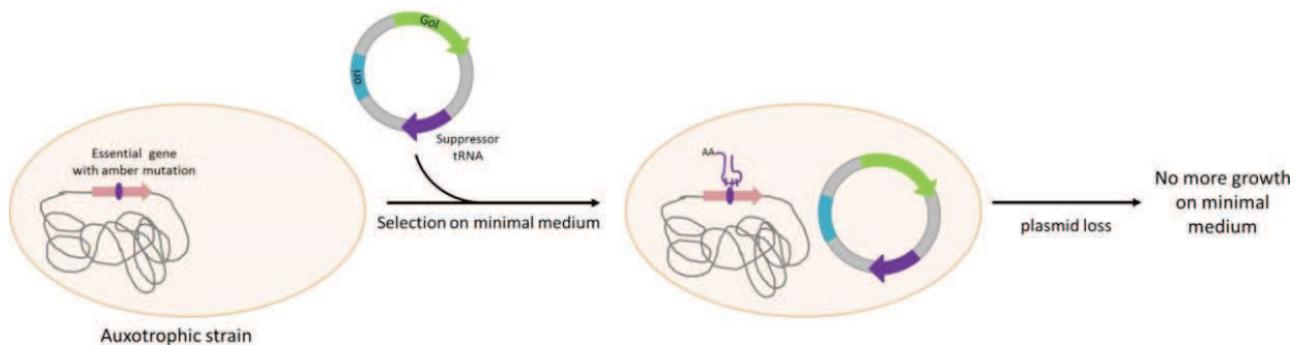


Figure 22: Sélection et maintien d'un plasmide par suppression d'une mutation non-sens.

L'auxotrophie de la bactérie est induite par introduction d'une mutation non-sens ambré dans un gène essentiel conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée. Cette auxotrophie est supprimée par l'expression à partir du plasmide d'un ARNt suppresseur contenant un anticodon modifié permettant l'incorporation d'un acide aminé en réponse au codon stop et conduisant ainsi à la synthèse de la protéine fonctionnelle (Mignon et al. 2015).

Il existe trois types de mutations non-sens : UAG (ambre), UGA (opale) et UAA (ocre). Pour cette stratégie la mutation ambre est introduite car ce type de mutation peut être facilement supprimé (Kleina et al. 1990). De plus, UAG représente 7,6% des codons stop, contre 63% pour UAA et 29,4% pour UGA (Blattner et al. 1997). Le risque de perturbation du métabolisme de l'hôte par l'insertion d'un acide aminé en réponse à un codon stop de type UAG est donc limité.

Les systèmes de sélection pFAR et pCOR sont deux exemples illustrant cette stratégie.

Le système de sélection des plasmides pCOR est basé sur la suppression d'une auxotrophie à l'arginine causée par l'introduction d'une mutation ambre dans le gène *argE* (codant pour la acétylornithine désacétylase)(Soubrier et al. 1999). Le gène codant pour l'ARNt étant de petite taille (environ 100 pb), cette stratégie conduit à une diminution significative de la taille de plasmide, en comparaison aux plasmides conventionnels. De plus, le système pCOR contient une origine de réplication conditionnelle dérivée d'un plasmide naturel R6K. Elle nécessite que la bactérie hôte exprime la protéine initiatrice π codée par le gène *pir* stablement intégré dans son génome. Cette stratégie diminue significativement le risque de dissémination du plasmide à d'autres bactéries de l'environnement. Les plasmides pCOR peuvent être produits avec de bons rendements et sont déjà utilisés en clinique (Nikol et al. 2008). Leur production présente cependant l'inconvénient de nécessiter l'utilisation d'un milieu dépourvu d'arginine.

Le système de sélection pFAR, utilisé dans le cadre de cette étude, sera décrit dans la section suivante.

Les tableaux ci-dessous résument les caractéristiques des stratégies présentées (Tableau 5) et présentent les vecteurs dépourvus de gène de résistance à un antibiotique ayant été employés dans le cadre d'essais cliniques (Tableau 6).

Stratégie	Modification de la souche bactérienne	Gène de sélection et modification du plasmide	Avantages (+) / Inconvénients (-)
Minicercles	La souche peut être modifiée pour améliorer la production	Gène de résistance à un antibiotique dans le plasmide producteur parental Sites de reconnaissance d'une recombinase	(+) Taille réduite du vecteur et absence de séquences d'origine bactérienne, souche non modifiée (-) Production laborieuse et coûteuse
MIDGE Ministring	Ministring : Souche recombinante optimisée (R-cells)	Gène de résistance à un antibiotique dans le plasmide producteur parental Sites de reconnaissance d'endonucléases ou de recombinases	(+) Taille réduite du vecteur et absence de séquences d'origine bactérienne, souche non modifiée (MIDGE) (-) Production laborieuse et coûteuse, vecteurs sensibles aux contraintes physiques
Auxotrophie	Introduction d'une mutation dans un gène codant une protéine essentielle	Gène codant la protéine essentielle	(-) Taille du plasmide importante, choix du milieu (minimum)
		ARNt suppresseur de la mutation	(+) Taille réduite du vecteur (-) Choix du milieu (minimum)
Toxine/ Antitoxine	/	Gène codant une toxine Second gène codant l'antitoxine, dont la durée de vie est plus courte que celle de la toxine	(+) Taille réduite du vecteur, indépendance par rapport au milieu, souche non modifiée (-) Sélection nécessitant un autre marqueur de sélection
	Insertion d'un gène codant une toxine	Gène codant l'antitoxine	(+) Taille réduite du vecteur, indépendance par rapport au milieu
ORT Operator- Repressor Titration	<i>lacdapD</i> : insertion du gène <i>dapD</i> sous le contrôle du promoteur <i>lac</i> et insertion du gène codant le répresseur LacI	Plasmide contenant plusieurs copies de l'opérateur lactose (<i>lacO</i>) permettant le titrage du répresseur	(+) Taille réduite du vecteur (-) Milieu sans lactose, faible rendement en fermenteur
ARN/ARN	Introduction du gène <i>sacB</i> fusionné à une séquence ARN-IN	Plasmide codant un ARN anti-sens (ARN-OUT) s'hybridant avec l'ARN-IN et inhibant l'expression de <i>sacB</i>	(+) Taille réduite du vecteur, bon rendement de production en fermenteur
	Introduction d'un gène répresseur fusionné à une séquence ARN-IN (ARNII) en amont d'un gène essentiel	Plasmide contenant une <i>ori</i> de type ColEI exprimant un ARN-OUT (ARNI) s'hybridant à ARN-IN	(+) Absence de séquences d'origine bactérienne à l'exception de l' <i>ori</i> ColEI. (-) Application limitée aux plasmides de type ColEI

Tableau 5: Résumé des stratégies de propagation de plasmides sans recours à des antibiotiques.

Stratégie	Vecteur (Nom plasmide)	Maladie	Produit d'expression du transgène	Méthode de transfert	Sponsor	Phase – Ref.
MIDGE Ministring	MIDGE	Cancer colorectal métastatique	2 cytokines : IL-7 (Interleukine 7) et GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)	Transfection <i>ex vivo</i> des cellules tumorales par transfert « ballistomagnétique »	Mologen AG	Phase I/II (Wittig et al. 2001)
Auxotrophie	pCOR (NV1FGF)	Artériopathie oblitérante des membres inférieurs	FGF (Fibroblast Growth Factor 1)	Injection intramusculaire	Sanofi	Phase II NCT00368797, NCT00566657 (Van Belle et al. 2011; Nikol et al. 2008)
ORT	pORT (AMEP)	Mélanome cutané	Peptide metargidin anti-angiogénique	Electroporation intratumorale	Copenhagen University Hospital	Phase I NCT01664273 (Spanggaard et al. 2013)
ARN/ARN	Nanoplasmids™ NTC (CryJ2-DNA-LAMP)	Allergie au cèdre rouge japonais (JRC)	Protéine allergène CryJ2	Injection intramusculaire ou intradermique	Immunomic Therapeutics, Inc.	Phase I NTC01707069, NTC02146781, NTC1966224 (Weiner et al. 2013)
	Nanoplasmids™ NTC	Infection virale par HSV-2 (Herpes simplex Virus type 2)	Fragment protéique gD de HSV-2	Injection intramusculaire	Admedus Vaccines	Phase II (Dutton et al. 2013)
	Nanoplasmids™ NTC	Infection virale par Adenovirus (Adv), cytomegalovirus (CMV) et Epstein-Barr virus (EBV)	Fragment protéique des différents virus	Nucléofection de cellules dendritiques utilisées pour activer des lymphocytes T	Baylor College of Medicine	Phase I/II NCT01070797 (Gerdemann et al. 2013)

Tableau 6 : Liste des vecteurs biosécurisés employés dans le cadre d'essais cliniques de thérapie génique ou de vaccination génétique.

II.5 LES MINIPLASMIDES BIOSECURISES PFAR

II.5.1 Description de la technologie pFAR

L'équipe d'accueil de cette thèse a récemment développé un nouveau système de sélection dépourvu de gène de résistance à un antibiotique nommé pFAR (Free of Antibiotic Resistance marker)(Marie et al. 2010). Comme pour le pCOR, ce système consiste en l'introduction d'une mutation non-sens ambre dans un gène essentiel d'*E. coli* et en sa suppression par introduction d'un plasmide codant un ARNt supprimeur.

II.5.1.1 Introduction de la mutation dans le gène *thyA* de MG1655

La mutation ambre a été introduite chez la souche MG1655 d'*E. coli* K-12. Contrairement à la majorité des souches de laboratoires, cette dernière ne contient pas d'ARNt supprimeur (Blattner et al. 1997), ce qui a orienté son choix. De plus, la séquence du génome de cette souche est entièrement connue, facilitant ainsi sa caractérisation et son entrée sur les sites de production « BPF » (Bonne Pratique de Fabrication).

La mutation ambre a été introduite dans le gène *thyA* de MG1655 qui code pour la thymidylate synthase, une enzyme nécessaire à la synthèse de thymidine monophosphate (dTMP) à partir de déoxyuridine monophosphate (dUMP). Cette mutation inhibe la synthèse d'ADN et génère une auxotrophie à la thymidine. Cette auxotrophie peut être contournée par l'addition de thymidine dans le milieu de culture. La thymidine exogène pénètre dans la bactérie via un transporteur et est convertie en dTMP par la thymidine kinase.

Le codon CAT codant pour l'histidine 147 a été choisi pour être substitué par le codon UAG (Figure 23B) car ce résidu histidine est situé dans le site de liaison au substrat de l'enzyme ThyA. De plus le codon CAT est suivi d'une guanosine, créant un environnement favorable pour une suppression efficace (Kleina et al. 1990). Ce choix a également été conforté par le fait que les ARNt supprimeurs Histidine sont efficaces pour la suppression d'une mutation ambre, puisque, contrairement à d'autres supprimeurs, ils incorporent avec une efficacité de 100 % le résidu attendu (Kleina et al. 1990).

II.5.1.2 Construction du plasmide pFAR

Le marqueur de sélection utilisé est un gène de 212 paires de bases codant pour un ARNt supprimeur histidine optimisé. Son expression est placée sous le contrôle d'éléments procaryotes, afin d'éliminer le risque d'expression dans les cellules transfectées eucaryotes.

Afin d'obtenir un plasmide qui soit le plus petit possible, un nouveau vecteur, nommé pFAR4, dont la taille est de 1,1 kb, a été entièrement synthétisé *de novo*. Il contient une origine de répllication de type pUC, le gène de sélection codant un ARNt supprimeur His et une séquence de clonage multiple (MCS) : le pFAR4 (Figure 23A).

L'introduction du plasmide pFAR4 dans la souche mutante *thyA* permet de restaurer la croissance bactérienne en milieu sélectif (dépourvu de thymidine) (Figure 23B).

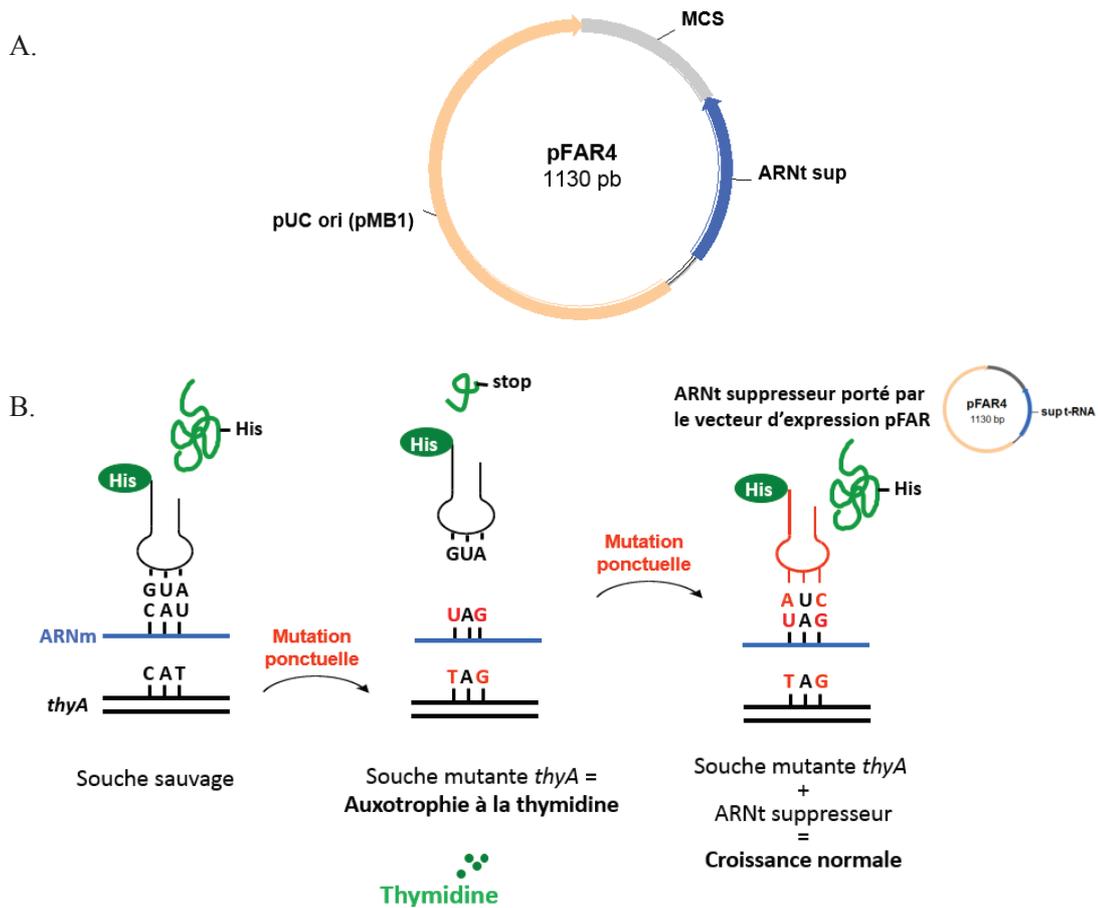


Figure 23: Description du système pFAR.

A. Carte du vecteur d'expression pFAR4 : Il contient une origine de réplication de type pUC, un marqueur de sélection codant pour un ARNt suppresseur Histidine et un site de clonage multiple (MCS). B. Stratégie de production des pFAR : Une mutation non-sens TAG est introduite dans le gène *thyA* rendant la souche auxotrophe pour la thymidine. La souche mutante est isolée en présence de thymidine dans le milieu de culture qui pénètre dans les cellules. En milieu sélectif, seules les bactéries contenant le plasmide pFAR4 codant un ARNt suppresseur capable d'insérer un acide aminé histidine en réponse au codon UAG peuvent pousser (Marie et al. 2010).

II.5.1.3 Optimisation de la souche bactérienne: le tripe-mutant TM#47-9a

Afin d'atteindre des conditions de production optimales, la souche mutante *thyA* issue de MG1655 a subi d'autres étapes d'optimisation.

La qualité de l'ADN produit par une souche bactérienne peut être améliorée en empêchant l'expression du gène *endA* codant pour l'endonucléase 1. Il a en effet été montré que la qualité de l'ADN produit par les souches *endA*⁺ était moins bonne que celle des souches *endA*⁻ et se dégradait après stockage sur de longues périodes (Schoenfeld et al. 1995). Afin d'éviter cela, la quasi-totalité du gène *endA* a été délétée du chromosome du mutant *thyA*, conduisant à un double mutant *thyA endA*.

Comme il l'a été souligné au début de chapitre II, l'un des paramètres clés pour une production stable de plasmide est l'obtention de plasmide sous forme monomère. La multimérisation, due à des recombinaisons intermoléculaires, influence le nombre de copies de plasmides par cellule et peut conduire à une perte du plasmide par les bactéries. Un ratio multimères/monomères trop élevé conduit notamment à des inconsistances entre différents lots d'un même plasmide et n'est donc pas toléré par les autorités réglementaires. Afin d'éviter la formation de multimères, le gène *recA* codant pour une recombinaise a été délété du chromosome du double mutant *thyA endA*, conduisant à la production d'une souche triple mutante *thyA endA recA* nommée TM#47-9a (TM: Triple Mutant)(Figure 24).

La souche TM#47-9a conduit à de bons rendements de production du pFAR4 sous forme monomérique surenroulée.

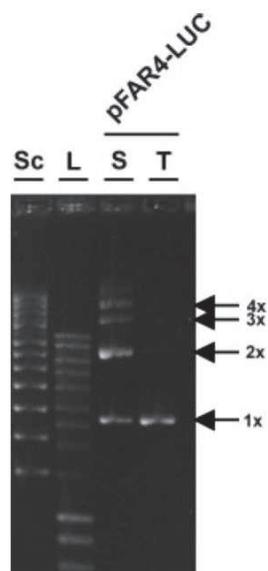


Figure 24 : Visualisation du plasmide pFAR4-LUC (3.7 kb) sur un gel d'agarose 1%.

Le plasmide produit par la souche contenant la seule mutation *thyA* (S) forme des multimères (1x: mono, 2x: di ...) tandis que le plasmide préparé partir de la souche triple mutante TM#47-9a est majoritairement présent sous forme de monomères (1x). Les premiers puits contiennent les marqueurs de taille : Sc: Supercoiled DNA ladder (Invitrogen) dont les bandes correspondent à des molécules d'ADN surenroulé de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14 et 16 kb) et L : Smart Ladder (Eurogentec) dont les bandes correspondent à des fragments d'ADN linéarisé de 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 kb)(Marie et al. 2010).

II.5.2 Efficacité des vecteurs pFAR pour le transfert gène *in vitro* et *in vivo*

Afin de valider l'efficacité du pFAR4 comme vecteur de gènes *in vitro* et *in vivo*, le gène rapporteur codant pour l'enzyme Firefly Luciférase a été cloné dans le plasmide sous le contrôle du promoteur CMV et d'un signal de polyadénylation BGH (Bovine Growth Hormone) conduisant à la construction du plasmide pFAR4-CMV-LUC-BGH également désigné par pFAR4-LUC.

II.5.2.1 Efficacité de transfection *in vitro* :

Le potentiel du vecteur pFAR4-LUC (3751 pb) a d'abord été validé *in vitro* après transfection de cellules murines B16. L'activité luciférase mesurée dans les cellules transfectées avec le dérivé pFAR4 était significativement plus élevée qu'avec les cellules transfectées avec une quantité équimolaire de pVAX2-LUC (4626 pb), contenant la même cassette d'expression et considéré comme un « plasmide contrôle » car porteur d'un gène de résistance à la Kanamycine (Figure 25).

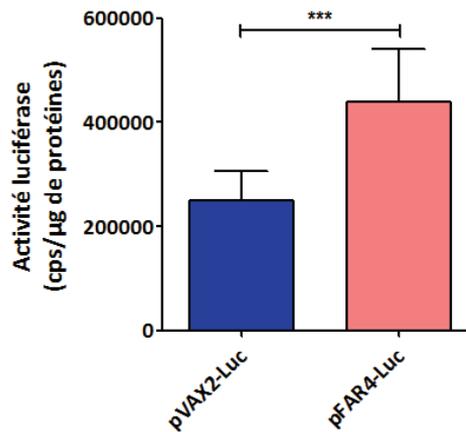


Figure 25 : Efficacité de transfection du pFAR4-LUC *in vitro*.

Des cellules B16 ont été transfectées avec le plasmide pVAX2-LUC et une quantité équimolaire de plasmide pFAR4-LUC. La quantité d'ADN totale a été ajustée avec le vecteur pFAR4 dépourvu de cassette d'expression. Le niveau de luminescence a été mesuré deux jours après transfection. Les cellules transfectées avec le dérivé pFAR4 expriment un niveau de fluorescence significativement plus élevé que les cellules transfectées avec le dérivé pVAX2 (test statistique de Mann-Whitney, ***P-value < 0,0001).

II.5.2.2 Efficacité de transfection *in vivo* :

Afin de tester l'efficacité du pFAR4-LUC *in vivo*, des quantités équimolaires de ce plasmide et du pVAX2-LUC furent administrées à différents tissus de la souris par électrotransfert (Marie et al. 2010). L'efficacité de transfert et d'expression du gène de la luciférase fut vérifiée après injection de luciférine et suivi de la bioluminescence grâce à une caméra CCD (charged-coupled device)(Figure 26).

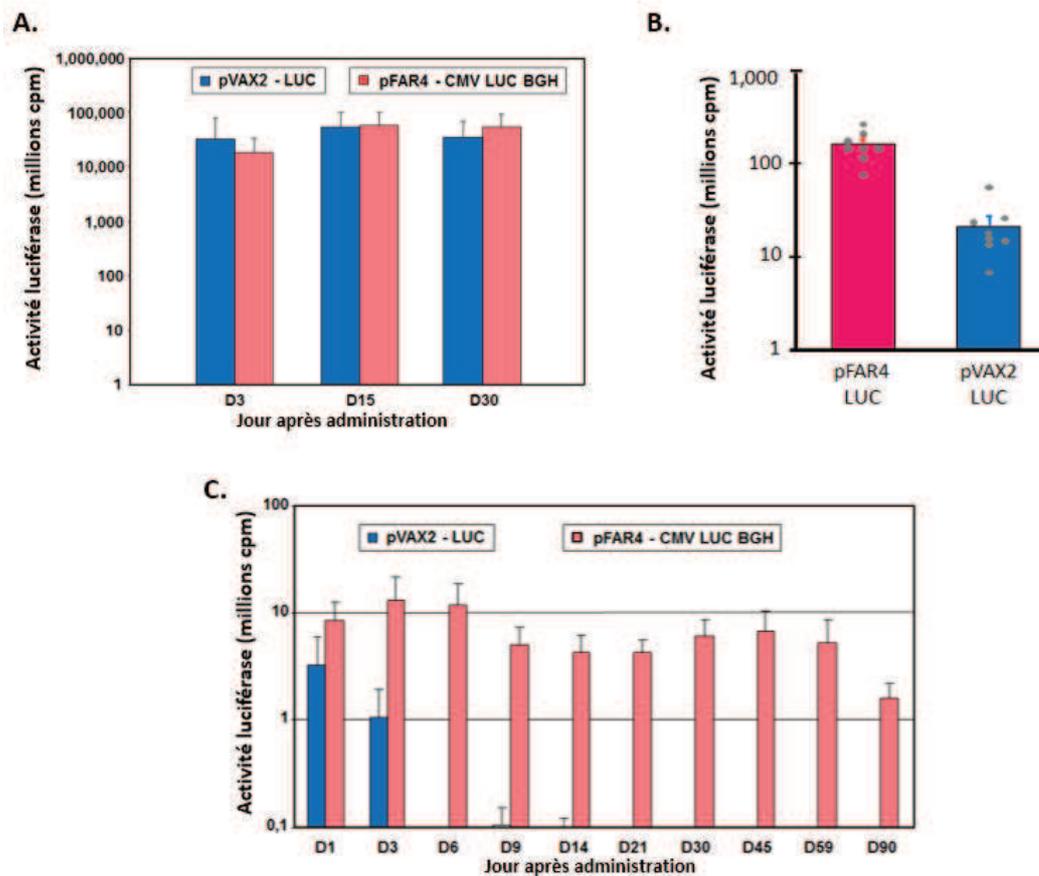


Figure 26 : Le plasmide pFAR4 conduit à une expression élevée et prolongée de la luciférase après administration par électrotransfert dans différents tissus. L'activité luciférase a été mesurée deux jours après administration des plasmides pVAX2-LUC et pFAR4-LUC dans : A) Le muscle tibial (n=7). B) Les cellules tumorales B16F10 implantées dans le flanc des souris (n=8). C) La peau, n=7 et n=8, respectivement.

Un haut niveau d'expression de la luciférase a été observé dans les différents tissus après administration du pFAR4-LUC. Dans des cellules tumorales B16F10 implantées dans le flanc de la souris, un niveau d'expression 10 fois plus élevé a été obtenu après électrotransfert du pFAR4-LUC en comparaison avec le plasmide contrôle. Dans la peau, l'expression chute en quelques jours après transfection avec le plasmide contrôle tandis que l'expression est maintenue plusieurs mois après administration du plasmide dérivé de pFAR4.

Ces résultats ont démontré l'efficacité du plasmide pFAR4 comme vecteur de gène *in vivo*. Son utilisation dans deux approches de thérapie génique constitue le cadre de cette thèse dont le contexte et les objectifs seront présentés dans la section IV de l'introduction.

L'une de ces approches a pour contexte un projet d'essai clinique pour lequel le plasmide pFAR4 devra être produit dans le respect des normes imposées pour une application clinique.

Une courte introduction au processus de production industrielle des vecteurs plasmidiques est donc présentée dans la section suivante.

II.6 PRODUCTION DE VECTEURS PLASMIDIQUES POUR UNE APPLICATION CLINIQUE

L'utilisation des plasmides pour des applications cliniques de thérapie génique nécessite généralement leur production à l'échelle et aux normes industrielles. De plus, comme pour tout produit pharmaceutique, l'utilisation d'un plasmide comme médicament requiert l'aval des autorités réglementaires et une production soumise à des contrôles stricts afin d'assurer les niveaux de pureté, de qualité et de stabilité compatibles avec des essais cliniques.

II.6.1 Conditions « BPF »

Pour répondre aux réglementations, il est nécessaire que les plasmides soient produits dans des conditions dites « BPF » (Bonnes Pratiques de Fabrication) ou GMP en langue anglaise (GMP : Good Manufacturing Practices). Sous condition BPF, chaque étape de la production est réalisée en suivant des procédures standardisées et contrôlées (SOP : « standard operating procedures »). Les infrastructures répondant à l'appellation BPF sont régulièrement inspectées par les agences réglementaires afin de vérifier leur conformité.

II.6.2 Processus de production

Cette section décrit les principales étapes de la production d'un plasmide en conditions BPF ainsi que les exigences auxquelles elles doivent répondre. La figure 27 donne une vue d'ensemble du processus.

Tout processus de production d'un plasmide commence à l'échelle du laboratoire « Research Grade » (Figure 27a). Dès cette échelle, il est nécessaire de s'assurer que tous les composants employés répondent à une qualité en adéquation avec les exigences du processus BPF. Le transfert d'une technologie à un environnement industriel BPF (Figure 27b) nécessite une description précise de la souche bactérienne et du plasmide à produire, en détaillant les différentes étapes de construction, les différents éléments génétiques impliqués ainsi que leurs séquences.

Le milieu de culture utilisé doit également être précisément décrit. Afin d'exclure les risques de TSE (Transmissible spongiform encephalopathies) liés à la transmission de prions les autorités réglementaires ont interdit l'utilisation de composants d'origine animale pour la production pharmaceutique (European Medicines Agency 2012). Le milieu de culture utilisé dès le stade « recherche » doit donc respecter ces conditions et les peptones d'origine animale généralement contenues dans ce type de milieu doivent être remplacées par des peptones obtenues à partir de protéines végétales.

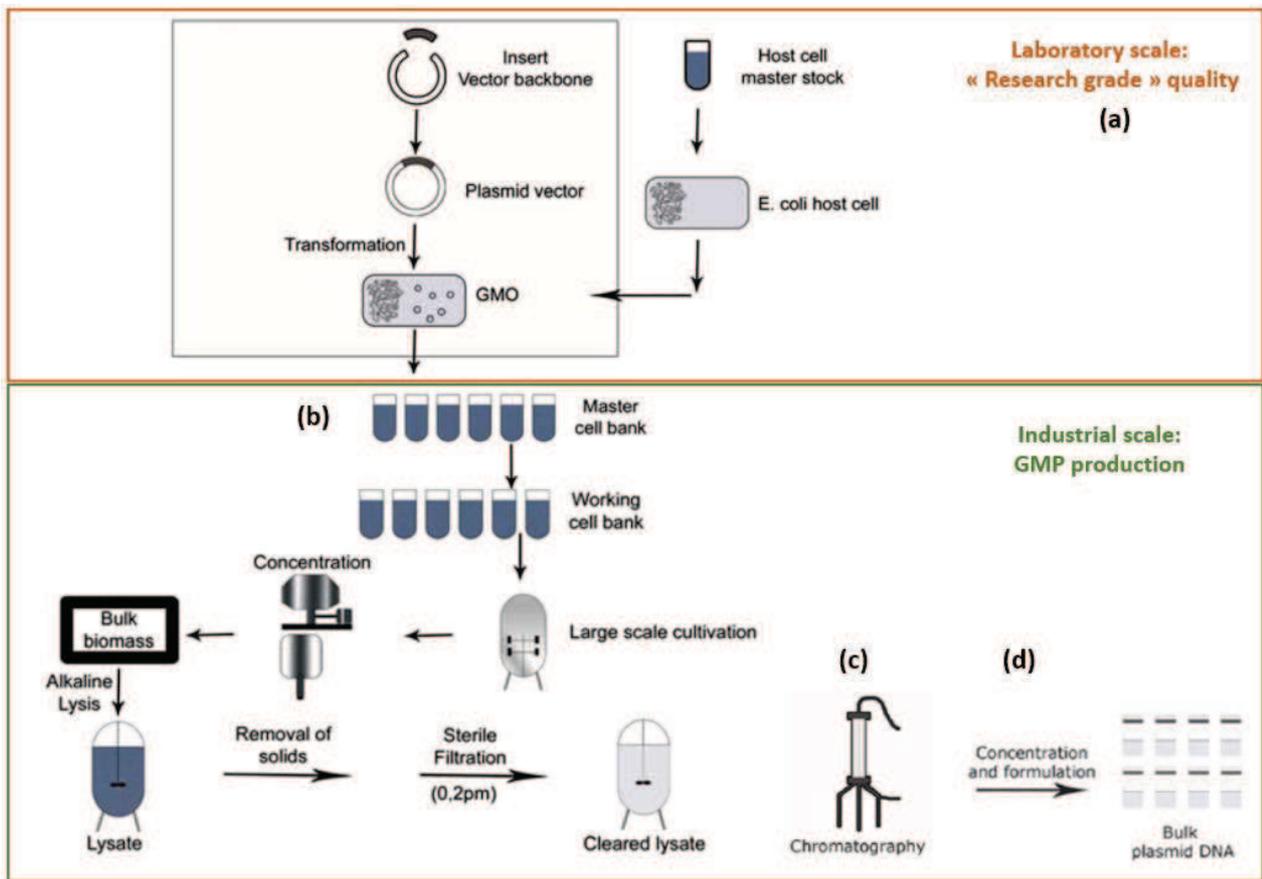


Figure 27: Vue d'ensemble du processus de production de plasmides en conditions BPF.

La construction du plasmide et la transformation de la souche bactérienne sont effectuées en laboratoire (encadré orange)(a). Le clone génétiquement modifié (GMO) est ensuite transféré dans un environnement BPF (GMP : encadré vert)(b) pour être contrôlé puis cultivé en bioréacteur. Plusieurs banques cellulaires sont constituées : une « Master Cell Bank », qui, après contrôle, sert à inoculer un nouveau réacteur pour générer la « Working Cell Bank » à partir de laquelle est ensuite inoculé le bioréacteur de production. La biomasse issue de la fermentation est concentrée puis lysée par lyse alcaline puis filtrée à 0,2 µm pour donner une solution d'ADN plasmidique. L'ADN plasmidique est ensuite purifié puis par chromatographie et par filtration à 0,2 µm (c). Après divers tests de contrôle qualité du produit final, il peut être concentré, formulé, conditionné et stocké en fonction de sa future application (d). D'après (Schleef et al. 2010; Schmeer & Schleef 2014).

La production sous des normes BPF implique que chaque étape soit soigneusement évaluée et documentée et soit réalisée dans des salles blanches afin de veiller au respect de la reproductibilité et de la qualité. La production BPF n'implique pas toujours une augmentation de l'échelle de production.

En utilisant de bonnes conditions (pH, température...), une fermentation d'une nuit peut être suffisante pour obtenir de large quantité de biomasse contenant de grande quantité de plasmide. Ces conditions dépendent de la souche et du plasmide et doivent être adaptées à chaque cas. Un processus de fermentation doit être réalisé à l'identique au moins trois fois pour assurer une qualité constante de la biomasse (Schmeer & Schleef 2014).

L'étape de purification est une étape critique du processus (Figure 27c). De nouvelles techniques permettent d'éliminer les fragments de chromosome bactérien, les ARNs, et également les formes

ouvertes et linéarisées du plasmide sans avoir recours à des enzymes d'origine animale (telle que la RNase A)(Stadler et al. 2004).

Après purification, le plasmide doit subir des tests de contrôle qualité et répondre à différentes spécifications (Tableau 7) (Schmeer & Schleef 2014). Il est ensuite formulé dans le tampon approprié pour son application et puis stocké (Figure 27d).

Les systèmes de stockage de plasmide ont également été améliorés ces dernières années pour assurer une stabilité du plasmide sur le long terme. La lyophilisation est l'une de ces méthodes et permet une conservation facilitée du plasmide sur une longue durée sans contrainte de température. Cependant d'après certaines études cette méthode influencerait négativement la topologie des plasmides. L'étape de resuspension avant utilisation peut générer des contaminations ce qui constitue également une limite à l'utilisation de cette méthode de stockage. Une étude récente a montré qu'il était possible de conserver stablement un plasmide en solution saline à -20°C sur une période d'au moins 7 ans tout en préservant sa qualité et sa fonctionnalité (Walther et al. 2013).

Le tableau ci-dessous récapitule les tests effectués lors du contrôle qualité du plasmide produit en conditions BPF, ainsi que les spécifications requises.

Paramètre testé	Méthodes analytiques pouvant être employées	Spécification
Apparence	Inspection visuelle	Clair, sans particules visibles
Concentration	Absorption à 260 nm après dilution dans du tampon TE (Tris-EDTA)	
Pureté	Scan (UV 220-320 nm)	Pic à 258 nm
Identité	-Restriction enzymatique avec les endonucléases appropriées -Electrophorèse sur gel d'agarose (AGE) -Séquençage complet du plasmide	Profil de restriction conforme à la séquence
Homogénéité (proportion plasmide surenroulé)	-Inspection visuelle après AGE ou Electrophorèse capillaire ou HPLC	≥ 90%
ARN	Inspection visuelle après AGE ou HPLC	≤ 1%
ADN chromosomique bactérien	Inspection visuelle après AGE ou PCR quantitative	≤ 1%

Endotoxines (LPS : Lipopolysaccharides)	Dosage colorimétrique <i>Test LAL (Limulus amoebocyte lysate)</i>	≤ 100 E. U./mg ADN
Protéines	Dosage colorimétrique BCA <i>(BiCinchoninic acid Assay)</i>	< 10 µg/mg ADN
Microorganismes	Numération de colonies après culture sur milieu	< 1 CFU/mL

Tableau 7: Contrôle qualité du produit plasmidique final: Tests et spécifications.

III LES TRANSPOSONS COMME OUTILS DE THERAPIE GENIQUE

Dans le cadre de cette thèse, les plasmides pFAR4 ont été utilisés en combinaison avec la technologie de transposition *Sleeping Beauty*. C'est pourquoi dans ce chapitre, les mécanismes et applications des systèmes transposons et plus particulièrement ceux du système *Sleeping Beauty* sont présentés.

III.1 PRESENTATION GENERALE DES TRANSPOSONS

Les transposons sont des éléments génétiques discrets ayant la capacité de se déplacer d'un locus à un autre dans le génome, par un phénomène dit de « transposition ». Décrits pour la première fois par Barbara McClintock chez le maïs (McClintock 1950; Fedoroff 2012), les transposons sont des séquences d'ADN présentes dans le génome de tous les eucaryotes. Des bactéries à l'humain, la mobilisation et l'accumulation de ces éléments au cours de l'évolution ont façonné les génomes. Chez l'homme environ 45% du génome dérivent de transposons (Lander et al. 2001), qui sont cependant pour la majeure partie inactifs.

Les transposons dits « autonomes » contiennent tous les constituants nécessaires à la transposition : l'ADN transposon codant la recombinase (ou transposase). Cette dernière peut mobiliser le transposon après interaction avec deux séquences répétées inversées (ITRs) situées de part et d'autre de ce dernier (Figure 28). Les transposons sont séparés en deux classes en fonction de leur mécanisme d'action : la classe I concerne les transposons mobiles par un mécanisme dit de « copier-coller » et la classe II désigne ceux transposant par un mécanisme dit de « couper-coller » (Figure 28). Les transposons de classe I, également appelés rétro-transposons, effectuent une « copie » de leur séquence (via un ARN intermédiaire) et intègre ensuite cette séquence néo-synthétisée dans un nouveau site du génome. La mobilisation des transposons de classe II repose sur l'expression de l'enzyme transposase qui se lie aux séquences ITRs et excise (« coupe ») le transposon qui est ensuite intégré (« collé ») dans le génome à un nouveau locus (Figure 28).

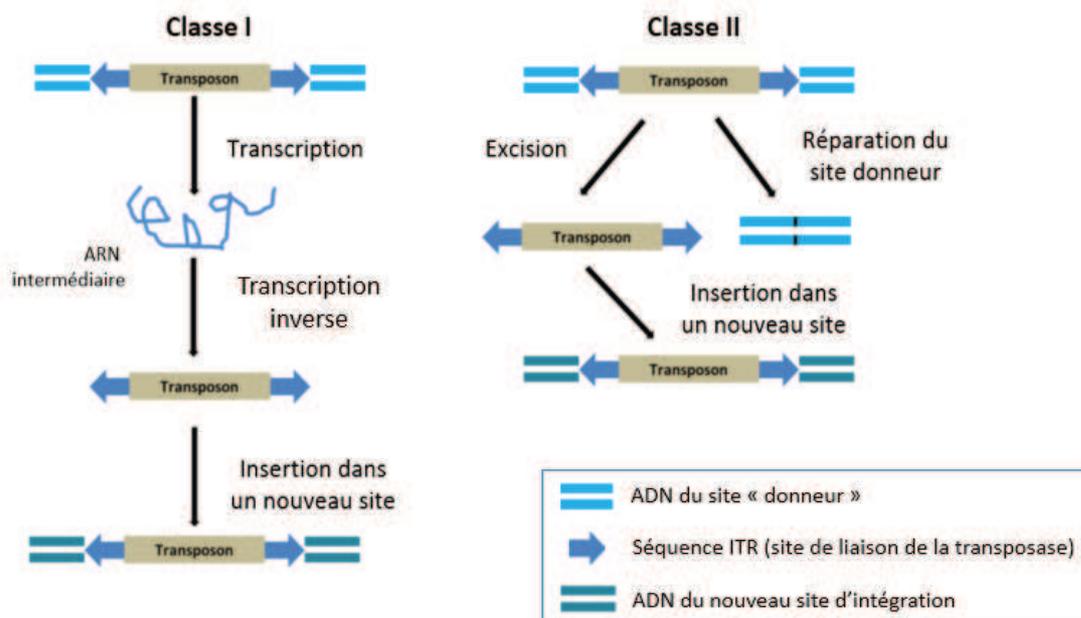


Figure 28: Mécanismes d'action des transposons de classe I et II.

La mobilisation des transposons de classe I repose sur un mécanisme dit de « copier-coller » qui implique la transcription inverse de l'ARN intermédiaire issu de la transcription du transposon puis l'intégration de la nouvelle copie dans un autre site du génome. Les transposons de classe II sont mobilisés grâce à la transposase qui se lie aux séquences ITRs (Inverted Terminal Repeats) situées de part et d'autre du transposon puis clive ce dernier pour l'intégrer dans un nouveau site du génome. L'excision au niveau du site donneur est suivie d'une réparation de l'ADN.

La capacité d'intégration des transposons constituant une propriété intéressante pour le développement d'outil de transfert de gène, de nombreux transposons ont été étudiés dans ce but. Ces transposons sont classés en différentes grandes familles en fonction de leurs séquences répétées (Muñoz-López & García-Pérez 2010). Parmi ces grandes familles : la superfamille Tc1/*mariner* dont est issue le système de transposition synthétique *Sleeping Beauty*, la famille *hAT*, comprenant le transposon *Tol2* et la famille *PiggyBac*, seront décrites dans ce chapitre.

Sleeping Beauty, *PiggyBac* et *Tol2* sont tous des transposons de classe II. Ils sont utilisés pour la transgénèse mais également pour la mutagenèse dirigée dans différents organismes. Ils constituent ainsi des outils génétiques puissants pour l'analyse du génome, pour l'identification de gènes ou de voies impliquées dans une maladie et ils sont, de nos jours, les systèmes de transposition les plus utilisés pour le transfert de gène.

Ce chapitre décrit les caractéristiques de ces transposons ainsi que leurs applications dans le domaine de la thérapie génique, en insistant plus particulièrement sur le système de transposition *Sleeping Beauty* utilisé dans le cadre de cette thèse.

III.2 LE SYSTEME DE TRANSPPOSITION *SLEEPING BEAUTY*

La superfamille de transposons Tc1/*mariner*, nommée d'après le transposon Tc1 de l'organisme invertébré modèle *C. elegans* constitue la famille de transposons la plus représentée dans les génomes de tous les animaux y compris les vertébrés (Vos et al. 1996). Cependant malgré leur large répartition, aucun de ces éléments n'a été retrouvé naturellement actif dans un organisme vertébré.

En se basant sur une approche phylogénétique comparative, un transposon synthétique actif nommé *Sleeping Beauty (SB)* a été reconstruit à partir d'éléments transposables de la famille Tc1 inactifs trouvés dans les génomes des poissons téléostéens (Ivics et al. 1997; Plasterk et al. 1999). Ce système de transposition ainsi « réactivé » a montré par des tests de transposition *in vitro* et *in vivo*, une capacité de mobilisation efficace dans le génome de nombreux vertébrés, y compris le génome humain (Izsvák et al. 2000).

III.2.1 Structure du système *Sleeping Beauty*

III.2.1.1 Structure du transposon

Le transposon *Sleeping Beauty* présente une structure générale simple : sous sa forme naturelle, il est constitué d'un gène codant pour une transposase, l'enzyme responsable de la transposition, flanqué par deux séquences terminales répétées inversées (ITRs) d'environ 230 paires de base contenant les sites de liaison de la transposase (Plasterk et al. 1999)(Figure 29A).

Les séquences ITRs contiennent chacune deux séquences directement répétées d'environ 32 paires de base, les DRs (Directed Repeats) auxquelles se lie la transposase. Cette organisation particulière de séquences répétées et inversées est présente pour la grande majorité des transposons de la famille Tc1/*mariner*.

Les séquences externes (DRo) sont situées à chaque extrémité du transposon. Les séquences internes (DRi) sont situées sur la partie la plus intérieure des ITRs. Les quatre DRs sont nécessaires à la transposition et ne sont pas interchangeables, leurs rôles dans la transposition étant différents (Cui et al. 2002; Liu et al. 2004). Une séquence commune de 11 paires de bases située en 3' des DRs et nommée HDR (Half Directed Repeat) est également répétée entre les deux séquences DRi et DRo sur l'ITR de gauche. D'après Izsvák et al. (2002), cette séquence, présente uniquement dans une sous-partie de la famille des Tc1/*mariner*, est non délétère pour la transposition mais augmente son efficacité en favorisant la liaison à la transposase.

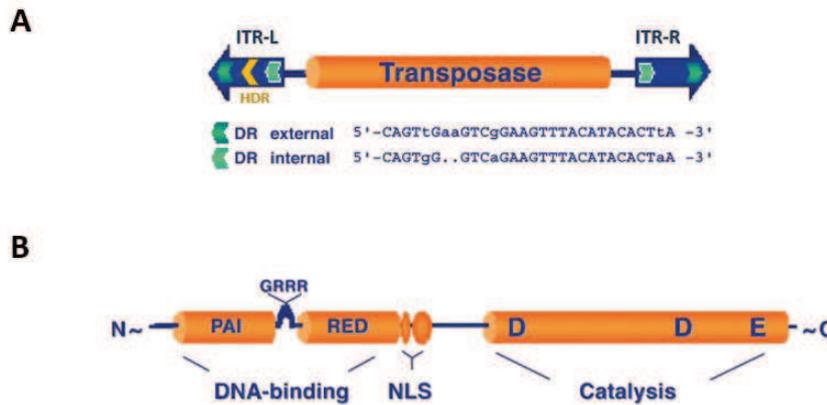


Figure 29: Représentation schématique des deux composants du système *Sleeping Beauty*.

A) Structure du transposon : Dans la nature, des séquences terminales répétées inversées sont situées de part et d'autre du gène codant pour la transposase. Ces séquences terminales ont une structure caractéristique (IR/DR) et contiennent deux sites de liaisons (en vert). B) Structure de la transposase : La transposase est séparée en deux domaines protéiques : le domaine de liaison à l'ADN en N-terminal, constitué de deux motifs hélice-tour-hélice PAI et RED séparés par un motif GRPR caractéristique des protéines à homéo-domaine et bordés par un signal de localisation nucléaire (NLS) ; et le domaine catalytique responsable de l'excision du transposon, contenant le motif de trois acides aminés DDE très conservé chez les protéines recombinase (Izsvák & Ivics 2004).

III.2.1.2 Structure de la transposase

La structure de la protéine transposase est conservée dans toute la superfamille de transposons *Tc1/mariner* et est séparée en deux grands domaines (Figure 29B) :

❖ Domaine de liaison :

La liaison spécifique aux séquences répétées est effectuée par le domaine de liaison de la transposase situé en N-terminal. Il est constitué de deux motifs « hélice-tour-hélice » PAI et RED. Le sous-domaine RED chevauche un signal de localisation nucléaire (Ivics et al. 2004).

PAI et RED se lient à chaque DRs des séquences ITRs, RED se liant plus particulièrement à la moitié 5'. Cette spécificité de liaison est renforcée par la liaison spécifique du sous-domaine PAI à la séquence HDR de l'ITR de gauche (Izsvák et al. 2002). Toute modification des séquences ITRs altère la liaison de la transposase au transposon. La reconnaissance de son substrat par la transposase est donc spécifique et prévient ainsi la trans-activation de transposons n'appartenant pas au système *Sleeping Beauty* mais pouvant avoir une structure proche (Izsvák et al. 2002).

❖ Domaine catalytique :

Le domaine catalytique responsable du clivage de l'ADN est caractérisé par un trio d'acide-aminé nommé le motif DDE, un motif conservé qui est retrouvé dans un très large groupe de recombinases, notamment les recombinases RAG1 et chez les transposases bactériennes (Plasterk et al. 1999). Ce motif DDE serait également impliqué dans l'interaction avec l'ADN cible (Nesmelova & Hackett 2010).

III.2.2 Mécanisme de la transposition

Le gène codant la transposase peut être physiquement séparé des séquences ITRs et remplacé par d'autres séquences d'ADN tel qu'un gène d'intérêt thérapeutique (Figure 30). La transposase peut en effet mobiliser le transposon en « *cis* », le gène codant la transposase est alors localisé sur la même molécule d'ADN que le transposon (Figure 30A), mais aussi en « *trans* », c'est-à-dire en étant exprimée à partir d'un ADN différent du transposon (Figure 30B). La configuration *trans* présente l'avantage de permettre un ajustement du ratio transposon/transposase. La transposase peut également être délivrée aux cellules sous forme de protéine recombinante ou d'ARN messager (Figure 30C et D). Ces dernières options permettent d'éliminer tout risque d'intégration du gène codant pour la transposase dans le génome des cellules hôtes.

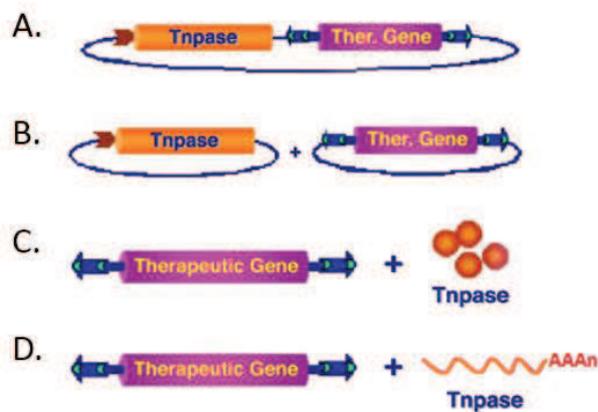


Figure 30: Le système Sleeping Beauty à une ou deux composantes.

La transposase peut être délivrée en « *cis* » à partir du même plasmide que le transposon (A) ou en « *trans* » sous la forme d'un second plasmide (B), de protéine recombinante (C) ou d'un ARN messager (D). (D'après Izsvák & Ivics 2004; Izsvák et al. 2010).

Le mécanisme de « couper-coller » de transposition peut être divisé en quatre étapes : 1) liaisons de 4 molécules de transposase aux 4 séquences répétées DRs, 2) formation d'un complexe synaptique dans lequel les deux extrémités du transposon s'apparient et sont maintenues appariées par les transposases, 3) excision du transposon de l'ADN donneur, 4) réintégration dans l'ADN cible.

III.2.2.1 Liaison transposase-transposon et formation du complexe synaptique

Deux transposases se lient à chaque séquence ITR (une molécule par DR) et des interactions se mettent en place entre les quatre molécules de transposase, maintenant ainsi le transposon sous forme de complexe synaptique (Figure 31).

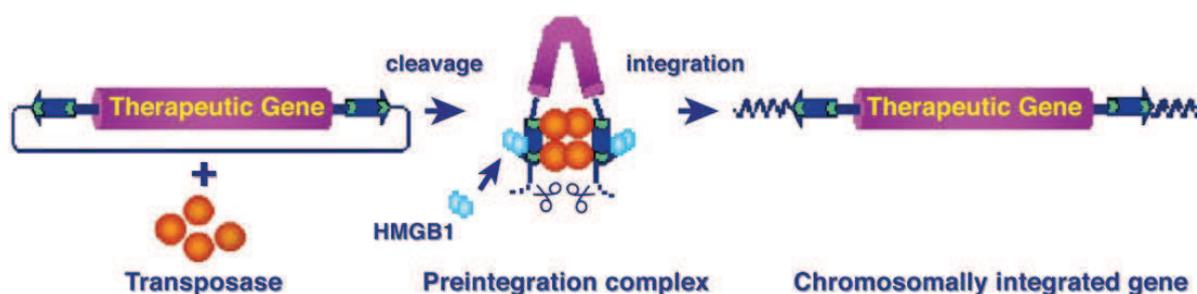


Figure 31 : Mécanisme de transposition.

Les deux composants du système peuvent être séparés et le gène de la transposase remplacé par un gène d'intérêt. Quatre molécules de transposase se lient aux séquences répétées et avec l'aide de facteurs de l'hôte tels que HMGB1, forment un complexe synaptique dans lequel les extrémités du transposon se rejoignent. Le transposon est excisé et transposé sur un autre site du génome (Izsvák & Ivics 2004).

La formation de ce complexe est facilitée par la présence d'un cofacteur cellulaire, la protéine HMGB1 (High Mobility Group Box 1) qui est recrutée par la transposase et l'« assiste » en pliant l'ADN entre les deux ITRs et entre les deux DRs de chaque ITR, favorisant ainsi sa liaison au transposon (Zayed et al. 2003). Il semblerait que l'effet de cette protéine soit plus prononcé au niveau des DRi et que l'ordre des événements ayant lieu à ce stade de la transposition soit le suivant : liaison de deux molécules de transposase aux DRi, facilitée par la présence de HMGB1 puis liaison de deux nouvelles molécules aux DRo.

Toute interférence avec cette suite d'événements, en inversant par exemple les séquences DRi et DRo, abolit la transposition. L'organisation des séquences ITRs introduit un haut niveau de régulation du processus de transposition et l'ordre de déroulement de ce processus constituerait donc un contrôle nécessaire avant sa poursuite par le clivage au niveau des DRo. (Cui et al. 2002).

De façon similaire à l'effet induit par HMGB1, il semblerait que la méthylation des motifs CpG du transposon augmente l'efficacité de la transposition. En effet, la méthylation de ces motifs conduit à la formation d'hétérochromatine, et donc à une condensation de la chromatine. Cette condensation favoriserait alors le rapprochement des séquences ITRs et ainsi la formation du complexe synaptique (Yusa et al. 2004).

III.2.2.2 Excision, intégration et réparation de l'ADN

Les coupures réalisées par hydrolyse des liaisons phosphodiester par la transposase lors de l'excision du transposon s'étendent sur trois nucléotides situés aux extrémités des séquences ITRs, et génèrent deux extrémités 3' cohésives terminées par un groupement OH libre (Figure 32). La réparation de l'ADN double brin donneur est effectuée par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). Ces processus sont catalysés par des enzymes cellulaires dont un complexe de ligases et de protéines kinases. Cette réparation génère une « empreinte » dont la nature dépend de l'espèce de l'organisme et du type cellulaire. Elle peut être canonique, c'est-à-dire identique aux trois premiers ou aux trois derniers nucléotides du transposon (Figure 32A) ou non canonique, c'est-à-dire générant la délétion ou l'insertion de nucléotides de part et d'autre du site d'excision

(Liu et al. 2004). La modification des séquences situées sur les flancs du site d'excision, notamment le dinucléotide TA, peut influencer l'efficacité de l'excision par la transposase sans toutefois abolir cette dernière.

L'étape de réparation de l'ADN par NHEJ serait facilitée par l'interaction de la transposase avec la protéine Miz-1, un facteur de transcription cellulaire dont l'action stoppe le cycle cellulaire en stade G1. L'interaction de *Sleeping Beauty* avec ce cofacteur générerait un délai permettant une réparation efficace de l'ADN avant le passage en phase S (Walisko et al. 2006).

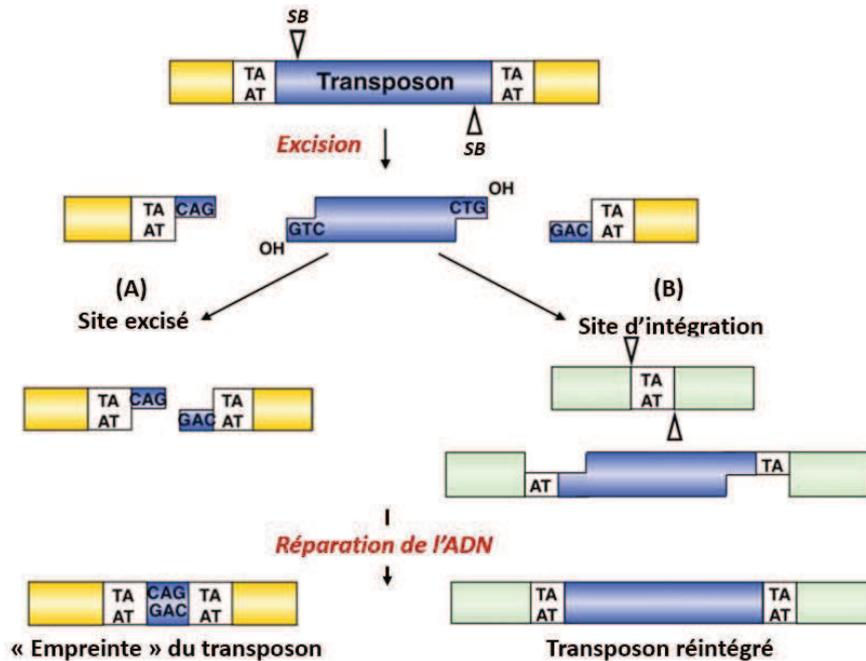


Figure 32: Etapes d'excision et d'intégration dans le processus de transposition de SB.

A. L'excision du transposon à partir de l'ADN donneur et la réparation de celui-ci par jonction d'extrémités non homologues laissent une empreinte au niveau du site d'excision. B. Le transposon excisé est exclusivement intégré dans un dinucléotide TA. D'après Ivics & Izsvák 2015.

La dernière étape de la transposition consiste en l'intégration du transposon dans un nouveau locus du génome. Cette réaction, catalysée par le même domaine de la transposase qui catalyse l'excision, repose sur le transfert du transposon excisé dans l'ADN cible par transestérification. Lors de cette étape, la transposase forme des liaisons hydrogènes avec l'ADN cible.

Comme d'autres transposons de la super famille Tc1/mariner, *Sleeping Beauty* présente une spécificité d'intégration au niveau de l'ADN. En effet, l'intégration du transposon excisé se produit exclusivement au niveau des dinucléotides TA, motifs dupliqués suite à la transposition et entourant ainsi l'élément intégré (Vigdal et al. 2002a) (Figure 32A et 33A). Les régions à la fois riches en AT, donnant une structure plus flexible à l'ADN, et riches en sites de liaisons hydrogènes, favoriseraient l'action de la transposase et contribueraient à la sélection du site de transposition (Vigdal et al. 2002a; Liu et al. 2005).

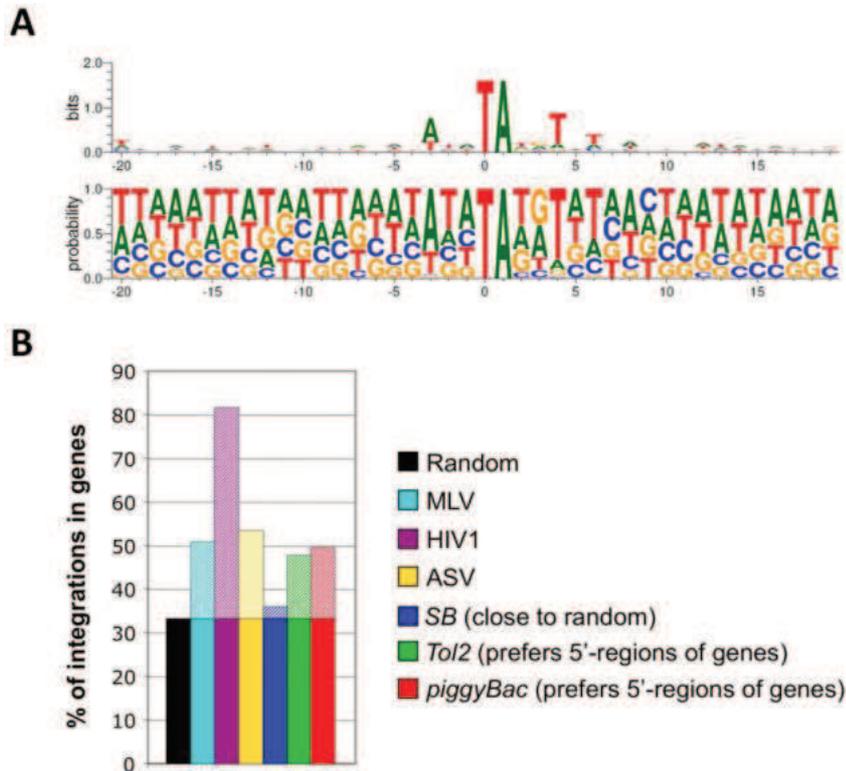


Figure 33 : Profil d'intégration du transposon *Sleeping Beauty* dans le génome eucaryote.

A) Séquence consensus des sites d'insertion de SB déterminée par les analyses SeqLogo des 40 paires de bases situées de part et d'autre des sites d'insertion. B) Fréquence relative d'insertions dans des gènes par différents systèmes rétroviraux et de transposition. La partie supérieure hachurée des histogrammes indique une sur-représentation d'insertions géniques en comparaison à des insertions générées aléatoirement (Ivics & Izsvák 2015).

L'analyse de sites d'intégration de *Sleeping Beauty* dans le génome de cellules humaines en culture a montré que si l'intégration de *Sleeping Beauty* est considérée comme spécifique au niveau de l'ADN (séquences riches en motifs TA), elle peut cependant être considérée comme aléatoire à l'échelle génomique. Environ 35% des intégrations sont situées dans des régions transcrites, or environ 1/3 du génome est composé de séquences transcrites, la fréquence d'intégration de *Sleeping Beauty* ne témoigne donc pas d'une préférence pour les gènes, ni pour les régions non transcrites (Liu et al. 2005). L'analyse des sites d'intégration de cellules modifiées avec d'autres systèmes de transpositions ou rétroviraux montre une propension de ces systèmes à intégrer dans les régions transcrites, notamment en comparaison au système *Sleeping Beauty* (Figure 33B)(Yant et al. 2005; Izsvák et al. 2010)

III.2.3 Facteurs agissant sur l'efficacité de la transposition

III.2.3.1 Importance du facteur « Hôte »:

De nombreux tests *in vitro* et *in vivo* ont montré que *Sleeping Beauty* peut transposer dans une large catégorie de vertébrés, du poisson à l'humain (Izsvák et al. 2000). Cependant, l'efficacité de transposition diffère significativement d'une espèce à l'autre mais également d'un type cellulaire à l'autre au sein d'un même organisme, suggérant que des différences d'interaction

entre le transposon et les facteurs cellulaires de l'hôte affectent l'efficacité de la transposase. La formation du système synaptique conduisant à la transposition nécessite donc la présence des éléments du système de transposition et également les facteurs cellulaires de l'hôte.

III.2.3.2 Taille du transposon

La taille du transposon fait partie des facteurs pouvant moduler l'efficacité de la transposition. Une petite taille n'est pas nécessaire pour la transposition mais il a été montré que l'efficacité de la transposition diminue lorsque la taille du transposon situé entre les deux séquences ITRs augmente (Izsvák et al. 2000). La transposition diminue en effet de façon quasi proportionnelle pour des tailles de cassette d'expression passant de 2 à 7 kb et elle devient négligeable pour des cassette d'expression de plus de 10 kb (Geurts 2003). Une explication possible serait que le rapprochement et la liaison des deux extrémités ITRs du transposon seraient d'autant plus difficiles que le transgène est long. Il est cependant possible de transposer des cargos de plus 10 kb en utilisant la configuration « sandwich » du système *Sleeping Beauty*. Cette configuration décrite par Zayed et al., consiste en un transgène entouré de part et d'autre une paire de séquences ITRs modifiées de façon à ce qu'elles ne transposent pas de façon indépendante. Cette conformation, en augmentant le nombre de sites de liaisons par *Sleeping Beauty* et ses cofacteurs cellulaires, faciliterait la formation du complexe synaptique nécessaire à la transposition (Zayed et al. 2004).

Il a également été montré que la longueur de l'ADN séparant les deux extrémités externes du transposon dans des constructions plasmidiques influence aussi la transposition. L'efficacité de cette dernière augmente lorsque la taille de l'ADN plasmidique entre les deux ITRs diminue (Izsvák et al. 2000).

III.2.3.3 "Over-production inhibition"

La transposase fonctionnant sous la forme d'un tétramère, un ratio moléculaire transposon: transposase pour une transposition efficace devrait être de 1:4. Une augmentation de la concentration en transposase ou de l'expression du gène codant pour l'enzyme peut augmenter cette efficacité jusqu'à une certaine limite à partir de laquelle est observé un phénomène d'inhibition par surproduction, c'est-à-dire que cette augmentation en transposase résulte en une diminution de la transposition. Une hypothèse justifiant ce phénomène, également observé avec d'autres transposases, est qu'à de fortes concentrations la machinerie cellulaire ne serait plus capable de synthétiser des transposases dont la conformation permet la transposition. Ces transposases non actives entreraient alors en compétition avec les molécules fonctionnelles au niveau des sites de liaisons du transposon inhibant ainsi la transposition (Izsvák & Ivics 2004). L'hypothèse formulée par Bell et al, repose également sur ce phénomène de compétition, qui, même en présence de molécules fonctionnelles, serait la cause de l'inhibition de la transposition

(Bell et al. 2007). Ce phénomène peut être évité en diminuant la quantité de transposase ou en faisant varier le promoteur dirigeant l'expression de l'enzyme.

III.2.3.4 Transposase hyperactive SB100X

A la différence des virus, les transposons doivent coexister avec les cellules hôtes afin de subsister. Les éléments transposables ne sont donc pas naturellement sélectionnés pour leur efficacité de transposition afin d'éviter la mutagenèse insertionnelle de gènes essentiels. La version reconstituée de *Sleeping Beauty* SB, bien qu'efficace n'est donc pas sa forme la plus active. Plusieurs expériences ont donc été menées dans le but d'augmenter son activité et afin d'obtenir un outil plus performant pour le transfert de gène.

Les séquences ITRs du transposon ont ainsi été optimisées tel que décrit plus haut (Cui et al. 2002). Et de nombreuses mutations ponctuelles de la séquence codant pour la transposase ont également été réalisées et ont conduit à l'obtention de variants modestement plus actifs (Zayed et al. 2004; Baus et al. 2005). Finalement, c'est par un criblage à haut débit de transposases hyperactives développées par évolution *in vivo* qu'en 2009 Mátés et al. ont permis la production d'un variant nommé SB100X, 100 fois plus performant que la protéine originellement reconstruite (Mátés et al. 2009). Le système de transposition hyperactif SB100X permet un transfert efficace et une expression sur le long terme de gènes thérapeutiques *in vivo* et *in vitro* notamment dans des cellules primaires difficiles à transfecter et d'intérêt majeur en thérapie génique, telles que les cellules CD34+ (Xue et al. 2009; Mátés et al. 2009), les cellules souches embryonnaires (Grabundzija et al. 2013) et les cellules T (Jin et al. 2011).

III.2.4 Le système *Sleeping Beauty* comme vecteur de thérapie génique :

Le système de transposition *Sleeping Beauty* a été largement étudié ces dernières années. Les grandes possibilités de design de ce système permettent d'insérer efficacement et stablement une séquence ADN d'intérêt introduite entre les séquences ITRs, cette séquence pouvant codée pour un marqueur fluorescent, un ARN interférant (Heggstad et al. 2004) ou encore une protéine d'intérêt thérapeutique. Elles permettent également de moduler aisément la transposition, en jouant notamment sur le promoteur dirigeant l'expression de la transposase (Mikkelsen 2003) et sur les différents variants de la transposase elle-même qui présentent des activités différentes. L'expression du transgène inséré peut également être optimisée en utilisant par exemple des promoteurs spécifiques de cellules ou tissus ciblés, ou encore en ayant recours à un système Tet-Off permettant d'induire l'expression du transgène (Geurts et al. 2006). Il est également possible d'insérer des séquences insultrices de part et d'autre de la cassette d'expression contenue dans le transposon limitant ainsi la répression de son expression après insertion (Dalsgaard et al. 2009a).

En tant que système insertionnel non viral, le système *Sleeping Beauty* a également été largement exploré comme outil de thérapie génique. Il fait notamment l'objet, depuis une dizaine d'années, d'études précliniques pour le traitement de maladies génétiques rares *ex vivo* et *in vivo* (Boehme et al. 2015).

Les protocoles suivis pour le transfert *ex vivo* de *Sleeping Beauty* sont basés sur des techniques d'électroporation et nucléofection et se sont révélés efficaces pour le transfert aux cellules primaires issues de patients (Mátés et al. 2009; Xue et al. 2009; Singh et al. 2014; Johnen et al. 2012). Pour les approches *in vivo* en revanche, le transfert jusqu'aux cellules cibles reste limité par les obstacles que représentent les nombreuses barrières de l'organisme pour l'ADN contenant le système de transposition. Différentes approches ont été mises en place dans le cadre de ces études précliniques pour optimiser le transfert de *Sleeping Beauty* en fonction de la maladie traitée.

L'injection hydrodynamique représente, par exemple, une méthode efficace pour le transfert des composants du système *Sleeping Beauty* aux hépatocytes chez la souris (Aronovich et al. 2009) mais reste encore difficile à mettre en place chez le gros animal.

La complexation de l'ADN codant le transposon et la transposase avec des composants chimiques, tel que le PEI (polyéthylèneimine) ou des nanocapsules, a également montré ses preuves pour le traitement de plusieurs maladies, telle que l'hémophilie de type A (L. Liu et al. 2006; Kren et al. 2009), ou le traitement de complications liées à une greffe de poumons (H. Liu et al. 2006).

Des vecteurs hybrides contenant les composants du système *Sleeping Beauty* dans des particules virales ont également été développés afin d'augmenter l'efficacité de transfert de gène. La technologie *Sleeping Beauty* a par exemple été couplée au virus de l'Herpes (HSV) dans une approche pour le traitement de troubles du système nerveux central (de Silva & Bowers 2011), à des adénovirus pour la délivrance du facteur IX dans un modèle canin d'hémophilie de type B (Hausl et al. 2010) ou à des lentivirus (Staunstrup et al. 2009).

Le premier essai clinique utilisant la technologie *Sleeping Beauty* a été initié aux Etats Unis et consiste à administrer à des patients atteints de lymphomes des cellules B ou de leucémies lymphoblastiques, des cellules T génétiquement modifiées pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR : Chimeric Antigen Receptor) dirigé contre l'antigène CD19 (NTC02529813)(Williams 2008; Huls et al. 2013; Jin et al. 2011). Le processus permettant la production de ces cellules est illustré Figure 34. Des cellules T ou des cellules souches hématopoïétiques de patients sont transfectées par électroporation avec deux plasmides : l'un codant le variant SB11 de la transposase et l'autre contenant le gène codant le récepteur CAR entouré des séquences ITRs. Les cellules sont ensuite cultivées sur des cellules K652 irradiées présentatrices de l'antigène (aAPC: artificial Antigen Presenting Cells) et en présence de

cytokines afin de favoriser la prolifération des cellules exprimant le CAR CD19. A l'issue de plusieurs cycles de prolifération, les cellules sont cryopréservées avant infusion aux patients. Ce processus a été optimisé pour être réalisé en conditions BFP (Singh et al. 2013; Singh et al. 2015; Hackett et al. 2010).

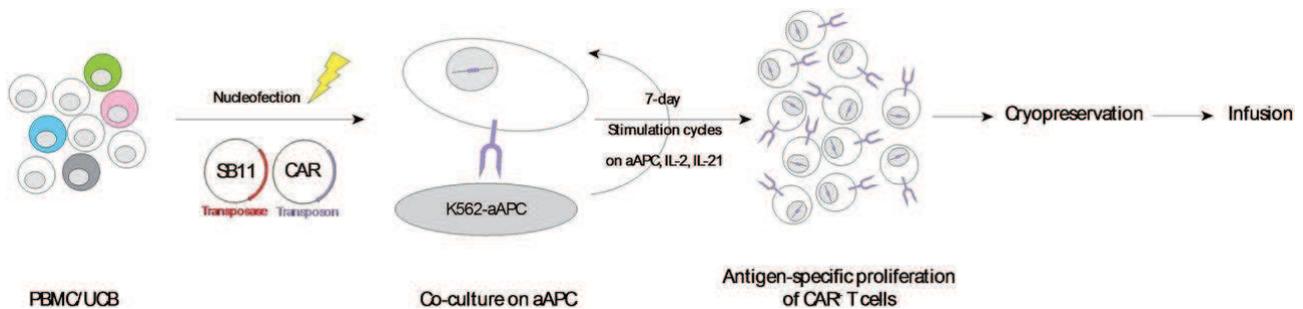


Figure 34: Production de cellules T spécifiquement dirigées contre l'antigène CD19.

Des cellules mononucléaires issues du sang périphérique ou du cordon ombilical sont transfectées par nucléofection avec les plasmides codant la transposase SB11 et le récepteur antigénique chimérique (CAR) CD19. Les cellules T exprimant le récepteur spécifique sont multipliées sur des cellules K562 irradiées présentatrices de l'antigène CD19 et en présence de cytokines stimulatrices dans le milieu de culture. Les cellules sont ensuite cryopréservées avant d'être infusées aux patients atteints de lymphome des cellules B ou de leucémies lymphoblastiques. PEMC : Peripheral blood mononuclear cells, UCB : umbilical cord blood, CAR : Chimeric Antigen Receptor, aAPC : artificial Antigen Presenting Cells, IL-2, IL-21: interleukines 2 et 21. (Huls et al. 2013)

Plusieurs essais cliniques ont été réalisés au Centre de Recherche sur le cancer MD Anderson en utilisant différentes sources cellulaires (cellules souches hématopoïétiques dérivées de patients, ou de donneurs sains etc...).

Plusieurs modifications ont aussi été apportées au récepteur CAR afin d'améliorer la spécificité du ciblage des cellules cancéreuses. Des cellules T dirigées contre un antigène plus spécifique des cellules tumorales (le récepteur tyrosine kinase-like 1 ROR1) ont également été générées par le même processus et seront testées dans le cadre d'un nouvel essai clinique (NTC02194374, (Deniger et al. 2015)).

Le système de transposition *Sleeping Beauty* est un outil puissant pour de multiples applications et particulièrement pour les approches de thérapie génique. Les premiers essais cliniques permettront de valider la biosécurité ainsi que l'efficacité de ce système.

Depuis la reconstruction de *Sleeping Beauty*, une liste croissante d'éléments transposables présentant une activité dans les cellules humaines a été étudiée et certains d'entre eux font à leur tour l'objet d'études précliniques, parmi lesquels les transposons *piggyBac* et *Tol2*, qui seront brièvement présentés dans la section suivante.

III.3 LES SYSTEMES DE TRANSPOSITION *PIGGYBAC* ET *TOL2*

III.3.1 Le système de transposition *piggyBac*

Le système de transposition *piggyBac* a été isolé à partir du génome d'un lépidoptère (la fausse-arpenreuse du chou, *Trichoplusia ni*) (Sarkar et al. 2003). Comme le système *Sleeping Beauty*, *piggyBac* consiste en deux composants : un transposon entouré des deux séquences ITRs et une transposase catalysant la mobilisation du transposon par un mécanisme de « couper-coller ». Ce système a tout d'abord été employé chez les insectes et s'est également révélé performant dans les cellules de mammifères *in vitro* (Wilson et al. 2007; Solodushko et al. 2014) et *in vivo* chez la souris (Nakanishi et al. 2010).

Le système *piggyBac* présente plusieurs avantages tels que la capacité à transposer des éléments de taille supérieure à 9,1 kb (jusqu'à 100 kb) (Li et al. 2011) ainsi que l'absence de phénomène dit d'« over-production inhibition » (Wilson et al. 2007). Mais l'un des avantages les plus significatifs repose sur sa capacité à exciser *de novo* le transposon sans laisser d'« empreinte » dans le génome. Cette propriété est particulièrement intéressante pour la génération de cellules souches pluripotentes induites (iPCS). L'utilisation de *piggyBac* dans ce but permet d'exciser *de novo* la cassette contenant les gènes de reprogrammation, permettant ainsi une expression transitoire des facteurs de reprogrammation, nécessaire à la différenciation des cellules, tout en limitant les risques de tumorigénicité (Yusa et al. 2009).

L'analyse de plusieurs centaines de sites d'intégration a montré que la transposase *piggyBac*, dont une version hyperactive a été créée (Yusa et al. 2011), favorisait les régions riches en nucléotides TTAA et les régions entourant les sites de début de transcription (TSS : transcription start site) (Wilson et al. 2007) (Figure 33B). Ce profil d'intégration présente des risques de mutagenèse.

III.3.2 Le système de transposition *Tol2*

Le système de transposition *Tol2* fait partie de la superfamille de transposon *hAT* et a été isolé à partir du génome du poisson Medaka (*Orizias latipes*). Il fonctionne également par un mécanisme de « couper-coller » nécessitant l'expression de la transposase *Tol2* et la présence de séquences ITRs de part et d'autre du transposon (Koga 2004; Urasaki et al. 2006). Comme *piggyBac*, ce système présente pour avantage d'avoir une capacité de transposition importante (>10 kb).

L'insertion du transposon dans le génome s'effectue sans préférence de séquences détectable mais crée une duplication du site d'insertion de 8 paires de bases. L'analyse des sites d'intégration a montré une propension du système *Tol2* à intégrer dans la région 5' des gènes (Grabundzija et al. 2010) (Figure 33B).

Largement employé comme outil de transgénèse dans le zebra fish, organisme dans lequel son activité est très efficace, le système de transposition *Tol2* a également été utilisé avec succès dans les cellules de mammifères, dont les cellules humaines (Balciunas et al. 2006). Il a notamment été employé pour modifier génétiquement des cellules T afin de leur faire exprimer le CAR CD19 (Tsukahara et al. 2015).

Le tableau ci-dessous résume les principales caractéristiques des systèmes de transposition présentés.

Nom du transposon	Famille	Capacité de transposition	Séquence d'intégration cible	Profil d'intégration	Autre
<i>Sleeping Beauty</i>	<i>Tc1/mariner</i>	L'efficacité de transposition diminue proportionnellement à l'augmentation de la taille du cargo génétique	TA	Profil dit « aléatoire » : pas de préférence pour les régions transcrites	-« over-production inhibition » -Utilisé dans plusieurs essais cliniques
<i>piggyBac</i>	<i>piggyBac</i>	>10kb	TTAA	Biais pour les régions transcrites	Excision du transposon <i>de novo</i> sans laisser d'empreinte dans le génome
<i>Tol2</i>	<i>hAT</i>	>10kb	Pas de préférence – duplication d'une séquence de 8 pb	Préférences pour la région 5' des gènes	

Tableau 8 : Caractéristiques des systèmes de transposition les plus employés dans le domaine de la thérapie génique.

IV UTILISATION DES PLASMIDES pFAR4 DANS DEUX APPROCHES DE THERAPIE GENIQUE

L'utilisation d'ADN plasmidique pour des applications de thérapie génique est considérée comme une alternative prometteuse aux approches traditionnelles telles que la protéothérapie ou aux méthodes virales de transfert de gène. Contrairement aux vecteurs viraux, les plasmides sont des produits facilement modifiables et pouvant être aisément produits en grande quantité. Ils sont également plus sûrs, car moins immunogènes et moins propices à l'intégration dans le génome des cellules hôtes. Les techniques de transfert de vecteurs plasmidiques se sont considérablement améliorées et de nouvelles générations de plasmides ont été créées afin d'éliminer tout risque lié au gène de résistance à un antibiotique.

Appartenant à cette nouvelle génération, le miniplasmide pFAR4, développé dans ce laboratoire, a montré son efficacité en tant que vecteur d'expression eucaryote dans différents tissus. L'expression à partir de ce plasmide s'est révélée augmentée et prolongée par rapport à celle obtenue avec un plasmide conventionnel porteur de la même cassette d'expression (Marie et al. 2010).

L'objectif de cette thèse a été d'étudier le potentiel des dérivés du pFAR4 comme vecteurs d'expression d'un transgène dans deux approches de thérapie génique non virale :

La première consiste à tester le potentiel des vecteurs pFAR4 pour l'expression, dans le foie, d'un gène thérapeutique, *Sgsh*, codant une protéine défectueuse chez les patients atteints de la maladie de Sanfilippo de type A, une maladie génétique de surcharge lysosomale.

La seconde consiste en une approche *in vitro* insertionnelle. Dans ce contexte, le miniplasmide pFAR4 est combiné à la technologie de transposition *Sleeping Beauty*. Ces deux technologies seront employées dans le cadre de deux essais cliniques européens visant à traiter la Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

La partie Résultats de ce manuscrit est séparée en deux chapitres correspondant à ces approches. Chaque chapitre contient une courte introduction présentant le contexte de l'étude.

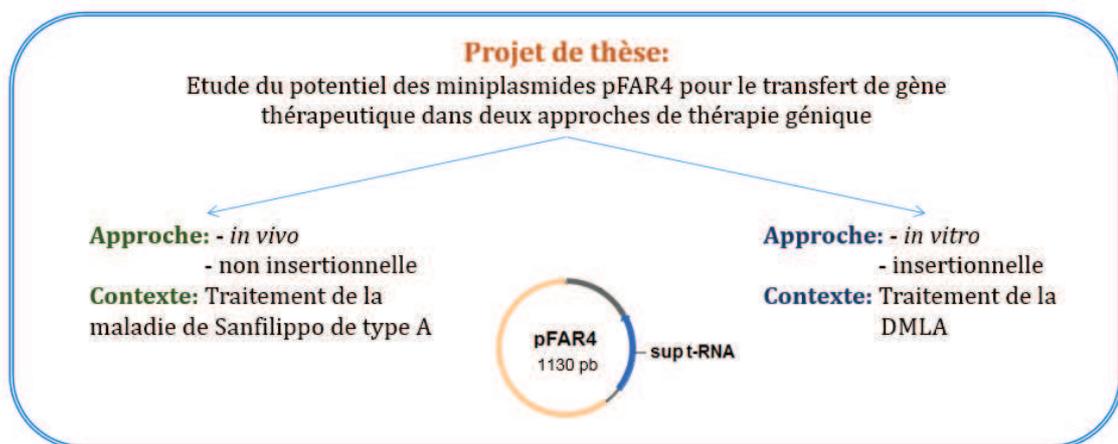


Figure 35: Projet de thèse

CHAPITRE I : APPROCHE DE THERAPIE GENIQUE NON VIRALE POUR LA MALADIE DE SANFILIPPO DE TYPE A

SOMMAIRE

Chapitre I : Approche de thérapie génique non virale pour la maladie de Sanfilippo de type A.....	95
I Introduction.....	97
I.1 Description de la maladie	97
I.2 Approches thérapeutiques.....	98
I.3 Traitement par thérapie génique	99
II Thérapie génique non virale pour MPSIIIA – Contexte de l'étude.....	101
III Résultats	105
III.1 L'expression de la sulfamidase à partir du pFAR4 est maintenue dans le temps	105
III.2 Hypothèses	107
III.3 Statut du plasmide pFAR4 dans le foie.....	109
III.4 Comparaison des quantités de plasmides dérivés de pFAR4 et de pKAR4.....	111
III.5 Comparaison du niveau de transcription du gène <i>Sgsh</i>	112
III.6 Comparaison du profil épigénétique des vecteurs pFAR4 et pKAR4 :	114
IV Discussion.....	124
V Conclusion.....	129

I INTRODUCTION

Ce premier chapitre décrit le potentiel du plasmide pFAR4 comme vecteur de gène pour l'expression et la sécrétion de protéines thérapeutiques par les cellules de foie de souris. Nous avons choisi d'étudier le profil d'expression de la protéine lysosomale SGSH qui est une protéine défectueuse chez les patients souffrant de la maladie de Sanfilippo de type A. Notre laboratoire possède en effet un modèle de souris malades qui reproduisent les symptômes décrits chez l'homme.

I.1 DESCRIPTION DE LA MALADIE

La maladie de Sanfilippo ou syndrome de Sanfilippo, portant le nom du docteur Sylvester Sanfilippo qui en a décrit les symptômes en 1963 (Sanfilippo et al. 1963), est une mucopolysaccharidose (MPS) de type III. La prévalence à la naissance de cette maladie rare est difficile à établir car elle est souvent sous-diagnostiquée. En juillet 2015, celle-ci a été estimée à 0.87 sur 100.000 naissances en Europe (<http://www.orpha.net>).

La maladie de Sanfilippo est une maladie lysosomale (LSD : lysosomal storage disease) à transmission autosomale récessive causée par un déficit en l'une des cinq enzymes impliquées dans la dégradation des sulfates d'héparane (HS) dans les lysosomes. Les HS appartiennent à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs) qui sont des composants essentiels de la matrice extracellulaire. L'accumulation de GAGs dans les lysosomes conduit à un dysfonctionnement cellulaire entraînant des dommages graves dans tous les organes et notamment au niveau du système nerveux central.

Cette maladie comporte cinq sous-types, désignés MSP III A, B, C, D et E, classifiés en fonction de l'enzyme déficiente dans le processus de dégradation des HS (Valstar et al. 2008; Kowalewski et al. 2012). La MPS IIIA ou maladie de Sanfilippo de type A est due à un déficit en l'enzyme *N*-sulfoglucosamine sulfohydrolase (SGSH, EC:3.10.1.1) également appelée sulfamidase. Le gène codant pour cette enzyme de 502 acides aminés est localisé sur le chromosome 17q25.3 et mesure 11 kb. A ce jour, 137 mutations de ce gène ont été recensées (Fedele 2015). Cette hétérogénéité génétique résulte en une grande diversité de phénotypes compliquant le pronostic et le traitement de la maladie (Ugrinov et al. 2015). Une activité résiduelle de l'enzyme est par exemple observée chez 60% des patients (Héron et al. 2011).

Le diagnostic des enfants est souvent tardif (2-5 ans) et commence par le dosage des GAGs excrétés dans les urines. Un niveau élevé de GAGs confirme une forme de MPS. Ce test est suivi d'un dosage de l'activité enzymatique permettant de déterminer l'enzyme mutée (Fedele 2015). La progression de la maladie conduit à un ralentissement de la parole et de l'acquisition du

langage (phase 1), suivie d'un arrêt du développement cognitif accompagné d'une émergence d'anormalités comportementales (phase 2) et finalement une perte de la mobilité progressant vers un état végétatif (phase 3). L'âge moyen de décès se situe entre 10 et 20 ans (Shapiro et al. 2016).

I.2 APPROCHES THERAPEUTIQUES

Bien qu'un certain nombre d'approches et d'essais cliniques soient actuellement à l'étude, aucun traitement n'est disponible pour MPS IIIA et seuls les symptômes sont actuellement traités. Les approches en cours de développement sont essentiellement basées sur le phénomène dit de « correction croisée » (« cross-correction ») qui repose sur l'habilité des cellules exprimant l'enzyme lysosomale à corriger les cellules avoisinantes déficientes en cette enzyme.

Dans les cellules exprimant l'enzyme, cette dernière est glycosylée dans le réticulum endoplasmique puis, en position 6, les résidus mannose sont phosphorylés (M6P) dans l'appareil de Golgi. La majeure partie de l'enzyme phosphorylée est ensuite adressée aux lysosomes et environ 10% suivent une voie alternative et sont sécrétés. L'enzyme sécrétée se lie aux récepteurs au mannose-6-phosphate (M6PR) ou aux récepteurs au mannose (ManR) présents à la surface des cellules de l'organisme. Les deux récepteurs permettent l'endocytose de l'enzyme et ainsi son transfert aux lysosomes dans lesquels elle peut effectuer son action catabolique (Sands & Davidson 2006)(Figure 36).

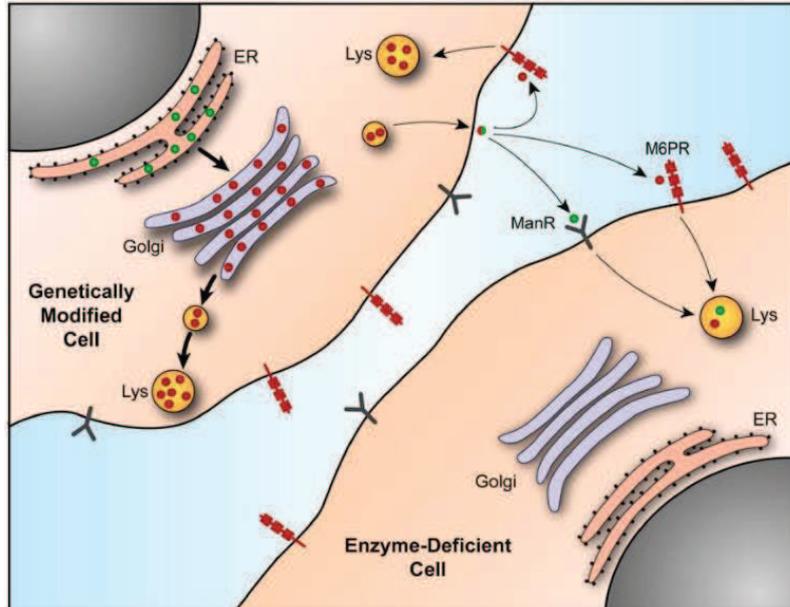


Figure 36: Trafic des enzymes lysosomales et correction croisée.

Les enzymes néo-synthétisées sont glycosylées dans le réticulum endoplasmique (Point verts) puis acquièrent une modification mannose-6-phosphate (points rouges) dans l'appareil de Golgi où elles se lient au récepteur au mannose-6-phosphate (M6PR). La majorité des enzymes sont ensuite dirigées vers la voie des lysosomes (flèches en gras). Une minorité (flèches fines) est sécrétée par la cellule. L'enzyme extracellulaire peut se lier au récepteur M6PR (ubiquitaire) ou au récepteur mannose (ManR) (limité au système réticulo-endothélial) situés à la membrane des cellules. La liaison conduit à l'endocytose puis à l'acheminement vers les lysosomes dans lesquels l'enzyme peut effectuer son activité catalytique (Sands & Davidson 2006).

Cette propriété résulte, en termes de thérapie, en la possibilité d'utiliser un faible nombre de cellules exprimant l'enzyme fonctionnelle pour corriger les cellules avoisinantes.

Plusieurs approches thérapeutiques ont été explorées :

La thérapie par remplacement d'enzyme (ERT) consiste à injecter par voie systémique au patient l'enzyme recombinante (rhSGSH) purifiée. Cette approche, bien que permettant une correction au niveau des organes périphériques est limitée par l'incapacité de l'enzyme à franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui constitue un obstacle majeur pour le traitement de la maladie de Sanfilippo. Afin de le contourner, des équipes ont alors injecté l'enzyme recombinante directement dans le cerveau ou dans le fluide cérébro-spinal de souris modèles MPS IIIA malades, ce qui a conduit à une diminution du niveau des GAGs ainsi qu'à une diminution des symptômes associés à la maladie (Savas et al. 2004; Hemsley et al. 2007). Cette dernière méthode fait actuellement l'objet d'un essai clinique en phase II mené par la société Shire Human Genetic. L'enzyme recombinante rhHNS est administrée dans le liquide céphalo rachidien via un dispositif médical implanté chirurgicalement en intrathécale (IDDD) (n°NCT01299727 et n°NCT02060526, <https://clinicaltrials.gov>).

Une autre approche consiste en la **transplantation de moelle osseuse** (cellules souches hématopoïétiques, HSC) d'un donneur sain compatible. Les monocytes issus de ces cellules peuvent se lier à la BHE comme macrophages périvasculaires et ainsi conduire à une correction dans le SNC (Système nerveux central)(Krivit et al.). Cependant, l'activité lysosomale normale de l'enzyme dans les HSC est trop faible pour apporter une correction croisée efficace et le rapport bénéfice/risque très bas a conduit à écarter cette approche (Peters & Steward 2003). Les HSC peuvent cependant être génétiquement modifiées par thérapie génique pour surexprimer l'enzyme thérapeutique (voir section suivante).

Ces deux approches sont très invasives et coûteuses et peuvent impacter négativement la qualité de vie des patients en fonction de la durée du traitement (Wyatt et al. 2012). En conséquence, la thérapie génique pour le traitement des maladies lysosomales constitue une alternative prometteuse, offrant la possibilité d'un traitement peu coûteux, potentiellement moins invasif et durable après une seule intervention.

I.3 TRAITEMENT PAR THERAPIE GENIQUE

La maladie de Sanfilippo de type A est considérée comme une bonne candidate pour la thérapie génique. En effet : (i) elle résulte de la mutation d'un seul gène (la thérapie constituera donc à délivrer une copie fonctionnelle du gène), (ii) l'activité enzymatique résiduelle observée chez certains patients limite l'induction du système immunitaire contre l'enzyme issue de l'expression

du gène thérapeutique et enfin (iii) la sulfamidase étant une enzyme sécrétée, il est possible d'obtenir une correction croisée de la maladie dans tout l'organisme en ne faisant exprimer la protéine que par un tissu (Sands & Davidson 2006).

Une approche de thérapie génique *ex vivo* a tout d'abord été employée pour modifier génétiquement des HSCs afin d'augmenter le niveau d'expression de la sulfamidase et de permettre une correction croisée de la maladie suite à leur transplantation. Les vecteurs lentiviraux se sont avérés être très efficaces pour cette approche combinant thérapie génique et allogreffe qui a été employée avec succès pour le traitement d'une autre LSD (Biffi et al. 2013). L'utilisation de cette approche chez des souris MPS IIIA a conduit à une normalisation de l'activité dans le SNC (Langford-Smith et al. 2012).

Bien qu'efficace, les risques associés à la transplantation de moelle osseuse, déjà évoqués précédemment, soulignent le besoin de développer des approches de thérapie génique moins invasives.

Plusieurs approches *in vivo* ont été développées en utilisant comme vecteurs de gènes des virus Adéno-associés (AAV). La société Lysogène a récemment mis en place deux essais cliniques (n°NCT01474343 et NCT02053064, <https://clinicaltrials.gov>) consistant à injecter directement dans le cerveau de patient MPS IIIA, par stéréotaxie, un vecteur AAV de sérotype rh10 codant pour l'enzyme sulfamidase. Cette approche s'est avérée sûre et bien tolérée par les patients, avec une légère amélioration des symptômes, en particulier chez les patients les plus jeunes (Tardieu et al. 2014). La phase II/III de cet essai est en cours de préparation.

D'autres approches prometteuses et moins invasives consistent à utiliser des vecteurs AAV de sérotype 9 ayant la capacité de franchir la BHE et de transduire les neurones et les astrocytes ainsi que les cellules des tissus somatiques après une seule injection par voie intraveineuse (Ruzo, Marcó, et al. 2012).

La délivrance de vecteurs AAV8 au foie a montré la relevance du ciblage de cet organe comme organe sécréteur de la sulfamidase. L'expression à partir des hépatocytes permet en effet d'obtenir des taux élevés de sulfamidase dans le sang et une correction efficace du niveau des GAGs dans les tissus périphériques. Cette approche n'a cependant conduit qu'à une faible correction de l'activité sulfamidase au niveau du SNC (10% de l'activité sulfamidase mesurée chez les souris saines) (Ruzo, Garcia, et al. 2012).

Bien que les AAV9 surpassent les autres vecteurs en termes d'efficacité de correction globale de la maladie, ils partagent les inconvénients associés aux vecteurs viraux, à savoir une production coûteuse et laborieuse ainsi qu'une immunogénicité non négligeable. L'injection d'une forte dose

de ces vecteurs peut en effet induire une réponse immunitaire pouvant diminuer l'efficacité du traitement. De plus un biais lié au genre a été rapporté lors de tests chez la souris et chez le chien. Ce biais est encore mal expliqué, et diffère selon les études (Aronovich & Hackett 2015)

Afin de contourner ces obstacles, une approche non virale a été envisagée en utilisant le vecteur pFAR4 comme vecteur de gène.

II THERAPIE GENIQUE NON VIRALE POUR MPSIIIA – CONTEXTE DE L'ETUDE

L'approche développée utilise le foie comme organe « producteur » de l'enzyme thérapeutique et consiste à administrer par injection hydrodynamique une solution de plasmide pFAR4 codant la sulfamidase.

Le choix du foie comme organe cible a été conforté par les résultats prometteurs de l'étude menée par Ruzo, et al. (2012), montrant que le foie était un bon organe sécréteur de la sulfamidase. L'injection hydrodynamique, présentée dans la section I.3.2.2.5 de l'introduction, permet de transférer efficacement les hépatocytes et a donc été choisie comme technique de transfert de gène.

L'un des obstacles majeurs à l'application de vecteurs non viraux pour la thérapie génique est la faible durée de l'expression du transgène dans le temps, dans certains organes. Cette limite est particulièrement prononcée dans le foie pour lequel de nombreuses études *in vivo* ont montré que les plasmides étaient capables de conduire à des niveaux d'expression élevés d'un transgène mais que cette expression déclinait rapidement avec le temps (Herweijer & Wolff 2003; Hodges et al. 2004; Ochiai et al. 2007). Plusieurs explications ont été données pour expliquer cette chute d'expression parmi lesquelles : (i) les divisions cellulaires induites par la régénération des cellules affectées par la procédure de transfection et ayant pour conséquence la perte du plasmide, (ii) la dégradation du plasmide dans le noyau et (iii) l'inhibition de l'activité du promoteur du gène (Herweijer & Wolff 2003). Des équipes ont cependant prouvé qu'il était possible de maintenir un niveau élevé d'expression dans le foie à partir d'un plasmide en utilisant notamment des promoteurs spécifiques du tissu, tels que le promoteur hAAT (human Alpha-AntiTrypsin : promoteur du gène α -antitrypsine humaine), plutôt que des promoteurs ubiquitaires dérivés de virus, tels que le promoteur CMV (Miao et al. 2001; Kramer et al. 2003; Aliño et al. 2003)(Tableau 8). D'autres études ont également montré qu'une expression prolongée dans le temps pouvait être obtenue à partir de vecteurs dépourvus de séquences plasmidiques d'origine bactérienne tels que les minicercles (Chen et al. 2003; Chen et al. 2008)(Tableau 9).

Vecteur	Produit d'expression	Promoteur	Durée d'expression	Références
Plasmide	hFIX (Facteur IX humain)	hAAT	>500 jours	(Miao et al. 2001)
Plasmide	hAAT (human alpha-antitrypsin)	hAAT	120 jours	(Aliño et al. 2003)
Plasmide	hAAT	hAAT chimérique	50 jours	(Kramer et al. 2003)
Minicercle	hAAT hFIX	RSV (Rous Sarcoma Virus)	110 jours 50 jours	(Chen et al. 2003; Chen et al. 2008)

Tableau 9 : Vecteurs et promoteurs ayant conduit à l'expression d'un transgène sur le long terme.

Dans le cadre de l'approche thérapeutique envisagée, nous avons donc décidé d'allier la taille réduite du plasmide pFAR4 à une cassette d'expression spécifique du foie. Le plasmide pFAR4-hAAT-SGSH exprimant la protéine sulfamidase murine à partir du promoteur hAAT a donc été construit (Quiviger et al. 2014).

Afin de valider la construction ainsi que l'approche thérapeutique, le plasmide pFAR4-hAAT-SGSH a été administré à des souris modèles de la maladie. Ce modèle, réalisé en introduisant une mutation dans le gène codant pour la sulfamidase murine, reproduit de nombreuses caractéristiques phénotypiques observées chez les jeunes patients atteints de MPSIIIA (Bhaumik et al. 1999). 100 µg du plasmide ont été administrés à des souris malades âgées de 6 à 8 semaines. Deux jours après injection, l'activité mesurée dans le sérum des souris avait atteint 40 fois le niveau mesuré chez les souris sauvages. L'injection de différentes doses de plasmides (5-20-50-100 µg) a montré un effet dose-dépendant de l'activité. Pour toutes les conditions, une activité maintenue et 5 à 19 fois supérieure à celle des souris sauvages a été observée 4 mois après injection (Figure 37).

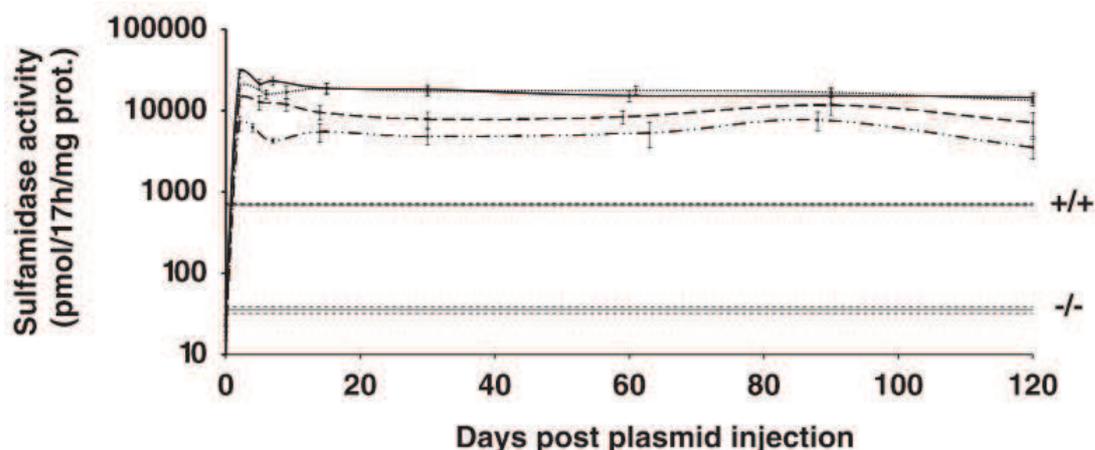


Figure 37: L'activité de la sulfamidase dans le sérum de souris MPS IIIA est dose dépendante.

L'activité sulfamidase dans le sérum a été mesurée après administration par injection hydrodynamique de différentes quantités de plasmide pFAR4-hAAT-SGSH (100 µg : ligne pleine (n=6), 50 µg : ligne en pointillés (n=4), 20 µg : ligne en tirets (n=4) et 5 µg : ligne en pointillés et tirets (n=4)). Un niveau d'activité 10 à 40 fois plus élevé que celui des souris sauvages (+/+) est observé 2 jours après traitement. La ligne (-/-) indique le niveau d'activité résiduelle mesurée chez les souris MPS IIIA non traitées. Les résultats représentent les moyennes des valeurs ± SEM (Quiviger et al. 2014).

Un niveau d'activité sulfamidase élevé a également été mesuré dans tous les organes périphériques des souris traitées (Figure 38a et 38c). Afin de vérifier si cette expression élevée de l'enzyme permettait une correction de la maladie, la quantité de GAGs a été mesurée dans les différents organes. Les figures 38b et 38d montrent les résultats de cette quantification à 1 et 6 mois après injection du plasmide. On constate que l'expression de la sulfamidase a permis une diminution significative de la quantité de GAGs dans ces organes jusqu'à atteindre une quantité similaire à celle mesurée pour les souris sauvages. Au niveau du cerveau, un faible niveau d'activité a pu être mesuré à 1 (Figure 38b) et 2 (non montré) mois après administration, et bien que faible, l'activité a permis de diminuer significativement la quantité de GAGs (Figure 38b) ainsi que la neuro-inflammation (Quiviger et al. 2014). A 4 (non montré) et 6 mois (Figure 38d), la correction des GAGs s'est révélée être maintenue dans tous les organes périphériques mais n'était cependant plus observée dans le cerveau (Figure 38d).

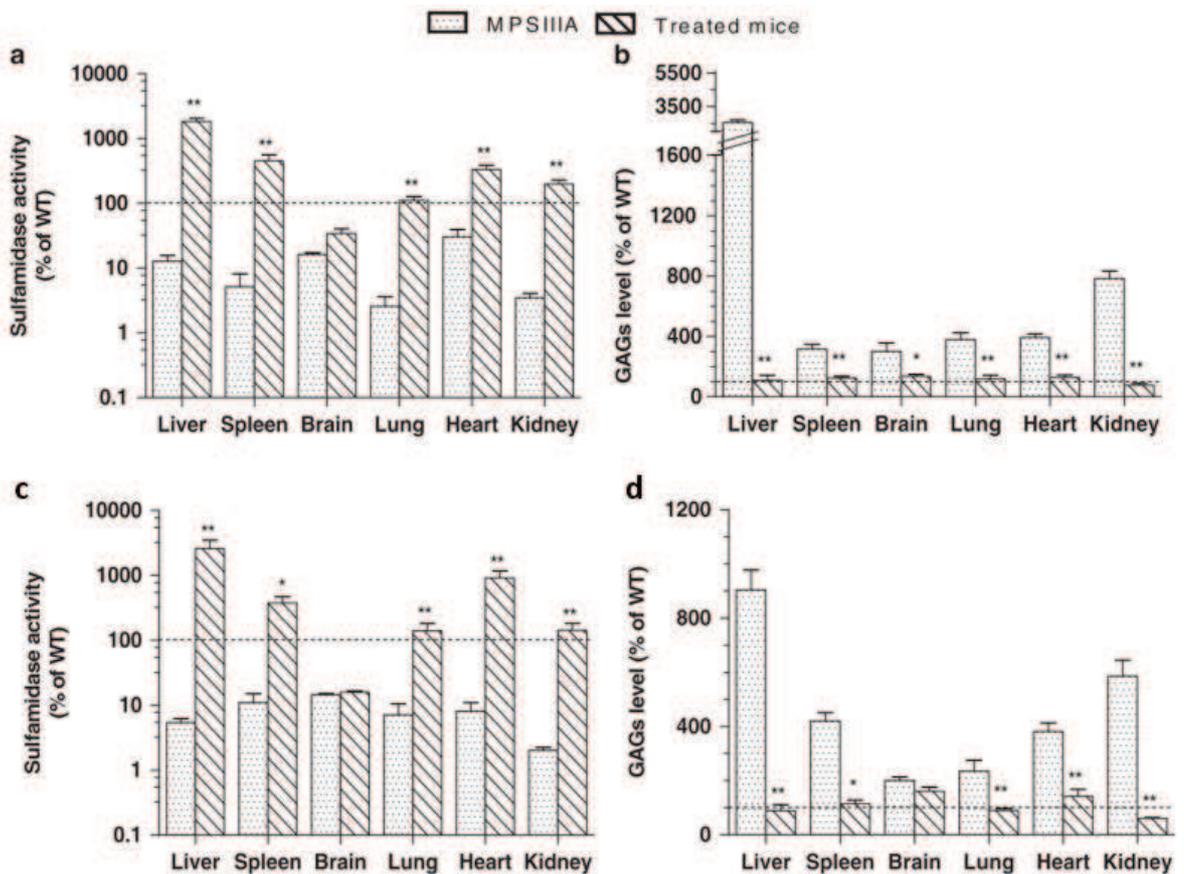


Figure 38 : Mesure de l'activité sulfamidase et de la quantité de GAGs dans différents organes de souris MPS IIIA traitées ou non.

Après administration par injection hydrodynamique de 100 µg de pFAR4-hAAT-SGSH à des souris MPS IIIA de 8 semaines, l'activité sulfamidase ainsi que le contenu en GAGs ont été déterminés dans le foie, la rate, le cerveau, les poumons, le cœur et les reins à 1 mois (a et b, n=6) et 6 mois (c et d, n=5) après injection. Des souris MPS IIIA non traitées et des souris saines (n=5) du même âge ont été incluses comme contrôles. Les résultats représentent le pourcentage par rapport aux valeurs obtenues avec des souris saines (ligne horizontale en pointillés) ±SEM. Les astérisques indiquent une différence significative entre les souris traitées et les non traitées déterminée par un test de Mann-Whitney (*=p<0,05 et **=p<0,01)(Quiviger et al. 2014).

L'administration du plasmide pFAR4-hAAT-SGSH aux cellules du foie de souris MPSIIIA permet donc l'obtention d'un niveau élevé d'activité sulfamidase, conduisant à une correction croisée efficace et sur le long terme de la quantité de GAGs dans les tissus périphériques.

Ces résultats révèlent le potentiel de cette approche pour le traitement par correction croisée de certaines maladies génétiques et plus particulièrement de celles ne nécessitant pas une correction dans le cerveau. Pour les maladies telles que MPS IIIA, une optimisation devra cependant être réalisée afin d'augmenter le niveau de la protéine thérapeutique dans le SNC, en fusionnant, par exemple, la protéine à de petits peptides favorisant le passage de la BHE par transcytose.

Ces résultats montrent également que l'utilisation d'un vecteur pFAR4, porteur d'une cassette d'expression spécifique du foie, permet d'atteindre des niveaux d'expression thérapeutiques prolongés dans le temps. La suite de nos travaux a porté sur l'étude des mécanismes jouant un rôle dans le maintien de l'expression du gène *Sgsh* à partir du vecteur pFAR4. La compréhension de ces mécanismes permettra de donner des pistes d'amélioration pour les vecteurs de thérapie génique non virale et également de mieux caractériser le vecteur pFAR4 avant son application clinique.

III RESULTATS

III.1 L'EXPRESSION DE LA SULFAMIDASE A PARTIR DU pFAR4 EST MAINTENUE DANS LE TEMPS

Afin de comprendre les mécanismes responsables du maintien de l'expression de la sulfamidase à partir du vecteur pFAR4, l'étude a été réalisée en comparant avec le profil d'expression obtenu à partir d'un plasmide conventionnel. Ce plasmide a été construit en introduisant par clonage la cassette d'expression hAAT-SGSH-BGH, portée par le plasmide pFAR4-hAAT-SGSH, contenant le gène *Sgsh*, placé sous le contrôle du promoteur spécifique du foie hAAT et du signal de polyadénylation BGH (Bovine Growth Hormone), dans le vecteur pKAR4. Le vecteur pKAR4 est dit « conventionnel » car il est porteur d'un gène de résistance à la kanamycine. Il est considéré comme un plasmide contrôle pour cette étude. Sa taille est supérieure à celle du pFAR4 d'environ 1 kb. Les deux plasmides de l'étude sont représentés Figure 39.

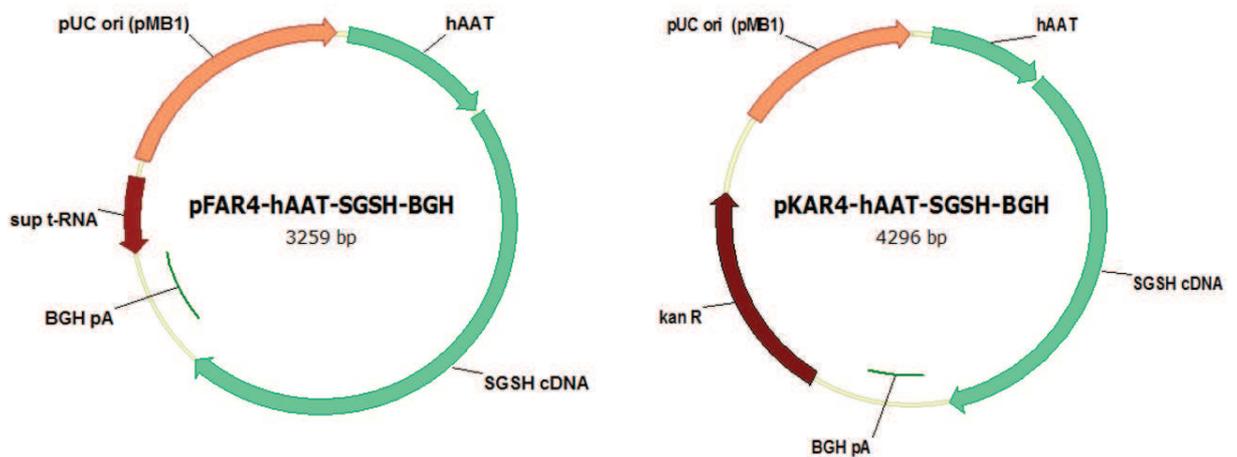


Figure 39: Cartes des plasmides dérivés du pFAR4 et du pKAR4 utilisés comme vecteurs d'expression de la sulfamidase dans le foie.

Le plasmide pFAR4 contient pour gène de sélection un gène codant un ARNt suppresseur d'une mutation introduite dans la souche TM#47-9a. Le plasmide pKAR4 est un plasmide dérivé du pVAX1 (Invitrogen™), porteur d'un gène de résistance à la kanamycine et contenant le même MCS (Multiple Cloning Site) que le pFAR4. La même cassette d'expression a été introduite dans ces deux plasmides. Elle contient le gène codant la sulfamidase murine (SGSH) dont l'expression est contrôlée par le promoteur du gène α -antitrypsine humain (hAAT) et par le signal de polyadénylation BGH (Bovine Growth Hormone).

Dans cette étude, 100 μ g de plasmide pFAR4-hAAT-SGSH et une quantité équimolaire du plasmide pKAR4-hAAT-SGSH (131,2 μ g) ont été administrés par injection hydrodynamique à deux groupes de souris C57BL/6J âgés de 6 à 8 semaines (n=7). L'expression de la sulfamidase a été suivie par dosage de l'activité de l'enzyme dans le sérum (Figure 40). Afin d'alléger la lecture, les souris ayant été injectées avec le dérivé pFAR4 ou dérivé pKAR4 seront par la suite désignées par « souris pFAR4 » et « souris pKAR4 », respectivement.

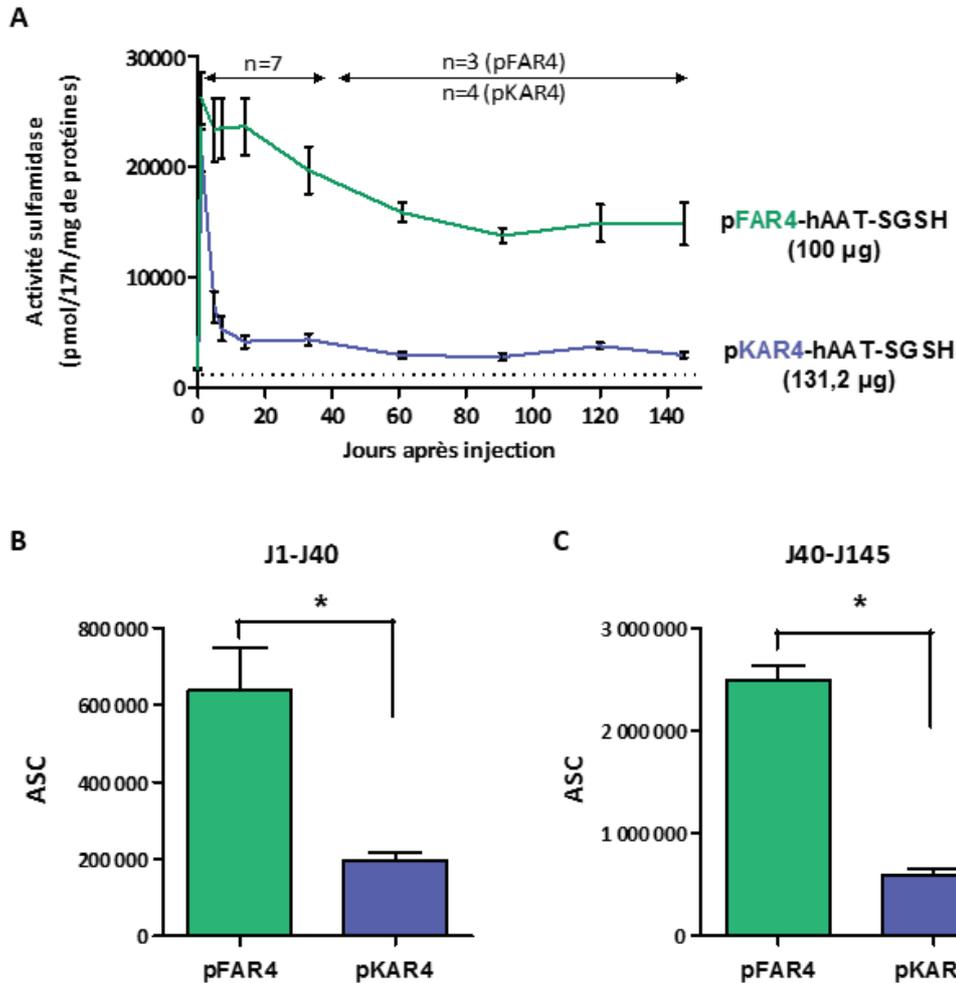


Figure 40: Mesure de l'activité de la sulfamidase sérique après administration des plasmides pFAR4-hAAT-SGSH et pKAR4-hAAT-SGSH au foie des souris.

A) Des quantités équimolaires des plasmides contenant le gène *Sgsh* décrits dans la figure 4 ont été administrées par injection hydrodynamique à des souris C57BL/6J sauvages (n=7 pour chaque groupe). Le niveau d'activité de la sulfamidase a été mesuré dans le sérum à différents temps suivant l'injection. Trois souris de chaque groupe ont été sacrifiées 40 jours après injection. B et C) Comparaison des aires sous la courbe des deux cinétiques de l'activité sulfamidase. Le niveau d'expression est significativement plus élevé lorsque le pFAR4 est utilisé comme vecteur (Test de Mann-Whitney, *, p-value<0,05).

Deux jours après administration, le niveau d'expression mesuré dans le sérum des souris pFAR4 et pKAR4 était, respectivement, 15 à 20 fois plus élevé que celui mesuré pour les souris sauvages (niveau moyen mesuré avant injection pour les souris des deux groupes (n=14) et représenté par la droite en pointillés) (Figure 40A). Cependant, une rapide chute d'expression a été observée pour les souris pKAR4 dès le cinquième jour post-injection. Pour les souris injectées avec le dérivé pFAR4, le niveau d'expression de l'enzyme décroît progressivement jusqu'à trois mois après injection, puis se stabilise et est maintenu à une valeur 5 fois plus élevée que celle mesurée avec le dérivé pKAR4. Plus de 4 mois après l'injection, l'activité sulfamidase sérique mesurée chez les souris pFAR4 est 10 fois supérieure à celle mesurée chez les souris contrôles non

transfectées. La réduction du nombre de souris par groupe à J40 est due au sacrifice d'une partie des souris nécessaires pour la suite de l'étude.

Les aires sous la courbe des cinétiques ont été déterminées pour les intervalles de temps [J1-J40] et [J40-J145]. Les valeurs obtenues montrent que la différence de niveau d'activité entre les souris pFAR4 et les souris pKAR4 est significative (Figure 40B et C).

Ainsi, en utilisant deux cassettes d'expression rigoureusement identiques, deux profils d'expression différents ont été obtenus. L'utilisation d'un promoteur spécifique du foie ne suffit donc pas pour maintenir le niveau d'expression dans le temps. Le résultat majeur de cette première étude est que la nature, et potentiellement la taille du vecteur ont un impact significatif sur le niveau d'expression du transgène, puisque le miniplasmide pFAR4, contrairement au plasmide contrôle, est capable de maintenir, *in vivo*, un niveau d'expression du transgène élevé et prolongé dans le temps.

III.2 HYPOTHESES

Plusieurs hypothèses ont été formulées afin d'expliquer la différence d'expression observée avec les deux types de vecteurs de gène sur le long terme. Le fait que le produit d'expression des deux plasmides soit le même nous a tout d'abord permis d'écarter l'hypothèse selon laquelle la chute d'expression observée pour le pKAR4 serait due à une réaction immunitaire dirigée contre la sulfamidase.

D'autres hypothèses ont été envisagées et sont présentées dans le schéma suivant.

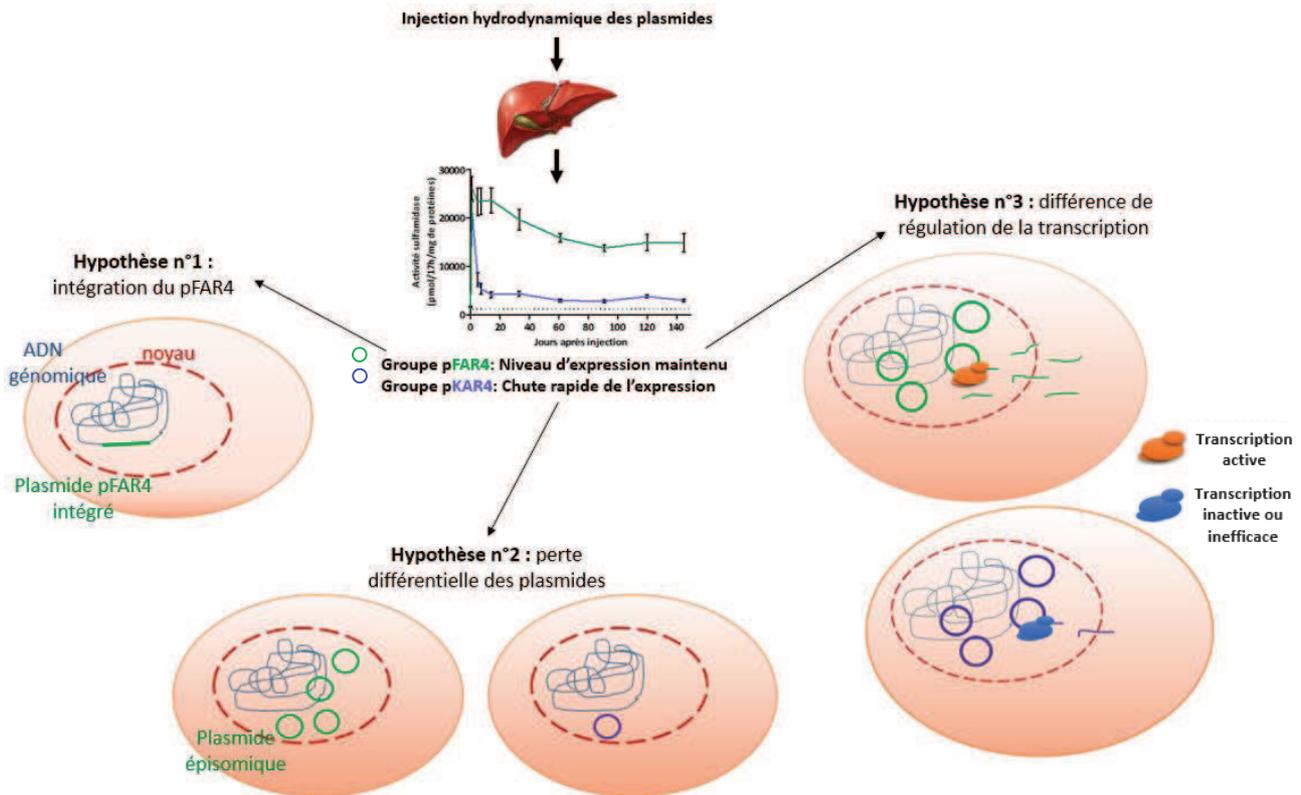


Figure 41: Hypothèses de travail

Trois hypothèses sont proposées pour expliquer la différence de profil d'expression de SGSH entre les souris pFAR4 et les souris pKAR4. Hypothèse n°1 : Le plasmide dérivé de pFAR4 se serait intégré dans le génome des hépatocytes et serait donc transmis aux cellules filles lors des divisions cellulaires permettant ainsi le maintien de l'expression dans le temps. Hypothèse n°2 : La chute d'activité observée pour les souris pKAR4 serait due à une perte plus importante du plasmide pKAR4-hAAT-SGSH. Hypothèse n°3 : La différence d'activité serait due à une différence de régulation au niveau transcriptionnel. La transcription à partir du pKAR4 serait inefficace ou inactive.

III.3 STATUT DU PLASMIDE pFAR4 DANS LE FOIE

La première étape pour expliquer le maintien de l'expression à partir du pFAR4 a été d'examiner le statut de ce vecteur dans les cellules transfectées du foie.

L'intégration aléatoire d'un plasmide dans le génome des cellules après transfection est considérée comme un événement rare. Cependant, les méthodes physiques permettant de favoriser le transfert de l'ADN, telles que l'électroporation ou l'injection hydrodynamique, pourraient également conduire à une augmentation de la fréquence d'intégration aléatoire. Dans le cas de l'électroporation, une étude a montré que cette méthode de transfert, comparée à une simple injection, n'entraînait pas d'augmentation de la fréquence d'intégration (Wang et al. 2004). En revanche, aucune étude n'a été réalisée pour vérifier l'impact de l'injection hydrodynamique sur la fréquence d'intégration aléatoire d'un plasmide dans le génome des hépatocytes.

Afin de déterminer le statut (épisomique ou intégré) dans lequel se trouve le plasmide dérivé de pFAR4 après administration par injection hydrodynamique, une division rapide des cellules du foie a été induite par injection intrapéritonéale de tétrachlorure de carbone (CCl₄) à des souris exprimant la sulfamidase recombinante.

Le CCl₄ est un composé organique dont les métabolites induisent la destruction des membranes cellulaires (Weber et al. 2003). L'injection intrapéritonéale de ce composé conduit à une nécrose des cellules du foie. Cette technique, notamment utilisée pour générer des modèles murins de fibrose hépatique (Hayes et al. 2014; Ho et al. 2010), a également été employée pour vérifier l'intégration de transgène médiée par l'intégrase ϕ C31 dans le génome des hépatocytes (Liesner et al. 2010). Les dommages hépatiques induits par l'injection d'une faible dose de CCl₄ sont en effet réversibles car ils sont rapidement suivis d'une augmentation de la multiplication cellulaire et d'une entière régénération tissulaire à partir des cellules non affectées par la nécrose.

Dans le cadre de notre expérience, cette multiplication cellulaire rapide induirait la perte du plasmide dans le cas où se ce dernier se trouverait sous forme épisomique, et conduirait donc à une chute de l'expression de *Sgsh*. Le niveau d'expression serait en revanche maintenu dans le cas où le plasmide serait intégré.

Deux groupes de 5 souris C57BL/6J ont reçu une dose de 100 μ g de plasmide pFAR4-hAAT-SGSH par injection hydrodynamique. 41 jours après cette injection, une dose de CCl₄ dans de l'huile d'olive a été injectée au premier groupe de souris par voie intrapéritonéale. Un volume équivalent d'huile d'olive a été administré au second groupe contrôle par la même voie. L'activité sulfamidase a été dosée à partir du sérum de chaque souris à différents temps avant et après l'induction de la division cellulaire par le CCl₄ (Figure 42).

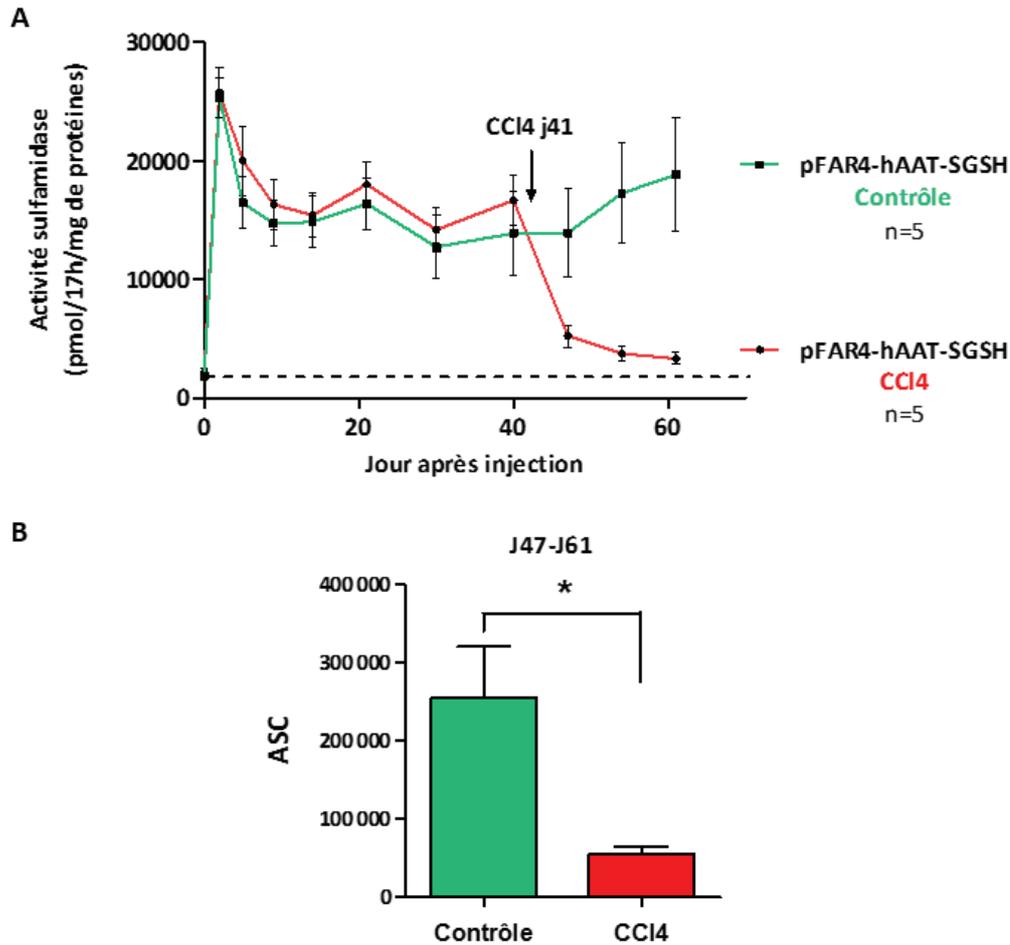


Figure 42: Mesure de l'activité sulfamidase après induction d'une multiplication cellulaire rapide par injection intrapéritonéale de CCl_4 .

A) 100 μg de pFAR4-hAAT-SGSH ont été administrés par injection hydrodynamique à deux groupes de 5 souris (groupes CCl_4 et Contrôle). 41 jours après l'administration de plasmide, 200 μL d'huile d'olive (Souris contrôle) ou d'une solution de CCl_4 (2 g/kg de souris diluée dans de l'huile d'olive) ont été injectés par voie intrapéritonéale. L'activité sulfamidase a été mesurée dans le sérum des souris à différents temps. B) Comparaison des aires sous la courbe pour les deux groupes de souris dans l'intervalle de temps J47 (correspondant au premier dosage de l'activité enzymatique après l'injection de CCl_4) à J61 (Test de Mann-Whitney, *, $p\text{-value} < 0,05$).

Ainsi, alors que l'activité sulfamidase des souris contrôles transfectées avec le plasmide pFAR4-hAAT-SGSH se maintient dans le temps, une chute significative de celle-ci est observée après injection de CCl_4 (Figure 42A). Les aires sous la courbe déterminées pour l'intervalle de temps [J47-J61] montrent une différence significative entre les deux conditions (Figure 42B). Cette étude suggère que le maintien du niveau d'expression observé à partir du plasmide pFAR4 est majoritairement dû à des formes épisomiques du vecteur.

III.4 COMPARAISON DES QUANTITES DE PLASMIDES DERIVES DE pFAR4 ET DE pKAR4

Le statut épisomique du pFAR4 ayant été vérifié, l'hypothèse selon laquelle la différence d'expression observée entre les souris pFAR4 et les souris pKAR4 serait due à une perte préférentielle de ce dernier a été testée.

Plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine d'une diminution du nombre de plasmide après transfert *in vivo*. La procédure de transfection peut notamment causer des dommages cellulaires entraînant la mort des cellules et par conséquent la perte du plasmide. Il est cependant peu probable qu'une perte différentielle de plasmide résulte de la procédure, puisque les souris des deux groupes ont été traitées en employant la même méthode.

L'activation du système immunitaire suite à l'injection peut également contribuer à l'élimination des cellules transfectées. Une étude réalisée en parallèle a notamment montré que, deux jours après l'injection, les niveaux sériques d'IL-12 (Interleukine 12) et de TNF- α (Tumor necrosis factor α) étaient plus élevés pour les souris ayant reçu le dérivé de pKAR4. Cependant, les niveaux de cytokines diminuent rapidement jusqu'à la valeur basale et plus aucune différence n'est observée entre les deux groupes de souris dès six jours après l'injection (Quiviger et al. 2014).

Par ailleurs, certaines études ont montré que la présence de motifs CpG non méthylés sur les plasmides pouvait conduire à une réponse inflammatoire de l'organisme, dirigée contre les cellules transfectées (Section II.2.3 de l'introduction). Ce phénomène, bien que controversé, conduirait à l'élimination des cellules et donc du plasmide. Le plasmide pKAR4-hAAT-SGSH contient 242 motifs CpG, sur chaque brin d'ADN, tandis que le plasmide pFAR4-hAAT-SGSH n'en contient que 158. On peut supposer qu'une réaction immunitaire dirigée contre les CpG non méthylés serait peut-être plus importante dans le cas des souris pKAR4 que des souris pFAR4 entraînant une perte plus élevée de plasmide pouvant expliquer la différence d'activité sulfamidase observée.

Afin de tester cette hypothèse, le nombre de copies de plasmides contenues dans les cellules du foie a été quantifié par PCR quantitative. Pour cela, des souris ont été sacrifiées 15 jours (n=4), 40 jours (n=3) et 145 jours (n=3 ou n=4, pour les groupes pFAR4 ou pKAR4, respectivement) après injection hydrodynamique et l'ADN total a été extrait à partir du foie. Les amorces pSGSH utilisés pour la PCRq ont été dessinées de façon à ce qu'elles s'hybrident avec le promoteur hAAT d'une part et l'ADNc du gène *Sgsh* d'autre part, permettant ainsi de quantifier de façon spécifique les plasmides. Les résultats ont été normalisés en utilisant des amorces spécifiques du gène de référence GAPDH (codant la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) présent en deux copies par génome diploïde. La figure 43 présente le nombre moyen de copies de plasmide par génome diploïde pour les différents temps.

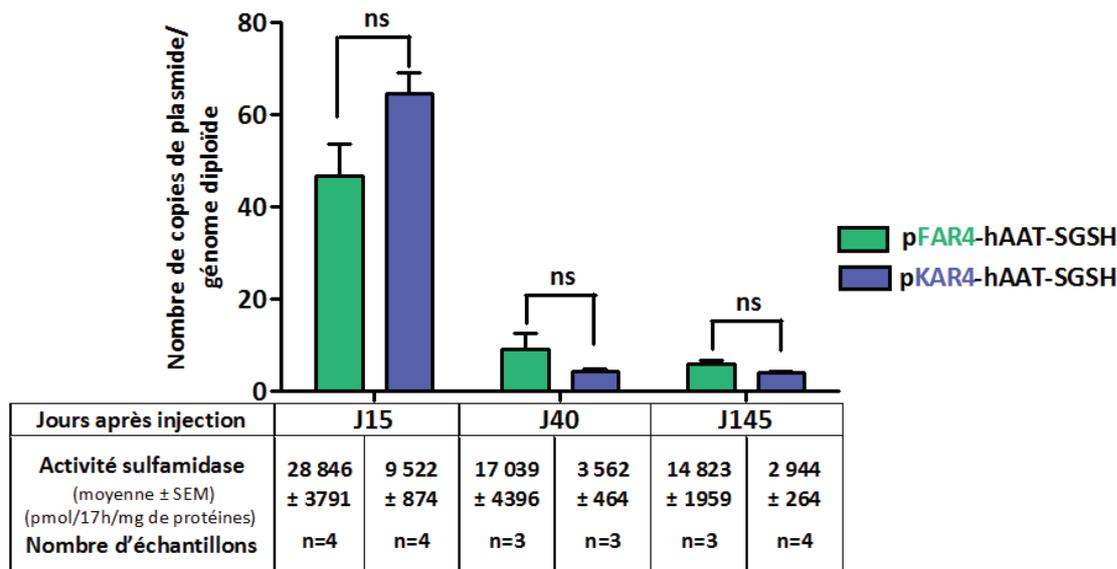


Figure 43: Nombre de copies de plasmide par génome diploïde.

L'ADN total a été extrait à partir du foie des souris sacrifiées 15, 40 et 145 jours après injection hydrodynamique des plasmides. Le nombre de copies de plasmides a été quantifié par PCRq en utilisant un couple d'amorces générant un amplicon spécifique de la cassette d'expression. La quantification du gène GAPDH, présent à hauteur de deux copies par génome diploïde, a permis de normaliser les résultats. Les histogrammes représentent les nombres de copies moyens ± SEM. Le tableau donne la valeur moyenne de l'activité sulfamidase mesurée pour chaque groupe de souris aux différents temps. D'après le test de Mann-Whitney, aucune différence significative n'est observée entre les nombre de copies (ns= différence non significative).

Une perte importante de plasmide est observée entre J15 et J40 pour les deux groupes. Cette diminution du nombre de copies peut être due à l'élimination des cellules transfectées endommagées par le processus de l'injection hydrodynamique ainsi qu'à la dégradation de plasmides non stables dans le noyau.

La différence observée entre le nombre de copies de plasmide pFAR4 et de plasmide pKAR4 est non significative à J40 et J145. Ainsi, à J145, alors que l'activité sulfamidase est cinq fois plus importante avec les souris pFAR4 qu'avec les souris pKAR4, des quantités de plasmides similaires ont été quantifiées dans le foie des animaux transfectés.

Nous pouvons donc en conclure que la différence d'activité sulfamidase mesurée entre les souris pFAR4 et les souris pKAR4 n'est pas due à une perte différentielle de plasmide. Cette hypothèse écartée, nous avons donc décidé d'étudier l'hypothèse selon laquelle une différence de régulation au niveau transcriptionnel serait à l'origine de la différence d'activité de la sulfamidase.

III.5 COMPARAISON DU NIVEAU DE TRANSCRIPTION DU GÈNE *SGSH*

Afin d'évaluer le niveau de transcription du gène codant pour la sulfamidase à partir des deux plasmides, une RT-PCRq a été réalisée à partir des ARNs totaux extraits des foies des souris sacrifiées à j15, j40 et j145. Les amorces utilisées pour amplifier les transcrits s'hybrident avec deux exons différents, de façon à ce que l'amplicon généré soit spécifique de l'ADN

complémentaire et non du gène situé sur le chromosome des cellules. Le gène codant pour la RNA polymérase II a été choisi comme gène de référence car son niveau de transcription est considéré comme constant car peu influencé par des stimuli intra ou extracellulaires (Radonić et al. 2004).

La Figure 44A montre le nombre moyen de copies de transcrits Sgsh par ng d'ARN total. Bien que les résultats ne soient pas présentés, le niveau de transcription a également été quantifié à partir de foie de souris sacrifiées 2 jours après injection hydrodynamique de 100µg de plasmide. Le niveau d'expression de la sulfamidase à J2 étant élevé à la fois pour les souris du groupe pFAR4 et du groupe pKAR4, la quantification des transcrits à partir de ces deux groupes a permis de s'assurer que le protocole mis en place permettait de réaliser une quantification efficace des transcrits.

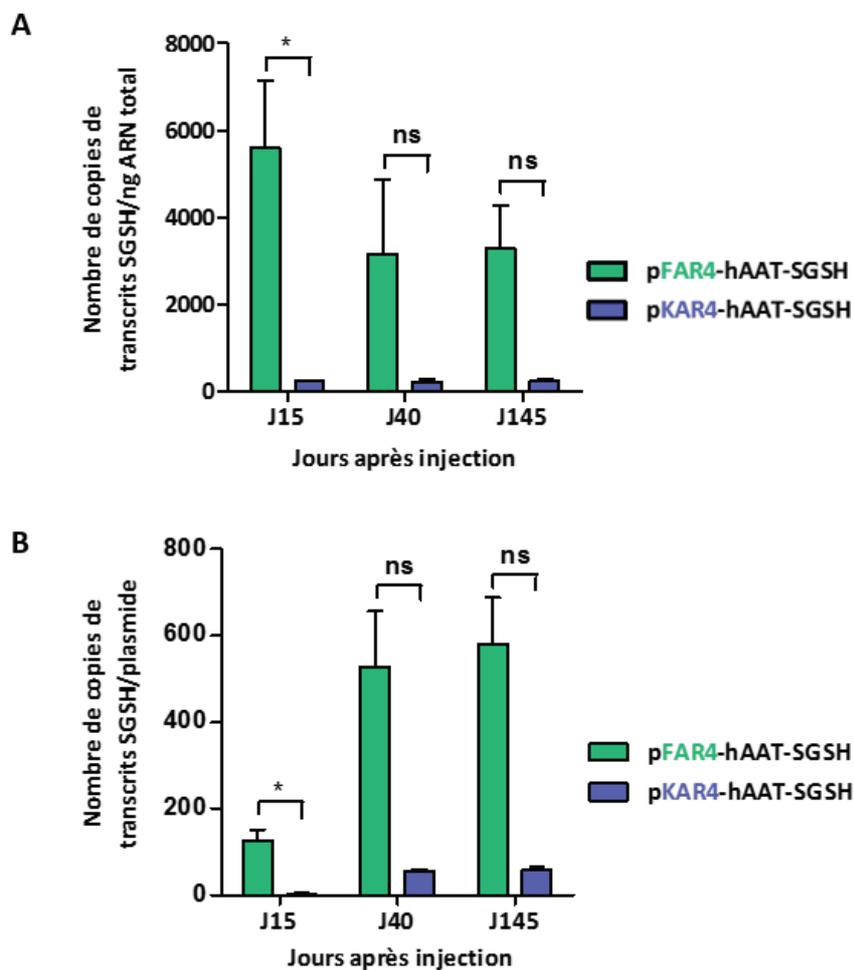


Figure 44: Quantification des transcrits Sgsh.

A) L'ARN total a été extrait à partir du foie des souris sacrifiées 15 jours (n=4), 40 jours (n=3) et 145 jours (n=3 ou n=4 pour les souris pFAR4 ou pKAR4, respectivement) après injection hydrodynamique des plasmides. Le nombre de copies de plasmides a été quantifié par PCRq en utilisant un couple d'amorces générant un amplicon spécifique du cDNA. La quantification des transcrits du gène de référence codant pour la RNAPolIII permet de déterminer la quantité totale d'ARN par puits de PCRq et donc de normaliser les résultats. Les histogrammes représentent les nombres de transcrits moyens par ng d'ARN total ± SEM. B) Les histogrammes représentent le nombre de transcrits associés à une copie de plasmide ± SEM. Les valeurs ont été comparées par un test statistique de Mann-Whitney, *P-value<0,05, ns : différence non significative.

Les niveaux de transcrits à J15, J40 et J145 montrent une bonne corrélation avec les niveaux d'activité sulfamidase mesurés pour les souris pFAR4 et pKAR4 à ces temps. En rapportant le nombre de transcrits au nombre de copies de plasmides (Figure 44B), on constate que le nombre de transcrits associés à une copie du plasmide pFAR4 est plus élevé que celui associé à une copie de plasmide pKAR4.

Ainsi, bien que le maintien des plasmides dans le noyau soit nécessaire pour une expression stable du transgène, le niveau d'expression semble, de plus, contrôlé par la quantité de transcrits. Plusieurs événements peuvent être impliqués dans la régulation de la transcription: (i) l'activité transcriptionnelle, (ii) la maturation des ARNm, (iii) leur transport vers le cytoplasme et (iv) leur maintien et stabilité conduisant soit à une dégradation soit à leur traduction. La cassette d'expression étant identique pour les dérivés pFAR4 et pKAR4, les transcrits produits sont donc de même nature et l'on peut donc supposer que c'est l'étape de transcription elle-même qui est régulée de façon différente pour les deux plasmides. Suivant cette supposition, la transcription du gène *Sgsh* à partir du pKAR4 serait inhibée. Le plasmide pFAR4 serait en revanche préservé de ce phénomène d'extinction de l'expression et le gène *Sgsh* activement transcrit. La suite de l'étude a consisté à étudier les phénomènes pouvant être impliqués dans cette différence de régulation transcriptionnelle.

III.6 COMPARAISON DU PROFIL EPIGENETIQUE DES VECTEURS pFAR4 ET pKAR4 :

Il a été montré que lorsqu'un plasmide entre dans le noyau, il est immédiatement condensé en une structure similaire à celle des nucléosomes par des histones et d'autres molécules, nommée chromatine (Jeong & Stein 1994; Hebbar & Archer 2008).

Dans le cas de l'ADN génomique, le niveau de compaction de la chromatine détermine l'accessibilité au génome et donc le niveau de transcription. La condensation de la chromatine est un phénomène dynamique régulé notamment par la modification post-traductionnelles de l'extrémité *N*-terminale des protéines histones. Les gènes transcrits sont associés à une chromatine dite « ouverte » appelée euchromatine et les gènes dont l'expression est réprimée sont associés à une chromatine condensée nommée hétérochromatine.

Bien que la compréhension de ces mécanismes ait fortement progressée en ce qui concerne l'ADN chromosomique, peu d'études ont à ce jour été réalisées sur la nature de la chromatine associée aux vecteurs plasmidiques épisomiques après transfection.

Le profil épigénétique associé à de l'ADN extrachromosomique après transfection par injection hydrodynamique a été étudié par l'équipe de M.A. Kay (Riu et al. 2007; Gracey Maniar et al. 2012). Ils ont notamment comparé les modifications d'histones associées à un plasmide codant la protéine hAAT et celles associées à un minicercle porteur de la même cassette d'expression mais dépourvu de squelette d'origine bactérienne. Les résultats de leurs études montrent un enrichissement en modifications d'euchromatine sur la cassette d'expression du minicercle et, au contraire, un enrichissement en marques d'hétérochromatine sur le plasmide. Ces résultats concordaient avec les niveaux d'expression de hAAT mesurés dans le sérum des souris transfectées, qui étaient plus élevés pour celles transfectées avec le minicercle que pour celles transfectées avec le plasmide.

Prenant en compte les résultats de la littérature, nous nous sommes posés la question suivante : la différence d'efficacité de transcription à partir des deux vecteurs pFAR4 et pKAR4 serait-elle due à une différence de régulation épigénétique, elle-même influencée par la nature et la longueur de leurs squelettes plasmidiques?

Nous avons donc décidé d'étudier les modifications épigénétiques associées aux plasmides en réalisant un essai d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation).

La Figure 45 présente le principe général d'un essai de ChIP.

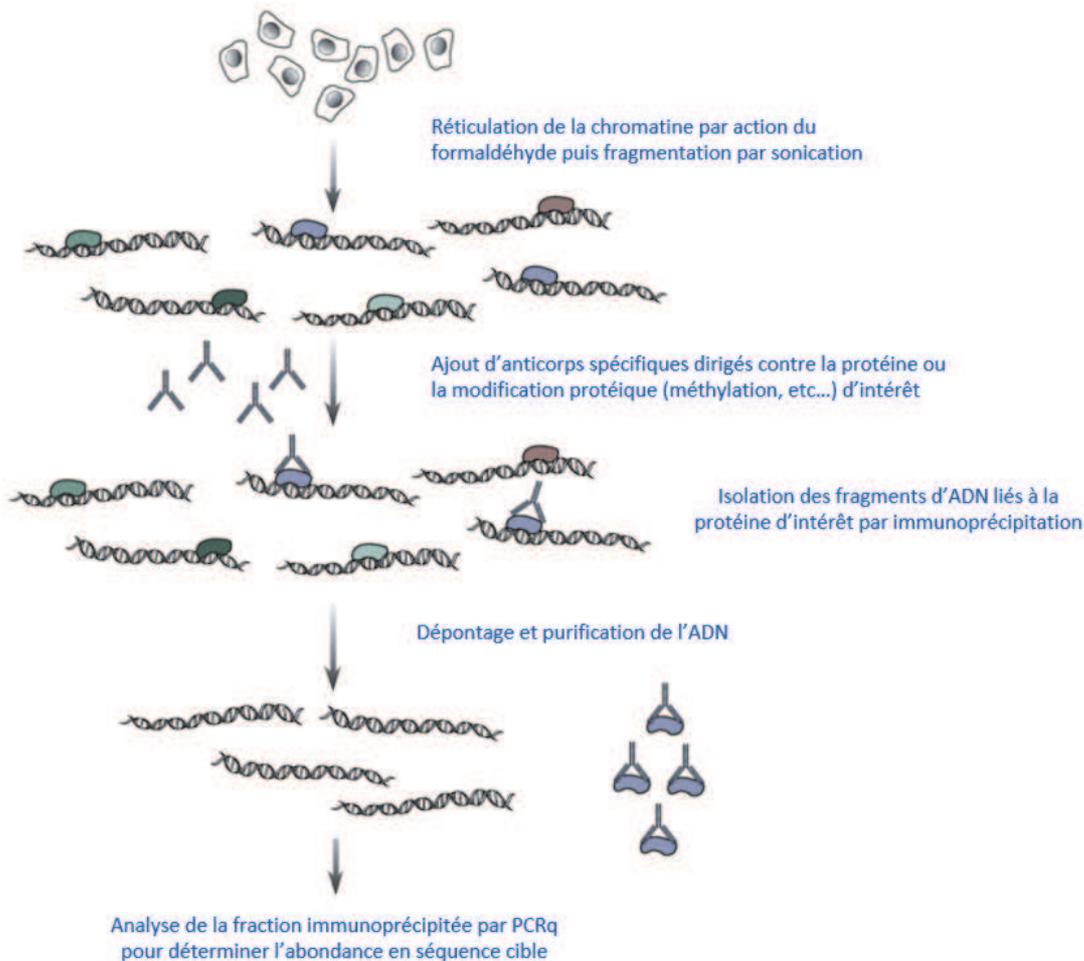


Figure 45: Principe général d'un essai de ChIP (Chromatin Immunoprecipitation).

Le tissu est initialement traité avec un agent de réticulation, le formaldéhyde, qui lie de façon covalente à l'ADN et les protéines (facteurs de transcription, histones...) interagissant avec ce dernier. La chromatine est ensuite isolée puis fragmentée en fragments de 100 à 1 000 pb par sonication. Un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt est ajouté et immunoprécipite les fragments de chromatine contenant cette protéine. Les complexes ADN-protéines immunoprécipités sont ensuite dépointés et les fragments d'ADN purifiés. Une PCR quantitative est généralement réalisée pour vérifier si une séquence d'ADN donnée est associée à la protéine d'intérêt. (Image adaptée d'après Hoffman & Jones 2009).

Les essais de ChIP ont été réalisés à partir des foies des souris sacrifiées à J15. Le choix de ce groupe de souris repose sur le fait qu'à J15, l'inhibition de la transcription pour le pKAR4 est déjà observable et que le nombre de copies de plasmides est plus important qu'à J40 ou J145, la probabilité d'immunoprécipiter les marques de chromatine associées aux plasmides est donc plus élevée.

III.6.1 Choix des séquences de la cassette d'expression et des modifications épigénétiques étudiées

III.6.1.1 Choix des séquences d'études et des amorces associées :

L'initiation de la transcription du gène *Sgsh* contenu dans la cassette d'expression a lieu au niveau du promoteur hAAT. Elle nécessite l'interaction de facteurs de transcription avec des séquences caractéristiques localisées dans cette région ainsi que le recrutement de la machinerie

transcriptionnelle, dont l'ARN polymérase II. Les principaux facteurs de transcription interagissant avec le promoteur hAAT dans le foie sont les facteurs HNF1 α et HNF4 (HNF : Hepatocyte Nuclear Factor)(Schrem et al. 2002). Les séquences de liaison de ces facteurs sont précisées Figure 46. Un premier couple d'amorces nommé hAAT a été choisi pour amplifier une séquence située de part et d'autre du site d'initiation de la transcription (TSS : Transcription Start Site) et comprenant le site de liaison de HNF1 α . Le second couple d'amorces (SGSH) a été choisi pour amplifier une séquence présente sur l'ADNc codant la sulfamidase et s'hybride avec l'exon 1 et l'exon 2. L'amplicon généré par ces amorces est donc spécifique de la cassette d'expression car les deux exons sont séparés par un intron de 2590 pb sur la séquence endogène chromosomique.

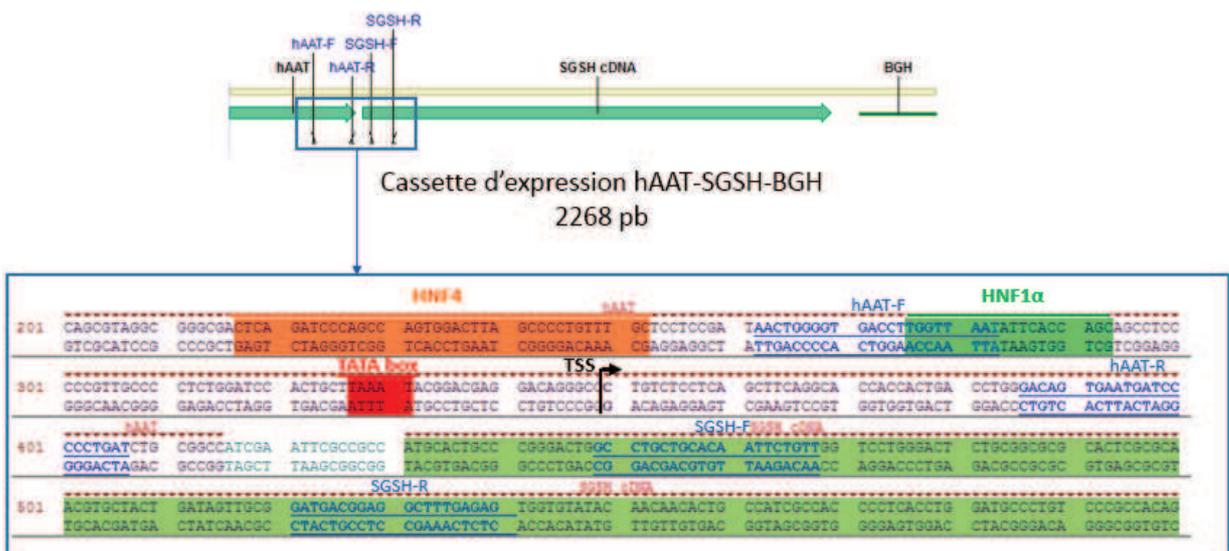


Figure 46: Choix des séquences de la cassette d'expression ciblées par l'essai de ChIP.

Un premier couple d'amorces de PCRq a été dessiné pour amplifier une séquence située au niveau du promoteur hAAT de part et d'autre du site d'initiation de la transcription (TSS : Transcription Start Site) et à proximité des sites de liaisons des principaux facteurs de transcription agissant sur ce promoteur dans le foie (HNF1 α et HNF4 : Hepatocyte Nuclear Factor 1 α et 4). Le second couple d'amorces a été dessiné de façon à amplifier une séquence présente sur l'ADNc du gène *Sgsh* et à cheval sur l'exon 1 et l'exon 2.

III.6.1.2 Modifications épigénétiques étudiées :

Trois modifications épigénétiques ont été ciblées et sont listées dans le tableau ci-dessous :

Nom de la modification	Etat de la chromatine associé à la modification
H3K27me3 tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3	Hétérochromatine
H3K4me2/3 di et tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3	Euchromatine
RNAPIISer2P Phosphorylation de la sérine 2 du motif C-terminal de la RNA polymérase II	RNA polymérase II active (en phase d'élongation)

Tableau 10: Modifications épigénétiques ciblées par les essais de ChIP.

H3K27me3 fait partie des trois méthylations de lysines impliquées dans la répression de l'expression des gènes (Kouzarides 2007; Kim & Kim 2012a). Elle est plus particulièrement enrichie dans la région 5' des gènes réprimés (Brookes & Pombo 2009).

La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est impliquée dans l'élongation transcriptionnelle est plus particulièrement présente dans la région 5' des gènes activement transcrits (Kouskouti & Talianidis 2005; Bannister & Kouzarides 2011).

L'ARN polymérase II (RNAPII) est l'enzyme clé de la transcription et également du recrutement des protéines favorisant l'établissement d'un état « ouvert » de la chromatine. Ce recrutement est notamment permis par des modifications post-traductionnelles de son domaine C-terminal et plus particulièrement par la phosphorylation des résidus sérine contenus dans une séquence d'acides aminés répétée dont le consensus est YSPTSPS (Corden 1990). La RNAPII est recrutée au niveau des promoteurs sous forme non phosphorylée et l'initiation de la transcription s'effectue par phosphorylations séquentielles. Ainsi, la phosphorylation de la Sérine 5 permet à l'enzyme de « s'échapper » du promoteur et de recruter l'histone H3 méthylée sur la lysine 4 (H3K4me2/3). La phosphorylation de la sérine 2 initie ensuite l'élongation transcriptionnelle. Cette modification se trouve donc enrichie au niveau des régions activement transcrites (Brookes & Pombo 2009).

Le tableau ci-dessous donne le profil de modifications attendu pour la cassette d'expression du pKAR4 et du pFAR4, en se basant sur les hypothèses suivantes : (i) l'inhibition de la transcription à partir du pKAR4 serait due à un enrichissement en marques d'hétérochromatine associées à la cassette d'expression et donc à une compaction de l'ADN limitant la fixation des activateurs de la transcription ; (ii) le maintien de la transcription à partir du pFAR4 serait lié à un enrichissement en marques d'euchromatine au niveau de la cassette d'expression facilitant l'accès aux facteurs et médiateurs de la transcription.

Plasmide	Modification	Séquence cible hAAT	Séquence cible SGSH
pFAR4	H3K27me3	-	-
	H3K4me2/3	+	+
	RNAPIISer2P	-	+
pKAR4	H3K27me3	+	+
	H3K4me2/3	-	-
	RNAPIISer2P	-	-

Tableau 11: Profils d'enrichissement en modifications épigénétiques attendus au niveau des séquences cibles contenues dans les plasmides pFAR4 et pKAR4.

III.6.2 Optimisation de l'extraction et de la sonication de la chromatine :

Les essais de ChIP ont été réalisés à l'aide du kit High Sensitivity ChIP Kit de chez Abcam et d'anticorps spécialement dédiés à des applications de ChIP (Anticorps « ChIP Grade »).

Avant de procéder à l'étape d'immunoprécipitation, les étapes de réticulation, d'extraction et de sonication de la chromatine à partir de broyat de foies congelés ont tout d'abord été optimisées :

- Plusieurs extractions ont été réalisées à partir de différentes quantités de tissu de départ afin de trouver la quantité permettant une préparation de chromatine propre et sonicable.

- Le temps d'incubation dans le formaldéhyde, nécessaire à la réticulation de l'ADN et des protéines a également été optimisé. Un temps d'incubation trop long peut en effet inhiber la sonication et entraîner une dénaturation de protéines (Das et al. 2004).

- Le programme de sonication du Bioruptor® (Bioruptor® Standard, Diagenode) a également été modifié afin d'obtenir une chromatine soniquée enrichie en fragments d'ADN de taille comprise entre 100 et 1000 pb.

Le protocole final est présenté en détail dans la partie Matériel et Méthodes et la Figure 46 montre le profil de l'ADN obtenu après optimisation des différentes étapes d'extraction et après dépontage (élimination de la réticulation entre l'ADN et les protéines associées).

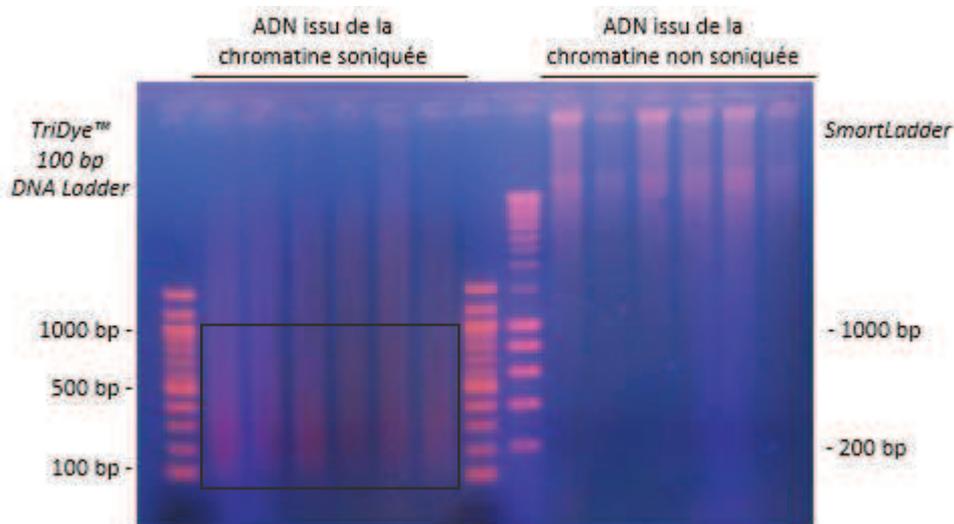


Figure 47: Vérification des étapes d'extraction et de sonication de la chromatine issue du foie des souris sacrifiées à J15 post-injection.

Avant de procéder à l'étape d'immunoprécipitation, le profil de la chromatine soniquée est tout d'abord vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. L'ADN extrait à partir de la chromatine avant et après sonication est déposé en parallèle de marqueurs de taille (le TriDye™ 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs et le SmartLadder, Eurogentec).

La sonication permet un enrichissement en fragments de taille comprise entre 100 et 1000 paires de bases. Des fragments de taille plus importante sont également observés. L'optimisation des

différentes étapes n'a cependant pas permis de réduire d'avantage la taille de ces fragments. Ce profil de sonication est probablement dû à la nature du matériel de départ (du tissu et non pas des cellules en culture) et non pas à la quantité de matériel, ni au temps d'incubation dans le formaldéhyde puisque des essais réalisés en utilisant une quantité moindre de matériel et sans étape de fixation au formaldéhyde génèrent le même profil de fragmentation.

Il est à noter que le profil visualisé sur le gel ci-dessus correspond au profil de sonication de l'ADN total extrait des cellules de foie. Il aurait été intéressant de pouvoir visualiser plus particulièrement l'état de fragmentation des plasmides, en effectuant par exemple un Southern Blot en utilisant des sondes spécifiques des plasmides.

III.6.3 Modifications épigénétiques associées aux plasmides

Afin de réaliser un essai de CHIP, de la chromatine a été préparée à partir du foie de trois souris pFAR4 et 3 souris pKAR4 (6 échantillons de chromatine au total).

Trois essais de CHIP ont été réalisés. Pour chacun des essais, 6 immunoprécipitations (IPs) sont effectuées pour chaque échantillon de chromatine (Tableau 12): trois IPs ciblant les modifications épigénétiques décrites plus haut (IPs 1 à 3) et trois IPs « contrôles » (IPs 4 à 6). Ainsi, 36 immunoprécipitations sont réalisées par essai de CHIP. Pour chaque IP, 8 µg de chromatine sont ajoutés à 0,8 µg d'anticorps.

N° de l'IP	Anticorps
1	Anti-H3K27me3
2	Anti-H3K4me2/3
3	Anti-RNAPIISer2P
4	Anti-RNAPII (contrôle positif)
5	IgG non immunes (contrôle négatif)
6	Sans anticorps

Tableau 12: Immunoprécipitations réalisées par essai pour chaque échantillon de chromatine.

Une étape de dépontage puis de purification permet d'extraire la fraction d'ADN immunoprécipitée par chaque anticorps. Cette fraction est ensuite analysée par PCRq afin de déterminer l'enrichissement en séquences cibles (hAAT et SGSH). L'enrichissement est déterminé à partir des Ct obtenus par PCRq et par rapport à la valeur obtenue pour le contrôle négatif en utilisant la formule suivante :

$$\text{Facteur d'enrichissement} = 2^{-(Ct\ IP - Ct\ IgG\ non\ immunes)}$$

La figure 48 représente l'enrichissement moyen en séquences cibles hAAT (Figure 48A) et SGSH (Figure 48B) dans la fraction immunoprécipitée par chaque anticorps par rapport à celle immunoprécipitée par les IgG non immunes pour les souris pFAR4 et les souris pKAR4.

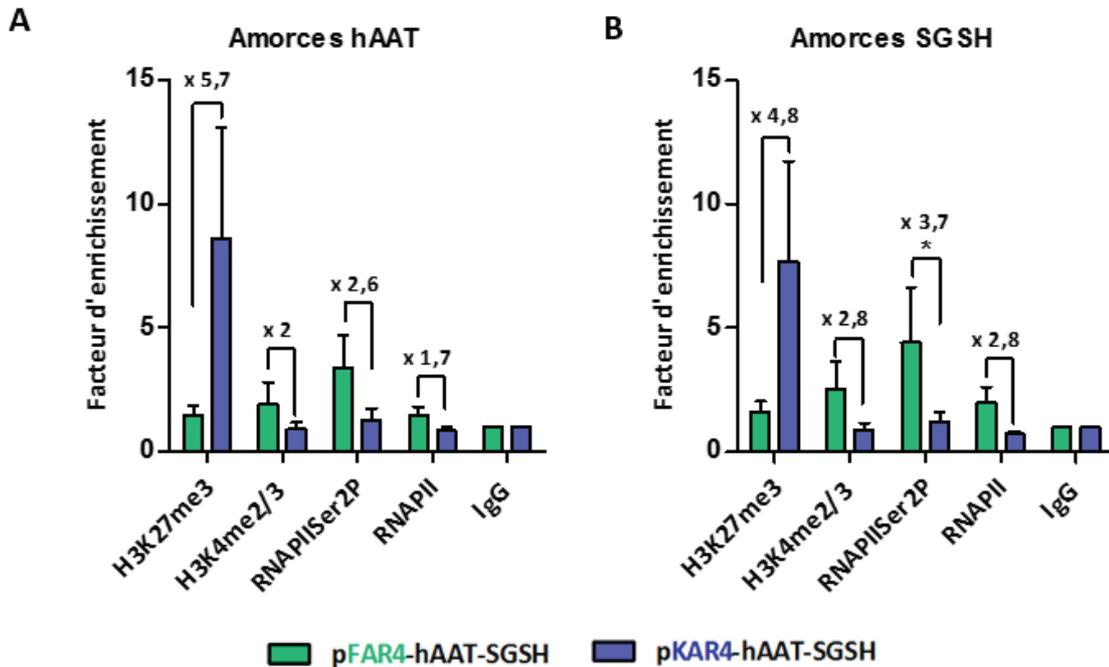


Figure 48 : Facteur d'enrichissement en séquences cibles hAAT et SGSH dans les fractions d'ADN immunoprécipitées.

L'essai de CHIP a été réalisé à partir de la chromatine extraite à J15. Les fractions d'ADN issues de chaque immunoprécipitation ont été analysées par PCRq en utilisant les couples d'amorces s'hybridant au niveau du promoteur (hAAT)(A) et de l'extrémité 5' du gène *Sgsh* (SGSH)(B). Le facteur d'enrichissement moyen est déterminé à partir des Ct de la PCRq et par rapport au Ct du contrôle négatif qui consiste en la fraction issue de l'immunoprécipitation avec les IgG non immunes. Trois essais indépendants de CHIP + PCRq ont été réalisés. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM des résultats des trois PCRqs pour chaque groupe pFAR4 et pKAR4. Les différences ont été analysées par un test de Mann-Whitney et sont toutes non significatives sauf indication contraire (*P-value < 0,05).

Les souris injectées avec le dérivé pKAR4 montrent un enrichissement environ 5 fois plus important en comparaison à celles injectées avec le dérivé pFAR4 en modification d'histone H3K27me3, un marqueur d'hétérochromatine. Cette enrichissement est constaté à la fois au niveau du TSS et au niveau de la région 5' du gène *Sgsh*. Ces résultats sont concordants avec l'extinction de l'expression observée *in vivo* chez ces souris. Bien que la différence avec le bruit de fond soit faible, un faible enrichissement en H3K27me3 est également observé sur le pFAR4, indiquant qu'une partie de la population plasmidique pFAR4 est condensée sous forme d'hétérochromatine.

La différence de profil par rapport aux modifications épigénétiques associées à une transcription active est moins importante que celle observée pour l'hétérochromatine. En effet, un faible enrichissement (facteur 2 à 2,8 par rapport au pKAR4) en marqueurs d'euchromatine H3K4me2 et H3K4me3 est observée pour le pFAR4 au niveau des deux séquences cibles.

On peut également remarquer la présence de l'ARN polymérase active (phosphorylée sur la sérine 2) au niveau de la séquence SGSH du pFAR4, ce qui est en accord avec le maintien de l'expression observé pour ce plasmide. Il est cependant surprenant d'observer cet enrichissement en ARN polymérase active également au niveau de la séquence située sur le promoteur. En effet, la présence de cette modification à ce niveau n'était pas attendue puisque l'ARN polymérase II n'acquiert cette modification que lors de l'élongation et que la présence de l'enzyme au niveau du promoteur est normalement associée à la phosphorylation de la sérine 5 de son domaine C-terminal.

Un enrichissement en ARN polymérase II est observé au niveau de la séquence SGSH du pFAR4 (facteur 2 par rapport au bruit de fond) mais pas pour le pKAR4, ce qui est également concordant avec la différence du niveau de transcription mesurée entre ces deux plasmides.

Afin de faciliter la comparaison du profil épigénétique de la cassette d'expression des deux plasmides, nous avons déterminé pour chaque paire d'amorces, les ratios « H3K27me3 / H3K4me2/3 » (Figure 49A) et « RNAPIISer2P / RNAPII » (Figure 49B). Le premier ratio permet de comparer l'enrichissement relatif en marqueur d'hétérochromatine par rapport à l'enrichissement en marque d'euchromatine. Le degré d'inactivation de la transcription est d'autant plus important que ce ratio est grand. Le second ratio permet d'estimer la proportion en ARN polymérase active par rapport à l'ARN polymérase totale présente au niveau de la cassette d'expression. Dans ce cas, plus le ratio est élevé, plus la transcription est active.

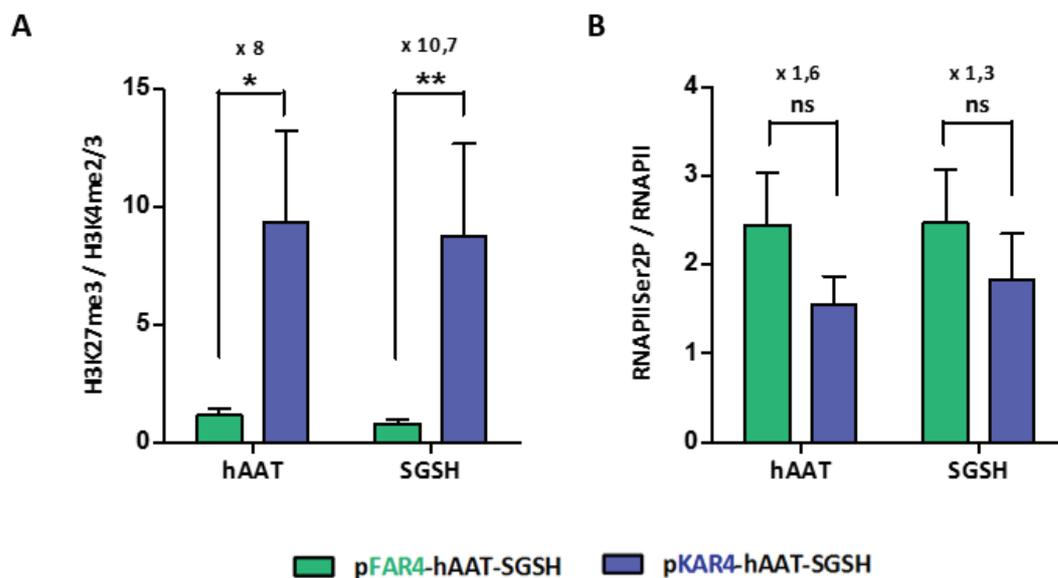


Figure 49: Comparaison des modifications de la chromatine du pFAR4 et du pKAR4 au niveau du promoteur hAAT et du gène Sgsh.

A. Ratio entre les enrichissements en séquences hAAT et SGSH des fractions associées à l'hétérochromatine (H3K27me3) et l'euchromatine (H3K4me2/3). B. Ratio entre les enrichissements en séquences hAAT et SGSH des fractions associées à l'ARN polymérase active (RNAPIISer2P) et l'ARN polymérase totale (RNAPII). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM des ratios des trois PCRq réalisées.

Le ratio H3K27me3 sur H3K4me2/3 est significativement plus élevé pour le plasmide dérivé de pKAR4 que pour le plasmide dérivé de pFAR4 (Figure 49A). Une différence d'un facteur 8 est observée au niveau du promoteur et d'un facteur 10,7 au niveau du gène *Sgsh*. Cette observation est bien concordante avec le niveau de transcription et d'activité de la sulfamidase. La chute d'expression du transgène pour le plasmide pKAR4 semble donc bien être liée à un enrichissement en modification associée à l'hétérochromatine. Le pFAR4 est moins sujet à cet enrichissement et est peut-être préservé par le faible enrichissement en marque d'euchromatine observé.

Bien que la proportion en ARN polymérase II transcriptionnellement active soit plus importante pour le dérivé de pFAR4, la différence avec le dérivé de pKAR4 n'est pas significative (Figure 49B). Cette faible différence ne semble pas concorder avec le niveau de transcription quantifié avec les marques d'euchromatine et d'hétérochromatine. Ceci peut être dû à un enrichissement également plus important en ARN polymérase totale (active ou « en pause ») au niveau des séquences régulatrices en 5' de *Sgsh* du dérivé de pFAR4 par rapport à celui observé pour le dérivé de pKAR4. Le choix des séquences ciblées pour étudier la phosphorylation de la sérine 2 semble *a posteriori* ne pas être le plus optimal. En effet, l'amplification d'une séquence située à l'extrémité 3' du gène *Sgsh* permettrait sûrement d'observer un ratio RNAPIISer2P / RNAPII plus élevé (Kim et al. 2010). La présence de phosphorylation sur la sérine 2 de l'ARN polymérase II au niveau du promoteur peut-être expliquée par le fait que la distance entre les deux couples d'amorces soit inférieure à la taille des fragments obtenus après sonication (compris entre 100 et 1000 paires de bases), ainsi des fragments enrichis en modifications RNAPIISer2P au niveau du gène *Sgsh* mais contenant également la séquence hAAT peuvent être à l'origine de ce résultat. Cet essai pourrait être consolidé en ciblant d'autres séquences du gène *Sgsh*.

IV DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons cherché à expliquer la différence de niveau d'activité de l'enzyme sulfamidase observée entre les souris transfectées par injection hydrodynamique avec le miniplasmide biosécurisé pFAR4-hAAT-SGSH et celles transfectées avec le plasmide conventionnel porteur d'un gène de résistance à la kanamycine pKAR4-hAAT-SGSH.

Nous avons dans un premier temps vérifié que le maintien de l'expression observé à partir du pFAR4 n'était pas dû à l'intégration du plasmide dans le génome des hépatocytes transfectés. La quantification du nombre de copies de plasmide ainsi que de la quantité de transcrits nous a, par la suite, permis de constater que le niveau d'activité sulfamidase corrélait avec la quantité de transcrits et non pas avec le nombre de plasmides par cellule. En effet, un nombre similaire de copies de plasmides par cellule a été quantifié pour les deux groupes de souris. Cette observation nous a permis, d'une part, d'exclure l'implication d'une réponse immunitaire dirigée vers les cellules transfectées avec le dérivé pKAR4 dans la chute de l'activité sulfamidase observée pour ce vecteur et nous a permis, d'autre part, de conclure qu'une différence au niveau de la régulation de la transcription était à l'origine de la différence d'activité mesurée. La transcription à partir du pKAR4 serait réprimée, conduisant à une extinction rapide de l'expression, tandis que la nature du plasmide pFAR4 préserverait ce dernier de ce phénomène et le maintiendrait dans un état transcriptionnellement actif.

Les étapes conduisant à la transcription d'un gène sont multiples et impliquent un très grand nombre de facteurs interagissant les uns avec les autres. Il a été montré que dès son entrée dans le noyau, le plasmide est condensé sous forme de chromatine (Jeong & Stein 1994; Riu et al. 2007). L'ADN épisomique est ainsi enroulé autour de plusieurs unités protéiques, formant des nucléosomes, constitués d'un octamère de protéines histones. D'autres protéines pouvant se lier à l'ADN, telles que les facteurs de transcription, ainsi que des protéines interagissant avec les histones vont initier l'accumulation de facteurs spécifiques de l'activation ou de la répression de la transcription. Dans le cas de l'ADN génomique, les gènes dont l'expression est réprimée sont associés à des histones porteuses de modifications post-traductionnelles spécifiques de l'hétérochromatine. Inversement, des modifications d'histones caractéristiques de l'euchromatine sont associées aux gènes activement transcrits. Nous avons donc supposé que les plasmides dérivés du pFAR4 et du pKAR4 devaient avoir des profils de chromatine différents et émis l'hypothèse que le pKAR4 était associé à des modifications d'histones caractéristiques de l'hétérochromatine tandis que le pFAR4 était plutôt associé à des modifications d'histones spécifiques de l'euchromatine.

Les résultats des essais de ChIP ont confirmé notre hypothèse puisque une proportion élevée en modification H3K27me3 (tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3), caractéristique de l'hétérochromatine, a été mesurée sur la cassette d'expression du dérivé du pKAR4 et non pas sur celle contenue par le dérivé du pFAR4. Bien qu'un léger enrichissement en marque d'euchromatine H3K4me2/3 ait été mesuré pour le pFAR4, la différence entre les deux plasmides pour cette marque n'était pas significative. La conclusion majeure issue de ces résultats est que le statut transcriptionnel d'un plasmide semble pouvoir être caractérisé par l'enrichissement en marque H3K27me3. Cette conclusion est en accord avec les résultats de ChIP-seq publiés par l'équipe de M. A. Kay qui montraient un enrichissement en modification H3K27me3 sur un plasmide dont l'expression du transgène *in vivo* avait rapidement chuté après transfection par injection hydrodynamique (Gracey Maniar et al. 2012)(Figure 50).

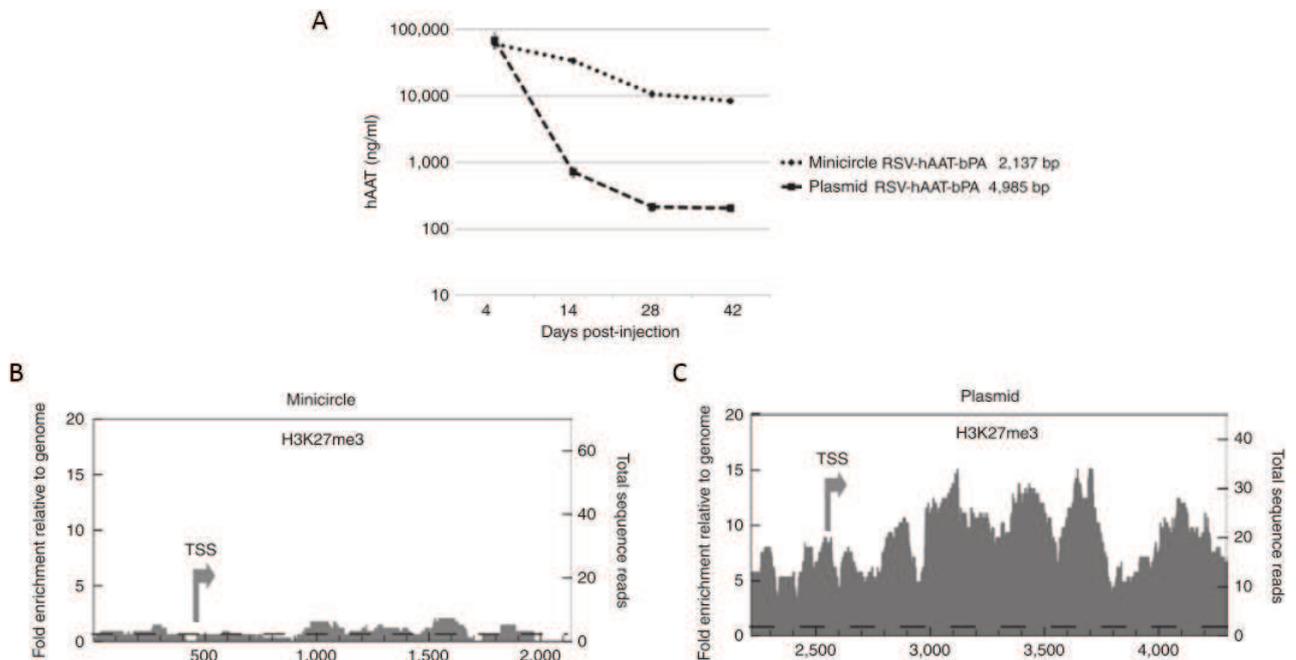


Figure 50 : Comparaison de l'expression du gène hAAT à partir d'un minicercle et d'un plasmide et de leur enrichissement respectif en marque d'histone H3K27me3.

A) Dosage par ELISA suivant la quantité de protéine hAAT sécrétée dans le sérum de souris injectées par l'administration hydrodynamique de solution de plasmide ou de minicercle codant hAAT. B et C) Enrichissement en marque H3K27me3 mesuré par ChIP-seq sur la cassette d'expression du minicercle (B) et du plasmide (C) extraits des foies des souris 6 semaines après l'injection hydrodynamique.

L'enrichissement en modification H3K27me3 suggère l'implication des protéines du groupe Polycomb dans la régulation de l'expression du transgène porté par le vecteur pKAR4. C'est en effet le complexe protéique PRC2 (polycomb repression complex 2) qui, après son recrutement au niveau des nucléosomes, est responsable de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (Kim & Kim 2012b; Margueron & Reinberg 2011).

Bien que l'enrichissement en modifications H3K27me3 ait été mesuré au niveau de la cassette d'expression du dérivé du pKAR4, il est peu probable que des séquences de la cassette

d'expression soient responsables du recrutement de PRC2 puisque la cassette est identique à celle du pFAR4. La différence entre les deux vecteurs réside uniquement dans la taille et la composition de leur squelette plasmidique. Il est donc probable que le complexe PRC2 ait tout d'abord été recruté au niveau du squelette plasmidique du pKAR4, puis que la modification post-traductionnelle H3K27me3 ait été propagée aux nucléosomes adjacents (Margueron et al. 2009). Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons cherché dans la littérature la nature des sites du génome ciblés par le complexe PRC2.

Chez la Drosophile, ces séquences cibles sont connues sous le nom de Polycomb Response Elements (PRE). En ce qui concerne les mammifères, les éléments équivalents de telles séquences sont encore peu connus (Simon & Kingston 2009). L'analyse des sites de liaisons de PRC2 sur la totalité du génome de cellules humaines et murines a cependant montré que les séquences cibles de ce complexe sont particulièrement riches en motifs C+G et que la plupart sont classées en tant qu'îlots CpG (Ku et al. 2008). Il est à noter que les cytosines présentes sur ces îlots CpG ne sont, en général, pas méthylées (Ku et al. 2008; Schübeler 2015). De plus, deux protéines de liaison à l'ADN ont récemment été identifiées comme protéines cibles pour PRC2 chez les mammifères: la protéine AEBP2 et la protéine JARID2 (Kim et al. 2009; Li et al. 2010)(Figure 51).

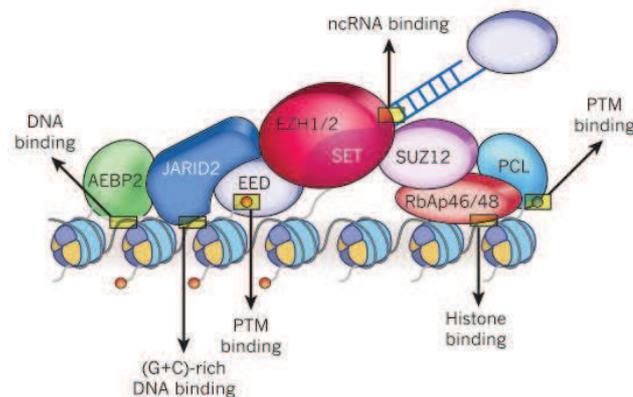


Figure 51: Représentation schématique du complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) et de son interaction avec la chromatine.

Le recrutement de ce complexe au niveau de la chromatine est médié par (i) la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques par les protéines AEBP2 et JARID2 ainsi que par (ii) la sous-unité EED qui favorise l'interaction du complexe avec les histones méthylées présentes sur les nucléosomes voisins (PTM : Post-transcriptional modification) et favorise donc la propagation de la marque H3K27me3. La sous-unité EZH1/2 catalyse la méthylation de l'histone. Son activité méthyltransférase est favorisée par la sous-unité EED. (Margueron & Reinberg 2011; Margueron et al. 2009).

L'étude de leurs sites de liaison a permis d'apporter de nouveaux éléments à propos des sites ciblés par PRC2. Le motif d'ADN auquel se lie la protéine AEBP2 présente une structure originale résumée par la séquence consensus suivante : CTT(N)15-26GCC (Kim et al. 2009). L'analyse des sites de liaison à l'ADN de la protéine JARID2, responsable du recrutement de la protéine EZH2 (sous-unité protéique du complexe PRC2 catalysant la méthylation sur H3K27),

montre une préférence pour les séquences riches en motifs CpG, ce qui concorde avec la nature des séquences précédemment identifiées par Ku et al (Li et al. 2010).

Nous avons donc analysé et comparé la proportion des motifs reconnus par JARID2 et AEBP2 présents sur le squelette plasmidique du pFAR4 et du pKAR4 (Tableau 13).

Plasmide	Nombre de motifs CpG sur un brin d'ADN (Fréquence d'apparition)	Nombre de sites de liaison potentiels de la protéine AEBP2 sur un brin d'ADN
pFAR4	65 (1/15)	5
pKAR4	149 (1/14)	9

Tableau 13: Nombres de sites de liaison de JARID2 et AEBP2, protéines de liaisons associées à PRC2, présents sur les squelettes plasmidiques pFAR4 et pKAR4.

Les deux squelettes plasmidiques contiennent des motifs CpG à une fréquence similaire à celle observée pour les îlots CpG (environ tous les 10 nucléotides) (Müller et al. 2003) mais le squelette plasmidique du dérivé pKAR4 étant 2 fois plus grand (2028 pb), il contient deux fois plus de motifs CpG. Ce dernier contient également 9 sites potentiellement ciblés par la protéine AEBP2, alors que le dérivé du pFAR4 n'en contient que 5. Ainsi, il est possible que la quantité plus élevée de ces motifs, favorise le recrutement de PRC2 sur le dérivé du pKAR4 et que le faible nombre de motifs présents sur le squelette plasmidique de taille réduite du pFAR4 ne soit pas suffisant pour induire la formation d'hétérochromatine.

Comme il l'a été dit précédemment, les îlots CpG enrichis en marque H3K27me3 sont en général non méthylés sur la cytosine, contrairement aux motifs CpG présents dans les autres régions du génome. La méthylation de l'ADN est cependant un processus impliqué dans la répression de l'expression des gènes (Schübeler 2015) et certaines méthylases d'histones sont de plus connues pour interagir avec les méthylases d'ADN (Viré et al. 2005) afin de favoriser la répression sur le long terme de l'expression de certains gènes. Nous pouvons donc nous interroger sur le statut des motifs CpG présents sur les deux plasmides dérivés de pFAR4 et de pKAR4, qui sont initialement non méthylés.

Il est possible que l'ADN plasmidique du pKAR4 soit resté non méthylé, favorisant ainsi le recrutement de PRC2. Ou bien, il est également possible que les motifs CpG aient été méthylés conduisant au recrutement des méthylases d'histones ou inversement (différentes séquences d'apparition de ces types de modifications ont déjà été rapportées pour l'ADN génomique)(Craig 2005). L'implication de la méthylation *de novo* des CpG dans le phénomène d'extinction de l'expression d'un transgène à partir d'un plasmide a par ailleurs été débattue dans plusieurs études (Yew et al. 2002b; Hyde et al. 2008; Hodges et al. 2004; Ochiai et al. 2006; Chen et al. 2008). Il serait donc intéressant d'étudier le niveau de méthylation des dérivés pFAR4 et pKAR4 afin de voir si le processus de méthylation est impliqué dans la chute d'expression observée à partir du

pKAR4. Des essais préliminaires de traitement au Bisulfite semblent montrer une absence de méthylation des CpG au niveau de la cassette d'expression pour les deux plasmides à J15. Il serait intéressant d'également étudier le niveau de méthylation des CpG présents sur le squelette plasmidique.

Une autre hypothèse pouvant également expliquer la différence d'expression à partir des deux plasmides est celle proposée par Lu et al (Lu et al. 2012) qui énonce que le phénomène d'extinction de l'expression serait uniquement lié à la taille du squelette bactérien et non à la nature de sa séquence.

Suivant cette hypothèse, la petite taille du squelette plasmidique pFAR4 favoriserait le « recyclage » de la machinerie transcriptionnelle de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' de la cassette d'expression. Des études ont en effet prouvé que les régions promotrices et terminales d'un gène actif pouvaient interagir via un phénomène dit de « gene looping », illustré dans la Figure 52 (Shandilya & Roberts 2012). La juxtaposition des deux extrémités du gène permettrait un recyclage de l'ARN polymérase et une réinitiation rapide de la transcription. Un squelette bactérien de petite taille favoriserait cette juxtaposition et permettrait le maintien d'un état transcriptionnel actif.

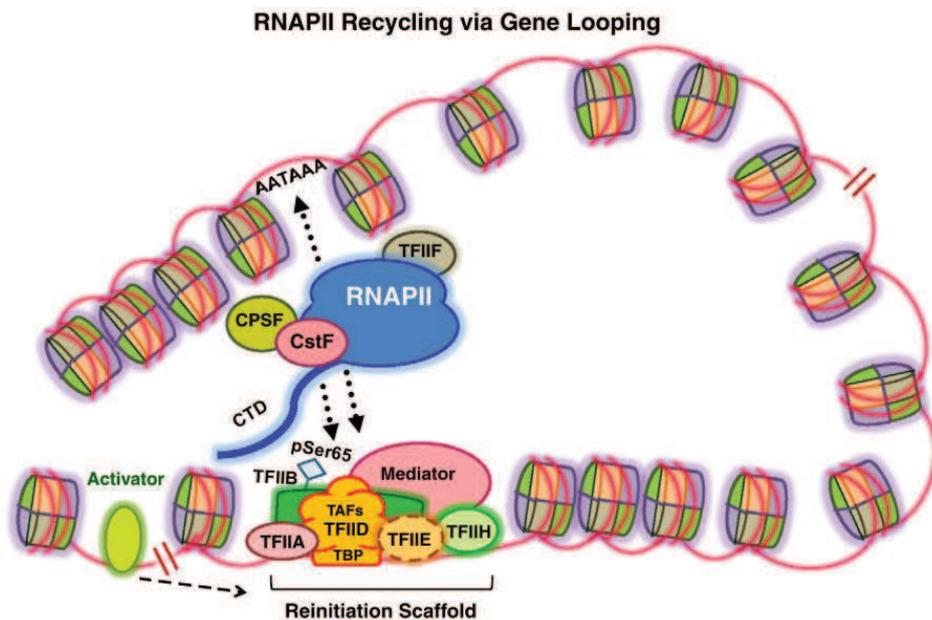


Figure 52: Recyclage de l'ARN polymérase II par « gene looping ».

Les régions terminale et promotrice du gène se juxtapose au cours d'une transcription active de façon à faciliter le recyclage de l'ARN polymérase II (RNAPII) et l'enchaînement de plusieurs cycles de transcription. Les facteurs et médiateurs de la transcription déjà liés à l'ADN forment un complexe de réinitiation dont le maintien est notamment stabilisé par TFIIB (Transcription Factor II B) phosphorylé sur la sérine 65, qui interagit avec l'ARN polymérase II et avec les complexes de terminaison tels que CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specific Factor) et CstF (Cleavage stimulatory Factor). TFIIA, D, E, H : Facteurs de transcription II A, D, E et H ; TBP : TATA Binding Proteins ; TAFs : TBP Associated Factors ; CTD : C-terminal domain (Shandilya & Roberts 2012).

La présence ainsi maintenue de l'ARN polymérase II constituerait également une barrière à la propagation de marque d'hétérochromatine (tel un insulateur) et maintiendrait une structure de chromatine « ouverte » (Schuettengruber & Cavalli 2013). Cette hypothèse pourrait donc également expliquer la présence de la marque H3K27me3 sur la cassette d'expression portée par le vecteur pKAR4 et non celle portée par le vecteur pFAR4.

Il est également possible de questionner l'influence de la taille des plasmides sur leur localisation dans le noyau et l'impact de cette localisation sur leur profil de chromatinisation (Bishop et al. 2006). Dans le noyau, le génome est en effet organisé en domaines distincts appelés TAD (topologically associating domains) associés à des marques d'histones spécifiques (Cheutin & Cavalli 2014). Les domaines riches en gènes actifs se trouvent fréquemment dans la région centrale du noyau tandis que les domaines contenant des gènes dont l'expression est réprimée sont davantage positionnés à la périphérie nucléaire et au niveau des centromères où les protéines Polycomb et les marques H3K27me3 sont particulièrement enrichies et forment des Polycomb Nuclear Foci (Cheutin & Cavalli 2014). Des études ont montré que la diffusion d'un plasmide dans le cytoplasme diminuait lorsque la taille du plasmide augmentait (Lukacs et al. 2000; Mearini et al. 2004). Bien qu'aucune différence de diffusion dans le noyau n'ait été rapportée, nous pouvons nous demander si la taille plus importante du pKAR4 ne limiterait pas d'avantage sa diffusion après transfection. Ceci conduirait à une accumulation de ce plasmide au niveau de la périphérie nucléaire, et donc au niveau des Polycomb Nuclear Foci, favorisant ainsi sa compaction sous forme d'hétérochromatine. Le pFAR4, de par sa taille, serait peut-être plus mobile et diffuserait jusqu'à la région centrale du noyau et serait donc moins sujet à l'action des protéines Polycomb. Cette hypothèse pourrait être testée en effectuant, par exemple, des essais d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH : Fluorescence In Situ Hybridization) sur des coupes de foie de souris injectées avec les plasmides dérivés de pFAR4 ou de pKAR4.

V CONCLUSION

La conclusion de cette étude est que le transfert du plasmide dérivé de pFAR4 nu par injection hydrodynamique conduit à une expression sur le long terme du transgène thérapeutique *Sgsh* dans les cellules du foie. Le maintien de l'expression n'est pas dû à une intégration aléatoire du plasmide dans le génome des hépatocytes mais au maintien du statut transcriptionnel actif du plasmide épisomique. La comparaison des modifications d'histones présentes sur le dérivé de pFAR4 et le plasmide conventionnel dérivé de pKAR4 a montré que la différence d'expression est liée à une différence de profil de la chromatine associée aux plasmides, un enrichissement en

marque d'hétérochromatine conduisant à une répression de l'expression. Le vecteur pFAR4 semble être préservé de ce phénomène d'extinction par la petite taille et probablement la composition de son squelette plasmidique.

CHAPITRE II : EVALUATION DE LA COMBINAISON pFAR4/*Sleeping Beauty* POUR DES APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE LA THERAPIE GENIQUE

SOMMAIRE

Chapitre II : Evaluation de la combinaison pFAR4/<i>Sleeping Beauty</i> pour des applications dans le domaine de la thérapie génique.....	131
I. Introduction.....	133
I.1 La dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	134
I.2 Approches thérapeutiques.....	136
I.3 Traitement de la DMLA par thérapie génique.....	137
I.4 Projet TargetAMD : Approche de thérapie génique non virale pour le traitement de la DMLA humide.....	138
II. Résultats.....	140
II.1 La combinaison pFAR4/ <i>SB</i> conduit à une transposition efficace dans le génome des cellules HeLa.....	140
II.2 Etude de la combinaison des technologies pFAR4/ <i>SB</i> en système non sélectif.....	146
II.3 Etude de la combinaison pFAR4/ <i>SB</i> en cellules primaires.....	158
II.4 Production des plasmides pFAR4-CMV-SB100X et pFAR4-ITRs-CMV-PEDF en conditions « BPF ».....	160
III. Discussion.....	163
IV. Conclusion.....	170

I INTRODUCTION

Le système de transposition *Sleeping Beauty (SB)* présenté dans le chapitre III de l'introduction est un outil moléculaire puissant permettant l'intégration d'un transgène thérapeutique dans le génome des cellules cibles conduisant ainsi à son expression sur le long terme. Il présente donc les avantages des systèmes rétroviraux (efficacité d'intégration) tout en offrant cependant une alternative plus sûre à ces derniers. Le choix de vecteurs permettant un transfert efficace des composants *Sleeping Beauty* aux cellules constitue une étape clé du développement de ce système qui, contrairement, aux vecteurs viraux, ne possède pas d'habileté de transduction. Plusieurs vecteurs ont ainsi été associés à la technologie *Sleeping Beauty* dans le but d'augmenter son efficacité de transfert. Des vecteurs hybrides contenant les composants du système dans des particules virales ont été développés en utilisant le virus de l'Herpes (HSV)(de Silva & Bowers 2011), des adénovirus (Hausl et al. 2010) ou des lentivirus (Bak & Mikkelsen 2011). Ces systèmes hybrides combinent ainsi les avantages du système *Sleeping Beauty* avec l'efficacité de transduction des virus. Cependant, ils incluent également les désavantages liés à l'utilisation et à la production des virus.

Les systèmes de transfert non viraux représentés principalement par les vecteurs plasmidiques sont plus sûrs et peuvent également conduire à une bonne efficacité de transfert de *SB*. Parmi eux, le miniplasmide pFAR4 constitue un bon candidat non viral : (i) d'une part car, étant dépourvu de gène de résistance à un antibiotique, il permet d'augmenter le profil de biosécurité du système et (ii) d'autre part, les résultats *in vitro* et *in vivo*, présentés dans la section II.6 de l'introduction et dans le chapitre de résultats qui précède, ont montré que l'utilisation de ce plasmide conduit à une expression augmentée du transgène en comparaison aux plasmides conventionnels. L'utilisation de ce plasmide permettrait donc d'augmenter également l'efficacité de transfert au noyau du transposon et de la transposase.

Pour ces raisons, le vecteur pFAR4 a été choisi pour être combiné à la technologie *SB* dans le cadre d'un projet d'essai clinique nommé « TargetAMD ». Le but de ce projet est de proposer une approche de thérapie génique non virale pour le traitement de la forme humide de la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA, ou AMD en anglais).

Afin de situer le contexte de ce second chapitre de résultats, une courte introduction est consacrée à la présentation de la maladie et de l'approche thérapeutique envisagée dans le cadre du projet TargetAMD.

I.1 LA DEGENERESCENCE MACULAIRE LIEE A L'AGE

La DMLA est une maladie neurodégénérative de la rétine causant une perte progressive et irréversible de la vision.

La rétine est un tissu neurosensoriel tapissant la partie postérieure de l'œil (Figure 53). A proximité du nerf optique, elle contient une zone à forte densité de photorécepteurs à cônes, nommé macula. Cette zone, qui conditionne l'acuité visuelle et permet la vision précise, est la zone touchée par la DMLA.

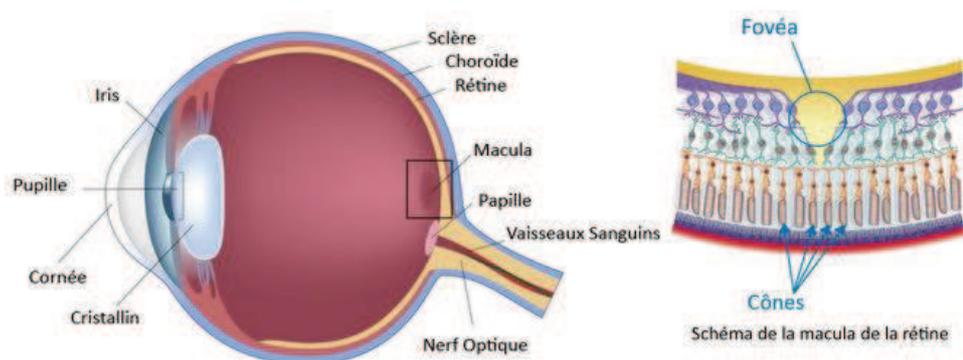


Figure 53: Schéma d'un œil et coupe de la rétine au niveau de la macula
(Source image : <http://www.guide-vue.fr/>)

D'après l'OMS, cette maladie est la troisième cause mondiale de déficience visuelle et représente 8,7% des causes de cécité. Dans les pays industrialisés, elle est la première cause de déficience visuelle chez les personnes de plus de 50 ans (<http://www.who.int/fr/>). En France elle toucherait 25 à 30% des personnes de plus de 75 ans et 50% des plus de 80 ans (Haute Autorité de Santé (HAS) 2012). Compte tenu de l'allongement de l'espérance de vie des populations, l'incidence de cette maladie ne va cesser de croître. La mise en place de traitements efficaces et abordables est donc urgente.

De nombreuses étiologies et processus métaboliques ont été liés à la DMLA mais la compréhension de son développement reste à ce jour incomplète. En plus du vieillissement comme principal facteur de risque, d'autres facteurs tels que le tabagisme, l'obésité, la nutrition, l'exposition au soleil et le patrimoine génétique ont été fortement liés à la maladie (Seddon 2013).

Le stade initial de la maladie est nommé **Maculopathie liée à l'âge (MLA)**. Il se caractérise par l'apparition de « drusen », une accumulation de dépôts lipidiques sous l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE) et peut évoluer en deux formes sévères de DMLA :

- **La DMLA atrophique ou « sèche »** : Elle est caractérisée par une dégénérescence atrophique des cellules RPE consécutive à l'évolution des drusen (figure 54B). Cette forme

est la plus courante et touche 50% des patients, elle présente une progression lente pouvant se convertir en DMLA exsudative, la deuxième forme sévère de la maladie.

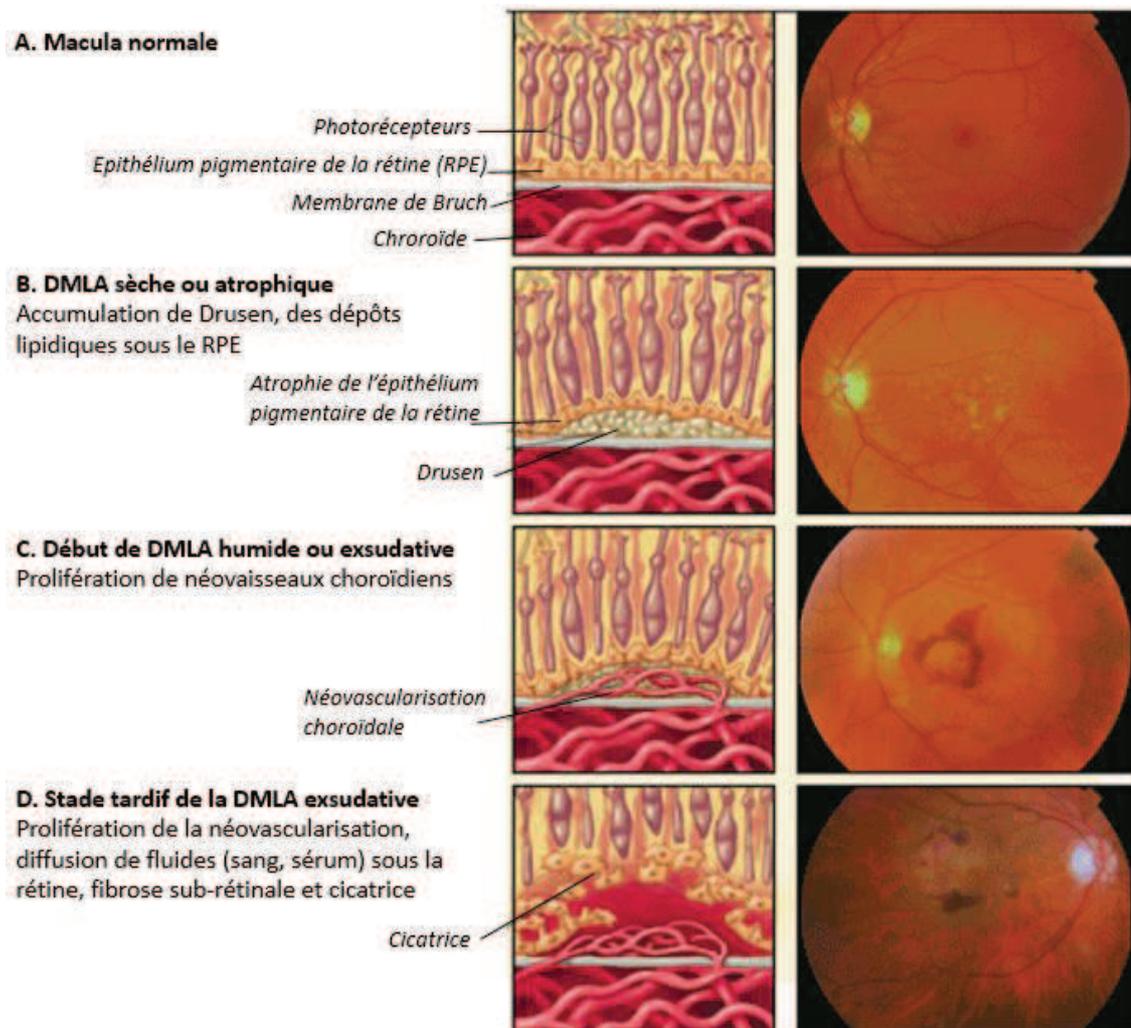


Figure 54: Dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Il existe deux formes de DMLA pouvant être distinguées après observation de la macula par ophtalmoscopie : la forme sèche et la forme humide. La forme sèche (B) est caractérisée par la présence de drusen (dépôts lipidiques jaunâtres dans l'espace sub-rétinal) ainsi que par une atrophie de l'épithélium pigmentaire de la rétine au niveau de la macula. La forme humide (C et D) est définie par la formation de néovaisseaux choroïdaux dans l'espace sub-rétinal conduisant à des fuites de liquide, puis à des stades plus avancés, à la formation de fibrose et de cicatrices résultant en perte irréversible de la vision (Adapté d'après (Somani 2003)).

- **La DMLA exsudative ou néovasculaire dite « humide »** : Elle se caractérise par le développement sous l'épithélium pigmentaire de la rétine de néovaisseaux issus de la choroïde nommé « néovascularisation choroïdale » (CNV : choroïdal neovascularization) (Kent 2015). La néovascularisation apparaît lorsque l'endothélium pigmentaire de la rétine est soumis à un stress oxydant, ce tissu libère alors un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF : Vascular endothelial growth factor). Cette sécrétion est également

favorisée par le développement d'une inflammation, impliquant notamment le système du complément (Prea et al. 2015). Le VEGF sécrété par le RPE induit alors la croissance de nouveaux vaisseaux en stimulant la mitose et empêchant l'apoptose des cellules endothéliales. Cependant, les néovaisseaux n'ayant pas l'intégrité du système vasculaire déjà en place, leur accumulation conduit à des fuites de fluides (sang). La progression de la maladie conduit à un décollement de la rétine, au développement de fibrose et à la formation de cicatrices au niveau de la macula résultant en une perte de vision en une période de quelques mois (Seddon 2013; Lagacé 2010) (Figure 54C et 54D).

I.2 APPROCHES THERAPEUTIQUES

Une première approche thérapeutique dite préventive consiste en la prise d'antioxydants sous forme de compléments alimentaires et permettrait de limiter la progression de la MLA en DMLA. Leur prise quotidienne limiterait les dommages causés par le stress oxydant dans la macula et réduirait la progression de 25% sur une période de 5 ans (Jager et al. 2008).

Pour les personnes atteintes de la forme sèche de la DMLA, aucun traitement médical n'est à ce jour disponible. Plusieurs approches ont en revanche été développées pour soigner la forme humide de la maladie. Ces approches, présentées ci-dessous, visent pour la plupart à empêcher ou réduire la néovascularisation.

La thérapie photodynamique (PDT) après injection de vertéporfine (Visudyne®, Novartis) a été le premier traitement disponible pour la DMLA humide. Le processus de traitement en deux étapes inclut l'injection intraveineuse du médicament et son activation par un laser à basse intensité. La réaction photochimique générée endommage les cellules endothéliales vasculaires causant une thrombose veineuse (Sickenberg et al. 2000). Ce traitement bien qu'ayant été montré comme relativement sûr et efficace, a été surpassé par le développement des anti-VEGF en 2006.

La thérapie anti-angiogénique intravitréale repose sur l'administration dans l'humeur vitrée de molécules anti-angiogéniques. Parmi ces molécules, les anticorps anti-VEGF ranibizumab (Lucentis®, Genentech) et bavituzumab (Avastin®, Genentech) sont les thérapies les plus utilisées à ce jour pour le traitement de la DMLA (Perrot 2013).

Ranibizumab est un fragment d'anticorps monoclonal humanisé qui neutralise le VEGF. En 2006, un essai clinique en phase III a montré que 90% des patients traités mensuellement pendant 2 ans par une dose de 0,5 mg de Ranibizumab avaient perdu moins de 15 lettres lors d'un test de vision et que 33% avaient une vision améliorée (Rosenfeld et al. 2006). Ce traitement est maintenant couramment utilisé et est notamment remboursé par l'Assurance maladie en France. De récentes

études montrent cependant que les résultats obtenus depuis sa mise sur le marché ne seraient pas à la hauteur de ceux obtenus lors des essais cliniques (Chong 2016).

Le bavituzumab est également un fragment d'anticorps anti-VEGF, utilisé plus couramment pour le traitement de cancers, il ne dispose pas actuellement d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) pour le traitement de la DMLA. Son coût avantageux par rapport à son prédécesseur (2,7 euros/mg d'Avastin® contre 448 euros/mg de Lucentis®) a cependant conduit l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) à établir une recommandation temporaire d'utilisation (Sources : ANSM et Vidal).

Un nouvel anti-VEGF, l'aflibercept (Eylea®, Bayer) ayant montré une efficacité comparable à celle du ranibizumab en essai clinique de phase III en 2014 (Schmidt-Erfurth et al. 2014) a reçu une AMM en septembre 2015.

L'injection d'inhibiteur de VEGF n'est cependant pas efficace chez tous les patients, puisque des gains d'acuité visuelle ne sont observés que chez 30 à 40% d'entre eux. L'utilisation de ces anticorps anti-VEGF est, de plus, limitée par leur courte demi-vie plasmatique (3 jours pour le Ranibizumab et 17 à 21 jours pour le Bavituzumab) (Fajnkuchen & Cohen 2008). Pour être efficace, les traitements anti-VEGF nécessitent donc une injection intravitréale régulière, généralement mensuelle (Fajnkuchen & Cohen 2008). Ces conditions de traitements sont lourdes pour le patient, généralement âgé et malvoyant, et ne sont donc pas considérées comme satisfaisantes. Certains pays d'Europe ne remboursent pas ces médicaments dont le coût exclut du traitement de nombreux patients. En plus de ce coût, les injections fréquentes et à vie peuvent être accompagnées de nombreux effets secondaires comme le développement d'endophtalmies (Sachdeva et al. 2016; Souied et al. 2016).

1.3 TRAITEMENT DE LA DMLA PAR THERAPIE GENIQUE

La thérapie génique intraoculaire a le potentiel de permettre une délivrance stable et sur le long terme de protéines thérapeutiques pour le traitement de la DMLA après une unique intervention.

L'œil présente par ailleurs de nombreux avantages en tant qu'organe cible de thérapie génique (Prea et al. 2015) : (i) la possibilité d'un traitement localisé permet d'éviter les risques associés à une délivrance systémique par voie intraveineuse, (ii) l'état immunitaire privilégié de l'œil limite l'induction de fortes réponses immunitaires, (iii) la compartimentalisation anatomique de l'œil permet le ciblage spécifique des populations cellulaires, (iv) les compartiments oculaires ont un très faible volume autorisant l'utilisation d'une quantité minimale de vecteur pour atteindre un effet thérapeutique, (v) et enfin la nature transparente de l'œil permet un suivi de l'évolution de la maladie après traitement à l'aide de techniques non invasives.

Plusieurs approches de thérapie génique virales ont à ce jour été explorées. Celles ayant montré les résultats les plus prometteurs utilisent des vecteurs AAV et rAAV de sérotype 2 présentant un fort tropisme pour les cellules RPE et les photorécepteurs afin de délivrer des inhibiteurs du facteur VEGF.

Deux approches font actuellement l'objet d'essai clinique :

La première consiste à transduire les cellules RPE avec le vecteur rAAV.sFLT-1, un vecteur adéno-associé recombinant de sérotype 2 codant pour sFLT-1 (soluble fms-like-tyrosine kinase 1) un puissant inhibiteur soluble du VEGF (n° NCT NCT01494805, Lions Eye Institute). L'intervention consiste en une injection sub-rétinale d'une dose de virus. Les résultats de la Phase I montrent une bonne tolérance au traitement ainsi qu'une stabilisation de l'évolution de la DMLA à 1 an (Rakoczy et al. 2015).

La seconde consiste en l'injection sub-rétinale du vecteur AAV2-sFLT01 codant pour un domaine de sFLT- (n° NCT01024998, Genzyme). Cette approche a conduit à une inhibition efficace de la néovascularisation dans trois modèles *in vivo* de néovascularisation oculaire (Lukason et al. 2011).

I.4 PROJET TARGETAMD : APPROCHE DE THERAPIE GENIQUE NON VIRALE POUR LE TRAITEMENT DE LA DMLA HUMIDE

Le protocole envisagé dans le cadre du projet européen TargetAMD consiste en la transplantation sub-rétinale de cellules RPE ou IPE (épithélium pigmentaire de l'iris) autologues de patients modifiées génétiquement *ex-vivo* pour exprimer le facteur anti-angiogénique et neuroprotecteur PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor). L'acte chirurgical, consistant en un prélèvement des cellules suivi de leur transplantation, a déjà été employé lors de précédentes études et s'est avéré sûr et relativement facile à effectuer (Binder et al. 2004; Aisenbrey et al. 2006). Dans le projet TargetAMD, la transplantation des cellules sécrétant le facteur PEDF inhibera la néovascularisation sur toute la durée de vie du patient.

Chez les personnes atteintes de DMLA, le niveau de PEDF dans la macula s'est révélé être significativement moins élevé que pour les adultes sains pour lesquels 10 fois plus de PEDF que de VEGF sont sécrétés dans cette région (Thumann 2012). La surexpression de VEGF évoquée précédemment associée à une chute de l'expression du PEDF conduit à un déséquilibre du contrôle de la vascularisation et débouche en une CNV. Par sa fonction anti-VEGF et neuroprotectrice, l'augmentation du niveau de PEDF sécrété semble donc une approche adaptée pour le traitement de la maladie (Thumann 2012). Le choix d'avoir recours au PEDF comme inhibiteur du VEGF dans le projet TargetAMD a également été conforté par les résultats observés suite à la délivrance de vecteurs codant pour d'autres inhibiteurs du VEGF tel que le FLT-1. De

premiers essais prometteurs de transfection *in vitro* de cellules RPE et IPE primaires conduisant à une sécrétion efficace du PEDF ont été menés par Thumann et al dès 2010 (Thumann et al. 2010).

Afin d'assurer une expression efficace et sur le long terme du facteur PEDF, les cellules du patient seront transfectées *ex-vivo* par électroporation et modifiées génétiquement en utilisant la technologie de transposition *Sleeping Beauty*. Cette approche ayant montré des résultats prometteurs (Johnen et al. 2012), les vecteurs de gène devraient être adaptés et validés pour des essais cliniques chez l'homme.

La figure ci-dessous donne une vue d'ensemble du protocole et des technologies employées dans le cadre du projet TargetAMD. L'opération envisagée durerait moins de 60 min.

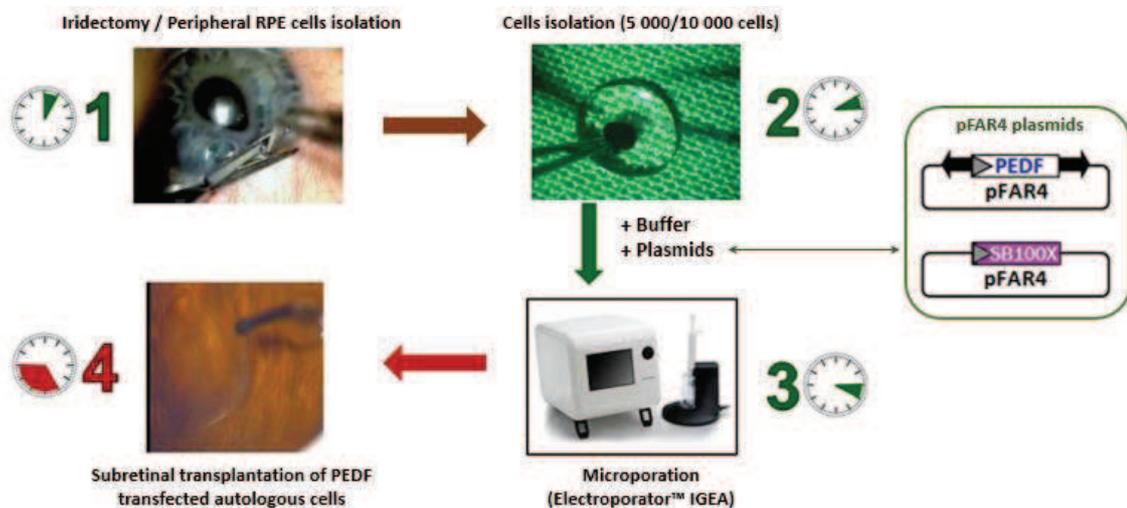


Figure 55: Protocole TargetAMD pour le traitement de la DMLA humide.

Des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE) ou de l'Iris (IPE) sont isolées de l'œil du patient. Elles sont ensuite mises en suspension dans un tampon en présence de plasmides pFAR4s codant pour la transposase SB100X et pour le transposon PEDF. Les cellules sont transfectées par électroporation puis transplantées dans l'espace sous la rétine à l'aide d'une canule d'injection sous-rétinienne. L'expression du PEDF par ces cellules permettra de rétablir l'équilibre PEDF/PEGF permettant de réguler la vascularisation choroïdale. Source de l'image : <http://www.targetamd.eu/>.

Dans le cadre de ce projet, les miniplasmides pFAR4s seront utilisés comme vecteurs pour délivrer les deux composants du système *Sleeping Beauty*, le gène codant la transposase SB100X ainsi que le transposon PEDF. En parallèle au développement de ces vecteurs, nous avons entrepris d'évaluer l'efficacité de la combinaison pFAR4/SB. Les cellules IPE et RPE ne pouvant être obtenues qu'en faible quantité à partir d'œil de patients décédés, les cellules HeLa, plus faciles à transfecter, seront utilisées pour cette analyse.

Ce chapitre présente les résultats de cette étude réalisée dans un contexte *in vitro*.

II RESULTATS

II.1 LA COMBINAISON pFAR4/SB CONDUIT A UNE TRANSPOSITION EFFICACE DANS LE GENOME DES CELLULES HELA

II.1.1 Evaluation de l'efficacité de transposition de la combinaison pFAR4/Sleeping Beauty

La combinaison pFAR4/*Sleeping Beauty* a été évaluée *in vitro* en mettant en place une expérience de « transposition formant colonies » dont l'efficacité est déterminée en quantifiant le nombre de colonies formées après insertion du transgène dans le génome des cellules. Chaque colonie est le résultat de l'expansion clonale d'une cellule ayant intégré le transgène conférant la résistance à un antibiotique. Cette expérience est classiquement utilisée pour l'étude du système de transposition *Sleeping Beauty* (Izsvák et al. 2009).

Le principe de l'expérience est illustré Figure 56. Des cellules en culture sont co-transfectées avec un plasmide codant la transposase et un plasmide transposon dont la cassette d'expression contient un gène de résistance à un antibiotique (dans le cadre de cet essai, le gène de résistance à la néomycine, désigné par « Neo »). Deux jours après transfection, différentes quantités de cellules transfectées sontensemencées dans des puits contenant un milieu sélectif. Après 11 jours de sélection, les colonies de cellules ayant résisté à la pression de sélection sont colorées au cristal violet et sont comptées. Le taux de transposition correspond au pourcentage de cellules ayant intégré le transgène, c'est-à-dire, au nombre de colonies résistantes à l'antibiotique divisé par le nombre de cellules ayant étéensemencées.

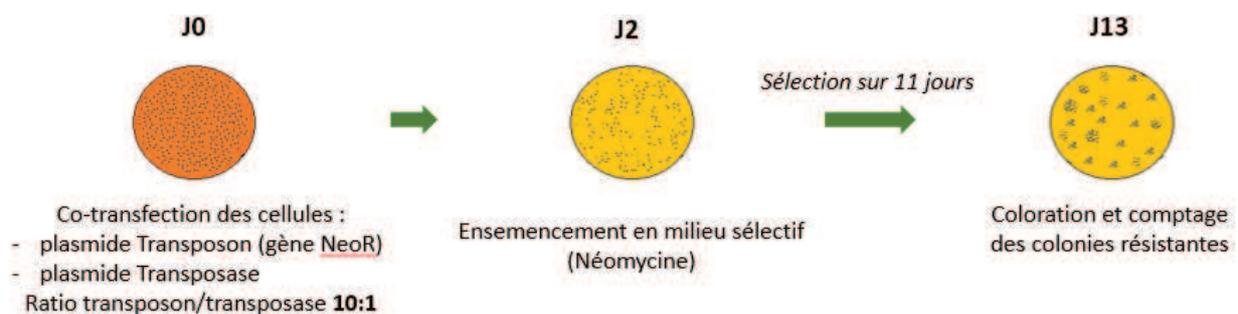


Figure 56 : Principe de l'essai de « transposition formant colonies ».

Les cellules sont cotransfectées avec le plasmide codant la transposase et le plasmide transposon contenant un gène de résistance à la néomycine inséré entre deux séquences ITRs (Inverted Terminal Repeats), sites de fixation de la transposase. Deux jours après transfection une quantité donnée de cellules estensemencées dans des puits contenant un milieu sélectif. Après 11 jours de sélection, les clones ayant intégré le transgène et donc résistants à la néomycine, sont colorés puis comptés afin de calculer le taux de transposition.

Les cellules choisies pour cette étude sont des cellules humaines HeLa. Facilement transfectables, elles sont couramment utilisées pour ce type d'expériences.

Afin d'évaluer le potentiel du plasmide pFAR4 combiné à la technologie *Sleeping Beauty*, les cassettes d'expression portées par les plasmides transposase et transposon originaux (pCMV(CAT)T7-SB100X et pT2/SVNeo) ont été clonées dans le vecteur pFAR4 pour générer les plasmides pFAR4-CMV-SB100X et pFAR4-ITRs-SVNeo. Les cartes des deux couples de plasmides sont représentées Figure 57.

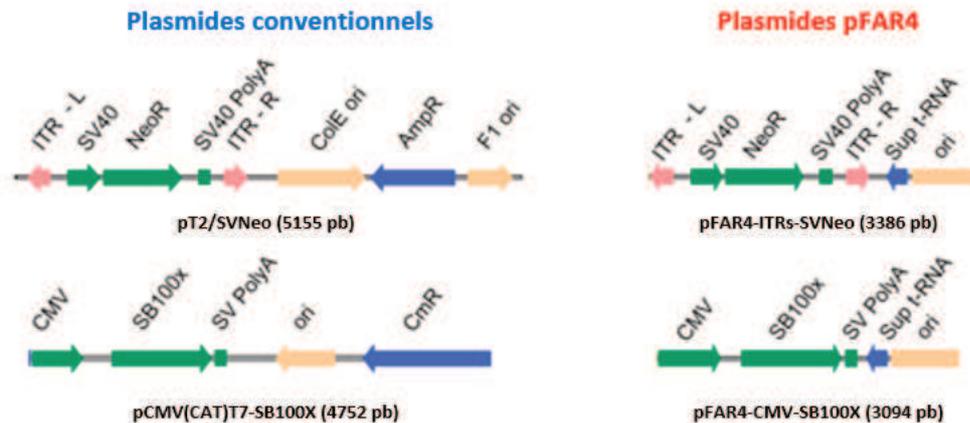


Figure 57: Plasmides conventionnels et pFAR4 employés pour l'essai de "transposition formant colonies". Les plasmides pFAR4 codant la transposase et le transposon ont été construits en introduisant dans le pFAR4 les cassettes d'expression contenus par les plasmides conventionnels. Contrairement aux pFAR4s, ces plasmides contiennent pour gène de sélection un gène de sélection à un antibiotique (Ampicilline et chloramphénicol).

Les plasmides transposase portent ainsi la même cassette d'expression comprenant le gène codant la transposase hyperactive SB100X dont l'expression est dirigée par le promoteur ubiquitaire CMV. Les plasmides pFAR4-ITRs-Neo et pT2/SVNeo portent également la même cassette d'expression qui contient un gène de résistance à la néomycine dont l'expression est dirigée par le promoteur SV40 et qui est flanquée par les deux séquences ITRs (Inverted Terminal Repeats) reconnues par la transposase. Ces séquences ont été optimisées par Cui et al (2002) pour permettre une action efficace de l'enzyme (Cui et al. 2002).

La différence entre les plasmides originaux et les plasmides pFAR4 repose uniquement sur leur squelette plasmidique. Les plasmides originaux sont dits « conventionnels » car ils sont tous deux porteurs d'un gène de résistance à un antibiotique pour leur propagation dans les cellules d'*E. coli*. pT2/SVNeo est porteur du gène de résistance à l'ampicilline et le pCMV(CAT)T7-SB100X au chloramphénicol, deux antibiotiques proscrits pour des applications cliniques. Les plasmides pFAR4 contiennent un ARNt suppresseur d'une mutation, permettant leur propagation par une souche d'*E. coli* porteuse de la mutation. Le mécanisme est plus précisément décrit dans la section II.6 de l'introduction.

Afin d'évaluer l'efficacité de la combinaison pFAR4/SB, les cellules HeLa ont été cotransfectées d'une part avec les plasmides originaux et d'autre part avec une quantité équimolaire des dérivés pFAR4 en respectant un ratio quantité transposon : quantité transposase de 10 :1. Le ratio 10 :1 est couramment utilisé pour les travaux réalisés avec *Sleeping Beauty* car il permet d'obtenir des taux de transposition satisfaisants tout en limitant le phénomène d'« over-production inhibition » auquel peut être sujette la transposase lorsqu'elle est utilisée en quantité trop importante (Izsvák et al. 2009; Kolacsek et al. 2011).

Deux conditions de transfection ont été employées tout en respectant le ratio 10 :1. La première condition est désignée par le terme « Elevée » et la seconde par « Faible » car des quantités élevées ou faibles de plasmides ont été utilisées pour la transfection, respectivement. Ces quantités sont rapportées dans le tableau ci-dessous.

Plasmides	Nom du plasmide	Taille (paires de base)	Quantité de plasmide transfectée (ng)	
			« Elevée »	« Faible »
Plasmides transposase	pCMV(CAT)T7-SB100X	4 756	50	5
	pFAR4-CMV-SB100X-SV40	3 098	32,6	3,3
Plasmides transposon	pT2/SVNeo	5 155	500	50
	pFAR4-ITRs-SVNeo	3 386	328,4	32,8

Tableau 14: Plasmides transposase et transposon Neo, tailles et quantités transfectées

Afin d'évaluer la proportion d'intégration non spécifique de la transposase, des cellules ont également été transfectées avec les plasmides transposon en absence de plasmide transposase.

Le vecteur pFAR4, qui ne contient aucune cassette d'expression, a été utilisé afin d'ajuster la quantité d'ADN total pour chaque condition de transfection.

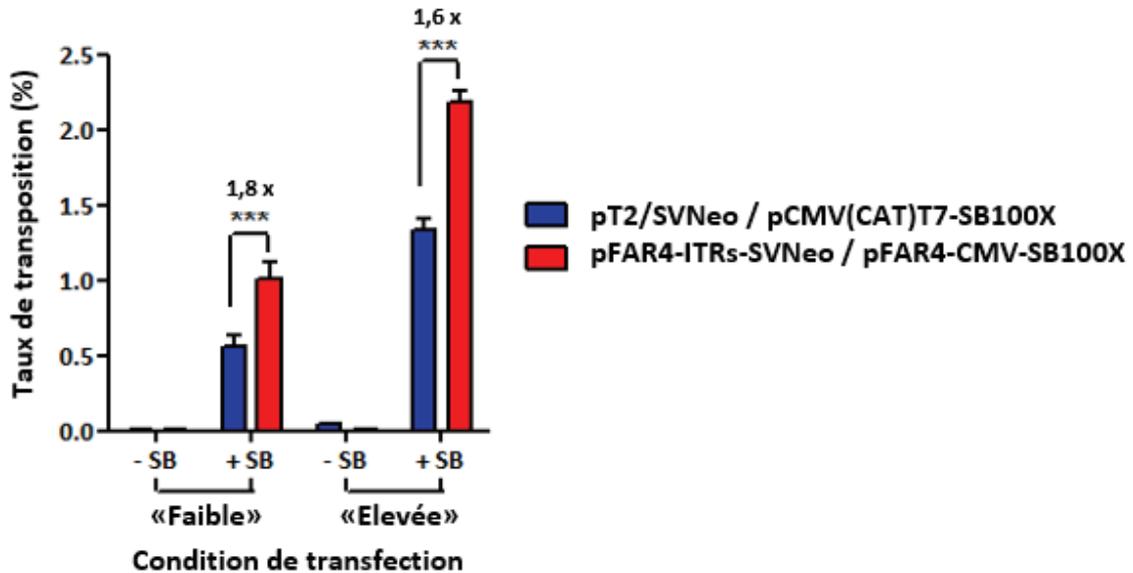


Figure 58: Taux de transposition moyens obtenus avec les plasmides pFAR4s et les plasmides conventionnels.

Après 11 jours de sélection, les colonies résistantes à la néomycine sont comptées. Le taux de transposition correspond au pourcentage de cellulesensemencées ayant résisté à la néomycine. Quatre et trois transfusions indépendantes ont été réalisées pour les ratios 50 :5 et 500 :50 respectivement. Pour chaque transfection, différentes quantités des cellules ont étéensemencées en quadruplicat en milieu sélectif. Les histogrammes représentent les taux de transposition moyens (\pm sem) obtenus pour les deux quantités de plasmides testées avec (+SB) ou sans transposase (-SB). $n=42/40$ (plasmides originaux/plasmides pFAR4) pour la condition « Faible » et $n=23/24$ pour la condition « Elevée ». Les astérisques indiquent une différence significative de taux de transposition déterminée par un test de Mann-Whitney, ***P-value<0,001.

Quelle que soit la quantité de plasmides utilisée pour transfecter les cellules HeLa, le taux de transposition est significativement supérieur lorsque les composants du système *Sleeping Beauty* sont portés par le miniplasmide pFAR4. Ce facteur est de 1,8 pour les conditions de transfection « Faible » et de 1,6 pour la condition « Elevée » (Figure 58). Les taux de transpositions obtenus avec le pFAR4 résultent bien d'une transposition spécifique de SB100X comme le prouve le faible taux de transposition (0,002 à 0,004%) obtenu pour les cellules témoins non transfectées par le plasmide transposase (-SB).

Cette première analyse a permis de montrer que le plasmide pFAR4 est un vecteur efficace des composants du transposon *Sleeping Beauty in vitro* et que son utilisation permet, de plus, d'augmenter de manière significative le nombre de cellules contenant un transgène inséré dans le génome, ce qui peut être avantageux pour la transfection de cellules primaires ou de cellules difficilement transfectables.

II.1.2 Influence du plasmide transposon sur le taux de transposition

Ayant déterminé que la combinaison pFAR4/SB conduisait à une intégration efficace d'un transgène, cette étude a été poursuivie afin d'évaluer de manière spécifique l'effet du plasmide

transposon sur l'efficacité de la transposition. Pour cela, des cellules ont été transfectées en utilisant 5 ng de plasmide transposase pFAR4-CMV-SB100X en combinaison avec soit 50 ng de plasmide transposon pFAR4-ITRs-NSV/Neo d'une part, soit avec une quantité équimolaire (76,1 ng) de plasmide transposon pT2/SVNeo d'autre part.

La quantité de plasmide a été ajustée en utilisant le vecteur pFAR4 dépourvu de cassette d'expression.

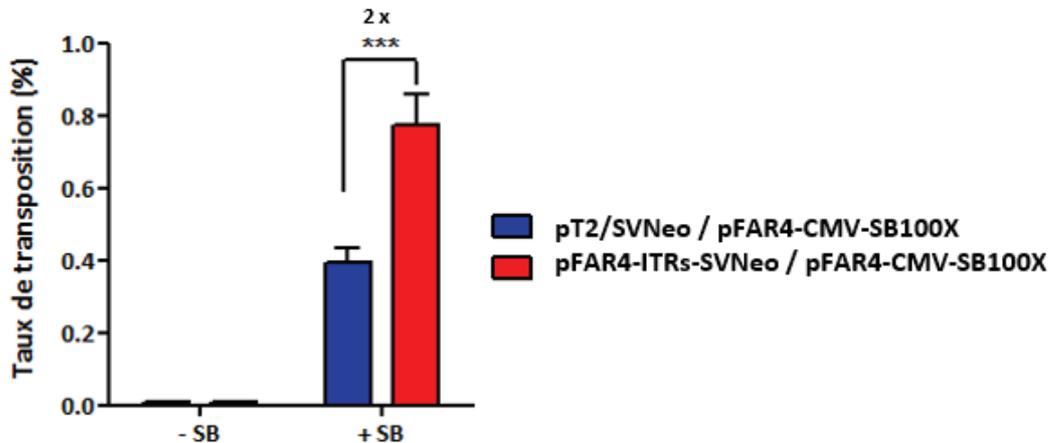


Figure 59: Effet du plasmide transposon sur le taux de transposition.

Des cellules HeLa ont été transfectées avec 50 ng de plasmide transposon pFAR4-ITRs-SVNeo ou une quantité équimolaire de pT2-SVNeo (76,1 ng) avec (+SB) ou sans plasmide transposase (-SB) pFAR4-CMV-SB100X (5ng). Les histogrammes représentent la moyenne des 40 valeurs de taux de transposition issues de 3 transfection indépendantes. Pour chaque transfection, différentes quantités de cellules ont étéensemencées en quadruplicat en milieu sélectif. Les astérisques indiquent une différence significative de taux de transposition déterminée par un test de Mann-Whitney ***P-value<0,0001.

Un taux de transposition deux fois plus important est observé en utilisant le plasmide pFAR4 comme vecteur transposon (Figure 59). En réalisant cette expérience, il a été possible de s'affranchir de la différence de taille du plasmide transposase, et de conclure que la différence observée dans l'essai précédent (Figure 58) semble majoritairement résulter du plasmide transposon. La cassette d'expression étant identique pour les deux vecteurs pFAR4 et pT2, nous pouvons en conclure que c'est la nature ou la taille du squelette plasmidique qui semble influencer l'efficacité de la transposition. Celle-ci serait plus efficace lors que le transposon est porté par le pFAR4.

II.1.3 Quantification du nombre de copies du transgène Néo intégrées :

Le test décrit précédemment ne permettant que de déterminer le nombre de colonies ayant inséré un transgène, l'étape suivante a consisté à déterminer si le choix du vecteur transposon pouvait impacter le nombre d'évènements d'intégration du gène de résistance à la néomycine.

Des clones résistants à la néomycine issus des trois transfections indépendantes réalisées pour l'expérience précédente, ont, dans ce but, été isolés (pFAR4-ITRs-SVNeo, n=12 et pT2/SVNeo,

n=9) et ont été propagés en milieu sélectif sur une moyenne de 7 passages à l'issue desquels l'ADN génomique des cellules a été extrait.

Le nombre de copies de transgène *NeoR* intégrées a été quantifié par PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques du gène *NeoR* et du gène de référence *RPPHI* utilisé pour normaliser les résultats. Ce gène est présent en 2 copies par génome diploïde dans les cellules humaines (Baer et al. 1990). Cependant, il est important de préciser que les cellules HeLa ont un nombre de chromosomes hypertriploïde (3n+) (Heneen 1976; Macville et al. 1999; Landry et al. 2013). Ainsi, le chromosome 14, sur lequel est situé le gène *RPPHI* serait présent en deux à trois copies dans ces cellules. La normalisation par *RPPHI* ne permet donc pas de quantifier précisément le nombre de copies de transgène intégrées par cellule, mais permet de comparer l'effet du plasmide transposon sur le nombre d'intégration.

Les résultats ont donc été exprimés en valeurs absolues (Figure 60A) et également en valeurs relatives (Figure 60B) par rapport au nombre moyen d'intégrations obtenu à partir du transposon pT2.

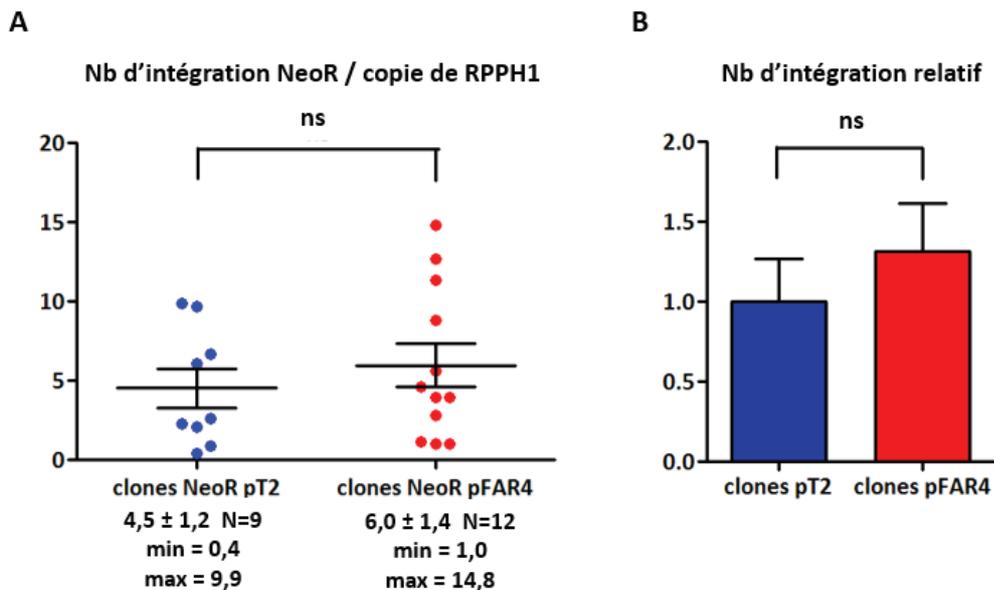


Figure 60: Nombre de copies du transgène *NeoR* intégrées dans le génome des cellules HeLa.

A) Le nombre de copies du gène *NeoR* intégrées, déterminé par PCRq, a été normalisé par le nombre de copies du gène de référence *RPPH1*. 9 et 12 clones ont été isolés pour les transfections avec les plasmides transposon pT2 et pFAR4 respectivement. B) Les résultats ont également été présentés sous forme relative, par rapport au nombre moyen d'intégrations obtenu pour les clones pT2. D'après le test statistique de Mann-Whitney, aucune différence significative n'est observée entre les nombres de copies (ns = différence non significative).

Les résultats de PCRq montrent que l'utilisation des plasmides pT2 et pFAR4 comme vecteurs transposons conduit à l'intégration de 4,5 et 6 copies par génome en moyenne, respectivement. Le nombre maximal d'intégrations par clone est d'environ 10 pour le dérivé pT2 et 15 pour le dérivé pFAR4. Le taux d'intégration du transposon à partir des deux plasmides n'est cependant

pas statistiquement différent. Le taux de transposition plus élevé observé avec le plasmide transposon pFAR4 ne semble donc pas résulter en un nombre d'intégrations plus important.

Ces premiers résultats ont montré que les dérivés pFAR4 constituent des vecteurs efficaces pour les composants du système *Sleeping Beauty*. L'utilisation du plasmide pFAR4 comme plasmide « donneur du transposon » conduit de plus à un taux de transposition supérieur à celui obtenu avec le plasmide transposon conventionnel pT2. Cette efficacité plus élevée ne se reflète cependant pas dans le nombre de copies de transgène intégrées. La question suivante demeure : à quelle étape de la transposition le vecteur pFAR4 apporte-t-il un avantage par rapport au plasmide conventionnel ?

Afin d'approfondir cette question et ainsi de mieux caractériser la combinaison pFAR4/SB, nous avons choisi de nous placer en système non sélectif. Il nous a en effet semblé important d'étudier la combinaison pFAR4/SB dans des conditions similaires à celles qui seront employées lors de l'essai clinique TargetAMD. Ce choix permet également d'éliminer tout biais lié à l'utilisation d'un milieu sélectif. Un tel biais a en effet déjà été décrit pour les γ -rétrovirus dans un système de sélection utilisant également la néomycine. Il a été montré que l'utilisation d'un système sélectif influençait significativement le site d'intégration de ces vecteurs viraux (Aker et al. 2006). Le risque d'un tel biais est l'augmentation du nombre d'intégrations dans les régions transcrites ou au contraire, dans les régions transcriptionnellement inactives du génome. Dans ce dernier cas, le transgène, bien qu'intégré, peut, du fait de sa position, ne pas être transcrit et ne permettra donc pas la survie de la cellule en milieu sélectif.

II.2 ETUDE DE LA COMBINAISON DES TECHNOLOGIES PFAR4/SB EN SYSTEME NON SELECTIF

Afin d'étudier la combinaison pFAR4/SB en système non sélectif, nous avons choisi d'utiliser un gène rapporteur codant la protéine fluorescente Vénus, un variant de la protéine EYFP (enhanced Yellow Fluorescent Protein).

L'essai réalisé pour cette étude est illustré par la Figure 61. Il permet d'étudier l'influence du plasmide transposon sur le processus de transposition et est divisé en 4 étapes principales:

- (1) L'étape de transfection des cellules par les plasmides
- (2) L'étape d'excision du transposon à partir du plasmide donneur
- (3) L'évaluation du taux de transposition
- (4) L'évaluation du taux d'intégration du transposon dans le génome

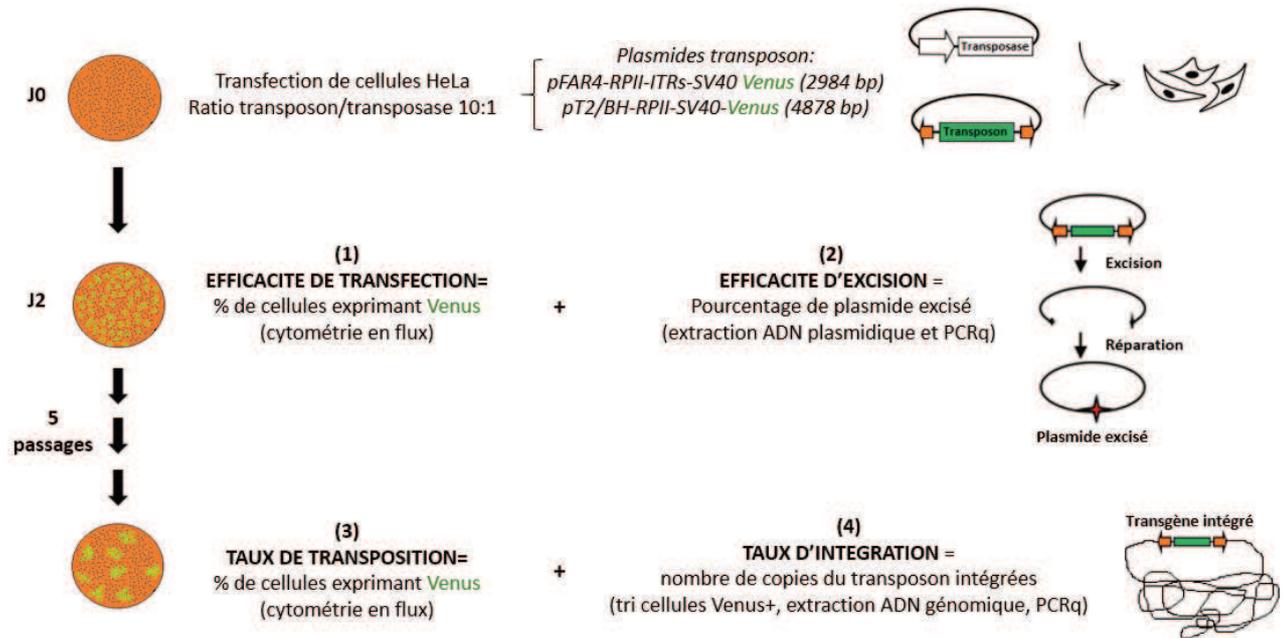


Figure 61: Etude de la combinaison pFAR4/SB en milieu non sélectif.

Le test réalisé permet de comparer l'influence des deux vecteurs transposon pFAR4 et pT2 sur les différentes étapes lors de la transposition. L'étape de transfection est étudiée par passage des cellules au cytomètre de flux (1). L'étape d'excision est évaluée par la quantification du pourcentage de plasmides transposon excisés par PCRq (2). L'étape de transposition est évaluée après plusieurs repiquages des cellules et le passage de la totalité de la population cellulaire au trieur de cellules (3). L'ADN des cellules fluorescentes triées est ensuite extrait afin de déterminer le nombre d'intégrations du transposon par PCRq (4).

(1) L'étape de transfection : son efficacité est évaluée par quantification du pourcentage des cellules exprimant Vénus par cytométrie en flux.

(2) L'excision du transposon : Cette première étape du processus de transposition consiste en la coupure du plasmide transposon par la transposase au niveau des ITRs. Après cette excision, des événements de réparation de l'ADN se produisent au niveau du plasmide donneur, permettant de reformer une molécule circulaire dépourvue de transposon. L'efficacité de cette étape peut être évaluée par un test dit « test d'excision ». Ce test consiste à extraire l'ADN plasmidique des cellules HeLa deux jours après transfection et de quantifier le nombre de plasmides excisés en réalisant une PCRq avec des amorces s'hybridant de part et d'autre des séquences ITRs. Les conditions de PCRq sont telles que si le transposon n'a pas été excisé aucun amplicon ne pourra être amplifié. Dans le cas où l'excision a été efficace, le couple d'amorces permet l'amplification d'une séquence de plus petite taille comprenant le site d'excision. Cette séquence est appelée « Produit d'excision » (EP). L'efficacité de cette étape correspond au pourcentage de plasmide donneur dont le transposon a été excisé.

(3) Le taux de transposition : Egalement désigné par « taux de transgénèse », il correspond au pourcentage de cellules exprimant la protéine Venus après plusieurs passages des cellules transfectées. Ces passages ont pour but d'éliminer le plasmide transposon épisomique résiduel et ainsi, de n'estimer que le pourcentage de cellules ayant intégré le transgène Vénus. Le taux de transposition est évalué par cytométrie en flux.

(4) Le taux d'intégration correspond au nombre d'évènements d'intégration ayant eu lieu par cellule HeLa transfectée. Il est déterminé par PCRq à partir de l'ADN génomique des cellules fluorescentes triées par cytométrie en flux

II.2.1 Construction des plasmides transposons

Pour cette étude, deux plasmides transposons ont été construits : le **pT2/BH-RPII-SV40-Venus** et le **pFAR4-RPII-ITRs-SV40-Venus** (Figure 62), portant tous deux la même cassette d'expression constituée du gène codant la protéine fluorescente Vénus exprimé à partir du promoteur SV40.

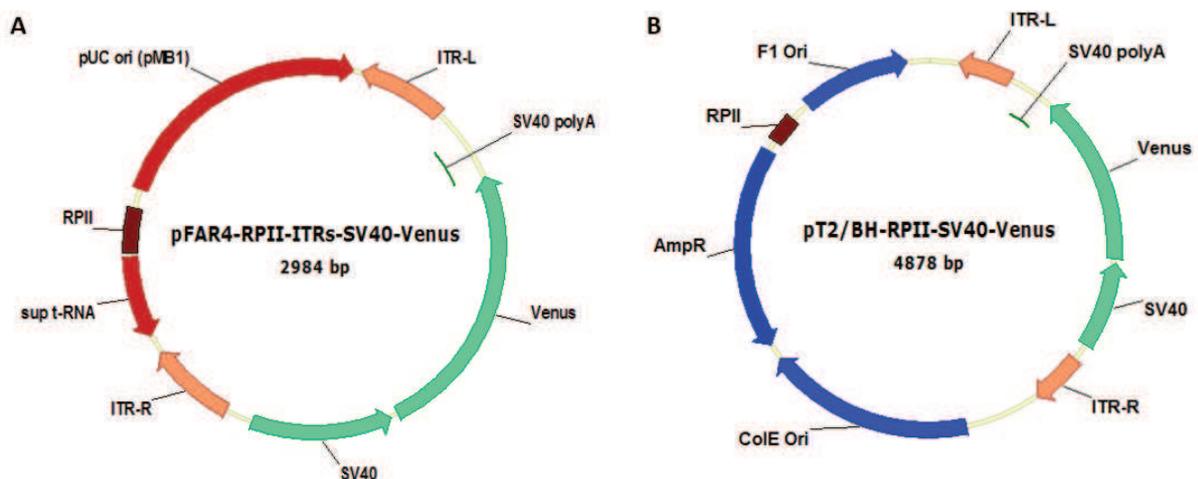


Figure 62: Plasmides transposon *pFAR4-RPII-ITRs-SV40-Venus* et *pT2/BH-RPII-SV40-Venus*.

Les deux plasmides portent la même cassette d'expression constituée du gène Vénus dont l'expression est dirigée par le promoteur SV40. Un fragment de PCR nommé RPII a été introduit dans le squelette plasmidique des deux plasmides.

Le squelette de ces deux plasmides a été modifié par insertion d'une petite séquence de 118 paires de bases désignée RPII. Cette séquence sera utilisée pour quantifier le nombre de plasmides transposon total présent dans les cellules transfectées. En effet, l'efficacité d'excision décrite précédemment est déterminée par le ratio du nombre de plasmides transposon excisés sur le nombre de plasmides transposon totaux. La détermination du nombre de plasmides transposon totaux (excisés ou non) nécessite de pouvoir amplifier par PCRq une séquence présente uniquement sur le squelette plasmidique. Or ceci pose un problème pour le plasmide transposon pFAR4 qui possède le même squelette plasmidique que le plasmide transposase pFAR4-CMV-

SB100X. Nous avons donc décidé d'intégrer une même courte séquence d'ADN non codante dans le squelette plasmidique des deux plasmides transposon. Cette séquence devait remplir les conditions suivantes : (i) elle ne devait pas être présente sur les autres plasmides employés pour la transfection et (ii) ne pas être présente dans le génome des cellules HeLa.

Le choix s'est porté sur un produit de RT-PCR, désigné RPII. Celui-ci a été amplifié à partir d'ADN complémentaire généré à partir de transcrits de cellules murines. Il correspond à une petite séquence d'ADNc du gène *RPII*, qui code l'ARN polymérase II.

Deux conditions de transfections ont été testées :

Une première série de transfections a en effet été réalisée en utilisant une quantité élevée de plasmide : 300 ng de plasmide transposon dérivé du pFAR4 ou une quantité équimolaire de plasmide transposon dérivé du pT2 (490 ng) ont été combinés à 30 ng de plasmide transposase pFAR4-CMV-SB100X pour transfecter les cellules HeLa. Le choix de ces quantités de plasmide a été orienté par les deux raisons suivantes :

- nous avons émis l'hypothèse que le pourcentage de plasmide excisé serait très faible. Nous avons donc décidé d'utiliser une quantité assez importante de plasmide transposon pour favoriser la quantification par PCRq des plasmides excisés.

- au cours de plusieurs essais de transfection, nous avons constaté un taux de mortalité cellulaire important suite au transfert de quantités de plasmide supérieures à 1 µg en utilisant la quantité de liposomes (DMAPAP/DOPE) nécessaire (4 nmol de liposome pour 1 µg d'ADN).

Nous avons donc décidé d'utiliser, dans un premier temps, une quantité totale de plasmide de 800 ng et de choisir les quantités de plasmides transposons et transposase données dans le tableau n°2 pour la condition de transfection « Elevée ».

A l'issue de cette première série de transfection et à la vue des résultats obtenus lors de l'évaluation de l'efficacité d'excision par PCRq, nous avons décidé de diminuer les quantités de plasmides transfectées. Nous avons ainsi effectué une seconde série de transfections, désignée par « Faible » en utilisant une quantité de plasmide transposon dérivé du pFAR4 de 50 ng ou une quantité équimolaire de plasmide transposon dérivé de pT2 (82 ng) en combinaison avec 5 ng de plasmide transposase pFAR4-CMV-SB100X pour une quantité totale de 500 ng d'ADN.

Plasmides	Nom du plasmide	Taille (paires de base)	Quantité de plasmide transfectée (ng)	
			« Faible »	«Elevée»
Plasmide transposase	pFAR4-CMV-SB100X-SV40	3 098	5	30
Plasmides transposon	pFAR4-RPII-ITRs-SV40-Venus	2 984	50	300
	pT2/BH-RPII-SV40-Venus	4 878	82	490

Tableau 15: Plasmides transposase et transposon Venus, tailles et quantités transfectées

Des cellules ont également été transfectées avec les plasmides transposon en absence de plasmide transposase afin d'estimer la proportion d'intégration aléatoire non spécifique de la transposase. Le plasmide pGL3-Basic, ne contenant aucune cassette d'expression, a été utilisé pour obtenir la même quantité d'ADN total pour chaque condition de transfection.

Afin de faciliter la lecture, les plasmides transposons pT2/BH-RPII-SV40-Venus et pFAR4-RPII-ITRs-SV40-Venus seront par la suite nommés pT2-Venus et pFAR4-ITRs-Venus, respectivement. D'autre part, les deux séries de transfection seront uniquement désignées par « Elevée » pour les transfections réalisées avec les quantités les plus élevées de plasmides et « Faible » pour celles réalisées avec les quantités les plus faibles.

II.2.2 Comparaison de l'efficacité de transfection

La première phase de cette étude a consisté en la comparaison de l'efficacité de transfection. Pour cela, deux jours après transfection des cellules, l'efficacité du transfert du gène Vénus est évaluée après passage des cellules au cytomètre de flux (Figure 63).

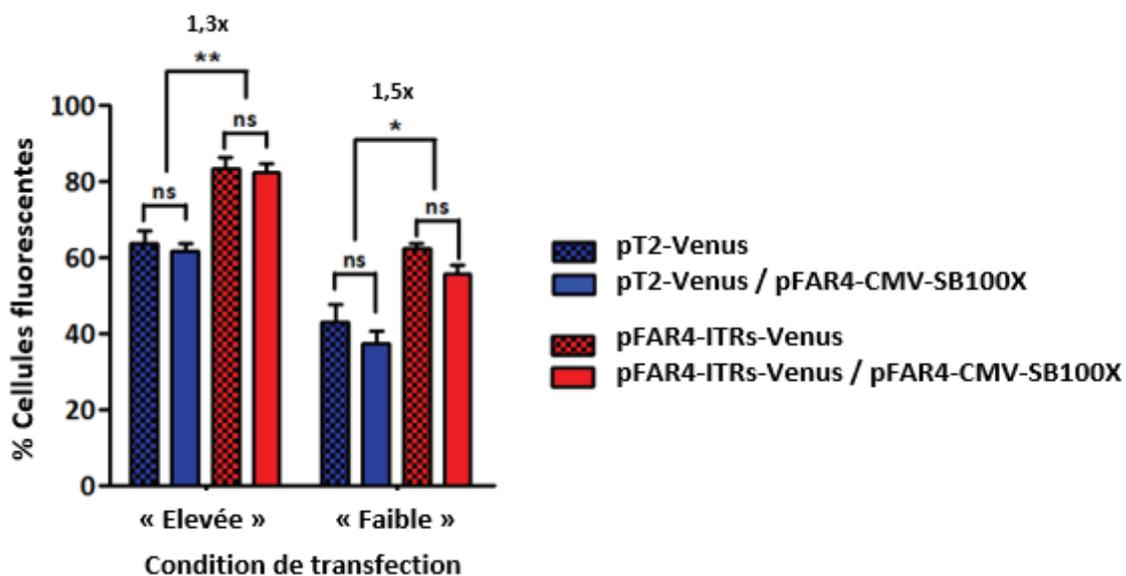


Figure 63: Pourcentage de cellules exprimant Venus deux jours après transfection.

Des cellules HeLa ont été transfectées avec 300 ou 50 ng de plasmide pFAR4-ITRs-Venus ou une quantité équimolaire (490 ou 82 ng, respectivement) de plasmide transposon pT2-Venus, avec ou sans le plasmide transposase pFAR4-CMV-SB100X. Deux jours après transfections, le pourcentage de cellules fluorescentes a été déterminé par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent la moyenne (\pm SEM) des résultats obtenus à partir de six et quatre transfections indépendantes pour les conditions « Elevée » et « Faible » respectivement. Les différences d'efficacité de transfection ont été évaluées par un test de Mann-Whitney, **P-value<0,01, *P-value<0,05, ns : différence non significative.

Quelle que soit la quantité de plasmides utilisée pour la transfection, le pourcentage de cellules fluorescentes est significativement plus important lorsque celles-ci ont été transfectées avec le plasmide transposon dérivé du vecteur pFAR4, et ce indépendamment de la présence du plasmide codant la transposase. L'efficacité de transfection entre les deux plasmides varie d'un facteur 1,3 à 1,5. La différence observée résulte probablement de la différence de taille entre les deux

plasmides transposon. En effet, le plasmide pFAR4-ITRs-Venus est plus petit que le plasmide pT2-Venus d'environ 1,9 kb et comme il l'a été décrit dans la section II.2.2 de l'introduction, la taille du plasmide influence l'efficacité du transfert au noyau, cette efficacité diminuant quand la taille du plasmide augmente.

D'après ces premiers résultats, il semblerait que la transposition à partir du pFAR4 bénéficie en premier lieu d'une meilleure efficacité de transfert du plasmide au noyau des cellules. Notre prochain objectif a donc consisté à comparer l'efficacité d'excision du transposon.

II.2.3 Comparaison de l'efficacité d'excision

Afin de déterminer l'efficacité d'excision du transposon par la transposase SB100X, à partir des deux plasmides donneurs pFAR4-ITRs-Venus et pT2-Venus. L'ADN plasmidique a été extrait à partir de cellules, deux jours après transfection, et le pourcentage de plasmides excisés a été quantifié par PCRq. Trois couples d'amorces ont été dessinés : un premier couple permettant de déterminer la quantité totale de plasmide transposon en amplifiant le fragment RPII intégré dans le squelette plasmidique et deux couples d'amorces EP-pFAR4 et EP-pT2 qui s'hybrident de part et d'autres des séquences ITRs afin de pouvoir amplifier le produit d'excision, c'est-à-dire, la séquence issue de l'excision du plasmide pFAR4 ou pT2, respectivement.

Le type de produit d'excision laissé par la transposase varie en fonction du type cellulaire. Dans le cas des cellules HeLas, plusieurs empreintes ont été décrites (Liu et al. 2004). Ces empreintes, présentées dans la section III.2.2.2 de l'introduction peuvent être : (i) canoniques, c'est-à-dire, être issues d'une simple jonction d'extrémités non homologues (NHEJ : Non homologous end joining) à partir des sites de coupures; (ii) non-canoniques lorsque un ou plusieurs nucléotides sont supprimés lors de la jonction NHEJ; (iii) et enfin ces empreintes peuvent impliquer une délétion de plusieurs dizaines de paires de bases de part et d'autre du site d'excision (Liu et al. 2004). Afin d'être en mesure de quantifier les trois types de produits d'excision, les amorces ont été dessinées pour s'hybrider à une distance supérieure à 50 pb des extrémités extérieures des séquences ITRs (Figure 64). Deux plasmides, pFAR4- Δ BamHI et pT2- Δ BamHI, « mimant » les plasmides pFAR4 et pT2 dont le transposon a été excisé, ont été construits en supprimant la cassette d'expression et les séquences ITRs. Ces plasmides permettent de réaliser les courbes standards de PCRq qui permettront de quantifier les plasmides excisés et de servir de témoins positifs de PCR et PCRq.

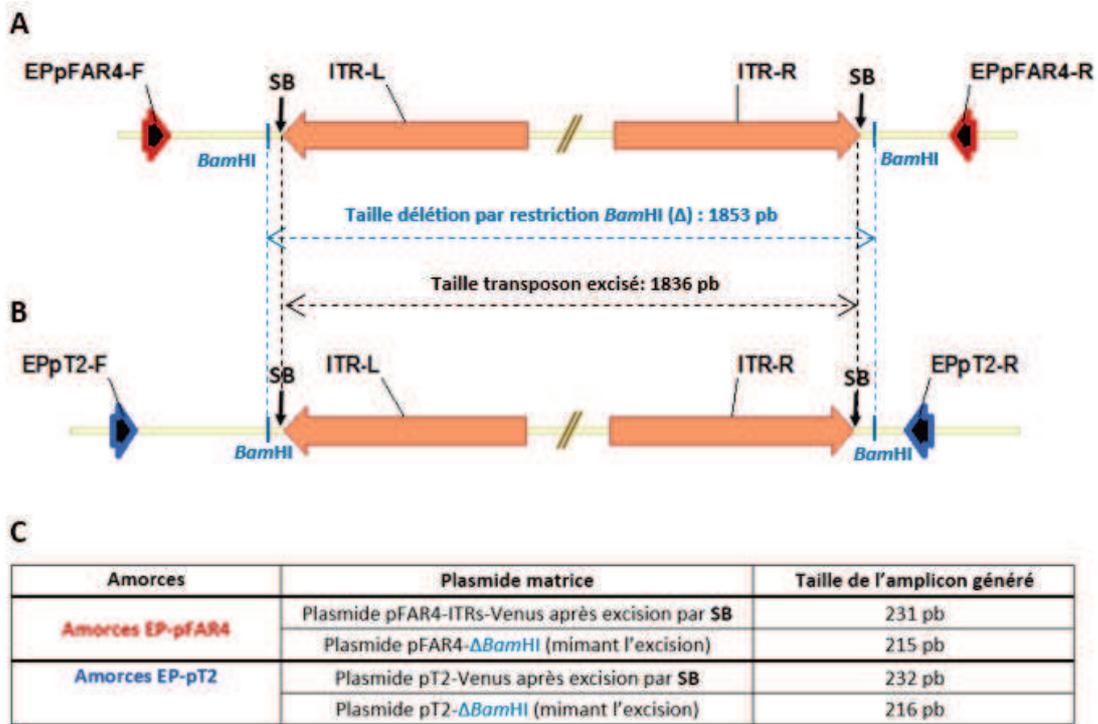


Figure 64: Amorces EPpFAR4 et EPpT2.

Représentation schématique des sites d'hybridation des couples d'amorces EPpFAR4 (A) et EPpT2 (B) utilisés pour amplifier le produit d'excision des plasmides transposons pFAR4 et pT2 respectivement et ainsi quantifier le nombre de copies de plasmide excisé. Les flèches noires verticales désignent les sites de clivage par la transposase (SB). Les barres verticales bleues indiquent les sites de restriction BamHI et la taille du fragment supprimé pour construire les plasmides pFAR4 Δ BamHI et pT2- Δ BamHI mimant l'excision. C) Tableau indiquant la taille de l'amplicon généré par PCR ou PCRq en fonction du couple d'amorces et du plasmide matrice (plasmide transposon après excision ou plasmide mimant l'excision).

Afin de valider la spécificité des amorces utilisées pour quantifier le produit d'excision, des réactions de PCR ont été dans un premier temps effectuées en utilisant comme matrice l'ADN plasmidique extrait des cellules transfectées avec les couples transposon/transposase (condition de transfection « Elevée »)(Figure 65A). Les solutions d'ADN plasmidique extraites des cellules transfectées avec les plasmides mimant l'excision et de cellules non transfectées ont servi de contrôles positif et négatif, respectivement. Cette même PCR a permis de vérifier l'absence de produit d'excision pour les cellules transfectées avec les seuls plasmides transposons.

Les PCRqs réalisées à partir des plasmides extraits montrent que la différence de taille entre les amplicons issus des plasmides excisés ou mimant l'excision résulte seulement en un léger décalage de la courbe de dissociation (Figure 65B)

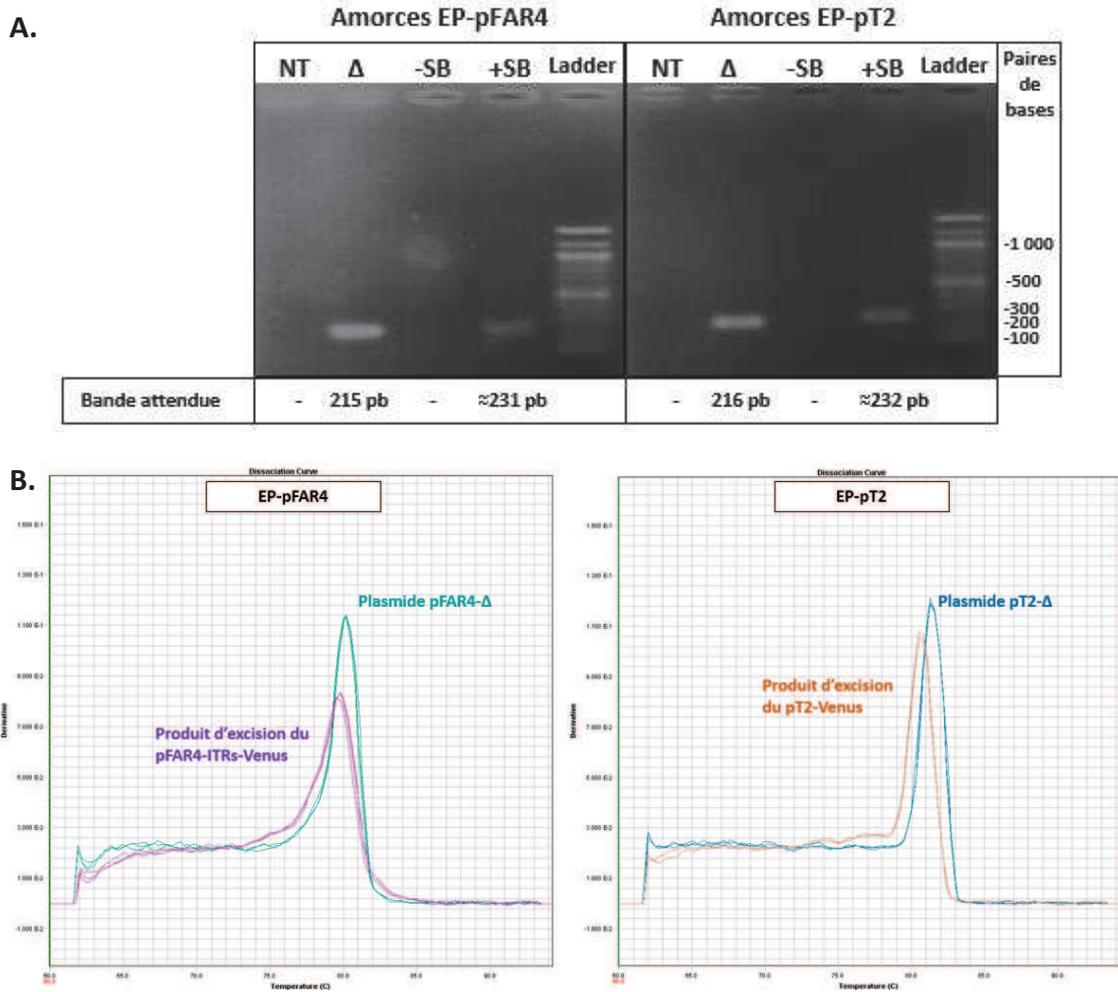


Figure 65: Détection et analyse du produit d'excision par PCR et PCRq.

Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec (i) 300 ng de plasmide pFAR4-ITRs-SV40-Venus, ou une quantité équimolaire (490 ng) de plasmide pT2-SV40-Venus, et 30 ng pFAR4-CMV-SB100X (+SB) (ii) avec le plasmide transposon seul (-SB) et (iii) avec le plasmide mimant l'excision du transposon (Δ) en utilisant une quantité correspondant à 2% du nombre de copies de plasmide transposon indiqué ci-dessus. A) Deux jours après transfection, une PCR a été réalisée avec les amorces EP s'hybridant de part et d'autre du site d'excision, à partir de l'ADN plasmidique extrait des cellules transfectées et de cellules témoins non transfectées (NT). Les produits de PCR ont été visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % en parallèle au marqueur de taille TriDye™ 100 bp DNA Ladder (NEB). B) Courbes de dissociation des amplicons obtenues par PCRq avec les amorces EP-pFAR4 ou EP-pT2, en utilisant pour ADN matrice, les plasmides mimant l'excision (pFAR4- Δ ou pT2- Δ) et l'ADN plasmidique extrait des cellules transfectées avec les combinaisons pFAR4-ITRs-Venus/pFAR4-CMV-SB100X et pT2-Venus/pFAR4-CMV-SB100X, respectivement.

La figure 66 représente le pourcentage d'excision déterminé par PCRq.

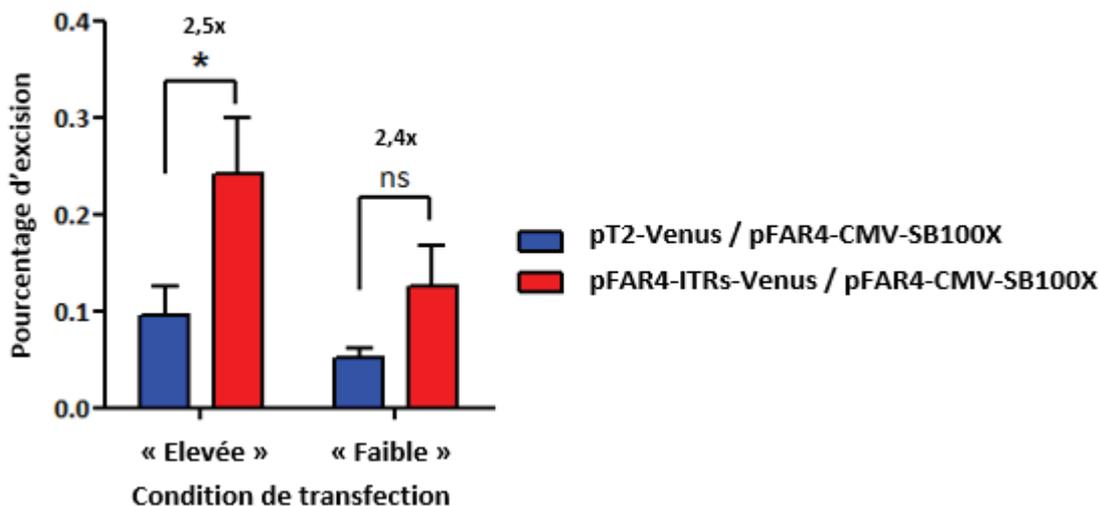


Figure 66: Comparaison des pourcentages d'excision des plasmides transposon dérivés du pFAR4 et du pT2.

Deux jours après transfection des cellules HeLa avec une quantité « Elevée » ou « Faible » de plasmides, ces derniers ont été extraits et quantifiés par PCRq en utilisant des amorces permettant d'amplifier les produits d'excision (amorces EP-pFAR4 et EP-pT2) ainsi que le nombre total de plasmides transposon (amorces cRPII). Les histogrammes représentent la moyenne (\pm SEM) des résultats de quatre PCRq réalisées à partir des échantillons provenant de 5 et 3 transfections indépendantes pour les conditions « Elevée » et « Faible », respectivement. *P-value<0,05, ns : différence non significative.

D'après les résultats de PCRq, seule une faible proportion de plasmide transposon a été excisée deux jours après transfection (entre 0,05 et 0,25% en fonction du plasmide et de la quantité d'ADN utilisée pour la transfection). Pour les deux conditions de transfection, l'utilisation du plasmide pFAR4-ITRs-Venus conduit à environ 2,5 fois plus d'évènements d'excision en comparaison avec le plasmide pT2-Venus. Il semblerait donc que le plasmide pFAR4 constitue un meilleur substrat pour l'étape d'excision du transposon par la transposase. Ces résultats semblent en accord avec l'hypothèse émise par Izsvák et al. postulant que la distance extérieure entre les extrémités du transposon influence l'efficacité de la transposition (Izsvák et al. 2000).

Ayant établi que la taille du vecteur aurait une influence sur l'étape d'excision du transposon à partir du plasmide, l'étape suivante a consisté à déterminer la répercussion sur le taux de transposition.

II.2.4 Comparaison du taux de transposition

Afin de déterminer l'impact du vecteur sur le taux de transposition, en conditions non sélectives, les cellules transfectées (10^4) ont été passées cinq fois (environ 10^7 cellules à passage n°5). A l'issue de ces passages, le pourcentage de cellules fluorescentes a été déterminé par cytométrie en flux. Ce pourcentage correspond, dans le cadre de cette expérience, au taux de transposition.

Quelles que soient les quantités de plasmides utilisées pour les transfections, le pourcentage de cellules fluorescentes varie de 20 à 23% et de 27 à 28% pour les cellules transfectées avec le transposon dérivés de pT2 et de pFAR4, respectivement, en combinaison avec le plasmide codant

SB100X. En absence de transposase, un très faible pourcentage de cellules fluorescentes (moins de 1,3 %) a été obtenu, il peut résulter d'une persistance du plasmide sous forme épisomique ou de son intégration aléatoire dans le génome des cellules ou bien d'une excision de la cassette d'expression indépendante de la transposase.

Pour comparer l'effet de la taille ou de la nature du plasmide sur le taux de transposition, les pourcentages de fluorescence ont été exprimés en valeurs relatives afin de pouvoir s'affranchir des variations liées à l'utilisation de différents trieurs cellulaires disponibles sur la plateforme de cytométrie. Le taux de transposition a été exprimé comme suit :

$$\frac{\text{Pourcentage de cellules transfectées par (pFAR4 - ITRs - Venus + SB) exprimant Venus}}{\text{Pourcentage de cellules fluorescentes transfectées par (pT2 - Venus + SB) exprimant Venus}}$$

Les moyennes des valeurs obtenues sont représentées Figure 67A.

La fluorescence moyenne exprimée par les cellules triées a été mesurée, et a également été exprimée sous forme de valeurs relatives (Figure 67B).

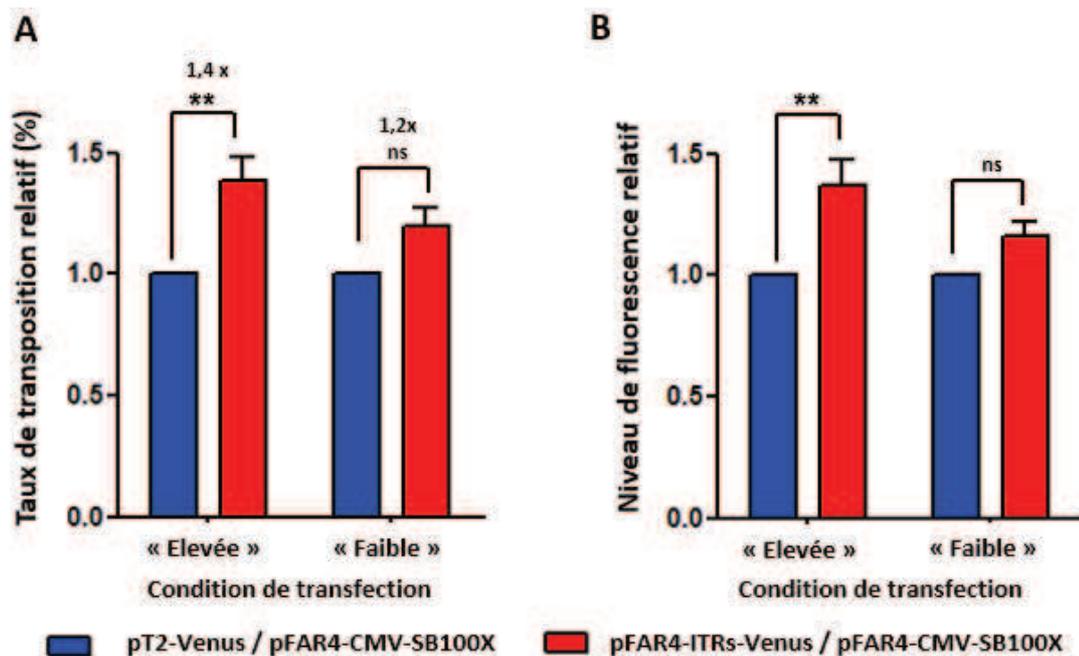


Figure 67: Comparaison de l'efficacité de transposition et du niveau de fluorescence.

Deux jours après chaque transfection, 10 000 cellules transfectées par les plasmides transposons dérivés du pFAR4 ou du pT2 avec le plasmide transposase ont été passées 5 fois avant d'être triées par cytométrie en flux afin de déterminer le pourcentage de cellules exprimant la protéine fluorescente Vénus. Ce pourcentage correspond au taux de transposition et a été exprimé en valeurs relatives en divisant les valeurs obtenues avec le plasmide pFAR4 par celles obtenues avec le plasmide pT2 (A). Le niveau de fluorescence de cellules triées a aussi été mesuré et est également exprimé en valeurs relatives (B). Les histogrammes représentent les moyennes (\pm SEM) des valeurs déterminées pour chaque transfection, n=5 ou 3 pour les conditions utilisant des quantités élevées (« Elevée ») ou faibles (« Faible ») de plasmides. L'analyse statistique a été réalisée par un test signé des Rangs de Wilcoxon, **, p-value < 0,01.

L'expression relative du taux de transposition permet de mettre en évidence une différence significative entre les deux plasmides transposons pour la condition de transfection « Elevée ». En

effet, l'efficacité de transposition est environ 1,4 fois plus élevée pour le plasmide transposon pFAR4. Pour la seconde condition de transfection, pour laquelle une quantité plus faible de plasmides a été utilisée (« Faible »), une différence d'efficacité de transposition d'un facteur 1,2 environ est mesurée et cette différence n'est pas significative (P-value = 0,0625).

Une différence similaire est observée en termes de fluorescence. La fluorescence mesurée pour les cellules transfectées avec le transposon pFAR4 est 1,37 et 1,16 fois plus élevée que celle mesurée pour les cellules pT2 pour les conditions de transfection « Elevée » et « Faible », respectivement.

Ces résultats semblent donc indiquer que le taux de transposition ne corrèle pas totalement avec le taux d'excision. Afin de pouvoir approfondir ce point, nous avons également déterminé le nombre d'intégrations du transgène *Vénus* dans le génome des cellules triées exprimant la protéine fluorescente.

II.2.5 Efficacité d'intégration

Le taux d'intégration du transgène *Vénus* dans le génome des cellules HeLa a été déterminé par PCRq en utilisant un couple d'amorces s'hybridant spécifiquement avec le gène codant la protéine fluorescente. Afin d'éliminer le nombre de copies provenant du plasmide transposon (pouvant être présent sous forme épisomique ou intégré), une PCRq utilisant les amorces cRPII spécifiques du squelette plasmidique a été réalisée en parallèle. Le nombre de copies de transgène intégré de façon spécifique de la transposase correspond donc au résultat du calcul suivant : (nombre copies de *Venus*) – (nombre de copies de fragment RPII). Enfin, cette valeur a été divisée par le nombre de copies du gène de référence *RPPHI*, également quantifié par PCRq (Figure 68A). Afin de faciliter l'analyse comparative entre les différentes conditions de transfection et l'évaluation de l'effet du plasmide transposon sur le taux d'intégration, les résultats ont également été exprimés sous forme de valeurs relatives (Figure 68B).

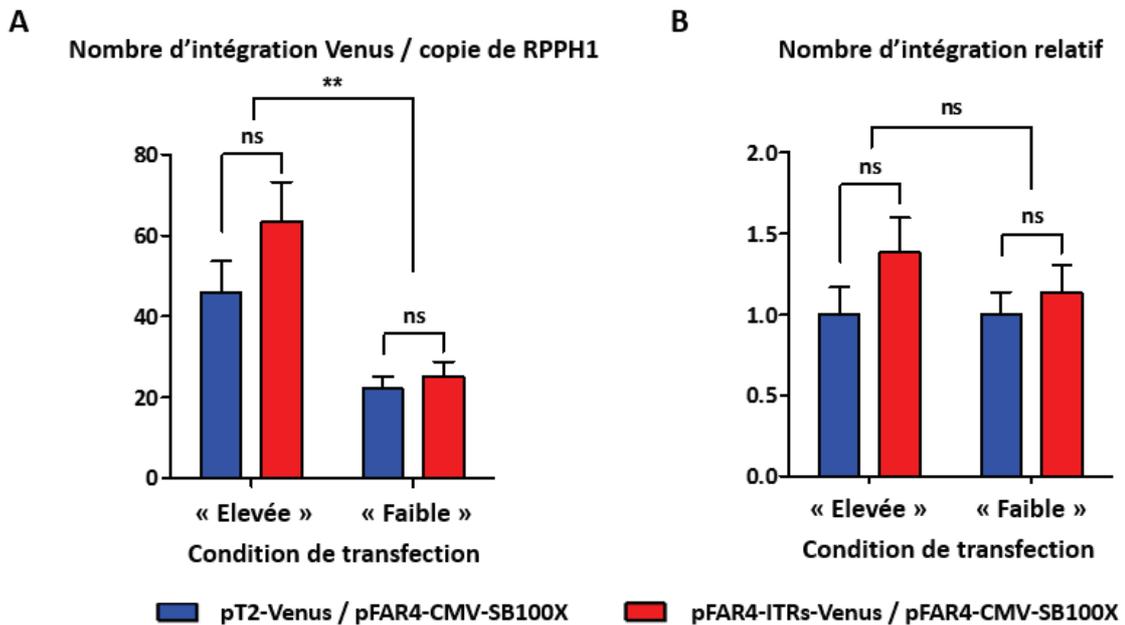


Figure 68: Nombre d'intégrations du transgène Vénus.

Le nombre moyen de copies du transgène Vénus intégrées dans le génome des cellules HeLa fluorescentes a été déterminé par PCRq. Les résultats ont été normalisés par le nombre de copies du gène de référence *RPPH1* et sont exprimés en valeurs absolues (A) ou relatives par rapport au nombre de copies moyen obtenu à partir du plasmide transposon pT2 (B). Les histogrammes correspondent à la moyenne (\pm SEM) des valeurs obtenues après 4 PCRq utilisant des échantillons provenant de 5 ou 3 transfections pour les conditions « Elevée » et « Faible », respectivement. La différence entre les nombres de copies a été analysée par le test statistique de Mann-Whitney (ns = différence non significative, **P-value<0,01).

On peut constater qu'un nombre d'intégrations élevé a été mesuré et que ce nombre dépend de la quantité de plasmide transfectée. Ces chiffres sont cependant à analyser avec précautions puisque, comme il l'a été évoqué précédemment, les cellules HeLa ont, en moyenne, 3 copies de chaque chromosome. Le nombre de sites pouvant être la cible d'une intégration par *Sleeping Beauty* est donc augmenté par rapport aux cellules humaines normales non cancéreuses.

On constate également que le nombre de copies intégrées est légèrement plus élevé pour les cellules transfectées avec le plasmide transposon pFAR4 que pour celles transfectées avec le pT2. La différence n'est cependant pas statistiquement significative. Ainsi, ces résultats semblent suggérer qu'un pourcentage d'excision plus élevé ne conduit pas systématiquement à une augmentation du taux d'intégrations.

II.2.6 Quantification du nombre de copies du gène SB100X :

La présence prolongée de plasmide codant la transposase peut conduire à des transpositions additionnelles à partir du génome et donc à l'instabilité du transgène mais surtout à l'introduction de mutations dans le génome (Hackett et al. 2013). L'intégration aléatoire du plasmide codant SB100X représente donc une source de risque potentiel. Afin d'étudier la probabilité d'intégration aléatoire de la transposase dans le génome des cellules HeLa employées pour notre essai, une PCRq a été réalisée à partir de l'ADN génomique extrait des cellules exprimant la protéine Vénus

à l'issue des 5 passages, en utilisant des amorces s'hybridant spécifiquement avec le gène codant SB100X.

Une moyenne d'environ 0,05 copies de SB100X par copie du gène *RPPHI* a été mesurée à la fois pour les cellules pFAR4 et les cellules pT2 pour la condition de transfection « Elevée » et une moyenne de 0,04 et 0,03 copies de SB100X pour les cellules pFAR4 et pT2, respectivement, pour la condition « Faible ». Ces valeurs peuvent être considérées comme négligeables en comparaison aux nombres de copies de pFAR4-CMV-SB100X transfectées (Condition « Elevée » : 30 ng = $8,8 \cdot 10^9$ copies et condition « Faible » : 5 ng = $1,5 \cdot 10^9$ copies). Ceci nous permet de conclure en la perte de la quasi-totalité du plasmide codant la transposase au cours des passages et en une absence d'intégration aléatoire du gène codant la transposase.

IL.3 ETUDE DE LA COMBINAISON pFAR4/SB EN CELLULES PRIMAIRES

Encouragés par les résultats prometteurs obtenus avec la combinaison pFAR4/SB après transfection des cellules HeLa, les partenaires du projet TargetAMD, Nina Harmening (Université de Genève) et Sandra Johnen (Uniklinik, RWTH, Aachen) ont également testé la combinaison dans des cellules primaires fraîchement isolées, et difficilement transfectables, en employant le système de transfection qui sera utilisé lors de l'essai clinique.

Afin de mener à bien ces essais, nous avons, au laboratoire, construits deux nouveaux plasmides transposons dérivés du pFAR4 : le plasmide **pFAR4-ITRs-CAGGS-Venus**, codant la protéine fluorescente Vénus, et le plasmide **pFAR4-ITRs-CMV-PEDF**, codant le facteur thérapeutique PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor), en introduisant dans le pFAR4 les cassettes d'expression extraites à partir de plasmides originaux dérivés de pT2.

Les plasmides ont ensuite été transmis aux partenaires chargés des expériences sur les cellules primaires dont les résultats sont brièvement présentés dans cette section.

Les essais ont consisté à cotransfecter par électroporation 10 000 cellules primaires de l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE), fraîchement isolées, avec les plasmides pFAR4 codant la transposase et contenant le transposon PEDF d'une part, ou Venus d'autre part, en respectant un ratio quantité de transposon : quantité de transposase de 1 :16 (le plus efficace dans ce système cellulaire)(Harmening et al. 2014; Harmening et al. 2015). Les essais ont été réalisés en comparant avec des quantités équimolaire de plasmides originaux analogues dérivés de pT2. Le niveau de PEDF sécrété a été mesuré par ELISA et Western Blot et la fluorescence des cellules transfectées avec les plasmides codant Vénus a été suivie par analyse microscopique et cytométrie.

Les résultats de ces essais ont montré, d'une part, qu'un faible nombre de cellules primaires humaines pouvaient être efficacement transfectées et, d'autre part, que l'utilisation du plasmide pFAR4 comme vecteur générait une efficacité de transfection augmentée (Tableau 16)(Harmening et al. 2015).

Transgène	Plasmides transposon	Efficacité de transfection	Facteur pFAR4/pT2 Significativité
Vénus	pFAR4-ITRs-CAGGS-Venus	24,7 % cellules fluorescentes	x 3,8 *** p<0,0001
	pT2-CAGGS-Venus	6,5 % cellules fluorescentes	
PEDF	pFAR4-ITRs-CMV-PEDF	6,5 ng PEDF/h/10 ⁴ cellules	x 2,4 ** p<0,001
	pT2-CMV-PEDF	2,7 ng PEDF/h/10 ⁴ cellules	

Tableau 16: Efficacité de transfection de la combinaison pFAR4/SB en cellules primaires RPE humaines. 10 000 cellules RPE (Epithélium pigmentaire de la rétine) fraîchement isolées d'yeux de donneurs humains sains ont été transfectées par électroporation avec d'une part (i) le plasmide pFAR4-CMV-SB100X et le plasmide pFAR4-ITRs-CAGGS-Venus ou une quantité équimolaire de plasmide pT2-CAGGS-Venus ; et d'autre part, (ii) avec le plasmide pFAR4-CMV-SB100X et le plasmide pFAR4-ITRs-CMV-PEDF ou une quantité équimolaire de pT2-CMV-PEDF. Deux jours après transfection le pourcentage de cellules fluorescentes ou la quantité de PEDF sécrétée ont été déterminés. Transgène Vénus : valeurs issues de 15 transfections réalisées sur les cellules isolées à partir de 3 donneurs. Les données ont été analysées par un test de t. Transgène PEDF : valeurs issues de 35 transfections réalisées sur les cellules isolées à partir de 7 donneurs. Les valeurs ont été comparées en réalisant une analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA).

En parallèle, des cellules de l'épithélium pigmentaire de l'iris bovin fraîchement isolées (BIPE) ont été cotransfectées avec les plasmides pFAR4-CMV-SB100X et pFAR4-ITRs-CMV-PEDF en respectant le ratio 1 :16. 21 jours après transfection, une quantité de PEDF 1247 fois supérieure était mesurée dans le milieu de culture de ces cellules par rapport à celui des cellules témoins non transfectées. Une sécrétion stable du PEDF a pu être détectée sur plus de 200 jours de culture (Harmening et al. 2014).

Ces résultats ont prouvé l'efficacité de l'approche et ont confirmé que l'utilisation des dérivés pFAR4 comme vecteurs transposons permettait d'augmenter l'efficacité du transfert et de l'expression du transgène dans des cellules primaires.

Les résultats combinés des études menées avec les cellules HeLa et les cellules primaires, en utilisant différentes méthodes de transfection, montrent que l'efficacité du système de transposition *Sleeping Beauty* est supérieure en utilisant les dérivés de pFAR4 plutôt que les plasmides conventionnels dérivés de pT2.

II.4 PRODUCTION DES PLASMIDES pFAR4-CMV-SB100X ET pFAR4-ITRS-CMV-PEDF EN CONDITIONS « BPF »

L'utilisation des vecteurs pFAR4 en essais cliniques nécessite leur production dans le respect des conditions « BPF » (Bonnes pratiques de fabrication) qui ont été décrites dans le chapitre II.7 de l'introduction. Dans le cadre du projet TargetAMD, la production des plasmides pFAR4 va être menée par le partenaire AmBTU (Amsterdam Biotherapeutics Unit, The Netherlands).

Comme il l'a été décrit dans la section II.7.2 de l'introduction, il est à ce jour interdit d'utiliser des produits d'origine animale dans le processus de production des plasmides afin d'éviter tout risque de maladies dues aux prions (European Medicines Agency 2012). Afin d'optimiser le transfert de la technologie pFAR4 du laboratoire aux unités de production BPF de AmBTU, il a donc été nécessaire d'identifier un nouveau milieu de culture pour remplacer le milieu complexe MH (Mueller Hinton) contenant des protéines animales et jusqu'alors utilisé pour la production du pFAR4. Ce nouveau milieu se devait de respecter les contraintes suivantes : (i) aucun composant d'origine animale (ii) absence ou faibles traces de thymidine et (iii) maintien du rendement de production des dérivés pFAR4.

Dans le cadre de cette thèse, deux milieux ne contenant que des composants d'origines minérale et végétale a été identifiés et ont été testés. Leur composition ainsi que celle du milieu MH sont données dans le tableau ci-dessous.

Milieu	Composant (concentration)
MH	Infusion de viande de bœuf (3 g/L) Amidon (1,5 g/L) Peptones de caséine (17,5 g/L)
Select APS™ LB (LB APS)	Chlorure de sodium (5 g/L) Extrait de levure (12,5 g/L) Peptones de soja (2,5 g/L)
LB Vegitone	Chlorure de sodium (5 g/L) Extrait de levure (12,5 g/L) Peptones végétales (2,5 g/L)

Tableau 17: Composition des milieux MH, Select APS™ LB et LB Vegitone.

Un premier criblage a été effectué en étalant une culture de TM#47-9a (auxotrophe à la thymidine) sur des boîtes de pétri contenant soit : (i) du LB supplémenté en thymidine (boîte contrôle), (ii) du LB APS ou (iii) du LB Vegitone (Tableau 18).

Milieu	Nombre de clones après culture sur la nuit à 37°C
LB + thymidine	Tapis cellulaire
Select APS™ LB (LB APS)	0
LB Vegitone	>200

Tableau 18: Evaluation de la sélectivité des milieux Select APS™ LB et LB Vegitone.

Un volume donné de culture de TM#47-9a a été étalé sur des boîtes de pétri réalisées avec les différents milieux. Après incubation des boîtes sur la nuit à 37°C, le nombre de clones ayant poussés ont été quantifiés.

Nous avons pu conclure, d'après ce premier criblage, que le milieu LB APS constitue un milieu sélectif satisfaisant, contrairement au milieu LB Vegitone.

Le milieu LB APS a donc ensuite été évalué en culture (Figure 69). L'absence de thymidine dans ce milieu a été confirmée par l'absence de croissance de la souche triple mutante TM#47-9 en absence de thymidine (Figure 69A, courbe bleu clair). La transformation des bactéries par le plasmide pFAR4-ITRs-CMV-PEDF permet de restaurer une densité bactérienne similaire à celle mesurée dans le milieu supplémenté en thymidine (Figure 69A, courbes bleu foncé et grise). Avec cette dernière condition le temps de latence est cependant moindre. En effet, la souche TM#47-9a métabolise directement la thymidine présente dans le milieu de culture alors que, en absence de thymidine, la croissance de la souche nécessite la synthèse de la protéine ThyA après suppression de la mutation permise par la présence du plasmide dérivé du pFAR4 (Voir Figure 23 du chapitre II de l'introduction).

Le rendement de production de plasmides dérivés de pFAR4 dans ce nouveau milieu est similaire à celui obtenu avec le milieu Mueller-Hinton jusqu'alors utilisé (Figure 69B). Ce rendement a été confirmé lors de la production d'autres dérivés du pFAR4, que ce soit dans des volumes de culture faibles (quelques millimètres) ou plus élevés (jusqu'à 2L).

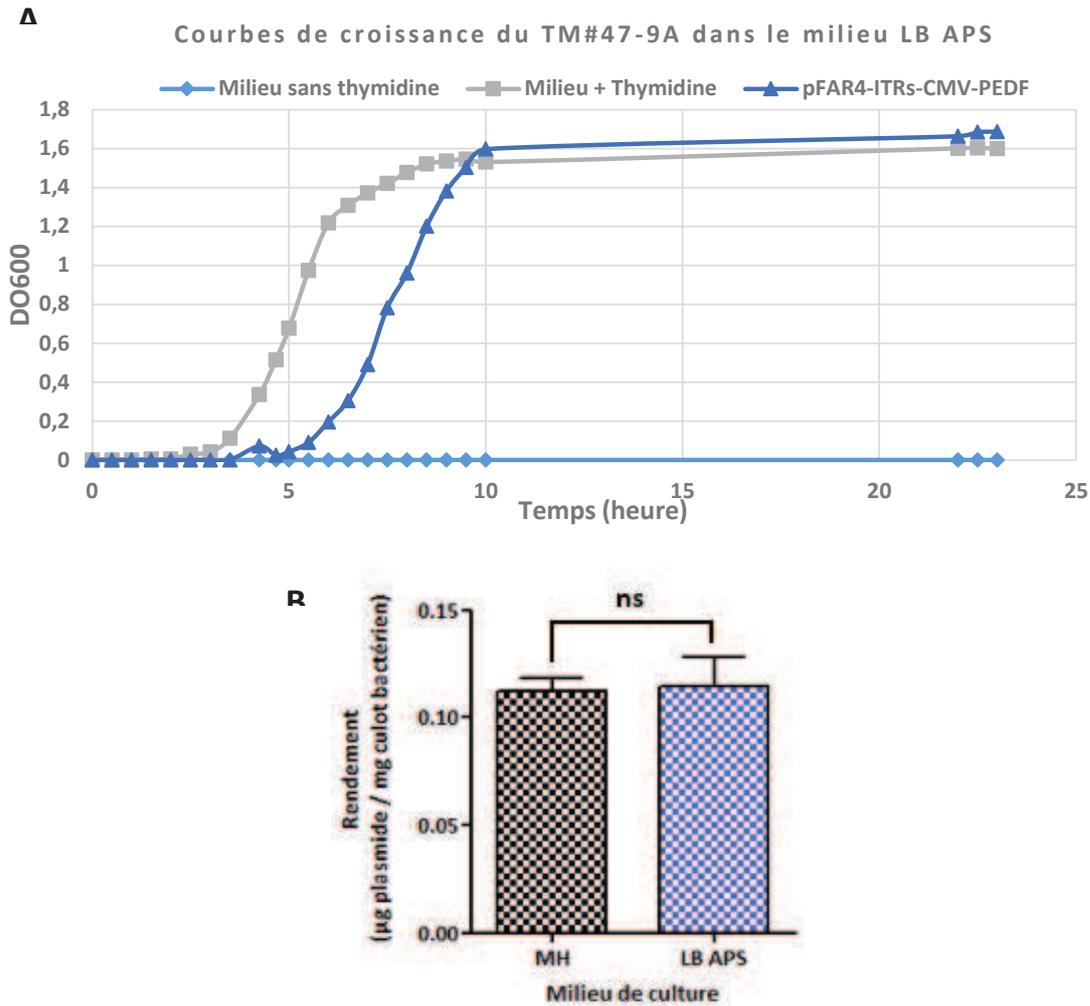


Figure 69 : Courbes de croissance de la souche bactérienne triple-mutante TM#47-9a et rendement de production d'un dérivé du pFAR4.

A) Les cultures ont été incubées à 37°C dans le milieu LB APS sous agitation constante (250 rpm) et la densité optique (DO 600) a été mesurée toutes les 30 min. La courbe bleu clair correspond à la croissance de la souche TM#47-9a dans le milieu en absence de thymidine, la courbe grise à la croissance du TM#47-9a dans le milieu en présence de thymidine et la courbe bleu foncée correspond au profil de croissance du TM#47-9a transformé avec le plasmide pFAR4-ITRs-CMV-PEDF dans le milieu LP APS sans thymidine. B) 3 mL de milieu MH ou de milieu LB APS ont étéensemencés avec des bactéries TM#47-9a transformées avec le plasmide pFAR4-ITRs-CMV-PEDF. Après une culture de 8h à 37°C et sous agitation constante à 250 rpm, les culots bactériens ont été pesés puis l'ADN plasmidique a été extrait et quantifié. Le rendement correspond à la quantité de plasmide extrait (µg) par mg de bactéries. Les histogrammes représentent la moyenne (±SEM) des rendements déterminés à partir de trois cultures. Les rendements moyens ont été comparés en utilisant le test statistique de Mann-Whitney, ns : différence non significative. LB APS : LB Broth Base, Select APS™, BD, MH : Mueller-Hinton.

Le milieu identifié respecte donc les contraintes de rendements et réglementaires imposées et sera donc utilisé pour la production des plasmides dérivés du pFAR4 en conditions BPF.

III DISCUSSION

Dans le cadre de cette thèse, nous avons réalisé une étude *in vitro* visant à évaluer la combinaison de la technologie des miniplasmides pFAR4 avec la technologie de transposition *Sleeping Beauty*. Cette combinaison devrait être prochainement utilisée dans le cadre d'essais cliniques réalisés en Suisse et en Autriche (projet européen TargetAMD) dont le but est de traiter la DMLA en intégrant le gène codant le facteur neuroprotecteur PEDF dans le génome des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine ou de l'iris des patients afin qu'elles l'expriment sur le long terme.

Afin d'étudier le potentiel du pFAR4 comme vecteur du système *SB*, les essais ont été réalisés en comparaison avec les plasmides jusqu'alors utilisés pour délivrer les composants du système (plasmides transposon dérivés de pT2). Nous avons ainsi montré que le plasmide pFAR4 constituait un vecteur efficace pour les composants du système *SB* à la fois en employant un système de sélection avec un antibiotique et en système non sélectif.

En système sélectif, l'utilisation du pFAR4 comme plasmide transposon codant le gène de résistance à la néomycine *NeoR*, a en effet conduit à l'obtention de 0,8 à 2% de colonies résistantes à l'antibiotique, soit 2 fois plus que le taux de transposition observé avec le plasmide transposon pT2 contenant la même cassette d'expression.

En système non sélectif, un taux de transgénèse de 27% a été mesuré en utilisant le plasmide pFAR4 soit un taux 1,2 à 1,3 fois plus élevé qu'avec le pT2.

Il n'est pas possible d'effectuer une comparaison directe entre les taux de transposition obtenus dans le cadre de ces deux expériences. En effet, si dans l'essai réalisé avec le transgène *NeoR* le taux de transposition est estimé à partir de clones, c'est une population cellulaire hétérogène, avec des temps de génération variés, qui est cependant étudiée dans l'essai réalisé avec le transgène *Venus*. Afin de comparer les deux expériences il aurait fallu réaliser ce dernier essai d'une autre manière, par exemple, en effectuant un tri cellulaire deux jours après transfection pour isoler des clones fluorescents. Le taux de transposition correspondrait alors au pourcentage de ces clones ayant formé des colonies fluorescentes et serait donc comparable au taux de transposition mesuré dans l'essai avec le transgène *NeoR*. Cette dernière expérience ne serait cependant pas représentative de la procédure qui sera réalisée dans le cadre du projet TargetAMD puisque, dans cette procédure, aucune sélection des cellules après transfection ne sera effectuée.

Si les deux tests ne sont pas comparables, il est cependant possible de comparer les différences de taux de transposition entre les deux plasmides transposon pFAR4 et pT2 mesurées pour ces deux essais. On peut ainsi constater que la différence est supérieure en milieu sélectif. La faible différence de taux de transposition en milieu non sélectif est assez surprenante, d'autant plus que

le pFAR4 semble conférer un avantage dans les premières étapes de l'essai de transposition. En effet, d'après nos résultats, l'utilisation du plasmide pFAR4 comme plasmide transposon semble tout d'abord favoriser le transfert du transgène au noyau et également favoriser l'action de la transposase lors de l'étape d'excision.

Comme évoqué dans la section II.2.3 des résultats, le pourcentage d'excision plus élevé observé pour le transposon pFAR4 peut résulter de la taille du plasmide, plus petit d'environ 1,9 kb par rapport au plasmide pT2. En effet, d'après Izsvák et al (Izsvák et al. 2000), une diminution de la taille de la séquence située à l'extérieur des ITRs augmenterait l'efficacité de la transposition en facilitant la formation du complexe synaptique dont une représentation est donnée Figure 70. Une hypothèse formulée serait que les molécules de transposases, après s'être liées à une première séquence ITR, peuvent être amenées à « chercher » et rapprocher la seconde ITR de façon bidirectionnelle, un plasmide de petite taille faciliterait donc la formation et le maintien du complexe synaptique (Izsvák et al. 2000).

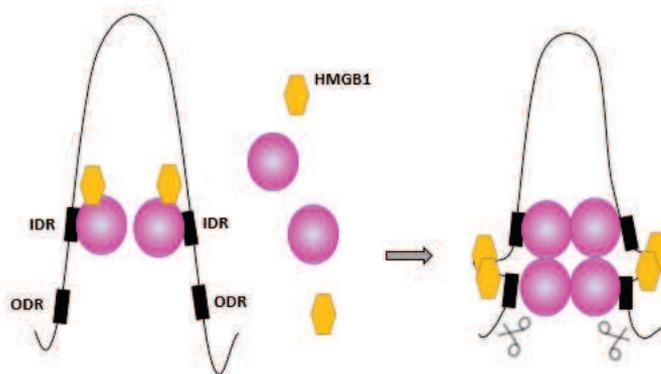


Figure 70 : Modèle de formation du complexe synaptique.

Dans ce modèle proposé par Ivics & Izsvák (2015), les molécules de transposase se lient tout d'abord au niveau des sites de liaison intérieurs (IDR : Inner Directed Repeat) des séquences ITRs (Inverted Terminal Repeats) du transposon. Le recrutement du cofacteur cellulaire HMGB1 stimule la liaison spécifique de la transposase aux IDRs. HMGB1 se lie ensuite à la région séparant les DRs, assurant le bon positionnement et le rapprochement des ODRs (Outer Directed Repeat) afin de favoriser la liaison des deux dernières molécules de transposase. La coupure (ciseaux) est réalisée une fois le complexe formé. Schéma réalisé d'après Ivics & Izsvák 2015.

Cette hypothèse selon laquelle un petit plasmide favoriserait la formation du complexe synaptique et ainsi l'étape d'excision n'a cependant pas été vérifiée quantitativement par Sharma et al (2013) dans une étude similaire à la nôtre, dans laquelle ils ont analysé le potentiel d'un minicercle comme vecteur du système *SB* en comparaison à un plasmide de taille 2,3 fois plus importante (Sharma et al. 2013). En effet, dans cette étude, les amplicons correspondant au produit d'excision des deux vecteurs, analysés sur gel d'agarose, étaient d'intensité égale, laissant supposer que la nature du vecteur transposon n'influence pas l'étape d'excision. Il faut cependant noter que la comparaison du taux d'excision a été réalisée par PCR et non par PCRq et donc sans moyen de normalisation.

Malgré un taux de transfection et d'excision plus élevé avec le plasmide transposon pFAR4-ITRs-Venus, seule une faible différence est observée au niveau du pourcentage de cellules transgéniques et au niveau du nombre d'intégrations. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cela.

La première hypothèse serait que les phases d'excision et d'intégration soient cinétiquement distinctes l'une de l'autre et que la dernière étape soit limitante. Cette hypothèse suggère tout d'abord que tout événement d'excision ne conduirait pas à un événement d'intégration. Ceci a effectivement été montré lors d'une des premières études réalisées avec le système *Sleeping Beauty*. Dans cette étude, des cellules souches embryonnaires murines contenant un transposon à un locus unique de leur génome ont été transfectées avec un plasmide codant la transposase (SB non hyperactive de 1^{ère} génération). Le nombre de clones dont le transposon a été excisé du locus initial pour être intégré à un second locus a ensuite été quantifié : seuls 76% des événements d'excision ont résulté en un événement d'intégration à un autre locus du génome (Luo et al. 1998). Cette première hypothèse suggère également que l'étape d'intégration du transgène dans le génome serait notamment limitée en présence de nombreux événements d'excision. Ceci pourrait par exemple être dû à une saturation des cofacteurs cellulaires agissant lors de l'étape d'intégration.

Cette première hypothèse est en corrélation avec l'étude de Kolacsek et al (2014), réalisée dans des cellules HeLa et HEK-293, qui montre que le haut taux d'excision obtenu avec des transposases hyperactives SB100X et hyPB (version hyperactive de la transposase *piggyBac*) ne résultait pas en un nombre d'intégration et en un taux de transgénèse plus élevés par rapport aux transposases non hyperactives (Kolacsek et al. 2014). Dans le cas du système *piggyBac*, il a été montré que certaines modifications de la séquence permettaient de générer des variants de la transposase capable d'exciser le transposon mais non de le réintégrer à un autre locus (Yusa 2015).

Notre hypothèse ne corrèle cependant pas avec l'étude de Liu et al, réalisée avec la transposase non hyperactive, dont la conclusion majeure était la corrélation entre le taux d'excision et le taux de transposition du système *SB* (Liu et al. 2004).

Dans le cas de notre étude, cette première hypothèse permet d'expliquer pourquoi seule une faible différence de nombres de copies intégrées est observée entre les cellules pFAR4 et les cellules pT2 malgré une différence de taux d'excision importante. Cependant, cette hypothèse n'explique pas la faible différence observée entre le pFAR4 et pT2 en termes de pourcentages de cellules transgéniques.

Une autre hypothèse pouvant être proposée serait que le pourcentage d'excision élevé observé pour le pFAR4 conduise effectivement à un nombre d'intégrations également plus élevé. Ce haut

taux d'intégration pourrait cependant également impliquer une fréquence d'intégration dans des gènes essentiels augmentée. Le métabolisme cellulaire en serait alors perturbé conduisant soit à la mort cellulaire (et donc la perte du clone génétiquement modifié) ou bien à une croissance relativement faible en comparaison aux cellules non modifiées. Un moyen de limiter le nombre d'intégrations et donc la perturbation du métabolisme cellulaire serait de diminuer la quantité de transposon. Nous pouvons cependant constater que si le nombre d'intégrations diminue entre les conditions de transfection « Elevée » et « Faible », aucune différence n'est pour autant mesurée entre les cellules pFAR4 et pT2. Il pourrait être intéressant de répéter cet essai en utilisant des quantités de plasmide moins importantes afin de voir si, dans ces conditions, le pourcentage d'excision élevé à partir du pFAR4 résulte en une différence en termes de taux de transposition.

Enfin, une troisième hypothèse pouvant être envisagée, est celle formulée par Dalsgaard et al (2009). Cette hypothèse repose sur l'activité *cis*-transcriptionnelle des séquences ITRs du transposon qui peut conduire à la synthèse de transcrits sens ou anti-sens et qui est considérée comme un mécanisme d'« autorégulation » du transposon (Dalsgaard et al. 2009b). L'intégration d'un nombre de copies important dans une même cellule conduirait à des niveaux de transcrits anti-sens assez élevés pour induire une extinction de l'expression du transposon.

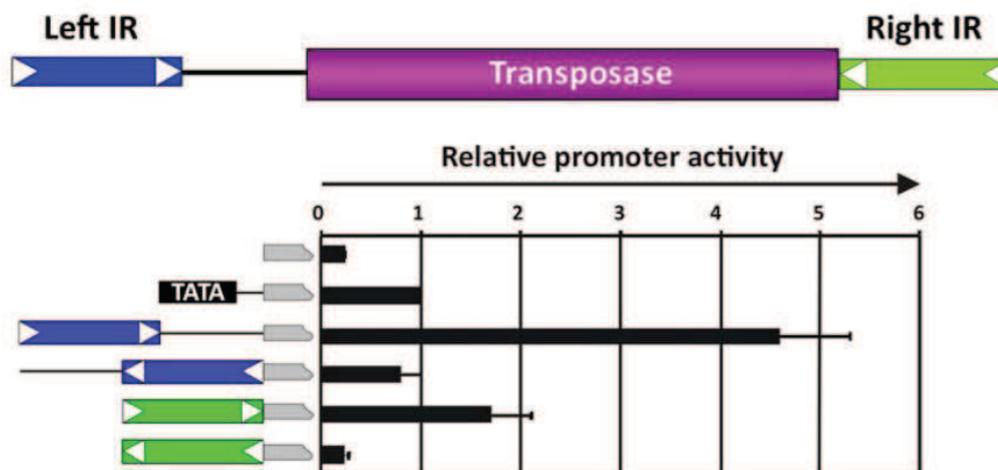


Figure 71 : Activité promotrice des séquences ITRs du transposon.

Une représentation schématique du transposon est redonnée en haut : Les ITRs (gauche : en bleu, et droite : en vert) contiennent deux sites de liaisons pour la transposase (flèches blanches). La ligne noire représente la séquence du transposon située directement en amont du transgène (qui, dans ce cas, code la transposase). L'activité transcriptionnelle relative a été déterminée dans des cellules HeLa en utilisant le gène codant la luciférase (*Luc*) comme gène rapporteur (en gris). L'activité d'un promoteur minimum contrôle (TATA-box) a été arbitrairement fixée à 1. Les séquences du transposon ont été placées en amont du gène *Luc* dans les deux orientations possibles (Ivics & Izsvák 2015).

Suivant cette hypothèse, certaines cellules transfectées avec le transposon dérivé du pFAR4 auraient intégré un nombre élevé de copies du transgène Venus mais n'exprimeraient pas la protéine fluorescente suite à l'extinction de l'expression du gène. Une expérience permettant de tester cette hypothèse consisterait à isoler des cellules exprimant Vénus deux jours après

transfection et, après plusieurs semaines, à quantifier le nombre de copies de transgène intégré dans le génome des populations clonales issues de ces cellules (Garrison et al. 2007) afin de déterminer le lien entre le nombre de copies et le niveau de fluorescence. Cette hypothèse semble cependant peu probable car un nombre élevé de copies de transposon a été quantifié par PCRq à partir de cellules triées car exprimant Vénus (Figure 68).

Ainsi, si la petite taille du plasmide pFAR4 semble favoriser l'étape d'excision du transposon, l'impact de l'utilisation du pFAR4 sur l'étape d'intégration et sur le taux de transposition n'a cependant pas pu être totalement élucidé par les essais réalisés sur les cellules HeLa. Dans les cellules primaires RPE humaines, des essais réalisés par un partenaire européen ont permis de vérifier l'absence de potentiel tumorigénique des cellules génétiquement modifiées et des études sont en cours afin de déterminer le nombre et les loci d'intégration du transgène (Dobias et al. 2015).

Bien que les nombres d'intégrations détectés pour ces cellules HeLa ne soient pas représentatifs des événements d'intégration pouvant avoir lieu dans des cellules non cancéreuses dont le génome est diploïde, les nombres de copies mesurés étaient étonnamment élevés à la fois pour le pFAR4 et le pT2 et d'autant plus en système non sélectif.

Bien que le système *SB* soit l'un des systèmes intégratifs ayant la plus faible préférence pour les régions transcrites (Liu et al. 2005; Berry et al. 2006; Ivics & Izsvák 2015) et que les exons ne représentent que 1,5 % du génome, l'augmentation du nombre d'intégration peut augmenter la probabilité d'intégrer dans ces régions codantes ou dans les régions régulatrices de certains gènes. Ceci peut conduire à une perturbation du métabolisme et potentiellement à la mort cellulaire mais implique surtout un risque de mutagenèse non négligeable, risque déjà rapporté pour les vecteurs viraux et mis en lumière lors de l'essai clinique réalisé chez les patients SCID en 2003, dont deux avaient développé des leucémies suite à l'intégration du transgène au niveau du promoteur du proto-oncogène *LMO2* (Hacein-Bey-Abina et al. 2003). De plus, l'intégration aléatoire du transgène peut également limiter l'expression de ce dernier par un mécanisme d'extinction de l'expression dû à l'« effet position » résultant de la méthylation du transgène ou de la formation de structures d'hétérochromatine (Garrison et al. 2007).

Afin de limiter ces risques, le nombre d'intégrations peut tout d'abord être réduit en diminuant la quantité de plasmide transfectée (Grabundzija et al. 2010). L'utilisation du pFAR4 est en ce sens avantageuse car l'efficacité de transfert de ce plasmide permet de réduire davantage la quantité transfectée par rapport au plasmide pT2.

D'autre part, le ciblage de l'intégration du transgène dans une région spécifique et « sûre » du génome (régions intergéniques et non régulatrices) pourrait avoir un impact positif en termes d'efficacité et de biosécurité.

Depuis quelques années, de nombreux laboratoires ont poursuivi le but d'identifier des loci d'intégration « sûrs » et de développer des outils permettant de « diriger » l'insertion des vecteurs thérapeutiques en ayant recours à des protéines de liaison à l'ADN.

Plusieurs stratégies ont été envisagées pour combiner de telles protéines avec le système *Sleeping Beauty* et sont présentées dans la figure suivante. Elles consistent à fusionner une protéine de liaison à l'ADN, soit à la transposase (Figure 72a), soit à une protéine interagissant avec le plasmide transposon (Figure 72b) ou bien encore à une protéine interagissant avec la transposase (Figure 72c).

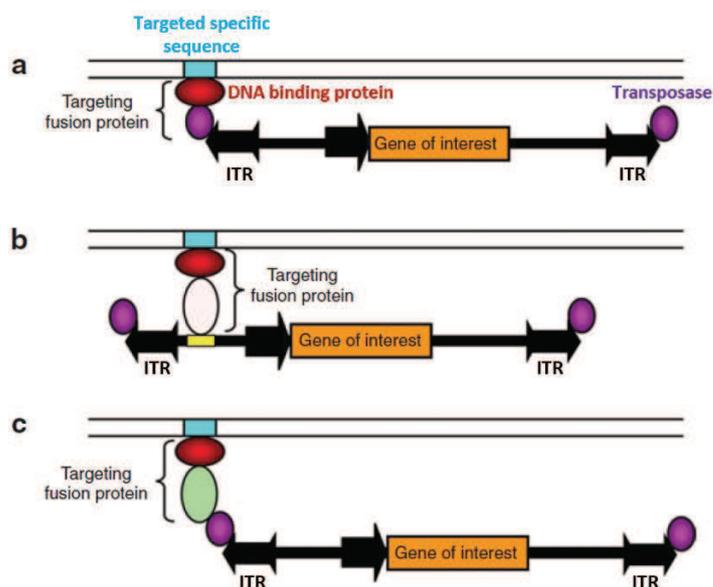


Figure 72: Stratégies pouvant être envisagées pour le ciblage de l'intégration du transposon SB.

a) Le ciblage peut être réalisé en fusionnant le domaine de liaison d'une protéine de liaison à l'ADN (rouge) reconnaissant la séquence cible (bleue) à la transposase (violet). b) Le ciblage peut ne pas impliquer la transposase mais le plasmide transposon en utilisant une protéine de fusion se liant à une séquence présente sur le transposon. Le ciblage est réalisé en fusionnant le domaine de liaison de la protéine de liaison à l'ADN (rouge) à une autre protéine (oval blanc) se liant de façon spécifique à la séquence présente sur le transposon (rectangle jaune). c) Le ciblage peut également être réalisé en utilisant une protéine de fusion interagissant avec la transposase. Le domaine de liaison de la protéine de liaison à l'ADN est fusionné à cette protéine (oval vert) capable d'interagir avec la transposase. Schéma adapté d'après Ivics et al. 2007).

Une étude réalisée par Ivics et al (2007) consistait à mettre en place ces trois stratégies en utilisant différentes protéines de liaison à l'ADN. Elle a permis de démontrer qu'il était possible de cibler la transposition puisque 10% des cellules ayant intégré le transgène, contenaient au moins un évènement de transposition dans un site cible. Le fait que des évènements de transposition soient également détectés dans de nombreux sites non ciblés et que certaines protéines de fusion

diminuent l'efficacité de la transposition, a cependant montré la nécessité d'améliorer ces stratégies.

Les nucléases à doigts de zinc (ZFN : Zinc Finger Nuclease) et les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nucleases) sont deux outils efficaces couramment employés pour la modification de séquences génomiques spécifiques (Cai & Yang 2014) et constituent donc de bons candidats comme protéines de fusion pour le ciblage de *SB*. Les premières tentatives pour combiner les ZFN à *SB* ont cependant conduit à une diminution de l'efficacité de transposition et à un faible effet de ciblage (Voigt et al. 2012). L'utilisation de ces stratégies pour le ciblage de *SB* constitue une perspective intéressante mais nécessite une optimisation de la stratégie de fusion protéique afin de limiter les effets délétères sur l'activité de la transposase.

Le défi majeur à surpasser pour le ciblage de la transposition reste cependant de réussir à déplacer l'affinité de la transposase pour un site TA aléatoire du génome vers un site particulier uniquement dicté par l'introduction d'une protéine de liaison à l'ADN (Vigdal et al. 2002b; Ivics et al. 2007).

D'autres solutions peuvent être envisagées dans le but d'augmenter le profil de biosécurité et d'efficacité de la combinaison pFAR4/*SB*. La transposase peut notamment être exprimée à partir d'un ARNm afin de parer tout risque lié à la persistance du plasmide codant la transposase ou à l'intégration de ce dernier dans le génome des cellules (Ivics & Izsvák 2006; Wilber et al. 2006). Les résultats présentés dans la partie II.2.6 ne semblent cependant pas confirmer la présence de tels risques.

Enfin, des séquences insultrices peuvent être placées de part et d'autre de la cassette d'expression, à l'intérieur des ITRs, afin de limiter le phénomène épigénétique d'extinction d'expression dont le transgène peut faire l'objet après son intégration dans le génome (Dalsgaard et al. 2009b; Sharma et al. 2012). L'introduction de telles séquences pourrait, d'autre part, limiter les risques de « transactivation » des gènes situés près du site d'intégration du transposon, par le promoteur de la cassette d'expression ou par l'activité *cis*-transcriptionnelle des séquences ITRs (Walisko et al. 2008).

IV CONCLUSION

La combinaison des technologies pFAR4 et *Sleeping Beauty* a montré son efficacité dans deux systèmes cellulaires : à la fois lors d'expériences réalisées avec les cellules HeLa et lors d'essais réalisés par des partenaires dans les cellules primaires de l'épithélium pigmentaire de la rétine ou de l'iris. La taille des dérivés pFAR4 confère à la combinaison une efficacité plus élevée par rapport à la combinaison utilisant les plasmides conventionnels, en favorisant l'étape de transfert des composants *SB* ainsi que l'étape d'excision, l'une des étapes cruciales de la transposition.

Cette efficacité pourrait permettre de limiter la quantité d'ADN transfectée, limitant ainsi le nombre d'intégration du transgène. Le miniplasmide pFAR4 apparaît donc comme un vecteur optimal pour le système de transposition *Sleeping Beauty* en augmentant son profil de biosécurité et en lui conférant une efficacité augmentée.

Les résultats obtenus avec les cellules primaires ainsi que les résultats de l'essai clinique TargetAMD permettront de confirmer le potentiel de cette combinaison et d'envisager d'autres applications, telles que la modification génétique de cellules difficilement transfectables comme les lymphocytes T ou les cellules souches neurales pour le traitement de cancers.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Le vecteur pFAR4, développé pour la thérapie génique, appartient à une nouvelle génération de vecteurs plasmidiques biosécurisés car dépourvus de gène de sélection à un antibiotique. L'absence de gène de résistance augmente non seulement le profil de biosécurité du vecteur, mais conduit également à diminuer la taille du plasmide, ce qui favorise notamment son transfert au noyau des cellules cibles.

La taille réduite du pFAR4 s'est effectivement révélée être un facteur clé de l'efficacité du plasmide comme vecteur de gène dans les deux approches étudiées.

En effet, dans l'application *in vivo* non insertionnelle, la taille réduite du squelette plasmidique semble rendre le pFAR4 moins propice à l'enrichissement en modifications d'histones caractéristiques de l'hétérochromatine, observé par ailleurs sur le plasmide conventionnel pKAR4 de taille plus importante. La taille du pFAR4 favoriserait donc le maintien d'un état transcriptionnel actif.

Jusqu'à présent, l'utilisation *in vivo* des vecteurs non viraux plasmidiques était limitée par la rapide chute d'expression observée après administration dans certains organes dont le foie. Nous avons montré qu'il était possible de dépasser cette limite avec un vecteur de taille réduite. Notre étude confirme ainsi l'influence de la taille du squelette plasmidique sur le maintien de l'expression, précédemment décrite par Lu et al. (2012), et prouve que des niveaux d'expression prolongés peuvent être obtenus sans pour autant éliminer complètement le squelette plasmidique d'origine bactérienne.

Ainsi, les dérivés de pFAR4 apparaissent comme une alternative intéressante aux vecteurs viraux mais également aux vecteurs dépourvus de séquence d'origine bactérienne tels que les minicercles. Ces derniers sont considérés comme les meilleurs vecteurs non viraux, à la fois en terme d'efficacité et de biosécurité, puisqu'ils sont totalement dépourvus de séquence susceptible d'être transférée au microbiote de l'hôte. Mais ils requièrent cependant un processus de production et de purification plus long, plus complexe et par conséquent plus coûteux que le mode de production de plasmides standards. Ceci empêche, à ce jour, leur production en conditions BPF et leur application en clinique (Chen, He & M. A. Kay 2005; Kay et al. 2010).

Si la production de dérivés de pFAR4 en condition BPF devrait être finalisée en juillet 2016, la robustesse de la production de ce vecteur en bioréacteur n'a encore jamais été évaluée. Cependant, il a été montré, à l'échelle du laboratoire, et pour des volumes de culture allant jusqu'à 2L, que les plasmides pFAR4 pouvaient être produits à partir de la souche triple-mutante avec un rendement équivalent à celui obtenu pour un plasmide pVAX2 produit à partir de la souche DH5- α dans un milieu supplémenté en kanamycine (Marie et al. 2010). Le pVAX2 est dérivé du

pVAX1, un vecteur commercial déjà employé dans le cadre d'essais cliniques de vaccination génétique.

De nouveaux vecteurs alliant le potentiel des minicercles à la facilité de production des plasmides ont été développées par Lu et al. (2013). Ces vecteurs, désignés par « MIPs » (Mini-intronic plasmids), sont construits en introduisant le squelette plasmidique (contenant un marqueur de sélection de type RNA-OUT) sous forme d'intron dans la cassette d'expression. Le niveau d'expression obtenu à partir de ces plasmides s'est avéré être supérieur à celui mesuré pour les plasmides dont ils sont dérivés et également à celui mesuré pour les minicercles (Lu et al. 2013). Cette efficacité pourrait résulter (i) d'une part, d'une augmentation de la stabilité des ARNm résultant de la présence d'un intron dans la cassette d'expression ; (ii) et d'autre part, de la proximité des extrémités 5' et 3' de la cassette d'expression, favorisant le maintien d'un état transcriptionnel actif. L'introduction du squelette plasmidique du pFAR4 dans la cassette d'expression pourrait être envisagée comme une amélioration potentielle du vecteur.

Il serait par ailleurs intéressant de confirmer le potentiel des miniplasmides pFAR4 dans d'autres applications *in vivo*, en ciblant par exemple d'autres tissus ou en employant d'autres méthodes de transfert. Leur efficacité de transfection pourrait également être évaluée *ex vivo* dans des systèmes cellulaires difficilement transfectables et pour lesquelles l'intégration du transgène n'est pas souhaitée, comme lors de la génération de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs : Induced pluripotent stem cells) à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique ou de fibroblastes issus de patients (Chou et al. 2011; Okita et al. 2013; Diecke et al. 2015).

Le vecteur pFAR4 sera prochainement employé en combinaison avec la technologie *Sleeping Beauty* pour la génération *ex vivo* de cellules T porteuses d'un récepteur chimérique à antigène (CAR T-cells) afin de rediriger la spécificité de ces dernières vers les cellules tumorales (Kebriaei et al. 2012). Le potentiel du pFAR4 comme vecteur pour les composants du système *Sleeping Beauty* a été montré dans notre étude. Dans ce contexte également, la taille du vecteur pFAR4 confère à ses dérivés un avantage par rapport aux plasmides conventionnels. En effet, la taille réduite du pFAR4 semble avoir influencé de façon positive la transposition en favorisant notamment le transfert des gènes au noyau et en augmentant l'efficacité de l'étape d'excision. De plus les résultats obtenus avec cette combinaison dans les cellules issues de l'épithélium pigmentaire de l'iris et de la rétine humaines prouvent le potentiel de cette combinaison pour la modification génétique de cellules primaires difficilement transfectables.

L'analyse des sites d'insertion du transgène permettra de compléter l'étude de cette combinaison et d'estimer les risques éventuels liés à l'intégration non ciblée médiée par la transposase. Les résultats des premiers essais cliniques employant *Sleeping Beauty* permettront d'évaluer le potentiel de cette technologie comme méthode de modification génétique alternative aux vecteurs

rétroviraux. L'ensemble de ces systèmes insertionnels a cependant été récemment dépassé par la découverte d'une nouvelle technologie dite « révolutionnaire » nommée CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). En effet, cette technologie, dérivée d'un « système immunitaire acquis » naturellement utilisés par certaines bactéries pour se défendre contre des ADN étrangers tels que des ADN viraux, permet de modifier de façon ciblée le génome des cellules (Jinek et al. 2012). Ce système est constitué de deux composants principaux : (i) un « ARN guide » dont la séquence est définie en fonction de la séquence ciblée, (ii) et la nucléase Cas9 (CRISPR associated) qui catalyse le clivage de l'ADN cible. Les propriétés de ce système permettraient de cibler l'intégration d'un transgène dans des locus du génome considérés comme des « safe harbours » limitant ainsi les risques d'oncogenèse ainsi que les risques liés à l'extinction par régulation épigénétique de l'expression du transgène.

Contrairement aux protéines TALENs et ZFNs, d'autres outils de modification ciblée évoqués dans la discussion du chapitre II des résultats, ce système ne nécessite pas l'ingénierie de nouvelles protéines pour chaque séquence ciblée et constitue donc une alternative plus simple et plus rapide pour l'introduction ciblée de mutations ou de séquences d'intérêt (Maeder & Gersbach 2016). L'optimisation de cette technologie pour des applications de thérapie génique va cependant nécessiter le développement parallèle des techniques bioinformatiques permettant de détecter les sites de clivage ou d'intégration non souhaités, désignés par le terme « Off-targets ».

Le transfert de CRISPR-Cas9 aux cellules cibles nécessite, comme pour la technologie *Sleeping Beauty*, un système de vectorisation. Son application clinique ainsi que les coûts de production seront donc dépendants du système utilisé.

Les vecteurs plasmidiques représentent à ce jour les vecteurs les plus simples à produire et également les moins coûteux. Cet avantage reste cependant relatif. En effet, la nécessité d'avoir recours à des chambres blanches et d'effectuer de nombreux tests de contrôle qualité, associée à la libération des lots cliniques par un Pharmacien Responsable conduit à des coûts élevés, compris entre 120 000 et 900 000 euros. La production est donc onéreuse et cela même si la quantité de plasmide requise reste faible.

Globalement, malgré les avancées technologiques et les résultats prometteurs des essais cliniques, le coût de la thérapie génique constitue un frein important à son application. Le GLYBERA, premier médicament de thérapie génique approuvé dans le monde occidental, peut être cité en exemple, puisque le coût d'un traitement curatif de la Déficience en lipoprotéine lipase par ce médicament coûterait environ 1 million d'euros (Ylä-Herttua 2015).

Le nombre d'essais cliniques de thérapie génique étant de plus en plus important, le débat concernant le prix des GTPMs (Gene Therapy Medicinal Product) s'intensifie, et implique la confrontation de plusieurs facteurs, tels que « le service rendu » aux patients ainsi que l'impact sur les systèmes d'assurance maladie. En effet, le coût de la production des GTMPs ainsi que du

traitement doit apporter un avantage par rapport au coût de l'hospitalisation et des traitements répétés des patients pouvant bénéficier de la thérapie. Ainsi, en France, l'HAS (Haute Autorité de Santé) a reconnu l'absence d'impact significatif du produit GLYBERA sur les dépenses de l'assurance maladie, permettant ainsi son remboursement (Haute Autorité de Santé (HAS) 2015). Les outils de thérapie génique ciblant les β -hémoglobinopathies comprenant la drépanocytose, la maladie génétique la plus répandue dans le monde (www.orpha.net), pourraient constituer en termes de « rentabilité et de service » un cas d'étude, puisque les thérapies actuellement disponibles consistent, en fonction des patients, en des transfusions de sang chroniques ainsi que des traitements médicamenteux à vie. La seule thérapie curative repose sur la transplantation de moelle osseuse (Bender & Seibel 2014). Le bénéfice d'un traitement par thérapie génique sûr et efficace, en termes de coût et de bien-être, serait donc considérable.

La mise en place des essais cliniques et la réduction des coûts de la thérapie génique pourrait être favorisée par une standardisation et une diffusion des techniques de production en conditions BPF, ainsi que par l'harmonisation des normes et législations nationales tout en respectant les mœurs et valeurs éthiques de chaque pays.

MATERIEL ET METHODES

SOMMAIRE

Conclusion générale	171
Matériel et Méthodes	177
I Techniques de biologie moléculaire	179
I.1 Clonages et production de plasmides.....	179
I.2 Extraction et quantification d'acides nucléiques	184
I.3 Immunoprécipitation de la chromatine	194
II Techniques de biologie cellulaire.....	198
II.1 Culture cellulaire	198
II.2 Cytométrie en flux.....	200
III Dosages biochimiques.....	201
III.1 Dosage de l'activité sulfamidase.....	201
III.2 Dosage des protéines totales	202
IV Expérimentation animale	202
IV.1 Les animaux	202
IV.2 Anesthésie	203
IV.3 Prélèvements	203
IV.4 Injections.....	203
V Statistiques	205

I TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

I.1 CLONAGES ET PRODUCTION DE PLASMIDES

I.1.1 Souches bactériennes

Trois souches bactériennes ont été utilisées:

- La souche d'*Escherichia coli* DH5 α , utilisée pour le clonage et la production de plasmides conventionnels porteurs de gène de résistance à un antibiotique (Hanahan 1983).
Génotype : F- Δ (*argF-lac*)169 Φ 80d*lacZ*58(M15) Δ *phoA8 glnX44*(AS) λ : *deoR481 rfbC1 gyrA96*(NalR) *recA1 endA1 thiE1 hsdR17*
- Les bactéries thermocompétentes Stellar, commercialisées par Clontech, également utilisées pour produire ces plasmides (réf.: 636763, Clontech).
Génotype : F- *endA1 supE44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 phoA* Φ 80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Δ *mcrA*, λ -
- La souche TM#47-9a (TM : Triple Mutant): décrite en introduction, cette souche est issue de la souche MG1655 d'*E. coli* et est auxotrophe pour la thymidine. Elle est utilisée pour le clonage et la production des pFARs, plasmides non porteurs de gène de résistance à un antibiotique (Marie et al. 2010).
Génotype: F- λ - *rph-1 thyA-(Am) Δ endA Δ recA*

I.1.2 Clonage

Les plasmides construits au cours de cette thèse ont été construits selon les techniques classiques de clonage impliquant :

- PCR (Polymerase Chain Reaction) :

Les PCR permettant l'amplification des inserts pour le clonage sont réalisées avec les enzymes polymérases TaKaRa ExTaq™ (réf.: RR001A, Takara Biotechnology) ou Phusion® High Fidelity (réf.: F-530S, Thermo Fisher Scientific). Les cycles de chaque PCR sont adaptés en fonction des amorces ainsi que de la séquence à amplifier en suivant les recommandations des fournisseurs.

- Digestion :

Les plasmides sont digérés à 37°C 2h ou sur la nuit en présence d'enzymes de restriction produites par la société New England Biolabs.

- Ligation :

La réaction de ligation est effectuée durant 16h à 16°C en utilisant la T4DNA Ligase (réf.: M02025, New England Biolabs) en respectant le rapport molaire vecteur/insert de 1/5.

- Sélection et culture des clones :

Pour la production de constructions plasmidiques dérivées du pFAR4, les bactéries électrocompétentes TM#47-9a sont mises en présence d'un faible volume de solution plasmidique préalablement dialysée et sont transformées par électroporation. Les clones sont sélectionnés sur milieu LB APS (LB Broth Base, Select APS™, réf.: 292438, BD), un milieu dépourvu de composants d'origine animale et pauvre en thymidine permettant uniquement la croissance des clones ayant été transformés par un plasmide pFAR4. Les clones sélectionnés sont cultivés à 37°C à 250 rpm (rotation par minute) dans du milieu LB APS.

Pour la préparation de cellules compétentes, les cellules TM#47-9a sont propagées dans du milieu LB APS en présence de thymidine (30 µg/mL).

Les plasmides dérivés de plasmides conventionnels (pT2/BH, pKAR4 ...) sont produits suite à la transformation par électroporation des bactéries électrocompétentes DH5α et sélection sur milieu LB APS contenant un antibiotique (Kanamycine, 50 µg/mL ; Ampicilline 100 µg/mL, Chloramphénicol 25µg/mL). Seuls les clones ayant été transformés par un plasmide porteur du gène de résistance à l'antibiotique peuvent pousser. Les clones sont ensuite cultivés à 37°C à 250 rpm dans du milieu LB APS supplémenté en antibiotique.

- Vérification des constructions par électrophorèse :

Chaque étape de clonage est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% ou 1,5% (réf.: GAPAGA07-07, Eurobio) dans du tampon de migration TAE 1x (Tris-Acétate EDTA ; 40 mM Tris acétate, EDTA 1 mM ; pH 8,3, réf. : 15558-026, Invitrogen).

Les échantillons à déposer sur le gel sont préalablement additionnés d'un tampon de charge réalisé au laboratoire (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 %, glycérol 30%) ou commercial (Gel loading dye, Purple, réf.: B7024S, New England Biolabs). Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont le Smart Ladder (réf.: MW-1700-10, Eurogentec), TriDye™ DNA Ladder (réf.: N3271S, New England Biolabs) et Supercoiled DNA Ladder (réf. : 15622-012, Invitrogen).

Le gel est ensuite soumis à un courant compris entre 70 et 100 V durant environ 30 min.

Le profil de migration est révélé sous éclairage UV après incubation du gel dans du bromure d'éthidium (réf.: 15585-011, Invitrogen).

- Vérification des constructions finales par séquençage :

Les constructions obtenues sont mises en présence d'un oligonucléotide s'hybridant en amont de la séquence à vérifier et sont transmises à la société Eurofins (Institut Cochin, Paris) pour séquençage. Les séquences obtenues sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ChromasPro.

I.1.3 Production de plasmides à partir d'*E. coli*

Les plasmides sont produits par mini-préparation à partir des cultures bactériennes avec le kit Nucleospin® Plasmid (réf.:740588, Macherey-Nagel).

Les plasmides destinés aux études *in vivo* sont produits par méga-préparation à l'aide du kit NucleoBond® PC2000 EF (réf.:740549, Macherey-Nagel), qui garantit une faible contamination par les endotoxines (<0,1 EU/μg), prévenant ainsi les réactions immunitaires après injection à la souris.

L'ADN plasmidique obtenu est quantifié par mesure de l'absorbance à 260 nm avec un spectrophotomètre (NanoVue™, GE Healthcare Life Sciences). Une absorbance de 1 à 260 nm correspond à 50 ng d'ADN par μL. La pureté de l'ADN extrait est attestée par la valeur du ratio Absorbance à 260 nm/ Absorbance à 280 nm.

L'électrophorèse sur gel à 1% d'agarose permet de vérifier la présence majoritaire de plasmide surenroulé ainsi que l'absence ou la faible proportion de multimères.

La figure 73 représente les principaux vecteurs plasmidiques utilisés au cours de cette thèse. Le vecteur pFAR4, décrit en introduction, contient une origine de répllication de type pUC, une séquence riche en sites de clonage (MCS : Multiple Cloning Site) et un gène codant un ARNt suppresseur de la mutation ambre du gène *thyA* codant la thymidylate synthase. Le plasmide pKAR diffère du plasmide pFAR4 uniquement de par le gène de sélection, qui est dans le cas du pKAR4 un gène de résistance à la kanamycine.

Le plasmide pT2/BH contient un squelette plasmidique de type pBluescript et est porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline. Il contient les séquences terminales répétées inversées (ITRs : inverted terminal repeats) nécessaires à l'action de la transposase *Sleeping Beauty* (Cui et al. 2002).

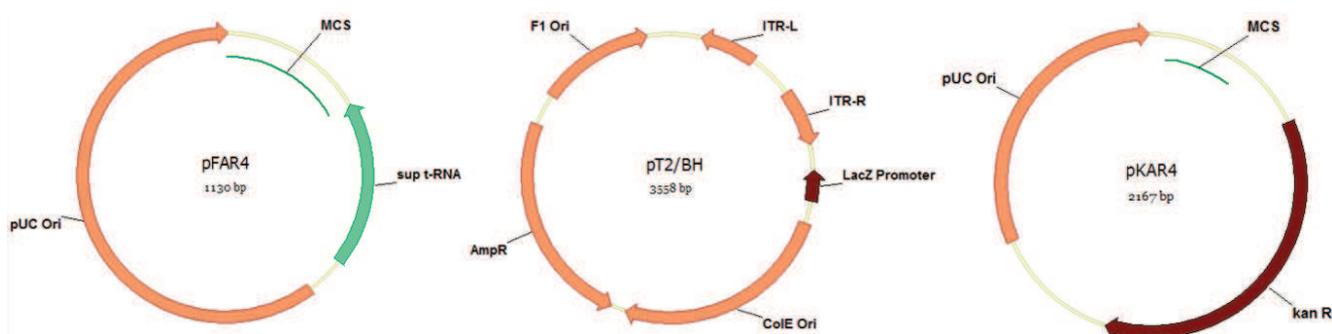


Figure 73: Cartes des vecteurs plasmidiques vides pFAR4, pT2/BH et pKAR4.

Le tableau ci-dessous répertorie les plasmides utilisés, leurs caractéristiques ainsi que la stratégie de clonage employée pour ceux ayant été construits durant la thèse.

Nom du plasmide (Taille)	Caractéristiques du plasmide	Stratégie de clonage des plasmides construits au cours de la thèse ou Source
Projet pFAR4 - <i>Sleeping Beauty</i>		
pCMV(CAT)T7-SB100X 4752 pb	-gène de résistance au chloramphénicol -promoteur CMV -gène codant la transposase <i>Sleeping Beauty</i> hyperactive	Mátés et al. 2009
pFAR4-CMV-SB100X-SV40 3094 pb	-promoteur CMV -gène codant la transposase <i>Sleeping Beauty</i> hyperactive	Insertion de la cassette d'expression du plasmide pCMV(CAT)T7-SB100X dans le vecteur pFAR4 (M. Quiviger, UTCBS, Paris)
pT2/SVNeo 5155 pb	-gène de résistance à l'ampicilline -séquence ITRs situées de part et d'autre de la cassette d'expression -promoteur SV40 - gène de résistance à la néomycine	Addgene (plasmide #26553)
pFAR4-ITRs-SVNeo 3386 pb	-séquence ITRs situées de part et d'autre de la cassette d'expression -promoteur SV40 - gène de résistance à la néomycine	Insertion dans le vecteur pFAR4 de la cassette d'expression SV40-Neo flanquée des deux séquences ITRs à partir du plasmide transposon pT2/SVNeo (M. Quiviger, UTCBS, Paris)
pT2-CAGGS-Venus 6119 pb	-gène de résistance à l'ampicilline -séquence ITRs situées de part et d'autre de la cassette d'expression -promoteur SV40 -gène codant la protéine Venus, variant d'YFP	Mátés et al. 2009
pFAR4-ITRs-CAGGS-Venus 4214 pb	-séquence ITRs situées de part et d'autre de la cassette d'expression -promoteur SV40 -gène codant la protéine Venus, variant d'YFP	-Digestion du plasmide pT2-CAGGS-Venus et du pFAR4 par <i>Sall/SacI</i> -Insertion de la séquence ITRs-CAGGS-Venus dans le pFAR4
pFAR4-ITRs 1715 pb	-séquences ITRs situées de part et d'autres de la séquence riche en sites de clonage multiple (MCS)	Insertion séquentielle des séquences ITR-L et ITR-R à partir du vecteur pT2/BH dans le vecteur pFAR4, de part et d'autre du MCS (C. Marie, UTCBS, Paris)
pFAR4-ITRs-CMV-PEDF 3870 pb	-promoteur CMV -ADNc codant le facteur PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor)	-Amplification par PCR de la séquence du gène PEDF précédé du promoteur CMV à partir du plasmide pT2-CMV-PEDF-His-IRES-BGH fourni par S. Johnen (UKA, Aachen) et introduction dans le pFAR4-ITRs après digestion du fragment de PCR et du pFAR4-ITRs par <i>EcoRI/HindIII</i> . - Amplification par PCR de la séquence de polyadénylation à partir du même plasmide et introduction en aval du gène PEDF par digestion avec les enzymes <i>EcoRI/AleI</i>

pFAR4-RPII-ITRs-SV40-Venus 2984 pb	-fragment RPII dans le squelette plasmidique -Séquences ITRs -promoteur SV40 -gène codant la protéine fluorescente Venus, variant d'YFP	-Insertion par PCR d'un site <i>AgeI</i> dans le squelette plasmidique du pFAR4-ITRs-CAGGS-Venus et insertion du fragment RPII après digestion par <i>AgeI</i> -Substitution de la séquence ITRs-CAGGS-Venus par la séquence ITRs-SV40-Venus par digestion <i>SalI/SacI</i>
pT2-RPII-SV40-Venus 4878 pb	-fragment RPII dans le squelette bactérien -promoteur SV40 -gène codant la protéine fluorescente Venus, variant d'YFP	-Insertion par PCR d'un site <i>AgeI</i> dans le squelette bactérien du pT2/BH et insertion du fragment RPII après digestion par <i>AgeI</i> . -Insertion de la séquence Venus-polyA générée par PCR après digestion par <i>BglII/EcoRI</i> -Insertion de la séquence du promoteur SV40 générée par PCR après digestion par <i>EcoRI/HindIII</i>
pFAR4-CAGGS-VenusΔBamHI 1001 pb	-Plasmide vide mimant l'excision de la cassette d'expression par <i>Sleeping Beauty</i>	-Délétion de la cassette d'expression par restriction avec l'enzyme <i>BamHI</i>
pT2/BH-ΔBamHI 2902 pb	-Plasmide vide mimant l'excision de la cassette d'expression par <i>Sleeping Beauty</i>	-Délétion du site de clonage multiple par restriction avec l'enzyme <i>BamHI</i>
pFAR4.2-GFP 2832 pb	-gène codant la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) -plasmide « contrôle » de transfection	Insertion du gène codant GFP à partir du plasmide pEGFP-C1 (Clontech) dans le plasmide pFAR4.2 (plasmide pFAR4 contenant le promoteur CMV) (M. Quiviger, UTCBS, Paris)
pGL3-Basic 4818 pb	-gène de résistance à l'ampicilline -plasmide vide permettant d'ajuster la quantité d'ADN total transfecté	Promega (plasmide #AE1751)
Projet Sulfamidase		
pFAR4-hAAT-SGSH 3259 bp	-promoteur spécifique de foie hAAT (human α -antitrypsine) -ADNc du gène codant pour la protéine sulfamidase	Quiviger et al. 2014
pKAR4-hAAT-SGSH 3259 bp	-gène de résistance à la Kanamycine -promoteur spécifique de foie hAAT (human α -antitrypsine) -ADNc du gène codant pour la protéine sulfamidase	Quiviger et al. 2014

Tableau 19: Plasmides utilisés au cours de la thèse, caractéristiques et stratégies de clonage

I.2 EXTRACTION ET QUANTIFICATION D'ACIDES NUCLEIQUES

I.2.1 Extraction d'ADN plasmidique à partir de cellules HeLa transfectées

Afin d'extraire l'ADN plasmidique contenu dans des cellules HeLa transfectées, le protocole de mini-prep du kit Nucleospin® Plasmid (réf.:740588, Macherey-Nagel) a été adapté en suivant le protocole indiqué par Sharma et al. 2013.

Deux jours après transfection, 1×10^6 cellules HeLa sont trypsinisées, collectées par centrifugation 5 min à 800 rpm, puis resuspendues dans le tampon de resuspension A1 supplémenté en SDS (0,6 %) et protéinase K (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (réf : 11501515, Thermo Fisher Scientific). Une incubation de 1h à 56°C permettant l'action de la protéinase K est suivie de l'ajout de tampon de lyse A2 contenant de la soude et d'une incubation de 5 min.

La lyse est neutralisée par l'ajout du tampon A3, contenant du chlorure de guanidinium, puis les déchets cellulaires sont culotés par une centrifugation de 5 min à 11000 g.

L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est adsorbé sur une membrane de silice contenu dans une colonne. Après lavage au tampon A4, qui contient de l'éthanol, et séchage de la colonne, l'ADN est élué dans du tampon AE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) puis stocké à -20°C.

I.2.2 Extraction d'ADN génomique de cellules HeLa en culture

L'ADN génomique des cellules HeLa en culture est extrait en utilisant le kit DNeasy® Blood and Tissue kit (réf.: 69504, Qiagen).

Jusqu'à 5×10^6 cellules sont trypsinisées, collectées par centrifugation 5 min à 800 rpm, et resuspendues dans du tampon de lyse. La lyse cellulaire s'effectue en présence de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNase A (réf : 19101, Qiagen), à 37°C puis de protéinase K (fournie dans le kit) à 56 °C. L'ADN est ensuite adsorbé sur une membrane en silice contenue dans une colonne en présence de fortes concentrations en sels chaotropiques. Après plusieurs lavages (Tampons AW1 et AW2, contenant de l'éthanol) suivis de centrifugations l'ADN est élué dans du tampon AE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) puis stocké à 4°C.

La quantité d'ADN obtenue est mesurée par absorbance au NanoVue™ et l'intégrité de l'ADN est vérifiée par l'absence de produits de dégradation suite à la migration de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (Figure 74).

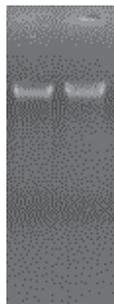


Figure 74: Profil de migration attendu suite à l'extraction d'ADN génomique à partir de cellules HeLa

I.2.3 Extraction d'ADN total à partir de foie de souris

L'ADN total contenu dans les cellules du foie est extrait en suivant le protocole classique d'extraction au phénol : chloroforme.

25 mg de foie préalablement congelé dans l'azote liquide et broyé dans la glace carbonique sont mis en présence de tampon de lyse (Tris-HCl pH 8 100 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,2%, NaCl 200 mM) et de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéinase K (réf : 11501515, Thermo Fisher Scientific) pour une incubation sur la nuit à 56°C. Après inactivation de la protéinase K par chauffage à 70 °C, l'échantillon est incubé 30 min à 37°C en présence de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNase A (réf : 19101, Qiagen).

L'échantillon ainsi digéré est déprotéinisé suite à l'ajout d'un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 :24 :1)(réf.: 15593-031, Invitrogen), pH 8,05, centrifugation et récupération de la phase aqueuse.

L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité par l'ajout d'éthanol absolu Ultra Pure (réf.: 51976, Sigma-Aldrich). Après lavage et séchage, il est resuspendu à 37°C dans de l'eau puis stocké à -20 °C.

La quantité d'ADN total extrait est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm au NanoVue™ et l'intégrité est vérifiée par électrophorèse sur gel à 0,8 % d'agarose (Figure 75).



Figure 75: Profil de migration attendu suite à l'extraction d'ADN total à partir de foie de souris

I.2.4 Extraction d'ARN à partir de foie de souris

L'extraction d'ARN à partir de tissu présente deux défis majeurs : le premier consiste à prévenir la dégradation des ARNs par les ribonucléases présentes de façon ubiquitaire et difficiles à éliminer. Le deuxième consiste à limiter la contamination des préparations d'ARN par de l'ADN génomique ou plasmidique.

Afin d'éviter la dégradation des ARNs par les ribonucléases, les surfaces ainsi que le matériel sont nettoyés avec du RNase Away et le matériel consommable ainsi que les solutions utilisées pour l'extraction sont tous dits « RNase-free » et sont spécialement dédiés à la manipulation des ARNs.

Plusieurs kit et protocoles ont été testés pour parvenir à une extraction optimale. Les ARNs contenus dans les cellules du foie ont finalement été extraits à l'aide du kit RNeasy® Plus Mini (réf.: 74134, Qiagen) :

10 mg de foie congelé broyé sont lysés avec un tampon contenant du thiocyanate de guanidinium, auquel a été ajouté du β -mercaptoéthanol (réf : 63689, Sigma-Aldrich®) afin d'inactiver par dénaturation les ribonucléases présentes dans l'échantillon. Le lysat est ensuite mis en présence d'un tampon à haute teneur en sels puis passé sur une colonne retenant l'ADN.

De l'éthanol (réf : 51976, Sigma-Aldrich®) est ajouté au filtrat afin de précipiter l'ARN et favoriser sa fixation à la membrane d'une deuxième colonne. Après plusieurs lavages les ARNs sont élués avec de l'eau « RNase-free » (réf : 10977035, Thermo Fisher Scientific).

Les ARNs ainsi purifiés sont quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 nm au NanoVue™. Une absorbance de 1 à 260 nm correspond à 44 ng d'ARNs par μ L. Ils sont visualisés par migration de 500 ng d'ARNs sur un gel contenant 1,5 % d'agarose en présence du marqueur de taille ssRNA Ladder (réf.: N0362S, New England Biolabs)(Figure 76).

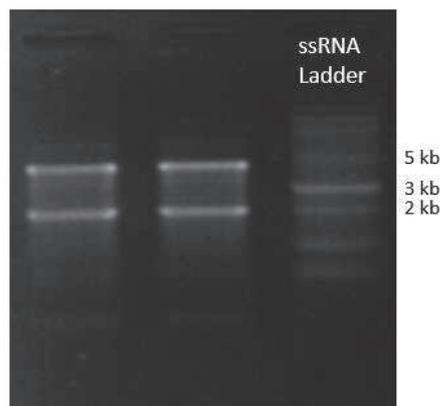


Figure 76: Profil de migration attendu suite à l'extraction des ARNs totaux à partir de foie de souris

L'intégrité des ARNs extraits est attestée par une absence de produits de dégradation ainsi que la présence des bandes correspondantes aux ARNs ribosomaux. Ces ARNs constituant 80 à 85 %

des ARNs totaux, ils sont plus facilement visualisables sur un gel. Les bandes attendues pour la souris sont les suivantes : bande 18S à 1,9 kb et bande 28S à 4,7 kb.

Les ARNs sont conservés à -80°C.

1.2.5 Transcription inverse (RT) de l'ARN en ADNc complémentaire (ADNc)

La synthèse d'ADNc à partir des ARNs extraits est réalisée avec le kit PrimeScript™ RT Master Mix (réf.: RR036Q, Takara). Ce mix concentré 5 fois contient les composants nécessaires à la transcription inverse : la PrimeScript reverse transcriptase, un inhibiteur de RNase, des « random hexamers », un mélange de désoxyribonucléotides (dNTP) ainsi que le tampon de réaction (composition exacte non communiquée).

2µL de mix sont ajoutés à 500 ng d'ARNs et la réaction s'effectue à 37°C durant 15 min dans un volume final de 10 µL. La reverse transcriptase est ensuite inactivée 5 sec à 85°C.

L'ADNc synthétisé est conservé à -20°C.

1.2.6 PCR quantitative en temps réel

1.2.6.1 Principe de la PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivi au cours du temps d'une réaction de PCR. Ce suivi cycle par cycle est effectué par mesure de l'accumulation de séquences synthétisées à l'aide d'un marqueur fluorescent, chaque séquence double brin synthétisée générant un signal fluorescent. Les valeurs de fluorescence sont déterminées pour chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés. L'augmentation du nombre de produits de la PCR entraîne donc une augmentation de la fluorescence.

La cinétique de fluorescence peut être divisée en trois phases successives (Figure 77A):

- 1) La phase de bruit de fond durant laquelle la quantité de produits de PCR est insuffisante pour générer un signal supérieur au bruit de fond.
- 2) La phase exponentielle : cette phase débute lorsque le signal fluorescent franchi une valeur seuil supérieure au bruit de fond et pouvant être mesurée par l'appareil. Le cycle auquel est atteint ce seuil est appelé Ct (threshold cycle).
- 3) La phase de saturation : cette phase est caractérisée par une baisse progressive de l'amplification au cours des cycles due à l'épuisement de certains réactifs de la réaction.

Plus l'échantillon de départ est concentré en molécule cible, moins il faudra de cycles pour atteindre le cycle seuil Ct. C'est donc en se basant sur cette valeur que sera déterminé le nombre de copies de la molécule présentes à l'origine dans l'échantillon. La Figure 77B donne un exemple de suivi de l'amplification d'une même séquence cible pour deux échantillons. Dans cet exemple,

$C_{T1} < C_{T2}$, ce qui signifie qu'à l'origine, l'échantillon 1 contient plus de copies de la séquence cible que l'échantillon 2.

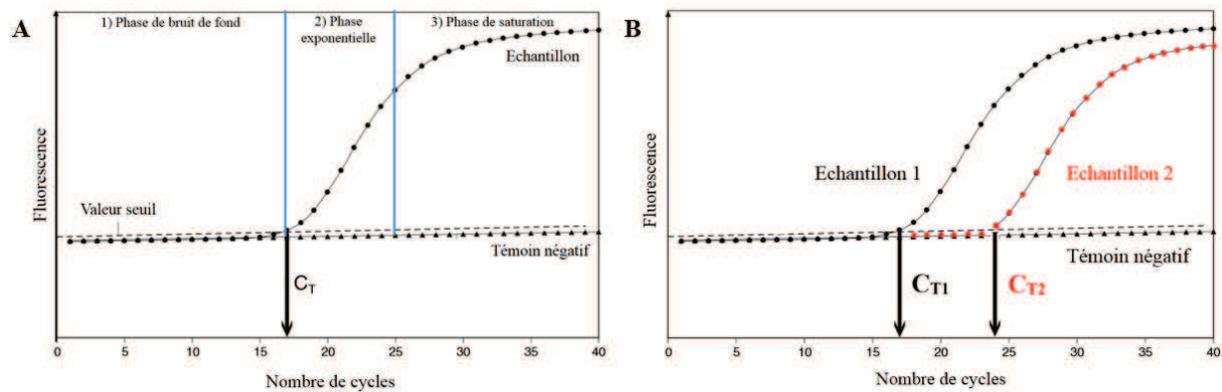


Figure 77: Suivi de l'amplification en temps réel par mesure de la fluorescence.

A. Les trois phases de l'amplification. B. Suivi de l'amplification et détermination des C_t pour deux échantillons. C_t = cycle seuil, Témoin négatif: échantillon ne contenant pas la séquence cible à amplifier.

1.2.6.2 Systèmes de détection

Deux technologies de fluorescence appliquées à la PCR quantitative ont été utilisées au cours de cette étude.

1.2.6.2.1 Technologie SYBR® Green

Le SybrGreen I est un fluorochrome ayant la propriété de se lier à l'ADN double brin. La quantité de molécules doubles brins augmentant avec les cycles de la PCR on observe donc une augmentation du signal de fluorescence à chaque étape d'élongation (Figure 78).

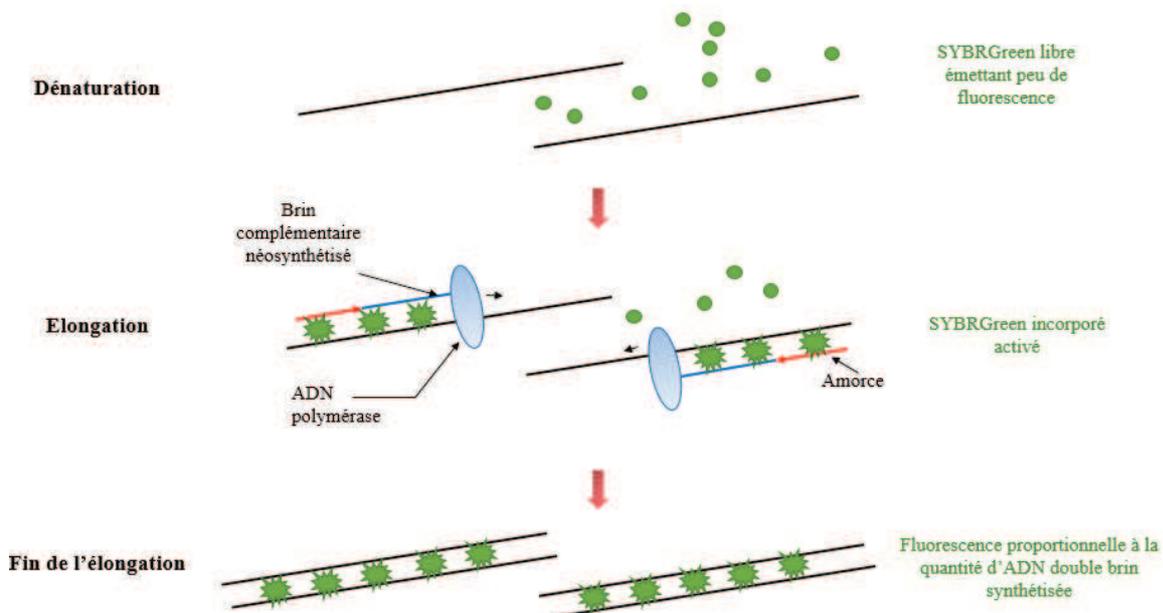


Figure 78: Suivi de l'amplification en temps réel avec la technologie Sybr® Green

Le fluorochrome SYBRGreen en solution émet peu de fluorescence. Lors de la phase d'élongation, il s'incorpore dans la molécule d'ADN double brin synthétisée et fluoresce. L'augmentation du signal de fluorescence observée durant cette phase d'élongation est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisée. La fluorescence est ainsi quantifiée à la fin de l'étape d'élongation pour chacun des cycles de la PCR par le système de détection de l'appareil.

La spécificité de cette technique repose sur la spécificité des amorces employées. Elle est vérifiée à l'issue de la PCR quantitative grâce à une courbe de dissociation. Cette courbe est obtenue en mesurant la diminution de la fluorescence induite par une augmentation de la température. Le pic de la courbe correspond à la température de fusion de l'amplicon. Une amplification non spécifique se caractérise par la présence de plusieurs pics ou de pics température de fusion différente de celle attendue.

I.2.6.2.2 Technologie TaqMan®

Cette technique utilise une sonde interne fluorescente s'hybridant de façon spécifique avec la séquence à amplifier située entre les deux amorces. Cette sonde contient un fluorochrome rapporteur en 5' dont la fluorescence est « quenchée » par un second fluorochrome dit « quencher » situé à l'extrémité 3'. Lors de la phase d'élongation, l'ADN polymérase qui possède une activité 5'-exonucléasique va hydrolyser la sonde entraînant la séparation des deux fluorochromes et ainsi une augmentation de la fluorescence du rapporteur (Figure 79).

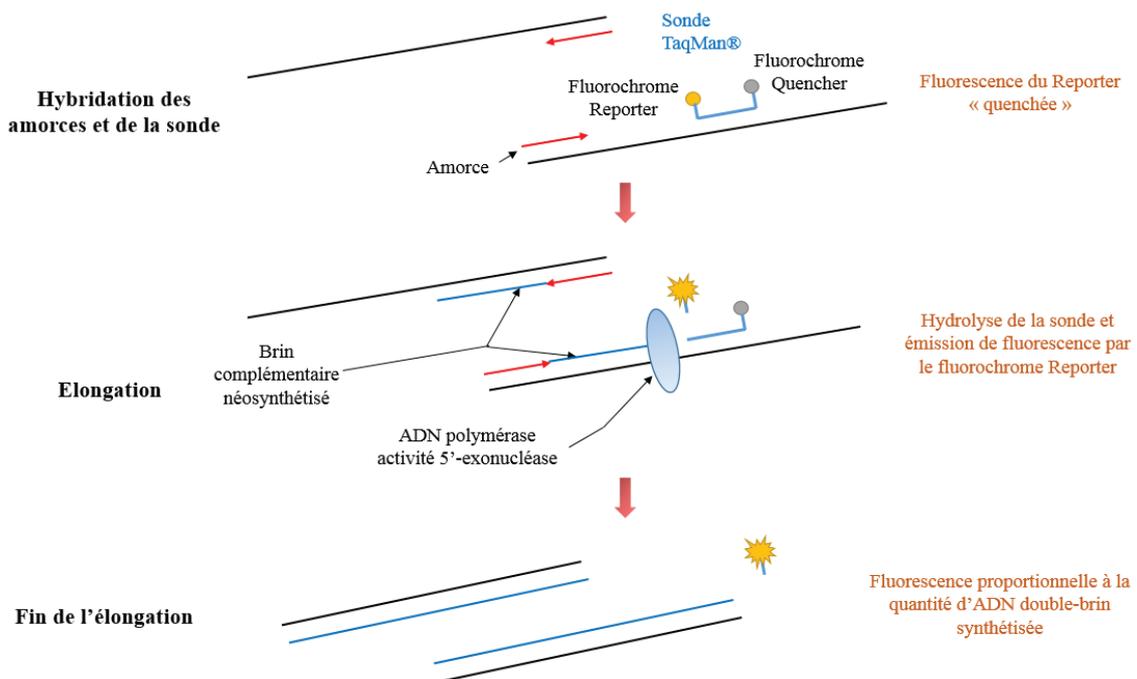


Figure 79: Suivi de l'amplification en temps réel avec la technologie TaqMan®

Une sonde TaqMan contient en 5' un fluorochrome émetteur (Reporter) dont l'émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (Quencher). Lors de la phase d'hybridation, la sonde ainsi que les amorces, situées de part et d'autres de la sonde, s'hybrident sur la séquence cible. Lors de l'élongation, la Taq polymérase, qui possède une activité 5'exonucléasique, hydrolyse la sonde hybridée libérant ainsi le fluorochrome Reporter et permettant l'émission de fluorescence. La fluorescence augmente donc de façon proportionnelle à la quantité d'ADN double bin synthétisée.

La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde. La présence de la sonde permet en effet de réduire significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des dimères d'amorces ou à des mésappariements.

1.2.6.3 Mise en place d'un essai de PCR quantitative

1.2.6.3.1 Choix du couple d'amorces pour les PCRq Sybr® Green :

Le couple d'amorces est un élément crucial pour la mise au point d'un essai de PCRq puisque c'est de ce couple et de l'amplicon généré que dépend l'efficacité de la PCR.

Ce choix doit respecter les consignes suivantes :

- Taille de l'amplicon généré idéalement comprise entre 50 et 200 paires de bases
- Taille d'amorce optimale : 20 bases
- Pourcentage de nucléotides GC de chaque amorce : 30-80%
- Température de fusion optimale de l'amorce : 58-60°C
- Les cinq derniers nucléotides de l'extrémité 3' de l'amorce ne doivent pas contenir plus de 2 bases G et/ou C
- Les amorces ne doivent pas former d'homo ou d'hétéro-dimères
- Lorsque le substrat de la PCR est de l'ADNc, les amorces doivent se situer de part et d'autre d'un intron du gène correspondant afin d'amplifier spécifiquement l'ADNc et non la séquence du gène située sur le génome

Les caractéristiques des amorces dessinées dans le cadre de ces travaux ont été vérifiées à l'aide du logiciel Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) et du logiciel OligoAnalyzer de la société IDT Integrated DNA Technologies (<http://eu.idtdna.com/site>). Les amorces ont été synthétisées par cette même société.

1.2.6.3.2 Validation des amorces et détermination de l'efficacité de la PCR :

Le couple d'amorces est testé en PCRq en présence des réactifs nécessaires à la PCR contenu dans un même mélange réactionnel. Un bon couple d'amorces est celui :

- Permettant une amplification de l'ADN matrice cible (ADNc, plasmide ou ADN génomique)
- Présentant une bonne spécificité, vérifiée par l'absence de pics parasites sur la courbe de dissociation
- Ne générant pas d'amplification (ou pour des Ct élevés) dans les puits dits « contrôles négatifs » contenant uniquement de l'eau ou de l'ADN dépourvu de la séquence cible

Une fois les trois points précédents validés, l'efficacité du couple d'amorce doit être déterminée. Pour cela une dilution en série de l'ADN matrice (ou standard) est réalisée et une PCR est effectuée. L'obtention des Ct pour chacune des dilutions permet de tracer une droite de régression (« courbe standard ») dont la pente doit être comprise entre -3,32 (correspondant à une efficacité de 100%) et -3,7 (efficacité de 86%). Si l'efficacité est de 100% une dilution au 1/10^{ème} aura une différence de Ct de 3,3 cycles par rapport à la solution mère.

I.2.6.3.3 Choix du gène de référence :

La stratégie de quantification choisie dans le cadre de ces travaux est la quantification relative. Dans cette stratégie, le nombre de copies de la séquence cible est exprimé par rapport au nombre de copies d'une séquence de référence présente dans le même échantillon. Cette séquence est généralement choisie sur la séquence d'un gène de ménage présentant un niveau d'expression stable dans les conditions de l'expérimentation ou d'un gène présent en une seule copie.

Ce gène contrôle joue un rôle de normalisateur et va permettre de compenser les éventuels biais de PCR tels que la variation de la qualité et de la quantité entre les échantillons ou les erreurs de pipetage.

Le couple d'amorces permettant d'amplifier cette séquence de référence sera choisi en suivant les mêmes consignes que pour la séquence cible.

I.2.6.3.4 Organisation des conditions de manipulation :

Deux sources de contaminations majeures peuvent venir fausser les résultats de PCR quantitative (faux positifs) : les ADNs standards utilisés pour la réalisation de la droite de régression et comme contrôles positifs ainsi que les produits de PCR.

Afin de limiter ces contaminations plusieurs mesures ont été prises :

- La manipulation est compartimentée:

Une première pièce est consacrée à la préparation du mélange réactionnel ainsi qu'à sa distribution dans les puits. La paillasse ainsi que les pipettes doivent être nettoyées au DNAway (réf.: 10223471, Fisher Scientific) et doivent uniquement servir à la réalisation du mélange.

L'ajout de l'ADN cible doit avoir lieu sur une seconde paillasse également nettoyée à l'aide du DNAway après chaque manipulation.

Enfin un troisième endroit est utilisé pour préparer les dilutions d'ADN standard nécessaire à la réalisation des droites de régression afin d'éviter la manipulation d'un nombre de copies de séquence cible très important près des plaques de PCR.

- Les lots de pipettes et les protections (blouses, gants) doivent être différents entre les trois lieux de préparation.
- Des pointes à filtre sont utilisées pour le pipetage.

I.2.6.4 Mélanges réactionnels et amorces utilisés

La technologie TaqMan® a été utilisée pour la quantification du gène de résistance à la néomycine intégré dans le génome des cellules HeLa. Le mélange réactionnel utilisé est celui contenu dans le « TaqMan® Gene Expression Master Mix » (réf.:4369016, Applied Biosystems). La séquence cible a été amplifiée et détectée grâce aux amorces et à la sonde contenus dans le « TaqMan® Copy Number Assay MTO S » (réf.: 4400291, Applied Biosystems). Le gène de référence utilisé

pour normaliser la PCRq est le gène *RPPH1*. La séquence a été amplifiée et détectée grâce aux amorces et sonde contenus dans le « TaqMan® Copy Number Ref Assay RNASEP » (réf.: 4403326, Applied Biosystems). La séquence des amorces et des sondes n'est pas communiquée.

Les PCRq Sybr® Green ont été réalisées à l'aide du « Fast Sybr® Green Master Mix » (ref 4385616, Applied Biosystems) en suivant le programme présenté Figure 80.

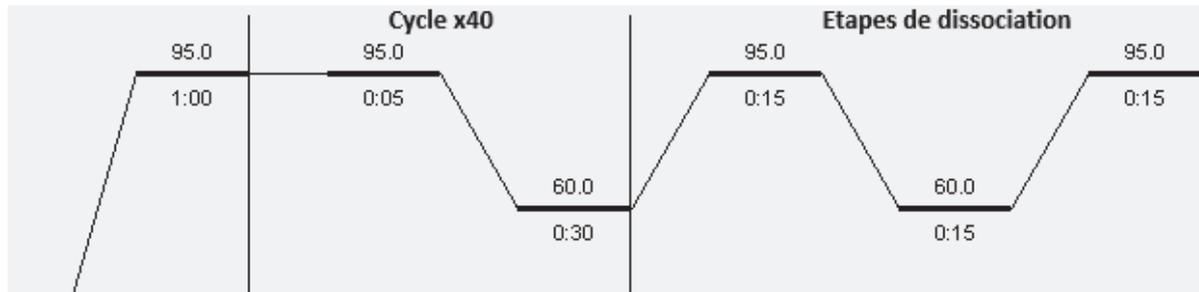


Figure 80: Programme de PCRq Fast Sybr® Green.

L'étape de dénaturation initiale est suivie de 40 cycles d'amplification. Le programme se termine par la dissociation des produits de PCR, ce qui permet de générer une courbe de dissociation afin de vérifier la spécificité des amorces.

Les amorces ainsi que les ADNs amplifiés sont listés dans le Tableau 20.

Nom	Amplicon (pb)	Amorce	Séquence 5'-3'	ADN matrice	Concentration finale (µM)
Projet pFAR4 - Sleeping Beauty					
gRPPH1	118	sens anti-sens	AGCTGAGTGCCTGTCCTGTC CGTTCTCTGGGAACCTCACCTC	Gène de référence humain (2 copies/génome diploïde)	0,2
Venus	119	sens anti-sens	CTCGGCTCTGGTCTTGTAGTTG GCCAGATACCCCGACCACAT	Plasmides codant pour la protéine Venus	0,05
EP-pFAR4	231	sens anti-sens	TTTTTGTGATGCTCGTCAGG AATCCCATAGCCACCCAC	Plasmide pFAR4 dont la cassette d'expression a été excisée	0,2
EP-pT2	232	sens anti-sens	GCCTCTTCGCTATTACGCCA CCTCATAAAGGGAACAAAAGC	Plasmide pT2 dont la cassette d'expression a été excisée	0,2
cRPII	117	sens anti-sens	TAAGCCCAGTGACCTTCATC ATGCCCCATCATGGACATTT	Fragment RPII intégré dans le squelette plasmidique des deux plasmides transposons. pFAR4 et pT2-SV40-Venus	0,2
Projet Sulfamidase					
gGAPDH	127	sens anti-sens	CCTGGGATTAGGGTTGAAAC GCTCAAAGGGCAAGGCTAAAG	Gène de référence murin	0,5

cRPII	117	sens anti-sens	TAAGCCCAGTGACCTTCATC ATGCCCCATCATGGACATTT	ADNc du gène de référence codant la RNA polymérase II murine -Amorces situées de part et d'autre d'un intron de 524 pb	0,5
pSGSH	141	sens anti-sens	AGTGAATGATCCCCCTGATCT CTCCGTCATCCGCAACTATCA	Plasmide pFAR4 ou pKAR4-hAAT-SGSH -Amorces situées en 5' du gène <i>Sgsh</i>	0,5
cSGSH	104	sens anti-sens	TCTGTTGGTCCTGGGACTCT GCGATGGCAGTGTGTTGT	ADNc du gène <i>Sgsh</i> – Amorces situées de part et d'autre d'un intron de 2590 pb	0,5
hAAT	144	sens anti-sens	ACTGGGGTGACCTT GTTAAT ATCAGGGGGATCATTCACTGT	Plasmide pFAR4 ou pKAR4-hAAT-SGSH -Amorces situées sur le promoteur hAAT	0,2
SGSH	91	sens anti-sens	GCCTGCTGCACAATTCTGTT CTCTCAAAGCCTCCGTCATC	Plasmide pFAR4 ou pKAR4-hAAT-SGSH -Amorces situées en 5' de l'ADNc du gène <i>Sgsh</i>	0,5

Tableau 20 : Amorces utilisées pour la PCR quantitative

Chaque réaction de PCRq est effectuée en triplicat (3 puits par échantillon et couple d'amorces). Les gammes permettant de tracer les « courbes standards » sont déposées sur chaque plaque de PCRq en parallèle des échantillons. Elles permettent d'évaluer l'efficacité de la PCRq ainsi que calculer le nombre de copies à partir du Ct. Un exemple de courbe standard est donné dans la figure 81A.

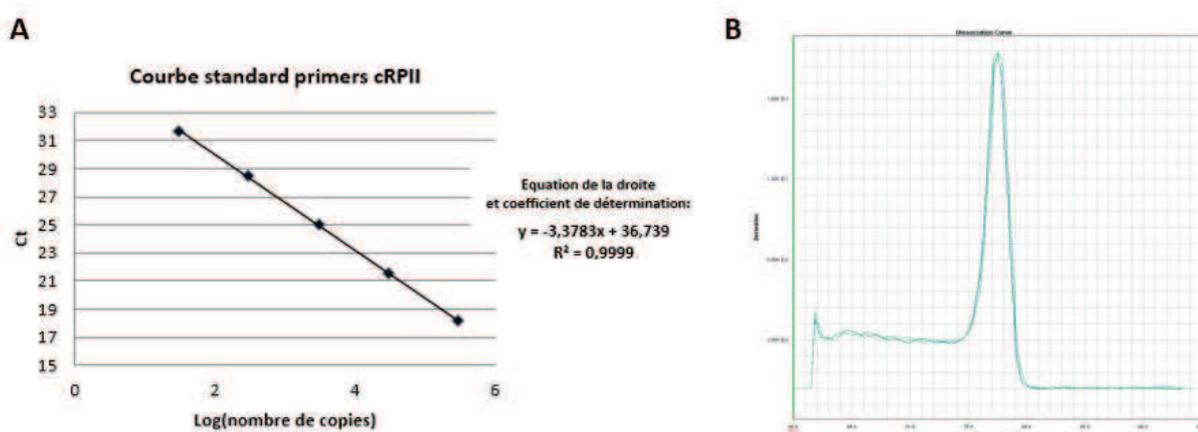


Figure 81: Exemple de courbe standard et de courbe de dissociation de PCRq réalisée en utilisant la technologie « Fast Sybr®Green »

Ces courbes ont été obtenues avec le couple d'amorces cRPII. A) La pente de la courbe est de -3,378 ce qui correspond à une efficacité de PCRq de 97,7%. B) La courbe de dissociation ne présente qu'un seul pic qui nous permet de conclure que le signal de PCRq est bien due à une amplification spécifique du fragment RPII.

1.2.6.5 Détermination du pourcentage d'excision du transposon

Afin d'étudier la combinaison pFAR4/SB (Partie Résultats : Chapitre II), l'ADN plasmidique a été extrait, deux jours après transfection, à partir des cellules HeLa transfectées avec, (i) d'une part, le plasmide transposon (pFAR4-ITRs-Venus ou pT2-Venus) et le plasmide transposase pFAR4-CMV-SB100X, (ii) et d'autre part, avec le plasmide transposon uniquement. Une PCRq a ensuite été réalisée en utilisant les couples d'amorces EP-pFAR4 et EP-pT2, permettant de quantifier le nombre de produits d'excision (EP), ainsi que le couple d'amorces cRPII permettant de quantifier le nombre total de plasmide transposon. Le pourcentage d'excision a été déterminé par le calcul suivant :

$$\left[\frac{\text{Nombre de copies EP}}{\text{Nombre de copies cRPII}} \right]^{+SB} - \left[\frac{\text{Nombre de copies EP}}{\text{Nombre de copies cRPII}} \right]^{-SB}$$

$\left[\frac{\text{Nombre de copies EP}}{\text{Nombre de copies cRPII}} \right]^{+SB}$ est déterminé à partir de l'ADN plasmidique issu des cellules transfectées avec la combinaison transposon + transposase.

$\left[\frac{\text{Nombre de copies EP}}{\text{Nombre de copies cRPII}} \right]^{-SB}$ est déterminé à partir de l'ADN plasmidique extrait des cellules transfectées avec le plasmide transposon uniquement et est considéré comme le bruit de fond.

1.2.6.6 Détermination du nombre de copies de transgène Venus intégré

Dans le cadre de l'étude pFAR4/SB, l'ADN génomique de cellules HeLa exprimant la protéine fluorescente Venus 15 jours après leur transfection (5 passages) avec le plasmide transposon et le plasmide transposase, a été extrait. Une PCRq a ensuite été réalisée afin de quantifier le nombre moyen de copies du transgène *Venus* intégré dans le génome. Les couples d'amorces employés sont (i) les amorces *Venus*, spécifiques du transgène, (ii) les amorces *gRPPH1*, spécifiques du gène de référence *RPPH1*, (iii) et les amorces *cRPII*, spécifiques du plasmide transposon. Le nombre de copies de transgène *Venus* intégré est déterminé par le calcul suivant :

$$\left[\frac{\text{Nombre de copies Venus} - \text{Nombre de copies cRPII}}{\text{Nombre de copies gRPPH1}} \right]$$

I.3 IMMUNOPRECIPITATION DE LA CHROMATINE

Afin d'évaluer si une régulation épigénétique de la transcription est impliquée dans le maintien du niveau d'expression de la sulfamidase à partir du plasmide pFAR4 par rapport au plasmide pKAR4 un essai d'immunoprécipitation de la chromatine associée à ces plasmides a été réalisé. L'immunoprécipitation de chromatine (ChIP : Chromatin Immunoprecipitation) est l'une des techniques de choix pour étudier les structures de la chromatine. Elle permet en effet de détecter

l'interaction de l'ADN avec différentes protéines qui lui sont associées tels que les facteurs de transcription ou d'identifier des modifications post-traductionnelles des histones.

Le principe repose sur l'enrichissement en une fraction de chromatine contenant un antigène spécifique. Un anticorps reconnaissant une protéine ou une modification protéique d'intérêt est utilisé pour déterminer l'abondance relative de cet antigène à un ou plusieurs loci d'une molécule d'ADN (ADN génomique ou, comme c'est le cas dans ce contexte : ADN plasmidique).

Les essais de CHIP ont été réalisés avec le kit High-Sensitivity CHIP kit de Abcam (réf.: ab185913, Abcam) dont le protocole a été optimisé. Il est divisé en 5 grandes étapes :

- 1- Extraction et sonication de la chromatine
- 2- Vérification de la sonication
- 3- Immunoprécipitation de la chromatine soniquée
- 4- Lavages et dépontage
- 5- PCR quantitative

I.3.1 Extraction et sonication de la chromatine

La chromatine a été extraite à partir des foies congelés et broyés de souris ayant été injectées avec les plasmides pFAR4-hAAT-SGSH et pKAR4-hAAT-SGSH et sacrifiées 15 jours après l'injection.

Deux extractions par échantillon ont été réalisées pour chaque essai à partir de 10 mg de foie broyé. Après mise en suspension dans 1 mL de formaldéhyde 1% dans du PBS contenant des inhibiteurs de protéases (réf : 12136490, Thermo Fisher Scientific), une incubation de 8 min à température ambiante et sous rotation constante permet la réticulation de la chromatine (« cross-linking »). La réticulation est stoppée par une incubation de 5 min à température ambiante après ajout de glycine (concentration finale de 0,125 M).

Après 3 lavages au PBS (+ inhibiteurs de protéases) suivis de centrifugations de 5 min à 800 rpm à 4°C, le culot de broyat est remis en suspension dans un tampon de lyse (Lysis Buffer : composition non communiquée) puis lysé à l'aide d'un broyeur de Potter placé dans la glace. Le lysat est filtré sur un tamis cellulaire de 40 µm (réf : 352340, Falcon™) et le filtrat est ensuite centrifugé 5 min à 6000 rpm.

Le culot contenant la chromatine est resuspendu dans du tampon de CHIP (CHIP Buffer : composition non communiquée) et la chromatine est ensuite soniquée en utilisant le Bioruptor® Standard (réf.: UCD-200, Diagenode) en réalisant 3 rounds de sonication de 5 cycles [30sec ON ; 30 sec OFF] à la puissance maximale (« High ») à 4°C. Entre chaque round les tubes sont vortexés pour remettre en suspension la chromatine.

25 μL de solution de chromatine soniquée sont utilisées pour vérifier la sonication et estimer la quantité de chromatine extraite (voir section suivante).

I.3.2 Vérification de la sonication

La deuxième étape consiste à vérifier le profil de chromatine obtenu après sonication. Afin de pouvoir être utilisée pour l'immunoprécipitation, les fragments de chromatine doivent avoir une taille comprise entre 100 et 1000 pb.

Un faible volume (25 μL) de chromatine est prélevé avant et après sonication. Après une étape de dépontage réalisée à 65 °C dans du « DNA release Buffer » et en présence de protéinase K (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (réf : 11501515, Thermo Fisher Scientific), l'ADN est extrait en réalisant une extraction au phénol chloroforme. La précipitation de la faible quantité d'ADN extraite est favorisée par une incubation de 3h dans de l'éthanol 100% contenant 10% d'acétate de sodium (NaOAc) 3M, pH 5,2 et 50 ng/ μL de glycogène (réf : 10814010, Thermo Fisher Scientific).

L'ADN extrait est ensuite visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (Figure ci-dessous) et est également quantifié au NanoVue™ afin d'évaluer la quantité de chromatine extraite.

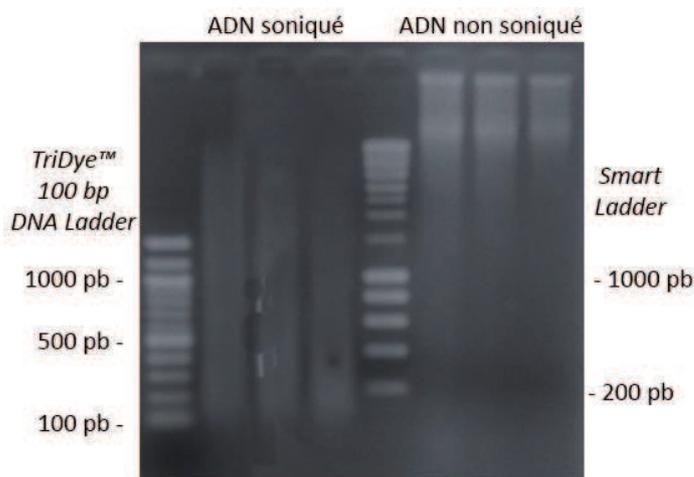


Figure 82: Vérification de la sonication de la chromatine sur gel d'agarose.

Avant de procéder à l'étape d'immunoprécipitation, la sonication de la chromatine est tout d'abord vérifiée. L'ADN extrait à partir de la chromatine avant et après sonication est déposée sur gel d'agarose 1,5 % en parallèle de marqueurs de taille (le TriDye™ 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs et le SmartLadder, Eurogentec).

Après avoir vérifié la sonication et estimé la quantité de chromatine extraite à partir de 25 μL , le reste de l'extraction peut être utilisé pour l'immunoprécipitation.

I.3.3 Immunoprécipitation

La première étape de l'immunoprécipitation consiste à lier les anticorps d'intérêt à la protéine chimérique A/G déjà fixée au fond des puits d'une plaque (fournie dans le kit). Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le Tableau 21.

Anticorps	Marque ou protéine détectée	Quantité/puits (µg)	Référence Abcam
Anti-H3K27me3	H3K27me3 est une marque d'hétérochromatine	0,8	ChIP Grade Ab6002
Anti-H3K4me2/3	H3K4me2/3 est une marque d'euchromatine	0,8	ChIP Grade Ab600
Anti-RNAPolII S2	La phosphorylation de la sérine 2 de la RNA polymérase II constitue une marque de transcription active (euchromatine)	0,8	ChIP Grade Ab5095
Anti-RNA polymérase II	Contrôle positif de l'essai de ChIP	0,8	ChIP Grade (kit Ab185913)
IgG non immunes	Contrôle négatif de l'essai de ChIP – Bruit de fond	0,8	ChIP Grade (kit Ab185913)

Tableau 21: Liste des anticorps utilisés pour les essais de ChIP

Un puits nommé « input » est laissé sans anticorps et sera par la suite traité de la même façon que les puits avec anticorps. Il permettra de déterminer la quantité initiale en ADN cible déposé dans les puits. Ainsi, 5 puits « immunoprécipitation » et un puits « input » sont utilisés pour chaque échantillon de chromatine.

Après une incubation de 90 min, les solutions d'anticorps sont retirées et les puits lavés avec du tampon de ChIP. 8 µg de chromatine sont ensuite ajoutés à chaque puits et l'immunoprécipitation s'effectue durant une incubation de 3h à température ambiante et sous agitation constante.

1.3.4 Lavages et dépontage

A l'issue des trois heures d'incubation, la solution de chromatine est retirée des puits (à l'exception des puits « input ») et les puits sont lavés 4 fois avec du tampon de lavage (Washing Buffer : composition non communiquée) afin d'éliminer la chromatine non immunoprécipitée.

Après une première incubation de 30 min à 42°C dans du DNA Release Buffer en présence de RNase A (0,25 µg/µL), la chromatine est dépontée par une incubation de 45 min à 65°C en présence de protéinase K (0,5µg/µL) qui est suivie par une incubation de 15 min à 95°C afin d'inactiver l'enzyme.

La solution de dépontage est transférée sur une colonne dont la membrane permet de fixer l'ADN. Après plusieurs lavages à l'éthanol 90% l'ADN est élué.

I.3.5 PCR quantitative

Afin d'évaluer l'abondance de fragments de plasmides pFAR4 ou pKAR4 parmi les fragments immunoprécipités, une PCR quantitative est réalisée en utilisant les amorces hAAT et mSGSH, spécifiques de la cassette d'expression contenue par ces plasmides.

II TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

II.1 CULTURE CELLULAIRE

II.1.1 Cellules cultivées

La lignée cellulaire humaine HeLa a été choisie pour étudier la combinaison des technologies pFAR4 et *Sleeping Beauty* afin de se placer dans le même contexte cellulaire que celui des principaux travaux analysant ce système de transposition. Les cellules HeLa (ATCC® CCL-2™) sont des cellules adhérentes et sont issues d'une tumeur du col de l'utérus. Porteuses du virus du papillome humain, elles sont manipulées dans un laboratoire biosécurisé de niveau 2 sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type 2.

II.1.2 Culture des cellules HeLa

Les cellules sont cultivées dans du milieu essentiel minimal MEM 1X + GlutaMAX™-I (réf.: 441090-028, Gibco®) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (réf.: F7524, Sigma-Aldrich®), des antibiotiques (Pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL)(réf.: 15140-122, Gibco®), des acides aminés non essentiels (MEM NEAA 100X, réf.: 11140-035, Gibco®) et du pyruvate de sodium 1 mM (réf.: 11360-039, Gibco®). Les milieux et suppléments sont conservés stérilement à 4 ou -20°C.

Les cellules sont cultivées dans des flasques de culture de 75 cm² contenant 25 mL de milieu dans une étuve à 37°C sous une atmosphère à 5 % de CO₂ et 95% d'humidité.

Elles sont passées deux fois par semaine après avoir atteint 70-80% de confluence. Afin de les décoller, les cellules sont premièrement lavées avec de la trypsine (Trypsine-EDTA 0,05%, réf.: 25300-054, Gibco®) puis incubées en présence de trypsine durant 4-5 min à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de milieu de culture et les cellules sont homogénéisées avant d'être transférées dans un nouveau flacon de culture ou ensemencées dans une plaque.

II.1.3 Comptage des cellules avant ensemencement

Afin de pouvoir effectuer des ensemencements cellulaires reproductibles, les cellules HeLa ont été comptées à l'aide du compteur de cellules automatisé Scepter™ (réf.: PHCC20060, Merck Millipore).

II.1.4 Transfection

Le jour précédent la transfection, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à hauteur de 115 000 cellules par puits afin d'atteindre une confluence d'environ 70-80% le jour de la transfection.

La transfection est réalisée à l'aide d'un vecteur liposomal constitué de deux composants : le lipide cationique 2-{3-[Bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecyl carbamoylmethyl-acetamide, appelé DMAPAP et le lipide neutre 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine ou DOPE. Les acides nucléiques sont complexés avec le vecteur dans du NaCl en respectant un rapport de charge de 4 (4 nmol de liposome pour 1 µg d'ADN).

Les lipoplexes se forment durant une incubation de 30 min à température ambiante et sont ensuite mélangés à du milieu de culture et mis en contact avec les cellules.

Le milieu est changé 24 heures après la transfection.

Un plasmide codant la protéine fluorescente GFP est utilisé comme contrôle de transfection. La transfection est vérifiée par observation des cellules transfectées avec ce plasmide au microscope à fluorescence.

II.1.5 Essai de « transposition formant colonies »

Dans le cadre de l'étude de la combinaison pFAR4/*Sleeping Beauty*, un essai dit de « transposition formant colonies » a été réalisé (Izsvák et al. 2009). Pour cela, deux jours après avoir été cotransfectées avec les plasmides transposon contenant le gène de résistance à la néomycine et le plasmide codant la transposase, les cellules ont étéensemencées dans du milieu contenant 800 µg/mL de Geneticin® (G418, 100 mg/mL, Invivogen, ref: ant-gen-5) et sélectionnées durant 11 jours. Les différentes quantités de cellulesensemencées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous. Chaqueensemencement a été réalisé en quadruplicat.

Condition de transfection	Nombre de cellulesensemencées en plaque de culture 6 puits			Nombre de cellulesensemencées en boîte de culture de 55 cm ²
Plasmide transposon (-SB)	30 000 (comptage)			/
Plasmide transposon + plasmide SB100X	2 000 (comptage)	4 000 (comptage)	8 000 (comptage)	1 000 (pour isoler des clones NeoR)

Tableau 22 : Nombre de cellulesensemencées en milieu sélectif.

A l'issue des 11 jours de sélection, les colonies résistantes à l'antibiotique car ayant intégré le gène de résistance à la néomycine sont soit repiquées à l'aide d'un cône dans une plaque 96 puits contenant du milieu sélectif pour être multipliées, soit colorées pour être comptées en suivant le protocole suivant. Les puits sont tout d'abord rincés avec du PBS puis 1 mL de méthanol est ajouté à chaque puits pour fixer les cellules. Après une incubation de 15 min, le méthanol est

aspiré et les puits sont mis à sécher sous une sorbonne. 1 mL de solution de cristal violet à 0,1 % dans de l'eau est ensuite ajouté à chaque puits et les cellules sont ainsi colorées par une incubation de 45 min à température ambiante. Trois lavages au PBS permettent d'éliminer la solution de cristal violet et de compter les colonies présentes dans chaque puits.

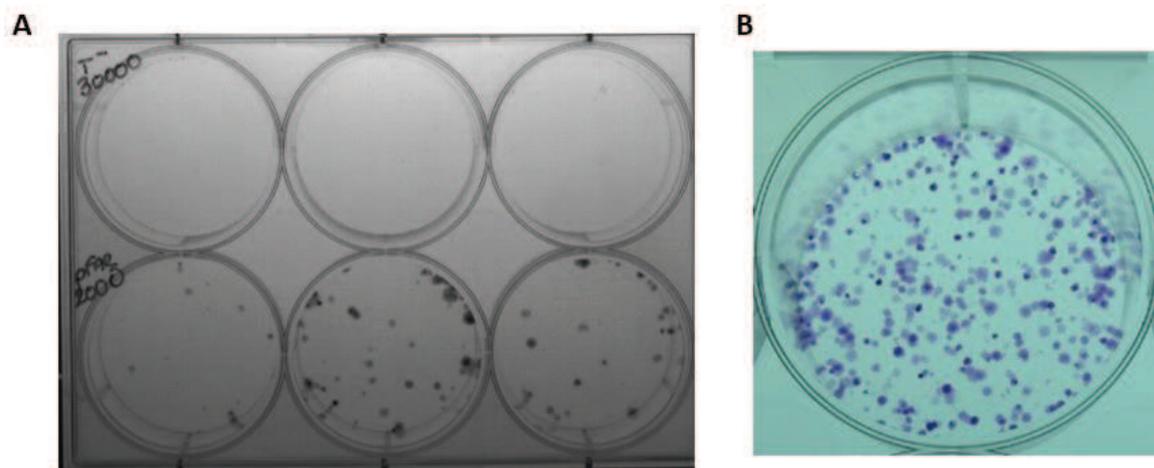


Figure 83 : Essai de « Transposition formant colonies ».

Photographies de puits contenant des colonies résistantes à la néomycine (NeoR) après fixation et coloration au cristal violet. A) Les trois puits du haut ont été ensemencés avec 30 000 cellules transfectées avec le plasmide transposon uniquement tandis que les puits du bas ont été ensemencés avec 2000 cellules ayant été transfectées avec les plasmides transposon et transposase dérivés du pFAR4. B) Exemple de puits ayant été ensemencé avec une quantité plus importante de cellules transfectées avec les plasmides transposon et transposase dérivés du pFAR4 (6000 cellules). Dans cet exemple, certaines colonies sont trop proches pour être distinguées. Les quantités ensemencées lors des essais ont été choisies pour éviter la superposition des colonies. Les puits de ces essais contenant trop de colonies superposées ont été exclus des comptages.

II.2 CYTOMETRIE EN FLUX

II.2.1 Analyse des cellules au cytomètre de flux

Les cellules HeLa transfectées avec les plasmides codant la protéine fluorescente Venus ont été analysées au cytomètre de flux deux jours après transfection. Elles ont pour cela tout d'abord été fixées par une incubation à température ambiante de 5 min dans du formaldéhyde dilué à 1 % dans du PBS suivie de deux lavages au PBS.

Les cellules ont ensuite été analysées au cytomètre de flux (Guava easyCyte™, Merck Millipore) après avoir ajusté leur concentration en diluant avec du PBS (concentration comprise entre 250 et 450 cellules/ μ L).

II.2.2 Tri des cellules

Les cellules ont été triées à l'aide des trieurs de cellules ARIAIII ou FACSJAZZ de BD Biosciences, situés sur une plateforme de cytométrie (Plateforme CYBIO, Institut Cochin, Paris).

Afin d'être triées, les cellules ont été trypsinisées puis resuspendues dans une solution de PBS à 10% de SVF, 1% Pénicilline/Streptomycine, 5 mM EDTA. Elles ont ensuite été passées à travers un tamis cellulaire de 35 μm (réf : 352235, BD Falcon™) et récoltées dans un tube de tri cellulaire en polystyrène.

III DOSAGES BIOCHIMIQUES

III.1 DOSAGE DE L'ACTIVITE SULFAMIDASE

Le dosage de l'activité de l'enzyme sulfamidase est réalisé à partir du sérum prélevé chez les souris. Il est divisé en deux étapes séquentielles se déroulant sur trois jours, comme décrit précédemment (Karpova et al. 1996) (Figure 84).

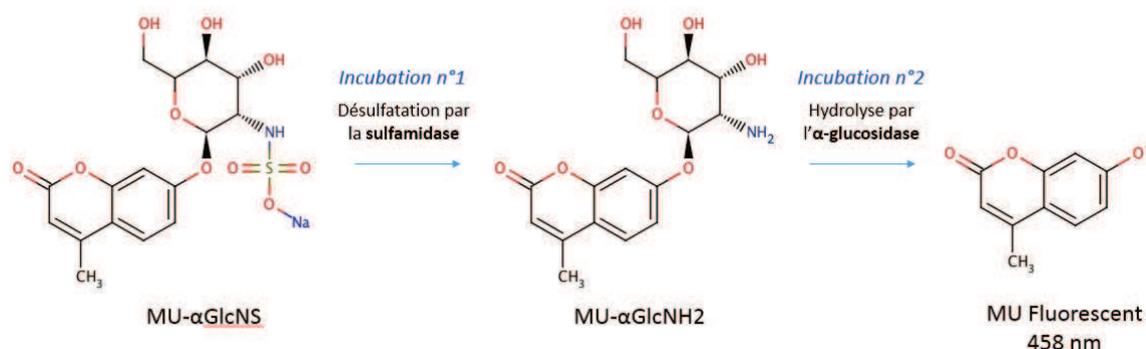


Figure 84: Dosage de l'activité sulfamidase

Le substrat MU- α GlcNS (4-méthylumbelliféryl- α -D-N-sulphoglucosaminide) est ajouté au sérum prélevé chez la souris et est désulfaté par l'enzyme sulfamidase au cours d'une incubation de 17h à 47°C. Le produit de désulfatation MU- α GlcNH₂ est hydrolysé après ajout d' α -glucosidase et incubation de 24h à 37°C pour libérer le 4-méthylumbelliférone (MU), un produit fluorescent à 485 nm.

Incubation n°1 - Désulfatation : 10 μL d'échantillon sont mélangés avec 0,45 mg/mL de Pefabloc®SC, un inhibiteur de protéase (réf.: 76307, Sigma-Aldrich) et 20 μL de 4-méthylumbelliféryl- α -D-N-sulphoglucosaminide (MU- α GlcNS) 5mM (réf.: EM06602, Carbosynth) dilué dans du tampon barbital de sodium/acétate de sodium, NaCl 0,7%, azide de sodium 0,02%, pH 6,5. Le mélange est placé à 47°C pour une incubation de 17h durant laquelle l'enzyme sulfamidase présente dans le sérum désulfate le MU- α GlcNS en MU- α GlcNH₂.

Incubation n°2 - Hydrolyse : L'incubation n°1 est stoppée par l'ajout de 6 μL de tampon de phosphate de sodium 0,4 M/citrate 0,2 M/azide de sodium à 0,02% pH 6,7. 10 μL d' α -glucosidase à 10 U/mL dans de la BSA 0,2 % (Albumine de Sérum Bovin) pH 7 sont ensuite ajoutés et le mélange est incubé 24h à 37°C. Durant cette deuxième incubation l' α -glucosidase hydrolyse MU- α GlcNH₂ pour libérer le 4-méthylumbelliférone (MU), un produit fluorescent.

Mesure de la fluorescence : La réaction est arrêtée par l'ajout de 200 µL de tampon d'arrêt (bicarbonate de sodium 0,5 M/carbonate de sodium 0,5 M/ 0,025% de Triton X-100, pH 10,7). L'intensité de la fluorescence est ensuite détectée à 485 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Une courbe standard de 4-méthylumbelliférone traitée en parallèle des échantillons permet de quantifier l'activité de la sulfamidase.

L'activité sulfamidase est ensuite normalisée par la quantité de protéines totales présentes dans l'échantillon et est exprimée en pmol de MU/17h/mg de protéines (désigné dans la partie résultat par pmol/17h/mg de protéines).

III.2 DOSAGE DES PROTEINES TOTALES

La quantité de protéines totales présente dans un échantillon est déterminée par dosage colorimétrique BCA (BiCinchoninic Acid) à l'aide du kit Pierce® BCA Protein Assay Kit (réf.: 23225, Thermo Fisher Scientific). Un mélange de réactif A contenant de l'acide bicinchoninique et de réactif B contenant du sulfate de cuivre est préparé extemporanément. 200 µL sont ajoutés à 10 µL de sérum dilué au 1/200^{ème}. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 min durant lesquelles les protéines présentes dans l'échantillon réduisent l'ion cuivrique du sulfate de cuivre Cu^{2+} en ion Cu^{+} en milieu alcalin. L'ion Cu^{+} est alors chélaté par deux molécules d'acide bicinchoninique et l'apparition du complexe pourpre ainsi formé est suivie par mesure de l'absorbance à 560 nm.

Une gamme standard de BSA est effectuée en parallèle afin de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon (0 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 3 - 4 - 5 µg de protéine/10µL)

IV EXPERIMENTATION ANIMALE

IV.1 LES ANIMAUX

Les expériences *in vivo* ont été réalisées chez la souris dans le respect de la réglementation et des directives du Ministère de l'Agriculture et avec l'accord du comité d'éthique Paris Descartes (CEEA 34, Projet MESR n° 2112.02).

Les souris utilisées sont des souris femelles de la souche C57BL/6J (Elevage Janvier). Elles sont hébergées à l'Animalerie Centrale de la faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Paris Descartes).

IV.2 ANESTHESIE

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de 15 mL/kg d'une solution de kétamine (8,7 mg/mL, Clorketam® 1000, Vetoquinol) et de xylasine (0,26 µg/mL, Rompun® 2%, Bayer) dans du sérum physiologie (NaCl 0,9%, Eurobio).

L'anesthésie générale est vérifiée par l'absence de réflexe lors du pincement d'une patte de l'animal.

IV.3 PRELEVEMENTS

IV.3.1 Prélèvements de sang

Le sang est prélevé sur l'animal anesthésié par ponction rétro-orbitale à l'aide d'un tube capillaire à hématocrite. L'échantillon, transféré dans un tube eppendorf de 1,5 mL est centrifugé pendant 30 min à 4000 rpm à 4°C afin de récupérer le sérum qui est ensuite conservé à -20°C.

IV.3.2 Perfusion et prélèvements du foie

Afin de prélever le foie, l'animal est anesthésié au gaz carbonique. Le sang est ensuite éliminé du système circulatoire par perfusion cardiaque. La perfusion est effectuée avec du PBS maintenu à 4°C dans de la glace, et à un débit de 5 mL/min après la mise en place de l'aiguille de perfusion dans le ventricule gauche et la section de l'oreillette droite de l'animal.

Le foie, blanchi par la perfusion, est rapidement prélevé, rincé dans du PBS, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

IV.4 INJECTIONS

IV.4.1 Injection hydrodynamique

L'injection hydrodynamique, décrite dans l'introduction (Section I.3.2.2.5), est une procédure utilisée pour le transfert de gène aux cellules du foie et consiste en l'injection rapide d'un large volume de solution d'ADN dans le système vasculaire. Chez la souris, elle est réalisée via la veine de la queue. Un volume de solution correspondant à 10% du poids de l'animal est injecté en 4 à 7 secondes.

IV.4.1.1 Préparation de la souris :

Les souris utilisées sont âgées de 6 à 10 semaines et sont pesées afin de déterminer le volume de solution plasmidique à injecter. Un échantillon de sang de ces souris est également prélevé quelques jours avant l'injection et correspond au « J-0 ».

IV.4.1.2 Préparation de la solution d'ADN :

L'ADN plasmidique est dilué dans un volume de NaCl 0,9% afin d'injecter à chaque souris la dose d'ADN dans un volume total correspond à 10% de son poids. Ainsi une souris de 20 g sera injectée avec 2 mL de solution d'ADN à 50 µg/mL. Le volume administré ne doit cependant pas excéder 2,5 mL même si l'animal pèse plus de 25g.

IV.4.1.3 Procédure :

L'animal est immobilisé dans une cage de contention permettant d'accéder à la queue. La queue est placée dans un bain à 35°C durant environ 20 secondes afin d'augmenter le volume vasculaire et de faciliter la visualisation des veines.

La queue est rapidement nettoyée à l'éthanol et une aiguille 26 gauge, portée par une seringue de 2,5 mL, est ensuite placée dans la veine à environ 2 cm de l'extrémité de la queue. Un retour veineux visualisé au niveau de l'aiguille indique que celle-ci est correctement placée dans la veine. La totalité de la solution plasmidique est alors injectée en 4 à 7 sec.

Après avoir retiré l'aiguille et effectué un point de compression à l'endroit de l'injection, la souris est rapidement retirée de la cage de contention et maintenue jusqu'à ce qu'elle retrouve son rythme de respiration normal. Elle est ensuite gardée sous observation jusqu'à ce qu'elle reprenne une activité normale soit pendant 30 min environ. Si durant ce temps la souris s'arrête de respirer, un léger massage de la cage thoracique est effectué afin de relancer la respiration.

IV.4.2 Injection intrapéritonéale de tétrachlorure de carbone

IV.4.2.1 Le tétrachlorure de carbone, utilisation et métabolisme :

Le tétrachlorure de carbone est un composé organique de formule CCl_4 , présent à température ambiante sous forme de liquide incolore et très volatil. C'est un produit toxique et cancérigène (Catégorie 2B) et également dangereux pour l'environnement et la couche d'ozone (Catégorie 1).

Ce composé est utilisé comme substance modèle pour : (i) l'étude chez l'animal des mécanismes d'action et des effets hépatotoxiques de certaines drogues ou maladies et (ii) pour créer des modèles animaux de fibrose ou cirrhose hépatique (Hayes et al. 2014; Weber et al. 2003).

Dans la cellule, le CCl_4 est métabolisé par le cytochrome P-450 conduisant à la formation du produit radicalaire $\text{CCl}_3\cdot$. $\text{CCl}_3\cdot$ se lie alors aux molécules cellulaires telles que les acides nucléiques, les protéines et les lipides altérant les processus cellulaires, entraînant la peroxydation des lipides et la destruction des membranes cellulaires (Weber et al. 2003).

En fonction de la dose et de la voie d'administration, la mort cellulaire et les dommages hépatiques induits sont rapidement suivis d'une augmentation de la multiplication cellulaire conduisant à une entière régénération tissulaire.

Dans le cas d'une administration par voie intrapéritonéale, environ 80 % du CCl₄ sont éliminés par expiration dans les 6 heures suivant l'administration, majoritairement sous la même forme ou sous forme de métabolites. Une faible proportion de CCl₄ est également éliminée dans les urines et les fèces (WHO World Health Organization 2004).

IV.4.2.2 Suivi de l'expression du plasmide pFAR4-hAAT-SGSH après injection de CCl₄ :

Dans le cadre de cette étude, une injection de CCl₄ a été effectuée à des souris, 41 jours après une première injection hydrodynamique de 100 µg de plasmide pFAR4-hAAT-SGSH, afin d'induire une division cellulaire rapide. Des prélèvements sanguins et le dosage de l'activité sulfamidase sont effectués à différents temps précédents et suivants l'injection.

Les doses et le protocole ont été déterminés d'après les données de la littérature (Liesner et al. 2010, Hayes et al. 2014).

Les souris ont préalablement été transférées dans des cages en plastique jetables et placées sous une sorbonne conforme. 200 µL d'une solution de CCl₄ (réf.: 270652, Sigma-Aldrich) à 12,5% (v/v) dans de l'huile d'olive (réf.: O1514, Sigma-Aldrich), correspondant à une dose de 1992,5 mg/kg a été administrée par voie intra-péritonéale. Les souris ont alors été laissées sous la sorbonne durant 6 à 8h, temps nécessaire à l'élimination d'environ 80% du CCl₄.

Des prélèvements de sang et des changements de cages jetables ont été effectués dès 24h puis tous les 7 jours après l'injection de CCl₄.

Les souris contrôle ont été injectées par voie intra-péritonéale avec 200 µL d'huile d'olive. Aucun produit toxique n'ayant été injecté, la manipulation des animaux et des cages est restée inchangée.

V STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Les résultats ont été analysés avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney sauf si indications contraires dans la légende. Les résultats avec une p-value < 0,05 sont considérés comme significatifs.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Aisenbrey, S. et al., 2006. Iris pigment epithelial translocation in the treatment of exudative macular degeneration: a 3-year follow-up. *Archives of ophthalmology*, 124(2), pp.183–188.
- Aiuti, A. et al., 2009. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *The New England journal of medicine*, 360(5), pp.447–58.
- Aker, M. et al., 2006. Integration bias of gammaretrovirus vectors following transduction and growth of primary mouse hematopoietic progenitor cells with and without selection. *Molecular therapy*, 14(2), pp.226–35.
- Al-Dosari, M.S. & Gao, X., 2009. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, 11(4), pp.671–681.
- Aliño, S.F., Crespo, a & Dasí, F., 2003. Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. *Gene therapy*, 10(19), pp.1672–1679.
- André, F.M. et al., 2006. Variability of naked DNA expression after direct local injection: the influence of the injection speed. *Gene therapy*, 13(23), pp.1619–27.
- Aronovich, E.L. et al., 2009. Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(7), pp.1136–1144.
- Aronovich, E.L. & Hackett, P.B., 2015. Lysosomal storage disease: Gene therapy on both sides of the blood–brain barrier. *Molecular Genetics and Metabolism*, 114(2), pp.83–93.
- Ayuso, E., Mingozi, F. & Bosch, F., 2010. Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Current gene therapy*, 10(6), pp.423–36.
- Badding, M.A. & Dean, D.A., 2013. Highly Acetylated Tubulin Permits Enhanced Interactions with and Trafficking of Plasmids Along Microtubules. *Gene Therapy*, 20(6), pp.616–624.
- Baer, M. et al., 1990. Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *Nucleic acids research*, 18(1), pp.97–103.
- Bak, R.O. & Mikkelsen, J.G., 2011. Mobilization of DNA transposable elements from lentiviral vectors. *Mobile genetic elements*, 1(2), pp.139–144.
- Balciunas, D. et al., 2006. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *PLoS genetics*, 2(11), pp.1715–1724.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), pp.381–395.
- Barrett, D.M. et al., 2014. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annual review of medicine*, 65, pp.333–47.

- Basarkar, A. & Singh, J., 2007. Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. *International journal of nanomedicine*, 2(3), pp.353–60.
- Bauer, A.P. et al., 2010. The impact of intragenic CpG content on gene expression. *Nucleic Acids Research*, 38(12), pp.3891–3908.
- Bauer, S. et al., 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), pp.9237–42.
- Baus, J. et al., 2005. Hyperactive transposase mutants of the Sleeping Beauty transposon. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 12(6), pp.1148–56.
- Bell, J.B. et al., 2007. Preferential delivery of the Sleeping Beauty transposon system to livers of mice by hydrodynamic injection. *Nature protocols*, 2(12), pp.3153–65.
- Belur, L., 2003. Gene insertion and long-term expression in lung mediated by the sleeping beauty transposon system. *Molecular Therapy*, 8(3), pp.501–507.
- Bender, M. & Seibel, G.D., 2014. Sickle Cell Disease. In R. Pagon et al., eds. *GeneReviews® [Internet]*. University of Washington, Seattle.
- Van den Berg, J.H. et al., 2009. Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Human gene therapy*, 20(3), pp.181–9.
- Berry, C. et al., 2006. Selection of target sites for mobile DNA integration in the human genome. *PLoS Computational Biology*, 2(11), pp.1450–1462.
- Bertrand, E. et al., 2011. Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 47(46), pp.12547–9.
- Bhaumik, M. et al., 1999. A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology*, 9(12), pp.1389–1396.
- Biffi, A. et al., 2013. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6148).
- Binder, S. et al., 2004. Outcome of transplantation of autologous retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration: a prospective trial. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(11), pp.4151–60.
- Bishop, C.L. et al., 2006. Role for centromeric heterochromatin and PML nuclear bodies in the cellular response to foreign DNA. *Molecular and cellular biology*, 26(7), pp.2583–94.
- Blaese, R.M. et al., 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5235), pp.475–80.
- Blair-Parks, K., Weston, B.C. & Dean, D.A., High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *The journal of gene medicine*, 4(1), pp.92–100.
- Blattner, F.R. et al., 1997. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), pp.1453–62.

- Bloquel, C. et al., 2004. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *The journal of gene medicine*, 6 Suppl 1, pp.S11–23.
- Boehme, P. et al., 2015. The sleeping beauty transposon vector system for treatment of rare genetic diseases: an unrealized hope? *Current gene therapy*, 15(3), pp.255–65.
- Bonamassa, B., Hai, L. & Liu, D., 2011. Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research. *Pharmaceutical research*, 28(4), pp.694–701.
- Boyer, O. & Klatzmann, D., 1999. Thérapie génique anticancéreuse par gènes suicides : du gène à l'essai thérapeutique. *Medecine/Sciences (Paris)*, 15(5), pp.625–634.
- Brookes, E. & Pombo, A., 2009. Modifications of RNA polymerase II are pivotal in regulating gene expression states. *EMBO reports*, 10(11), pp.1213–1219.
- Buckland, K.F. & Bobby Gaspar, H., 2014. Gene and cell therapy for children - New medicines, new challenges? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 73, pp.162–169.
- Büning, H., 2013. Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey. *EMBO molecular medicine*, 5(1), pp.1–3.
- Burgess-Beusse, B. et al., 2002. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 Suppl 4, pp.16433–7.
- Cai, M. & Yang, Y., 2014. Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. *Current gene therapy*, 14(1), pp.2–9.
- Capecchi, M.R., 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22(2 Pt 2), pp.479–88.
- Caplen, N.J. et al., 1995. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nature medicine*, 1(1), pp.39–46.
- Carbone, G.M. et al., 2004. DNA binding and antigene activity of a daunomycin-conjugated triplex-forming oligonucleotide targeting the P2 promoter of the human c-myc gene. *Nucleic acids research*, 32(8), pp.2396–410.
- Casali, N. & Preston, A., 2003. *E. coli Plasmid Vectors* N. Casali & A. Preston, eds.,
- Catanese, D.J. et al., 2012. Supercoiled Minivector DNA resists shear forces associated with gene therapy delivery. *Gene therapy*, 19(1), pp.94–100.
- Cesana, D. et al., 2014. Uncovering and dissecting the genotoxicity of self-inactivating lentiviral vectors in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(4), pp.774–85.
- Chabot, S. et al., 2013. Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery. *Gene therapy*, 20(1), pp.62–8.

- Chen, Z.Y. et al., 2001. Linear DNAs concatemerize in vivo and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 3(3), pp.403–410.
- Chen, Z.Y. et al., 2004. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene therapy*, 11(10), pp.856–864.
- Chen, Z.-Y. et al., 2003. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 8(3), pp.495–500.
- Chen, Z.-Y. et al., 2008. Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(3), pp.548–556.
- Chen, Z.-Y., He, C.-Y. & Kay, M. a, 2005. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Human gene therapy*, 16(1), pp.126–131.
- Chen, Z.-Y., He, C.-Y. & Kay, M.A., 2005. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Human gene therapy*, 16(1), pp.126–31.
- Chenuet, S. et al., 2009. DNA delivery by microinjection for the generation of recombinant mammalian cell lines. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 518, pp.99–112.
- Cherng, J.-Y. et al., 1999. Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)–plasmid complexes. *Journal of Controlled Release*, 60(2-3), pp.343–353.
- Cheutin, T. & Cavalli, G., 2014. Polycomb silencing: from linear chromatin domains to 3D chromosome folding. *Current opinion in genetics & development*, 25, pp.30–7.
- Chiu, Y.-N. et al., 2012. Skin tattooing as a novel approach for DNA vaccine delivery. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (68).
- Chong, V., 2016. Ranibizumab for the treatment of wet AMD: a summary of real-world studies. *Eye (London, England)*, 30(2), pp.270–286.
- Chou, B.-K. et al., 2011. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell research*, 21(3), pp.518–29.
- Chow, Y.T. et al., 2016. Single Cell Transfection through Precise Microinjection with Quantitatively Controlled Injection Volumes. *Scientific reports*, 6, p.24127.
- Chung, J.H., Bell, A.C. & Felsenfeld, G., 1997. Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(2), pp.575–80.
- Corden, J.L., 1990. Tails of RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences*, 15(10), pp.383–387.

- Craig, J.M., 2005. Heterochromatin - Many flavours, common themes. *BioEssays*, 27(1), pp.17–28.
- Cranenburgh, R.M. et al., 2001. Escherichia coli strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic acids research*, 29(5), p.E26.
- Cui, Z. et al., 2002. Structure-function analysis of the inverted terminal repeats of the Sleeping Beauty transposon. *Journal of Molecular Biology*, 318(5), pp.1221–1235.
- Dalsgaard, T. et al., 2009a. Shielding of sleeping beauty DNA transposon-delivered transgene cassettes by heterologous insulators in early embryonal cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(1), pp.121–30.
- Dalsgaard, T. et al., 2009b. Shielding of sleeping beauty DNA transposon-delivered transgene cassettes by heterologous insulators in early embryonal cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(1), pp.121–30.
- Das, P.M., Ramachandran, K. & Singal, R., 2004. Chromatin Immunoprecipitation Assay Schematic. *BioTechniques*, 37(6), p.1.
- Dean, D.A. et al., 1999. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Experimental cell research*, 253(2), pp.713–22.
- Delalande, A. et al., 2015. Efficient Gene Delivery by Sonoporation Is Associated with Microbubble Entry into Cells and the Clathrin-Dependent Endocytosis Pathway. *Ultrasound in medicine & biology*, 41(7), pp.1913–26.
- Delalande, A. et al., 2013. Sonoporation: mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer. *Gene*, 525(2), pp.191–9.
- Delalande, A. et al., 2011. Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery in Achilles tendons: long lasting gene expression and restoration of fibromodulin KO phenotype. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 156(2), pp.223–30.
- Deniger, D.C. et al., 2015. Sleeping Beauty Transposition of Chimeric Antigen Receptors Targeting Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor-1 (ROR1) into Diverse Memory T-Cell Populations. *PloS one*, 10(6).
- Diecke, S. et al., 2015. Novel codon-optimized mini-intronic plasmid for efficient, inexpensive, and xeno-free induction of pluripotency. *Scientific reports*, 5, p.8081.
- Dobias, A. et al., 2015. *Lack of Tumorigenic Potential of PEDF Transfected Primary Human Pigment Epithelial Cells in Soft Agar Assays - Poster presented at The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*,
- Dong, W.-R., Xiang, L.-X. & Shao, J.-Z., 2010. Novel antibiotic-free plasmid selection system based on complementation of host auxotrophy in the NAD de novo synthesis pathway. *Applied and environmental microbiology*, 76(7), pp.2295–303.
- Dutton, J.L. et al., 2013. A novel DNA vaccine technology conveying protection against a lethal herpes simplex viral challenge in mice. *PloS one*, 8(10).

- Ehrhardt, A. et al., 2003. Optimization of cis-acting elements for gene expression from nonviral vectors in vivo. *Human gene therapy*, 14(3), pp.215–25.
- Escriou, V. et al., 2003. NLS bioconjugates for targeting therapeutic genes to the nucleus. *Advanced drug delivery reviews*, 55(2), pp.295–306.
- European Medicines Agency, 2008. *Guideline on Follow-Up of Patients Administered With Gene Therapy Medicinal Products*,
- European Medicines Agency, 2012. *Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells*,
- European Medicines Agency, 2015. *Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products*,
- Fabre, E.E. et al., 2008. Careful adjustment of Epo non-viral gene therapy for beta-thalassemic anaemia treatment. *Genetic vaccines and therapy*, 6, p.10.
- Fajnkuhen, F. & Cohen, S.-Y., 2008. Utilisation des anti-VEGF dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge. *Journal Français d'Ophthalmologie*, 31(1), pp.94–110.
- Fath, S. et al., 2011. Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. *PloS one*, 6(3), p.e17596.
- Fda, C., 2007. Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications. *Biotechnology Law Report*, 26(6), pp.641–648.
- Fedele, A.O., 2015. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. *The application of clinical genetics*, 8, pp.269–81.
- Fedoroff, N. V., 2012. McClintock's challenge in the 21st century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), pp.20200–3.
- Felgner, P.L. et al., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), pp.7413–7.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), pp.806–11.
- Garrison, B.S. et al., 2007. Postintegrative gene silencing within the Sleeping Beauty transposition system. *Molecular and cellular biology*, 27(24), pp.8824–33.
- Gaspar, V. et al., 2015. Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(3), pp.353–379.
- Gaspar-Maia, A. et al., 2011. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), pp.36–47.
- Gazdhar, A. et al., 2006. In vivo electroporation and ubiquitin promoter--a protocol for sustained gene expression in the lung. *The journal of gene medicine*, 8(7), pp.910–8.

- Gerdemann, U. et al., 2013. Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(11), pp.2113–21.
- Geurts, A., 2003. Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Molecular Therapy*, 8(1), pp.108–117.
- Geurts, A.M. et al., 2006. Conditional gene expression in the mouse using a Sleeping Beauty gene-trap transposon. *BMC Biotechnology* 2006 6:1, 6(1), p.1.
- Giacca, M. & Zacchigna, S., 2012. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 161(2), pp.377–88.
- Gomez, J.-P., Pichon, C. & Midoux, P., 2013. Ability of plasmid DNA complexed with histidinylated LPEI and LPEI to cross in vitro lung and muscle vascular endothelial barriers. *Gene*, 525(2), pp.182–190.
- Gonçalves, C. et al., 2009. An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *The journal of gene medicine*, 11(5), pp.401–11.
- Goudy, K.S., Wang, B. & Tisch, R., 2008. Gene gun-mediated DNA vaccination enhances antigen-specific immunotherapy at a late preclinical stage of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 129(1), pp.49–57.
- Grabundzija, I. et al., 2010. Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(6), pp.1200–1209.
- Grabundzija, I. et al., 2013. Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells. *Nucleic acids research*, 41(3), pp.1829–47.
- Gracey Maniar, L.E. et al., 2012. Minicircle DNA Vectors Achieve Sustained Expression Reflected by Active Chromatin and Transcriptional Level. *Molecular Therapy*, 21(1), pp.131–138.
- Grund, M. & Schleaf, M., 2013. Minicircle Patents: A short IP Overview of Optimizing Nonviral DNA Vectors. In M. Schleaf, ed. *Minicircle and Miniplasmid DNA Vectors: The Future of Non-viral and Viral Gene Transfer*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1–6.
- Guimarães-Walker, A. et al., 2008. Lessons from IAVI-006, a phase I clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the pThr.HIVA DNA and MVA.HIVA vaccines in a prime-boost strategy to induce HIV-1 specific T-cell responses in healthy volunteers. *Vaccine*, 26(51), pp.6671–7.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J., 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology*, 22(7), pp.346–53.

- Haas, T. et al., 2008. The DNA Sugar Backbone 2' Deoxyribose Determines Toll-like Receptor 9 Activation. *Immunity*, 28(3), pp.315–323.
- Hacein-Bey-Abina, S. et al., 2010. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England journal of medicine*, 363(4), pp.355–64.
- Hacein-Bey-Abina, S. et al., 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5644), pp.415–9.
- Hackett, P.B. et al., 2013. Evaluating risks of insertional mutagenesis by DNA transposons in gene therapy. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 161(4), pp.265–83.
- Hackett, P.B., Largaespada, D.A. & Cooper, L.J., 2010. A Transposon and Transposase System for Human Application. *Molecular Therapy*, 18(4), pp.674–683.
- Hägg, P. et al., 2004. A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in Escherichia coli. *Journal of biotechnology*, 111(1), pp.17–30.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), pp.557–580.
- Harmening, N. et al., 2014. *Non-Viral Transfection of Primary Cells using Plasmids Free of Antibiotic Resistance Markers- Poster presented at The Annual Meeting of the SFTCG (Société Française de Thérapie Cellulaire et Génique)*,
- Harmening, N. et al., 2015. *The use of mini-plasmids free of antibiotic resistance markers for a gene therapeutical approach to treat AMD - Poster presented at The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*,
- Harraghy, N., Gaussin, A. & Mermoud, N., 2008. Sustained transgene expression using MAR elements. *Current gene therapy*, 8(5), pp.353–66.
- Harvie, P., Wong, F.M. & Bally, M.B., 2000. Use of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates to regulate the surface attributes and transfection activity of lipid-DNA particles. *Journal of pharmaceutical sciences*, 89(5), pp.652–63.
- Hausl, M.A. et al., 2010. Hyperactive sleeping beauty transposase enables persistent phenotypic correction in mice and a canine model for hemophilia B. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(11), pp.1896–906.
- Haute Autorité de Santé (HAS), 2015. *Décision n°2015.0157/DC/SEESP du 24 juin 2015 du collège de la Haute Autorité de santé constatant l'absence d'impact significatif du produit GLYBERA sur les dépenses de l'assurance maladie*,
- Haute Autorité de Santé (HAS), 2012. *Dégénérescence maculaire liée à l'âge : prise en charge diagnostique et thérapeutique*,
- Hayes, B.J. et al., 2014. Activation of platelet-derived growth factor receptor alpha contributes to liver fibrosis. *PloS one*, 9(3).

- Hayes, F., 2003. The function and organization of plasmids. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 235, pp.1–17.
- Hebbar, P.B. & Archer, T.K., 2008. Altered histone H1 stoichiometry and an absence of nucleosome positioning on transfected DNA. *The Journal of biological chemistry*, 283(8), pp.4595–601.
- Heggestad, A.D., Notterpek, L. & Fletcher, B.S., 2004. Transposon-based RNAi delivery system for generating knockdown cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(3), pp.643–650.
- Hélène, C., 1991. Rational design of sequence-specific oncogene inhibitors based on antisense and antigene oligonucleotides. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 27(11), pp.1466–71.
- Heller, L.C. & Heller, R., 2010. Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Current gene therapy*, 10(4), pp.312–7.
- Heller, R. & Heller, L.C., 2015. Gene electrotransfer clinical trials. *Advances in genetics*, 89, pp.235–62.
- Hemmi, H. et al., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), pp.740–5.
- Hemsley, K.M., King, B. & Hopwood, J.J., 2007. Injection of recombinant human sulfamidase into the CSF via the cerebellomedullary cistern in MPS IIIA mice. *Molecular genetics and metabolism*, 90(3), pp.313–28.
- Heneen, W.K., 1976. HeLa cells and their possible contamination of other cell lines: karyotype studies. *Hereditas*, 82(2), pp.217–48.
- Héron, B. et al., 2011. Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. *American journal of medical genetics. Part A*, 155A(1), pp.58–68.
- Herweijer, H. et al., Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *The journal of gene medicine*, 3(3), pp.280–91.
- Herweijer, H. & Wolff, J. a, 2003. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene therapy*, 10(6), pp.453–8.
- Ho, T.-C. et al., 2010. Pigment epithelium-derived factor is an intrinsic antifibrosis factor targeting hepatic stellate cells. *The American journal of pathology*, 177(4), pp.1798–811.
- Hodges, B.L. et al., 2004. Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Molecular Therapy*, 10(2), pp.269–278.
- Hoffman, B.G. & Jones, S.J.M., 2009. Genome-wide identification of DNA-protein interactions using chromatin immunoprecipitation coupled with flow cell sequencing. *Journal of Endocrinology*, 201(1), pp.1–13.

- Hofmann-Antenbrink, M., Grainger, D.W. & Hofmann, H., 2015. Nanoparticles in medicine: Current challenges facing inorganic nanoparticle toxicity assessments and standardizations. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 11(7), pp.1689–94.
- Huls, H. et al., 2013. First Clinical Trials Employing Sleeping Beauty Gene Transfer System and Artificial Antigen Presenting Cells To Generate and Infuse T Cells Expressing CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor. *Blood*, 122(21), p.166.
- Huth, S. et al., 2004. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *The journal of gene medicine*, 6(8), pp.923–36.
- Hyde, S.C. et al., 2008. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nature biotechnology*, 26(5), pp.549–551.
- Ivics, Z. et al., 1997. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 91(4), pp.501–510.
- Ivics, Z. et al., 2007. Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(6), pp.1137–1144.
- Ivics, Z. et al., 2004. The Sleeping Beauty transposable element: evolution, regulation and genetic applications. *Current issues in molecular biology*, 6(1), pp.43–55.
- Ivics, Z. & Izsvák, Z., 2015. Sleeping Beauty Transposition. *Microbiology spectrum*, 3(2).
- Ivics, Z. & Izsvák, Z., 2006. Transposons for gene therapy! *Current gene therapy*, 6(5), pp.593–607.
- Izsvák, Z. et al., 2009. Efficient stable gene transfer into human cells by the Sleeping Beauty transposon vectors. *Methods*, 49(3), pp.287–97.
- Izsvák, Z. et al., 2002. Involvement of a bifunctional, paired-like DNA-binding domain and a transpositional enhancer in Sleeping Beauty transposition. *The Journal of biological chemistry*, 277(37), pp.34581–8.
- Izsvák, Z. et al., 2010. Translating Sleeping Beauty transposition into cellular therapies: victories and challenges. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 32(9), pp.756–67.
- Izsvák, Z. & Ivics, Z., 2004. Sleeping beauty transposition: biology and applications for molecular therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 9(2), pp.147–56.
- Izsvák, Z., Ivics, Z. & Plasterk, R.H., 2000. Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *Journal of molecular biology*, 302(1), pp.93–102.
- Jacobs, F. et al., 2008. Direct comparison of hepatocyte-specific expression cassettes following adenoviral and nonviral hydrodynamic gene transfer. *Gene therapy*, 15(8), pp.594–603.
- Jager, R.D., Mieler, W.F. & Miller, J.W., 2008. Age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*, 358(24), pp.2606–17.

- Jaichandran, S. et al., 2006. In vivo liver electroporation: optimization and demonstration of therapeutic efficacy. *Human gene therapy*, 17(3), pp.362–75.
- Jenke, B.H.C. et al., 2002. An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO reports*, 3(4), pp.349–54.
- Jeong, S. & Stein, A., 1994. Micrococcal nuclease digestion of nuclei reveals extended nucleosome ladders having anomalous DNA lengths for chromatin assembled on non-replicating plasmids in transfected cells. *Nucleic acids research*, 22(3), pp.370–375.
- Jia, F. et al., 2010. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods*, 7(3), pp.197–9.
- Jin, Z. et al., 2011. The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. *Gene therapy*, 18(9), pp.849–56.
- Jinek, M. et al., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), pp.816–21.
- Johnen, S. et al., 2012. Sleeping Beauty transposon-mediated transfection of retinal and iris pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(8), pp.4787–4796.
- Kamimura, K. et al., 2013. Parameters Affecting Image-guided, Hydrodynamic Gene Delivery to Swine Liver. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 2(10).
- Kamimura, K. et al., 2014. Safety Assessment of Liver-Targeted Hydrodynamic Gene Delivery in Dogs. *PLoS ONE*, 9(9).
- Kano, Y. et al., 1981. In vivo correlation between DNA supercoiling and transcription. *Gene*, 13(2), pp.173–84.
- Karjoo, Z., Chen, X. & Hatefi, A., 2016. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 99(Pt A), pp.113–28.
- Karpova E. A., 1996. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo D disease (MPS III D). *Journal of inherited metabolic disease*, 19, pp.278–285.
- Kaufmann, K.B. et al., 2013. Gene therapy on the move. *EMBO molecular medicine*, 5(11), pp.1642–61.
- Kay, M.A., 2011. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nature Reviews Genetics*, 12(5), pp.316–328.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C. & Naldini, L., 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature medicine*, 7(1), pp.33–40.
- Kay, M.A., He, C.-Y. & Chen, Z.-Y., 2010. A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nature biotechnology*, 28(12), pp.1287–9.

- Kebriaei, P. et al., 2012. Infusing CD19-directed T cells to augment disease control in patients undergoing autologous hematopoietic stem-cell transplantation for advanced B-lymphoid malignancies. *Human gene therapy*, 23(5), pp.444–50.
- Kent, D., 2015. The stereotypical molecular cascade in neovascular age-related macular degeneration: the role of dynamic reciprocity. *Eye (London, England)*, 29(11), pp.1416–26.
- Kim, H. et al., 2010. Gene-specific RNA polymerase II phosphorylation and the CTD code. *Nature structural & molecular biology*, 17(10), pp.1279–1286.
- Kim, H., Kang, K. & Kim, J., 2009. AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Research*, 37(9), pp.2940–2950.
- Kim, J. & Kim, H., 2012a. Recruitment and biological consequences of histone modification of H3K27me3 and H3K9me3. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 53(3-4), pp.232–9.
- Kim, J. & Kim, H., 2012b. Recruitment and biological consequences of histone modification of H3K27me3 and H3K9me3. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 53(3-4), pp.232–9.
- Kleina, L.G. et al., 1990. Construction of Escherichia coli amber suppressor tRNA genes. II. Synthesis of additional tRNA genes and improvement of suppressor efficiency. *Journal of molecular biology*, 213(4), pp.705–17.
- Koga, A., 2004. Transposition mechanisms and biotechnology applications of the medaka fish Tol2 transposable element. *Advances in biophysics*, 38, pp.161–80.
- Kolacsek, O. et al., 2014. Excision Efficiency Is Not Strongly Coupled to Transgenic Rate: Cell Type-Dependent Transposition Efficiency of Sleeping Beauty and piggyBac DNA Transposons. *Human Gene Therapy Methods*, 25(4), pp.241–252.
- Kolacsek, O. et al., 2011. Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mobile DNA*, 2(1), p.5.
- Koltover, I. et al., 1998. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5373), pp.78–81.
- Kostarelos, K. & Miller, A.D., 2005. Synthetic, self-assembly ABCD nanoparticles; a structural paradigm for viable synthetic non-viral vectors. *Chemical Society reviews*, 34(11), pp.970–94.
- Kouskouti, A. & Talianidis, I., 2005. Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *The EMBO journal*, 24(2), pp.347–357.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), pp.693–705.
- Kowalewski, B. et al., 2012. Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), pp.10310–5.

- Kramer, M.G. et al., 2003. In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Molecular Therapy*, 7(3), pp.375–385.
- Kreiss, P. et al., 1999. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic acids research*, 27(19), pp.3792–3798.
- Kren, B.T. et al., 2009. Nanocapsule-delivered Sleeping Beauty mediates therapeutic Factor VIII expression in liver sinusoidal endothelial cells of hemophilia A mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(7), pp.2086–99.
- Krieg, a M., 2012. CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther*, 22(2), pp.77–89.
- Krieg, a M., 1999. Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy. *The journal of gene medicine*, 1(1), pp.56–63.
- Krieg, A.M. et al., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), pp.546–549.
- Krivit, W. et al., Microglia: the effector cell for reconstitution of the central nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Cell transplantation*, 4(4), pp.385–92.
- Ku, M. et al., 2008. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genetics*, 4(10).
- Kwon, H. et al., 2015. Spatio-temporally controlled transfection by quantitative injection into a single cell. *Biomaterials*, 67, pp.225–231.
- Kwon, S.M. et al., 2008. In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 128(1), pp.89–97.
- Lacy-Hulbert, A. et al., 2001. Interruption of coding sequences by heterologous introns can enhance the functional expression of recombinant genes. *Gene therapy*, 8(8), pp.649–53.
- Lagacé, J.-P., 2010. Traitements de la DMLA : revue. *L'optométriste*, pp.16–19.
- Lander, E.S. et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), pp.860–921.
- Landry, J.J.M. et al., 2013. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(8), pp.1213–24.
- Langford-Smith, A. et al., 2012. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(8), pp.1610–21.
- Li, G. et al., 2010. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes and Development*, 24(4), pp.368–380.

- Li, M.A. et al., 2011. Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Nucleic acids research*, 39(22).
- Li, Y., Berke, I. & Modis, Y., 2012. DNA binding to proteolytically activated TLR9 is sequence-independent and enhanced by DNA curvature. *The EMBO journal*, 31(4), pp.919–931.
- Li, Z. et al., 2009. Nanoparticle delivery of anti-metastatic NM23-H1 gene improves chemotherapy in a mouse tumor model. *Cancer gene therapy*, 16(5), pp.423–9.
- Liesner, R. et al., 2010. Critical Amino Acid Residues Within the f C31 Integrase DNA-Binding Domain Affect Recombination Activities in Mammalian Cells. , 1118(September), pp.1104–1118.
- Liu, F., Song, Y. & Liu, D., 1999. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene therapy*, 6(7), pp.1258–1266.
- Liu, G. et al., 2004. Excision of Sleeping Beauty transposons: Parameters and applications to gene therapy. *Journal of Gene Medicine*, 6(5), pp.574–583.
- Liu, G. et al., 2005. Target-site preferences of Sleeping Beauty transposons. *Journal of Molecular Biology*, 346(1), pp.161–173.
- Liu, H. et al., 2006. Sleeping Beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(13), pp.2384–6.
- Liu, L., Mah, C. & Fletcher, B.S., 2006. Sustained FVIII expression and phenotypic correction of hemophilia A in neonatal mice using an endothelial-targeted sleeping beauty transposon. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 13(5), pp.1006–15.
- López-Fuertes, L. et al., 2002. DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against Leishmania major infection in mice. *Vaccine*, 21(3-4), pp.247–257.
- Lorain, S. & Garcia, L., 2014. On demand alternative splicing for gene rescue. In D. Scherman, ed. *Advanced Textbook on Gene Transfer, Gene Therapy and Genetic Pharmacology*. pp. 73–83.
- Lu, J. et al., 2012. The Extragenic Spacer Length Between the 5' and 3' Ends of the Transgene Expression Cassette Affects Transgene Silencing From Plasmid-based Vectors. *Molecular Therapy*, pp.1–9.
- Lu, J., Zhang, F. & Kay, M. a, 2013. A Mini-intronic Plasmid (MIP): A Novel Robust Transgene Expression Vector In Vivo and In Vitro. *Molecular Therapy*, 21(5), pp.954–963.
- Lui, V.W., Falo, L.D. & Huang, L., 2001. Systemic production of IL-12 by naked DNA mediated gene transfer: toxicity and attenuation of transgene expression in vivo. *The journal of gene medicine*, 3(4), pp.384–93.

- Lukacs, G.L. et al., 2000. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), pp.1625–1629.
- Lukason, M. et al., 2011. Inhibition of choroidal neovascularization in a nonhuman primate model by intravitreal administration of an AAV2 vector expressing a novel anti-VEGF molecule. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(2), pp.260–5.
- Luke, J. et al., 2009. Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system. *Vaccine*, 27(46), pp.6454–9.
- Luo, G. et al., 1998. Chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like element in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), pp.10769–73.
- Macville, M. et al., 1999. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer research*, 59(1), pp.141–50.
- Maeder, M.L. & Gersbach, C.A., 2016. Genome Editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(3), pp.430–46.
- Mairhofer, J. et al., 2010. Marker-free plasmids for gene therapeutic applications-Lack of antibiotic resistance gene substantially improves the manufacturing process. *Journal of Biotechnology*, 146, pp.130–137.
- Mairhofer, J. & Grabherr, R., 2008. Rational vector design for efficient non-viral gene delivery: Challenges facing the use of plasmid DNA. *Molecular Biotechnology*, 39(2), pp.97–104.
- Margueron, R. et al., 2009. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature*, 461(7265), pp.762–767.
- Margueron, R. & Reinberg, D., 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330), pp.343–9.
- Marie, C. et al., 2010. pFARs, plasmids free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cells. *The journal of gene medicine*, 12(4), pp.323–32.
- Marimani, M.D. et al., 2015. Inhibition of replication of hepatitis B virus in transgenic mice following administration of hepatotropic lipoplexes containing guanidinopropyl-modified siRNAs. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 209, pp.198–206.
- Martin, M.E. & Rice, K.G., 2007. Peptide-guided gene delivery. *The AAPS journal*, 9(1), pp.E18–29.
- Mátés, L. et al., 2009. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nature genetics*, 41(6), pp.753–61.
- Maucksch, C. et al., 2009. Transgene expression of transfected supercoiled plasmid DNA concatemers in mammalian cells. *The journal of gene medicine*, 11(5), pp.444–53.

- Mauro, V.P. & Chappell, S.A., 2014. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 20(11), pp.604–13.
- Mayrhofer, P. et al., 2008. Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography. *The journal of gene medicine*, 10(11), pp.1253–69.
- McCLINTOCK, B., 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36(6), pp.344–55.
- Mearini, G., Nielsen, P.E. & Fackelmayer, F.O., 2004. Localization and dynamics of small circular DNA in live mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research*, 32(8), pp.2642–2651.
- Melendez, M.E. et al., 2014. Herpes Simplex Virus (hsv-1)-based vectors: applications for gene transfer, gene therapy, cancer virotherapy and vaccination. In D. Scherman, ed. *Advanced Textbook on Gene Transfer, Gene Therapy and Genetic Pharmacology*. pp. 165–182.
- Melendez, M.E., Fraefel, C. & Epstein, A.L., 2014. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-derived amplicon vectors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1144, pp.81–98.
- Miao, C.H. et al., 2001. Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 3(6), pp.947–957.
- Mignon, C., Sodoyer, R. & Werle, B., 2015. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 4(2), pp.157–81.
- Mikkelsen, J., 2003. Helper-Independent sleeping beauty Transposon–Transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression in vivo. *Molecular Therapy*, 8(4), pp.654–665.
- Miller, A.M. & Dean, D.A., 2009. Tissue-specific and transcription factor-mediated nuclear entry of DNA. *Advanced drug delivery reviews*, 61(7-8), pp.603–13.
- Mingozzi, F. & High, K.A., 2011. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature Reviews Genetics*, 12(5), pp.341–355.
- Mir, L.M. et al., 1999. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), pp.4262–7.
- Moghimi, S.M. et al., 2005. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 11(6), pp.990–5.
- Müller, V., Grüber, G. & Antequera, F., 2003. Cellular and Molecular Life Sciences Structure , function and evolution of CpG island promoters. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(3), pp.1647–1658.
- Mulligan, R.C., 1993. The basic science of gene therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), pp.926–32.

- Muñoz-López, M. & García-Pérez, J.L., 2010. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Current genomics*, 11(2), pp.115–28.
- Nafissi, N. et al., 2014. DNA Ministrings: Highly Safe and Effective Gene Delivery Vectors. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 3(5).
- Nafissi, N. & Foldvari, M., 2015. Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools. *Frontiers in neuroscience*, 9(355).
- Nakanishi, H. et al., 2010. piggyBac transposon-mediated long-term gene expression in mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(4), pp.707–14.
- Negre, O. et al., 2016. Gene Therapy of the β -Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the β (A(T87Q))-Globin Gene. *Human gene therapy*, 27(2), pp.148–65.
- Nesmelova, I. V & Hackett, P.B., 2010. DDE transposases: Structural similarity and diversity. *Advanced drug delivery reviews*, 62(12), pp.1187–95.
- Neumann, E. et al., 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*, 1(7), pp.841–5.
- Nikol, S. et al., 2008. Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(5), pp.972–8.
- Noble, M.L. et al., 2013. Ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated gene delivery into canine livers. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(9), pp.1687–94.
- O'Brien, J. & Lummis, S.C.R., 2004. Biolistic and diolistic transfection: using the gene gun to deliver DNA and lipophilic dyes into mammalian cells. *Methods (San Diego, Calif.)*, 33(2), pp.121–5.
- Ochiai, H. et al., 2007. Transient activation of transgene expression by hydrodynamics-based injection may cause rapid decrease in plasmid DNA expression. *Gene therapy*, 14(15), pp.1152–1159.
- Ochiai, H., Harashima, H. & Kamiya, H., 2006. Intranuclear disposition of exogenous DNA in vivo: Silencing, methylation and fragmentation. *FEBS Letters*, 580(3), pp.918–922.
- Official Journal of the European Union, 2009. *Amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products*,
- Okita, K. et al., 2013. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(3), pp.458–66.
- Olbrich, C. et al., 2001. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 77(3), pp.345–55.

- Oliveira, P.H. et al., 2009. Structural instability of plasmid biopharmaceuticals: challenges and implications. *Trends in biotechnology*, 27(9), pp.503–11.
- Pepperkok, R. et al., 1991. Single cell assay with an automated capillary microinjection system. *Cytotechnology*, 5(Suppl 1), pp.93–8.
- Perrot, M.-C.C.G.T.A.C.C.L.N., 2013. Indications et traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) en pratique. *Santé Publique*, Vol. 25(3), pp.315–324.
- Peters, C. & Steward, C.G., 2003. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone marrow transplantation*, 31(4), pp.229–39.
- Peubez, I. et al., 2010. Antibiotic-free selection in E. coli: new considerations for optimal design and improved production. *Microbial cell factories*, 9(65).
- Pickard, M.R., Barraud, P. & Chari, D.M., 2011. The transfection of multipotent neural precursor/stem cell transplant populations with magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 32(9), pp.2274–84.
- Piechaczek, C. et al., 1999. A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Research*, 27(2), pp.426–428.
- Pigeon, L. et al., 2013. An E3-14.7K peptide that promotes microtubules-mediated transport of plasmid DNA increases polyplexes transfection efficiency. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 9(22), pp.3845–51.
- Pikaart, M.J., Recillas-Targa, F. & Felsenfeld, G., 1998. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes & development*, 12(18), pp.2852–62.
- Plasterk, R.H., Izsvák, Z. & Ivics, Z., 1999. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends in Genetics*, 15(8), pp.326–332.
- Praseuth, D., Guieysse, A.L. & Hélène, C., 1999. Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1489(1), pp.181–206.
- Prea, S.M. et al., 2015. Gene Therapy with Endogenous Inhibitors of Angiogenesis for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Beyond Anti-VEGF Therapy. *Journal of ophthalmology*, 2015.
- Quiviger, M. et al., 2014. High and prolonged sulfamidase secretion by the liver of MPS-III mice following hydrodynamic tail vein delivery of antibiotic-free pFAR4 plasmid vector. *Gene therapy*, 21, pp.1001–1007.
- Radonić, A. et al., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), pp.856–862.
- Rakoczy, E.P. et al., 2015. Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow-up of a phase 1 randomised clinical trial. *Lancet (London, England)*, 386(10011), pp.2395–403.

- Ramezani, A. & Hawley, R.G., 2002. Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. In F. M. Ausubel, ed. *Current protocols in molecular biology*. p. Unit 16.21.
- Ray-Gallet, D. et al., 2005. Variations sur le thème du «code histone». *Medecine/Sciences*, 21(4), pp.384–389.
- Ren, S. et al., 2002. Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits. *BMC biotechnology*, 2(10).
- Reschner, A. et al., 2013. Use of Staby(®) technology for development and production of DNA vaccines free of antibiotic resistance gene. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 9(10), pp.2203–10.
- Reyes-Sandoval, a. & Ertl, H.C.J., 2004. CpG methylation of a plasmid vector results in extended transgene product expression by circumventing induction of immune responses. *Molecular Therapy*, 9(2), pp.249–261.
- Riede, O. et al., 2015. Preclinical safety and tolerability of a repeatedly administered human leishmaniasis DNA vaccine. *Gene therapy*, 22(8), pp.628–35.
- Rischmüller, A. et al., 2013. Analytical Tools in Minicircle Production. In M. Schleaf, ed. *Minicircle and Miniplasmid DNA Vectors: The Future of Non-viral and Viral Gene Transfer*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 71–91.
- Riu, E. et al., 2007. Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(7), pp.1348–1355.
- Riu, E. et al., 2005. Increased maintenance and persistence of transgenes by excision of expression cassettes from plasmid sequences in vivo. *Human gene therapy*, 16(5), pp.558–570.
- Rosazza, C. et al., 2016. Endocytosis and Endosomal Trafficking of DNA After Gene Electrotransfer In Vitro. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 5.
- Rosenfeld, P.J. et al., 2006. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*, 355(14), pp.1419–31.
- Rozkov, A. et al., 2004. Characterization of the metabolic burden on Escherichia coli DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7), pp.909–15.
- Ruzo, A., Marcó, S., et al., 2012. Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Human gene therapy*, 23(12), pp.1237–46.
- Ruzo, A., Garcia, M., et al., 2012. Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(2), pp.254–66.
- Sachdeva, M.M. et al., 2016. Endophthalmitis following intravitreal injection of anti-VEGF agents: long-term outcomes and the identification of unusual micro-organisms. *Journal of ophthalmic inflammation and infection*, 6(2).

- Sands, M.S. & Davidson, B.L., 2006. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 13(5), pp.839–49.
- Sanfilippo, S.J. et al., 1963. Mental retardation associated with acid mucopolysacchariduria (heparitin sulfate type). *The Journal of Pediatrics*, 63(4), pp.837–838.
- Sarkar, A. et al., 2003. Molecular evolutionary analysis of the widespread piggyBac transposon family and related “domesticated” sequences. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 270(2), pp.173–80.
- Sato, M. et al., 2013. Site-targeted non-viral gene delivery by direct DNA injection into the pancreatic parenchyma and subsequent in vivo electroporation in mice. *Biotechnology journal*, 8(11), pp.1355–61.
- Savas, P.S., Hemsley, K.M. & Hopwood, J.J., 2004. Intracerebral injection of sulfamidase delays neuropathology in murine MPS-IIIa. *Molecular genetics and metabolism*, 82(4), pp.273–85.
- Schakowski, F. et al., 2001. A novel minimal-size vector (MIDGE) improves transgene expression in colon carcinoma cells and avoids transfection of undesired DNA. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 3(5 Pt 1), pp.793–800.
- Scheiermann, J. & Klinman, D.M., 2014. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*, 32(48), pp.6377–6389.
- Scherer, F. et al., 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, 9(2), pp.102–109.
- Schleef, M. et al., 2010. Production of non viral DNA vectors. *Current gene therapy*, 10(6), pp.487–507.
- Schmeer, M. & Schleef, M., 2014. Pharmaceutical Grade Large-Scale Plasmid DNA Manufacturing Process. In Monica Rinaldi et al., ed. *DNA Vaccines: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science, pp. 219–240.
- Schmidt-Erfurth, U. et al., 2014. Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. *Ophthalmology*, 121(1), pp.193–201.
- Schoenfeld, T. et al., 1995. Effects of bacterial strains carrying the endA1 genotype on DNA quality isolated with Wizard(TM) plasmid purification systems. *Promega Notes Magazine*, 53, p.12.
- Schrem, H., Klempnauer, J. & Borlak, J., 2002. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacological reviews*, 54(1), pp.129–158.
- Schröder, A.R.W. et al., 2002. HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell*, 110(4), pp.521–529.
- Schübeler, D., 2015. Function and information content of DNA methylation.

- Schuettengruber, B. & Cavalli, G., 2013. Polycomb Domain Formation Depends on Short and Long Distance Regulatory Cues. *PLoS ONE*, 8(2).
- Schultheis, B. et al., 2014. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(36), pp.4141–8.
- Schüttrumpf, J. et al., 2011. Transgene loss and changes in the promoter methylation status as determinants for expression duration in nonviral gene transfer for factor IX. *Human gene therapy*, 22(1), pp.101–106.
- Seddon, J.M., 2013. Genetic and environmental underpinnings to age-related ocular diseases. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(14), pp.28–30.
- Sendra, L. et al., 2014. Low RNA translation activity limits the efficacy of hydrodynamic gene transfer to pig liver in vivo. *The journal of gene medicine*, 16(7-8), pp.179–92.
- Shandilya, J. & Roberts, S.G.E., 2012. The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(5), pp.391–400.
- Shapiro, E.G. et al., 2016. A Prospective Natural History Study of Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *The Journal of pediatrics*, 170, pp.278–287.
- Sharei, A., Zoldan, J., et al., 2013. A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), pp.2082–7.
- Sharei, A., Cho, N., et al., 2013. Cell squeezing as a robust, microfluidic intracellular delivery platform. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 81.
- Sharma, N. et al., 2013. Efficient sleeping beauty DNA transposition from DNA minicircles. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 2.
- Sharma, N. et al., 2012. The Impact of cHS4 Insulators on DNA Transposon Vector Mobilization and Silencing in Retinal Pigment Epithelium Cells. *PLoS ONE*, 7(10).
- Sickenberg, M. et al., 2000. A preliminary study of photodynamic therapy using verteporfin for choroidal neovascularization in pathologic myopia, ocular histoplasmosis syndrome, angioid streaks, and idiopathic causes. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 118(3), pp.327–36.
- Silva, A.C. et al., 2010. Adenovirus vector production and purification. *Current gene therapy*, 10(6), pp.437–55.
- De Silva, S. & Bowers, W.J., 2011. Targeting the central nervous system with herpes simplex virus / Sleeping Beauty hybrid amplicon vectors. *Current gene therapy*, 11(5), pp.332–40.
- Simon, J. a & Kingston, R.E., 2009. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(10), pp.697–708.

- Singh, H. et al., 2014. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19. *Immunological Reviews*, 257(1), pp.181–190.
- Singh, H. et al., 2013. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. *PloS one*, 8(5).
- Singh, H. et al., 2015. Manufacture of T cells using the Sleeping Beauty system to enforce expression of a CD19-specific chimeric antigen receptor. *Cancer gene therapy*, 22(2), pp.95–100.
- Soenen, S.J. et al., 2011. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today*, 6(5), pp.446–465.
- Sokolova, V. & Epple, M., 2008. Inorganic Nanoparticles as Carriers of Nucleic Acids into Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(8), pp.1382–1395.
- Solodushko, V., Bitko, V. & Fouty, B., 2014. Minimal piggyBac vectors for chromatin integration. *Gene therapy*, 21(1), pp.1–9.
- Somani, S., 2003. Age-related macular degeneration: an update on nutritional supplementation. *Geriatrics and Aging*, 6(5), pp.15–18.
- Song, K., Chang, Y. & Prud'homme, G.J., 2000. Regulation of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer. *Gene therapy*, 7(6), pp.481–92.
- Soubrier, F. et al., 1999. pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene therapy*, 6(8), pp.1482–1488.
- Souied, E.H. et al., 2016. Severe Ocular Inflammation Following Ranibizumab or Aflibercept Injections for Age-Related Macular Degeneration: A Retrospective Claims Database Analysis. *Ophthalmic epidemiology*, pp.1–9.
- Spanggaard, I. et al., 2013. Gene electrotransfer of plasmid antiangiogenic metargidin peptide (AMEP) in disseminated melanoma: safety and efficacy results of a phase I first-in-man study. *Human gene therapy. Clinical development*, 24(3), pp.99–107.
- Srinivasan, C. et al., 2006. Labeling and intracellular tracking of functionally active plasmid DNA with semiconductor quantum dots. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 14(2), pp.192–201.
- Stadler, J., Lemmens, R. & Nyhammar, T., 2004. Plasmid DNA purification. *The journal of gene medicine*, 6 Suppl 1, pp.S54–66.
- Staunstrup, N.H. et al., 2009. Hybrid lentivirus-transposon vectors with a random integration profile in human cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(7), pp.1205–14.
- Stenler, S. et al., 2014. Micro-minicircle Gene Therapy: Implications of Size on Fermentation, Complexation, Shearing Resistance, and Expression. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2.

- Stolberg, S.G., 1999. The biotech death of Jesse Gelsinger. *The New York times magazine*, pp.136–140, 149–150.
- Stopeck, A.T. et al., 2001. Phase II study of direct intralesional gene transfer of allovectin-7, an HLA-B7/beta2-microglobulin DNA-liposome complex, in patients with metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(8), pp.2285–91.
- Suda, T. & Liu, D., 2007. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(12), pp.2063–2069.
- Summers, D., 1998. Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Molecular Microbiology*, 29(5), pp.1137–1145.
- Summers, D.K. & Sherratt, D.J., 1984. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: CoIE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*, 36(4), pp.1097–103.
- Szipirer, C.Y. & Milinkovitch, M.C., 2005. Separate-component-stabilization system for protein and DNA production without the use of antibiotics. *BioTechniques*, 38(5), pp.775–81.
- Tardieu, M. et al., 2014. Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Human gene therapy*, 25(6), pp.506–16.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A. & Kay, M.A., 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews. Genetics*, 4(5), pp.346–58.
- Thumann, G. et al., 2010. High efficiency non-viral transfection of retinal and iris pigment epithelial cells with pigment epithelium-derived factor. *Gene therapy*, 17(2), pp.181–9.
- Thumann, G., 2012. Prospectives for gene therapy of retinal degenerations. *Current genomics*, 13(5), pp.350–62.
- Tomás, H. a et al., 2013. Lentiviral Gene Therapy Vectors : Challenges and Future Directions. In F. M. Molina, ed. *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*. InTech.
- Trollet, C. et al., 2009. Generation of high-titer neutralizing antibodies against botulinum toxins A, B, and E by DNA electrotransfer. *Infection and immunity*, 77(5), pp.2221–9.
- Trollet, C., 2005. *Transfert de gène in vivo : étude , régulation et application de l ' électrotransfert*. (Doctoral Thesis) Université Paris 6.
- Tsukahara, T. et al., 2015. The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies. *Gene therapy*, 22(2), pp.209–15.
- Ugrinov, K.G. et al., 2015. A multiparametric computational algorithm for comprehensive assessment of genetic mutations in mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo syndrome). *PloS one*, 10(3).

- Uner, M. & Yener, G., 2007. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International journal of nanomedicine*, 2(3), pp.289–300.
- Urasaki, A., Morvan, G. & Kawakami, K., 2006. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics*, 174(2), pp.639–49.
- Valstar, M.J. et al., 2008. Sanfilippo syndrome: a mini-review. *Journal of inherited metabolic disease*, 31(2), pp.240–52.
- Vandermeulen, G. et al., 2011. New Generation of Plasmid Backbones Devoid of Antibiotic Resistance Marker for Gene Therapy Trials. *Molecular Therapy*, 19(11), pp.1942–1949.
- Vaughan, E.E., DeGiulio, J. V & Dean, D.A., 2006. Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. *Current gene therapy*, 6(6), pp.671–81.
- Verissimo, L.M. et al., 2010. Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy. *Journal of drug targeting*, 18(5), pp.333–42.
- Vidal, L. et al., 2008. Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 134(1-2), pp.127–36.
- Vigdal, T.J. et al., 2002a. Common physical properties of DNA affecting target site selection of Sleeping Beauty and other Tc1/mariner transposable elements. *Journal of Molecular Biology*, 323(3), pp.441–452.
- Vigdal, T.J. et al., 2002b. Common Physical Properties of DNA Affecting Target Site Selection of Sleeping Beauty and other Tc1/mariner Transposable Elements. *Journal of Molecular Biology*, 323(3), pp.441–452.
- Viré, E. et al., 2005. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, 439(7078), pp.871–874.
- Voigt, K. et al., 2012. Retargeting Sleeping Beauty Transposon Insertions by Engineered Zinc Finger DNA-binding Domains. *Molecular Therapy*, 20(10), pp.1852–1862.
- Vos, J.C., De Baere, I. & Plasterk, R.H., 1996. Transposase is the only nematode protein required for in vitro transposition of Tc1. *Genes & development*, 10(6), pp.755–61.
- Walisko, O. et al., 2006. Sleeping Beauty transposase modulates cell-cycle progression through interaction with Miz-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), pp.4062–7.
- Walisko, O. et al., 2008. Transcriptional activities of the Sleeping Beauty transposon and shielding its genetic cargo with insulators. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(2), pp.359–69.
- Walther, W. et al., 2013. A Seven-Year Storage Report of Good Manufacturing Practice–Grade Naked Plasmid DNA: Stability, Topology, and In Vitro/In Vivo Functional Analysis. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 24(4), pp.147–153.

- Walther, W. et al., 2001. Nonviral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology. *Gene therapy*, 8(3), pp.173–80.
- Wang, S. et al., 2006. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*, 24(21), pp.4531–40.
- Wang, W. et al., 2013. Non-viral gene delivery methods. *Current pharmaceutical biotechnology*, 14(1), pp.46–60.
- Wang, Z. et al., 2004. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene therapy*, 11(8), pp.711–21.
- Weber, L.W.D., Boll, M. & Stampfl, A., 2003. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes : Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2), pp.105–136.
- Weeratna, R.D. et al., 2001. Designing gene therapy vectors: avoiding immune responses by using tissue-specific promoters. *Gene therapy*, 8(24), pp.1872–8.
- Weiner, L. et al., 2013. *A DNA vaccine immunotherapy for japanese red cedar allergy- Poster presented at the WAO Symposium on Immunotherapy and Biologics*, World Allergy Organization.
- WHO World Health Organization, 2004. *Environmental Health Criteria 208*,
- Wilber, A. et al., 2006. RNA as a source of transposase for Sleeping Beauty-mediated gene insertion and expression in somatic cells and tissues. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 13(3), pp.625–30.
- Williams, D. a, 2008. Sleeping beauty vector system moves toward human trials in the United States. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(9), pp.1515–1516.
- Williams, J., 2014. Improving DNA Vaccine Performance Through Vector Design. *Current Gene Therapy*, 14(3), pp.170–189.
- Williams, J.A., Carnes, A.E. & Hodgson, C.P., 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnology advances*, 27(4), pp.353–70.
- Williams, S.G. et al., 1998. Repressor titration: a novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids. *Nucleic acids research*, 26(9), pp.2120–4.
- Wilson, J.M., 2005. Gendicine: The First Commercial Gene Therapy Product; Chinese Translation of Editorial. *Human Gene Therapy*, 16(9), pp.1014–1015.
- Wilson, M.H., Coates, C.J. & George, A.L., 2007. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(1), pp.139–145.

- Wittig, B. et al., 2001. Therapeutic vaccination against metastatic carcinoma by expression-modulated and immunomodified autologous tumor cells: a first clinical phase I/II trial. *Human gene therapy*, 12(3), pp.267–78.
- Wolfe, D., Mata, M. & Fink, D.J., 2009. A human trial of HSV-mediated gene transfer for the treatment of chronic pain. *Gene therapy*, 16(4), pp.455–60.
- Wolff, J.A. et al., 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4949 Pt 1), pp.1465–8.
- Wu, X. et al., 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5626), pp.1749–51.
- Wyatt, K. et al., 2012. The effectiveness and cost-effectiveness of enzyme and substrate replacement therapies: a longitudinal cohort study of people with lysosomal storage disorders. *Health technology assessment (Winchester, England)*, 16(39), pp.1–543.
- Xue, X. et al., 2009. Stable gene transfer and expression in cord blood-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by a hyperactive Sleeping Beauty transposon system. *Blood*, 114(7), pp.1319–30.
- Yang, Z. et al., 2012. Combined therapy with cytokine-induced killer cells and oncolytic adenovirus expressing IL-12 induce enhanced antitumor activity in liver tumor model. *PloS one*, 7(9).
- Yant, S.R. et al., 2005. High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Molecular and cellular biology*, 25(6), pp.2085–2094.
- Yew, N.S. et al., 2002a. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 5(6), pp.731–738.
- Yew, N.S. et al., 2002b. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 5(6), pp.731–8.
- Ylä-Herttuala, S., 2015. Glybera's second act: the curtain rises on the high cost of therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 23(2), pp.217–8.
- Yokoo, T. et al., 2013. Novel electric power-driven hydrodynamic injection system for gene delivery: safety and efficacy of human factor IX delivery in rats. *Gene therapy*, 20(8), pp.816–23.
- Young, J.L., Barravecchia, M.S. & Dean, D.A., 2014. Electroporation-mediated gene delivery to the lungs. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1121, pp.189–204.
- Yusa, K. et al., 2011. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), pp.1531–6.
- Yusa, K. et al., 2009. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nature methods*, 6(5), pp.363–9.

- Yusa, K., 2015. piggyBac Transposon. *Microbiology spectrum*, 3(2).
- Yusa, K., Takeda, J. & Horie, K., 2004. Enhancement of Sleeping Beauty Transposition by CpG Methylation: Possible Role of Heterochromatin Formation. *Molecular and Cellular Biology*, 24(9), pp.4004–4018.
- Zayed, H. et al., 2004. Development of hyperactive sleeping beauty transposon vectors by mutational analysis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 9(2), pp.292–304.
- Zayed, H., Izsvak, Z., Khare, D., Heinemann, U., Ivics, Z., 2003. The DNA-bending protein HMGB1 is a cellular cofactor of Sleeping Beauty transposition. *Nucleic Acids Research*, 31(9), pp.2313–2322.
- Zeira, E. et al., 2003. Femtosecond infrared laser-an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 8(2), pp.342–50.
- Zeira, E. et al., 2007. Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(13), pp.3522–33.

ARTICLE

ORIGINAL ARTICLE

High and prolonged sulfamidase secretion by the liver of MPS-IIIA mice following hydrodynamic tail vein delivery of antibiotic-free pFAR4 plasmid vector

M Quiviger^{1,2,3,4}, A Arfi^{1,2,3,4}, D Mansard^{1,2,3,4}, L Delacotte^{1,2,3,4}, M Pastor^{1,2,3,4}, D Scherman^{1,2,3,4} and C Marie^{1,2,3,4}

Mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-IIIA) or Sanfilippo A syndrome is a lysosomal storage genetic disease that results from the deficiency of the *N*-sulfolglucosamine sulfohydrolase (SGSH) protein, a sulfamidase required for the degradation of heparan sulfate glycosaminoglycans (GAGs). The accumulation of these macromolecules leads to somatic organ pathologies, severe neurodegeneration and death. To assess a novel gene therapy approach based on prolonged secretion of the missing enzyme by the liver, mediated by hydrodynamic gene delivery, we first compared a kanamycin and an antibiotic-free expression plasmid vector, called pFAR4. Thanks to the reduced vector size, pFAR4 derivatives containing either a ubiquitous or a liver-specific promoter mediated a higher reporter gene expression level than the control plasmid. Hydrodynamic delivery of SGSH-encoding pFAR4 into MPS-IIIA diseased mice led to high serum levels of sulfamidase protein that was efficiently taken up by neighboring organs, as shown by the correction of GAG accumulation. A similar reduction in GAG content was also observed in the brain, at early stages of the disease. Thus, this study contributes to the effort towards the development of novel biosafe non-viral gene vectors for therapeutic protein expression in the liver, and represents a first step towards an alternative gene therapy approach for the MPS-IIIA disease.

Gene Therapy (2014) 21, 1001–1007; doi:10.1038/gt.2014.75; published online 21 August 2014

INTRODUCTION

Gene therapy involves the use of DNA, RNA, viral or non-viral-based vectors. For non-viral approaches, naked plasmid DNA represent the most popular gene vectors as this subclass now accounts for more than 18% of all gene therapy clinical trials, just behind those involving adenoviruses and retroviruses.¹ This relatively high percentage most probably results from the continuous improvement of both gene carriers and physical delivery techniques such as electroporation, sonoporation or hydrodynamics-based techniques.^{2–7}

Recently, we developed a novel antibiotic-free expression vector, called pFAR4.⁸ With this system, selection of plasmid-containing bacteria relies on the suppression, by a plasmid-borne function, of an amber nonsense mutation introduced into an essential *Escherichia coli* gene. The 1.1-kb pFAR4 vector was *de novo* entirely synthesized, thus allowing the removal of redundant sequences to mostly conserve a replication origin and a suppressor t-RNA selection marker regulated by prokaryotic regulatory elements.⁸ The potency of pFAR4 plasmids as eukaryotic expression vectors was demonstrated in muscle, tumor and skin cells, in which transgene expression was found to be higher, prolonged or both, as compared with a kanamycin-resistance vector containing the same eukaryotic expression cassette.⁸ Thus, not only are pFAR4 derivatives safer, but they also display a higher efficiency for gene delivery and expression, which most probably results from their reduced size^{8–10} and a

decreased content in prokaryotic sequences, as the size of the t-RNA gene is smaller than that of the kanamycin-resistance gene.

In the present study, our first objective was to identify a potent expression vector for efficient transfection of hepatocytes following hydrodynamic tail vein injection, with the aim of proposing an alternative gene therapy approach for the treatment of the Sanfilippo A or mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-IIIA) disease. MPS-IIIA belongs to the lysosomal storage disease (LSD) family that regroups more than 60 inherited metabolic monogenic diseases specified by the types of accumulating macromolecules in lysosomal organelles. Patients suffering from MPS-IIIA are deficient in the sulfamidase protein (SGSH, EC3.10.1.1) that cleaves the glucosamine-*N*-sulfate bonds at the non-reducing end of glycosaminoglycan heparan sulfate (GAG-HS). The resulting undigested GAG-HS accumulates in all body cells generating severe and progressive neurodegeneration, hepatosplenomegaly as well as skeletal and joint malformations.^{11,12} First clinical signs are usually noted at a median age of 2.5 years and consist of developmental delay (for example, speech) and/or behavioral problems (such as sleep disturbances, hyperactivity, aggressiveness and anxiety). Other symptoms include recurrent diarrhea, frequent upper airway infections, hearing and visual impairment, and epilepsy. Full stagnation of development occurs at around the age of 3–4 years, and patients with severe or less attenuated form of the disease usually die by the mid to late teenage years.^{11,13}

Several therapeutic approaches have been evaluated. They include gene therapies (using either adeno-associated^{14–16}

¹Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France; ²Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Chimie Paristech, Paris, France; ³CNRS, UMR8258, Paris, France and ⁴Inserm, U1022, Paris, France. Correspondence: Dr C Marie, INSERM U1022 – CNRS UMR8258 - Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, Paris F-75270, France.

E-mail: corinne.marie@parisdescartes.fr

Received 16 August 2013; revised 17 May 2014; accepted 15 July 2014; published online 21 August 2014

or lentivirus vectors¹⁷), SGSH-transduced hematopoietic stem cells,¹⁸ enzyme replacement therapy (ERT)^{19,20} or substrate reduction therapy (SRT).^{21–23} From these studies, two clinical trials have been launched. The first one is based on the administration of the recombinant protein into the cerebrospinal fluid (CSF) via an implanted intrathecal drug delivery device (#NCT01155778 and #NCT01299727, clinicaltrials.gov), whereas the second one is based on an intracerebral injection of sulfamidase-expressing adeno-associated vector to four patients in a phase I/II clinical trial (#NCT01474343). After a year of follow-up, treatment was estimated to be safe and well tolerated but requiring some adjustments, as neuropsychological evaluations revealed a possible albeit moderate improvement.²⁴ As there is no widely available safe and effective treatment for this disease, the objectives of our work were therefore dual: (a) to assess the potency of pFAR4 derivatives as expression vectors in hepatocytes after plasmid hydrodynamic delivery and (b) to use the pFAR4 vector in a therapeutic context, namely in an MPS-IIIa mouse model, which contains a spontaneous mutation in the SGSH gene and exhibits many of the clinical manifestations of the human disease.²⁵ In this approach, liver is used as a manufacturing organ to secrete the sulfamidase protein, taking advantage of the property of lysosomal proteins, which are glycosylated and endocytosed by mannose 6-phosphate receptor-expressing cells and thereafter trafficked to the lysosomes to perform its enzymatic function, thus allowing cross correction in distant cells.²⁶

RESULTS

Identification of the optimal non-viral vector for efficient gene expression in the liver

In order to assess the potency of pFAR4 to deliver and express eukaryotic genes in the liver, the murine secreted alkaline phosphatase (mSEAP) reporter protein was first used to longitudinally monitor transgene expression. The mSEAP gene was cloned downstream from either the ubiquitous CAG (CMV early enhancer/chicken β actin promoter) or the 415-bp liver-specific hAAT (human alpha-1 antitrypsin) promoter. For a comparative assessment, both expression cassettes were also introduced into a kanamycin-resistance vector, pKAR4, which has the same replication origin and MCS as pFAR4 but is ~ 1 kb larger as it contains a different selection marker (KanR versus t-RNA suppressor for pFAR4). The four plasmids were tail vein hydrodynamically delivered into wild-type mouse and sera were collected at different time points (Figure 1a). With either promoter, higher mSEAP concentrations were obtained when pFAR4 was used as a gene vector. Although the use of the CAG promoter led to a higher mSEAP expression than the hAAT promoter, the

liver-specific promoter in combination with pFAR4 was selected as this combination mediated a prolonged transgene expression.

In order to determine whether similar results could be obtained with a therapeutic gene product, the murine SGSH cDNA expressed from the hAAT promoter was introduced into either the pFAR4 or the pKAR4 vector. Hydrodynamic injection of the pFAR4 derivative led to a higher level of serum sulfamidase activity, which was remarkably prolonged over time, in contrast to the rapid decline obtained after delivery of the pKAR4 derivative (Figure 1b). This tendency lasted for more than 4 months and could not be attributed to a loss in plasmid copy number (Supplementary Information 1). When compared with the pKAR4 derivative expressing SGSH, analyses of serum cytokine (interleukin-12 and tumor necrosis factor- α) and aspartate transaminase levels showed that pFAR4-hAAT-SGSH plasmid did not exert any adverse effect in liver (Supplementary Information 2A–C).

Furthermore, in contrast to what was observed with the mSEAP-encoding plasmid, an $\sim 50\%$ initial reduction of serum sulfamidase activity was not observed at early time points. This could neither be attributed to the plasmid amount used (as a similar result was obtained after the injection of 100 μg of pFAR4-hAAT-mSEAP, Supplementary Information 3A) nor to a shorter protein half-life, estimated to be < 13 h for mSEAP and < 7 h for mSGSH (Supplementary Information 3B and C). Instead, it could be attributed to a decrease in plasmid copy number in transfected hepatocytes (Supplementary Information 3A), which do not naturally secrete the embryonic SEAP protein.

Data in the literature report that plasmid hydrodynamic delivery predominantly leads to the transfection of liver cells.^{27,28} In order to challenge the specificity of the hAAT promoter carried by the newly designed pFAR4 vector, the luciferase gene encoding a non-secreted protein was introduced downstream from the liver-specific promoter. The pFAR4-hAAT-Luc plasmid was tail vein hydrodynamically injected into both healthy and diseased mice, in order to assess whether the pathology of MPS-IIIa mice (which includes hepatosplenomegaly) could affect plasmid biodistribution. Monitoring of luciferase expression 2 or 8 days after plasmid injection showed that the transgene expression was restricted to liver (with somehow a slightly lower value in diseased MPS-IIIa mice) (Supplementary Figure 4A and B). Thus, taken together, pFAR4 appears to be a potent and safe vector for protein expression in liver.

Tail vein hydrodynamics-based plasmid delivery leads to high and prolonged level of circulating sulfamidase in an MPS-IIIa mouse model

Having determined that pFAR4 is the optimal vector to reach a prolonged blood level of transgene product in wild-type mice, our

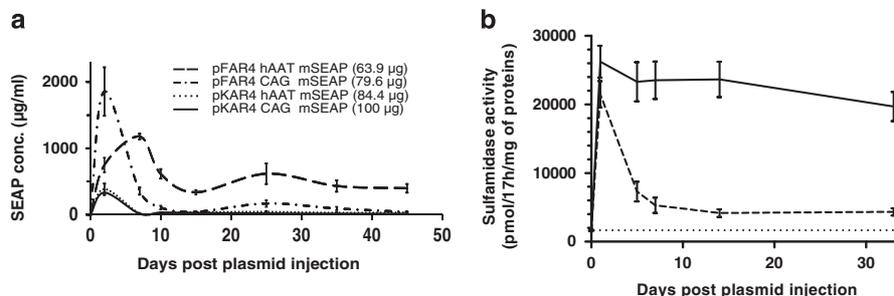


Figure 1. Prolonged transgene expression after tail vein hydrodynamic delivery of pFAR4 derivatives into the liver. (a) Alkaline phosphatase concentrations were determined after injection of plasmids either containing or lacking a kanamycin-resistance gene (pKAR4 or pFAR4 derivatives, respectively). The mSEAP gene expression was driven by either a ubiquitous (CAG) or a liver-specific (hAAT) promoter. Equimolar amounts of plasmids (29.8 pmol) were hydrodynamically injected into C57BL/6 mice ($n=3$ for all plasmids, except for pFAR4-CAG-mSEAP, where $n=5$). Error bars represent s.e.m. (b) Serum sulfamidase activities were measured at different time points, following equimolar injection (46.5 pmol) of either pFAR4-hAAT-SGSH (100 μg , full line) or pKAR4-hAAT-SGSH (132 μg , dashed line) into C57BL/6 mice (dotted line, $n=7$ per group). Error bars represent s.e.m.

next objective was to assess its potency in a therapeutic context. The pFAR4-hAAT SGSH was tail vein hydrodynamically injected into MPS-IIIa mice, which display phenotypic similarities to human patients,²⁵ and sera were then collected at different time points to quantify secreted sulfamidase levels (Figure 2).

Two days post plasmid injection, MPS-IIIa mice transfected with 100 µg of pFAR4-hAAT SGSH displayed a sulfamidase activity that was 40-fold superior to that measured in wild-type mice (Figure 2). Although this value gradually declined with time, it was still more than 20-fold higher than wild-type values 4 months after plasmid delivery (Figure 2), a tendency that lasted for at least 6 months (data not shown). In non-treated MPS-IIIa mice, a residual serum sulfamidase activity was measured, which results from the missense mutation present in the SGSH gene, reflecting anyhow what is observed in the majority (61%) of MPS-IIIa patients.²⁹

In order to determine whether a similar effect was observed with lower concentrations of the pFAR4 derivative, 5, 20 or 50 µg of plasmids were similarly hydrodynamically injected into the tail vein of MPS-IIIa mice. The serum sulfamidase activity measured at different time points post injection appeared to follow similar kinetics profiles and to be dose-dependent (for quantities < 50 µg), but was still, 4 months after plasmid injection, between ~5 and 19 times above wild-type values.

These results contrasted with those obtained after electro-transfer of a plasmid-encoding SGSH from the CMV promoter and injected into the muscle of MPS-IIIa mice. Indeed, whereas transfected muscles exhibited, for at least a month, a 500% increase in sulfamidase activity as compared to wild-type values, no significant modification of the serum sulfamidase level was observed. Thus, unlike muscle, liver appears to be an efficient secretory organ for SGSH when the pFAR4 derivative encoding the therapeutic protein is tail vein hydrodynamically delivered. This construct was therefore retained for assessing the phenotypic correction in different organs.

Biochemical and metabolic effects of treatment following tail vein hydrodynamic injection of pFAR4-hAAT SGSH

Several recent articles have reported that high serum levels of lysosomal therapeutic proteins could lead to phenotypic correction not only in peripheral organs but also in the brain, thus suggesting blood–brain barrier (BBB) crossing by the blood circulating protein.^{15,30,31} To assess whether a similar approach could be used to treat the Sanfilippo A disease, the highest quantity (100 µg) of pFAR4-hAAT-SGSH plasmid was hydrodynamically administered to

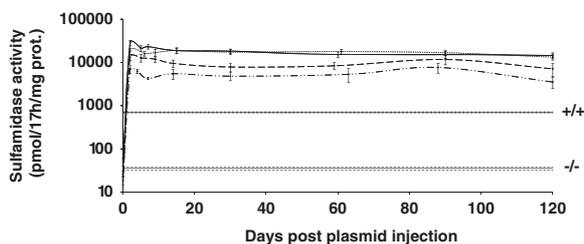


Figure 2. Plasmid dose-dependent sulfamidase activity in the sera of transfected MPS-IIIa mice. Hydrodynamics-based delivery of various doses (100 µg: plain line; 50 µg: dotted line; 20 µg: dashed line and 5 µg: dashed and dotted line) of the pFAR4-hAAT-SGSH therapeutic plasmid into the MPS-IIIa mouse tail vein led to elevated level of circulating sulfamidase activity, which was from 40 to 10 times higher than wild-type level, 2 days post injection. Although this enzymatic activity appeared to slowly decrease with time, it was still from 20 to 5-fold above that measured in healthy mice (+/+) 4 months after plasmid delivery. The (-/-) line indicates the residual enzymatic activity measured in MPS-IIIa mice. Data represent means of values ± s.e.m. ($n=4$ for all plasmid doses, except for 100 µg, where $n=6$).

MPS-IIIa mice and the sulfamidase activities and the GAG contents were quantified in several organs at different time points (Figure 3).

One month after plasmid administration, the sulfamidase activity was several-fold above wild-type level in all tested peripheral organs (Figure 3a). This resulted in a decrease of GAG contents (Figure 3b; $P < 0.01$) that were not significantly different from wild-type values, indicating that the therapeutic amount of the circulating SGSH enzyme has been taken up by the diseased cells. In the brain, although a complete restoration of SGSH activity could not be detected with this biochemical assay, a reduction in GAG content appeared to be significant at this time point ($P < 0.05$). To further assess this correction, brain sagittal longitudinal sections from three diseased, healthy and treated mice were stained with antibodies recognizing either LAMP1 (lysosome associated membrane protein-1), a major protein component of the lysosomal membrane or GFAP (glial fibrillary acidic protein), the principal intermediate filament of mature astrocytes and the most specific markers for cells of astrocytic origin, thought to be important in astrocyte motility and shape, and known to be upregulated in the CNS of MPS-IIIa diseased mice^{32,33} (Figure 4a). The anti-LAMP1 antibody revealed that lysosomes occupied a larger zone ($41.2 \pm 2.5 \mu\text{m}^2$ per cells) in MPS-IIIa than in healthy mouse brains ($10.6 \pm 1.3 \mu\text{m}^2$ per cells). Interestingly, the lysosome surface area in MPS-IIIa-treated brains ($12.5 \pm 1.2 \mu\text{m}^2$ per cells) was significantly different from that measured in the brains of diseased animals ($P < 10^{-4}$) and not significantly different from wild-type values (Figure 4b). These data strengthened our result showing a correction of GAG accumulation in MPS-IIIa brain tissues. Similar experiments were carried out using an anti-GFAP antibody to quantify the level of this neuroinflammation marker. As astrocytes, unlike lysosomes, do not form regular structures, we quantified the percentage of staining in a set area. With the healthy mice, the percentage was 0.96 ± 0.20 and it increased to 6.39 ± 0.43 in the brains of MPS-IIIa mice. With treated MPS-IIIa mice, the obtained value was 4.37 ± 0.33 , which is significantly different ($P = 0.0017$) from that of diseased mice.

Interestingly, when biochemical assays were performed in organs taken 2 months after plasmid injection (Figure 3c), not only was sulfamidase activity restored in all peripheral organs, but a significant increase ($P < 0.05$) in therapeutic protein could also be detected in the brain. Consequently, a significant decrease in GAG content ($P < 0.01$) was obtained in all peripheral organs, as well as in the brain, in which the GAG concentration was not statistically different from wild-type values (Figure 3d). At later time points, however, such as 4 (Figures 3e and f) or 6 months post plasmid injection (Figures 3g and h), GAG correction was only detected in peripheral organs, and no longer in the brain. Thus, after one single pFAR4-hAAT-SGSH administration, a long-lasting level of circulating enzyme was reached, allowing correction of GAG accumulation in peripheral organs, as well as in the brain, although with a reduced efficiency.

DISCUSSION

As successful gene therapy of lysosomal storage diseases, such as MPS-IIIa, requires a lifetime presence of the therapeutic protein, which can be rapidly cleared from the blood circulation, the aim of this study was to assess the potency of a novel biosafe gene vector. The proven inefficiency of muscle in the secretion process of lysosomal proteins (our data and Ruzo *et al.*¹⁵) prompted us to elect liver as the targeted organ for gene delivery, using the antibiotic-free pFAR4 vector that mediates a higher and prolonged serum sulfamidase activity, after a single tail vein hydrodynamic injection, than the kanamycin-resistant plasmid.

Molecular mechanisms having a role in gene silencing in the liver following non-viral vector delivery remain to be fully elucidated, but appear to be partly involved in heterochromatin

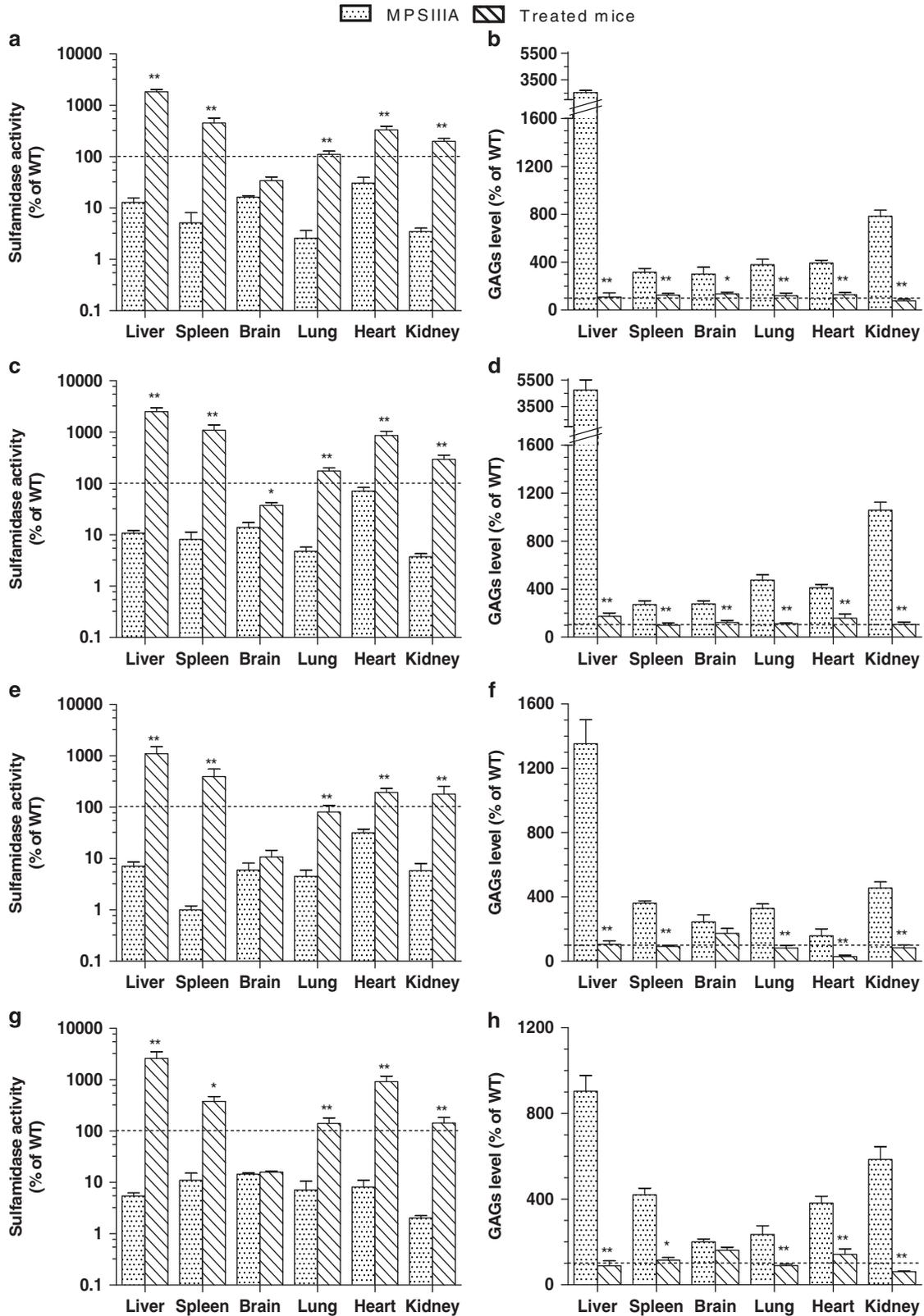


Figure 3. Sulfamidase activity and GAG contents in various organs of diseased and treated MPS-IIIa mice. Following injection of 100 μ g of pFAR4-hAAT-SGSH into the tail vein of 8-week-old MPS-IIIa mice, the sulfamidase activity as well as GAG contents were determined in various organs such as liver, spleen, brain, lung, heart and kidney at 1 month (**a** and **b**, $n=6$), 2 months (**c** and **d**, $n=5$), 4 months (**e** and **f**, $n=6$) and 6 months (**g** and **h**, $n=5$) after plasmid delivery. The serum levels for each set of mice were of 18 861, 23 207, 15 045 and 29 187 pmol per 17h per mg of proteins, respectively, 2 days post injection. Age-matched untreated MPS-IIIa (-/-) and unaffected mice (+/+) ($n=5$) were included as controls. The results represent percentage of values obtained with healthy mice (dotted horizontal line) \pm s.e.m. Asterisks indicate a significant difference between the treated and MPS-IIIa mice determined using the Mann-Whitney test with * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

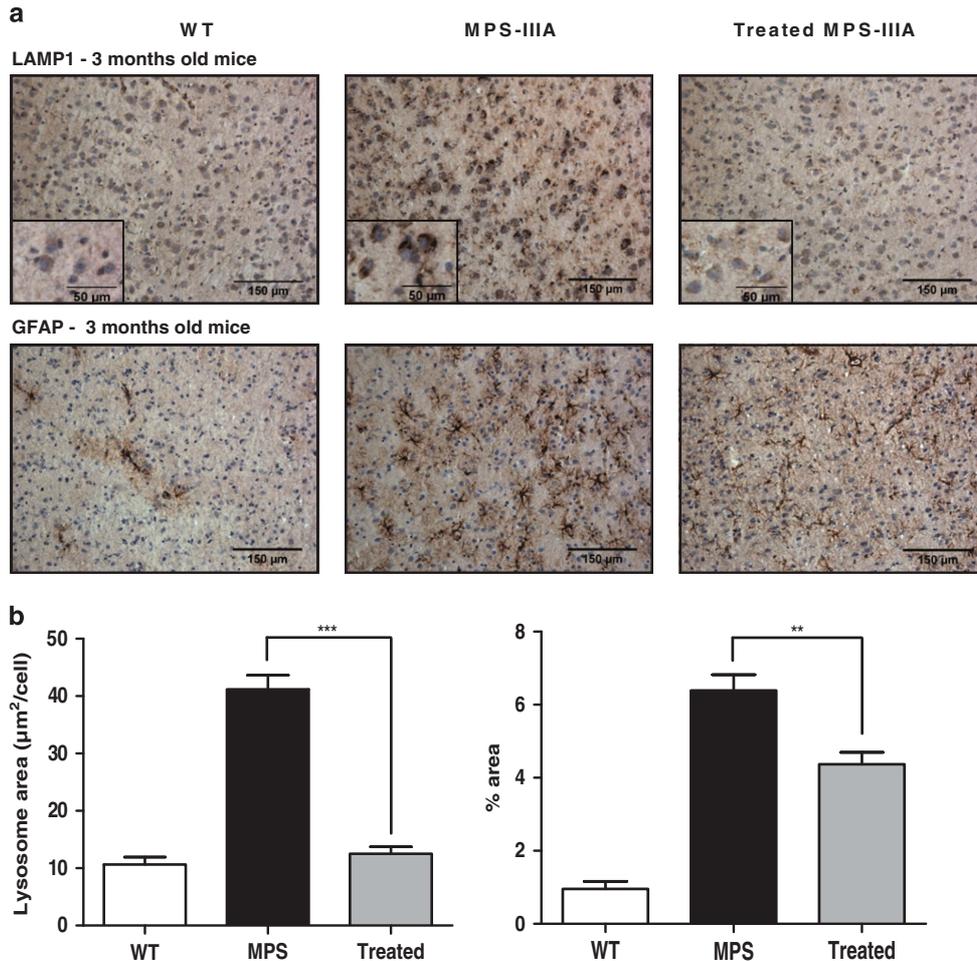


Figure 4. LAMP1 and GFAP immunostainings in brain mice. (a) Three brains of 3-month healthy, diseased or treated mice (1 month after plasmid injection) were taken and fixed. Ten- μm brain sections were stained with either an anti-LAMP1, which recognizes a lysosomal-associated membrane protein indicative of lysosomal compartment enlargement consequent to GAG accumulation, or with or an anti-GFAP antibody, which recognizes the principal intermediate filament of mature astrocytes. Immunoreactivity was revealed using peroxidase-coupled antibodies, and staining was quantified using the Image J software. (b) Values represent means (\pm s.e.m.), obtained from more than 30 pictures (10 for each mouse), of either lysosome surfaces per cells (left) or stained GFAP proteins quantified in a determined area (right). ***P* value: 0.0017 and ****P* < 0.0001.

formation characterized by an enrichment of H3K27 trimethylation on plasmid sequences.^{34,35} By combining non-bacterial and non-coding sequences of various sizes to the same eukaryotic expression cassette, Lu *et al.*³⁶ showed that an increase in the size of the vector backbone correlates with transgene silencing. Thus, the reduced size of the pFAR4 vector backbone (< 1 kb versus > 2 kb in the pKAR4 derivatives) could most probably partly explain the prolonged blood sulfamidase level, allowing a decrease in GAG contents in peripheral organs but also in the brain of treated animals, in which lysosome volume and astrocyte activation were partly corrected.

The reduction in neuropathological manifestations most probably reflects the presence of sufficient sulfamidase level in the brain parenchyma. Following a similar non-viral approach aimed at treating the MPS-I lysosomal storage disease, α -L-iduronidase (IDUA) enzymatic activity of the otherwise deficient protein was measured at a sub-wild-type level in the cerebellum, which was nevertheless sufficient to correct GAG accumulation.³¹ Thus, these two examples highlight the possibility of using a non-viral gene vector to deliver therapeutic genes into the liver to reach a high serum level of the missing enzyme and thereafter delivery of lysosomal proteins to the cerebral parenchyma. As mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 (M6P/IGF2)

receptor-mediated transcytosis is downregulated by the age of 2 weeks,³⁷⁻³⁹ the mechanisms by which proteins could gain access to the brain parenchyma remains largely unknown. They could either involve migration of lysosomal protein endocytosed by white blood cells, from blood circulation to the central nervous system,⁴⁰ or a passive partial crossing of the BBB when exposed to a high and prolonged lysosomal protein blood concentration (see Rozaklis *et al.*⁴¹ Table 2 for a review). In the Sanfilippo A disease, apparent contradictory results have been reported. Whereas reduced neuropathology was not observed in the brain of high-dose unmodified or chemically modified rhSGSH-treated MPS-IIIa mice⁴¹ or following intravenous administration of sulfamidase-expressing adeno-associated vector (AAV2/8-expressing SGSH,¹⁶ which transduces the liver but is unable to cross the BBB), a partial correction was reported by Ruzo *et al.*¹⁵ after injection of an AAV8 derivative into the liver. This discrepancy could result from two different factors: (a) the level of the circulating enzyme, which is two- to threefold higher in the study reported by Ruzo *et al.*¹⁵ and prolonged in the approach reported herein, and (b) the protein half-life, as in both Rozaklis *et al.*⁴¹ and Sorrentino *et al.*¹⁶ studies, a human SGSH derivative (half-life < 4 h)⁴¹ was used in MPS-IIIa mice, whereas a mouse derivative (half-life < 7 h) was secreted from the liver in the present study and by Ruzo *et al.*¹⁵

In comparison with viral vectors that can be easily delivered by intravenous injection, but requiring however lengthy and costly production, non-viral vectors do not display these drawbacks. For plasmid delivery to the mouse liver, the hydrodynamics-based technique is a well-established and efficient approach that primarily leads to transfection of liver cells (our study, Liu *et al.*²⁷ and Kobayashi *et al.*²⁸). A translation of this technology to large animals and humans will need some specific adjustments. Image-guided, lobe-restricted hydrodynamic gene delivery to the liver has been reported in pigs, dogs and baboons, in which injection into the individual liver lobes through an inserted balloon catheter at the designated lobular hepatic vein led to a transfection of 6% of liver cells.⁶ A further recent improvement towards the clinical use of this physical delivery technique also involves a novel electric power-driven injection system called the HydroJector-EM to control the time–pressure curves, in order to insure a reproducible and controlled gene delivery.⁷

Thus, following hydrodynamics-based delivery of the small and biosafe pFAR4 expression vector, high levels of circulating sulfamidase enzyme were reached, allowing correction of GAG accumulation in somatic organs and in young animal brains. Future work will focus on (i) the study of the mechanism(s) having a role in transgene expression after pFAR4 derivatives administration in the liver; (ii) the improvement of neurological correction by increasing sulfamidase delivery to the brain parenchyma, thanks to its fusion with a transcytosis peptide. In addition, even though we did not observe any obvious deleterious effects in any organs of mice treated with a high plasmid quantity, and considering the potency of the pFAR4 vector, it would be worth assessing lower plasmid doses.

On a more extended perspective, one significant result of the present work arose from the prolonged transgene expression after pFAR4 vector delivery to the liver. This favorable property could be of great value for fundamental physiological studies and for gene therapy of any disease, which could benefit from sustained secretion of a missing enzyme to treat various pathologies such as the extended lysosomal storage disorders family, hemophilia, pulmonary or metabolic diseases.

MATERIALS AND METHODS

Wild-type and MPS-IIIa mice

MPS-IIIa mice^{25,42} were originally purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Diseased mice and their unaffected littermates (hereafter designed as wild-type +/-) were obtained from a breeding colony established at the 'Central Animal Facility' of the Faculty of Pharmacy. Mice were genotyped by using standard methods according to protocols provided by the Jackson Laboratory and as described in Bhattacharyya *et al.*⁴² Eight-week-old female C57BL/6 mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were used for the identification of the optimal eukaryotic expression vector. Studies were conducted in compliance with the recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrates Animals used for Experimentation. All experimental protocols were approved by the local ethic committees for animal care and use.

Plasmid constructs and injection

In order to identify the optimal vector for gene delivery to the liver, the murine secreted embryonic alkaline phosphatase (mSeAP) gene (CpG free, Invivogen, Toulouse, France) was first introduced into either the pFAR4 (antibiotic-resistance free)⁸ or the pKAR4 (KanR) vectors. This latter plasmid was constructed by ligating the plasmid backbone of pVAX vectors (Invitrogen, Illkirch, France) with the MCS (multiple cloning sites) of pFAR4.⁸ Following identification of the optimal eukaryotic expression vector, the murine SeAP gene on pFAR4-hAAT-mSeAP was substituted by the murine sulfamidase (SGSH) cDNA, to give pFAR4-hAAT-SGSH and subsequently pFAR4-hAAT-SGSH.

To construct pFAR4-hAAT-LUC, SGSH was replaced by the luciferase gene extracted from pVAX2-LUC.⁸ Endfree plasmids were purified and analyzed as described in Marie *et al.*⁸ and delivered by a single hydrodynamic injection via the tail vein of 8-week-old C57BL/6 or MPS-IIIa mice, as described in Liu *et al.*²⁷ and Zhang *et al.*⁴³

Quantification of plasmid copy number

Total DNA was extracted from 25 mg of grounded liver, using Phenol/CCl₃. DNA copy number was determined by real-time PCR using an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System following the recommendations provided with the Fast SYBR Green Master Mix kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Illkirch, France). The 20 μ l reaction mixtures contained 1–10 ng of DNA and 500 mM of each primer. The PCR program used was 1 min at 95 °C (5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C)_{40x}. Standard amplification curves were generated, in the presence of 1–10 ng of control genomic DNA, with a serial dilution of templates. The primer sequences were: pSGSH-F: 5'-AGTGAATGATCCCCCTGATCT and pSGSH-R: 5'-CTCCGT CATCCGCAACTATCA; pSEAP-F: 5'-AGTGAATGATCCCCCTGATCT and pSEAP-R: 5'-AAGCCCAGCAATAGCAGACA for plasmid quantification that was normalized with mouse GAPDH sequence amplified with the following primers: gGAPDH-F3: 5'-CCTGGGATTAGGGTTGAAAC and gGAPDH-R3: 5'-GCTCAAAGGGCAAGGCTAAAG.

Quantification of enzymatic activities and glycosaminoglycan contents

Sera were collected by retro-orbital or intra-cardiac punctures. Alkaline phosphatase concentration was determined using the Great EscAPE SEAP chemiluminescence Kit (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). Interleukin-2 and tumor necrosis factor- α levels were quantified using the Quantikine ELISA mouse IL-12 p70 and TNF- α Immunoassay kits, respectively (R&D Systems, Lille, France). Aspartate aminotransferase activities were determined using commercialized kits (Biovision, CliniSciences, Nanterre, France). Sulfamidase activity was assessed using the fluorimetric substrate MU- α -GlcNs (4-methylumbelliferyl- α -D-N-sulfo-glucosaminide, Moscerdam, Oegstgeest, The Netherlands), essentially as described in Karpova *et al.*,⁴⁴ either directly from serum or after organ grounding and cell lysis. The SGSH activity was finally normalized against the total amount of protein quantified using bicinchoninic acid (BCA) (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Courtabeuf, France). To study the biodistribution of pFAR4-hAAT-LUC, luminescence was recorded *in vivo* by using a charged coupled device (CCD) camera or *in vitro* after organ grounding and cell lysis, essentially as described in Bloquel *et al.*⁴⁵ Glycosaminoglycan levels were determined essentially as described in Richard *et al.*⁴⁶ Data were expressed as μ g of GAG per mg of dried tissue.

Histological analyses

Ten μ m sections of brains frozen in cooled isopentane and taken from age-matched wild-type, diseased or treated MPS-IIIa mice ($n=3$ per group) were simultaneously stained with either of the following antibodies: rat monoclonal anti-LAMP1 (1D4B, sc-19992, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or Polyclonal rabbit anti-GFAP (Z0334; Dako, Glostrup, Denmark). Either biotinylated goat anti-rat antibody (559286, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) or goat anti-rabbit IgG-Peroxidase antibodies (A0545, Sigma, Lyon, France) were used as secondary antibodies. Finally, the tissue sections were stained using DAB (3,3'-diaminobenzidine, Sigma-Aldrich, Lyon, France) as streptavidine-peroxidase substrate, and subsequently counterstained using hematoxylin. Images were visualized using a Leica DM4000B optical microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). About 30 pictures for each group of animals were taken at the same exposure settings, in the same session, and treated using the Image J software (NIH, USA).

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 5 software. The significance of differences between groups was determined based on exact two-tailed P values obtained with the nonparametric Mann–Whitney test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The performed work and fellowships to AA, MQ and DM have been sponsored, with the support of the EC-DG research through the FP6-Network of Excellence, CLINIGENE: LSHB-CT-2006-018933.

REFERENCES

- Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J Gene Med* 2013; **15**: 65–77.
- Rols MP. Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues. *Methods Mol Biol* 2008; **423**: 19–33.
- Delalande A, Kotopoulos SMP, Midoux P, Pichon C. Sonoporation: mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer. *Gene* 2013; **525**: 191–199.
- Escoffre JM, Zeghimi A, Novell A, Boukaz A. In-vivo gene delivery by sonoporation: recent progress and prospects. *Curr Gene Ther* 2013; **13**: 2–14.
- Sawyer GJ, Rela M, Davenport M, Whitehorne M, Zhang X, Fabre JW. Hydrodynamic gene delivery to the liver: theoretical and practical issues for clinical application. *Curr Gene Ther* 2009; **9**: 128–135.
- Kamimura K, Suda T, Kanefuji T, Zhang G, Aoyagi Y, Liu D. Image-guided, lobe-specific hydrodynamic gene delivery to baboon liver. *Mol Ther* 2012; **20**: S37 (Abstract 89).
- Yokoo T, Kamimura K, Suda T, Kanefuji T, Oda M, Zhang G *et al*. Novel electric power-driven hydrodynamic injection system for gene delivery: safety and efficacy of human factor IX delivery in rats. *Gene Therapy* 2013; **20**: 816–823.
- Marie C, Vandermeulen G, Quiviger M, Richard M, Pr at V, Scherman D. pFARS, Plasmids free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cells. *J Gene Med* 2010; **12**: 323–332.
- Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charriol O, Airiau M *et al*. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 3792–3798.
- Bloquel C, Fabre E, Bureau MF, Scherman D. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *J Gene Med* 2004; **6**: S11–S13.
- Valstar MJ, Ruijter GJG, van Diggelen OP, Poorthuis BJ, Wijburg FA. Sanfilippo syndrome: a mini-review. *J Inherit Metab Dis* 2008; **31**: 240–252.
- Oussoren E, Brands MMMG, Ruijter GJG, van der Ploeg AT, Reuser AJJ. Bone, joint and tooth development in mucopolysaccharidoses: relevance to therapeutic options. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1812**: 1542–1556.
- Valstar MJ, Neijs S, Bruggenwirth HT, Olmer R, Ruijter GJG, Wevers RA *et al*. Mucopolysaccharidosis Type IIIA: clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Ann Neurol* 2010; **68**: 876–887.
- Ruzo A, Marco S, Garcia M, Villacampa P, Ribera A, Ayuso E *et al*. Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Hum Gene Ther* 2012; **23**: 1237–1246.
- Ruzo A, Garcia M, Ribera A, Villacampa P, Haurigot V, Marco S *et al*. Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Ther* 2012; **20**: 254–266.
- Sorrentino NC, D'Orsi A, Sambri I, Nusco E, Monaco C, Spanpanato C *et al*. A highly secreted sulphamidase engineered to cross the blood-brain barrier corrects brain lesions of mice with mucopolysaccharidoses type IIIA. *EMBO Mol Med* 2013; **5**: 675–690.
- McIntyre C, Byers S, Anson DS. Correction of mucopolysaccharidosis type IIIA somatic and central nervous system pathology by lentiviral-mediated gene transfer. *J Gene Med* 2010; **12**: 717–728.
- Langford-Smith A, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Holley RJ, Sergijenko A, Howe SJ *et al*. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Ther* 2012; **20**: 1610–1621.
- Savas PS, Hemsley KM, Hopwood JJ. Intracerebral injection of sulfamidase delays neuropathology in murine MPS-IIIa. *Mol Genet Metab* 2004; **82**: 273–285.
- Hemsley KM, Norman EJ, Crawley AC, Auclair D, King B, Fuller M *et al*. Effect of cisternal sulfamidase delivery in MPS IIIA Huntaway dogs – a proof of principle study. *Mol Genet Metab* 2009; **98**: 383–392.
- Delgadoillo V, del Mar O'Callaghan M, Artuch R, Montero R, Pineda M. Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J Inherit Metab Dis* 2011; **34**: 1039–1045.
- Piotrowska E, Jakobkiewicz-Banecka J, Maryniak A, Tytki-Szymanska A, Puk E, Liberek A *et al*. Two-year follow-up of Sanfilippo disease patients treated with a genistein-rich isoflavone extract: assessment of effects on cognitive functions and general status of patients. *Med Sci Monit* 2011; **17**: 196–202.
- de Ruijter J, Valstar MJ, Narajczyk M, Wegrzyn G, Kulik W, Ijlst L *et al*. Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. *Ann Neurol* 2012; **71**: 110–120.
- Tardieu M, Z erah M, Husson B, de Bournonville S, Deiva K, Adamsbaum C *et al*. Intracerebral administration of AAVrh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with MPSIIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum Gene Ther* 2014; **25**: 506–516.
- Bhaumik M, Muller VJ, Rozaklis T, Johnson L, Dobrenis K, Bhattacharyya B *et al*. A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology* 1999; **9**: 1389–1396.
- Neufeld EF, Fratantoni J-C. Inborn errors of mucopolysaccharide metabolism. Faulty degradative mechanisms are implicated in this group of human diseases. *Science* 1970; **169**: 141–146.
- Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 1999; **6**: 1258–1266.
- Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, Takakura Y. Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med* 2004; **6**: 584–592.
- H eron B, Mikaeloff Y, Froissart R, Caridade G, Maire I, Caillaud C *et al*. Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. *Am J Med Genet* 2010; **155A**: 58–68.
- Vogler C, Levy B, Grubb JH, Galvin N, Tan Y, Kakkis E *et al*. Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 14777–14782.
- Osborn MJ, McElmurry RT, Lees CJ, DeFeo AP, Chen Z-Y, Kay MA *et al*. Minicircle DNA-based gene therapy coupled with immune modulation permits long-term expression of a-L-Iduronidase in mice with mucopolysaccharidosis type I. *Mol Ther* 2011; **19**: 450–460.
- Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH, Neufeld EF. Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIb. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 1902–1907.
- Arfi A, Richard M, Gandolphe C, Bonnefont-Rousselot D, Th erond P, Scherman D. Neuroinflammatory and oxidative stress phenomena in MPS IIIA mouse model: the positive effect of long-term aspirin treatment. *Mol Genet Metab* 2011; **103**: 18–25.
- Riu E, Chen Z-Y, Xu H, He C-Y, Kay MA. Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression *in vivo*. *Mol Ther* 2007; **15**: 1348–1355.
- Gracey Maniar LE, Maniar JM, Chen ZY, Lu J, Fire AZ, Kay MA. Minicircle DNA vectors achieve sustained expression reflected by active chromatin and transcriptional level. *Mol Ther* 2013; **21**: 131–138.
- Lu J, Zhang F, Xu S, Fire AZ, Kay MA. The extragenic spacer length between the 5' and 3' ends of the transgene expression cassette affects transgene silencing from plasmid-based vectors. *Mol Ther* 2012; **20**: 2111–2119.
- Vogler C, Levy B, Galvin NJ, Thorpe C, Sands MS, Barker JE *et al*. Enzyme replacement in murine mucopolysaccharidosis type VII: neuronal and glial response to β -glucuronidase requires early initiation of enzyme replacement therapy. *Pediatr Res* 1999; **45**: 838–844.
- Urayama A, Grubb JH, Sly WS, Banks WA. Developmentally regulated mannose 6-phosphate receptor-mediated transport of a lysosomal enzyme across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 12658–12663.
- Urayama A, Grubb JH, Sly WS, Banks WA. Mannose 6-p phosphate receptor-mediated transport of sulfamidase across the blood-brain barrier in the newborn mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **16**: 1261–1266.
- Wang D, Zhang W, Kalfa TA, Grabowski G, Davies S, Malik P *et al*. Reprogramming erythroid cells for lysosomal enzyme production leads to visceral and CNS cross-correction in mice with Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 19958–19963.
- Rozaklis T, Beard H, Hassiotis S, Garcia AR, Tonini M, Luck A *et al*. Impact of high-dose, chemically modified sulfamidase on pathology in a murine model of MPS IIIA. *Exp Neurol* 2011; **230**: 123–130.
- Bhattacharyya B, Gliddon B, Beccari T, Hopwood JJ, Stanley P. A novel missense mutation in lysosomal sulfamidase in the basis of MPS III A in a spontaneous mouse mutant. *Glycobiology* 2001; **11**: 99–103.
- Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 1735–1737.
- Karpova EA, Voznyi YV, Keulemans JLM, Hoogeveen AT, Winchester B, Tsvetkova IV *et al*. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type A (MPS IIIA). *J Inherit Metab Dis* 1996; **19**: 278–285.
- Bloquel C, Trollet C, Pradines E, Seguin J, Scherman D, Bureau MF. Optical imaging of luminescence for *in vivo* quantification of gene electrotransfer in mouse muscle and knee. *BMC Biotechnol* 2006; **6**: 16.
- Richard M, Arfi A, Seguin J, Gandolphe C, Scherman D. Widespread biochemical correction of murine mucopolysaccharidosis type VII pathology by liver hydrodynamic plasmid delivery. *Gene Therapy* 2009; **16**: 746–756.

Supplementary Information accompanies this paper on Gene Therapy website (<http://www.nature.com/gt>)