



HAL
open science

Exploiter la thérapie génique ciblant le foie pour traiter des pathologies hépatiques et extra-hépatiques

Louisa Jauze

► **To cite this version:**

Louisa Jauze. Exploiter la thérapie génique ciblant le foie pour traiter des pathologies hépatiques et extra-hépatiques. Santé. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1045 . tel-04544726

HAL Id: tel-04544726

<https://theses.hal.science/tel-04544726>

Submitted on 13 Apr 2024

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.



Numéro d'ordre NNT : 2021LYSE1045

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

réalisée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie moléculaire intégrative et cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 19 mars 2021 par :

Louisa Jauze

EXPLOITER LA THERAPIE GENIQUE CIBLANT LE FOIE POUR TRAITER DES PATHOLOGIES HEPATIQUES ET EXTRA-HEPATIQUES

Devant le jury composé de :

NICOLINO, Marc	MD/PUPH	Hospices civils de Lyon	Président
DALKARA, Deniz	PhD/CR1,HDR	UMR S968	Rapporteur
PARADIS, Valérie	MD,PUPH	UMR114	Rapporteur
LABRUNE, Philippe	MD/PUPH	Hôpital Antoine Béchère	Examineur
RONZITTI, Giuseppe	PhD/CR1,HDR	UMR 951	Examineur
RAJAS, Fabienne	PhD/DR2	UMRS U1213	Directrice de thèse
MITHIEUX, Gilles	PhD/DRCE	UMRS U1213	Invité

**EXPLOITER LA THERAPIE GENIQUE CIBLANT
LE FOIE POUR TRAITER DES PATHOLOGIES
HEPATIQUES ET EXTRA-HEPATIQUES**

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie Doyenne	Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud-Charles Mérieux Doyenne	Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est Doyen	M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice: Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN UFR
Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, les Dr Dalkara, Paradis, Labruno, Nicolino et Ronzitti, pour leur disponibilité et d'avoir accepté de participer à mon jury. J'espère que vous trouverez mon sujet de recherche aussi intéressant qu'il m'a passionné. Je remercie tout particulièrement les Dr Deniz Dalkara et Valérie Paradis d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, d'avoir pris le temps de lire, d'évaluer et de commenter mon manuscrit de thèse. Merci au Dr Philippe Labruno d'avoir également participé à mes Comités de suivi de thèse. Vos conseils scientifiques et para-scientifiques, ainsi que votre bienveillance continue, m'ont été précieux durant ces années.

Je remercie également les associations AFG et Gen&Zic, pour leurs investissements personnels et financiers dans les projets développés dans cette thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement les patients GSDI et GSDIII que j'ai eu la chance de rencontrer lors des Journées des patients de l'AFG. Les témoignages que j'ai pu écouter à ces occasions ont donné un sens à mon travail et aux efforts quotidiens. Le courage dont font preuve les parents et les patients que j'ai pu rencontrer sont un exemple, une source de motivation, et m'ont poussée à fournir toujours plus d'efforts, et à aller toujours plus loin.

Merci à Fabienne et Giuseppe de m'avoir guidée pendant ces 3,5 années ! Fabienne, tu es une formidable directrice de thèse, présente et à l'écoute. Merci pour ta disponibilité, ta compréhension et tous les conseils que tu as su me prodiguer tout au long de cette thèse. Je te remercie également pour tout le temps que tu as passé à relire, critiquer et commenter cette thèse, mes diverses présentations, et tout une panoplie d'abstracts et de rapports ! En plus de tes qualités en tant que directrice de thèse, tu es également très drôle et amusante. Cela fait du bien quand on est en thèse ! Giuseppe, je te remercie pour tout le temps que tu m'as consacré, et on peut dire que cela ne se compte pas en minutes... Mais surtout, merci pour toutes les discussions scientifiques, les critiques constructives, les conseils, les hypothèses qui s'avèrent plus ou moins vraies, les retours en arrière, les changements de priorité... Bref, tout ce que l'on rencontre en recherche et dans un labo au quotidien. A vous deux, vous m'avez montré les diverses facettes d'un chercheur et je ne saurais vous en remercier assez. Vous m'avez donné envie de continuer dans cette voie, et j'espère être à la hauteur de ce que vous m'avez appris. Merci de m'avoir confié les projets sur lesquels j'ai travaillé, et de m'avoir fait confiance pour les mener à bien.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire U1213, « Nutrition, diabète et cerveau ». Merci de l'accueil que chacun et chacune m'ont donné. Il y a dans ce laboratoire une bienveillance que l'on ressent presque immédiatement. Merci à Gilles Mithieux de m'avoir accueillie dans son laboratoire, et d'avoir accepté que je ne sois que rarement sur place. Merci pour tous les commentaires sur mes présentations en réunions de labo, tant au niveau de la langue que d'un point de vue scientifique ! Merci à Marie-Ange pour toute la gestion des réservations de billets, les remboursements, etc., ton franc-parler et ton humour ! Merci à Alexane, Vincent, Marine, Cécile et Carine pour toutes les manip et le soin aux animaux. Votre apport à cette thèse est plus que conséquent ! Alexane et Vincent, je ne sais pas comment j'aurais fait sans vous ! J'aurai probablement dû déménager une partie de l'année à Lyon !! Merci également à Laure, Judith et Justine pour leur sympathie, les sorties glaces dans le vieux Lyon et leur gentillesse.

Je remercie également tous les membres du laboratoire IMF au Genethon. La liste est longue ! Merci à Federico Mingozzi qui m'a accueillie dans son laboratoire du Genethon dans un premier temps,

et merci pour les éclairages scientifiques apportés lors des lab meetings et autres Journal club. Merci à Patrice, évidemment, pour tout ce que tu m'as appris, ta rigueur, mais aussi ton soutien et pour tous les TGIFs, les fous-rires, les cafés noisette... Travailler avec toi a été un plaisir, j'espère que nous aurons l'occasion de travailler de nouveau ensemble dans le futur. Merci à la team : Pauline, Justine, Coralie et Pierre-Romain. Nos cafés « ambiance covid » sont les seules pauses et moments de détente que j'ai eu en ces temps d'écriture de thèse... Votre humour et votre fraîcheur m'ont tellement fait du bien !! Je vous remercie pour ces moments, le chocolat et le café, mais aussi pour votre disponibilité, votre soutien et votre compréhension. Vous êtes tous des personnes formidables et j'espère que l'on ne se perdra pas de vue, car je vous apprécie énormément. J'ai hâte de pouvoir vous retrouver autour d'un barbecue dans la nouvelle maison de PV&PV. Merci à Jérémy, mon voisin de bureau pour nos discussions, qui peuvent s'avérer très longues !, nos rires... et les carrés et de chocolat (il y a beaucoup trop de chocolat dans ce labo...) ! Gracias à Valle, ta vie est une succession d'aventures et de drôleries qui m'ont beaucoup fait rire ces derniers temps !! Merci à Séverine pour les manips, mais surtout pour les discussions bébé ! Je pense également à Antoine et Lindsay, que je connais peu, mais qui sont très sympathiques et j'ai hâte de travailler encore un peu plus longtemps avec vous. Antoine ton humour bien particulier fait du bien ! Lindsay, merci pour ta gentillesse et pour les biscuits et bonbons ! Je remercie évidemment Fanny, pour sa gentillesse légendaire, sa disponibilité, ses conseils, le nombre de fois où tu as contrôlé mes gradients de césium pour la purif des AAVs, et ta gestion du labo. Je remercie également Christian pour sa disponibilité, sa gentillesse et sa bienveillance également légendaire (décidément !) et tous les conseils sur les elisa, le FIX, la gestion du L2, etc. Merci pour le temps que tu m'as consacré et pour ce que tu m'as appris. Merci à Béran, pour ton franc-parler et ton humour qui sont un vrai vent de fraîcheur !! Grazie à Isabella, Tiziana et Novella pour leur bonne humeur. Isabella tu m'as tellement aidée lors de ma grossesse pour toutes mes manips ! Je ne saurai te remercier assez. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi, tu es toujours de bonne humeur et très drôle ! Hyperdisponible, j'espère que je ne t'ai pas trop mené la vie dure et que tu as également apprécié de travailler avec moi. Tiziana tu as toujours le sourire aux lèvres, c'est tellement agréable de travailler avec toi ! A Novella, ti ringrazio per gli caffè e le discussioni su di Alice, e di Napoli. Parlare con te mi porta un pò di sole d'Italia !

Évidemment, mon plus grand remerciement revient à ma famille. Merci à ma mère, Corine, qui a toujours cru en moi, et qui je le sais est fière de moi. Merci de m'avoir donné l'éducation que j'ai reçue, de m'avoir données les clés qui m'ont permis d'être ici aujourd'hui et de saisir toutes les opportunités que j'ai rencontrées, y compris quand cela impliquait une année à l'étranger, ou des études dans des villes éloignées. Tu es un soutien sans faille. Je sais que si aujourd'hui je passe une thèse c'est en grande partie grâce à toi ! Je sais les sacrifices que tu as fait pour nous trois, et je sais que je te montre rarement ma gratitude... Je profite de ces remerciements pour le faire. Je t'aime. Merci à mes sœurs, Anne-Lyse et Lucie, qui ont toujours été fières, peut-être un peu impressionnées et surprises de leur petite sœur, cet énergumène familial qui fait de la science... Quelle idée ! Nous ne voyons pas assez, mais sachez que je vous aime énormément, vous êtes des modèles pour moi. A ma grand-mère, maminou, Claudine, un grand merci pour tes petits plats, tes pulls tricotés pour Alice, tes appels du Pays Merveilleux qu'est Aston et surtout, surtout, tes petites piques sur « il faut bien que les vacances finissent ! ». Papy, j'aurai aimé que tu sois encore là pour lire ces mots. Je t'aime tellement, tu m'as enseigné tellement de choses que je ne peux en faire la liste ici. Tu seras toujours dans mon cœur.

Je remercie également mes amis Joanna, Camille, Sarah et Mehdi, toute la bande erasmus, et mes amis bordelais. Joanna, tu sais que je t'adore. Ton honnêteté est rare, surtout ne change pas. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi, et tu as fait beaucoup. Ton soutien m'a énormément aidée. A l'instant où j'écris ces mots, tu vis une période difficile. J'espère pouvoir être à la hauteur, et te donner

la même assistante et la même écoute que toi. Ne sous-estime pas ta force et ton courage. Je vous embrasse toi, Romain et Valentin. Camille, ah Camille ! Tu es une tornade. Tellement drôle ! Tu chamboules tout sur ton passage, ce qui est sûr c'est qu'une fois que l'on t'a rencontrée, on ne peut pas t'oublier !! Je te remercie pour tous les conseils de future maman, toutes nos discussions, et ton aide dans les moments difficiles. Tu ne te rends pas compte à quel point tu m'as aidée. Merci pour tout. Je te souhaite tout le bonheur possible avec Antoine et Auguste.

Enfin, je remercie Enzo et Alice. Enzo, pour ton soutien et ta présence. Ces dernières semaines (ces derniers mois), tu t'es occupé de tout quasiment tout seul. Merci d'avoir pris soin de moi en ces temps de fin de thèse, merci pour les petits plats et les petites attentions. Tu cherches toujours à me changer les idées, à me faire voir le bon côté des choses, à relativiser... même si je râle et que je te dis que je dois travailler, ces moments de détente me sont très précieux. Je ne sais pas si j'aurai pu me consacrer à cette thèse autant que je l'ai fait sans toi. Sache que je serai toujours là pour toi, inconditionnellement. Et surtout, merci de t'occuper aussi bien d'Alice. Alice, ma chérie, mon rayon de soleil, tu as changé ma vie du jour au lendemain. Tu es ma plus belle réussite. Ton sourire suffit à embellir une journée. Cela dit, je ne te remercie pas pour les nuits blanches, l'angoisse de mal faire, et les doutes sur ma qualité de maman ! J'ai hâte de te voir grandir et de te voir découvrir le monde. Tout ce que je fais, tous les jours, c'est pour toi. Je t'aime.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	8
Abstract.....	9
Abréviations.....	10
Liste des figures et des tables.....	13
AVANT-PROPOS	15
INTRODUCTION	17
I. LA THERAPIE GENIQUE.....	18
A. Thérapie génique <i>ex vivo</i> ou thérapie génique <i>in vivo</i>	18
B. Les vecteurs de thérapie génique	19
II. LA THERAPIE GENIQUE CIBLANT LE FOIE PAR LES VECTEURS ADENO-ASSOCIES	21
A. Le foie, structure et fonctions.....	21
1) Architecture et organisation tissulaire hépatique	21
2) Les rôles du foie dans l'organisme	24
3) Atteinte de l'architecture du foie : la fibrogenèse hépatique.....	25
B. L'AAV : un vecteur de choix pour la thérapie génique <i>in vivo</i>	27
1) L'AAV sauvage	27
2) Vecteurs AAV recombinants.....	28
C. Intérêts du foie en tant que cible de thérapie génique par les vecteurs AAV	30
1) Le foie est un organe fortement vascularisé	30
2) La tolérance du transgène grâce à son expression hépatique	31
3) Le foie en tant que bio-usine.....	32
D. Les contraintes actuelles de la thérapie génique par les vecteurs AAV	33
1) Immunogénicité.....	33
2) Efficacité et niveaux d'expression thérapeutiques	35
3) Capacité d'encapsulation de l'AAV.....	37
4) Quantité de vecteur à produire	38
III. EXEMPLES DE PATHOLOGIES HEPATIQUES ET EXTRA-HEPATIQUES POUVANT ETRE TRAITÉES PAR DES AAV RECOMBINANTS CIBLANT LE FOIE	40
A. Les glycogénoses : exemples de la glycogénose de type Ia et de la glycogénose de type III....	40
1) Le glycogène.....	40
2) Le métabolisme hépatique du glycogène et du glucose	41
3) Les glycogénoses.....	44

4) Les glycoséses de type I	45
5) La glycosésse de type III	53
B. L'hypophosphatémie liée au chromosome X	57
1) Le métabolisme osseux	57
2) Aspects génétiques et métaboliques	58
3) Tableau clinique et prise en charge	60
4) Les approches de thérapie génique pour l'hypophosphatémie liée l'X	61
OBJECTIFS	62
MATERIELS ET METHODES	65
A. Production des vecteurs viraux AAV recombinants	66
1) Clonages des plasmides et vecteurs AAV utilisés	66
2) Méthode de production des AAV recombinants	67
3) Titration des AAV recombinants	67
B. Expériences <i>in vivo</i>	67
1) Modèles animaux	67
2) Test du « wire hang »	68
3) Mesure du glucose sanguin	69
4) Mesure des paramètres plasmatiques ASAT, ALAT, AFP	69
5) Traitement à la rapamycine	69
C. Analyse des tissus	69
1) Lyse des tissus et dosage des protéines	69
2) Analyses histologiques et par microscopie électronique à transmission	70
3) Analyse par Western Blot	70
4) Quantification du glycogène	71
5) Activité glucose-6-phosphatase	71
6) Quantification des lipides	72
7) Evaluation de l'expression du facteur IX	72
8) Quantification du nombre de copies de vecteur	72
9) Extraction d'ARN et quantification des ARNm	72
10) Evaluation de la réponse immunitaire	73
D. CALCULS STATISTIQUES	73
RESULTATS	74
I. THERAPIE GENIQUE PAR LES VECTEURS AAV CIBLANT LE FOIE POUR LA GSD Ia ET LA GSD III	75
A. Les défis de la thérapie génique pour la GSD Ia et la GSD III	75
1) Transduire un foie prolifératif	75
2) Pré-traiter les foies pour améliorer la transduction des hépatocytes	76

3) Cibler plusieurs tissus.....	77
B. Essais de thérapie génique par vecteur AAV pour la GSD Ia et efficacité sur la correction de la pathologie hépatique à long-terme.....	91
1) Etude de la perte d'expression du transgène au cours du temps chez les souris L.G6pc ^{-/-} ..	91
2) Choix des vecteurs AAV permettant de corriger l'activité glucose-6 phosphatase dans le foie des souris L.G6pc ^{-/-} ..	92
3) Etude de l'efficacité à long-terme des différents vecteurs ..	95
4) Etude de l'efficacité des différents vecteurs sur la prévention du développement de tumeurs hépatiques.....	97
C. THERAPIE GENIQUE PAR AAV CIBLANT LE FOIE POUR LA GLYCOGENOSE DE TYPE III	101
1) Caractérisation des dommages hépatiques et de la tumorigénèse dans la GSD III	101
2) Stratégies de thérapie génique pour la GSD III	109
II. THERAPIE GENIQUE PAR LES VECTEURS AAV CIBLANT LE FOIE POUR L'HYPOPHOSPHATEMIE LIEE AU CHROMOSOME X.....	118
A. Contexte de la publication : utilisation du foie en tant que bio-usine	118
B. Publication.....	119
CONCLUSION ET DISCUSSION.....	155
REFERENCES.....	164
ANNEXES.....	174
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	177
A. Articles de recherche.....	178
B. Revue	178
C. Thèse d'exercice.....	178
D. Communications orales	178
E. Communications affichées	179
F. Communications "grand public"	179
G. Brevets.....	179

Résumé

Exploiter la thérapie génique ciblant le foie pour traiter des pathologies hépatiques et extra-hépatiques

La thérapie génique ciblant le foie est une technologie innovante qui présente de nombreux intérêts, notamment pour le traitement de maladies monogéniques. Les virus adéno-associés recombinants (rAAV) sont de très bons vecteurs pour exprimer un « gène médicament », en particulier dans le foie. Cependant, l'efficacité de la thérapie génique peut être diminuée dans les situations où le foie est endommagé et/ou en prolifération. De même, certaines pathologies nécessitent le traitement d'autres tissus peu ciblés par les rAAV, tels que les muscles squelettiques, les reins ou les os. Dans cette thèse, nous avons développé des approches de thérapie génique ciblant le foie pour trois maladies rares sans traitement curatif afin de relever ces défis.

Les glycogénoses de type Ia (GSDIa, mutation du gène *G6PC*) et de type III (GSDIII, mutation du gène *AGL*) sont des maladies rares qui se caractérisent par une accumulation anormale de glycogène au niveau du foie, associée respectivement à une stéatose ou une fibrose hépatique modifiant l'architecture du foie. De plus, le glycogène s'accumule aussi dans les reins, ce qui mène à une maladie rénale dans la GSDIa, ou les muscles squelettiques, résultant à une perte de la force musculaire dans la GSDIII.

Dans un premier temps, nous avons pu confirmer une perte du transgène au cours du temps dans les modèles animaux de la GSDIa et de la GSDIII, probablement en raison de la prolifération des hépatocytes. Grâce à un vecteur AAV9 exprimant le gène *G6PC* sous le contrôle du promoteur hépatique de l'alpha antri-trypsine humaine (hAAT), nous avons obtenu une correction à long-terme de la pathologie hépatique de la GSDIa, incluant le maintien de la glycémie mais aussi la prévention du développement tumoral.

Pour la GSDIII, nos résultats mettent en évidence que l'efficacité de la transduction des foies GSDIII n'est pas impactée par la fibrose. La taille du gène *AGL* ne permet pas de l'encapsider dans un unique AAV, aussi, nous avons utilisé deux AAV exprimant l'enzyme débranchante du glycogène (GDE) après recombinaison homologue. Grâce à l'utilisation d'un promoteur hybride, nous avons corrigé complètement le foie et le cœur, et partiellement les muscles squelettiques. Un prétraitement des animaux par la rapamycine, connue pour activer l'autophagie, a permis d'augmenter l'expression de GDE dans les muscles.

Dans la troisième étude, nous avons mis au point une thérapie pour l'hypophosphatémie liée au chromosome X (XLH), pathologie dans laquelle la surexpression du facteur de croissance du fibroblaste 23 (FGF-23) conduit à une fuite du phosphate dans les urines, et à un défaut de minéralisation des tissus osseux. Plutôt que de cibler les reins ou les os, nous avons choisi de cibler le foie grâce à un AAV, afin d'exprimer et de sécréter dans la circulation une molécule capable de se fixer au récepteur du FGF-23 et qui se comporte comme un compétiteur du FGF-23 endogène. Cette approche a permis de corriger le défaut de minéralisation et la croissance, dans un modèle murin de la pathologie.

En conclusion, nous avons développé des approches de thérapie génique utilisant l'AAV pour cibler le foie afin de développer des thérapies pour des pathologies hépatiques et extra-hépatiques rares. Pour la GSDIa, nous avons obtenu une correction du phénotype hépatique permettant de prévenir le développement de tumeur. Dans la GSDIII, l'utilisation d'un promoteur tandem nous a permis de corriger le foie, le cœur, et les muscles squelettiques en association avec un traitement à la rapamycine. Enfin, nous avons développé une stratégie utilisant le foie en tant que bio-usine afin de bloquer l'action néfaste du FGF-23 endogène sur la minéralisation osseuse. Ainsi, en nous adaptant au contexte physiopathologique de chaque maladie, la thérapie génique ciblant le foie nous a permis de corriger des pathologies dans lesquelles le foie est endommagé et prolifératif, et dans lesquelles d'autres tissus que le foie sont atteints.

Mots-clés : thérapie génique, AAV, foie, muscles, glycogénose, XLH, fibrose, tumeurs hépatiques

Abstract

Taking advantage of liver gene transfer to treat hepatic and non-hepatic disorders

Many preclinical studies and clinical trials indicated the recombinant adeno-associated virus vectors (rAAV) as an established technology to transfer genetic material to the liver. rAAVs are the vectors of choice especially for monogenetic diseases that require liver targeting. Despite this, there are still some challenges to overcome in order to broaden the reach of liver gene transfer. An important limitation of gene therapy is the relatively low information on the gene transfer stability, in particular in diseases with liver degeneration and increased hepatocyte proliferation. In addition to that, the transduction of some tissues – such as skeletal muscle, kidneys and bones – may require high vector doses that are associated to unwanted toxicities. Here, we developed liver gene therapy strategies for three diseases without curative treatment available and displaying one or more of these limits.

Glycogen storage disease type Ia (GSDIa) and type III (GSDIII), due to mutations in the *G6PC* and *AGL* gene, respectively, are rare diseases characterized by abnormal glycogen accumulation in the liver and associated to hepatic degeneration. Glycogen also accumulates in the kidneys, leading to a chronic kidney disease in GSDIa, or in the muscles, resulting in cardiac function and muscle strength impairment in GSDIII.

By using a reporter gene, we confirmed transgene expression loss overtime in the animal models of GSDIa and GSDIII, probably due to the proliferative state of the liver and the consequent transgene dilution. Using an AAV9 vector expressing *G6PC* under the human alpha anti-trypsin promoter (hAAT), we obtained a long-term correction of the hepatic disease in GSDIa, including the maintenance of glycemia and the prevention of tumor development.

In GSDIII, our results indicate that liver transduction is not impacted by hepatic fibrosis. Because the *AGL* gene size exceeds the AAV packaging capacity, we used a dual AAV system that allows to express the full length glycogen debranching enzyme (GDE), the protein encoded by *AGL*, after recombination. Using a liver-muscle hybrid promoter, we efficiently transduced the liver, heart, and skeletal muscles. Importantly, combination of AAV gene therapy and rapamycin, a known autophagy inducer, resulted in increased GDE expression in the skeletal muscle.

Finally, we developed an AAV liver gene transfer approach for X-linked hypophosphatemia (XLH). XLH is a disorder due to increased expression of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in bones. Enhanced FGF23 signaling in kidney leads to phosphate wasting and is thought to be the main cause of the mineralization defects observed in bones of XLH patients. Instead of targeting the kidneys or the bones, which are refractory to AAV, we chose to use the liver as a biofactory to express and secrete a molecule acting as a FGF23 competitor for the binding to its receptor in the kidneys. This strategy was successful in correcting the mineralization defect and the growth impairment in a murine model of XLH.

This research work highlights some of the potential solutions to overcome the current limitations to gene transfer with AAV vectors. The results obtained support the future clinical translation of the approaches described and further broaden the application of AAV gene transfer to diseases that were never addressed by this technology thus providing alternative solutions to address unmet medical needs and expand patients' access to the treatment.

Keywords: gene therapy, AAV, liver, muscles, glycogen storage disease, XLH, fibrosis, tumors

Abréviations

A

AAP	Protéine activatrice de l'assemblage
AAV	Virus adéno-associé
ACTA2	Actine α des muscles lisses
ADA-SCID	Déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFP	Alpha-fœtoprotéine
AGL	Amylo- α 1,6-glucosidase, 4- α -glucanotransférase
AHC	Adénome hépatocellulaire
ALAT	Alanine aminotransférase
AP	Phosphatase alcaline
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférent
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATF6	Facteur de transcription 6 de la famille des ATF
ApoE	Apolipoprotéine E

B-C

BCA	Test de l'acide bicinchoninique
bGH	Hormone de croissance bovine
BMP	Protéines morphogéniques osseuses
CBA	Beta actine du poulet
cFGF-23	Compétiteur du facteur de croissance du fibroblaste 23
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CSH	Cellules stellaires hépatiques
CMV	Cytomégalovirus
COL-1a	Chaîne 1 du collagène

D-E-F

dsAAV	AAV double brin
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
EMA	Agence européenne du médicament
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FGF-23	Facteur de croissance du fibroblaste 23
FGFR	Récepteur du facteur de croissance du fibroblaste

G

G1P	Glucose-1-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
G6PC	Sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase
G6PT	Sous-unité transporteur de la glucose-6-phosphatase
GAA	Alpha-1,4-glucosidase acide
GBE	Enzyme branchante du glycogène
GDE	Enzyme débranchante du glycogène
GLUT-2	Transporteur de glucose 2
GSD	Glycogénose
GYS1	Isoforme 1 de la glycogène synthase
GYS2	Isoforme 2 de la glycogène synthase

H-I

hAAT	α -1-antitrypsine humaine
HBB2	sous-unité β -2 de l'hémoglobine humaine
HE	Hématoxyline et éosine
HF/HS	Régime alimentaire riche en lipides et en sucres
HEK 293	Cellules embryonnaires humaines de rein 293
hFIX	Facteur de coagulation IX humain
HGFR	Récepteur du facteur de croissance hépatocytaire
hGPE	Promoteur endogène humain de la G6PC
HSPG	Héparane sulfate
ITR	Séquences terminales inversées

L-M

LamR	Récepteur de la laminine
LiMP	Promoteur foie et muscles
MAAP	Protéine accessoire associée à la membrane
MET	Microscopie électronique à transmission
mGPE	Promoteur endogène murin de la G6PC
MMP-1	Métalloprotéase matricielle 1
MMP-2	Métalloprotéase matricielle 2
mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères

N-O-P

NAb	Anticorps neutralisants
NK	Lymphocyte « natural killer »
PAI1	Inhibiteur de l'activateur du plasmogène de type 1

PDGFR	Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PHEX	Homologue de l'endopeptidase régulatrice du phosphate lié à l'X
PTEN	Homologue de la phosphatase et de la tensine
PTH	Parathormone ou hormone parathyroïdienne
R-S-T	
rAAV	Virus adéno-associé recombinant
SNC	Système nerveux central
SV40	Virus simien 40
TBG	Globuline liant l'hormone thyroïdienne
TGF-β	Facteur de croissance transformant β
TLR	Récepteur Toll-like
Treg	Lymphocyte T régulateur
U-V	
UDP	Uridine diphosphate
UPR	Réponse aux protéines mal conformées
UTP	Uridine triphosphate
VG	Génome vectoriel
VGCN	Nombre de copies du génome vectoriel
VIM	Vimentine
X	
XLH	Hypophosphatémie liée au chromosome X

Liste des figures et des tables

Figures

Figure 1: principes de la thérapie génique in vivo et ex vivo	18
Figure 2: anatomie du foie.....	21
Figure 3: organisation tissulaire hépatique.....	22
Figure 4: parenchyme hépatique et organisation au niveau sinusoidal	23
Figure 5: organisation d'un acinus	23
Figure 6: modification du parenchyme hépatique lors du développement de la fibrose hépatique ...	26
Figure 7: carte schématique du génome de l'AAV2.....	27
Figure 8: cycle de vie de l'AAV	28
Figure 9: vascularisation hépatique.....	31
Figure 10: utilisation du foie en tant que bio-usine.....	33
Figure 11: réponses immunitaires après injection d'AAV recombinant	35
Figure 12: la fenêtre thérapeutique pour une thérapie génique par AAV	36
Figure 13: stratégies mettant en jeu deux vecteurs AAV pour surmonter la limite d'encapsidation de l'AAV.....	38
Figure 14: structure d'une molécule de glycogène et ses liaisons intra-moléculaires	40
Figure 15: schéma simplifié de la glycogénogenèse	42
Figure 16 : schéma simplifié de la glycogénolyse	43
Figure 17: schéma simplifié de la néoglucogenèse	44
Figure 18: le couplage fonctionnel de la G6PT (en bleu) et de la G6PC (en rose) forme le complexe enzymatique de la glucose-6 phosphatase	45
Figure 19: dérégulations métaboliques hépatiques suite au déficit en G6PC	48
Figure 20: altérations du métabolisme et modifications des voies de signalisation conduisant au développement de tumeurs dans les hépatocytes GSD Ia.....	49
Figure 21: perte de la correction de la glycémie chez des souris $G6pc^{-/-}$ injectées avec un AAV8-hGPE-hG6PC.	51
Figure 22: perte de la correction de la glycémie chez des souris $G6pc^{-/-}$ injectées avec un AAV8-CBA-hG6PC.	52
Figure 23: dégradation cytosolique du glycogène dans le foie GSD III.....	53
Figure 24: régulation du métabolisme osseux.....	58
Figure 25: structure protéique du FGF-23	58
Figure 26: effets du FGF-23 sur les cellules tubulaires proximales.....	59
Figure 27: conséquences de l'augmentation du FGF-23 circulant dans l'XLH	60
Figure 28: radiographies des membres inférieurs de patients atteints de la maladie XLH	60
Figure 29: évolution de la pathologie hépatique dans la GSD III, caractérisée par l'accumulation de glycogène anormal et par le développement d'une fibrose pouvant évoluer en cirrhose, voir en AHC ou CHC.	76
Figure 30: glomérule et barrière glomérulaire	77
Figure 31: protocole d'évaluation de la transduction de foies de souris GSD Ia et de la persistance d'expression du transgène suivie pendant 9 mois.....	92
Figure 32: évaluation de la perte d'expression du transgène chez les souris $L.G6pc^{-/-}$	92
Figure 33: schéma des différentes constructions évaluées chez le modèle murin GSD Ia.	93
Figure 34: évaluation de l'efficacité, à court terme, des vecteurs AAV9 exprimant la G6PC humaine sous le contrôle de différents promoteurs chez les souris $L.G6pc^{-/-}$	95

Figure 35: suivi à long-terme des souris L.G6pc ^{-/-} injectées avec les vecteurs exprimant le gène G6PC1 sous le contrôle des promoteurs hAAT, hGPE ou mGPE.....	97
Figure 36: suivi à long-terme des souris L.G6pc ^{-/-} injectées avec les vecteurs sous le contrôle des promoteurs hAAT, hGPE et mGPE, dans des conditions accélérant le développement tumoral	98
Figure 37: développement tumoral chez les souris L.G6pc ^{-/-} sous un régime HF/HS après injection d'AAV.....	100
Figure 38: altérations du métabolisme glucidique chez les souris AgI ^{-/-} âgées de 14 mois	102
Figure 39 : altérations du métabolisme lipidique chez les souris AgI ^{-/-} âgées de 14 mois.....	103
Figure 40: analyse des profils d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique chez les souris AgI ^{-/-}	104
Figure 41: étude de la fibrose dans le foie des souris AgI ^{-/-}	106
Figure 42: caractérisation du développement de tumeurs hépatiques chez les souris AgI ^{-/-}	108
Figure 43: observation de la dilatation du réticulum endoplasmique dans les foies AgI ^{-/-}	109
Figure 44: protocole d'évaluation de la transduction de foies de souris GSD III et de la persistance d'expression du transgène.....	110
Figure 45: perte d'expression du transgène dans le foie des souris AgI ^{-/-} au cours du temps	110
Figure 46: protocole de la co-thérapie rapamycine et vecteur AAV9-LiMP-GDE overlapping et interventions.....	111
Figure 47: effet d'un traitement à la rapamycine pendant un mois dans un modèle murin GSD III ..	112
Figure 48: effets de la co-thérapie AAV-rapamycine au niveau hépatique dans un modèle murin de GSD III.....	113
Figure 49: effets de la co-thérapie AAV-rapamycine au niveau cardiaque dans un modèle murin de GSD III.....	114
Figure 50: effets de la co-thérapie AAV-rapamycine au niveau des muscles squelettiques dans un modèle murin de GSD III	115
Figure 51: réponse immunitaire dans un modèle murin de GSD III suite à une co-thérapie AAV-rapamycine.....	116
Figure 52: images représentatives de triceps et de quadriceps de souris AgI ^{-/-} , traitées ou non par thérapie génique associée au traitement par la rapamycine	117
Figure 53: stratégie de thérapie génique pour l'XLH	119

Tables

Table 1: propriétés des principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique.....	20
Table 2: tropisme des principaux sérotypes d'AAV utilisés en thérapie génique	29
Table 3 : types de glycogénoses et gènes en cause	45
Table 4: développement tumoral chez les souris L.G6pc ^{-/-} après administration de vecteurs AAV.....	99
Table 5: fréquence des tumeurs chez les souris AgI ^{-/-} de 14 mois.	107

AVANT-PROPOS

La thérapie génique utilisant les vecteurs dérivés des virus adéno-associés (AAV) pour cibler le foie a obtenu de nombreux succès précliniques et cliniques. Notamment, les essais cliniques pour l'hémophilie A et l'hémophilie B ont montré le potentiel de telles approches dans l'obtention d'une efficacité et d'une expression à long-terme, ainsi que des profils de sécurité rassurants.

De ce fait, cibler le foie, y compris pour des pathologies non hépatiques, apparaît comme une approche prometteuse. Cette approche innovante consiste à utiliser le foie comme une bio-usine sécrétant la protéine déficiente dans la pathologie. Elle a été utilisée avec succès au sein du laboratoire « Immunologie et Maladie du Foie » au Genethon pour la maladie de Pompe, une pathologie neuromusculaire¹, pour laquelle un essai clinique basé sur cette stratégie est en cours (NCT04093349).

Cependant, depuis ces premiers essais fondateurs pour le domaine de la thérapie génique, des problématiques ont émergés.

En particulier, l'une des clés du succès de ces essais est le fait de cibler un foie « sain », alors que dans certaines maladies génétiques le foie est affecté au niveau de son architecture et son fonctionnement général. Qu'en est-il donc d'une thérapie génique ciblant un foie « malade » ?

De plus, dans certaines pathologies, il est nécessaire de cibler le foie et d'autres tissus directement par une expression locale du transgène. Or, par voie systémique, cibler d'autres tissus que le foie, tels que les muscles squelettiques ou les reins, requière de fortes doses d'AAV. Comme nous le détaillerons dans la suite de cette thèse, il est préférable, pour des raisons de réponse immunitaire et de coût/efficacité de production, d'utiliser la dose thérapeutique la plus faible possible. Comment cibler efficacement ces tissus, sans pour autant augmenter la dose ? Dans cette optique, il serait donc intéressant de trouver des stratégies permettant d'augmenter l'efficacité de transduction dans les tissus moins bien transduits par les AAV.

Dans cette thèse, nous proposons d'identifier clairement les limites actuelles de la thérapie génique du foie auxquelles se heurtent les chercheurs et les médecins travaillant dans ce domaine, mais également de tirer avantage du fait de cibler le foie pour développer des approches thérapeutiques pour des pathologies rares sans traitement curatif.

Ainsi, nous avons développé des approches de thérapie génique ciblant le foie grâce à des vecteurs AAV pour des pathologies extra-hépatiques, et des pathologies où le foie est affecté dans son architecture et sa fonction.

En introduction, après des généralités sur la thérapie génique, je présenterai le foie, son architecture, ses principales fonctions, et certaines conditions pathologiques comme le développement d'une fibrose, associées au développement de tumeurs hépatiques. Je détaillerai ensuite les approches de thérapie génique utilisant les vecteurs AAV et les avantages de cibler le foie. Enfin, je terminerai cette introduction par la présentation de trois maladies rares, caractérisées par des atteints hépatiques et extra-hépatiques pouvant être traitées par des vecteurs AAV recombinants : la glycogénose de type Ia, la glycogénose de type III et l'hypophosphatémie liée au chromosome X.

INTRODUCTION

I. LA THERAPIE GENIQUE

A. Thérapie génique *ex vivo* ou thérapie génique *in vivo*

La thérapie génique est une stratégie de développement thérapeutique récente et innovante qui ne cesse de susciter l'intérêt et les espoirs des chercheurs, des médecins, et des patients.

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

- Réintroduire l'expression d'un gène qui est défectueux ou manquant dans la pathologie,
- Réduire l'expression d'un gène dont la surexpression est pathologique,
- Surexprimer un gène pour atténuer les effets négatifs de la pathologie.
- Corriger la séquence d'un gène mis en cause dans la pathologie pour restaurer son expression physiologique ou en atténuer les effets délétères.

Il existe de nombreuses approches, qu'elles soient techniques ou liées à la pathologie ciblée, et de nombreux domaines d'application. Classiquement, on peut distinguer la thérapie génique *ex vivo* et *in vivo*.

- La thérapie génique *ex vivo* consiste à prélever des cellules, par exemple des cellules souches dans le sang ou la moelle osseuse, à les modifier *in vitro* par l'introduction du gène thérapeutique, puis à les cultiver en laboratoire pour en augmenter leur nombre avant de les réintroduire chez le patient (Figure 1).
- Au contraire, dans la thérapie génique *in vivo*, le vecteur contenant le gène d'intérêt est directement injecté chez le patient pour atteindre directement les cellules cibles (Figure 1).

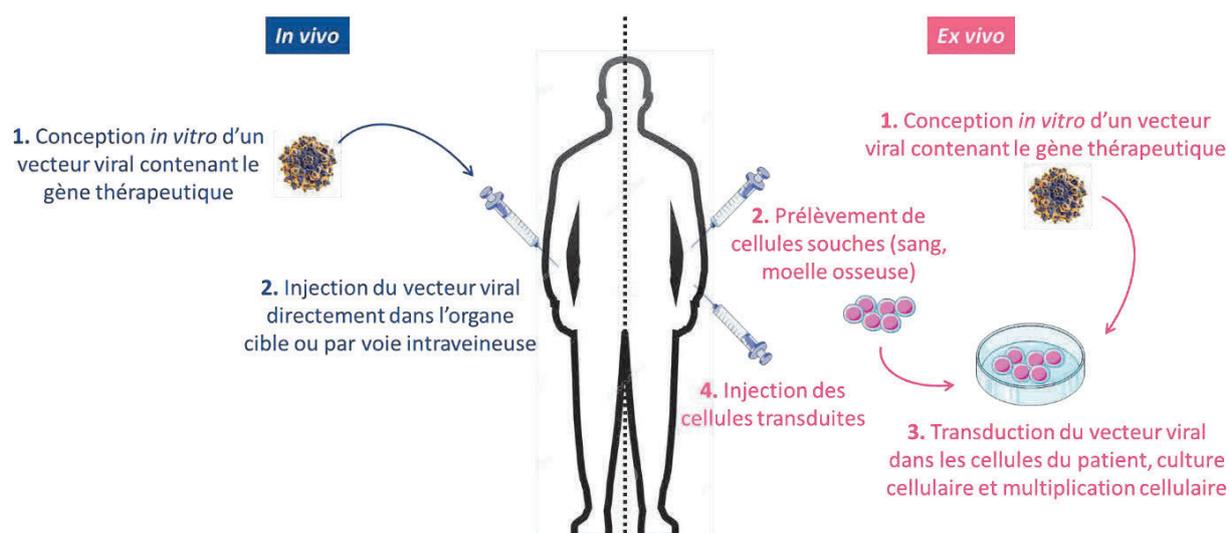


Figure 1: principes de la thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*

La thérapie génique *ex vivo* a l'avantage de permettre un meilleur contrôle des étapes et des vecteurs : la quantité de vecteur utilisée est inférieure, et les vecteurs ne pénètrent que dans les cellules auxquelles ils sont présentés – il n'y a donc pas de dispersion du traitement dans des organes non ciblés.

Dans le cas des maladies génétiques affectant les cellules sanguines, cette stratégie est la plus utilisée. En effet, les cellules sont facilement accessibles par prise de sang. Le premier médicament de thérapie génique *ex vivo*, Strimvelis (développé par GlaxoSmithKline), a été autorisé sur le marché européen en 2016. Il consiste en la transplantation autologue de cellules hématopoïétiques CD34+ isolées chez des patients atteints d'un déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase (ADA-DICS), modifiées par un vecteur de thérapie génique pour qu'elles expriment le gène qui code pour l'adénosine désaminase, l'enzyme déficitaire dans la pathologie.

Néanmoins, cette stratégie n'est pas la plus adéquate pour les pathologies affectant un organe solide. Dans ces cas, l'approche privilégiée est le transfert de gène *in vivo*, par injection du gène vectorisé directement par voie systémique ou dans l'organe à traiter, comme un médicament. De nombreux essais cliniques sont en cours avec cette technique et plusieurs produits ont atteint le stade de la mise sur le marché (Luxturna, développé par Sparks Therapeutics et autorisé en 2018 pour traiter, par injection sous-rétinienne, les patients présentant une perte visuelle due à une dystrophie rétinienne héréditaire ; Zolgensma, développé par Avexis/Novartis et autorisé en 2019 pour traiter par voie systémique l'amyotrophie spinale).

Quelle que soit l'approche privilégiée, le produit thérapeutique doit comporter plusieurs éléments :

- Le transgène et les séquences régulatrices d'expression : c'est la séquence que l'on veut exprimer dans les cellules, classiquement la séquence codante du gène thérapeutique. Des éléments régulateurs sont ajoutés autour de cette séquence afin d'optimiser l'expression du gène dans les cellules, tels qu'un promoteur associé ou non à un « enhancer » qui favorise l'expression du gène dans un tissu donné, une séquence intronique qui stabilise les ARNm (acide ribonucléique messenger) en recrutant les spliceosomes et favorise la sortie des ARNm du noyau vers le cytoplasme pour la traduction², ou un signal de polyadénylation qui permet de stabiliser l'ARN au sein des cellules.
- Le vecteur : c'est l'outil qui va permettre d'administrer le produit thérapeutique et de l'acheminer aux cellules cibles.

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

B. Les vecteurs de thérapie génique

On distingue le plus souvent les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux :

- Les vecteurs non viraux : ce sont des composés synthétiques qui vont protéger leur contenu génétique de la dégradation afin de l'amener à sa cellule cible. Ils présentent plusieurs avantages : ils sont moins coûteux et plus simples à produire que les vecteurs viraux, ils peuvent cibler des cellules en division ou quiescentes, ils n'ont pas de limitation de taille du transgène, ils sont moins immunogéniques que les vecteurs viraux, et ils permettent de cibler spécifiquement un tissu donné grâce à des modifications chimiques.

Ce sont par exemple des polymères cationiques ou des lipides cationiques, qui créent des liaisons électrostatiques avec l'ADN (acide désoxyribonucléique) chargé négativement, ou encore des exosomes qui sont des vésicules sécrétées par les cellules qui vont être utilisés pour véhiculer le matériel génétique jusqu'à sa cible.

Cependant, cette stratégie ne permet pas à ce jour une expression du transgène à long-terme.

- Les vecteurs viraux : les virus sont les entités idéales pour la thérapie génique : leur nature infectieuse leur permet de transporter du matériel génétique à une cellule cible spécifique en le protégeant de la dégradation, de pénétrer dans cette cellule et d'utiliser la machinerie cellulaire afin de répliquer et d'exprimer leur génome viral. Ainsi, la plupart des virus permettent une expression du transgène à long-terme.

Parmi les virus connus à ce jour, seul un faible pourcentage d'entre eux est utilisé en tant que vecteurs de thérapie génique. Les plus utilisés sont les adénovirus, les virus adéno-associés (AAV), et les rétrovirus dont les lentivirus (Table 1). Tous présentent des avantages et des inconvénients, il n'y a pas de vecteur viral idéal, mais la diversité des virus permet de choisir le vecteur le plus adéquat en fonction:

- Du tropisme du virus : que ce soit le type de cellules (en division ou quiescentes) ou le type tissulaire.
- De leur capacité d'intégration : c'est-à-dire la capacité du vecteur à insérer son génome dans l'ADN de l'hôte.
- De leur capacité d'encapsidation : c'est-à-dire la taille maximale du transgène pouvant être encapsidée par le virus.

	Lentivirus	Adénovirus	AAV
Diamètre	80-130 nm	70-90 nm	20-25 nm
Génome	3-9 kb ARN simple brin	36 kb ADN double brin	4,7 kb ADN simple brin
Capacité d'encapsidation	8 kb	7,5 kb	~5 kb
Tropisme cellulaire	Cellules quiescentes et en division	Cellules quiescentes et en division	Cellules quiescentes et en division
Intégration	Oui	Non	Possible
Expression à long-terme	Oui	Modérée	Oui
Réponse immunitaire	Modérée	Forte	Faible

Table 1: propriétés des principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique

Dans cette thèse, seule la thérapie génique *in vivo* utilisant les virus AAV dans le but de cibler le foie sera décrite.

II. LA THERAPIE GENIQUE CIBLANT LE FOIE PAR LES VECTEURS ADENO-ASSOCIES

A. Le foie, structure et fonctions

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

1) Architecture et organisation tissulaire hépatique

Le foie est l'organe abdominal le plus volumineux, il peut représenter jusqu'à 2% du poids corporel chez l'homme adulte (4% chez la souris).

Extrêmement vascularisé, il contient plus de 10% du sang total. Il est alimenté en sang par l'artère hépatique qui apporte de l'oxygène, et par la veine porte qui apporte un sang riche en nutriments provenant du tube digestif, du pancréas et de la rate (voir détails au paragraphe II, C, 1 de l'introduction). Le sang artériel et le sang issu de la veine porte se mélangent au niveau des sinusoides hépatiques. Le sang est ensuite évacué par les veines sus-hépatiques, puis la veine cave inférieure (Figure 2).

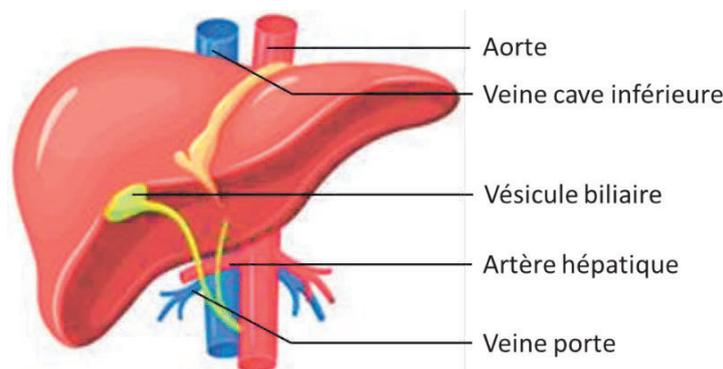


Figure 2: anatomie du foie

Le foie est alimenté en sang par l'artère hépatique qui apporte un sang oxygéné, et par la veine porte qui apporte un sang riche en nutriments. Ces deux apports sanguins se mélangent au niveau des sinusoides hépatiques, puis se déversent dans la veine cave inférieure.

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

Le lobule hépatique est l'unité structurale du foie. De forme hexaédrique, chacun de ses sommets correspond à l'espace porte. L'espace porte comporte une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte, et une branche du canal biliaire. A partir de la veine centro-lobulaire, plusieurs branches radiales d'hépatocytes se déploient en monocouches (Figure 3). Les hépatocytes représentent environ 60% des cellules hépatiques, soit 85% de la masse du foie. Ils ont une fonction

endocrine, en libérant des composés et des hormones dans la circulation sanguine, et une fonction exocrine, la sécrétion de la bile.

Les hépatocytes en monocouche peuvent s'anastomoser, délimitant l'espace sinusoidal.

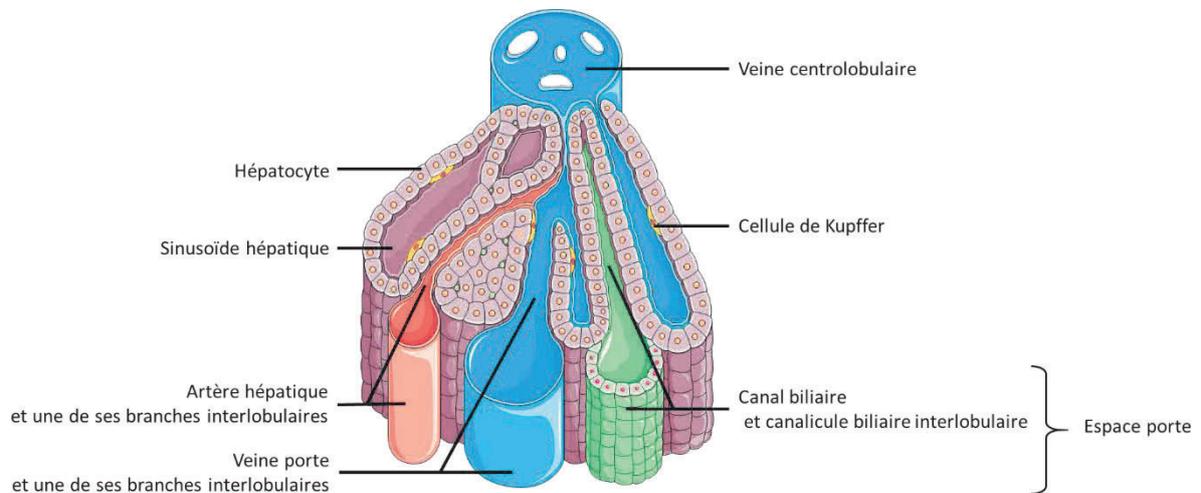


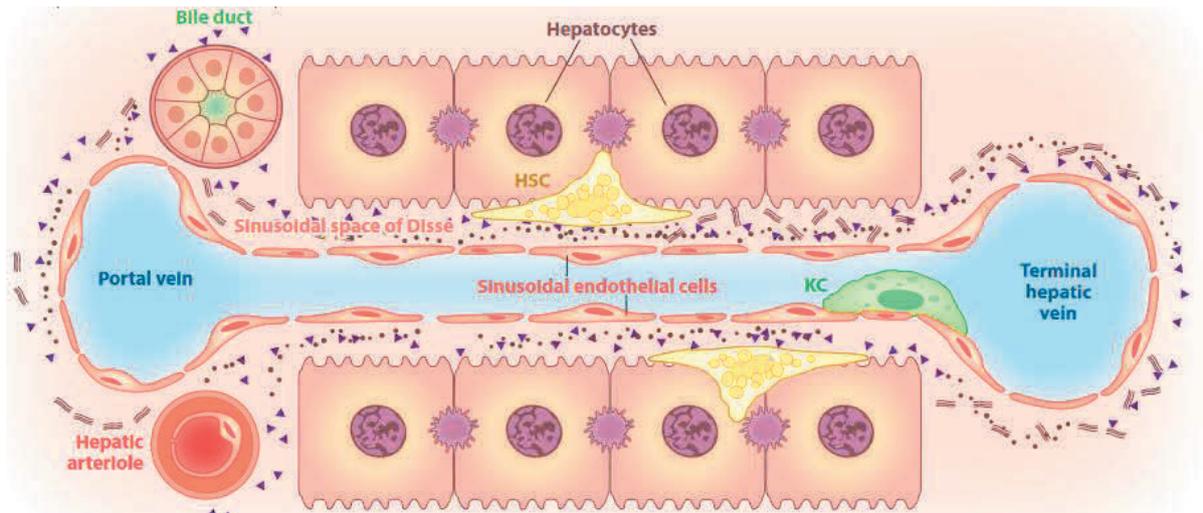
Figure 3: organisation tissulaire hépatique

L'espace porte comprend une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte, et une branche du canal biliaire, à l'opposé desquelles se trouve la veine centrolobulaire qui permet l'évacuation du sang. Entre ces vaisseaux, les hépatocytes sont déployés en rayons monocouches et délimitent le sinusoides hépatique ou espace sinusoidal.

Cet espace sinusoidal est traversé par les sinusoides sanguins, qui relient les branches de la veine porte à la veine centrolobulaire. La paroi des sinusoides sanguins est constituée des cellules endothéliales sinusoidales formant un épithélium fenestré qui délimite des pores de 50 à 300 nm chez l'homme, et qui constitue un filtre au passage des molécules présentes dans la circulation.

A proximité des cellules endothéliales sinusoidales se trouvent les cellules de Kupffer, représentant 35% des cellules hépatiques. Ce sont des macrophages mononucléés présents uniquement dans le foie et dont les principales fonctions sont la phagocytose des déchets du métabolisme et la sécrétion d'interleukines dans le contexte de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules de Kupffer ne sont pas en contact direct avec les hépatocytes mais en sont séparés par l'espace de Disse (Figure 4).

Dans l'espace de Disse, entre les hépatocytes et les cellules endothéliales, se trouvent les cellules stellaires hépatiques (CSH), encore appelées cellules de Ito (Figure 4). Les CSH sont importantes pour le métabolisme de la vitamine A, qu'elles stockent dans des gouttelettes lipidiques, et la fibrogenèse hépatique.



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

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

Figure 4: parenchyme hépatique et organisation au niveau sinusoidal

Source : traduit de : Hernandez-Gea et al., Pathogenesis of Liver Fibrosis, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2011 (3)

L'organisation du foie en lobules est une représentation structurale plutôt que fonctionnelle. En effet, l'unité fonctionnelle du foie est un acinus. Un acinus est centré sur l'espace porte, et occupe la zone située entre les veines centrolobulaires de deux lobules adjacents. L'acinus est subdivisé entre trois régions théoriques en forme d'ellipses qui chevauchent ainsi deux lobules. Les activités métaboliques des hépatocytes diffèrent selon leur localisation en zone 1 (autour de l'espace porte), 2 (zone intermédiaire), ou 3 (zone la plus proche de la veine centrolobulaire), car les apports en oxygène et en nutriments, notamment en glucose, diffèrent. Dans l'espace périportal, la concentration en oxygène, nutriments, et hormones est plus élevée (Figure 5). Les hépatocytes de cette zone sont surtout impliqués dans la néoglucogenèse et la β oxydation. Dans l'espace péricentral, le sang est enrichi en dioxyde de carbone et en déchets du métabolisme (Figure 5). Les hépatocytes péricentraux sont principalement impliqués dans la glycolyse et la lipogenèse⁴.

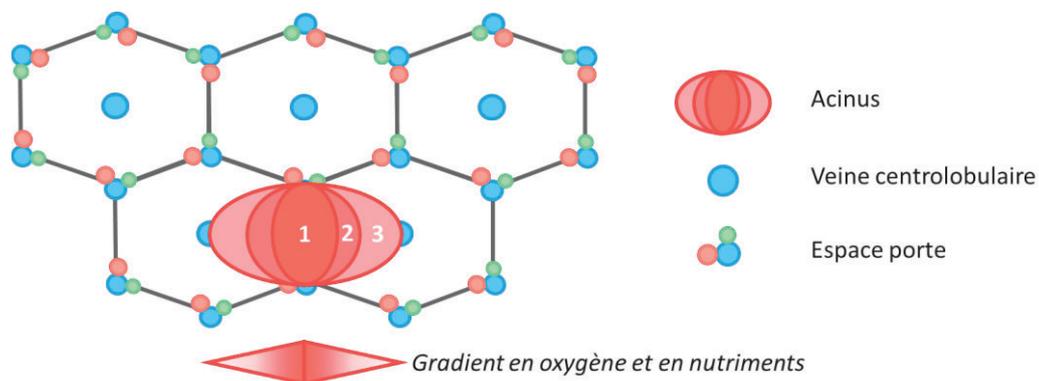


Figure 5: organisation d'un acinus

2) Les rôles du foie dans l'organisme

Le foie est un organe majeur dans le fonctionnement de l'organisme : il en assure l'homéostasie. Les fonctions hépatiques peuvent être divisées en 4 catégories :

- Rôle dans la digestion

A partir du cholestérol, le foie produit des acides biliaires. Ces acides biliaires sont stockés dans la vésicule biliaire (Figure 2), jusqu'à la prise alimentaire.

Lors d'un repas, la bile produite par les hépatocytes est déversée dans le duodénum. Les hépatocytes produisent entre 0,5 et 1 litre de bile par jour. Elle est composée d'eau à 97%, et contient également les sels et les acides biliaires, des électrolytes, du cholestérol, des phospholipides, des pigments de bilirubine, et des déchets.

Une fois dans le duodénum, les acides biliaires permettent l'absorption des lipides et leur digestion. De plus, la bile est légèrement basique, elle permet donc de neutraliser le chyme gastrique qui est acide.

- Rôle dans la détoxification

De par sa vascularisation particulière, le foie reçoit *via* la veine porte un sang riche en toxines issues de la digestion et du métabolisme cellulaire.

Ces toxines, déchets cellulaires, sont métabolisés par le foie grâce à son contenu enzymatique important et notamment grâce aux protéines de la famille des cytochromes P450. Ainsi modifiés, les métabolites sont éliminés *via* la bile dans le tractus digestif, ou *via* la circulation sanguine par laquelle ils rejoindront les reins pour être éliminés dans les urines.

- Rôle dans le métabolisme glucidique et lipidique et la sécrétion protéique

Le foie joue un rôle clé dans le maintien de la glycémie, c'est-à-dire le taux de glucose sanguin, à une valeur autour de 0,8-1 g/L (environ 5 mM), en particulier entre deux repas ou lors de période de jeûne. L'hypoglycémie survient lors que le taux de glucose sanguin est en dessous de 0,5 g/L (ou 2,8 mM). Si la privation de glucose au niveau neuronal est prolongée, l'hypoglycémie peut être sévère et conduire à un coma, à des séquelles neurologiques, voire même au décès.

Lors d'une prise alimentaire, les cellules β du pancréas sécrètent de l'insuline. Celle-ci favorise l'absorption du glucose circulant par les cellules insulino-dépendantes, grâce à un transport facilité *via* les transporteurs GLUT (transporteur de glucose). Au niveau du foie, le glucose entre dans les cellules grâce à leurs récepteurs GLUT-2, où il sera stocké sous forme de glycogène (voir paragraphe III, A, 2, a de l'introduction). En cas de forte concentration plasmatique de glucose, il peut également être stocké sous forme de triglycérides *via* la lipogenèse *de novo*, induisant une stéatose hépatique⁵.

Au contraire, lors d'une hypoglycémie, le pancréas libère du glucagon qui est produit par ses cellules α . Sous l'influence du glucagon, le glycogène hépatique est dégradé en glucose et libéré dans la circulation sanguine *via* la glycogénolyse (voir paragraphe III, A, 2, b de l'introduction). Lors d'un jeûne prolongé, et une fois que les stocks en glycogène hépatique sont épuisés, la néoglucogenèse (voir paragraphe III, A, 2, c de l'introduction) prend le relais de la glycogénolyse pour fournir du glucose à l'organisme.

La néoglucogenèse peut être réalisée par les trois organes glucoformateurs : le foie, les reins, et les intestins. En situation post-absorptive, le foie fournit la majorité du glucose (80%) *via* la glycogénolyse⁶.

Si le jeûne se prolonge, la part des reins et des intestins dans la production endogène de glucose augmente, jusqu'à 50 et 20%, respectivement, alors que celle du foie diminue⁶. A noter qu'une activation de la production de glucose par le foie est associée au développement d'un diabète entraînant des hyperglycémies chroniques⁷.

Au cours du jeûne, le foie est également capable de capter des acides gras issus du tissu adipeux, pour les oxyder et produire de l'énergie, et de produire majoritairement des corps cétoniques via la cétogenèse. Le glycérol produit lors de la lipolyse est un substrat de la néoglucogenèse.

Outre son rôle majeur dans les métabolismes glucidique et lipidique, le foie synthétise et sécrète de nombreuses protéines, dont l'albumine, qui représente à elle seule 60% des protéines plasmatiques.

- La fonction immunitaire

Le foie joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire car il reçoit *via* le système portal un sang chargé en protéines étrangères à l'organisme provenant du tractus gastro-intestinal : antigènes alimentaires, bactéries intestinales, virus. Il contient 10^{10} cellules immunocompétentes :

- Des cellules présentatrices d'antigène : les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Kupffer, et des cellules dendritiques.
- Des cellules lymphoïdes : les lymphocytes B, les lymphocytes T, les lymphocytes « natural killer » (NK).

Dans l'organisme, la réponse immunitaire est toujours en équilibre entre activation et tolérance à l'antigène. Au niveau hépatique, cet équilibre favorise la tolérance. La présentation antigénique dans le foie peut suivre deux voies.

Dans le premier cas, la cellule présentatrice de l'antigène rencontre l'antigène puis migre dans les organes lymphoïdes. Elle présente alors l'antigène aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs, qui s'activent et prolifèrent. Ces lymphocytes T actifs sont ensuite capables de migrer dans l'organisme et de déclencher une réponse immunitaire dans le tissu où ils rentrent en contact avec l'antigène. Si cette rencontre a lieu dans le foie, la réponse immunitaire des lymphocytes T est fréquemment éteinte. Les lymphocytes T peuvent aussi se transformer en lymphocytes T régulateurs (Treg), capables de réduire ou éteindre l'activation de la réponse immune.

Dans le second cas, l'antigène peut être présenté directement à des cellules qui ne sont pas spécialisées dans la présentation. Les lymphocytes T peuvent toujours être activés, mais, dans le foie par exemple, leur activation est partielle et ils peuvent entrer en apoptose. Ainsi, la réponse immunitaire induite contre l'antigène dans le foie est souvent inefficace.

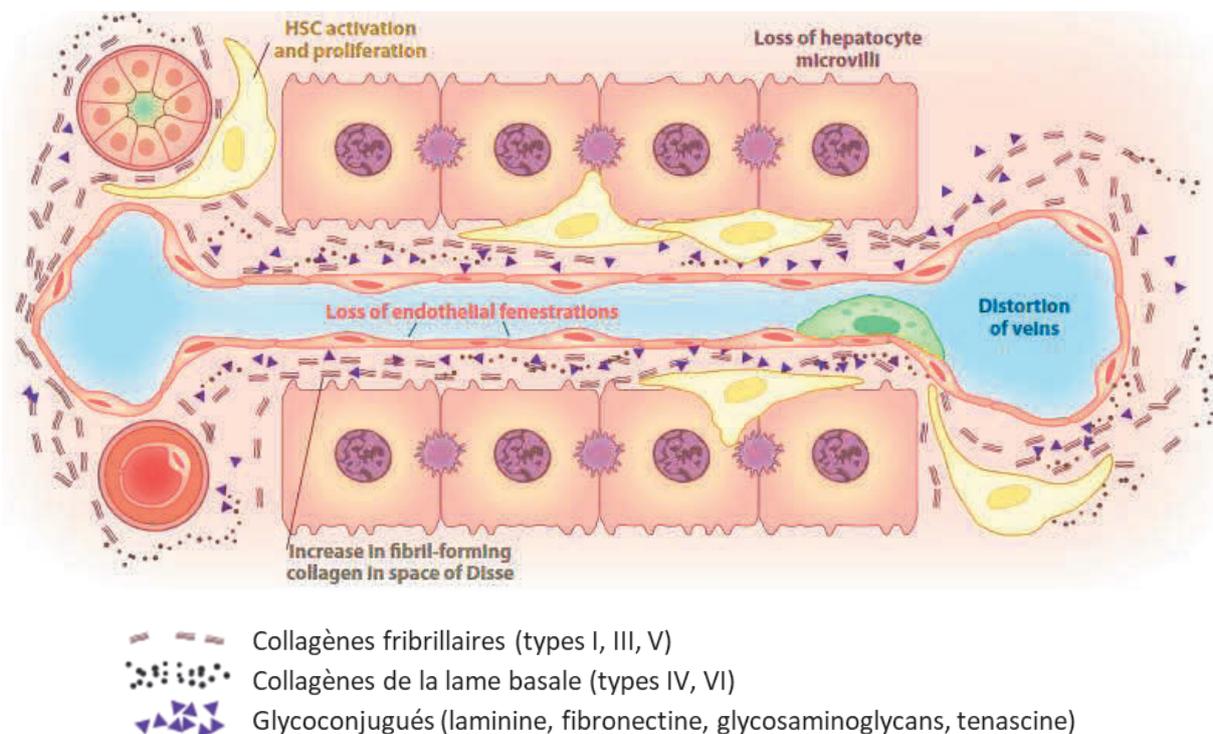
3) Atteinte de l'architecture du foie : la fibrogenèse hépatique

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

L'étape initiale de la fibrogenèse hépatique est l'activation des CSH en myofibroblastes. Cette activation est due à des stimuli paracrines (facteurs de croissance et cytokines) sécrétés par les cellules parenchymales du foie suite à une lésion. Les stimuli vont induire la modification de l'expression des gènes des CSH, modifiant ainsi leur phénotype au niveau de plusieurs paramètres comme la prolifération, la chimiotaxie, la contractilité, la dégradation de la matrice, et les activent en myofibroblastes.

En effet, les CSH jouent un rôle central dans la sécrétion de la matrice extracellulaire et la régulation de sa dégradation⁸.

- A l'état quiescent, les CSH synthétisent : du collagène de type III, du collagène de type IV, du collagène de type VI, de la laminine, de la ténascine, des protéoglycanes, et des protéases impliquées dans la dégradation de la matrice telles que la MMP-1 (métalloprotéase matricielle 1).
- Après activation, les CSH se transforment en myofibroblastes, caractérisées par la synthèse *de novo* d'actine-alpha de type musculaire lisse (α -SMA), et la composition de leur synthèse protéique change (Figure 6). Elles synthétisent en grande quantité des collagènes fibrillaires (type I, type III, type VI), de la fibronectine, et des protéoglycanes. De plus, les CSH activées synthétisent la MMP-2 (métalloprotéase matricielle 2), capable de dégrader le collagène de type IV qui est présent dans les lames basales, alors que la synthèse de la MMP-1 est diminuée³.



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

Figure 6: modification du parenchyme hépatique lors du développement de la fibrose hépatique

L'activation des CSH en myofibroblastes conduit à la modification de leurs sécrétions protéiques, et à la modification de la composition de la matrice extracellulaire. Notamment, la proportion de collagène fibrillaire augmente tandis que le collagène de la lame basale est dégradé. Ces modifications conduisent à des détériorations du microenvironnement sinusoidal, et in fine à une fonction altérée du foie.

Source : traduit de : Hernandez-Gea et al., Pathogenesis of Liver Fibrosis, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2011 (3)

Ces modifications qualitatives et quantitatives de la matrice extracellulaire détériorent le microenvironnement sinusoidal. Le dépôt de matrice dans l'espace de Disse conduit à la perte de la

fenestration des cellules endothéliales et à la perte des microvillosités des hépatocytes (Figure 6). En conséquence, les échanges bidirectionnels entre le flux sanguin de la veine porte et les hépatocytes sont altérés, conduisant à une altération de la fonction des hépatocytes⁸ et une hypertension portale³.

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

B. L'AAV : un vecteur de choix pour la thérapie génique *in vivo*

1) L'AAV sauvage

L'AAV est un virus de la famille *Parvoviridae*, et du genre *Dependovirus*. C'est un petit virus, de 20-25 nm, non enveloppé et renfermant un simple brin d'ADN⁹⁻¹¹.

Le virus n'a jamais été mis en cause dans une pathologie⁹, bien que des anticorps anti-AAV soient retrouvés chez 30 à 80% de la population selon le sérotype^{12,13}, car il dépend pour sa réplication d'autres virus auxiliaires tels que l'adénovirus ou le virus de l'herpès.

On compte à ce jour 12 sérotypes d'AAV (table 2). Découvert en premier, dès 1965, le sérotype le plus décrit et le plus connu est celui de l'AAV2. Le génome de l'AAV2 fait 4,7 kb, et contient deux gènes : *Rep* et *Cap*¹⁴⁻¹⁶ (Figure 7). Ces deux gènes sont flanqués à leurs extrémités par des séquences terminales inversées (ITRs). Les ITRs sont des séquences en épingle de 145 bp, dont 125 bp consistent en une séquence palindromique et les 20 bp restant sont une séquence interne non appariée^{9,17}.

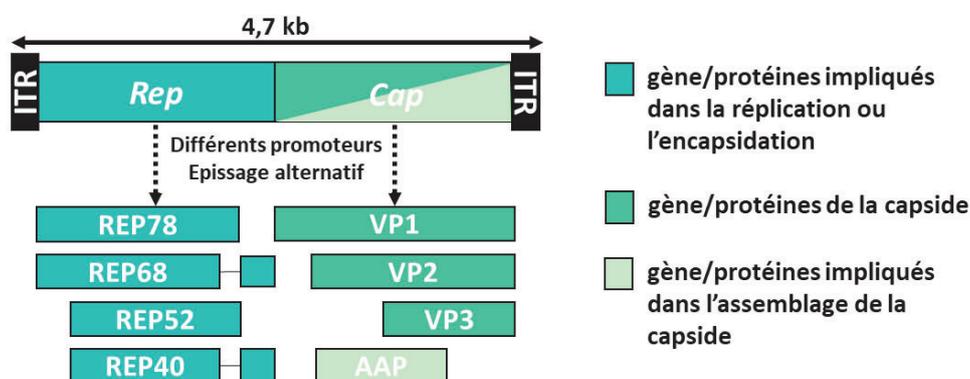


Figure 7: carte schématique du génome de l'AAV2

ITR: séquence terminale inversée ; VP: protéine virale ; AAP: protéine activatrice de l'assemblage

Le gène *Rep* code pour quatre protéines nécessaires à la réplication de l'AAV, à travers des mécanismes d'épissage alternatif et de sites d'initiation de la traduction alternatifs. Deux de ces protéines, REP78 et REP68, sont appelées protéines majeures. Elles sont capables de fixer l'ADN viral et de réaliser la réplication du génome. Les deux autres protéines, REP52 ET REP40, sont dites mineures, et participent à l'encapsidation du génome viral compris entre les deux ITRs.

Le gène *Cap* code pour les protéines VP1, VP2 et VP3, constituants de la capsid, et pour la protéine activatrice de l'assemblage de la capsid (AAP) qui permet l'assemblage de VP1, VP2 et VP3. Une autre

protéine, la protéine accessoire associée à la membrane (MAAP), joue un rôle important pour l'encapsidation du génome viral¹⁸.

En l'absence d'un virus auxiliaire nécessaire pour sa réplication, l'AAV peut entrer dans une phase de latence lors de laquelle il ne se réplique pas mais s'intègre de manière spécifique dans le locus 19q13.4 du génome humain¹⁹⁻²¹. Ce locus présente en effet deux motifs également présents au niveau des ITRs et cibles des protéines REP. Les protéines REP sont capables de réaliser un pontage entre l'ADN génomique et l'ADN viral. Un site de clivage présent dans la séquence des AAV permet l'intégration de la séquence virale dans le génome de la cellule hôte. Lors d'une infection ultérieure par un virus auxiliaire, l'AAV pourra se répliquer^{10,11,21-24}.

L'AAV est capable de persister dans les cellules sous forme extra-chromosomique, en formant des épisomes. Le virus n'est néanmoins pas capable de répliquer son génome épisomale en même temps que la réplication de l'ADN cellulaire (Figure 8).

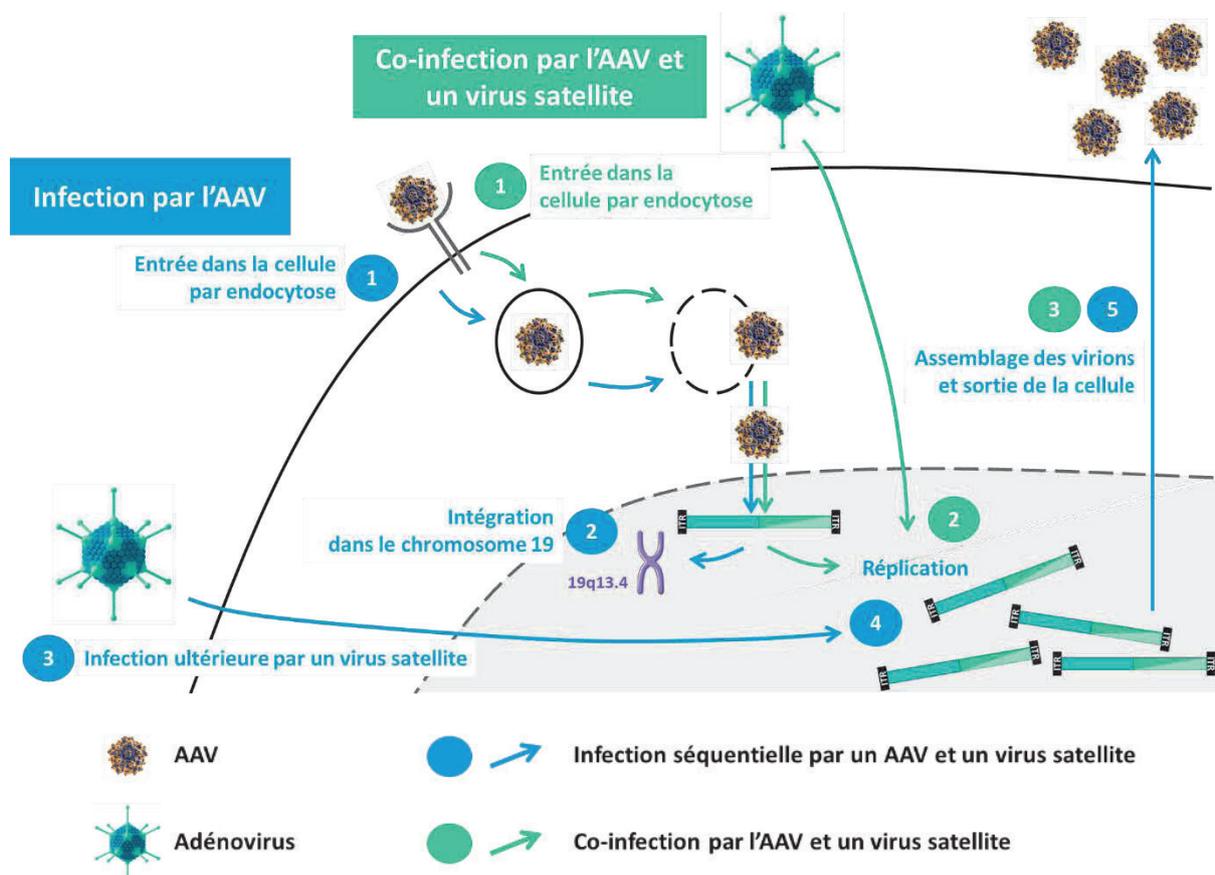


Figure 8: cycle de vie de l'AAV

Lors d'une infection par l'AAV seul, le virus pénètre dans la cellule par endocytose et son génome est intégré en position 19q13.4 du génome de la cellule hôte. Lors d'une infection ultérieure par un virus auxiliaire, comme l'adénovirus, le génome de l'AAV est répliqué et les virions sont libérés de la cellule. Lors d'une co-infection par l'AAV et un virus auxiliaire, le génome viral ne s'intègre pas dans le génome hôte mais est directement répliqué afin de produire de nouveaux virions.

2) Vecteurs AAV recombinants

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

Seuls les ITRs sont conservés car ils sont nécessaires à l'encapsidation, mais les gènes *Rep* et *Cap* sont retirés de la séquence, et remplacés par une cassette d'expression comportant un promoteur, la séquence codante du gène choisi et un signal de polyadénylation. Il est préférable que la taille de la cassette d'expression ne dépasse pas 4,7 kb ; en effet, au-delà, l'encapsidation de la totalité du transgène n'est pas garantie et des phénomènes de fragmentations du transgène et d'encapsidations multiples peuvent se produire. Les rAAV ne sont donc pas capables de s'intégrer dans le génome hôte de façon spécifique au niveau du locus 19q13.4. Ils peuvent s'intégrer de façon aléatoire dans le génome de l'hôte, et persistent dans les cellules sous forme de concatamères d'ADN appelés épisomes. Les épisomes sont constitués par la succession de plusieurs séquences de rAAV liées par leurs ITRs²⁵⁻²⁷. Cette particularité est l'un des grands avantages de l'AAV. En effet, le faible taux d'insertion des AAV diminue le risque génotoxique, tout en permettant une expression à long-terme dans les cellules post-mitotiques grâce à leur persistance épisomale.

La variété des sérotypes d'AAV est un facteur particulièrement intéressant en thérapie génique *in vivo*, car il existe en effet un tropisme tissulaire selon le sérotype utilisé (Table 2). Par exemple, l'AAV8 est décrit comme particulièrement efficace pour transduire le foie mais aussi les muscles squelettiques et le cœur, tandis que l'AAV9 va transduire ces trois organes ainsi que le système nerveux central, les poumons et reins²⁸. Cette diversité dans la biodistribution des AAV serait due à la diversité des récepteurs et corécepteurs assurant leur entrée dans les cellules.

Sérotypes AAV	Tissus cibles	Récepteurs	Corécepteurs
AAV1	Foie, muscles squelettiques, cœur	Acide sialique N-lié	Inconnu
AAV2	Foie, muscles squelettiques, cœur, poumons, reins	HSPG	FGFR1, intégrines $\alpha V\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$, HGFR, LamR, CD9
AAV5	Muscles squelettiques, SNC, poumons	Acide sialique N-lié	PDGFR
AAV6	Muscles squelettiques, cœur, poumons	HSPG Acide sialique N-lié	EGFR
AAV8	Foie, muscles squelettiques, cœur	Inconnu	LamR
AAV9	Foie, muscles squelettiques, cœur, SNC, poumons, reins	Galactose N-lié	LamR

Table 2: tropisme des principaux sérotypes d'AAV utilisés en thérapie génique

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

Ainsi, en associant le choix du sérotype et l'utilisation judicieuse de séquences régulatrices spécifiques d'un tissu, les rAAV permettent de cibler préférentiellement l'expression du gène thérapeutique dans un ou plusieurs types cellulaires et tissulaires connus.

C. Intérêts du foie en tant que cible de thérapie génique par les vecteurs AAV

La thérapie génique ciblant le foie grâce à l'utilisation de vecteurs AAV recombinants est l'une des premières à avoir été un succès clinique.

Des études précliniques chez l'animal, sur différents modèles (souris, chien, primates), ont montré que l'administration intraveineuse de vecteurs AAV permet de cibler efficacement le foie par rapport à d'autres organes, ce qui a été confirmé dans les essais cliniques réalisés chez l'homme²⁹⁻³¹. Les études précliniques et les essais cliniques ont permis de démontrer une expression hépatique du transgène à long-terme après injection des rAAV dans la circulation sanguine^{1,29-38}.

Plusieurs paramètres expliquent ces réussites et soulignent l'intérêt de cibler le foie en thérapie génique utilisant les AAVs.

1) Le foie est un organe fortement vascularisé

Le foie est un des organes les plus perfusé du corps : il contient environ 10% du volume sanguin total, ce qui représente un débit de 1,5 litre par minute chez l'homme adulte.

Cette vascularisation est tout à fait particulière, car le foie est perfusé à la fois par une veine et une artère. L'artère hépatique et la veine porte se divisent en plusieurs branches à leur entrée dans le foie. Un segment est une région du foie alimentée par une branche de la veine porte et une branche de l'artère hépatique. Chez l'homme, on distingue ainsi 8 segments dans le foie, qui fonctionnent indépendamment.

Les branches artérielles et veineuses irriguent les capillaires sinusoidaux, qui récoltent les métabolites relargués par les hépatocytes, et se déversent dans la veine centrolobulaire. En se rejoignant, les veines centrolobulaires forment les veines sous hépatiques, généralement au nombre de trois, qui s'abouchent dans la veine cave inférieure (Figure 9).

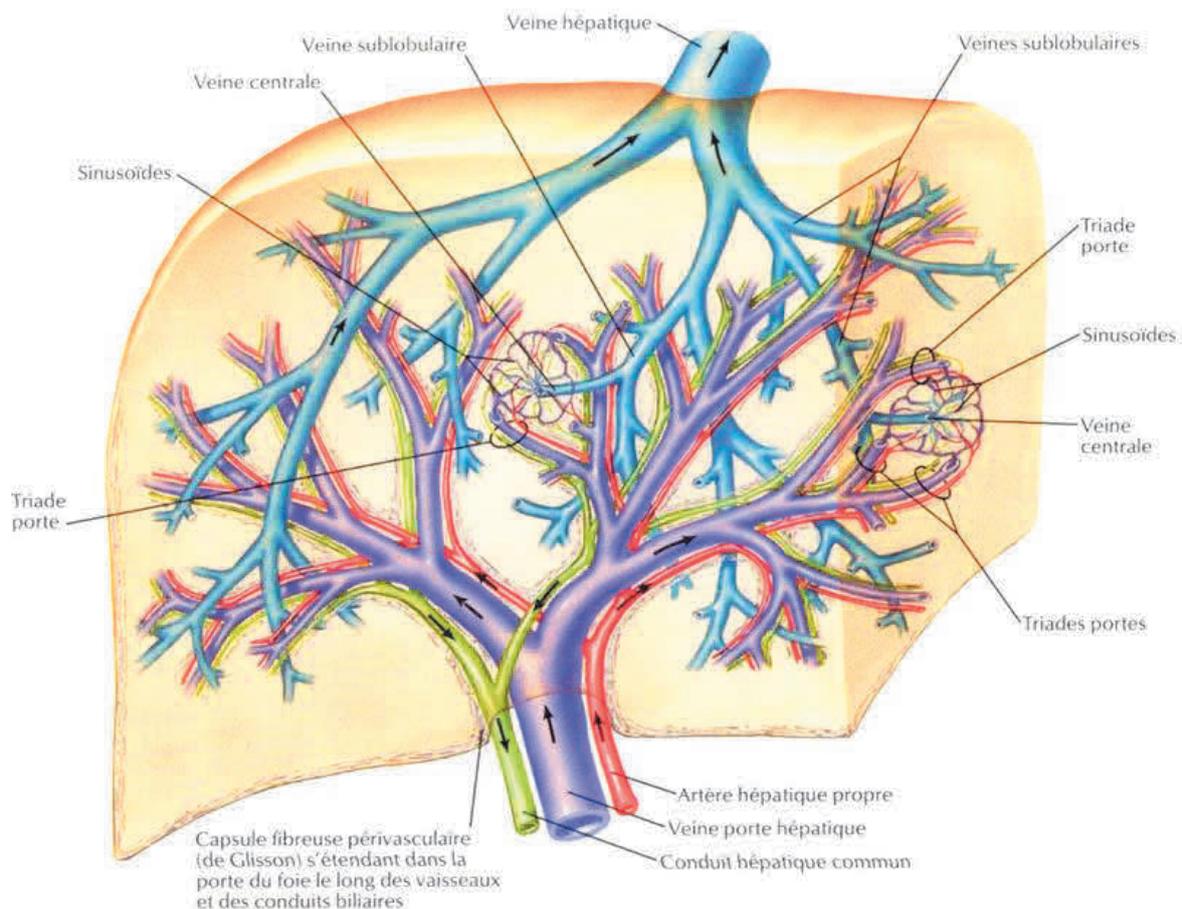


Figure 9: vascularisation hépatique

Source : Netter 2020, <https://www.netterimages.com/> consulté le 07/07/2020

Ainsi, dès lors qu'une substance, telle qu'un AAV, est introduite dans la circulation systémique, elle atteindra les voies hépatiques en quelques minutes.

De plus, la barrière sinusoidale est facilement franchie par les AAV, grâce à la fenestration de l'endothélium sinusoidal, ce qui explique la transduction relativement simple du parenchyme hépatique par les AAV.

2) La tolérance du transgène grâce à son expression hépatique

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

Le phénomène de tolérance hépatique a été observé dans le domaine de transplantation d'organes. Dans le cadre de greffes de foie, l'immunosuppression n'est pas toujours requise dans les modèles animaux^{39,40}. Chez l'homme, la discordance des complexes majeurs d'histocompatibilité entre hôte et receveur n'influence pas de manière significative l'évolution de la greffe⁴¹. Enfin, la transplantation foie-rein simultanée améliore les chances de maintien du greffon rénal par rapport à une simple transplantation d'un rein seul, alors que cela ne varie pas pour le foie⁴².

Dans le cas du transfert du gène par vecteur AAV, des études précliniques indiquent que la tolérance hépatique est apportée par les lymphocytes Treg CD4+CD25+FoxP3+^{43,44}, capables d'inhiber les réponses des lymphocytes T et la production des anticorps anti-transgène. Les Treg ont aussi un rôle

important dans le contrôle de la réponse cytotoxique médiée par les lymphocytes T CD8+, mais il semble que l'épuisement de ces cellules soit aussi impliquée⁴⁵.

La tolérance hépatique suite au transfert du gène est particulièrement importante dans certaines pathologies comme les hémophilies A et B, avec des patients à mutations nulles c'est-à-dire n'exprimant pas ou très peu la protéine déficiente. Ces patients peuvent développer des anticorps contre la protéine recombinante administrée à des doses thérapeutiques. Il est donc tout à fait possible que ce type de patients développent également une réponse anti-transgène qui, en l'absence de tolérance induite par le foie, pourrait conduire à un échec thérapeutique.

Cependant, jusqu'à présent, aucun patient enrôlé dans les différents essais cliniques pour l'hémophilie n'a développé de réponse anti-transgène²⁹⁻³¹, bien que certains d'entre eux soient porteurs de mutations nulles. Il est important de noter néanmoins que tous les sujets inclus dans ces essais thérapeutiques étaient traités par substitution protéique et tous ceux ayant développé des anticorps anti-facteur de coagulation suite au traitement ont été exclus de ces essais.

3) Le foie en tant que bio-usine

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

Cette machinerie peut être exploitée en thérapie génique :

- « Classiquement » pour exprimer des protéines hépatiques.
- En utilisant le foie comme une « usine » de production protéique *in vivo*.

Dans cette dernière approche, l'idée est de cibler le foie afin qu'il produise et sécrète la protéine d'intérêt (qui n'est pas nécessairement produite ni sécrétée par le foie en conditions physiologiques), afin que ladite protéine puisse atteindre son/ses organe(s) cible(s) *via* la circulation sanguine.

Par exemple, le facteur de coagulation VIII et le facteur Von Willebrand sont normalement produits par les cellules endothéliales, mais des stratégies de thérapie génique utilisant des rAAV ciblant le foie ont permis de faire synthétiser ces facteurs par le foie et de les faire sécréter dans la circulation sanguine^{38,46}.

Plus récemment, une thérapie génique ciblant le foie a été mise au point pour la maladie de Pompe¹. Cette pathologie affecte les muscles squelettiques, notamment le diaphragme, ainsi que le système nerveux central, et le cœur des patients. L'approche de thérapie génique pour cette maladie est basée sur l'optimisation de l'expression et de la sécrétion par le foie de l'enzyme déficiente dans la pathologie, l'alpha-1,4-glucosidase acide (GAA), afin d'obtenir une correction croisée de tous les tissus (Figure 10)¹.

Cette stratégie n'est possible uniquement parce que la GAA est une protéine lysosomale pour laquelle toutes les cellules possèdent un récepteur permettant son internalisation : le récepteur du mannose-6-phosphate. Après l'endocytose de la GAA au sein des cellules, la vésicule endocytée fusionne avec les lysosomes où elle est active.

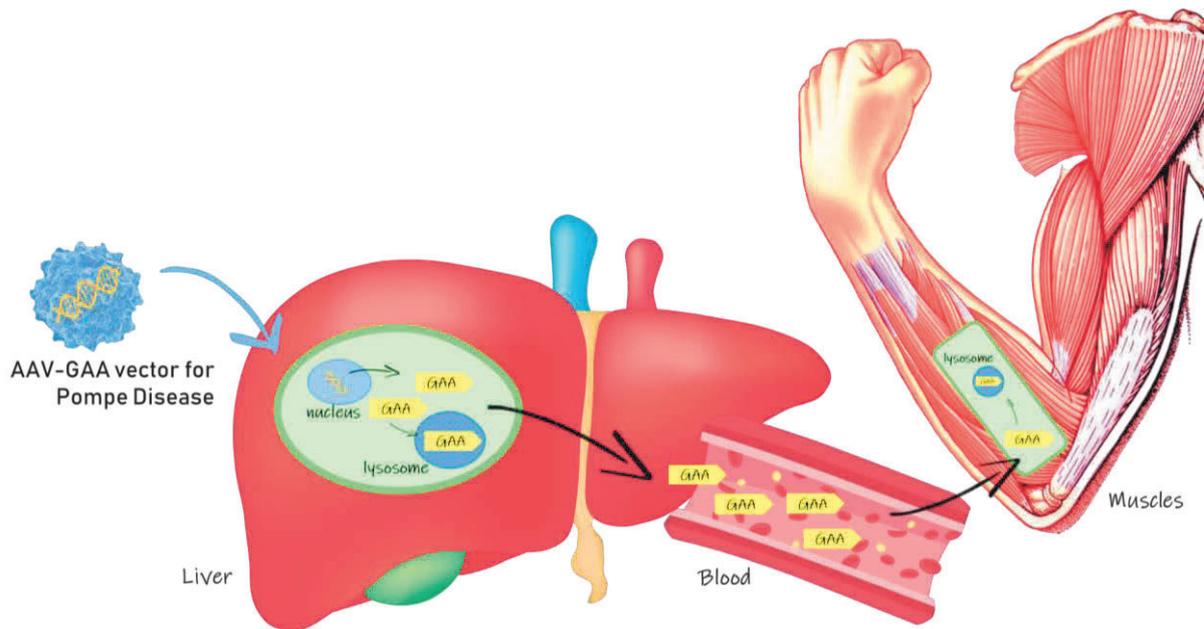


Figure 10: utilisation du foie en tant que bio-usine

Le foie est la cible d'un AAV codant la GAA modifiée pour être mieux sécrétée. Les hépatocytes transduits produisent et sécrètent la GAA dans la circulation sanguine, celle-ci est capturée par endocytose par tous les tissus exprimant le récepteur mannose-6-phosphate.

Comme démontré récemment, cette stratégie bénéficie d'un avantage quant à la dose de vecteur nécessaire pour une maladie neuromusculaire comme la maladie de Pompe, car cibler le foie nécessite moins d'AAV que la transduction de tous les muscles de l'organisme¹.

D. Les contraintes actuelles de la thérapie génique par les vecteurs AAV

1) Immunogénicité

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

Suite à l'administration du vecteur AAV, la première réponse immunitaire est la réponse innée. Dans le cas de la thérapie génique utilisant des vecteurs AAV, celle-ci peut s'exprimer contre le transgène ou contre la capsid de l'AAV.

De plus, bien que l'AAV sauvage n'a jamais été décrit comme pathogène chez l'homme, l'homme peut y être exposé au cours de sa vie et développer une réponse immunitaire. La capsid de l'AAV recombinant utilisé en thérapie génique est semblable à celle de l'AAV sauvage, ce qui signifie qu'une administration de rAAV à un patient peut conduire à une réponse immune adaptative. Cette réponse immunitaire adaptative contre la capsid se manifeste sous deux volets : une réponse cellulaire et une réponse humorale.

a. La réponse immune humorale contre la capsidite des rAAV

Diverses études sérologiques ont mis en évidence que 30 à 80% de la population générale développe des anticorps anti-capsidite à l'AAV^{12,13}, suite à une primo-exposition estimée entre 1 et 3 ans d'âge.

La séroprévalence la plus élevée est observée pour les AAV2 et AAV1^{12,13}, alors que la plus faible séroprévalence est celle des AAV9 et surtout de l'AAV8^{12,13}. Or, un faible titre d'anticorps anti-capsidite neutralisants ou NAb, suffit à neutraliser les AAV en diminuant leur efficacité de transduction^{13,29} (Figure 11).

Cela a été mis en évidence dans un essai clinique pour l'hémophilie B, mettant en jeu un AAV2 exprimant le facteur IX injecté par voie veineuse²⁹. Dans la cohorte injectée à forte dose (2×10^{12} vg/kg), un patient avec un titre de NAb de 1:2 avant administration du vecteur a obtenu une bonne réponse au traitement avec une expression de facteur atteignant jusqu'à 11% de l'expression d'une personne saine. Au contraire, chez un patient avec un titre de NAb de 1:17 avant administration du vecteur, le facteur IX n'a pas été détecté dans la circulation suite au traitement²⁹. Par conséquent, un titre d'anticorps neutralisants préexistants élevé (le plus souvent >1:5) constitue un critère d'exclusion des essais cliniques.

Il a également été proposé de réaliser une plasmaphérèse, afin de retirer tous les anticorps présents dans la circulation des patients, avant d'administrer le vecteur⁴⁷. Dans le même esprit, une publication récente a démontré la possibilité d'utiliser une enzyme, l'endopeptidase IdeS, clivant les anticorps anti-AAV⁴⁸. Cette endopeptidase a d'abord été développée afin de réduire les rejets de greffe lors de transplantation, mais administrée en parallèle d'une injection d'AAV elle permet également de réduire la réponse humorale anti-AAV et d'augmenter la transduction du foie.

b. La réponse immune cytotoxique

Après l'endocytose de l'AAV dans la cellule, le génome de l'AAV et sa capsidite sont détectés par les récepteurs Toll-like (TLR) 9 et 2, respectivement (Figure 11).

Les TLR sont des récepteurs essentiels à la réponse innée. Ils sont capables de reconnaître des particules bactériennes et virales, notamment l'ADN viral⁴⁹, ce qui conduit :

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

En complément à cette réponse innée, il existe une réponse adaptative. Celle-ci a été mise en évidence dans un essai clinique pour l'hémophilie B. Cet essai mettait en jeu un vecteur AAV2 exprimant le facteur IX, injecté par voie veineuse à une dose de 2×10^{12} vg/kg. Une augmentation transitoire et asymptomatique des transaminases a été observée chez deux patients 4 semaines après l'injection, avec en parallèle une diminution de l'expression du facteur IX²⁹.

Ces observations ont été corrélées à une expansion des lymphocytes T CD8+ spécifiques de la capsidite, probablement responsables du rejet immunitaire des hépatocytes transduits⁵⁰. Les lymphocytes T CD8+ éliminent alors les hépatocytes transduits par le vecteur AAV, qui exposent les protéines virales sur le CMH type I à leur surface membranaire⁵⁰ (Figure 11).

Afin d'éviter cette réponse immune cellulaire, deux solutions peuvent être envisagées.

La première consiste à atteindre la dose de vecteur AAV nécessaire pour obtenir une expression du transgène efficace sans dépasser le seuil d'activation du système immunitaire. Néanmoins, il est difficile d'établir une règle générale pour déterminer cette dose, car d'autres paramètres sont à prendre en compte tels que la pré-exposition à l'AAV sauvage, la variabilité génétique interindividuelle et le complexe majeur d'histocompatibilité.

Une seconde solution consiste à traiter les patients injectés par une immunosuppression (corticostéroïdes oraux) dès lors que les transaminases hépatiques augmentent ou à appliquer une immunosuppression continue à partir de l'injection du vecteur et pour toute la période critique suivant l'injection (jusqu'à 12 semaines après injection).

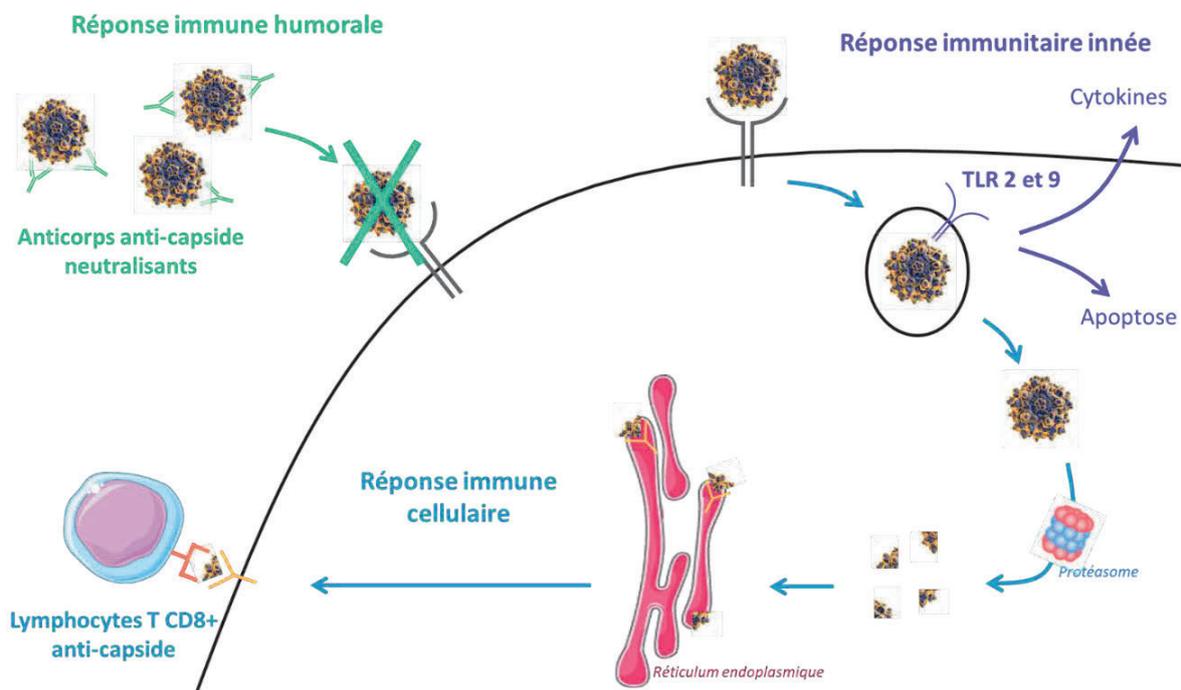


Figure 11: réponses immunitaires après injection d'AAV recombinant

Dans la réponse immunitaire innée, le génome ou la capsid de l'AAV est reconnu par les TLR, ce qui conduit à l'activation des cellules de la réponse immunitaire innée et l'élimination de la cellule transduite par les cellules de l'immunité, ou à l'apoptose de la cellule transduite. Dans la réponse immune adaptative cellulaire, les lymphocytes T CD8+ anti-capsides sont réactivés par la présentation de protéines de la capsid de l'AAV par les cellules transduites, ce qui conduit à leur expansion, et in fine à l'élimination des cellules transduites. Dans la réponse immune adaptative humorale, les lymphocytes B synthétisent des anticorps neutralisants anti-capsid AAV, bloquant ainsi la transduction.

2) Efficacité et niveaux d'expression thérapeutiques

Le transfert de gène par rAAV a pour but une expression du transgène à des niveaux suffisants pour observer un effet thérapeutique, stable, et sur le long-terme. L'efficacité de la thérapie génique dépend du niveau d'expression du transgène mais aussi du pourcentage de transduction des cellules ciblées.

Les essais cliniques sur l'hémophilie ont permis d'établir que les niveaux d'expression du transgène sont liés à la dose d'AAV injectée²⁹⁻³¹ : plus la dose est forte, plus le niveau d'expression augmente. Or, la réponse immunitaire anti-capsid est également liée à la dose d'AAV injectée et peut diminuer, voire

effacer, l'expression du transgène, si elle n'est pas prise en charge. Afin d'être efficace, la dose de vecteur doit se trouver dans la fenêtre thérapeutique étroite entre la dose de vecteur nécessaire pour atteindre des niveaux d'expression thérapeutiques, et la dose de vecteur qui va engendrer une réponse immunitaire (Figure 12). Comme décrit plus haut (voir paragraphe II, D, 1 de l'introduction), le traitement immunosuppresseur peut élargir cette fenêtre, mais une autre stratégie possible est de réduire la dose de vecteur nécessaire pour traiter la pathologie.



Figure 12: la fenêtre thérapeutique pour une thérapie génique par AAV

Les niveaux d'expression thérapeutique à atteindre, et donc la quantité d'AAV nécessaire, dépendent de la maladie à traiter. Des approches existent afin de réduire la dose d'AAV nécessaire :

- Utiliser des capsides plus efficaces et/ou qui permettent d'échapper à la réponse immunitaire anti-capside

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

Par exemple, des AAV infectant d'autres espèces que l'homme ont été identifiés et sont utilisés chez l'homme⁵¹. Ces capsides ont l'avantage d'avoir une séroprévalence plus basse.

La modification de la capside de l'AAV par ingénierie permet également d'augmenter le ciblage tissulaire du vecteur, mais aussi la signalisation intracellulaire de l'AAV⁵². Par exemple, il est possible de détourner les particules virales de la dégradation protéosomale en modifiant leur capside à des sites spécifiques, ou en utilisant des approches pharmacologiques, ce qui permet d'augmenter l'efficacité de transduction de ces vecteurs.

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

La « codon optimisation » a pour but de modifier les nucléotides de la séquence du transgène, sans modifier la séquence d'acides aminés de la protéine codée, afin de faire correspondre les codons de la séquence avec les acides ribonucléiques de transfert (ARNt) les plus représentés chez l'espèce cible. Grâce à cette technique, la traduction des ARNm issus des transgènes peut être plus efficace, ce qui permet en théorie d'augmenter les niveaux de protéines synthétisées.

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

3) Capacité d'encapsidation de l'AAV

L'AAV sauvage permet d'inclure dans sa capsid un génome de 4,7kb (Figure 7), ce qui restreint son utilisation à des transgènes (incluant les séquences régulatrices et le signal de polyadénylation) qui ont une taille inférieure à 4,7kb. C'est aujourd'hui l'une des principales limites à l'utilisation généralisée de l'AAV en thérapie génique.

Afin de surmonter cet obstacle, deux approches sont envisageables :

- Réduire la taille du transgène tout en optimisant la cassette d'expression avec les séquences régulatrices les plus courtes et fonctionnelles connues. Cette approche dépend du transgène et de la pathologie.
- Augmenter la capacité d'encapsidation de l'AAV. Ces stratégies reposent sur des mécanismes cellulaires comme la recombinaison homologue et l'utilisation de deux AAV qui permettront de synthétiser un seul produit thérapeutique ; elles ne dépendent pas du transgène ni de la pathologie^{53,54}. Une autre stratégie est d'utiliser des AAV hybrides avec des autres virus, par exemple le Bocavirus, qui permettent d'augmenter la taille du transgène pouvant être encapsidé⁵⁵.

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

L'« overlapping » est basé sur le mécanisme de réparation de l'ADN de recombinaison homologue. La cassette étant trop grande pour être encapsidée dans un vecteur AAV, elle est séparée en deux parties (appelées ici « Head » et « Tail ») qui sont intégrées dans deux particules d'AAV distinctes. Chaque partie comporte une région d'homologie située en 3' de la cassette Head et en 5' de la cassette Tail (Figure 13A). C'est la recombinaison homologue intracellulaire entre chacune des parties qui permettra de reconstituer le transgène entier^{53,56}. L'efficacité de cette stratégie a été démontrée dans plusieurs pathologies⁵⁷⁻⁵⁹. Néanmoins, le taux de recombinaison dans la cellule reste faible, et permet d'obtenir des quantités de transgène autour de 1 à 2% de ce qui pourrait être obtenu avec un unique AAV codant un transgène complet⁶⁰. De plus, les séquences Head et Tail peuvent être exprimées séparément⁶¹, sans qu'il y ait eu recombinaison, générant des protéines tronquées non naturelles potentiellement toxiques et/ou immunogènes.

La stratégie dite « dual-hybrid » est appelée ainsi car elle nécessite deux AAV et met en jeu deux mécanismes : la recombinaison homologue et l'épissage. Les séquences Head et Tail comprennent une séquence de recombinaison, et un site donneur d'épissage en 3' de la séquence Head ou un site accepteur d'épissage en 5' de la séquence Tail (Figure 13B). Grâce au mécanisme de recombinaison homologue, *via* les séquences ITRs ou *via* la séquence de recombinaison, le transgène complet est reconstitué et transcrit. Lors de la maturation des ARNm, la séquence de recombinaison est éliminée par épissage *via* les sites donneurs et accepteurs insérés à ses extrémités^{53,54}. Le plus souvent, la région d'homologie utilisée dans ce type de vecteur est la séquence de la phosphatase alcaline (AP), qui est connue pour conduire à de bons taux de recombinaison⁶². Cependant, comme dans l'« overlapping », des protéines tronquées peuvent être synthétisées à partir de chaque vecteur Head ou Tail. De plus, si les sites d'épissage ne sont pas reconnus, la protéine synthétique générée comporte une séquence exogène qui peut modifier la structure tridimensionnelle de la protéine, et donc sa fonction, mais également être reconnue comme exogène et entraîner une réponse immunitaire. Ce dernier phénomène est considéré comme mineur⁵⁶.

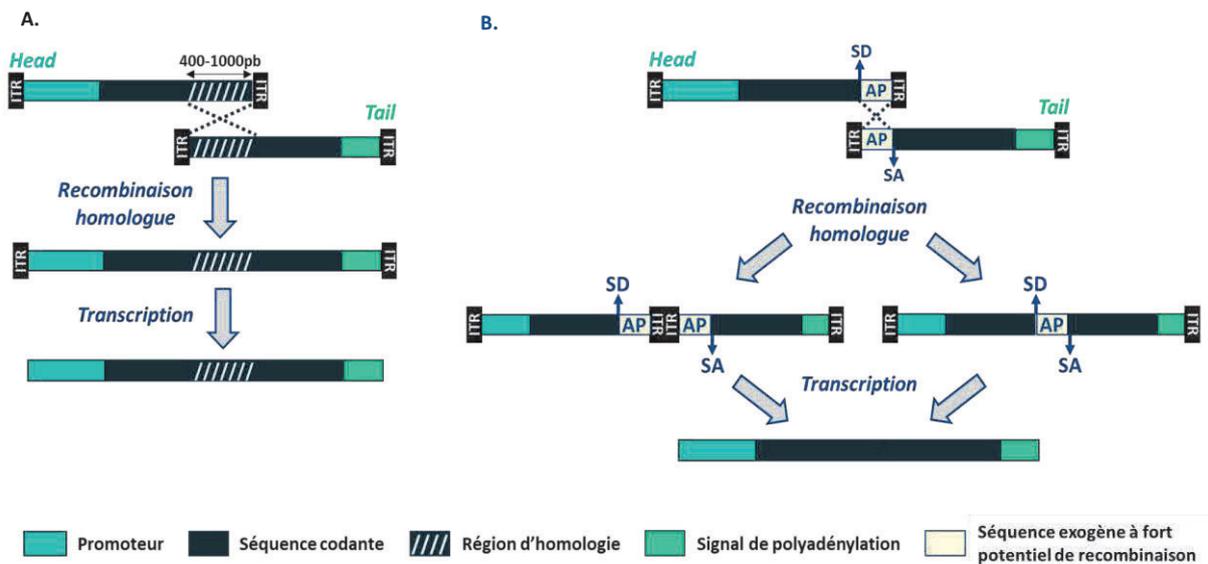


Figure 13: stratégies mettant en jeu deux vecteurs AAV pour surmonter la limite d'encapsidation de l'AAV

A. Stratégie de l'overlapping. B. Stratégie dual hybrid, SD : site donneur ; SA : site accepteur ; AP : région d'homologie dérivée de la phosphatase alcaline.

4) Quantité de vecteur à produire

Les vecteurs AAV peuvent être produits par plusieurs méthodes, dont la triple co-transfection de cellules de mammifères est la plus commune^{63,64}.

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

- Un plasmide contenant la cassette d'expression du transgène, encadrée par deux séquences ITRs.
- Un plasmide contenant les gènes Rep et Cap.
- Un plasmide codant les gènes du virus auxiliaire.

Une fois les virus produits par les cellules, une étape de purification est nécessaire. Elle peut être réalisée par chromatographie sur colonne, ou par des méthodes physiques impliquant la séparation par gradient et des centrifugations. Selon la méthode choisie, les contaminations de débris cellulaires et de capsides d'AAV vides (ne contenant pas le transgène) seront plus ou moins importantes. La pureté de l'AAV produit est un paramètre essentiel à prendre en compte pour la réalisation d'études précliniques et surtout cliniques, car les contaminations peuvent avoir un impact en termes de réponse immunitaire. Notamment, la persistance de capsides vides dans les lots d'AAV augmente la possibilité de reconnaissance des AAV par le système immunitaire, ou peuvent au contraire servir de leurres⁶⁵.

Aujourd'hui, ces méthodes de production permettent d'obtenir des titres allant jusqu'à 10^{10} vg/mL de culture (génomes vectoriels/mL de culture). Ces rendements sont élevés ; cependant, dans des stratégies ciblant des organes difficilement transduits (système nerveux central, muscles squelettiques, reins) par voie systémique, les doses requises sont de l'ordre de 10^{13} vg/kg, allant jusqu'à 3×10^{14} vg/kg (NCT00428935, NCT02122952, NCT03381729, NCT03199469, NCT03505099, NCT03375164, NCT00430768, sur <https://clinicaltrials.gov/>), ce qui nécessite 18 L de production

(milieu de culture) pour un patient de 60 kg et pose la question des équipements – notamment des bioréacteurs – et de production à grande échelle pour traiter plusieurs patients.

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

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

III. EXEMPLES DE PATHOLOGIES HEPATIQUES ET EXTRA-HEPATIQUES POUVANT ETRE TRAITES PAR DES AAV RECOMBINANTS CIBLANT LE FOIE

A. Les glycogénoses : exemples de la glycogénose de type Ia et de la glycogénose de type III

1) Le glycogène

Le glycogène est la forme de stockage du glucose principalement dans le foie et les muscles, mais est retrouvé dans tous les types cellulaires au niveau du cytosol et des lysosomes. Dans le foie, sa synthèse et sa dégradation permettent la libération rapide de glucose ce qui est essentiel pour le maintien de la glycémie. Dans les muscles, il est dégradé sous forme de glucose pour fournir de l'énergie lors des premières secondes de la contraction musculaire⁶⁶.

Le glycogène est composé de chaînes de résidus uridine diphosphate-glucose (UDP-glucose) liés entre eux par des liaisons α -1,4. A chaque douzaine de résidus environ, un branchement α -1,6 permet d'initier une nouvelle chaîne de résidus glucodisiques liés en α -1,4⁶⁶ (Figure 14). Du fait de ce branchement, les résidus UDP-glucose sont assemblés en une spirale centrée sur la glycogénine lui conférant une structure arborescente. La glycogénine est une glycosyltransférase capable de polymériser au moins 4 résidus UDP-glucose sur son résidu tyrosine en position 194, ce qui permet d'amorcer la synthèse du glycogène.

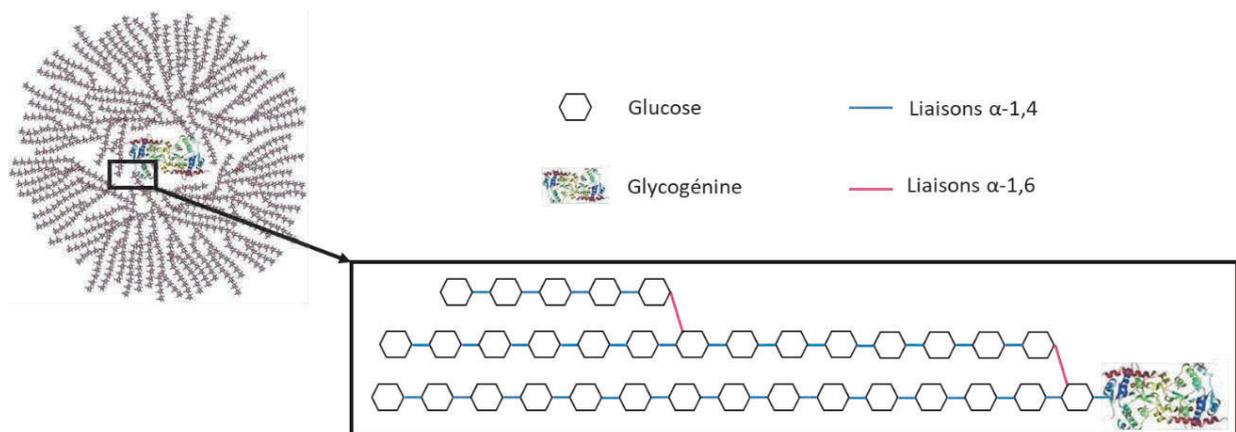


Figure 14: structure d'une molécule de glycogène et ses liaisons intra-moléculaires

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

2) Le métabolisme hépatique du glycogène et du glucose

Dans le foie, le métabolisme du glycogène a pour but de fournir du glucose pour maintenir la glycémie dans les valeurs normales, c'est-à-dire entre 0,7 et 1 g/L à jeun. Le glucose ainsi libéré dans le sang est ensuite utilisé par toutes les cellules pour fournir de l'énergie, mais est aussi la principale source de squelette carboné.

Le métabolisme du glycogène et la production de glucose mettent en jeu plusieurs réactions biochimiques :

- La glycogénogenèse : la synthèse du glycogène, à partir de résidus de glucose-1 phosphate (G1P). Elle est réalisée principalement dans le foie et les muscles.
- La glycogénolyse : la dégradation du glycogène, pour fournir principalement du G1P, transformé en glucose-6-phosphate (G6P). Quelques résidus de glucose sont directement produits grâce à l'action de l'enzyme débranchante. L'hydrolyse du glycogène est réalisée dans le foie et les muscles.
- La néoglucogenèse : qui permet de fournir du glucose à partir de composés non glucidiques. Elle est réalisée dans le foie, les reins et les intestins.

a. La glycogénogenèse

Le glycogène est un polymère de glucose assemblé à partir de G1P. La glycogénogenèse nécessite donc une étape préalable de phosphorylation du glucose. Cette réaction enzymatique est réalisée par une hexokinase (la glucokinase dans le foie), qui phosphoryle une molécule de glucose en position 6 pour obtenir le G6P. La phosphoglucomutase intervient ensuite pour obtenir le G1P à partir du G6P (Figure 15).

Le G1P est ensuite activé en UDP-glucose, la forme active du glucose et substrat des réactions suivantes, sous l'action de l'UDP-glucose pyrophosphorylase et en présence d'UTP (uridine triphosphate). La glycogène synthase transfère ensuite le résidu glucose de l'UDP-glucose à l'extrémité d'une branche de glycogène, en libérant de l'UDP, polymérisant de façon linéaire ainsi le glycogène par l'ajout d'un résidu glucose. Enfin, l'enzyme branchante du glycogène (GBE) permet de relier les chaînes de résidus glucosidiques α -1,4 par des branchements intercaténaux α -1,6 tous les 12 résidus environ (Figure 15). Une molécule de glycogène peut contenir jusqu'à 30 000 résidus glucosidiques.

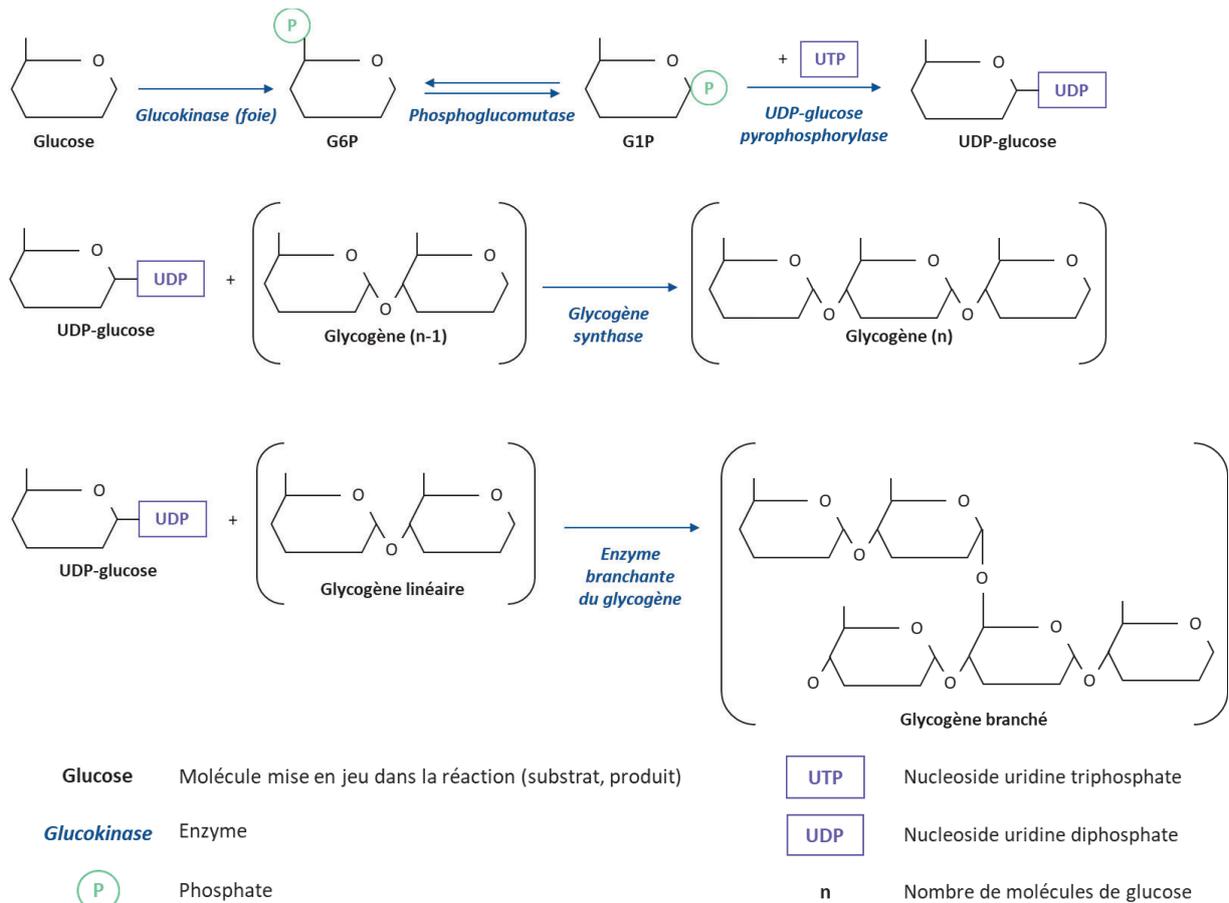


Figure 15: schéma simplifié de la glycogénogenèse
 UDP : uridine diphosphate ; UTP : uridine triphosphate

b. La glycogénolyse

La glycogénolyse est la phosphorolyse du polymère de glucose en résidus glucosidiques simples. Cette dégradation intervient en deux étapes : la première permettant d'obtenir du G1P à partir des chaînes linéaires en α -1,4, et la deuxième permettant le débranchement du glycogène c'est-à-dire la lyse des liaisons en α -1,6.

Le glycogène est tout d'abord clivé par la glycogène phosphorylase, à partir de l'extrémité non réductrice du glycogène, libérant du G1P (Figure 16). Les résidus glucosidiques sont clivés jusqu'à ce qu'il en reste 4 sur la branche. La glycogène phosphorylase n'est pas capable de cliver ces 4 derniers résidus. Le glycogène avec des branches comportant uniquement 4 résidus est appelé dextrine limite. Le G1P libéré est isomérisé en G6P grâce à la phosphoglucomutase, selon la réaction inverse de celle réalisée pour la glycogénogenèse (Figure 15). Le sens de la réaction opérée par la phosphoglucomutase dépend des besoins en glucose :

- Dans le cas d'une glycémie élevée : la production de G1P est favorisée pour former du glycogène, principalement via une régulation dépendante de l'insuline
- Dans le cas d'une faible glycémie ou si la cellule nécessite de l'énergie : la production de G6P est favorisée à la fin de la glycogénolyse

Une autre enzyme est nécessaire pour dégrader la dextrine limite. L'enzyme débranchante du glycogène (GDE) possède deux fonctions enzymatiques : une transférase et une glucosidase. Dans un premier temps, la transférase transfère 3 des 4 derniers résidus non clivés par la glycogène phosphorylase sur une autre chaîne en α -1,4. Dans un second temps, la glucosidase va cliver la liaison α -1,6 pour libérer directement une molécule de glucose (Figure 16).

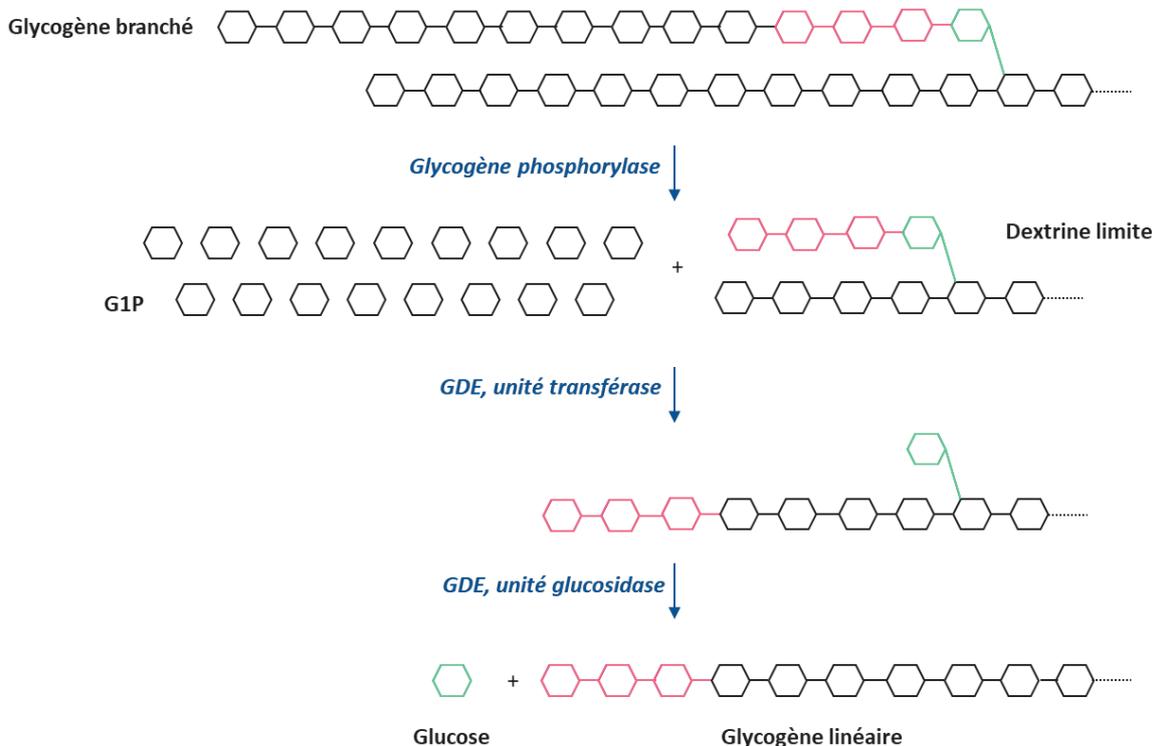


Figure 16 : schéma simplifié de la glycogénolyse

G1P : glucose-1-phosphate ; GDE : enzyme débranchante du glycogène

Le G6P produit à partir du G1P peut être utilisé dans différentes voies métaboliques⁶⁷ selon les conditions métaboliques. Il peut participer à la voie des pentoses phosphates ou à la glycolyse, ou bien être converti en glucose.

La déphosphorylation du G6P en glucose est réalisée par un complexe enzymatique, la glucose-6-phosphatase (G6Pase), localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique dans le foie, les reins et l'intestin, les trois tissus capables de produire du glucose⁶⁸. Ce complexe enzymatique joue un rôle essentiel de maintien de la glycémie par libération de glucose directement dans la circulation sanguine en catalysant la dernière étape de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse.

c. La néoglucogenèse

La néoglucogenèse est la synthèse de glucose à partir de composés non glucidiques : le lactate, le pyruvate, le glycérol, et plusieurs acides aminés. La néoglucogenèse permet ainsi de produire du glucose *de novo* afin d'éviter l'hypoglycémie.

Elle emprunte la plupart des réactions de la glycolyse en sens inverse, exceptées celles qui sont irréversibles et sont contournées (Figure 17).

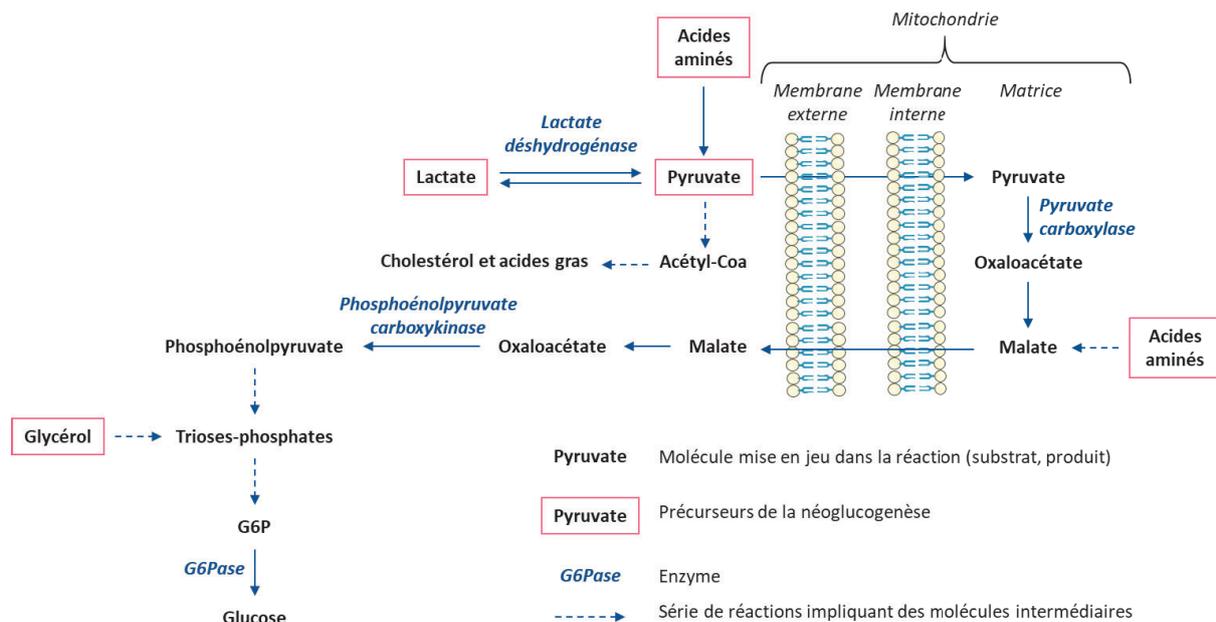


Figure 17: schéma simplifié de la néoglucogénèse

G6P : glucose-6-phosphate ; G6Pase : glucose-6-phosphatase

Le foie, les reins et les intestins sont les seuls organes capables de réaliser la néoglucogénèse.

A noter, il a été mis en évidence que l'activation de la néoglucogénèse intestinale a un impact bénéfique sur le maintien de l'homéostasie énergétique par l'activation d'un axe intestin cerveau, alors qu'une production accrue de glucose par le foie est plutôt délétère et responsable de l'hyperglycémie associée au développement du diabète⁷.

3) Les glycogénoses

Les glycogénoses (GSD, pour *Glycogen Storage Diseases*) regroupent plusieurs pathologies dans lesquelles le métabolisme ou le stockage du glycogène est affecté⁶⁹. Ce sont toutes des maladies monogéniques dans lesquelles les gènes déficitaires sont impliqués dans la synthèse ou la dégradation du glycogène, ou sa régulation.

On comptabilise à ce jour 15 types de glycogénoses (Table 3), dont les symptômes sont très variables d'un type à l'autre et dont l'incidence varie de 1 : 20 000 à 1 : 100 000 naissances.

Le plus souvent, on distingue :

- Les glycogénoses hépatiques, dans lesquelles un phénotype hépatique est caractérisé par des hypoglycémies et une hépatomégalie due à l'accumulation du glycogène dans le foie (GSD 0 ; GSD I ; GSD III ; GSD IV, GSD VI, GSD IX).
- Les glycogénoses affectant les muscles, dans lesquelles les muscles squelettiques et/ou le muscle cardiaque sont touchés (GSD II, GSD III, GSD IV, GSD V, GSD VII, GSD IX, GSD X, GSD XI, GSD XII, GSD XIII, GSD XIV, GSD XV).

Glycogénose	Gène impliqué
GSD 0	<i>Glycogène synthase 1 ou 2 (GYS2 dans le foie ; GYS1 dans les muscles et les autres tissus)</i>
GSD I , maladie Von Gierke	Type a : <i>sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase (G6PC)</i> Type b : <i>transporteur du glucose-6-phosphate (SLC37A4)</i>
GSD II , maladie de Pompe	<i>Alpha-1,4-glucosidase acide (GAA)</i>
GSD III , maladie de Cori ou Forbes	<i>Amylo-α1,6-glucosidase, 4-α-glucanotransférase (AGL)</i>
GSD IV , maladie d'Andersen	<i>Amylo-1,4 à 1,6-transglucosidase (GBE1)</i>
GSD V , maladie McArdle	<i>Glycogène phosphorylase du muscle (PYGM)</i>
GSD VI	<i>Glycogène phosphorylase du foie (PYGL)</i>
GSD VII , maladie de Tarui	<i>Phosphofructokinase du muscle (PFKM)</i>
GSD IX	<i>Phosphorylase kinase (PHKA2, PHKB, PHKG2)</i>
GSD X	<i>Phosphoglycérate mutase du muscle (PGAM2)</i>
GSD XI , maladie Bickel Fanconi	<i>Transporteur 2 de glucose (GLUT2)</i>
GSD XII	<i>Aldolase A (ALDOA)</i>
GSD XIII	<i>β enolase musculaire (ENO3)</i>
GSD XIV	<i>Phosphoglucomutase (PGM1)</i>
GSD XV	<i>Glycogénine (GYG1)</i>

Table 3 : types de glycogénoses et gènes en cause

4) Les glycogénoses de type I

a. *Tableau clinique et prise en charge*

Les glycogénoses de type I (GSD I) sont des maladies génétiques rares, affectant 1 : 100 000 naissances par an, et de transmission autosomique récessive⁷⁰. Elles se manifestent précocement chez le nourrisson par des hypoglycémies sévères lors de périodes de jeûne courtes (entre deux repas).

Les GSD I sont dues à un déficit du complexe enzymatique de la G6Pase localisé au niveau de la membrane interne du réticulum endoplasmique. Ce complexe est formé par la sous-unité catalytique de la G6Pase (G6PC) et le transporteur du G6P (G6PT) (Figure 18). La G6PT est capable de transporter le G6P à l'intérieur de la lumière du réticulum endoplasmique, tandis que la G6PC déphosphoryle le G6P en glucose. Alors que la G6PC est exprimée uniquement dans le foie, le cortex rénal et l'intestin, la G6PT a une expression ubiquitaire. Ainsi, en l'absence de G6Pase, le G6P ne peut être hydrolysé : le G6P s'accumule dans la cellule, tandis que le glucose intracellulaire diminue.

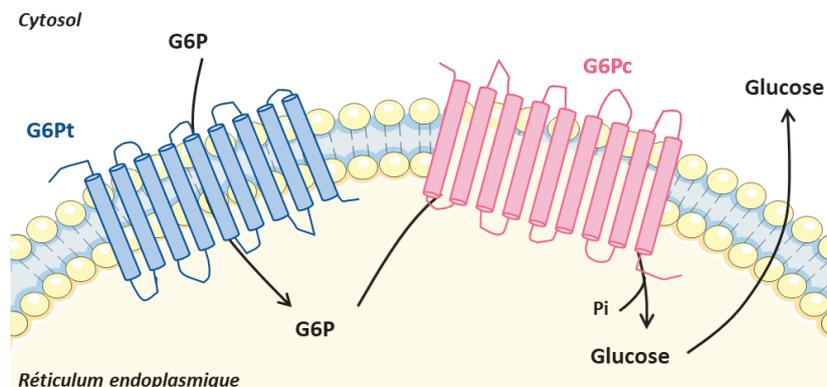


Figure 18: le couplage fonctionnel de la G6PT (en bleu) et de la G6PC (en rose) forme le complexe enzymatique de la glucose-6-phosphatase

Ainsi, on distingue deux types de GSD I :

- Le type Ia : dû à des mutations sur le gène *G6PC*. Le type Ia représente 80% des GSD I⁷¹ et sera détaillé ci-après.
- Le type Ib : dû à des mutations sur le gène codant pour la G6PT (*SLC37A4*). Plus de 40 mutations ont déjà été décrites dans la littérature⁷².

Sur le plan clinique, on peut distinguer :

- Le phénotype hépatique : les patients souffrent d'hypoglycémies sévères lors de jeûnes pouvant entraîner un coma, voire un décès, et d'une hépatomégalie. Avec l'âge, les patients développent une stéatose du foie. De plus, 75-80% des patients de plus de 30 ans développent des adénomes hépatocellulaires (AHC), c'est-à-dire une tumeur bénigne du foie, dont 5 à 10% se transforment en carcinomes hépatocellulaires (CHC), une tumeur maligne du foie^{70,73}.

Au niveau biochimique, les patients présentent également une hyperlactatémie, une hypertriglycéridémie, une hypercholestérolémie et une hyperuricémie.

- Le phénotype rénal : les patients présentent une néphromégalie due à l'accumulation anormale de glycogène dans les reins, associée à une fibrose et à long terme au développement de kystes rénaux⁷⁴. Plus de 70-80% des patients développent une néphropathie qui se caractérise d'abord par une augmentation du débit de filtration glomérulaire, puis par une microalbuminurie puis une protéinurie, et qui peut évoluer vers l'insuffisance rénale. A ce jour, deux cas de carcinome papillaire rénal à cellules claires ont été décrits chez des patients GSD Ia⁷⁵. De plus, certains patients présentent une acidification des tubules rénaux distaux, qui les prédispose à une néphrocalcinose et au développement de calculs rénaux⁷⁰.

A noter qu'il a été montré chez la souris que la pathologie rénale et la pathologie hépatique se développent de façon indépendante⁷⁶. Ainsi, une greffe du foie permet d'éviter les hypoglycémies et le développement de tumeurs hépatiques mais ne permet pas de corriger la maladie rénale.

- Le phénotype intestinal est le plus souvent discret, la principale manifestation étant des diarrhées récurrentes. Certains patients présentent une inflammation de la muqueuse intestinale⁷⁰.
- La faible glycémie constante et les hypoglycémies à répétition entraînent chez l'enfant des retards de développement, ayant pour conséquence des retards de croissance. De plus, le suivi régulier de la croissance est important, car il reflète le contrôle métabolique de la maladie⁷⁰. Un retard de la puberté est également fréquemment observé chez les patients qui sont peu stables métaboliquement. L'ostéoporose est une manifestation fréquemment observées chez les patients adultes⁷⁰.
- Il est commun que les patientes présentent des ovaires polykystiques, sans pour autant entraîner une baisse de la fertilité⁷⁰.
- Les patients atteints de GSD type Ib développent en plus une neutropénie chronique, due à une altération de la fonction des polynucléaires neutrophiles. Cela se traduit par une susceptibilité aux infections bactériennes, et des manifestations gastrointestinales accrues chez ces patients ; en particulier, plusieurs cas de maladie de Crohn ont été décrits chez les patients souffrant de GSD Ib⁷⁰.

A ce jour, il n'existe aucun traitement pour la GSD I. La prise en charge repose uniquement sur l'adaptation du régime alimentaire. Afin d'éviter les hypoglycémies, le régime alimentaire est basé sur la prise de carbohydrates complexes (féculé de maïs crue ou Glycosade®, Vitaflo), et des prises alimentaires plus fréquentes que chez un sujet sain, y compris la nuit⁷⁰. La mise en place d'une sonde délivrant du glucose en continu est souvent envisagée pour pallier le jeûne nocturne, notamment chez les enfants. L'adaptation du régime alimentaire en limitant la consommation de sucres rapides (fructose, lactose, saccharose) permet d'améliorer le phénotype pathologique, mais ne permet pas de corriger complètement tous les marqueurs biochimiques et cliniques⁷³.

Afin de détecter le plus tôt possible d'éventuels AHC et/ou d'améliorer leur prise en charge, le foie doit être contrôlé régulièrement par imagerie et dosages biologiques. La fonction rénale fait également l'objet d'un suivi régulier chez ces patients. En effet, avec l'âge, la plupart des patients développent des AHC/CHC et une maladie chronique rénale, qui peuvent nécessiter une transplantation hépatique et/ou rénale⁷⁰.

Après la réalisation de nombreux essais de thérapie génique dans des modèles de souris ou de chiens atteints de GSD Ia⁷⁷⁻⁸⁰, un essai clinique de thérapie génique a débuté en 2018 pour la GSD Ia (identifiant NCT03517085 sur ClinicalTrial.gov). Cet essai de phase I/II, conduit par Ultragenyx, utilise un vecteur AAV8 exprimant l'ADNc *G6PC* humain sous le contrôle du promoteur endogène humain *G6PC*⁸¹. Des résultats préliminaires ont démontré l'efficacité du traitement chez 3 patients injectés à une faible dose (2.0×10^{12} vg/kg). Dans cette cohorte, il a été observé une amélioration de 80% du délai pour développer un événement hypoglycémique lors d'un test de résistance au jeûne, (« fasting challenge »), en lien avec une réduction de 38% de la consommation quotidienne d'amidon de maïs crue. Une deuxième cohorte de patients a été injectée à une plus forte dose (6.0×10^{12} vg/kg), mais à cette dose, le traitement n'a pas permis d'améliorer le score du test « fasting challenge ». En effet, malgré un traitement par corticostéroïdes, les patients présentent des niveaux d'ALT élevés, ce qui est le signe d'une réponse immunitaire^{82,83}. Dans une troisième cohorte, la dose de 6.10^{12} vg/kg a été reconduite avec un protocole de prise en charge de la réponse immunitaire qui a été amélioré. Il semble que ce protocole adapté ait permis d'obtenir de meilleurs résultats, puisqu'en moyenne les patients de la cohorte 3 ont réduit leur consommation d'amidon cru de 57% (contre 14% dans la deuxième cohorte).

Enfin, deux études précliniques ont montré les potentiels effets bénéfiques de deux molécules de la famille des fibrates (hypolipémiants prescrits pour des hypercholestérolémies et/ou hypertriglycéridémies) dans la prise en charge des GSD I. Une première étude a montré que le fénofibrate permet de diminuer la triglycéridémie, l'accumulation de lipides et de glycogène dans le foie et les reins, et prévient les dommages hépatiques et la néphropathie chez des modèles murins de GSD Ia⁷⁶. Une deuxième étude a montré que le bésafibrate permet de diminuer l'accumulation de lipides et de glycogène hépatique, mais aussi de rétablir le mécanisme d'autophagie qui est défectueux chez un modèle murin de GSD Ia⁸⁴. Bien qu'encore au stade préclinique, ces études présentent l'intérêt d'utiliser des médicaments déjà sur le marché et dont les profils d'efficacité et de sécurité ont été caractérisés et sont bien connus.

Dans la suite de cette thèse, nous ne traiterons que la GSD Ia.

b. Aspects génétiques et métaboliques

Le gène *G6PC* mis en cause dans la GSD Ia est situé en position 17q21.31 et est formé de 5 exons. Plus de 60 mutations affectant ce gène ont été décrites chez des patients GSD Ia dans la littérature^{71,72},

incluant : des mutations faux sens, non-sens, des délétions et des insertions, et des mutations affectant l'épissage du gène⁷¹. Ces mutations sont réparties sur les 12,5 kb du gène, et aucune relation génotype-phénotype claire n'a pu être établie à ce jour.

i. Phénotype hépatique

Dans le foie, le G6P est au carrefour de nombreuses voies métaboliques soit en tant que substrat, soit en tant que produit. Son accumulation modifie les équilibres métaboliques au sein de la cellule et conduit à une activation de la glycogénogenèse, de la glycolyse, de la lipogenèse *de novo* et de la voie des pentoses-phosphate⁶⁷. Ceci entraîne une augmentation de la synthèse du glycogène, des acides gras, du cholestérol, de l'acide urique et du lactate (Figure 19).

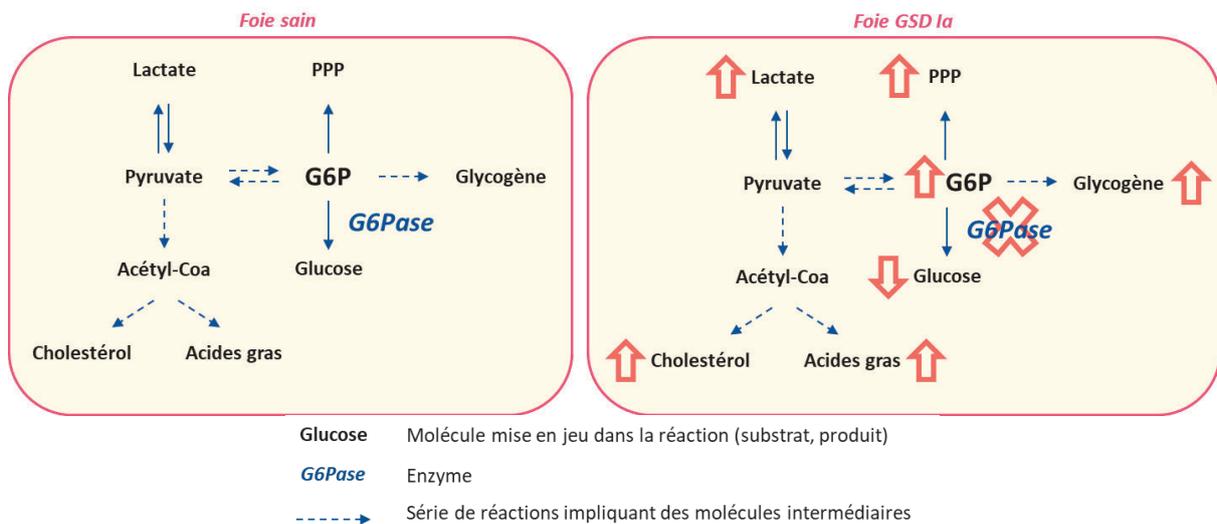


Figure 19: dérégulations métaboliques hépatiques suite au déficit en G6PC

PPP : voie des pentoses phosphates

Ainsi, les altérations métaboliques observées dans le cadre de la GSD Ia sont très similaires à celles d'une cellule cancéreuse. En effet, l'accumulation de G6P dans les hépatocytes déficients en G6Pase conduit à l'accumulation de glycogène qui peut être source de stress cellulaire, à un métabolisme tourné vers la glycolyse (effet Warburg), à l'augmentation de la production de triglycérides (associée à une diminution de leur oxydation) qui sont nécessaires à la production de membranes cellulaires. Ces altérations entraînent une perte de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, un stress chronique du réticulum endoplasmique, et un défaut de l'autophagie, et favorisent la formation de tumeurs et leur progression (Figure 20)⁸⁵.

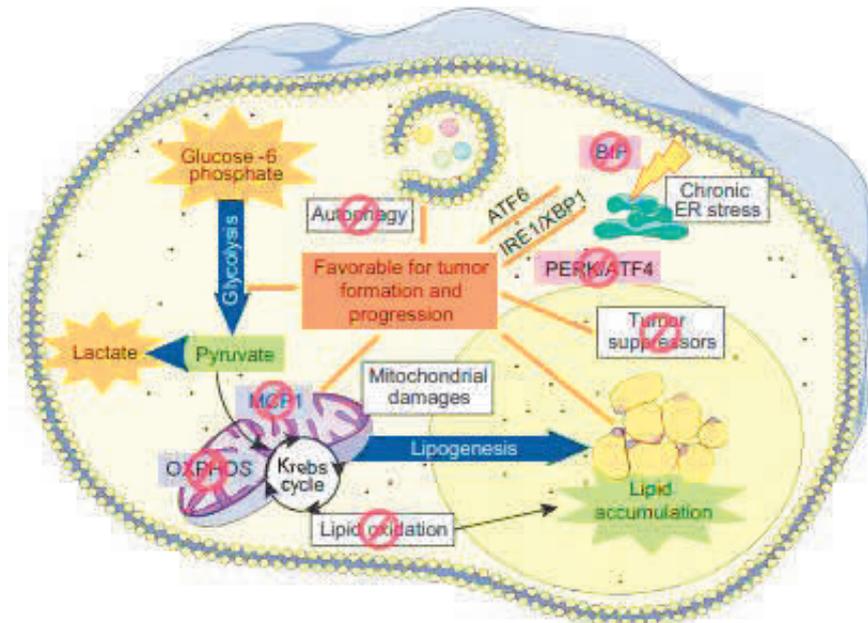


Figure 20: altérations du métabolisme et modifications des voies de signalisation conduisant au développement de tumeurs dans les hépatocytes GSD 1a

Dans un modèle murin de la GSD 1a, les dysfonctionnements du métabolisme dus au déficit en G6Pase conduisent à un métabolisme altéré similaire à celui observé dans des tumeurs. L'accumulation de G6P entraîne une surproduction de lactates et de lipides. En conséquence, la respiration mitochondriale est altérée. On observe également un déficit de l'autophagie et des défenses antioxydantes, un stress du réticulum endoplasmique, et enfin une perte de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces paramètres conditionnent un environnement favorable au développement tumoral.

Source : Gjorgjieva M. et al., *Hepatology*, 2018 (85)

Le phénotype hépatique observé dans la GSD 1a est le miroir de ces altérations métaboliques et est caractérisé par une stéatose hépatique, qui n'est pas associée au développement d'une fibrose. Chez les patients, l'inflammation du foie est aussi très discrète.

Contrairement au schéma de tumorigenèse hépatique classique qui mène au développement de CHC sur un foie fibrotique/cirrhotique, les patients ou les souris GSD 1a développent d'abord des AHC, en l'absence de fibrose mais sur un foie stéatosique, mais avec un taux élevé de transformation (estimé à 10%) en CHC⁸⁵.

ii. Phénotype rénal

Comme dans le foie, le déficit en G6PC dans les reins conduit à l'accumulation de G6P, de glycogène et de lipides, responsables de la dilatation des tubules.

Contrairement au foie, l'accumulation de lipides (ou de dérivés lipidiques) conduit au développement d'une fibrose, et ceci indépendamment de l'accumulation de glycogène. Chez la souris modèle de la GSD 1a, il a été montré que les lipides et les dérivés lipidiques activent le système rénine angiotensine⁸⁶ favorisant l'expression du facteur profibrotique TGF- β 1 (facteur de croissance transformant bêta). La fibrose conduit à des lésions tubulaires puis glomérulaires. En lien avec cette dégradation de la barrière de filtration glomérulaire, on observe une albuminurie et l'accumulation de déchets (comme l'urée) dans le sang, qui marquent la perte de la fonction rénale⁸⁶. Comme observé initialement dans le modèle murin, les patients développent des kystes rénaux qui apparaissent à un stade tardif de la maladie rénale, précédant l'insuffisance rénale⁷⁴.

c. La thérapie génique pour GSD Ia

Suite à la caractérisation des mutations affectant le gène *G6PC*, et au développement de modèles murins ou canins de la GSD Ia, plusieurs programmes de développement d'une thérapie génique pour cette pathologie se sont multipliés aboutissant à un essai clinique de thérapie génique (NCT03517085) débuté en 2018.

i. Les modèles animaux de GSD Ia

Plusieurs modèles d'animaux développant une GSD Ia existent, qu'ils soient spontanés ou modifiés génétiquement⁸⁷.

Le premier modèle développé et caractérisé est celui de la souris *G6pc*^{-/-} total, généré par une interruption de l'exon 3, partie codante pour le site catalytique de l'enzyme. Ces souris présentent donc une perte d'activité G6Pase dans tous les tissus néoglucogéniques⁸⁸.

Les souris *G6pc*^{-/-} reproduisent la physiopathologie humaine avec des manifestations hépatiques (hépatomégalie, hypoglycémie) et rénales (néphromégalie). L'hypoglycémie observée chez ces animaux est tellement sévère qu'une supplémentation en glucose est nécessaire dès la fin du sevrage, et seulement 10% environ des souris *G6pc*^{-/-} survivent au-delà de 5 semaines⁸⁸. En raison de cette espérance de vie réduite, ce modèle n'est toutefois pas adapté pour étudier les conséquences à long-terme de la maladie (tumeurs hépatiques et maladie rénale).

Il existe également un modèle canin spontané de la GSD Ia de l'espèce des bichons maltais⁸⁹. Ce modèle est *G6pc*^{-/-} total, en raison d'une mutation faux sens dans le gène *G6pc*⁹⁰. Ces chiens reproduisent également les signes cliniques observés chez l'homme : hypoglycémie sévère, hépatomégalie, néphromégalie⁹⁰. La survie moyenne de ces chiens est de 5 à 8 semaines avec supplémentation en glucose⁸⁹.

Afin de stabiliser le modèle, Kishnani et al. ont croisé le bichon maltais GSD Ia avec des beagle et obtenu un nouveau modèle canin *G6pc*^{-/-} total⁹¹. Ce croisement a permis d'augmenter le nombre de nouveau-nés dans les portées, et d'améliorer la survie bien que l'espérance de vie reste courte malgré une prise en charge diététique. Le modèle reproduit également le phénotype hépatique et rénal⁹¹.

Plus récemment, des modèles de délétion de l'exon 3 du gène *G6pc*, spécifiquement dans un des tissus néoglucogéniques ont été développés grâce à la technique CRE-lox. Les souris L.*G6pc*^{-/-} présentent une perte totale de l'activité G6Pase uniquement dans le foie⁹², tandis que les souris K.*G6pc*^{-/-} présentent une perte partielle (50%) de l'activité G6Pase dans les reins^{74,86}. L'absence de G6PC dans uniquement un tissu permet aux autres organes glucoformateurs non ciblés (foie, reins ou intestins) de maintenir une glycémie suffisante. Cependant, les souris L.*G6pc*^{-/-} ne sont pas capables de mobiliser leur glycogène hépatique et présentent des hypoglycémies après quelques heures de jeûne (2 à 8h). Après induction de la néoglucogénèse rénale et intestinale, ces souris ont une glycémie similaire à celles de souris saines après 24h de jeûne⁹². Ainsi, en plus de reproduire les caractéristiques de la pathologie observées chez l'homme⁹²⁻⁹⁴, ces modèles permettent de s'affranchir des problématiques liées aux hypoglycémies sévères qui conduisent aux décès des animaux *G6pc*^{-/-} totaux. En particulier, ces modèles murins de GSD Ia hépatique ou rénale ont une espérance de vie de plus de 18 mois et développent toute les complications hépatiques (stéatose associée au développement d'AHC et CHC)^{85,92} et rénales (maladie chronique rénale et kystes)⁷⁴.

ii. Transduire durablement le foie GSD la grâce à un AAV

Plusieurs équipes de recherche ont développé des approches de thérapie génique pour la GSD Ia^{78,95,96}. Dès 2002, Beaty et al. ont montré la faisabilité d'une approche de thérapie génique par AAV chez un modèle canin de GSD Ia⁹⁵. Néanmoins, plusieurs résultats ultérieurs obtenus par des groupes différents ont mis en évidence une difficulté à transduire durablement les foies des souris GSD Ia.

En 2006, Koeberl et al. ont injecté des souris *G6pc*^{-/-} de 2 semaines avec un AAV8 exprimant la G6PC humaine (hG6PC) sous le contrôle du promoteur endogène de la G6PC humaine (hGPE) à une dose de 1×10^{12} vg/souris⁹⁷. Ils ont observé une correction partielle de la glycémie 15 jours après l'injection (Figure 21). Néanmoins, avec le temps, la glycémie a diminué atteignant des niveaux inférieurs à 60 mg/dL à l'état nourri. En parallèle, ils ont noté une diminution du nombre de copies du vecteur au cours du temps⁹⁷.

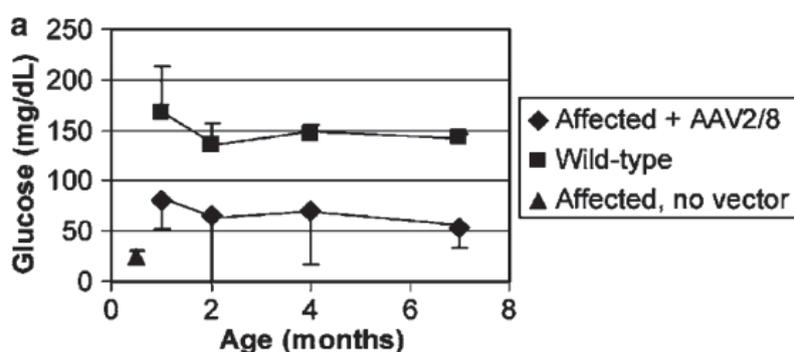


Figure 21: perte de la correction de la glycémie chez des souris *G6pc*^{-/-} injectées avec un AAV8-hGPE-hG6PC.

La glycémie des souris *G6pc*^{-/-} non traitées (triangle) ou traitées (losange) par un vecteur AAV8 exprimant la G6PC humaine, et de souris saines (wild-type, carrés) est suivie, sans mise à jeun, jusqu'à 7 mois après injection des AAV.

Source : Koeberl et al., *Gene Ther*, 2006 (97)

Cette difficulté à transduire efficacement et durablement le foie GSD Ia chez les souris *G6pc*^{-/-} a également été mise en évidence par une autre équipe travaillant également sur le modèle murin total. Avec une première injection néonatale d'un AAV1 exprimant la G6PC à 5×10^{11} vg/souris, Gosh et al. n'ont pu prévenir complètement la mort des souris *G6pc*^{-/-} : plus de la moitié des souris sont décédées probablement en raison de la dilution du vecteur suite à la croissance hépatique. La réinjection de souris avec le même vecteur à une dose trois fois plus élevée une semaine après la première injection néonatale a permis la survie de toutes les souris traitées, et la correction de la glycémie⁷⁷. Luo et al. ont également observé ce phénomène chez la souris *G6pc*^{-/-} injectée avec un AAV9 exprimant la G6PC⁹⁸.

Cette problématique se retrouve chez le modèle canin. En effet, un AAV8 exprimant la G6PC sous le contrôle du promoteur CBA (promoteur du gène de la beta actine du poulet, « chicken beta actin ») injecté à des chiens GSD Ia de 1 jour à une dose de 5×10^{13} vg/kg a permis la prévention des hypoglycémies jusqu'à un mois post-injection⁷⁹. Toutefois, les niveaux n'étaient pas similaires à ceux observés chez les chiens hétérozygotes, et l'effet a été perdu dès les deux mois pos-injection⁷⁹ (Figure 22).

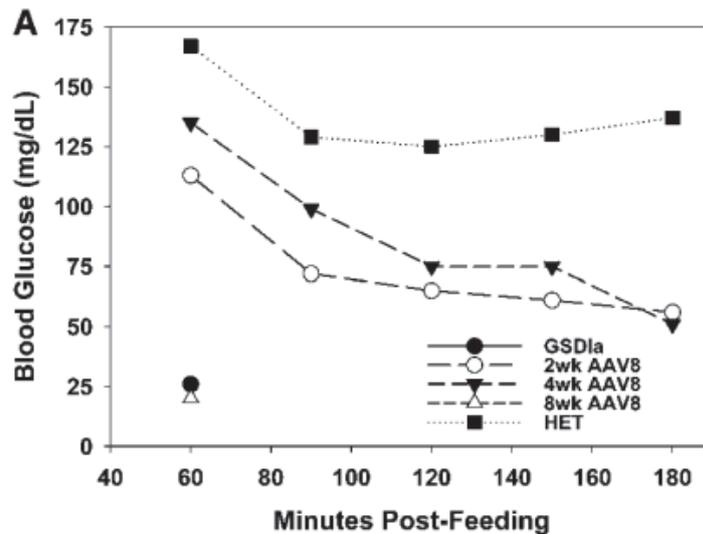


Figure 22: perte de la correction de la glycémie chez des souris $G6pc^{-/-}$ injectées avec un AAV8-CBA-hG6PC.

Suivi de la glycémie pendant 3 heures après un repas chez des souris $G6pc^{-/-}$ non traitées (GSD 1a, rond noir), ou 2 (ronds blancs), 4 (triangles noirs) et 8 (triangles blanc) semaines après injection d'AAV8, et chez des souris $G6pc^{-/+}$ hétérozygotes (HET). Les animaux en hypoglycémie (<50 mg/dl) ont été re-nourris.

Source : Weinstein et al., *Hum Gene Ther*, 2010 (79)

La difficulté à transduire les foies GSD 1a efficacement et durablement a été confirmée par une publication rapportant les cas de chiens $G6pc^{-/-}$ qui ont nécessité de multiples réinjections d'AAV exprimant la G6PC au cours du temps afin de maintenir des niveaux satisfaisants de glycémie³³.

Toutefois, ces résultats doivent être pondérés au regard de l'âge auquel les animaux ont été injectés. En effet, en raison de la faible survie des modèles $G6pc^{-/-}$ au-delà du sevrage, les animaux ont été injectés à quelques jours de vie. Or, dans un foie en croissance, Cunningham et al. ont montré une perte de l'expression du transgène due à la dilution de l'AAV sous forme épisomale dans les cellules en prolifération⁹⁹.

Cependant, il semblerait que la restauration d'une activité G6Pase même faible, autour de 3-5% de l'activité de souris saines (« wild-type »), permet de prévenir les hypoglycémies^{95,80,100}. Ainsi, plus récemment, Koeberl et al. ont obtenu un maintien de la correction de la glycémie entre 6 mois (chez la souris) et 1 an (chez le chien)⁹⁶, après réinjection de vecteurs AAV-hG6PC de sérotypes différents.

Enfin, une des problématiques majeures pour le traitement de la GSD 1a est la prévention des complications à long-terme, c'est-à-dire les tumeurs hépatiques et la maladie rénale. Kim et al. ont montré que la restauration d'une activité de la G6Pase supérieure à 2% de l'activité G6Pase wild-type prévient l'apparition de HCA, suite à l'injection d'un AAV exprimant la G6PC humaine sous le contrôle du promoteur hGPE dans un modèle $G6pc^{-/-}$ total¹⁰⁰. De plus, la thérapie génique a permis de réguler les voies de signalisations activées dans l'inflammation et la tumorigenèse dans les foies GSD 1a¹⁰¹. Dans le modèle canin, cet effet préventif n'est pas aussi clair et les résultats obtenus sont plus controversés. En effet, dans une première étude, malgré une activité G6Pase élevée obtenue par transfert d'un AAV (21 à 52% de l'activité G6Pase wild-type), 4 chiens sur 5 ont développé des tumeurs hépatiques (HCA ou CHC), et 3 chiens sur 5 ont développé une maladie rénale chronique en raison de la faible transduction des reins¹⁰². Dans une deuxième étude, Lee et al. n'ont observé aucune complication à long-terme chez les sept chiens inclus dans l'étude³⁷. Cette différence a été attribuée à un contrôle strict du régime alimentaire dans la deuxième étude, qui permet un meilleur contrôle métabolique de la maladie, et qui pourrait être responsable de la meilleure efficacité de la thérapie

génique. A noter toutefois, dans cette deuxième étude, la glycémie des chiens traités diminue au cours du temps, signe d'une perte d'efficacité, et les chiens sont décédés à un âge de 5,9 ans en moyenne³⁷.

Ainsi, cibler le foie dans la GSD la apparaît comme un véritable défi : seul un faible pourcentage des hépatocytes est efficacement transduit et le plus souvent temporairement, alors que la pathologie nécessite une prise en charge précoce et surtout durable afin de prévenir les complications à long-terme.

5) La glycogénose de type III

a. Aspects génétiques et métaboliques

La glycogénose de type III (GSD III) est une maladie génétique rare, affectant 1 : 100 000 naissances par an, et de transmission autosomique récessive¹⁰³. Elle est due à des mutations sur le gène *AGL* codant pour la GDE (amylo- α 1,6-glucosidase, 4- α -glucanotransférase), en position 1p21.2 du génome humain¹⁰⁴. Il existe deux types de GSD III :

- Le type a, dans lequel les phénotypes hépatique et musculaire sont observés.
- Le type b, dans lequel aucun phénotype musculaire n'est observé, tandis que le foie est affecté.

Le gène *AGL* comprend 35 exons, et les mutations recensées chez les patients GSD III sont nombreuses (plus de 170 mutations différentes^{103,105}) et diverses : faux-sens, non-sens, insertions, délétions¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Bien que certaines mutations soient préférentiellement associées au type a ou b^{109,110}, aucune corrélation certaine entre le génotype et phénotype n'a été établie. En particulier, les mutations observées dans le domaine transférase ne conduisent pas à un phénotype spécifique, par rapport aux mutations observées dans le domaine glucosidase.

L'absence de GDE dans la GSD III conduit à l'accumulation de glycogène de structure anormal, la limite dextrine⁶⁶, avec des branches accessibles courtes de 4 résidus glucosidiques (Figure 23).

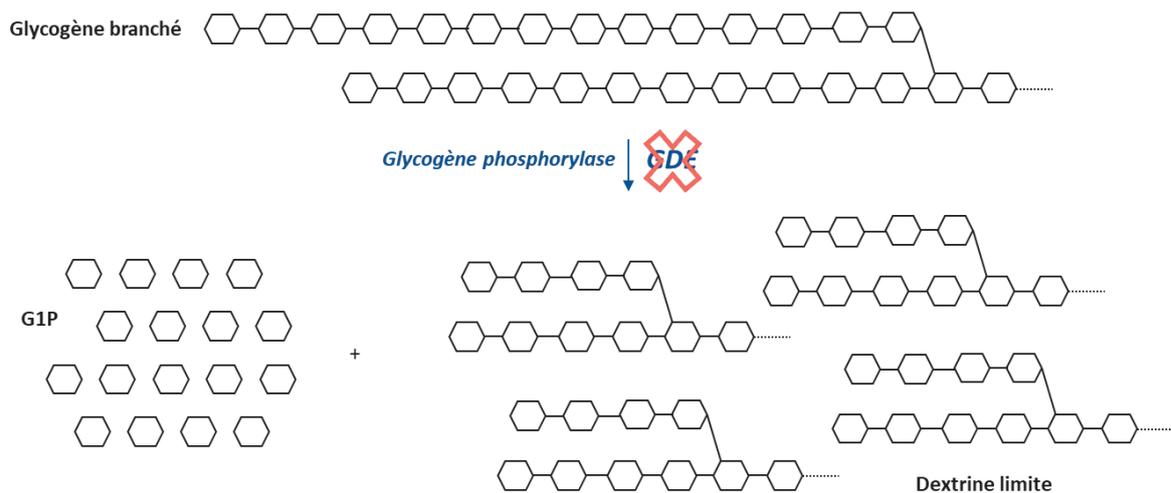


Figure 23: dégradation cytosolique du glycogène dans le foie GSD III.

L'accumulation du glycogène dans le foie est responsable de l'hépatomégalie, tandis que l'impossibilité de produire du glucose à partir du glycogène en quantité suffisante conduit à des hypoglycémies et à un métabolisme détourné pour produire de l'énergie¹¹¹. Dans les muscles, l'accumulation de glycogène

dans de larges vacuoles modifie l'architecture des fibres, conduisant à un éloignement des myofibrilles entre elles et à une diminution de la force musculaire^{111,112}.

b. Tableau clinique et prise en charge

La GSD III est le plus souvent diagnostiquée pendant l'enfance mais certains patients développent un tableau clinique plus tardif. En France, 187 patients GSD III ont été recensés. Sur le plan clinique, on peut distinguer deux phases d'évolution de la maladie :

- L'enfance : la manifestation de la maladie est surtout hépatique et métabolique. Les patients souffrent d'hypoglycémies lors de jeûnes et d'hépatomégalie. Un retard de croissance peut être observé en cas de déséquilibre métabolique non contrôlé^{103,111}.
- L'adolescence et la période adulte : l'hépatomégalie régresse, et une faiblesse musculaire progressive, pouvant amener à la perte de la marche, apparaît¹⁰³. Les patients peuvent présenter une fibrose hépatique, voire une cirrhose, et 2 à 5% d'entre eux développent des CHC à l'âge de 30 ans^{103,113}. A ce jour, 10 patients GSD III ayant développé un CHC ont été recensés dans le monde¹⁰⁵. Neuf d'entre eux présentaient une fibrose ou une cirrhose, et deux présentaient des AHC¹¹⁴. Enfin, les patients présentent fréquemment une cardiomyopathie à un stade plus ou moins sévère (hypertrophie du ventricule gauche, généralement asymptomatique)^{103,111}.

De plus, bien que le phénotype hépatique semble régresser avec l'âge, les concentrations sanguines de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) sont élevées chez les patients GSD III¹¹⁵ ce qui est le signe d'une hépatotoxicité probablement due à l'accumulation de glycogène.

A l'heure actuelle, la prise en charge thérapeutique de la pathologie repose uniquement sur l'adaptation du régime alimentaire. Les sucres simples doivent être évités afin de réduire la synthèse de glycogène. Afin de prévenir les hypoglycémies, un régime alimentaire à base de carbohydrates complexes (amidon de maïs cru ou Glycosade®, Vitaflo) et des prises alimentaires fréquentes sont mis en place, y compris pendant la nuit^{103,111}. En cas de crise hypoglycémique, des perfusions de glucose sont nécessaires.

Dans la GSD III, la néoglucogenèse est fonctionnelle. Un apport en substrats de la néoglucogenèse permet donc de produire du glucose dans le sang. Un régime riche en protéines permet donc d'induire la néoglucogenèse et améliore le maintien de la glycémie. Chez les adultes, un apport protéique important est avantageux, du fait de l'atteinte musculaire qui s'aggrave. De plus, un régime alimentaire riche en lipides et en protéines a montré son efficacité dans la prévention des cardiomyopathies hypertrophiques¹¹⁶⁻¹²¹.

c. La thérapie génique pour GSD III

i. Les modèles animaux

Plusieurs modèles animaux de la GSD III, canin ou murin, spontané ou non, existent.

Le modèle canin est un retriever à poil bouclé. La mutation est une délétion apparue spontanément dans l'exon 32 du gène *Agl*, qui conduit à des niveaux de GDE réduits^{122,123}. Les chiens GSD III sont de

bons modèles pour GSD III car ils présentent la plupart des signes cliniques observés chez l'homme. Tout comme chez les patients GSD III, le glycogène s'accumule dans le cœur, le foie, et les muscles squelettiques. Ils présentent une atteinte musculaire progressive, une hépatomégalie^{102,122,123}, des nodules hépatiques et une cirrhose^{102,123}. Comme chez les patients GSD III, l'hépatomégalie régresse en raison de l'installation d'une fibrose puis d'une cirrhose. Les taux plasmatiques des ASAT, ALAT et d'alkaline phosphatase sont élevés, signes de l'atteinte hépatique¹²³. Toutefois, leur espérance de vie n'est pas affectée par la pathologie, les chiens GSD III vivent en moyenne 11 à 12 ans^{102,122,123}.

Le premier modèle murin développé est la souris *AgI*^{EX5-/-}. Il a été obtenu en insérant un site accepteur d'épissage et une cassette de queue polyA entre les exons 5 et 6 du gène *AgI*, ce qui conduit, après l'épissage, à un ARNm tronqué au milieu de l'exon 5¹²⁴. La protéine produite ne comporte pas les deux sites catalytiques. Les niveaux de GDE sont indétectables et l'activité enzymatique est fortement diminuée dans le foie, le cœur, et les muscles squelettiques (entre 10 et 20% de l'activité normale selon les tissus)¹²⁴. Le glycogène est accumulé dans le foie, le cœur, et les muscles squelettiques. En conditions d'hébergement et de nutrition classique, l'espérance de vie n'est pas affectée. Cependant, lorsque les souris sont soumises à des jeûnes répétés, la moitié d'entre elles meurent avant 12 mois d'âge. Les souris présentent une hépatomégalie, et une fibrose avec l'âge. Le phénotype musculaire se manifeste tardivement, vers 12 mois d'âge.

Un autre modèle murin, les souris *AgI*^{EX32-/-} a été développé par délétion des séquences de l'exon 32 à l'exon 34 du gène *AgI*, conduisant à une délétion des acides aminés de l'activité glucosidase et du domaine de liaison au glycogène¹²⁵. La protéine GDE est absente, et l'activité enzymatique est nulle. L'accumulation de glycogène est importante dans le foie et les muscles, entraînant une hépatomégalie et des dommages musculaires conséquents. Le phénotype musculaire est bien plus prononcé dans ce modèle de GSD III, avec une faiblesse musculaire qui apparaît dès 2 mois d'âge. Cependant, le phénotype hépatique n'est pas aussi représentatif de la clinique humaine que dans le premier modèle murin développé. En effet, bien que les dommages hépatiques soient évidents au niveau histologique, aucune inflammation, ni fibrose, ni cirrhose, ni HCA ou CHC n'ont été observés même à 18 mois d'âge. A noter, le taux de mortalité est très élevé (environ 50% à 12 mois).

En 2018, notre équipe a publié un nouveau modèle murin et une stratégie de thérapie génique pour la GSD III¹¹². J'ai pu participer à cette publication lors de mon stage de master II et au début de ma thèse. Ce modèle a été obtenu en remplaçant les exons 6 à 10 du gène *AgI* avec une cassette exprimant la néomycine, et en croisant ces souris avec des souris BALB/c, afin que les altérations métaboliques soient moins sévères. Ceci a permis d'augmenter la survie des animaux par rapport aux modèles précédents, puisque la totalité des souris vivent au-delà d'une année. De plus, dans ce modèle, nous avons caractérisé une atteinte musculaire (accumulation de glycogène, réduction de la force musculaire entre autres) contrairement au modèle *AgI*^{EX5-/-}, et également une atteinte hépatique bien établie (accumulation de glycogène, hépatomégalie, baisse de la glycémie) contrairement au modèle *AgI*^{EX32-/-}. De plus, aucune expression ni activité de la GDE n'ont été observées au niveau hépatique et musculaire. Finalement, une accumulation de glycogène dans le cœur, les muscles et dans le cerveau a été observée.

De façon intéressante, Lim et al. ont récemment développé un modèle murin de GSD III avec également une délétion des exon 6-10¹²⁶. Dans ce modèle, la protéine GDE est absente dans le foie, le cœur, et les muscles squelettiques, et en parallèle, le glycogène est accumulé dans ces tissus et dans certaines zones du cerveau et de la moelle épinière. Les souris présentent également une hépatomégalie, une fibrose hépatique, une intolérance à l'exercice, et une altération de la fonction musculaire. Cependant, contrairement à notre modèle, ces souris ne présentent pas d'hypoglycémie.

ii. Stratégies de thérapie génique pour GSD III

La séquence codante d'*AGL* mesure 4,6 kb. Malgré l'utilisation d'un promoteur et d'un signal de polyadénylation réduits, la cassette minimale pour GDE dépasse les 5kb, au-delà des 4,7kb autorisés par la capacité d'encapsidation de l'AAV sauvage.

Néanmoins, quelques équipes ont pu obtenir l'encapsidation efficace de transgènes allant jusqu'à 5,2kb^{53,54,127,128}, mais augmenter la taille du transgène conduit à une baisse du rendement lors de la production de l'AAV.

Certaines stratégies peuvent être envisagées afin de résoudre ce problème (cf Introduction, II, D, 3)). Dans notre publication de 2018¹¹², nous avons opté pour deux stratégies différentes.

Dans cette étude, la taille de la séquence codante du gène *AGL* étant supérieure à celle de la capacité d'encapsidation des AAV, une première approche a consisté à injecter un AAV encapsidant une version modifiée de la séquence codante de la GAA (alpha-1,4-glucosidase acide), l'enzyme responsable de la dégradation lysosomale du glycogène, pour la rendre sécrétable par le foie, à une dose de 1×10^{11} ou 1×10^{12} vg/souris. Ce vecteur a été mis au point dans le laboratoire pour le traitement de la glycogénose de type II¹. Dans la GSD III, cette approche a permis de diminuer l'accumulation du glycogène dans le foie, mais pas dans les muscles, sans néanmoins corriger l'hypoglycémie et l'hépatomégalie.

Une autre approche a donc été envisagée. Cette stratégie repose sur la méthode de l'« overlapping » (Figure 13A) : deux vecteurs AAV sont utilisés, l'un contenant le promoteur et la partie 5' de la séquence codante *AGL*, et l'autre codant la partie 3' de la séquence codante *AGL* et un signal de polyadénylation. Ces deux vecteurs comportent une séquence identique, qui permet une fois que les deux AAV ont transduit la même cellule, la recombinaison des séquences en un unique transgène. Chacun des AAV ont été injectés à une dose de 1×10^{12} vg/souris.

Le choix du promoteur est important pour obtenir des niveaux d'expression du transgène importants. L'injection des vecteurs « overlapping » comportant un promoteur fort CMV (promoteur du cytomégalovirus) chez des souris *Agl*^{-/-} à l'âge de 3 mois a permis la correction de l'accumulation du glycogène dans les muscles squelettiques et le cœur, ainsi que la restauration de la force musculaire jusqu'à 3 mois après le traitement. Cependant, malgré une bonne transduction du foie, l'accumulation du glycogène hépatique, la glycémie, et l'hépatomégalie n'ont pas été corrigées. En effet, il s'avère que le promoteur CMV a été inactivé dans le foie, comme cela avait déjà été observé dans une autre étude¹²⁹.

La même stratégie « overlapping » utilisant un promoteur hAAT (promoteur de l'antritypsine humaine α) dans un AAV8, a montré également une correction partielle du phénotype hépatique. En effet, le vecteur a permis la correction de la glycémie un mois après l'injection, mais cette correction a été perdue dès le deuxième mois après l'injection. De plus, malgré la correction de l'accumulation de glycogène hépatique, l'hépatomégalie n'a pas été corrigée.

Lim et al. ont également développé une approche de thérapie génique pour la GSD III¹²⁶. Leur stratégie repose sur un vecteur AAV exprimant la pullulanase, une GDE bactérienne (*Bacillus subtilis*) dont la taille est compatible avec l'utilisation d'un AAV. Ce traitement a permis de réduire l'accumulation du glycogène hépatique et musculaire, et *in fine* a permis d'améliorer les fonctions hépatiques et musculaires. Cependant, comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe précédent (III, A, 5, c, i), le modèle utilisé ici ne présente pas d'hypoglycémie, ne permettant pas de tester l'efficacité du traitement sur ce paramètre. De plus, en lien avec le transfert du gène d'une protéine bactérienne, les aspects immunologiques sont à prendre en compte.

B. L'hypophosphatémie liée au chromosome X

1) Le métabolisme osseux

a. *Organisation du tissu osseux*

Le tissu osseux contient divers types cellulaires :

- Les ostéoblastes : ce sont des cellules ostéoformatrices situées à la surface du tissu osseux. Les ostéoblastes synthétisent de nombreux constituants de la matrice extracellulaire, ils sont donc riches en organites liés à la synthèse protéique (réticulum, appareil de Golgi). Les ostéoblastes peuvent devenir des cellules bordantes ou des ostéocytes, ou bien entrer en apoptose.
- Les cellules bordantes : ce sont des ostéoblastes au repos, susceptibles d'être mobilisés si la zone où elles se situent entre en phase de formation ou de résorption de tissu.
- Les ostéocytes : ce sont des ostéoblastes qui se sont différenciés en s'entourant intégralement de matrice extracellulaire. Les ostéocytes participent au maintien de la matrice extracellulaire et à l'homéostasie du calcium.
- Les ostéoclastes : ce sont des cellules plurinucléées situées à la surface des os. Une fois activés, les ostéoclastes sont capables de résorber la matrice grâce à leur grande mobilité et leur appareil lysosomal abondant. Ils possèdent une bordure en brosse au pôle apical.

La matrice extracellulaire du tissu osseux est très solide. Elle est constituée d'une phase organique et d'une phase minérale. La partie organique est produite par les cellules ostéoformatrices, et est composée de fibres de collagène (principalement du type I), de protéoglycanes, et d'ostéopontine (reliant l'hydroxy-apatite aux cellules osseuses). La phase minérale est constituée de cristaux d'hydroxy-apatite, c'est-à-dire des cristaux de phosphate de calcium, et qui expliquent la dureté de l'os. Cette phase minérale fait de l'os un réservoir de calcium et de phosphate.

b. *Re modelage du tissu osseux*

Le tissu osseux est en constant renouvellement, sous contrôle de différents facteurs et hormones (Figure 24). Le calcium et le phosphate nécessaires à la minéralisation du tissu osseux viennent de l'alimentation par absorption dans les intestins, sous l'action de la 1,25-dihydroxy-vitamine D (la forme active de la vitamine D), ou bien issus de la réabsorption dans les reins.

Sous l'action de facteurs ostéorésorbants, dont la parathormone (ou hormone parathyroïdienne, PTH), les cellules bordantes autorisent l'accès à la matrice par les ostéoclastes. Les ostéoclastes dissolvent alors la phase minérale en l'acidifiant, puis la phase organique en sécrétant des enzymes protéolytiques.

Les ostéoblastes interviennent ensuite en deux étapes. Dans un premier temps, et sous l'action notamment de la 1,25-dihydroxy-vitamine D et de protéines morphogéniques osseuses (BMP), ils produisent de la matrice. Le tissu créé est appelé ostéoïde car il n'est pas encore minéralisé. Dans un second temps, les ostéoblastes minéralisent ce tissu sous l'action notamment de la vitamine D.

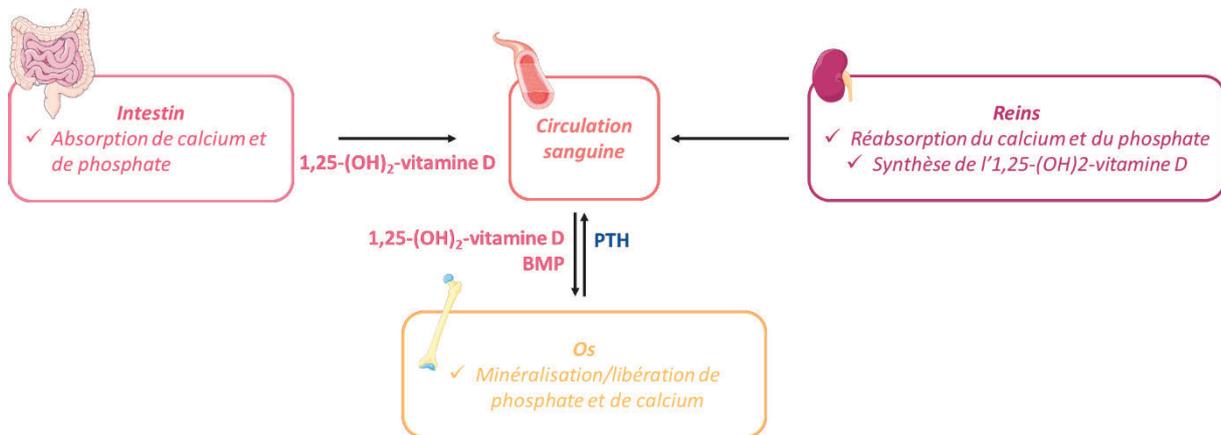


Figure 24: régulation du métabolisme osseux

PTH : hormone parathyroïdienne, BMP : protéines morphogéniques osseuses

2) Aspects génétiques et métaboliques

L'hypophosphatémie liée à l'X (*X-linked hypophosphatemia*, XLH) est due à des mutations sur le gène *PHEX* (homologue de l'endopeptidase régulatrice du phosphate lié à l'X)¹³⁰. *PHEX* est localisé sur le chromosome X, au locus Xp22.11 ; la transmission est donc liée à l'X et est dominante.

PHEX code pour une endopeptidase, dont les cibles protéiques ne sont pas connues. La *PHEX* est impliquée dans la régulation du phosphate au niveau de l'organisme. Les mutations de *PHEX* conduisent à une élévation du facteur FGF-23 (*fibroblast growth factor 23*, le facteur de croissance de fibroblaste 23) circulant. A ce jour, le mécanisme d'interaction entre *PHEX* et le FGF-23 n'est pas élucidé.

Le FGF-23 est une protéine de 251 acides aminés sécrétée par les ostéocytes. Sous sa forme précurseur, elle possède 25 acides aminés en N terminal, qui sont absents dans la forme active du FGF-23. Le FGF-23 actif est clivé par une furine qui reconnaît la séquence Arg176-X-X-Arg179 (RXXR), qui donne lieu à deux produits protéiques inactifs (Figure 25). En particulier, la protéine tronquée de 180 à 251 acides aminés a la particularité de pouvoir se fixer sur le récepteur rénal du FGF-23, inhibant ainsi l'effet du FGF-23 circulant par compétition¹³¹.

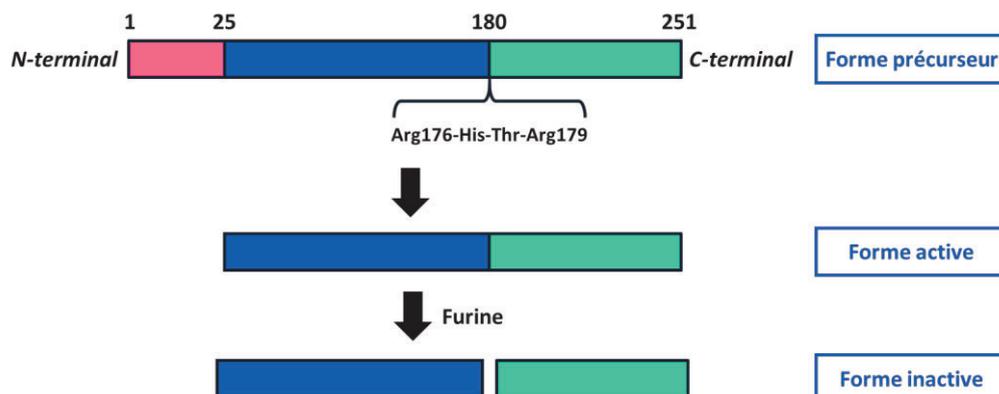


Figure 25: structure protéique du FGF-23

Le FGF-23 est une protéine sécrétée d'abord sous une forme précurseur de 251 acides aminés. Dans la forme active du FGF-23, les 25 premiers acides aminés ne sont pas présents. Cette forme active peut-être clivée par une furine au niveau du domaine Arg176-His-Thr-Arg179 en deux peptides inactifs. Le peptide C-terminal (acides aminés 180 à 251 de la forme active) a la particularité de pouvoir se fixer sur le récepteur rénal du FGF-23 actifs sans toutefois induire la signalisation intracellulaire suite à la liaison sur le récepteur.

Le FGF-23 régule la réabsorption du phosphate dans les reins. Le FGF-23 se fixe au niveau des tubules proximaux sur son récepteur FGFR (récepteur du facteur de croissance du fibroblaste) et sur son récepteur Klotho, ce qui enclenche une signalisation intracellulaire conduisant à :

- Une régulation négative de l'expression du cotransporteur sodium phosphate 2a (NaPi-2a), qui permet la réabsorption du phosphate des urines au sang (Figure 26).
- Une régulation transcriptionnelle négative des enzymes impliquées dans la synthèse de l'1,25-dihydroxy-vitamine D, hormone qui favorise l'absorption du phosphate et de calcium dans les intestins (Figure 26).

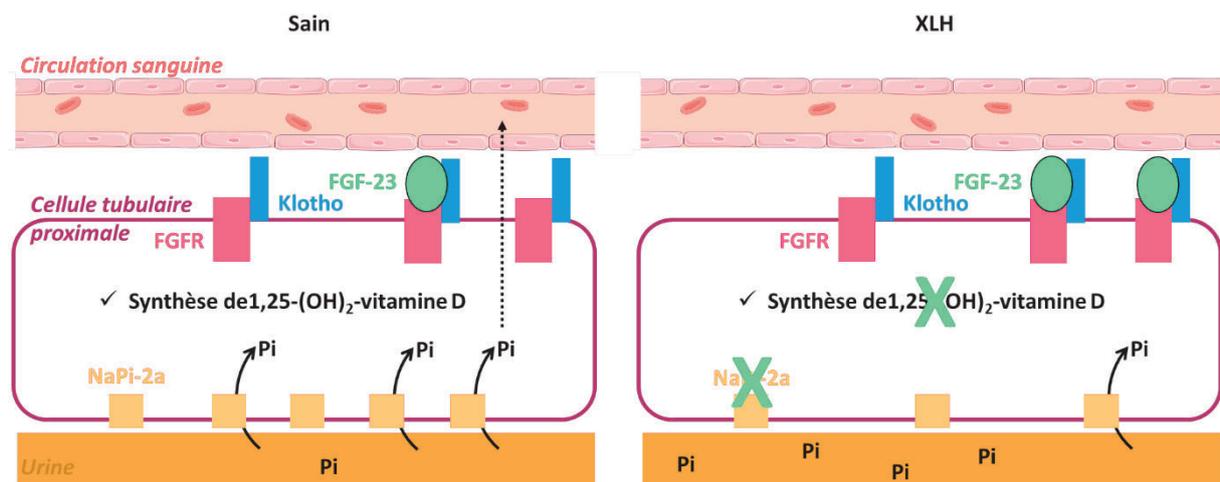


Figure 26: effets du FGF-23 sur les cellules tubulaires proximales

Chez un individu sain, le phosphate est réabsorbé de l'urine vers la circulation sanguine grâce à un transporteur de phosphate, le NaPi-2a, présent sur les cellules du tubule proximal. Le FGF-23 participe à l'homéostasie du phosphate en se fixant sur son récepteur des cellules du tubule proximal, ce qui a pour effet d'inhiber la transcription du gène codant pour le transporteur NaPi-2a. Le FGF-23 régule également la transcription des enzymes impliquées dans la synthèse de la 1,25-dihydroxy-vitamine D, qui favorise l'absorption de phosphate et de calcium dans les intestins. Chez un individu XLH, le FGF-23 est en excès ce qui déséquilibre l'homéostasie du phosphate. L'expression du transporteur NaPi-2a est très faible, ce qui entraîne une fuite du phosphate dans les urines. De plus, la synthèse de la 1,25-dihydroxy-vitamine D est fortement inhibée ce qui diminue l'absorption intestinale du phosphate issu de l'alimentation. En conséquence, les patients XLH présentent une hypophosphatémie.

Chez le sujet sain, ces effets sont équilibrés au niveau de l'organisme entier. Chez le patient XLH, un niveau élevé de FGF-23 circulant conduit à une phosphaturie et une baisse de la synthèse de l'1,25-dihydroxy-vitamine D (Figure 27).

In fine, la faible phosphatémie induite par les taux de FGF-23 circulants élevés conduit à un défaut de minéralisation des tissus osseux (Figure 27).

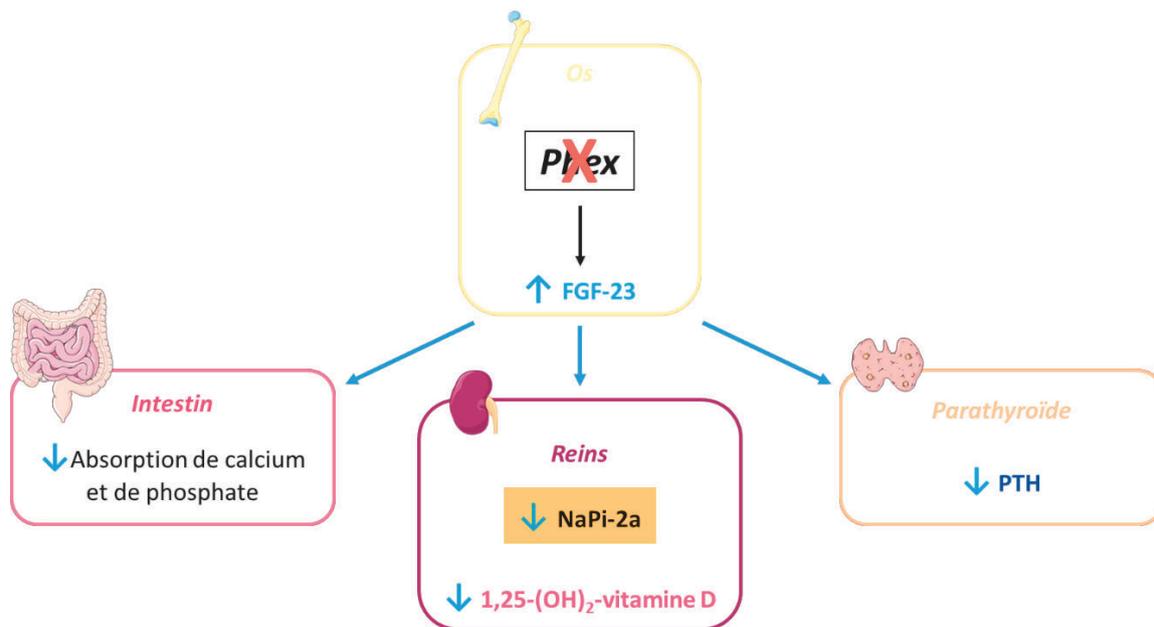


Figure 27: conséquences de l'augmentation du FGF-23 circulant dans l'XLH

3) Tableau clinique et prise en charge

L'hypophosphatémie liée à l'X est une maladie génétique rare touchant environ 4 : 100 000 naissances¹³².

Les signes cliniques apparaissent dès l'enfance, généralement avant 18 mois. Le principal symptôme est biochimique : ces patients présentent une hypophosphatémie, liée à une augmentation du FGF-23, qui a pour conséquence une déplétion de l'organisme en phosphates nécessaires à la formation osseuse¹³². En conséquence, la pathologie affecte essentiellement les tissus minéralisés.

Le développement osseux est altéré : les os sont douloureux et fragiles, les patients présentent des fractures à répétition, ils sont de petite taille (rachistisme), leurs jambes sont arquées et leur mobilité en est réduite (Figure 28). De plus, les articulations sont douloureuses et ils sont atteints d'enthésiopathie, une maladie touchant les insertions tendino-capsulo-ligamentaires sur les os, car les articulations et les enthèses se calcifient. En lien avec ces modifications du squelette, les patients peuvent également éprouver des douleurs musculaires¹³².

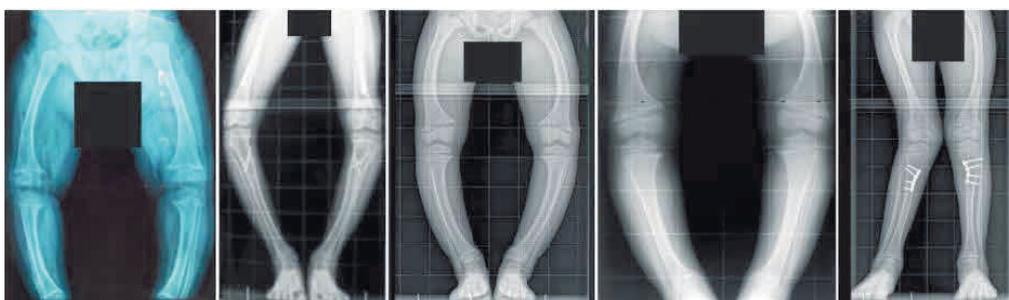


Figure 28: radiographies des membres inférieurs de patients atteints de la maladie XLH

Source : Haffner et al., Nat. Rev. Nephrol., 2019 (132)

Au niveau dentaire, les patients souffrent de douleurs dentaires sévères, et d'abcès fréquents pouvant être sources d'infections. Enfin, certains patients présentent une perte d'audition¹³². De plus, cette

pathologie est associée à une néphrocalcinose chez 30 à 70% des patients et une hyperparathyroïdie¹³².

Ces signes cliniques nombreux et variés ont un énorme impact sur la qualité de vie des patients, notamment en termes de mobilité et de possibilités professionnelles¹³³. Leur prise en charge est multidisciplinaire et dure toute la vie des patients.

Contrairement à d'autres formes de rachitisme, ces patients ne répondent pas à un traitement par supplémentation de vitamine D. Les patients sont traités par une supplémentation en phosphate et en calcitriol (1,25-dihydroxy-vitamine D) afin de réduire la douleur, mais ce traitement ne permet pas la prévention des complications à long-terme. De plus, l'augmentation de la phosphatémie grâce à la supplémentation stimule une augmentation du FGF-23 circulant et donc une fuite du phosphate dans les urines, résultant en un cercle vicieux qui peut conduire à une perte d'efficacité et à la nécessité d'augmenter les doses ce qui augmente la probabilité d'apparition d'effets indésirables.

Dans les cas de déformation osseuse sévères, de la chirurgie correctrice peut être envisagée.

Un médicament, le burosumab (Crysvita® commercialisé par Ultragenyx Pharmaceuticals, approuvé par la « Food and Drug Administration », FDA, en 2018), a récemment été mis sur le marché. Il s'agit d'un anticorps anti-FGF23 administré tous les 15 jours, qui, par compétition avec le FGF-23 endogène, conduit à l'augmentation de l'absorption du phosphate issu de l'alimentation au niveau digestif et la réabsorption du phosphate au niveau rénal. Les essais cliniques ont montré des résultats encourageants. Chez les enfants, l'administration du burosumab deux fois par mois a permis d'augmenter la phosphatémie, et de corriger les manifestations de rachitisme en particulier les anomalies osseuses, et la croissance^{134,135}. Chez les patients adultes, le burosumab a amélioré la guérison des fractures osseuses, et réduit la douleur¹³⁶.

4) Les approches de thérapie génique pour l'hypophosphatémie liée l'X

Une étude récente a montré que la réintroduction du gène *PHEX* dans les ostéoblastes par une approche rétrovirale ne permet pas de corriger ni l'hypophosphatémie, ni le défaut de minéralisation, chez les souris *Hyp* représentant un modèle de l'XLH et dans des ostéoblastes issus des souris *Hyp*¹³⁷.

Les auteurs ont conclu que la restauration de l'expression et de l'activité de *PHEX* dans les os n'est pas suffisante pour corriger le phénotype et que soit plusieurs tissus doivent être ciblés, soit d'autres facteurs rentrent en compte dans le mécanisme de cette pathologie.

OBJECTIFS

La thérapie génique du foie est une approche thérapeutique innovante. Les virus AAV sont des vecteurs prometteurs pour cibler le foie en thérapie génique avec de bons profils d'efficacité et de sécurité. En effet, les AAV ne sont associés à aucune pathologie humaine et leur injection systémique permet une bonne transduction des hépatocytes. En effet, grâce à sa vascularisation importante et un endothélium vasculaire fenestré, le foie est le premier organe transduit par les vecteurs AAV injectés par voie systémique. De plus, bien que non intégratifs, les vecteurs AAV permettent une expression à long-terme du transgène en persistant sous forme d'épisomes. En raison de ces avantages, plusieurs thérapies utilisant cette technologie sont en phase de développement clinique.

Néanmoins, cette stratégie peut présenter des limites dans certains contextes physiopathologiques. Par exemple, il est connu que l'efficacité de la thérapie peut être perdue au cours du temps lorsque le foie est en prolifération, ce qui est le cas chez les nourrissons/enfants ou dans certaines pathologies liées à la tumorigénèse. En effet, une perte du transgène, non intégré au génome cellulaire et non répliqué, est observée au cours des divisions cellulaires. De plus, l'efficacité de transduction de foies dont l'intégrité architecturale est lésée, comme dans les foies fibrotiques et/ou stéatosiques, n'est pas connue. En effet, dans ces cas, la vascularisation du foie peut être modifiée, et les échanges sanguins sont réduits. Finalement, transduire le foie peut s'avérer non suffisant dans le cas de pathologies impliquant plusieurs organes, comme pour les glycogénoses de type I ou de type III, où le métabolisme du glycogène est aussi affecté dans les reins ou les muscles, respectivement.

Selon l'efficacité des vecteurs AAV à transduire les autres tissus atteints, la dose injectée doit être généralement augmentée. C'est par exemple le cas dans le cadre de pathologies affectant les muscles squelettiques, qui peuvent être transduits par les vecteurs AAV mais au prix d'une forte augmentation de la dose. De même, les reins sont peu transduits par les vecteurs AAV, ce qui nécessite un développement technologique.

Trouver une réponse à ces problématiques permettrait d'étendre le champ d'application de la thérapie génique ciblant le foie à des pathologies non strictement hépatiques.

D'un autre côté, utiliser le foie comme usine d'expression et de sécrétion d'un transgène est aussi une approche thérapeutique de plus en plus envisagée, en apportant une molécule thérapeutique dans les tissus cibles via la circulation sanguine.

Le but de cette thèse a été de développer de nouvelles approches de thérapie génique adaptée à ces contextes physiopathologiques. Pour cela, nous avons développé des approches spécifiques pour traiter trois pathologies que sont la GSD Ia, la GSD III et l'XLH, dont la thérapie génique reste encore un défi pour corriger l'ensemble du phénotype pathologique.

Dans cette thèse, nous reviendrons d'abord sur les problématiques rencontrées dans les approches de thérapie génique du foie utilisant les AAV pour corriger les GSD I et GSD III. Les différents défis à relever pour traiter ces pathologies par thérapie génique ont été décrits dans une revue (Jauze, Monteillet et al., Hum Gene Ther., 2019). Puis, nous présenterons les approches que nous avons développées dans chacune de ces pathologies utilisées comme modèles de ces limites et défis de la thérapie génique du foie.

Les deux premières pathologies, la GSD Ia et la GSD III, sont caractérisées par des défauts liés métabolisme du glycogène dans le foie mais aussi dans les reins ou les muscles, respectivement, qui sont deux organes difficiles à traiter par thérapie génique. De plus, les foies sont très touchés par la pathologie, et marqués par une forte prolifération conduisant à l'apparition de tumeurs hépatiques. Dans la GSD Ia, les HCA se développent sur un foie stéatosique, et se transforment fréquemment en

CHC. Dans la GSD III, les CHC peuvent se développer directement ou par transformation de HCA en CHC, sur un foie fibrotique.

Dans le cadre d'une première étude, nous avons développé une approche de thérapie génique pour traiter la GSD Ia, basée sur un AAV9, ayant un tropisme pour le foie mais aussi pour les reins (contrairement au sérotype de type 8 classiquement utilisé pour cibler le foie). Dans le but d'obtenir des taux d'expression du transgène élevés, nous avons comparé l'efficacité de plusieurs promoteurs : le promoteur endogène *G6PC* humain classiquement utilisé dans les essais de thérapie génique pour la GSD Ia, le promoteur spécifique des hépatocytes hAAT généralement utilisé pour cibler les pathologies hépatiques, le promoteur endogène *G6pc* murin que nous avons développé. L'étude a été réalisée dans un modèle de souris L.G6pc^{-/-} reproduisant la pathologie hépatique de la GSD Ia, en testant l'efficacité des vecteurs sur la correction de la glycémie et de la pathologie hépatique, y compris le développement de tumeurs.

Dans une deuxième étude, nous avons tenté de relever différents défis pour exprimer le gène thérapeutique *AGL* pour corriger les pathologies hépatiques et musculaires de la GSD III. Nous avons d'abord caractérisé les dommages hépatiques qui sont peu décrits et qui conduisent au développement de tumeurs. Nous avons ensuite proposé différentes approches pour cibler le foie et les muscles grâce à l'utilisation de vecteurs AAV, associées à un traitement par la rapamycine. Le développement d'une thérapie génique pour la GSD III se heurte à une problématique supplémentaire. La séquence codante du gène en cause atteint les limites d'encapsidation de l'AAV, aussi, il est nécessaire de trouver des stratégies pour contourner la taille limite d'encapsidation de l'AAV. Au sein du laboratoire, une stratégie utilisant deux AAV9 encapsidant chacun une partie du transgène pouvant se recombiner dans le cytoplasme a été développée et a permis de corriger le phénotype musculaire et en partie le phénotype hépatique¹¹². En nous basant sur cette stratégie, nous avons développé une approche permettant la correction du phénotype hépatique et musculaire. De plus, afin de réduire les doses d'AAV nécessaires notamment pour atteindre les muscles, nous avons développé une association thérapeutique AAV-rapamycine qui a démontré un effet synergique dans le traitement des manifestations musculaires.

Finalement, **la troisième étude** a permis de développer une thérapie génique en utilisant le foie comme une bio-usine de sécrétion d'un transgène dans la circulation sanguine afin de traiter l'hypophosphatémie liée au chromosome X. Dans cette maladie rare, l'hypophosphatémie responsable du défaut de minéralisation des os est liée à l'augmentation du facteur FGF-23 circulant. Cependant, le foie n'est pas affecté par la pathologie. Notre stratégie de thérapie génique a visé à faire produire par le foie un compétiteur du FGF-23 (cFGF-23) qui est sécrété directement dans la circulation. Ainsi, le cFGF-23, par compétition pour le récepteur du FGF-23 endogène, va inhiber l'action du FGF-23 endogène et permettre la réabsorption du phosphate dans la circulation sanguine.

Le développement d'approches de thérapie génique pour ces trois pathologies nous a permis de mettre en lumière les problématiques et les limites actuelles qui restreignent le champ d'application de la thérapie génique. En nous basant sur ces constats, nous avons développé des stratégies thérapeutiques qui nous ont permis de résoudre, en partie, ces problématiques.

MATERIELS ET METHODES

Cette partie « matériel et méthodes » ne concerne que les résultats décrits dans la partie Résultats, I. B. Thérapie génique pour la glycogénose de type Ia, et I.C. Thérapie génique pour la glycogénose de type III.

Les matériels et méthodes de la partie Résultats, II. Thérapie génique ciblant le foie pour l'XLH, sont décrits dans la publication.

A. Production des vecteurs viraux AAV recombinants

1) Clonages des plasmides et vecteurs AAV utilisés

- Vecteur AAV8-hFIX

Le vecteur AAV8-hFIX est un AAV8 exprimant le facteur IX humain, sous le contrôle du promoteur humain de l'alpha antitrypsine 1 (hAAT), un promoteur spécifique des hépatocytes. Ce vecteur a déjà été décrit¹³⁸.

- Vecteurs AAV-hG6PC

Les vecteurs AAV-hG6PC sont des AAV9 exprimant l'ADNc du gène humain *G6PC1* wild-type ou codon-optimisé (hG6PC ou hG6PC *co*), sous différents promoteurs. La séquence codon-optimisée a été obtenue grâce à l'algorithme IDT, et a une composition en nucléotides GC de 48,46%.

Les promoteurs qui ont été utilisés sont : (i) le promoteur hAAT, (ii) le promoteur endogène humain hG6PC (hGPE) déjà décrit⁷⁸, et (iii) le promoteur endogène murin *G6pc1* (mGPE ; -1227 bp/+1). Ils ont été associés à un intron synthétique dérivé de l'intron de la beta globine humaine (HBB2), ou à l'intron du virus simien 40 (SV40) ; et au signal de polyadénylation de l'HBB2 ou de l'hormone de croissance bovine (bGH).

- Vecteurs AAV-GDE

Les vecteurs AAV-GDE sont des AAV9 exprimant l'ADNc du gène humain *AGL*. Le promoteur LiMP utilisé ici est promoteur tandem déjà décrit³⁴, comportant le promoteur hAAT et le promoteur musculaire synthétique spC5.12, permettant une expression hépatique et musculaire. Tous les construits comportent l'intron SV40 et le signal de polyadénylation bGH.

Dans les vecteurs « overlapping » (GDEov), l'ADNc d'*AGL* a été divisé en deux parties, incluant chacune une partie recombinante de 1000 paires de bases.

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

Après production, la purification a été réalisée grâce aux kits NucleoBond® Mini/Mini ou MaxiPrep, (Machery-Nagel), en fonction de la quantité de plasmide requise. Les plasmides obtenus ont été validés après digestion par différentes enzymes de restriction (FastDigest, ThermoFisher) et migration des fragments d'ADN sur gel d'agarose.

2) Méthode de production des AAV recombinants

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

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

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec les trois plasmides par l'utilisation de phosphate de calcium.

Les AAV produits sont ensuite purifiés grâce à deux gradients de césium, permettant de séparer les capsides vides des capsides contenant le transgène.

3) Titration des AAV recombinants

Les titres des AAV produits ont été déterminés par deux techniques :

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

Les séquences des amorces utilisées sont :

Amorce ITR (1)	Fwd 5' CTCCATCACTAGGGGTTCTTG 3' Rev 5' GTAGATAAGTAGCATGGC3'
Amorce ITR (2)	Fwd 5' GGAACCCCTAGTGATGGAGTT 3' Rev 5' CGGCCTCAGTGAGCGA 3'
Amorce hAAT	Fwd 5' GGCGGGCGACTCAGATC 3' Rev 5' GGGAGGCTGCTGGTGAATATT 3'

B. Expériences *in vivo*

1) Modèles animaux

- Modèle de GSD Ia : la souris L.G6pc^{-/-}

Les souris L.G6pc^{-/-} ont été développées par délétion de l'exon 3 du gène *G6pc1* spécifiquement dans le foie, comme déjà décrit⁹². Les mâles B6.G6pc1^{lox/lox}.SA^{CreERT2} âgés de 6 à 8 semaines ont reçu des injections de 0,2 mg de tamoxifène par jour, pendant 5 jours consécutifs. Des mâles C57Bl/6J (Charles Rivers Laboratories, L'Arbresle, France) du même âge ont également été injectés avec du tamoxifène, et sont appelés ci-après L.G6pc^{+/+}.

Les souris ont été nourries avec un régime standard (3.1% de matières grasses, 16.1% de protéines, 60% de carbohydrates, Safe) ou un régime high fat-high sucrose (36.1% de matières grasses, 35% de carbohydrates, 19.8% de protéines, INRAE) connu pour accélérer le développement d'AHC et CHC chez les souris L.G6pc^{-/-85}.

Les souris ont été hébergées par groupes de 4 à 6 animaux, dans un environnement enrichi à 21-23°C, avec un cycle de lumière/obscurité de 12h/12h, et un accès illimité à la nourriture et à l'eau, dans l'animalerie de l'Université Lyon I (ALECS).

Les prélèvements de sang ont été réalisés par ponction de la veine submandibulaire, après un jeûne de 6 heures (avec un accès illimité à l'eau).

Les souris ont été injectées avec une solution saline ou avec les vecteurs AAV en veine caudale environ 6 semaines après le traitement au tamoxifène. Elles ont été mises à mort par dislocation cervicale après 6 heures de jeûne (avec un accès illimité à l'eau). Les tissus ont été congelés par freeze-clamp dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

Toutes les conditions expérimentales et les expériences ont été approuvées par le comité éthique de l'Université Lyon I et par le Ministère de l'éducation nationale, des études supérieures et de la recherche (autorisation Apafis n°10003-2017052308255402) en accord avec les recommandations européennes pour la protection des animaux de laboratoire.

- Modèle de GSD III : la souris AgI^{-/-}

Les souris AgI^{-/-} ont été développées par croisement entre le modèle murin GSD III commercial (International Mouse Phenotyping Consortium), qui a une faible survie, et des souris BALB/c, comme décrit précédemment¹¹².

Les souris ont été hébergées par groupes de 4 à 6 animaux, dans un environnement enrichi à 21-23°C, avec un cycle de lumière/obscurité de 12h/12h, et un accès illimité à la nourriture et à l'eau, dans l'animalerie du CERFE (Evry).

Les prélèvements de sang ont été réalisés par ponction rétro-orbitale, après une anesthésie gazeuse.

Les souris ont été injectées avec une solution saline ou avec les vecteurs AAV en veine caudale. Elles ont été mises à mort par dislocation cervicale. Les tissus ont été congelés par freeze-clamp dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

Toutes les conditions expérimentales et les expériences ont été approuvées par le comité éthique de l'animalerie CERFE et par le Ministère de l'éducation nationale, de études supérieures et de la recherche (autorisation Apafis n°#23334-2018020516052045) en accord avec les recommandations européennes pour la protection des animaux de laboratoire.

2) Test du « wire hang »

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

3) Mesure du glucose sanguin

- Chez la souris L.G6pc^{-/-}

Le glucose sanguin a été mesuré après 6h de jeûne grâce au lecteur de glycémie Accu-Check Go glucometer (Roche Diagnostic, Meylan, France), grâce à une goutte de sang obtenue en coupant moins de 1mm de l'extrémité de la queue des souris.

- Chez la souris Ag1^{-/-}

Lors des prélèvements sanguins, les souris (non mises à jeun) ont été anesthésiées par anesthésie gazeuse. La glycémie a été mesurée grâce au lecteur de glycémie Accu-Check Go glucometer (Roche Diagnostic, Meylan, France), en déposant la première goutte de sang prélevée sur les bandelettes extra-larges Accu-Chek® Performa.

4) Mesure des paramètres plasmatiques ASAT, ALAT, AFP

Les activités plasmatiques d'ASAT et d'ALAT et la concentration plasmatique d'alpha-fetoprotéine (AFP) ont été déterminées par un test colorimétrique réalisé grâce à l'appareil FUJI DRI-CHEM NX500 (FUJIFILM corp, Tokyo, Japan).

5) Traitement à la rapamycine

Les souris Ag1^{-/-} ont été traitées quotidiennement par de la rapamycine, injectée en intrapéritonéale à une dose de 1,5 mg/kg. La rapamycine a été re-suspendue dans du DMSO, à une concentration de 50 mg/ml, et diluée dans du PBS pour les injections. Les souris contrôles, non traitées à la rapamycine, ont été injectées avec du PBS dans les mêmes conditions.

C. Analyse des tissus

1) Lyse des tissus et dosage des protéines

- Chez la souris L.G6pc^{-/-}

Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale. Le foie a été prélevé rapidement. Une partie du foie a été fixée dans du formol pour les analyses histologiques. Le reste du foie a été congelé dans de l'azote. Les tissus ont été lysés selon divers protocoles en fonction des dosages réalisés, les protocoles sont indiqués dans les paragraphes détaillant les dosages.

- Chez la souris Ag1^{-/-}

Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale. Le foie, le cœur, les triceps et les quadriceps ont été congelés rapidement comme suit :

- Le foie : une partie du foie a été fixée dans du formol pour les analyses histologiques. Le reste du foie a été congelé dans de l'azote.
- Le cœur : l'apex du cœur a été coupé et congelé dans de l'isopentane refroidi. Le reste du cœur a été congelé dans de l'azote.

- Les muscles squelettiques : les muscles gauches ont été congelés dans de l'isopentane refroidi. Les muscles droits ont été congelés dans de l'azote.

Un fragment de foie (100 mg) ou la totalité du tissu a été lysé grâce à un piston dans un tampon de lyse (RIPA, ThermoFisher) contenant des inhibiteurs de protéase (PIC, Sigma-Aldrich) (protocole avec traitement à la rapamycine) ou grâce au FastPrep®-24 (MPbio) dans de l'eau sans DNase/RNase.

La quantification des protéines de l'homogénat tissulaire a été réalisée par la méthode BCA (bicinchoninic acid assay) ou la technique de Bradford (BioRad®), qui permettent de doser par colorimétrie une concentration en protéines en utilisant une gamme standard de sérum albumine bovine (BSA).

2) Analyses histologiques et par microscopie électronique à transmission

Le cœur, les triceps et les quadriceps ont été congelés dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide. Les coupes transversales, de 8 µm, ont été réalisées grâce au cryostat Leica CM3050S (Leica Biosystems, Nussloch, Allemagne), et colorées par de l'hématoxyline éosine (HE). Les coupes et les colorations ont été réalisées par la plateforme histologie du Genethon, Evry.

Le foie a été fixé dans du formol, puis inclus en paraffine. Pour les tissus GSD Ia, les coupes et les colorations ont été réalisées par le Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CiQle), Université Claude Bernard Lyon I, Lyon. Pour les tissus GSD III, les coupes et les colorations ont été réalisées par la plateforme histologie du Genethon, Evry.

L'analyse au microscope électronique a été réalisée sur des foies de souris Agl^{+/+} et Agl^{-/-}. Les échantillons ont été fixés avec du glutaraldéhyde (2,5%, pH 7,4), puis traités avec du tétr oxyde d'osmium (2%), et enfin déshydratés et inclus dans une résine. Des sections ultra-fines ont été réalisées et colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Les grilles ont été observées à l'aide d'un microscope électronique et photographiées. Les coupes et les colorations ont été réalisées par le Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CiQle), Université Claude Bernard Lyon I, Lyon.

3) Analyse par Western Blot

- Dans les tissus GSD Ia

Après dénaturation des protéines dans le tampon de Laemmli, les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE sur un gel à gradient de polyacrylamide 4-12%, dans un tampon de migration TRIS/Glycine/SDS 1%. Le transfert des protéines sur une membrane de PVDF a été réalisé par transfert semi-liquide (Trans-Blot® Biorad). Après le transfert, la membrane a été incubée dans un tampon de blocage TBS/Tween/BSA puis incubée avec les anticorps primaires (listés ci-dessous). Après lavage, la membrane a été incubée avec l'anticorps un anticorps secondaire adapté couplé à la peroxidase (HRP). Après ajout du réactif Luminata (Millipore), les protéines ont été visualisées grâce à l'appareil BioRad ChemiDoc TMTouch Imaging System.

- Dans les tissus GSD III

Après dénaturation des protéines dans un tampon commercial contenant du LDS (lithium dodecyl sulfate) (NuPAGE™ LDS Sample Buffer, Thermofisher), les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE sur un gel à gradient de polyacrylamide 4-12%, dans un tampon MOPS. Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose a été réalisé par transfert liquide, dans une solution de MOPS contenant 20% d'éthanol. Après le transfert, la membrane a été incubée dans un tampon de

blochage (tampon Odyssey buffer, Li-Cor Biosciences) puis incubée avec les anticorps primaires (listés ci-dessous). Après lavage, la membrane a été incubée avec un anticorps secondaire fluorescent adapté (Li-Cor Biosciences), et révélée grâce à l'appareil Odyssey imaging system (Li-Cor Biosciences).

Anti-actine	Anti-mouse, rabbit monoclonal, sc-8432, SantaCruz Biotechnology	1 : 5000
Anti-GAA	Anti-mouse, rabbit polyclonal, PA5-96756, ThermoFisher Scientific	1 : 1000
Anti-GDE	Anti-human, rabbit polyclonal AS09-454, Agrisera	1 : 1000
	Anti-human, rabbit polyclonal, 16582-1-AP, Proteintech	1 : 1000
Anti-G6PC	Anti-human, Anticorps polyclonal de lapin fait maison (139)	1 : 1000
Anti-PYGL	Anti-mouse, rabbit polyclonal, 15851-1-AP, Proteintech	1 : 1000
Anti-vinculine	Anti-mouse, mouse monoclonal, V9131, Sigma Aldrich	1 : 1000

4) Quantification du glycogène

- Dans les tissus GSD Ia

Un fragment de 100 mg de foie congelé a été ajouté à 8 volumes d'acide perchlorique 6% et lysé avec l'appareil FastPrep®-24 (MPbio). La quantité de glycogène a été déterminée indirectement dans le surnageant à un pH de 6,6-8,5. Le glycogène a été hydrolysé dans du NaOH 0,15M sous l'action de la chaleur, puis digéré par l'alpha-amylglucosidase à 45°C pendant 1h. Le glucose libéré a été mesuré après l'ajout de 0,7 U d'hexokinase et de glucose-6-phosphate déshydrogénase en présence de NADPH. La production de NADH a été détectée après 30 min d'incubation à température ambiante, en mesurant l'absorbance à 340 nm.

- Dans les tissus GSD III

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

Les lysats de tissus ont été incubés 5 minutes à 95°C, puis refroidis à 4°C. Après ajout de l'amyloglucosidase, les homogénats tissulaires ont été incubés à 37°C pendant 90 minutes. Les réactions ont ensuite été stoppées par une incubation à 95°C pendant 5 min. Le glucose libéré a ensuite été dosé grâce au kit glucose GO assay kit (Sigma-Aldrich). Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène par la glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'o-dianisidine, en présence de peroxydase, pour former un premier produit coloré après 30 minutes d'incubation à 37°C. L'o-dianisidine oxydée réagit avec l'acide sulfurique pour former un second produit coloré plus stable. L'absorbance de ce produit est déterminée à 540 nm (lecture par l'EnSpire Microplate Reader, Perkin-Elmer). La quantité réelle de glucose libéré est calculée par différence avec les quantités de glucose des contrôles réalisés en absence de l'amyloglucosidase.

5) Activité glucose-6-phosphatase

Un fragment de 100 mg de foie a été lysé avec une solution HEPES 1%/sucrose 0,25% grâce au FastPrep®-24 (MPbio) and par sonication. L'activité G6Pase spécifique a été évaluée à la vitesse maximale (20 mmol/l de G6P) à 30°C dans les homogénats tissulaires. Les activités phosphatases non spécifiques ont été estimées grâce à l'hydrolyse du beta-glycerophosphate, et soustraites des mesures.

6) Quantification des lipides

Les lipides hépatiques ont été extraits en suivant la procédure Folch, à partir des homogénats tissulaires obtenus en lisant 80 mg de foie dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1) grâce au FastPrep®-24 (MPbio). Les triglycérides ont été mesurés grâce à un kit (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Germany).

7) Evaluation de l'expression du facteur IX

L'expression du facteur IX humain (hFIX) a été mesurée par un dosage ELISA-sandwich sur les plasmas des souris.

Les plasmas, dilués au 1 : 1000, ont été incubés en présence d'un anticorps anti-hFIX (Goat anti-human factor IX, Affinity Biologicals), préalablement « coaté » sur des plaques 96 puits, pendant une nuit à 4°C, parallèlement à une gamme étalon de protéine recombinante du FIX humain (human factor IX native protein, ThermoFisher). Après rinçages et incubation avec l'anticorps secondaire (Goat anti-human factor IX-HRP, Affinity Biologicals), l'ajout du substrat de la peroxydase permet d'initier une réaction de chimioluminescence (OPD peroxidase substrate, Sigma Aldrich). La réaction est ensuite stoppée par de l'acide sulfurique. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 450nm (lecture par l'EnSpire Microplate Reader, Perkin-Elmer).

8) Quantification du nombre de copies de vecteur

Après extraction de l'ADN génomique à partir de 20mg de tissus, le nombre de copies de génome a été déterminé par qPCR (LightCycler 480, Roche). Les amorces utilisées sont les mêmes que pour la titration des AAV (amorces sur le promoteur hAAT, ou amorces sur les ITR). L'ADNc codant pour la titine a été utilisé comme contrôle interne et normalisateur.

Amorce titine	Fwd 5' TTCAGTCATGCTGCTAGCGC3' Rev 5' AAAACGAGCAGTGACGTGAGC3'
---------------	-----------------------------------------------------------------

9) Extraction d'ARN et quantification des ARNm

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 50mg de tissus, grâce au Trizol (Trizol reagent, Life technologies).

Après une incubation avec une DNase (1h à 37°C) (DNA-free kit, Ambion), les ARNm ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc grâce au kit « RevertAID cDNA first strand synthesis » (ThermoFisher), puis quantifiés par qPCR (LightCycler 480, Roche) par la technique de « SYBR Green » (Maxima SYBR Green Mastermix, ThermoFisher). Les amorces utilisées pour quantifier les ARNm sont listées dans la Table 1 en annexe. L'expression de chaque ARNm a été normalisée grâce à un gène de ménage, l'ARNm de Rpl19 (protéine ribosomale mL19).

Les résultats ont été exprimés sous forme de $\Delta\Delta Ct$, et ont été représentés via une « heat map » en utilisant des couleurs représentant les n fois d'induction d'un gène chez les souris étudiées par rapport aux souris contrôles

10) Evaluation de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire a été évaluée par un dosage ELISA-sandwich sur les plasmas des souris.

- IgM et IgG anti-capside

Les plasmas, dilués au 1 : 1000, ont été incubés en présence d'une capsid AAV9, préalablement « coatée » sur des plaques 96 puits, pendant une nuit à 4°C, parallèlement à une gamme étalon d'IgM ou d'IgG (Sigma-Aldrich), selon le dosage. Après rinçages et incubation avec l'anticorps secondaire anti-IgM-HRP ou anti-IgG-HRP (Life Technology), l'ajout du substrat de la peroxydase permet d'initier une réaction de chimioluminescence (OPD peroxidase substrate, Sigma Aldrich). La réaction est ensuite stoppée par de l'acide sulfurique. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 450nm (lecture par l'EnSpire Microplate Reader, Perkin-Elmer).

- IgG anti-transgène

Les plasmas ont été dilués au 1 : 10, puis incubés en présence de la protéine GDE recombinante (Origen), préalablement « coatée » sur des plaques 96 puits, pendant une nuit à 4°C, parallèlement à une gamme étalon d'IgG (Sigma-Aldrich). Après rinçages et incubation avec l'anticorps secondaire anti-IgG-HRP (Life Technology), le TMB est ajouté afin d'initier une réaction de chimioluminescence (BD Biosciences). La réaction est ensuite stoppée par de l'acide sulfurique. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 450nm (lecture par l'EnSpire Microplate Reader, Perkin-Elmer).

D. CALCULS STATISTIQUES

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

Les analyses ont été réalisées par un test de Student paramétrique ou non paramétrique (test de Mann-Whitney), ou un test ANOVA suivi d'un test Ad Hoc, selon le cas, comme indiqué dans chaque figure. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type à la moyenne.

RESULTATS

I. THERAPIE GENIQUE PAR LES VECTEURS AAV CIBLANT LE FOIE POUR LA GSD Ia ET LA GSD III

A. Les défis de la thérapie génique pour la GSD Ia et la GSD III

La thérapie génique et les vecteurs AAV recombinants ont un grand potentiel pour soigner les maladies hépatiques. De nombreux essais précliniques et cliniques ont démontré la stabilité de l'expression du transgène au niveau des hépatocytes. Cependant, ces résultats ont été obtenus dans des foies dont l'architecture n'est pas endommagée, comme dans l'hémophilie A et B. Dans des pathologies où le foie est endommagé, la transduction et la correction à long-terme des hépatocytes par un AAV sont plus difficiles et représentent un réel défi à ce jour.

Les problématiques rencontrées pour traiter la GSD Ia et la GSD III par thérapie génique ont été décrites dans une revue que nous avons publiée en 2019¹⁴⁰ (Jauze L, Monteillet L, et al., Challenges of Gene Therapy for the Treatment of Glycogen Storage Diseases Type I and Type III. Hum Gene Ther. 2019).

Brièvement, plusieurs points rendent la thérapie génique plus difficile dans la GSD Ia et la GSD III que pour d'autres pathologies :

1) Transduire un foie prolifératif

Dans la GSD Ia, en plus des hypoglycémies qui peuvent être fatales, l'atteinte hépatique est caractérisée par l'accumulation anormale de glycogène mais aussi par le développement d'une stéatose fortement liée au risque de tumorigenèse hépatique. En effet, l'accumulation de G6P dans les hépatocytes G6pc^{-/-} induit un métabolisme très similaire à celui des cellules tumorales et une forte prolifération^{85,141}. La stratégie thérapeutique développée pour la GSD Ia doit donc permettre de cibler efficacement et durablement le foie.

Dans la GSD III, les patients sont à risque de développer une fibrose hépatique, pouvant évoluer en cirrhose, et dans de rares cas en CHC^{103,111,113} (Figure 29). Dans les modèles murins et canins de GSD III, le foie est atteint dans son architecture et sa morphologie, et une fibrose s'installe et progresse^{141,142}. Dans un foie fibrotique, les échanges avec le sang sont diminués. Dans ce contexte, on peut émettre l'hypothèse que la transduction des hépatocytes par un AAV injecté dans la circulation serait moins efficace que dans le cas d'un foie sain. En parallèle au développement d'une fibrose, il a été montré que les hépatocytes GSD III ont un taux de prolifération élevé¹⁴¹, conduisant à l'apparition de tumeurs.

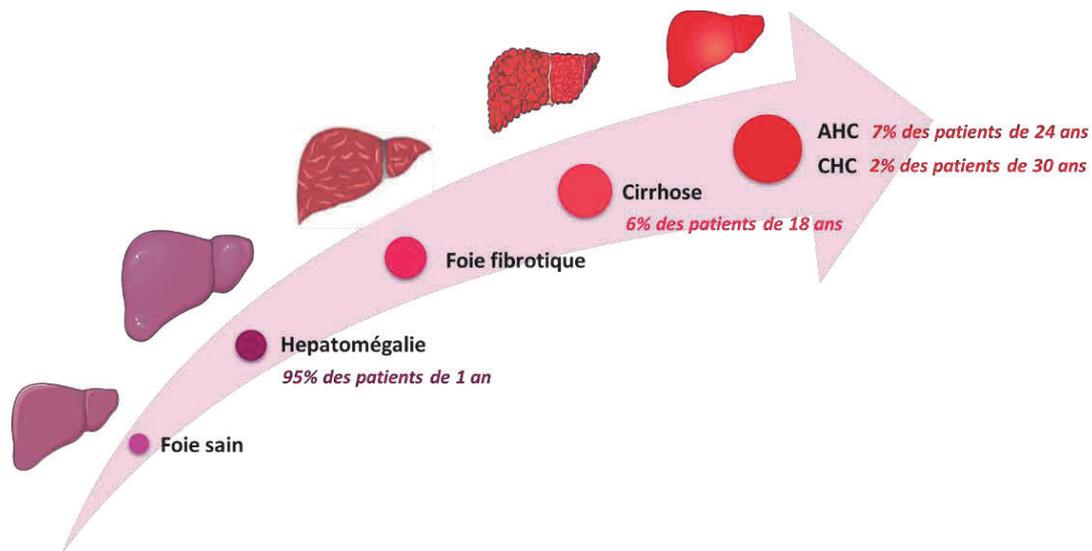


Figure 29: évolution de la pathologie hépatique dans la GSD III, caractérisée par l'accumulation de glycogène anormal et par le développement d'une fibrose pouvant évoluer en cirrhose, voir en AHC ou CHC.

D'après Sentner et al., JIMD, 2016 (103).

Ainsi, la prolifération des hépatocytes dans les foies GSD Ia est probablement la principale raison de la perte d'expression du transgène observé dans les études de thérapie génique réalisées dans les modèles animaux de GSD Ia et décrites en Introduction (voire paragraphe III, A, 4), c., ii de l'Introduction) ; de la même manière, il est fort probable que l'on observe une perte du transgène liée à la prolifération des hépatocytes dans les foies GSD III. De plus, la faible efficacité de transduction des foies GSD III (voire paragraphe III, A, 5), c., ii de l'Introduction) pourrait s'expliquer par le fait que les foies GSD III soient fibrotiques.

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

Ainsi, dans la GSD Ia et la GSD III, la transduction stable des hépatocytes représente un véritable défi.

2) Pré-traiter les foies pour améliorer la transduction des hépatocytes

Afin d'améliorer la transduction des hépatocytes GSD Ia et GSD III par les vecteurs AAV, il est envisageable de réaliser un « pré-traitement » afin de « normaliser » le foie avant l'injection des vecteurs AAV. Le but de cette stratégie est de réduire l'atteinte hépatique et la prolifération des foies GSD Ia et GSD III, afin d'éviter la dilution du transgène par la suite.

Par exemple, Pursell et al. ont mis au point des ARN interférents (ARNi) contre l'enzyme glycogène synthase hépatique (GYS2). Cette approche a permis la prévention de la fibrose et de la prolifération des hépatocytes dans GSD III et la prévention de la stéatose dans la GSD Ia¹⁴¹.

Autre exemple, un traitement pharmacologique avec de la rapamycine a été évalué chez un modèle canin GSD III : pendant 8 à 16 mois, des doses de 0,5 ou 1 mg/kg/j ont été administrées aux animaux. Ce traitement a permis une réduction et une prévention de l'accumulation de glycogène dans le foie, une prévention de la progression de la fibrose hépatique, ainsi qu'une réduction de l'accumulation de glycogène dans les muscles squelettiques¹⁴². La rapamycine est une molécule approuvée par les agences du médicament européenne (EMA, agence européenne du médicament) et américaines (FDA, agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) en tant qu'immunosuppresseur pour

prévenir le rejet de greffe. Elle inhibe la protéine mTOR1 (complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères), permettant ainsi d'inhiber la prolifération des lymphocytes B qui sont les cellules responsables de la sécrétion des anticorps. Cependant, mTOR est au cœur de nombreuses autres voies de signalisation dont la progression dans le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, et l'autophagie. En particulier, la rapamycine induit l'autophagie en inhibant mTOR¹⁴³.

De plus, dans le cadre de la thérapie génique, Hösel et al. ont montré l'importance de l'autophagie dans la transduction des hépatocytes. En effet, le blocage de l'autophagie conduit à une transduction moindre du foie, tandis que l'induction de l'autophagie conduit à une augmentation de l'expression du transgène dans le foie. Plus précisément, la co-injection de l'AAV et de la rapamycine (dose de 3 mg/kg) chez le primate a permis de multiplier par quatre l'expression du transgène, par comparaison avec un primate injecté uniquement avec de l'AAV¹⁴⁴.

3) Cibler plusieurs tissus

La GSD Ia et la GSD III sont des pathologies dans lesquelles plusieurs organes sont atteints.

Dans la GSD Ia, le foie et les reins sont les principaux organes touchés. Dans la GSD III, le foie, le cœur et les muscles squelettiques sont touchés. Cela représente une double contrainte dans le cadre de la thérapie génique par l'utilisation d'AAV :

- Pour cibler ces tissus, qui contrairement au foie, sont difficiles à transduire avec les vecteurs AAV.
- Pour corriger le phénotype : l'expression du transgène doit être suffisante dans chacun de ces tissus et potentiellement dans chacune des cellules.

En ce qui concerne la transduction des reins par un AAV, l'accès aux reins par la circulation sanguine est restreint. La filtration sanguine est réalisée au niveau du glomérule. La filtration glomérulaire est possible grâce à la barrière glomérulaire (Figure 30) qui est composée :

- Des cellules endothéliales qui tapissent les capillaires glomérulaires,
- De la membrane basale glomérulaire,
- Des prolongements cytoplasmiques des podocytes qui reposent sur la membrane basale glomérulaire.

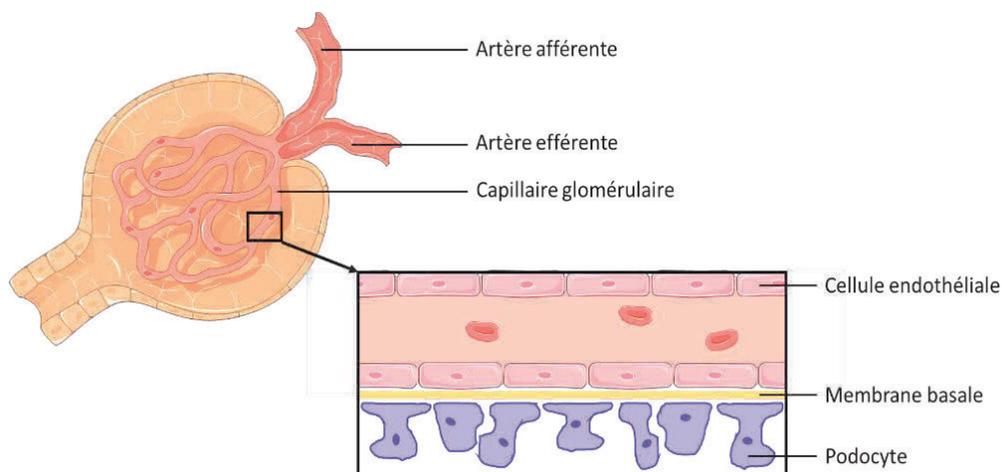


Figure 30: glomérule et barrière glomérulaire

Ainsi, les molécules pouvant passer passivement la barrière de filtration glomérulaire doivent être d'une taille inférieure aux pores entre les cellules endothéliales et aux pores créés par les podocytes qui mesurent au maximum 25-40 nm de diamètre^{145,146}. Seules les substances d'un poids moléculaire inférieur à 68 kDa, c'est-à-dire le poids moléculaire de l'albumine, peuvent passer cette barrière.

Les AAVs mesurent 20-25 nm de diamètre. Leur capsid est composée de 60 monomères de VP (1, 2 ou 3), pour un poids moléculaire bien supérieur à 100 kDa. Ainsi, bien que quelques AAVs peuvent en théorie pénétrer dans les reins, seul un passage actif permettrait aux AAVs de pénétrer de façon importante dans les reins.

Etant donné que les reins sont peu transduits par une administration systémique en voie intraveineuse^{147,148}, il est possible d'envisager des administrations qui favoriseraient la transduction des reins, en particulier les cellules du tubules contourné proximal, site d'expression de la G6Pase^{139,149}, telles que :

- L'injection dans l'artère rénale : elle permet de transduire les cellules du tubule contourné proximal et du tubule collecteur¹⁵⁰.
- L'injection rétrograde hydrodynamique dans la veine rénale : elle permet de transduire le cortex et la médulla, en ciblant le glomérule et le tubule contourné proximal^{148,151}.
- L'injection rétrograde transurétrale dans le pelvis rénal : elle permet de transduire les cellules tubulaires, en limitant la fuite du virus dans la circulation générale. Cependant, des obstructions de l'uretère sont fréquemment observées^{152,153}.
- L'injection transparenchymale dans le pelvis rénal : elle permet de transduire les cellules tubulaires (notamment du tube contourné proximal), et les cellules du tubule collecteur dans une zone autour du site d'injection. Une faible transduction extra-rénale est souvent observée (principalement dans le foie)¹⁵⁴.

Dans tous les cas, le geste chirurgical est technique et doit être parfaitement maîtrisé, en particulier chez la souris.

L'AAV9 a un tropisme élargi par rapport à l'AAV8 et permet de mieux transduire les reins. Cependant, la transduction des reins reste encore difficile et requière une dose plus importante de vecteur. Enfin, il faudrait aussi envisager une injection systémique concomitante pour transduire le foie efficacement, sans restreindre l'injection aux reins.

Dans la GSD III, afin de cibler les différents tissus et l'ensemble des muscles squelettiques, il est nécessaire d'administrer le vecteur AAV par voie systémique. Le corps humain compte plus de 600 muscles, répartis sur toute sa surface. Une administration systémique est donc nécessaire, et les administrations locales intramusculaires ne peuvent être envisagées que dans des pathologies où un muscle en particulier est plus sévèrement atteint.

L'AAV9 permet également de transduire le foie, le cœur, et les muscles squelettiques. Contrairement au foie, qui est très vascularisé et capte la plupart des agents exogènes en circulation, les muscles sont plus difficiles à transduire et nécessitent une augmentation de la dose d'AAV, avec toutes les problématiques que cela implique notamment sur le plan de la réponse immunitaire (voir paragraphe II, D, 1 de l'introduction).

Ainsi, dans les études cliniques, les doses d'AAV injecté par voie systémique sont de l'ordre de 6×10^{13} – 3×10^{14} vg/kg (essais cliniques NCT02122952 et NCT03306277 pour l'atrophie spinale musculaire de type 1, essai clinique NCT03199469 pour la myopathie myotubulaire liée à l'X, essai clinique

NCT04174105 pour la GSD II ou maladie de Pompe, essais cliniques NCT03362502, NCT03368742 et NCT03769116 pour la myopathie de Duchenne, essai clinique NCT03652259 pour une dystrophie des ceintures). Ces fortes doses représentent une limite en termes d'immunogénicité et donc d'efficacité, mais également en termes de production.

Ces différentes difficultés rencontrées pour traiter ces maladies métaboliques par thérapie génique ont été discutées dans une revue publiée en 2019, dans *Gene Therapy*:

Challenges of Gene Therapy for the Treatment of Glycogen Storage Diseases Type I and Type III

Louisa Jauze,^{1-4,†} Laure Monteillet,^{2-4,†} Gilles Mithieux,²⁻⁴
Fabienne Rajas,^{2-4,†} and Giuseppe Ronzitti^{1,*,†}

¹INTEGRARE, Genethon, Inserm, Université d'Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1213, Lyon, France; ³Université de Lyon, Lyon, France; ⁴Université Lyon 1, Villeurbanne, France.
[†]These authors contributed equally.

Glycogen storage diseases (GSDs) type I (GSDI) and type III (GSDIII), the most frequent hepatic GSDs, are due to defects in glycogen metabolism, mainly in the liver. In addition to hypoglycemia and liver pathology, renal, myeloid, or muscle complications affect GSDI and GSDIII patients. Currently, patient management is based on dietary treatment preventing severe hypoglycemia and increasing the lifespan of patients. However, most of the patients develop long-term pathologies. In the past years, gene therapy for GSDI has generated proof of concept for hepatic GSDs. This resulted in a recent clinical trial of adeno-associated virus (AAV)-based gene replacement for GSDIa. However, the current limitations of AAV-mediated gene transfer still represent a challenge for successful gene therapy in GSDI and GSDIII. Indeed, transgene loss over time was observed in GSDI liver, possibly due to the degeneration of hepatocytes underlying the physiopathology of both GSDI and GSDIII and leading to hepatic tumor development. Moreover, multitissue targeting requires high vector doses to target nonpermissive tissues such as muscle and kidney. Interestingly, recent pharmacological interventions or dietary regimen aiming at the amelioration of the hepatocyte abnormalities before the administration of gene therapy demonstrated improved efficacy in GSDs. In this review, we describe the advances in gene therapy and the limitations to be overcome to achieve efficient and safe gene transfer in GSDs.

Keywords: adeno-associated virus, glucose metabolism, glycogen, kidney, liver, muscles

GLYCOGEN STORAGE DISEASES ARE RARE GENETIC DISEASES CHARACTERIZED BY A DISTURBANCE OF GLYCOGEN METABOLISM

GLYCOGEN IS A HIGHLY BRANCHED polysaccharide that is the storage form of glucose in mammals. Although most tissues store glycogen, it is enriched in liver and skeletal muscle. In the liver, glycogen serves as a source of glucose to maintain normal blood glucose levels. Accumulation and glycogen degradation depend on the levels of glucose in circulation. During the absorptive state, when the gastrointestinal tract is full, the glucose extracted from the food reaches the circulation and it is stored in the liver as glycogen. In the post-absorptive state, when blood glucose levels fall, glycogen is broken down to glucose (glycogenolysis) to maintain normal values of glycemia. This pro-

cess requires the intervention of two different enzymes, glycogen phosphorylase that degrades the linear tract of glycogen and glycogen debranching enzyme (GDE) that transforms branched glycogen in a linear form. Glycogen degradation releases glucose-1 phosphate that after isomerization to glucose-6 phosphate is transformed into glucose by the glucose-6 phosphatase enzyme (G6Pase). When hepatic glycogen stores are depleted, gluconeogenesis can occur in liver, kidney, and intestine, allowing for *de novo* synthesis of glucose with noncarbohydrate substrates, for example, amino acids, pyruvate, and glycerol.¹ In muscles, G6Pase is not expressed and the glucose-6 phosphate derived from glycogen is used to produce ATP through the glycolytic pathway as a source of energy for muscle contraction.

*Correspondence: Dr. Giuseppe Ronzitti, INTEGRARE, Genethon, Inserm, Université d'Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France. E-mail: gronzitti@genethon.fr

Glycogen storage diseases (GSDs) are a group of rare inherited metabolic disorders (incidence from 1 in 20,000 to 1 in 100,000 newborns) characterized by abnormal storage or degradation of glycogen.^{2,3} GSDs manifest with an abnormal quantity or structure of glycogen in liver, muscles, or both. To date, there are 15 known GSDs caused by genetic deficiencies of different proteins involved in glycogen synthesis or degradation, glycolysis, and glucose release in the bloodstream^{2,3} (Fig. 1). Episodes of hypoglycemia are the primary manifestation of hepatic GSDs (GSD0, GSDI, GSDIII, GSDIV, GSDVI, and GSDIX), especially during short fasting since the liver is the main glucose-producing tissue in postabsorptive period.⁴ In contrast, intolerance to exercise with muscle pain and rhabdomyolysis, or muscle weakness and cardiomyopathy are signs of GSDs affecting muscles (GSDII to GSDV and GSDVII to GSDXV).^{2,5}

The monogenic origin of hepatic GSDs and their liver involvement make these diseases an ideal target for gene replacement strategies. Gene therapy research in animal models has generated proof of concept for the treatment of GSDI and GSDIII. The extensive preclinical experience accumulated in GSDIa lately resulted in a clinical trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03517085). Nevertheless, the development of curative treatments for GSDI and GSDIII that address the diseases manifestations in their entirety is still a precise medical need. GSDI and GSDIII represent

a challenge for gene therapy due to the modified hepatocyte metabolism and the underlying liver degeneration together with the involvement of tissues hardly targeted by the current gene replacement strategies. Thus, the focus of this review is on the recent development of gene therapy approaches for hepatic GSDI and GSDIII that represent ~50% of GSDs. We discuss the key choices of capsid serotypes and transgene expression cassettes (including tissue-specific promoters) together with the recently reported combination therapies to improve the efficacy of gene therapy for GSDI and GSDIII.

GSDI AND GSDIII

GSDI, also referred as von Gierke disease, is characterized by the absence of endogenous glucose production due to deficient G6Pase activity. More precisely, GSDIa and GSDIb are caused by mutations in the genes encoding for the catalytic subunit of the G6Pase complex (*G6PC1*) or the glucose-6 phosphate transporter (*SLC37A4* or *G6PT*), respectively.⁶⁻⁹ Loss-of-function mutations in these two subunits result in severe hypoglycemia after a short fasting period that can be fatal if untreated immediately. Patients with GSDI also displayed hepatomegaly and nephromegaly due to the abnormal storage of glycogen in liver and kidneys. Indeed, the accumulation of glucose-6 phosphate, resulting from reduced hydrolysis to glucose, leads to a complete hepatic and renal me-

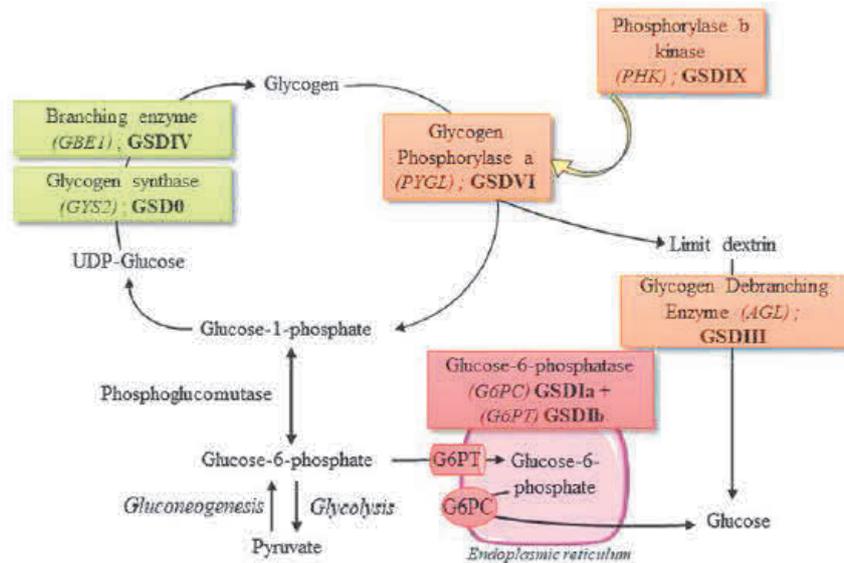


Figure 1. Glycogen metabolism and hepatic glycogen storage diseases. Hepatic glycogen storage disorders are indicated in roman numbers next to the defective genes. UDP-glucose, uridine diphosphate glucose.

tabolism reprogramming, characterized by increased glycogen turnover, and activation of *de novo* lipogenesis and pentose phosphate pathway.^{10–12} As a consequence, GSDI patients exhibit swollen hepatocytes and renal epithelial cells due to the accumulation of high levels of glycogen and lipids leading to fatty liver, kidney injuries, and secondary biochemical abnormalities, including hyperlactatemia, hyperuricemia, and hyperlipidemia.^{8,9} Hepatocellular adenomas (HCAs) occur in 70–80% of patients >25 years, with a high probability to transform into hepatocellular carcinomas (HCCs), which may require liver transplantation.^{8,9} Indeed, we showed similarity in the metabolism of GSDI hepatocytes and tumor cells, both characterized by increased cell proliferation, and loss of several tumor suppressors.¹⁰ Most of the GSDI patients older than 25 years have kidney disease.⁹ Studies in a murine model of the disease indicate that the accumulation of lipids is responsible for renal injuries leading to a chronic kidney disease (CKD),^{11,13,14} which may require dialysis or kidney transplantation in patients.^{8,9} GSDI patients also develop intestinal symptoms that appear more serious in GSDIb.⁹ In GSDIb, differently from GSDIa, patients present severe infectious complications, due to neutropenia and neutrophil and monocyte functional defects.⁹ In GSDI, normoglycemia is maintained by frequent meals enriched in uncooked cornstarch even during the night or continuous nasogastric feeding.^{9,15} To limit glycogen and fat accumulation, lactose, fructose, and products containing free sugar should be avoided. Thus, frequent daytime feeding, intragastric continuous infusions, and a strict dietary regimen allow for the control of hypoglycemia and reduce the metabolic impairment. Although a strict metabolic control may delay or, in some cases, lead to the regression of long-term complications in GSDI, poor compliance with the dietary treatment makes liver and/or kidney transplantation the only curative treatment for this disease.^{9,16–20}

GSDIII or Cori disease is caused by mutations in *AGL* resulting in reduced activity of GDE that degrades branched glycogen.²¹ GDE deficiency leads to the accumulation of abnormal glycogen (called limit dextrin) virtually in all tissues. GSDIII has variable features involving generally both liver and muscle (type IIIa, representing 85% of cases) or liver only (type IIIb; in ~15% of cases). The disease manifests during childhood with hepatomegaly, hypoglycemia, and hyperlipidemia. Dietary management is based on frequent meals enriched in uncooked cornstarch, as in GSDI, to prevent hypoglycemia and hyperketonemia.^{21,22} Differently

from GSDI patients, the activation of gluconeogenesis triggered by protein- and fat-enriched diet permits better control of blood glucose levels in GSDIII patients.^{21–26} Nevertheless, during childhood, the control of glycemia in GSDIII patients is quite variable and they experience episodes of life-threatening severe hypoglycemia. In most GSDIII patients, hepatomegaly and the control of glycemia improve with aging. However, the decreased liver size can be misleading as progressive liver cirrhosis and hepatic failure occur.^{21,27,28} Recent results showed that proliferation and differentiation of stellate cells lead to the development of fibrosis, which plays a central role in the progression of liver disease.²⁹ In rare cases, HCA and HCC were reported.^{27,28} In addition, plasmatic transaminases are generally elevated in GSDIII patients, suggesting severe hepatic damages.²¹ At the muscle level, creatine kinase elevation, muscular pain after exercise, and both distal and proximal myopathy were reported in GSDIII patients.^{21,30–32} Intolerance to exercise seems to be only marginally related to the low blood glucose.³³ A careful characterization of the muscle function indicated a progressive degeneration starting in the third decade.^{30,31} In general, hypotonia and muscle weakness leads to intolerance to exercise and, in some cases, to the loss of independent walking. Cardiac involvement with left ventricular hypertrophy or other forms of hypertrophy were reported in 58% of a young patient's population (median age: 20.6 years range 1–64.1).²¹ In the same cohort, 15% of the patients had cardiomyopathy defined as severe intolerance to exercise and/or the use of pharmacological treatment for symptoms of heart failure. Importantly, high-fat, high-protein, and low-carbohydrate diet was associated with an improvement of the cardiac phenotype.²³

To resume, both GSDI and GSDIII are characterized by glycogen accumulation in the liver that directly or indirectly causes stress virtually in all the hepatocytes, leading to abnormal liver parenchyma and hepatic complications. Interestingly, increased hepatocyte proliferation was observed in GSDIa and GSDIII hepatocytes long before hepatic tumor formation.^{10,29} In addition, hepatocyte metabolism characterized in GSDIa mouse was very similar to that of tumor cells,^{10,12} indicating a high potential for transformation of GSDI hepatocytes. Given the risk of tumor occurrence in GSDI and GSDIII patients, it is important to define the residual level of activity needed to avoid the development of tumors at long term.

Another important feature shared by the two diseases is the multiorgan manifestation. In addition

to hypoglycemia and liver pathology, renal, myeloid, or muscle complications affect GSDI and GSDIII patients and need to be addressed. In GSDI, the short-term follow-up of the transplanted patients and the simultaneous liver and kidney transplantation make the prevention of renal disease by liver transplantation still an open question.^{34,35} In animal models of GSDI, liver-directed gene therapy did not prevent kidney degeneration and CKD at long term.^{36,37} In addition, targeted deletion of *G6Pase* in the kidney is sufficient to induce the characteristic GSDI nephropathy in mice.¹³ Similarly, in GSDIII patients, liver transplantation did not rescue the cardiac and muscle function impairment,^{38,39} and both liver- and muscle-targeted gene therapies were required to rescue the phenotype of a mouse model of GSDIII.⁴⁰ Thus, a key challenge for successful gene therapy in GSDI and GSDIII is to develop gene therapy tools to efficiently target kidney and muscle in addition to the liver, to prevent both hypoglycemia and long-term pathologies.

GENE THERAPY APPROACHES IN GSDI AND GSDIII

Recent clinical successes in hemophilia A and B, in retinitis pigmentosa, and in spinal muscular atrophy indicate adeno-associated virus (AAV) as the vector of choice for *in vivo* gene therapy.^{41–43} Today, engineering of recombinant AAV vectors has made remarkable strides permitting efficient liver-directed gene therapy.⁴⁴ Moreover, the liver is a preferred target for AAV vectors, thanks to its unique anatomic properties with fenestrated endothelium and a high blood supply, leading to efficient accumulation of AAV vectors within the liver after systemic administration. In addition, AAV genomes are relatively stable in quiescent hepatocytes, generally found in episomal form.^{45,46}

Starting from the identification of the molecular basis of GSDs, different approaches were tested to restore the expression of the mutated proteins and rescue the disease phenotype in animal models of hepatic GSDs. Vectors used to deliver a corrected copy of the transgene included adenovirus,^{47–50} lentivirus,^{51,52} and naked DNA combined with ultrasound-mediated delivery.⁵³ Starting from 2006, AAV became the vectors of choice for gene replacement in hepatic GSDs. More recently, mRNA lipid nanoparticles were used to target rare genetic metabolic diseases⁵⁴ and GSD.⁵⁵ The advantages and limitations of these therapeutic strategies for DNA or RNA delivery into the cell were recently discussed.^{56,57}

AAV gene therapy for GSDI

More than 20 years ago, the availability of murine and canine models of GSDIa and GSDIb stimulated the development of gene replacement strategies for those diseases. Unfortunately, these animal models suffer from severe hypoglycemia and have a very low life expectancy, which makes them unsuitable for studying the effects of gene therapy on the GSDI long-term complications. In total *G6pc*^{-/-} mice or dogs, to avoid premature deaths, glucose therapy, that is, glucose injections, glucose-fortified water, or food supplementation was maintained before AAV injections. More recently, tissue-specific knockout mouse models were obtained with extended life expectancy.⁵⁸ The liver-specific *G6pc*^{-/-} mice recapitulated the human hepatic disease, including intolerance to fasting, metabolic disturbance, and tumor development,⁵⁹ whereas the kidney-specific *G6pc*^{-/-} mice exhibited CKD, as reported in GSDIa patients.^{11,13}

Another important advantage of GSDI regarding AAV gene therapy is that the *G6PC* or the *G6PT* transgenes are relatively short, and this provides a relative freedom in the choice of the elements constituting the transgene expression cassette (Table 1).

Finally, restoration of a low hepatic *G6Pase* activity is sufficient to control glycemia. Indeed, the first data obtained with AAV gene therapy in canine and murine models of GSDIa confirmed that low levels of *G6PC* transgene expression, that is, 3–5% of wild-type (WT) activity, were sufficient to prevent hypoglycemia.^{60–62} Similarly, in GSDIb, gene therapy with AAV vectors resulted in improved survival and long-term correction of the hypoglycemia in *G6pt*^{-/-} mice, at doses comparable with those used in GSDIa.^{63,64} As expected, due to the very low integration rates of AAV vectors, gene therapy resulted in the transient correction of myeloid abnormalities in *G6pt*^{-/-} mice.⁶³

However, those pioneer studies highlighted some of the limitations of AAV gene therapy for GSDI. First, the treatment of 2-week-old mice resulted in vector genome loss possibly due to the liver and kidney degeneration underlying the disease pathology and/or liver growth.³⁷ Despite vector dilution, the correction of liver impairment was stable up to 6 months in mice and 1 year in dogs after administration of an AAV8 vector expressing the *G6PC* transgene.⁶⁵ Long-term studies conducted in dogs reported a progressive transgene loss, requiring up to three repeated administrations of AAV vectors pseudotyped in different serotypes to avoid IgG-mediated neutralization and achieve sustained efficacy (Table 1).^{36,66–68} The need of

Table 1. Adeno-associated viral vector-based gene therapies in hepatic glycogen storage diseases type I and type III

Disease	Serotype	Dose	Age at Treatment	Promoter	Transgene	Animal Model	Reference
GSDIa	ssAAV2/1 or ssAAV2/8	5×10^{11} vg/animal at 1–2 days, or/and 1.5×10^{12} vg/animal at 7 days	Neonates and/or 7 days	CAG	mG6pc	G6pc ^{-/-} mouse	68
GSDIa	ssAAV2/8 or dsAAV2/8	1×10^{12} vg/animal	2 weeks	Canine G6PC	Canine G6PC	G6pc ^{-/-} mouse	37
GSDIa	dsAAV2/1	$1-3 \times 10^{13}$ vg/kg	2 weeks (mouse)	Mini hGPE	hG6PC	G6pc ^{-/-} mouse	65
	dsAAV2/8	$3 \times 10^{11}-1 \times 10^{13}$ vg/kg (mouse)	3 days (dogs)			G6pc ^{-/-} dog	
		10^{13} vg/kg (dog)					
GSDIa	ssAAV2/8 and ssAAV2/1	5×10^{13} vg/kg and 1×10^{12} vg/kg	Neonates and 20 weeks	CAG	mG6pc	G6pc ^{-/-} dog	68
GSDIa	ssAAV2/8	1×10^{12} vg/animal	Neonates, or 2 or 4 weeks	CAG or hGPE	hG6PC	G6pc ^{-/-} mouse	73
GSDIa	dsAAV2/2, or dsAAV2/7, or dsAAV2/8, or dsAAV2/9	2×10^{12} vg/kg or 1×10^{13} vg/kg	2 weeks	Mini hGPE	hG6PC	G6pc ^{-/-} mouse	72
GSDIa	dsAAV2/9, and 0 to 3 readministrations with dsAAV2/8, dsAAV2/7, dsAAV2/9, dsAAV2/1	$2-4 \times 10^{13}$ vg/kg, readministration at $2 \times 10^{12}-1 \times 10^{13}$ vg/kg	Neonates, readministration at 2–43 months	Mini hGPE	hG6PC	G6pc ^{-/-} dog	66
GSDIa	ssAAV2/8	$5 \times 10^{12}-3 \times 10^{13}$ vg/kg	2–4 weeks, or 15 weeks, or 30 weeks	hGPE	hG6PC	G6pc ^{-/-} mouse	62
GSDIa	ssAAV2/8	$1.8-3.6 \times 10^{12}$ vg/kg	2 weeks	hGPE	hG6PC	G6pc ^{-/-} mouse	75
GSDIa	ssAAV2/8	$2-6 \times 10^{12}$ vg/kg	2 weeks	hGPE	hG6PC	G6pc ^{-/-} mouse	61,74
GSDIa	ssAAV2/1 or ssAAV2/8 with readministration	$1-2 \times 10^{13}$ vg/kg and readministration at $1-2 \times 10^{13}$ vg/kg	Neonates and readministration at 2 and 6 months	hGPE	hGPE	G6pc ^{-/-} dog	67
GSDIa	dsAAV2/8 or dsAAV2/9 at birth, and readministration with dsAAV2/8, or dsAAV2/9, or dsAAV2/7	$1-4 \times 10^{13}$ vg/kg at birth, and readministration at $1 \times 10^{12}-1 \times 10^{13}$ vg/kg	Neonates, and 1 to 3 readministrations at 2–58 months	Mini hGPE	hG6PC	G6pc ^{-/-} dog	36
GSDIb	ssAAV2/8	6×10^{13} vg/kg	Neonates	CAG	hG6PT	G6pt ^{-/-} mouse	64
GSDIb	ssAAV2/8	7×10^{12} vg/kg at 1–2 days and 2×10^{13} vg/kg at 4 weeks	1–2 days and 4 weeks	hGPE	hG6PT	G6pt ^{-/-} mouse	63
	dsAAV2/8	1.4×10^{13} vg/kg and 4×10^{13} vg/kg		mini hGPE			
GSDIII	ssAAV2/8	1×10^{11} vg/animal or 1×10^{12} vg/animal	3 months	hAAAT	Secreted hGAA	Agf ^{-/-} mouse	40
	Dual ssAAV2/9	1×10^{12} vg/animal $\times 2$	3 months	CMV, or hAAAT, or CAG	hGDE	Agf ^{-/-} mouse	

Neonates: 1–2 day-old mice.

AAV, adeno-associated virus; CAG, CMV early enhancer/chicken beta actin promoter; CMV, cytomegalovirus promoter; ds, double stranded; GSD, glycogen storage disease; hAAAT, human α -1-antitrypsin promoter; hG6PC, human glucose-6 phosphatase; hGAA, human acid alpha-glucosidase; hGDE, human glycosyl branching enzyme; hGPE, human G6PC promoter (–2.864 to –1); mG6PC, murine glucose-6 phosphatase; mini hGPE, minimal human G6PC promoter (–288 to +128); mini hGPE, minimal human G6PT promoter (610 bp); ss, single stranded; vg, vector genome.

simultaneous targeting of liver and kidney constituted a second technical barrier for the correction of the disease at a systemic level with some AAV serotypes that were very inefficient in kidney targeting.^{37,65} Despite this limitation, correction of kidney and liver disease was partially achieved with single-stranded AAV1 vectors.⁶⁹ Differently from WT AAV that has a single-stranded (ssAAV) genome, recombinant AAV vectors can have both single and double-stranded genomes. The use of double-stranded AAV (dsAAV) vectors may improve transduction efficacy and AAV vector genome stability.^{70,71} Accordingly, in GSDIa, dsAAV9 vectors allowed for the efficient expression of *G6PC* in both liver and kidney and the rescue of glycogen accumulation, glycemia, and kidney function.⁷² However, low transduction efficacy was obtained and the loss of transgene expression was reported in the kidney at long term (~1 year after vector injection), suggesting that the tissue degeneration associated with the diseased state was not fully corrected by gene therapy.⁷² Another possible cause of the low persistence of the *G6PC* transgene may be due to the formation of an antitransgene immune response, leading to the clearance of the cells expressing the transgene. Early finding indicated that the use of a constitutive promoter (cytomegalovirus early enhancer/chicken beta actin promoter [CAG]) to express *G6PC* was associated with higher CD8 positive infiltrates in the liver and lower transgene persistence.⁷³ However, a similar transgene expression cassette was used to transduce hepatocytes in GSDIa dogs without any evident immune response, even after readministration.⁶⁸ This suggests that antitransgene immune responses may have a marginal role in the low transgene persistence observed in the different animal models.

The second limitation concerns the prevention of long-term hepatic and renal complications, very prevalent in the GSDI population,⁹ by AAV gene therapy. Preclinical studies performed in total *G6pc*^{-/-} mice showed that the long-term expression of the *G6PC* transgene under transcriptional control of the human *G6PC* promoter (hGPE) prevented the formation of liver tumors (Table 1).^{61,62,74,75} Results indicated that a low percentage of G6Pase activity (>2% of normal hepatic G6Pase activity) could be sufficient to avoid the formation of HCA in GSDIa mice.⁶¹ In GSDIb mouse model, a higher percentage (6–8%) of the WT *G6PT* activity was required to prevent the formation of HCA in 60–78-week-old animals.⁶³ The prevention of tumors formation by AAV gene therapy in GSDIa dogs is less clear and controversial. Indeed, in one study, despite high G6Pase

activity (21% to 52% of normal hepatic G6Pase activity), four out of five treated dogs developed HCA and HCC.³⁶ Moreover, three of the five AAV-treated dogs developed CKD due to a very low kidney transduction.³⁶ In a second study, none of the dogs developed long-term complications.⁶⁷ This difference, attributed to a strict dietary management, allowing for a better control of liver degeneration, may account for the improved efficacy of gene therapy^{76,77} and supports the use of combination therapies in gene transfer.⁷⁸ However, it should be noted that in the second study, the treated GSDIa dogs showed a time-dependent decrease in blood glucose and died at a mean age of 5.9 years, despite the strict metabolic control and the sequential administration of two AAV vectors.⁶⁷

The experience accumulated in >20 years of practice with the animal models and gene transfer in GSDIa resulted, this year, in a phase 1/2 open-label clinical trial (NCT03517085; Ultragenyx Pharmaceutical, Inc.). Preliminary results obtained from three patients in the low dose cohort (2.0×10^{12} vg/kg) demonstrated efficacy with an average 80% of improvement in the time to hypoglycemic event, together with a 38% reduction in the total daily cornstarch consumption.⁷⁹ The administration of the AAV8 vectors expressing human *G6PC* at the low dose was associated with alanine aminotransferase (ALT) elevation in two patients out of three.⁷⁹ Based on the results obtained in clinical trials on the use of AAV8 for hemophilia B, the ALT elevation observed in the GSDIa trial is likely associated with an immune response to the AAV vector capsid and can be controlled by a short course of corticosteroids.⁸⁰ However, the kinetic of the formation of the immune response in patient 1, which required two corticosteroid treatments at week 8 and week 20, may suggest a distinct trait when compared with the hemophilia B trial.⁸⁰ So far, the sponsor has provided no interpretation of these results based on immune-monitoring data. Given the demonstration of efficacy and the acceptable safety profile, the Data Monitoring Committee positively advised to continue the trial with the enrollment of cohort 2 at the dose of 6.0×10^{12} vg/kg.

AAV gene therapy for GSDIII

In hepatic GSD other than GSDI, the experience with gene transfer in general, and with AAV in particular, is limited. In GSDIII, the development of an AAV-based gene therapy approach was delayed by (1) the complexity of the disease, which requires simultaneous liver and muscle targeting, (2) the lack of small animal models, and (3) the size

of the transgene that is close to the AAV genome packaging limit (~5 kb).

A dog model of GSDIII was described in 2012. This model showed extensive accumulation of glycogen in liver and muscle, together with hepatic cirrhosis and muscle fibrosis at long term.^{81,82} Starting from 2014, four mouse models of GSDIII were described and all recapitulated the characteristics of the human GSDIII disease with glycogen accumulation in the liver and muscle, hypoglycemia, muscle strength impairment, and intolerance to exercise.^{29,40,83,84} The availability of these small animal models allowed for the development of an AAV vector-based gene therapy approach for GSDIII. The use of recombinant human acid alpha-glucosidase (GAA) was suggested for the clearance of cytosolic glycogen accumulated in GSDIII primary myoblasts.⁸⁵ Similarly, the treatment of GSDIII mice with an optimized vector expressing a liver-secreted GAA⁸⁶ was able to reduce glycogen accumulation in liver.⁴⁰ Surprisingly, despite the high levels of GAA enzyme taken up in muscle, no reduction of glycogen accumulation was observed,⁴⁰ suggesting different mechanisms underlying glycogen degradation in liver and muscle.

One of the biggest obstacles for the development of an AAV gene therapy approach for GSDIII is the size of the transgene, which is larger than the AAV vector encapsidation capacity. A dual vector strategy was developed to express GDE in muscle and liver. Following this strategy, the GDE transgene sequence was split into two different vectors. The recombination relied on an overlapping sequence, derived from the GDE transgene and present in both vectors. The use of a constitutive cytomegalovirus promoter permitted for the efficient reconstitution of the full size GDE sequence and the consequent expression of the transgene in muscle. This was associated with reduced glycogen accumulation in different muscles and the rescue of muscle strength. Interestingly, when a liver-specific promoter was used, glycemia was only partially rescued and a high variability in the expression of the GDE transgene was reported. Hepatocyte proliferation and degeneration due to the development of fibrosis in GSDIII²⁹ may explain the partial rescue of glycemia despite the high doses of AAV vectors used to target the liver.^{29,40}

ALTERNATIVE GENE THERAPY APPROACHES ADDRESSING THE LIMITATIONS OF AAV GENE THERAPY

Liver gene therapy with AAV vectors in neonate animals results in vector genome dilution and

transgene loss after liver growth since the AAV vector genomes remain for the vast majority in the nonintegrated episomal form.^{45,46} In adult hemophilia B dogs, canine coagulation Factor IX was stably expressed for more than 10 years.⁸⁷ Accordingly, in a pioneer clinical trial for hemophilia B, Nathwani *et al.* demonstrated stable expression of the human coagulation Factor IX for a period of 6 years, indicating the lack of transgene expression loss in hepatocytes.⁸⁸ One important advantage of hemophilia B is that the underlying mutations slightly affect liver function and hepatocytes can be considered as normal.

In GSDI and GSDIII, the impaired enzymatic function results in the modification of hepatocyte metabolism that ultimately leads to enhanced proliferation, apoptosis, and/or transformation and cell death.^{10,29} Increased hepatocytes proliferation and wasting are likely to result in AAV vector genome dilution and transgene expression loss. Indeed, repeated administrations of AAV vectors were required to achieve stable correction of the hypoglycemia in GSDIa dogs (Table 1) and glycemia correction was reduced over time when the vector was administered early in life (up to 6 months of age).⁶⁷ Integrative approaches, based on lentivirus^{51,52} or zinc finger (ZFN)-mediated targeted integration,^{89,90} were developed in GSDIa mice. Interestingly, integration of the *G6PC* transgene by lentivirus resulted in an increased transduction of hepatocytes between neonatal state and 9 months postinjection, leading to ~20% of *G6PC*-expressing hepatocytes and resulting in the prevention of tumor formation in liver-specific *G6pc*^{-/-} mice.⁵¹ However, the potential genotoxicity of the integrative approaches *in vivo* is still questioned and it is particularly relevant in hepatic GSDs that are associated with hepatocytes degeneration and HCA and HCC formation. Recently, data obtained *in vivo* by genome editing with ZFN or CRISPR/Cas9 targeted to the ROSA26 safe harbor locus demonstrated specific integration of the *G6PC* transgene together with complete rescue of hypoglycemia in *G6pc*^{-/-} mice.⁸⁹⁻⁹¹

Another potential approach, circumventing both the AAV persistence and the potential genotoxicity of integrative approaches, is the use of synthetic mRNA delivered by lipid nanoparticles.⁹² Proof-of-concept studies performed in liver-specific *G6pc*^{-/-} mice showed a marked improvement of glycemia and hepatomegaly after single administration of the mRNA nanoparticle complex allowing for the efficient expression of G6Pase.^{55,93}

Finally, it was suggested that combination therapy might improve liver function and decrease

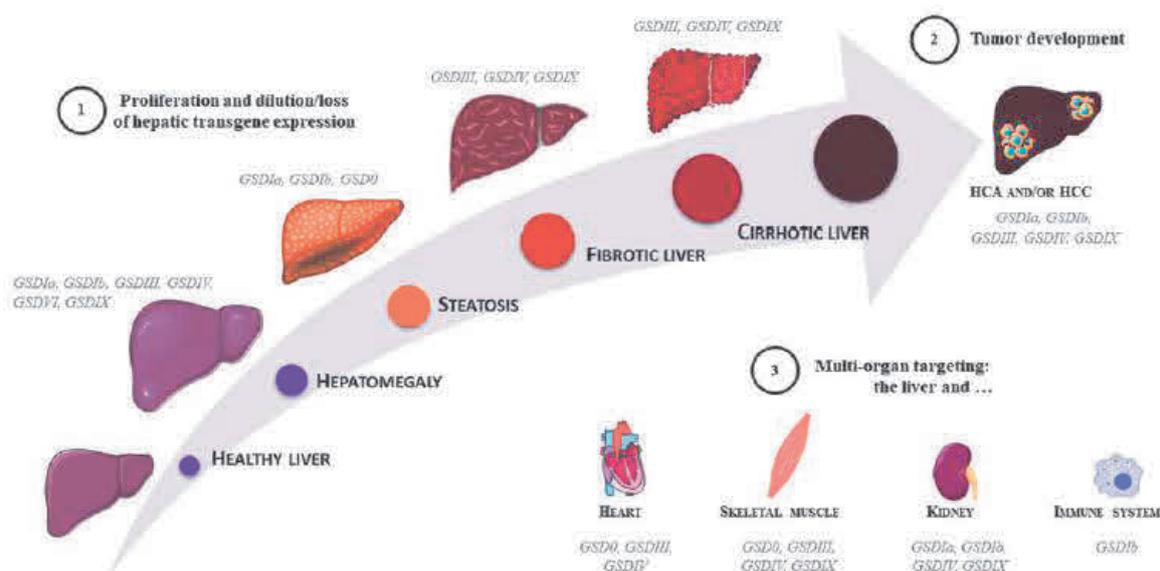


Figure 2. AAV gene therapy challenges in hepatic glycogen storage diseases. Increased liver size (*i.e.*, hepatomegaly) is a hallmark of hepatic GSDs. The liver function impairment may evolve in steatosis or fibrosis/cirrhosis and ultimately in the formation of HCA or HCC. (1) Increased hepatocytes proliferation may result in vector genome dilution and efficacy loss after AAV gene therapy. (2) Predisposition to tumor development may represent a risk for AAV gene transfer in GSDs. (3) The involvement of tissues other than liver in GSDs represents a further challenge for the development of gene therapy approaches. AAV, adeno-associated virus; GSDs, glycogen storage diseases; HCA, hepatocellular adenoma; HCC, hepatocellular carcinoma.

apoptosis, leading to a better efficacy of gene therapy. In principle, the rescue of hepatocytes degeneration may improve transgene persistence and ultimately lead to long-term correction of the hepatic manifestation in GSDI and GSDIII by a single dose of AAV vector. For example, substrate reduction strategies were attempted to rescue the metabolic phenotype in GSDIa and GSDIII. A small interfering RNA (siRNA) specific for the liver isoform of glycogen synthase (*Gys2*) was developed to decrease glycogen synthesis and accumulation in the liver. Long-term treatment with *Gys2*-specific siRNA prevented glycogen accumulation in the liver and rescued hepatomegaly in a mouse model of GSDIII.²⁹ Similarly, in liver-specific *G6pc*^{-/-} mice, decreased glycogen accumulation and normalization of the liver morphology were observed.²⁹ Thus, although the siRNA-mediated inhibition of *Gys2* did not rescue glycemia, this approach can be considered in combination with gene therapy. Bezafibrate, a pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist, was proposed in combination with ZFN-mediated targeted integration to improve treatment efficacy.⁸⁹ Bezafibrate treatment in combination with AAV gene therapy improved survival, glycemia, and hepatomegaly in *G6pc*^{-/-} mice. The beneficial effect observed after bezafibrate treatment, possibly due to autophagy

induction,⁹⁴ was associated with improved vector genome copy number and integration in hepatocytes.⁸⁹ This could be linked to the global amelioration of the metabolism of targeted organs, since fenofibrate, a bezafibrate analog, has recently been reported to prevent the deleterious evolution of both liver and kidney diseases in liver- and kidney-specific deficient *G6pc*^{-/-} mice, respectively.¹⁴

CONCLUSIONS

In the past years, gene therapy reached maturity, moving from proof of concept to preclinical studies and clinical trials. New therapeutic approaches are being developed for a growing number of indications. However, current limitations of AAV-mediated gene transfer, in addition to those related to the immune response to the AAV product, include (1) the reduced persistence of vector genomes, in particular, in diseases with an underlying liver degeneration, (2) the potential genotoxicity of integrated genomes, and (3) the need of high vector doses to target nonpermissive tissues (Fig. 2). The hepatocyte degeneration observed in GSDI and GSDIII makes them an ideal test bench to develop novel approaches to overcome the actual gene therapy limitations in liver gene transfer. In addition to that, the need to treat a second tissue

other than liver and the transgene size in GSDIII represents technical challenges for the available gene therapy tools. Hybrid promoters with dual tissue specificity,⁹⁵ new capsids with enhanced targeting of both liver and muscle or kidney, and new strategies to increase dual vectors recombination⁹⁶ may represent a potential solution.

An emerging concept particularly adapted to the treatment of metabolic diseases is the combination of gene therapy with other therapeutic strategies. The 20-year-long experiences in gene therapy for GSDIa clearly indicate that the degeneration of hepatocytes affects the long-term efficacy of gene therapy. Pharmacological intervention or dietary regimen aimed at the amelioration of the liver impairment before the administration of gene therapy demonstrated improved efficacy in GSDI. The combination of specific dietary regimen with gene therapy has the potential to improve the outcome of the treatment by improving vector persistence and by delaying the long-term complications onset.

In conclusion, the experience accumulated with both small and large animal models of GSDI and GSDIII hints at new therapeutic strategies for metabolic diseases. Those models represent a

unique opportunity to identify molecular targets to improve the efficacy of gene transfer in the liver. Although we cannot exclude the existence of disease-specific pathways, it is likely that at least some parts of the underlying mechanisms are shared among the different diseases with hepatocyte degeneration. Therefore, the improvement of gene therapy for GSDI and GSDIII represents a unique opportunity to devise novel approaches and ultimately provide safe and efficacious treatments for genetic metabolic diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

GSDI and GSDIII researchers at Genethon and Inserm U1213/Université Lyon I have been supported by Genethon, the “Association Française contre la Myopathie”, the “Association Francophone des Glycogénoses,” and the National Research Agency (ANR16-CE14-0022-02 and ANR-17-CE18-0014).

AUTHOR DISCLOSURE

G.R. is inventor in patents related to the development of gene therapy strategies for GSDIII.

REFERENCES

- Soty M, Gautier-Stein A, Rajas F, et al. Gut-brain glucose signaling in energy homeostasis. *Cell Metab* 2017;25:1231–1242.
- Kanungo S, Wells K, Tribett T, et al. Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Ann Transl Med* 2018;6:474.
- Chen MA, Weinstein DA. Glycogen storage diseases: diagnosis, treatment and outcome. *Transl Sci Rare Dis* 2016;1:45–72.
- Burda P, Hochuli M. Hepatic glycogen storage disorders: what have we learned in recent years? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015;18:415–421.
- Godfrey R, Quinlivan R. Skeletal muscle disorders of glycogenolysis and glycolysis. *Nat Rev Neurol* 2016;12:393–402.
- Bruni N, Rajas F, Montano S, et al. Enzymatic characterization of four new mutations in the glucose-6 phosphatase (G6PC) gene which cause glycogen storage disease type 1a. *Ann Hum Genet* 1999;63:141–146.
- Chevalier-Porst F, Bozon D, Bonardot AM, et al. Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type 1a. *J Med Genet* 1996;33:358–360.
- Froissart R, Piraud M, Boudjemline AM, et al. Glucose-6-phosphatase deficiency. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:27.
- Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, et al. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2014;16:e1.
- Gjorgjieva M, Calderaro J, Monteillet L, et al. Dietary exacerbation of metabolic stress leads to accelerated hepatic carcinogenesis in glycogen storage disease type Ia. *J Hepatol* 2018;69:1074–1087.
- Gjorgjieva M, Raffin M, Duchamp A, et al. Progressive development of renal cysts in glycogen storage disease type I. *Hum Mol Genet* 2016;25:3784–3797.
- Gjorgjieva M, Oosterveer MH, Mithieux G, et al. Mechanisms by which metabolic reprogramming in GSD1 liver generates a favorable tumorigenic environment. *J Inborn Errors Metab Screen* 2016;4:1–10.
- Clar J, Gri B, Calderaro J, et al. Targeted deletion of kidney glucose-6 phosphatase leads to nephropathy. *Kidney Int* 2014;86:747–756.
- Monteillet L, Gjorgjieva M, Silva M, et al. Intracellular lipids are an independent cause of liver injury and chronic kidney disease in non alcoholic fatty liver disease-like context. *Mol Metab* 2018; 16:100–115.
- Steunenberg TAH, Peeks F, Hoogeveen IJ, et al. Safety issues associated with dietary management in patients with hepatic glycogen storage disease. *Mol Genet Metab* 2018;125:79–85.
- Damska M, Labrador EB, Kuo CL, et al. Prevention of complications in glycogen storage disease type Ia with optimization of metabolic control. *Pediatr Diabetes* 2017;18:327–331.
- Okechuku GO, Shoemaker LR, Damska M, et al. Tight metabolic control plus ACE inhibitor therapy improves GSD I nephropathy. *J Inher Metab Dis* 2017;40:703–708.
- Beegle RD, Brown LM, Weinstein DA. Regression of hepatocellular adenomas with strict dietary therapy in patients with glycogen storage disease type I. *JIMD Rep* 2015;18:23–32.
- Wang DQ, Fiske LM, Carreras CT, et al. Natural history of hepatocellular adenoma formation in glycogen storage disease type I. *J Pediatr* 2011; 159:442–446.
- Melis D, Cozzolino M, Minopoli G, et al. Progression of renal damage in glycogen storage disease type I is associated to hyperlipidemia: a multicenter prospective Italian study. *J Pediatr* 2015;166:1079–1082.
- Sentner CP, Hoogeveen IJ, Weinstein DA, et al. Glycogen storage disease type III: diagnosis, genotype, management, clinical course and outcome. *J Inher Metab Dis* 2016;39:697–704.
- Derks TG, Smit GP. Dietary management in glycogen storage disease type III: what is the evidence? *J Inher Metab Dis* 2015;38:545–550.

23. Brambilla A, Mannarino S, Pretese R, et al. Improvement of cardiomyopathy after high-fat diet in two siblings with glycogen storage disease type III. *JIMD Rep* 2014;17:91–95.
24. Dagli AI, Zori RT, McCune H, et al. Reversal of glycogen storage disease type IIIa-related cardiomyopathy with modification of diet. *J Inher Metab Dis* 2009;32 Suppl 1:S103–S106.
25. Santner CP, Caliskan K, Vletter WB, et al. Heart failure due to severe hypertrophic cardiomyopathy reversed by low calorie, high protein dietary adjustments in a glycogen storage disease type IIIa patient. *JIMD Rep* 2012;5:13–16.
26. Valayannopoulos V, Bajolle F, Amouy JB, et al. Successful treatment of severe cardiomyopathy in glycogen storage disease type III With D,L-3-hydroxybutyrate, ketogenic and high-protein diet. *Pediatr Res* 2011;70:638–641.
27. Demo E, Frush D, Gottfried M, et al. Glycogen storage disease type III-hepatocellular carcinoma a long-term complication? *J Hepatol* 2007;46:492–498.
28. Oterdoom LH, Verweij KE, Biemann K, et al. Hepatocellular adenomas and carcinoma in asymptomatic, non-cirrhotic type III glycogen storage disease. *J Gastrointest Liver Dis* 2015;24:515–518.
29. Pursell N, Gierut J, Zhou W, et al. Inhibition of glycogen synthase II with RNAi prevents liver injury in mouse models of glycogen storage diseases. *Mol Ther* 2018;26:1771–1782.
30. Decoste V, Laforet P, De Antonio M, et al. Long term longitudinal study of muscle function in patients with glycogen storage disease type IIIa. *Mol Genet Metab* 2017;122:108–116.
31. Decoste V, Laforet P, Nadaj-Pakleza A, et al. Cross-sectional retrospective study of muscle function in patients with glycogen storage disease type III. *Neuromuscul Disord* 2016;26:584–592.
32. Preisler N, Laforet P, Madsen KL, et al. Skeletal muscle metabolism is impaired during exercise in glycogen storage disease type III. *Neurology* 2015;84:1767–1771.
33. Preisler N, Pradel A, Husu E, et al. Exercise intolerance in glycogen storage disease type III: weakness or energy deficiency? *Mol Genet Metab* 2013;109:14–20.
34. Matern D, Statzl TE, Arnaout W, et al. Liver transplantation for glycogen storage disease types I, III, and IV. *Eur J Pediatr* 1999;158 Suppl 2: S43–S48.
35. Boers SJ, Visser G, Smit PG, et al. Liver transplantation in glycogen storage disease type I. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:47.
36. Brooks ED, Landau DJ, Everitt JJ, et al. Long-term complications of glycogen storage disease type Ia in the canine model treated with gene replacement therapy. *J Inher Metab Dis* 2018;41:965–976.
37. Koerber DD, Sun BD, Damodaran TV, et al. Early, sustained efficacy of adeno-associated virus vector-mediated gene therapy in glycogen storage disease type Ia. *Gene Ther* 2006;13:1281–1289.
38. Kondo Y, Usui H, Ishige-Wada M, et al. Liver cirrhosis treated by living donor liver transplantation in a patient with AGL mutation c.2607-2610delATTC and c.1672dupA. *Clin Chim Acta* 2013;424:19–21.
39. Zobeiri M. Liver transplantation in a myopathic patient with glycogen storage disease type IIIa and decompensated cirrhosis. *Int J Organ Transplant Med* 2017;8:217–220.
40. Vidal P, Pagliarini S, Colella P, et al. Rescue of GSDIII phenotype with gene transfer requires liver- and muscle-targeted GDE expression. *Mol Ther* 2018;26:890–901.
41. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N Engl J Med* 2017;377:1713–1722.
42. Pickar AK, Gersbach CA. Gene therapies for hemophilia hit the mark in clinical trials. *Nat Med* 2018;24:121–122.
43. Bennett J, Wellman J, Marshall KA, et al. Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *Lancet* 2016;388:661–672.
44. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging issues in AAV-mediated in vivo gene therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018;8:87–104.
45. Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, et al. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol Ther* 2000;1:522–532.
46. Nakai H, Montini E, Fuess S, et al. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 2003;34:297–302.
47. Crane B, Luo X, Demaster A, et al. Rescue administration of a helper-dependent adenovirus vector with long-term efficacy in dogs with glycogen storage disease type Ia. *Gene Ther* 2012;19:443–452.
48. Zingone A, Hiraiwa H, Pan CJ, et al. Correction of glycogen storage disease type Ia in a mouse model by gene therapy. *J Biol Chem* 2000;275:828–832.
49. Koerber DD, Sun B, Bird A, et al. Efficacy of helper-dependent adenovirus vector-mediated gene therapy in murine glycogen storage disease type Ia. *Mol Ther* 2007;15:1253–1258.
50. Yiu WH, Pan CJ, Allamanrashed M, et al. Glucose-6-phosphate transporter gene therapy corrects metabolic and myeloid abnormalities in glycogen storage disease type Ib mice. *Gene Ther* 2007;14:219–226.
51. Clar J, Mutal E, Gri B, et al. Hepatic lentiviral gene transfer prevents the long-term onset of hepatic tumours of glycogen storage disease type Ia in mice. *Hum Mol Genet* 2015;24:2287–2296.
52. Grinshpun A, Condiotti R, Waddington SN, et al. Neonatal gene therapy of glycogen storage disease type Ia using a feline immunodeficiency virus-based vector. *Mol Ther* 2010;18:1592–1598.
53. Raju BI, Leyli E, Seip R, et al. Enhanced gene expression of systemically administered plasmid DNA in the liver with therapeutic ultrasound and microbubbles. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2013;60:88–96.
54. Jiang L, Berraondo P, Jerico D, et al. Systemic messenger RNA as an etiological treatment for acute intermittent porphyria. *Nat Med* 2018;24:1899–1909.
55. Roseman DS, Khan T, Rajas F, et al. G6PC mRNA therapy positively regulates fasting blood glucose and decreases liver abnormalities in a mouse model of glycogen storage disease Ia. *Mol Ther* 2018;26:814–821.
56. Aravalli RN, Belcher JD, Steer CJ. Liver-targeted gene therapy: approaches and challenges. *Liver Transpl* 2015;21:718–737.
57. Kaefer AM, ElMallah MK, Flotte TR. Gene therapy 2017: progress and future directions. *Clin Transl Sci* 2017;10:242–248.
58. Rajas F, Clar J, Gautier-Stein A, et al. Lessons from new mouse models of glycogen storage disease type Ia in relation to the time course and organ specificity of the disease. *J Inher Metab Dis* 2015;38:521–527.
59. Mutal E, Abdul-Wahed A, Ramamonjisoa N, et al. Targeted deletion of liver glucose-6-phosphatase mimics glycogen storage disease type Ia including development of multiple adenomas. *J Hepatol* 2011;54:529–537.
60. Beatty RM, Jackson M, Peterson D, et al. Delivery of glucose-6-phosphatase in a canine model for glycogen storage disease, type Ia, with adeno-associated virus (AAV) vectors. *Gene Ther* 2002;9:1015–1022.
61. Kim GY, Lee YM, Kwon JH, et al. Glycogen storage disease type Ia mice with less than 2% of normal hepatic glucose-6-phosphatase- α activity restored are at risk of developing hepatic tumors. *Mol Genet Metab* 2017;120:229–234.
62. Lee YM, Jun HS, Pan CJ, et al. Prevention of hepatocellular adenoma and correction of metabolic abnormalities in murine glycogen storage disease type Ia by gene therapy. *Hepatology* 2012;56:1719–1729.
63. Kwon JH, Lee YM, Cho JH, et al. Liver-directed gene therapy for murine glycogen storage disease type Ib. *Hum Mol Genet* 2017;26:4395–4405.
64. Yiu WH, Pan CJ, Mead PA, et al. Normoglycemia alone is insufficient to prevent long-term complications of hepatocellular adenoma in glycogen storage disease type Ib mice. *J Hepatol* 2009;51:909–917.
65. Koerber DD, Pinto C, Sun B, et al. AAV vector-mediated reversal of hypoglycemia in canine and murine glycogen storage disease type Ia. *Mol Ther* 2008;16:665–672.

66. Demaster A, Luo X, Curtis S, et al. Long-term efficacy following readministration of an adeno-associated virus vector in dogs with glycogen storage disease type Ia. *Hum Gene Ther* 2012;23:407–418.
67. Lee YM, Conlon TJ, Specht A, et al. Long-term safety and efficacy of AAV gene therapy in the canine model of glycogen storage disease type Ia. *J Inherit Metab Dis* 2018;41:977–984.
68. Weinstein DA, Correia CE, Conlon T, et al. Adeno-associated virus-mediated correction of a canine model of glycogen storage disease type Ia. *Hum Gene Ther* 2010;21:903–910.
69. Ghosh A, Allamarvasht M, Pan CJ, et al. Long-term correction of murine glycogen storage disease type Ia by recombinant adeno-associated virus-1-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2006;13:321–329.
70. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 2008;16:1648–1656.
71. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 2001;8:1248–1254.
72. Luo X, Hall G, Li S, et al. Hepatorenal correction in murine glycogen storage disease type I with a double-stranded adeno-associated virus vector. *Mol Ther* 2011;19:1961–1970.
73. Yiu WH, Lee YM, Peng WT, et al. Complete normalization of hepatic G6PC deficiency in murine glycogen storage disease type Ia using gene therapy. *Mol Ther* 2010;18:1076–1084.
74. Kim GY, Kwon JH, Cho JH, et al. Downregulation of pathways implicated in liver inflammation and tumorigenesis of glycogen storage disease type Ia mice receiving gene therapy. *Hum Mol Genet* 2017;26:1890–1899.
75. Lee YM, Kim GY, Pan CJ, et al. Minimal hepatic glucose-6-phosphatase- α activity required to sustain survival and prevent hepatocellular adenoma formation in murine glycogen storage disease type Ia. *Mol Genet Metab Rep* 2015;3:28–32.
76. Brooks ED, Kishnani PS, Koeberl DD. Letter to the Editors: concerning “Long-term safety and efficacy of AAV gene therapy in the canine model of glycogen storage disease type Ia” by Lee et al. *J Inherit Metab Dis* 2018;41:913–914.
77. Lee Y, Chou JY, Weinstein DA. Response letter. *J Inherit Metab Dis* 2018;41:915.
78. Ronzitti G, Mingozzi F. Combination therapy is the new gene therapy? *Mol Ther* 2018;26:12–14.
79. Weinstein D, Ahmad A, Lee C, et al. Positive cohort 1 results from the Phase 1/2 trial with AAV8-mediated liver-directed gene therapy in adults with Glycogen storage disease type Ia. In: ASOCT 22nd Annual Meeting (Washington). *Mol Ther* 2019;4:1–465.
80. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011;365:2367–2365.
81. Brooks ED, Yi H, Austin SL, et al. Natural progression of canine glycogen storage disease type IIIa. *Comp Med* 2016;66:41–51.
82. Yi H, Thurberg BL, Curtis S, et al. Characterization of a canine model of glycogen storage disease type IIIa. *Dis Model Mech* 2012;5:804–811.
83. Liu KM, Wu JY, Chen YT. Mouse model of glycogen storage disease type III. *Mol Genet Metab* 2014;111:467–476.
84. Pagliarini S, Lucchiani S, Ulzi G, et al. Glycogen storage disease type III: a novel Agl knockout mouse model. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:2318–2328.
85. Sun B, Fredrickson K, Austin S, et al. Alglucosidase alfa enzyme replacement therapy as a therapeutic approach for glycogen storage disease type III. *Mol Genet Metab* 2013;108:145–147.
86. Puzo F, Colella P, Biferi MG, et al. Rescue of Pompe disease in mice by AAV-mediated liver delivery of secreted acid α -glucosidase. *Sci Transl Med* 2017;9:pil:eaam6375.
87. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 2009;113:797–806.
88. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994–2004.
89. Kang HR, Waskowicz L, Seifts AM, et al. Bezaflibrate enhances AAV vector-mediated genome editing in glycogen storage disease type Ia. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019;13:265–273.
90. Landau DJ, Brooks ED, Perez-Pinera P, et al. In vivo zinc finger nuclease-mediated targeted integration of a glucose-6-phosphatase transgene promotes survival in mice with glycogen storage disease type Ia. *Mol Ther* 2016;24:697–706.
91. Kang H, Brook E, Courtney D, et al. Genome editing with CRISPR/Cas9 in a GSDIa canine model. In: ASOCT 22nd Annual Meeting (Washington). *Mol Ther* 2019;4:1–465.
92. Berraondo P, Martini PGV, Avila MA, et al. Messenger RNA therapy for rare genetic metabolic diseases. *Gut* 2019;68:1323–1330.
93. Cao J, Silva M, Philippe E, et al. mRNA Therapy for the treatment of glycogen storage disease type Ia (GSD1a). In: ASOCT 22nd Annual Meeting (Washington). *Mol Ther* 2019;4:1–465.
94. Waskowicz LR, Zhou J, Landau DJ, et al. Bezaflibrate induces autophagy and improves hepatic lipid metabolism in glycogen storage disease type Ia. *Hum Mol Genet* 2019;28:143–154.
95. Colella P, Sellier P, Costa Vedra H, et al. AAV gene transfer with tandem promoter design prevents anti-transgene immunity and provides persistent efficacy in neonate pompe mice. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019;12:85–101.
96. Patel A, Zhao J, Duan D, et al. Design of AAV vectors for delivery of large or multiple transgenes. *Methods Mol Biol* 2019;1950:19–33.

Received for publication May 14, 2019;
accepted after revision July 10, 2019.

Published online: July 19, 2019.

B. Essais de thérapie génique par vecteur AAV pour la GSD Ia et efficacité sur la correction de la pathologie hépatique à long-terme

Plusieurs essais de thérapie génique réalisés chez des souris ou des chiens atteints de GSD Ia ont mené au développement d'un essai clinique en phase I/II débuté aux USA en 2018 (NCT03517085). Les résultats de cet essai sont très encourageants et indiquent que la thérapie génique avec des vecteurs AAV est efficace sur la régulation de la glycémie en augmentant la durée entre deux repas et en diminuant les prises régulières de sucres lents comme la Maïzena ou le Glycosade^{®82,83}. Néanmoins, comme cela a déjà été vu dans d'autres essais cliniques³⁰, la présence d'une réponse cytotoxique contre la capsid AAV semble limiter l'efficacité du traitement. Pour cette raison, le développement de nouveaux protocoles thérapeutiques incluant une approche de thérapie génique avec une meilleure efficacité, et un meilleur contrôle de la réponse immunitaire¹⁵⁵, semble être une option thérapeutique prometteuse en vue d'un traitement curatif pour GSD Ia.

Transduire les foies GSD Ia durablement est encore un réel défi. Une possibilité afin d'améliorer l'efficacité de la thérapie génique est d'utiliser un promoteur hépatique fort permettant l'expression durable du transgène dans le foie. Une autre approche est l'utilisation de la codon optimisation, qui a aussi été proposée comme augmentant l'expression du transgène.

Dans cette étude, nous avons voulu comparer l'efficacité de différentes constructions d'AAV9 exprimant l'ADNc *G6PC1* humain, dans sa version sauvage ou codon-optimisée, et sous le contrôle de différents promoteurs. Les versions codon-optimisées du gène humain *G6PC1* ont été obtenues grâce à l'algorithme IDT. Leur contenu en GC s'élève à 48,46%. De plus, nous avons choisi d'utiliser les vecteurs AAV de sérotype 9 afin de pouvoir éventuellement transduire les reins (étude non présentée).

Les différents promoteurs ont été sélectionnés sur la base des connaissances de la littérature. Ainsi, l'efficacité des promoteurs des gènes codant pour la G6PC humaine (hGPE), utilisé comme « gold standard » pour des approches de thérapie génique pour GSD Ia dans la littérature, et pour la G6PC murine (mGPE) a été comparée à celle du promoteur hAAT classiquement utilisé pour cibler l'expression d'un transgène sélectivement dans le foie. L'utilisation des promoteurs *G6PC1* endogènes pourrait permettre l'expression du gène *G6PC* dans le foie mais également dans les reins, dans le cas où ce tissu serait transduit efficacement.

Le but de cette étude a été d'évaluer la persistance de l'expression du transgène dans le foie, et son efficacité sur la régulation de la glycémie ainsi que sur la prévention du développement tumoral hépatique chez les souris L.G6pc^{-/-}.

1) Etude de la perte d'expression du transgène au cours du temps chez les souris L.G6pc^{-/-}

Etant donné que plusieurs études ont rapporté une perte d'efficacité de la thérapie génique dans plusieurs modèles animaux de GSD Ia, nous avons évalué la perte possible de l'expression du transgène au cours du temps grâce au suivi de l'expression d'un gène « rapporteur », mesurée tous les 3 mois dans la circulation sanguine. L'intérêt d'utiliser un gène rapporteur est de pouvoir étudier la dilution

du vecteur AAV en s'affranchissant de l'effet thérapeutique apporté par un transgène exprimant la G6PC. Pour cela, nous avons injecté un vecteur AAV8 exprimant le facteur IX (AAV8-hFIX), sous le contrôle du promoteur hAAT, chez des souris L.G6pc^{+/+} et L.G6pc^{-/-}, à l'âge adulte, à une dose de $1,5 \times 10^{10}$ vg/souris (Figure 31). Le facteur IX est produit par le foie puis secrété dans la circulation sanguine.

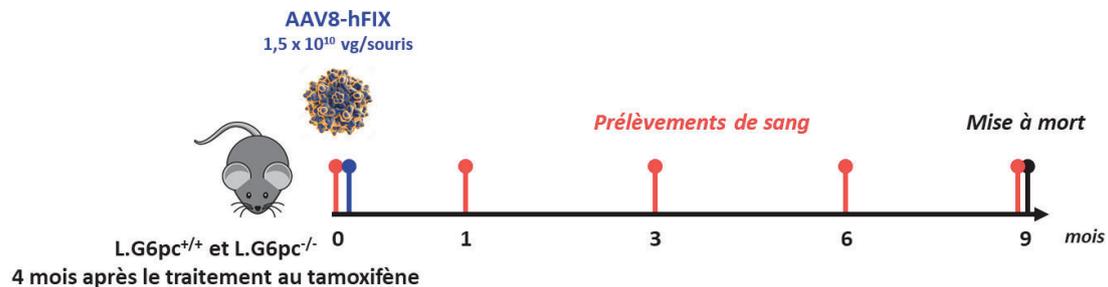


Figure 31: protocole d'évaluation de la transduction de foies de souris GSD Ia et de la persistance d'expression du transgène suivie pendant 9 mois.

Jusqu'à 6 mois post-injection, les taux plasmatiques de facteur IX humain des souris L.G6pc^{-/-} étaient similaires à ceux des souris L.G6pc^{+/+}. Cependant, 9 mois après l'injection, la concentration plasmatique de FIX chez les souris L.G6pc^{-/-} était fortement diminuée par rapport à celle des souris L.G6pc^{+/+} (Figure 32A). De plus, le nombre de copies du vecteur (VGCN) dans le foie des souris L.G6pc^{-/-} était significativement inférieur à celui des souris L.G6pc^{+/+} (Figure 32B). Ces résultats mettent en évidence une perte du transgène chez les souris L.G6pc^{-/-} entre 6 et 9 mois après le traitement par thérapie génique, alors que l'expression d'un transgène reste stable chez les souris L.G6pc^{+/+}.

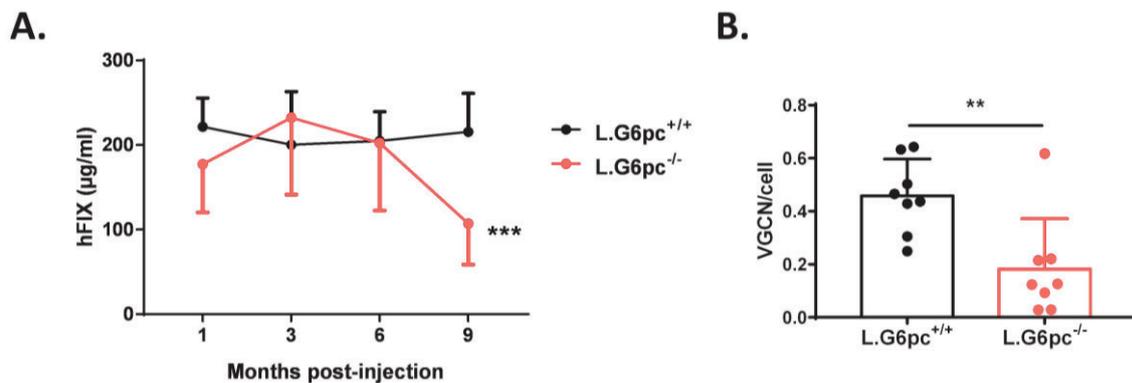


Figure 32: évaluation de la perte d'expression du transgène chez les souris L.G6pc^{-/-}

A. Concentration plasmatique du hFIX, 1, 3, 6, et 9 mois après l'injection de l'AAV. **B.** Nombre de copies du vecteur par cellule diploïde dans le foie. Les significativités ont été déterminées par un test ANOVA (panneau A) ou un test de Student (panneau B), ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

2) Choix des vecteurs AAV permettant de corriger l'activité glucose-6 phosphatase dans le foie des souris L.G6pc^{-/-}

Afin d'améliorer les taux d'expression de la G6PC au niveau hépatique, l'efficacité de différentes constructions AAV exprimant la G6PC a été comparée chez les souris L.G6pc^{-/-} (Figure 33).

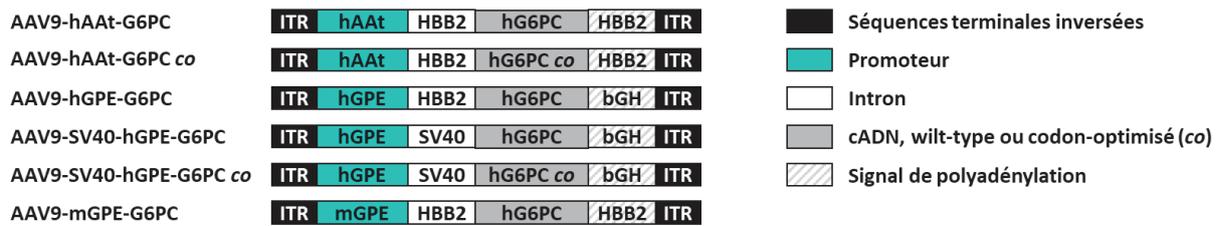


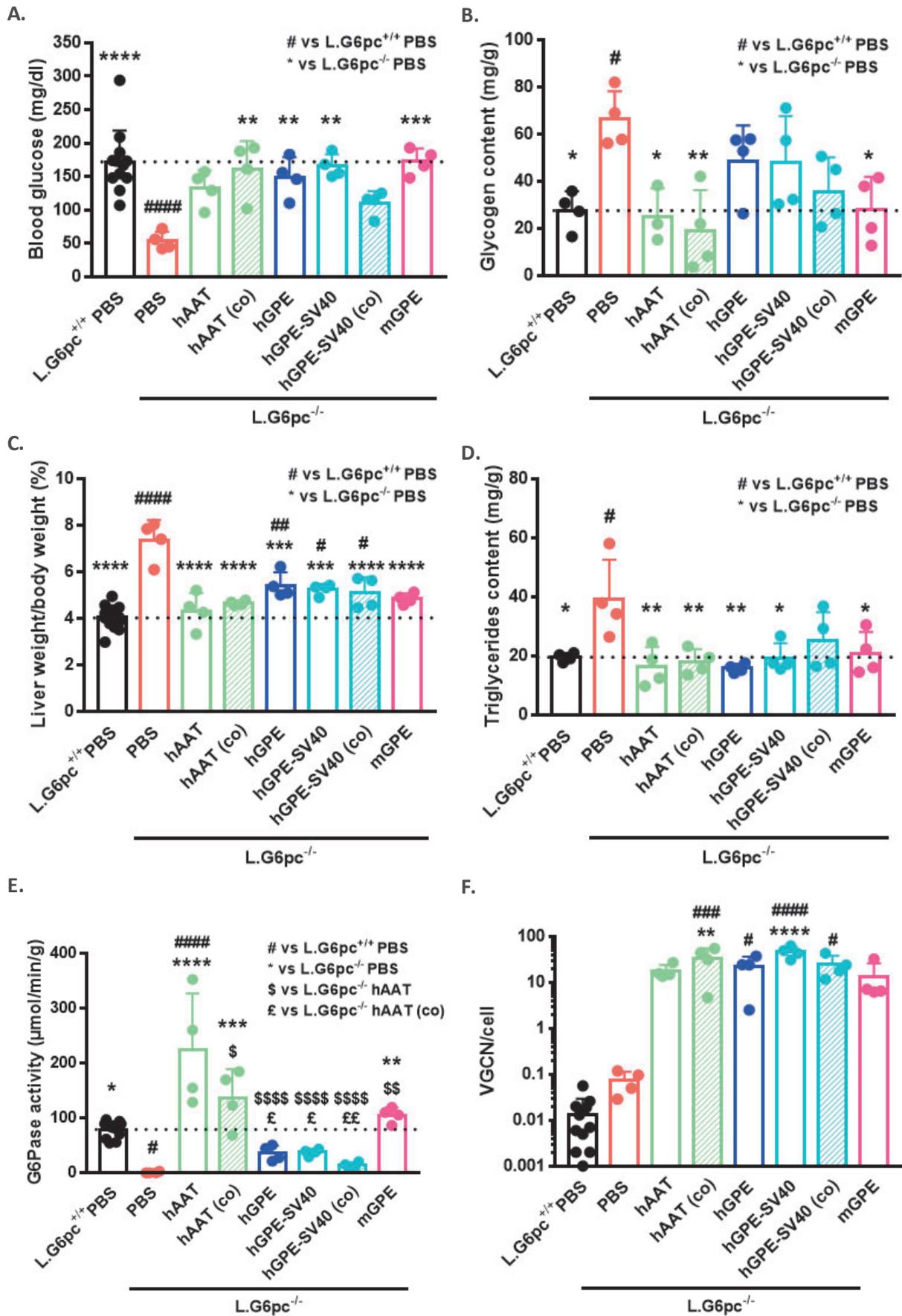
Figure 33: schéma des différentes constructions évaluées chez le modèle murin GSD Ia.

L'efficacité de plusieurs promoteurs a été comparée : (i) le promoteur de l'alpha antitrypsine humaine 1 (hAAT), qui est un promoteur spécifique des hépatocytes, (ii) le promoteur endogène humain de G6PC1 (hGPE), comprenant les nucléotides -2864 à +1 en 5' du gène humain G6PC1, (iii) le promoteur endogène murin de G6pc1 (mGPE), comprenant les nucléotides -1227 à +1 en 5' du gène G6pc1 murin. L'ADNc de la hG6PC a été utilisé sous sa forme wild-type (hG6PC), ou codon-optimisé (hG6PC co). Ces séquences ont été associées à l'intron de la beta globine humaine (HBB2), ou l'intron du virus simien 40 (SV40) ; et à un signal de polyadénylation HBB2 ou de l'hormone de croissance bovine (bGH).

Les différentes constructions ont été injectées à une dose de 1×10^{11} vg/souris à des souris L.G6pc^{-/-} à l'âge adulte et l'efficacité du transgène a été évaluée 15 jours après injection. En parallèle, des souris L.G6pc^{-/-} et L.G6pc^{+/+} ont été injectées avec du PBS comme contrôles.

Tous les vecteurs ont permis de corriger la glycémie mesurée après un jeûne de 6 heures, avec des valeurs comprises entre 100 et 160 mg/dL, bien supérieures au seuil hypoglycémique de 50 mg/dl observé chez les souris L.G6pc^{-/-} non traitées. En particulier, les vecteurs AAV9-hAAT-G6PC co, AAV9-hGPE-G6PC, AAV9-hGPE-SV40-G6PC, et AAV9-mGPE-G6PC ont permis d'atteindre des niveaux de glucose sanguin similaires à ceux des souris L.G6pc^{+/+} (Figure 34A). Au niveau hépatique, les vecteurs AAV9-hAAT-G6PC, AAV9-hAAT-G6PC co et AAV9-mGPE-G6PC ont permis de réduire l'accumulation de glycogène, en abaissant les niveaux de glycogène à des niveaux similaires à ceux observés chez les souris L.G6pc^{+/+}. Au contraire, les vecteurs AAV9-hGPE-G6PC, AAV9-hGPE-SV40-G6PC et AAV9-hGPE-SV40-G6PC co n'ont pas permis de corriger l'accumulation de glycogène (Figure 34B). En conséquence, l'hépatomégalie n'a été corrigée que par les vecteurs AAV9-hAAT-G6PC, AAV9-hAAT-G6PC co et AAV9-mGPE-G6PC (Figure 34C). L'accumulation de triglycérides, mise en évidence chez les souris L.G6pc^{-/-}, a été corrigée par tous les vecteurs excepté le vecteur AAV9-hGPE-SV40-G6PC co (Figure 34D). En accord avec ces résultats, les vecteurs AAV9-hAAT-G6PC, AAV9-hAAT-G6PC co et AAV9-mGPE-G6PC ont permis de corriger complètement l'activité G6Pase, alors qu'elle était significativement plus faible avec les vecteurs AAV9-hGPE-G6PC, AAV9-hGPE-SV40-G6PC et AAV9-hGPE-SV40-G6PC co, représentant environ 18% à 45% de l'activité wild-type. Il est important de souligner que les deux vecteurs hAAT semblent les plus efficaces puisque leur transduction a permis d'obtenir des valeurs d'activité G6Pase hépatiques plus élevées que les souris L.G6pc^{+/+} (Figure 34E), alors que le nombre de copies de vecteur par hépatocytes était similaire pour tous les vecteurs (Figure 34F). L'efficacité des promoteurs hAAT et mGPE a été confirmée par western blot. En effet, bien que tous les vecteurs aient permis l'expression de la protéine G6PC, les vecteurs AAV9-hAAT-G6PC, AAV9-hAAT-G6PC co et AAV9-mGPE-G6PC ont permis d'exprimer des taux plus élevés de la protéine G6PC au niveau du foie, en accord avec les niveaux d'activité G6Pase (Figure 34G).

De façon intéressante, les vecteurs avec la version codon optimisé de hG6PC n'ont pas permis une meilleure correction du phénotype.



G.

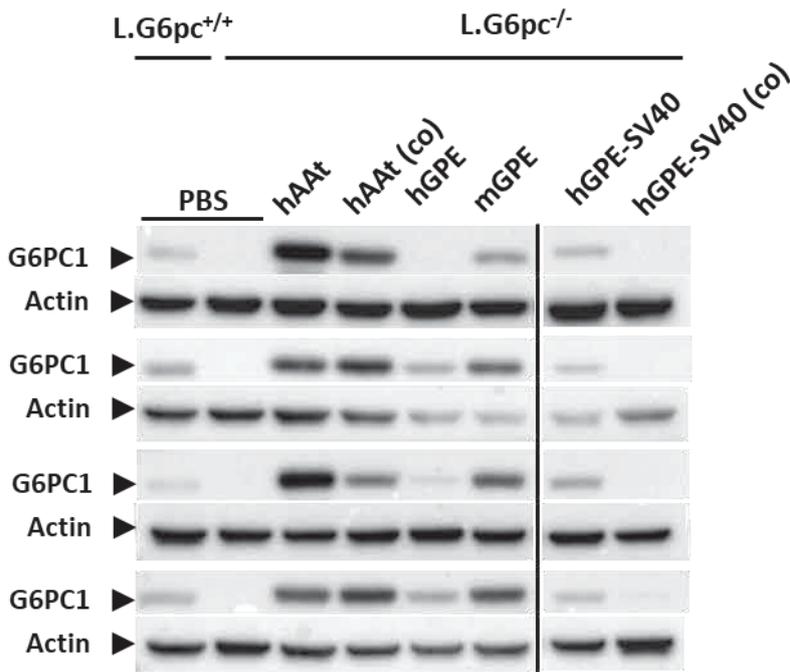


Figure 34: évaluation de l'efficacité, à court terme, des vecteurs AAV9 exprimant la G6PC humaine sous le contrôle de différents promoteurs chez les souris L.G6pc^{-/-}

Les différents vecteurs ont été décrits sur la figure 34. Comme indiqué (co), certains vecteurs comportent une séquence codon optimisée. Des lots de souris L.G6pc^{-/-} ont été injectés avec différents vecteurs à une dose de 1×10^{11} vg/souris, 6 semaines après le traitement au tamoxifène. Les analyses ont été conduites 15 jours après les injections. Les souris L.G6pc^{+/+} ont été utilisées en contrôle ; les valeurs moyennes des souris L.G6pc^{+/+} sont repérées par une ligne en pointillés. **A.** Glycémie après un jeûne de 6 heures. **B.** Quantité de glycogène hépatique. **C.** Poids du foie exprimé en pourcentage du poids de la souris. **D.** Quantité de triglycérides hépatiques. **E.** Activité G6Pase dans le foie. **F.** VGCN par cellule diploïde dans le foie. **G.** Expression de la G6PC1 dans le foie analysée par Western blot. Les significativités ont été déterminées par un test ANOVA, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,005$, ### $p \leq 0,0005$, #### $p \leq 0,0001$ versus les souris L.G6pc^{+/+} ; *, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$ versus les souris L.G6pc^{-/-} PBS ; \$ $p \leq 0,05$, \$\$ $p \leq 0,005$, \$\$\$ $p \leq 0,0001$ versus les souris L.G6pc^{-/-} hAAT ; £ $p \leq 0,05$, ££ $p \leq 0,005$ versus les souris L.G6pc^{-/-} hAAT co ; les barres d'erreur représentent l'écart-type.

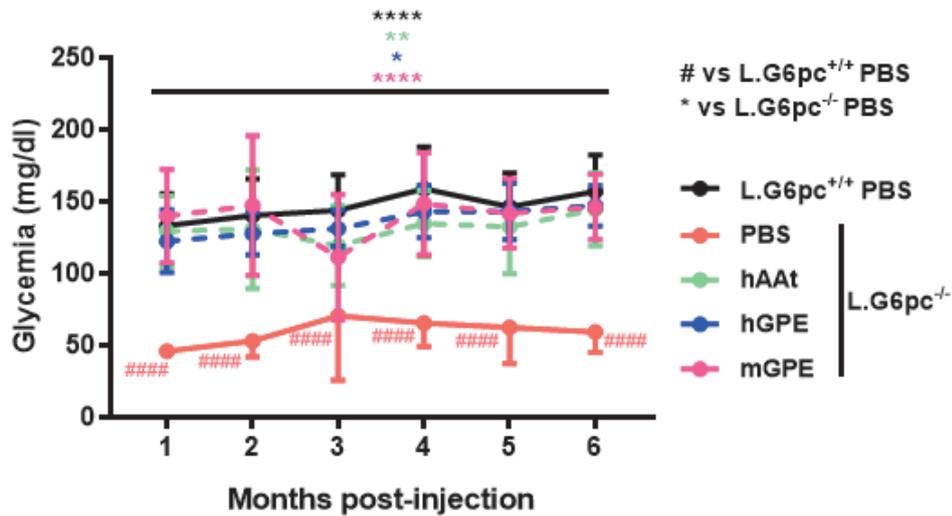
3) Etude de l'efficacité à long-terme des différents vecteurs

L'efficacité des vecteurs les plus prometteurs à court-terme, c'est-à-dire les vecteurs exprimant le gène G6PC1 humain wild-type sous le contrôle des promoteurs hAAT et mGPE a été comparée pendant 6 mois, par rapport au promoteur hGPE, généralement utilisé dans les essais précliniques récents. Les vecteurs ont été injectés aux souris L.G6pc^{-/-} à la dose de $2,5 \times 10^{11}$ vg/souris, à l'âge adulte.

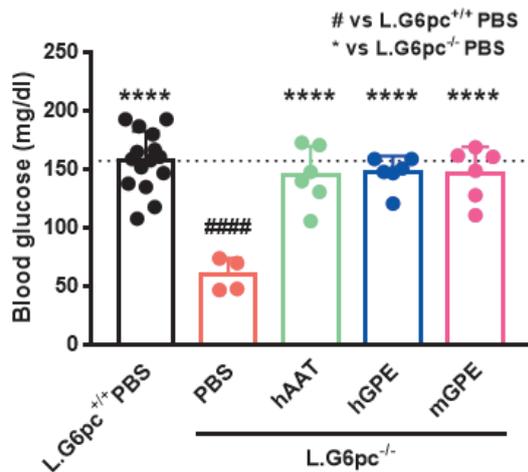
Dès le premier mois après l'injection des vecteurs, la glycémie a été corrigée à des valeurs similaires de celles des souris L.G6pc^{+/+}, quel que soit le vecteur AAV injecté (Figure 35A, B). Cette correction se maintient jusqu'à 6 mois après l'injection, alors que les souris L.G6pc^{-/-} développent une hypoglycémie après 6h de jeûne (Figure 35B). De même, les trois vecteurs ont permis une normalisation des taux de glycogène dans le foie (Figure 35C) et une correction de l'hépatomégalie (Figure 35D). De façon surprenante, la quantité de triglycérides n'était pas augmentée de façon significative chez les souris L.G6pc^{-/-} par rapport aux souris L.G6pc^{+/+}, et aucune accumulation des triglycérides hépatiques n'a été observée chez les souris traitées (Figure 35E). En lien avec ces résultats, l'activité de la G6Pase a été corrigée par les trois vecteurs (Figure 35F).

Ces résultats indiquent que les trois vecteurs permettent d'exprimer des niveaux de G6Pase similaires à ceux des souris L.G6pc^{+/+}, de corriger le phénotype hépatique des souris L.G6pc^{-/-} et de maintenir une glycémie post-absorptive similaire à celle des souris saines, jusqu'à 6 mois après l'injection des vecteurs. Il est cependant important de noter que l'efficacité des vecteurs hAAT et mGPE semble être légèrement supérieure (Figure 35F), alors que la transduction du foie est similaire pour tous les vecteurs (Figure 35G).

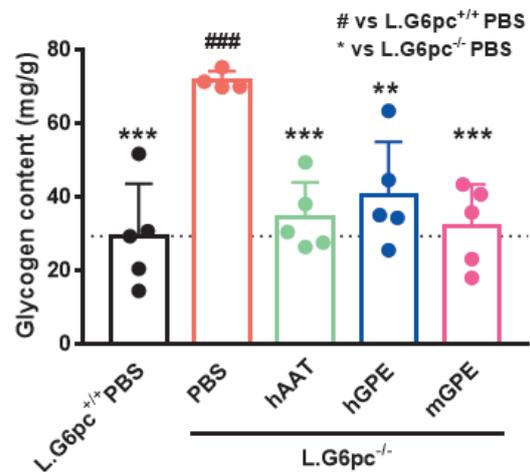
A.



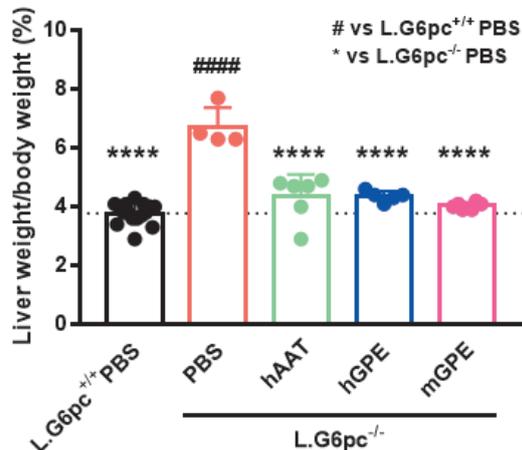
B.



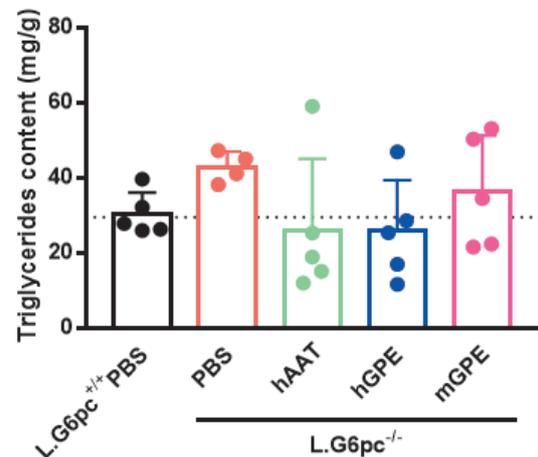
C.



D.



E.



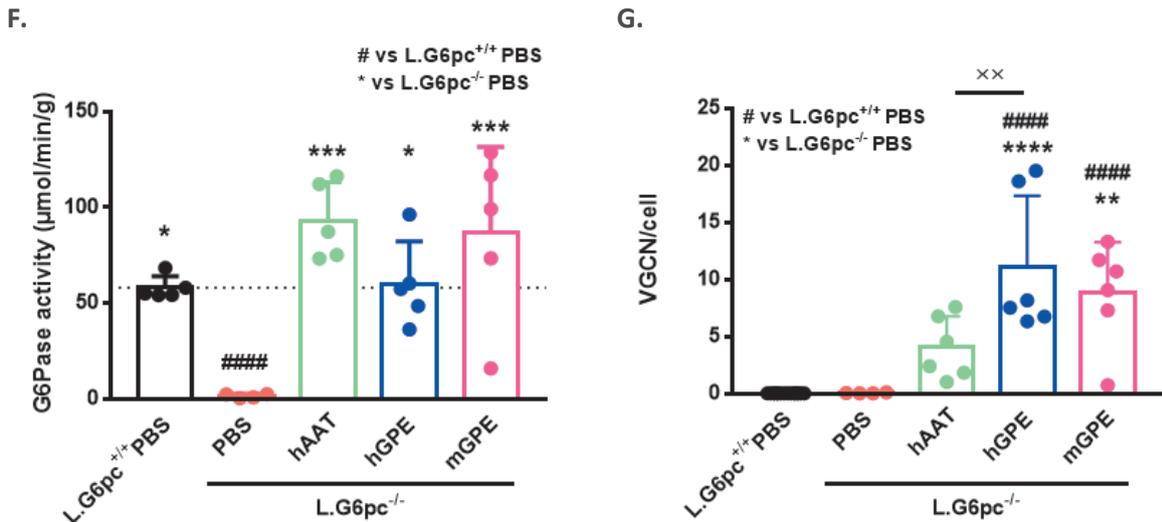


Figure 35: suivi à long-terme des souris L.G6pc^{-/-} injectées avec les vecteurs exprimant le gène G6PC1 sous le contrôle des promoteurs hAAT, hGPE ou mGPE.

Des lots de souris L.G6pc^{-/-} ont été injectés avec différents vecteurs à $2,5 \times 10^{11}$ vg/souris, 6 semaines après le traitement au tamoxifène. Les souris L.G6pc^{+/+} ont été utilisées en contrôle ; les valeurs moyennes des souris L.G6pc^{+/+} sont repérées par une ligne en pointillés. Les analyses ont été conduites 6 mois après le traitement. **A.** Suivi de la glycémie tous les mois après un jeûne de 6 heures. **B.** Glycémie 6 mois après l'injection des vecteurs. La glycémie a été mesurée après un jeûne de 6 heures. **C.** Quantité de glycogène hépatique. **D.** Poids du foie exprimé en pourcentage du poids de la souris **E.** Quantité de triglycérides hépatiques. **F.** Activité G6Pase dans le foie. **G.** VGCN par cellule diploïde dans le foie. Les significativités ont été déterminées par un test ANOVA, #### $p \leq 0,0005$, ##### $p \leq 0,0001$ versus les souris L.G6pc^{+/+} ; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$ versus les souris L.G6pc^{-/-} PBS; les barres d'erreur représentent l'écart-type.

4) Etude de l'efficacité des différents vecteurs sur la prévention du développement de tumeurs hépatiques

En plus du maintien de la glycémie post-prandiale au cours du temps, le but de la thérapie génique dans le cadre de la GSD Ia est aussi de prévenir l'atteinte hépatique et le développement de tumeurs hépatiques qui s'ensuit. L'efficacité des constructions a donc été évaluée dans un contexte de développement tumoral accéléré pendant 7 à 8 mois. Après l'injection des vecteurs à la dose de $2,5 \times 10^{11}$ vg/souris, les souris L.G6pc^{-/-} ont été nourries avec une régime HF/HS (« high fat »/ « high sucrose ») connu pour accélérer le développement tumoral puisque 80-90% des souris L.G6pc^{-/-} développent des AHC/CHC après 9 mois de régime⁸⁵.

L'injection des trois vecteurs a permis de corriger la glycémie mesurée après 6h de jeûne pendant les premiers mois de traitement. En revanche, à partir du 7^{ème} mois, cette correction est seulement partielle (Figure 36A, B). De la même façon, les trois vecteurs ont permis une correction seulement partielle de l'accumulation du glycogène, sans normalisation des taux de glycogène au niveau des souris L.G6pc^{+/+}. A noter, les taux de glycogène hépatique ont tendance à être plus faibles chez les souris traitées avec le vecteur hAAT (Figure 36C). En lien avec ces résultats, l'activité G6Pase des souris traitées avec le vecteur hAAT est similaire à celle des souris contrôles. Les vecteurs hGPE et mGPE n'ont permis qu'une correction partielle de l'activité G6Pase hépatique, représentant 33% et 55% de l'activité des souris L.G6pc^{+/+} contrôles, respectivement (Figure 36D). En revanche les taux de transduction des trois vecteurs semblent similaires (Figure 36E).

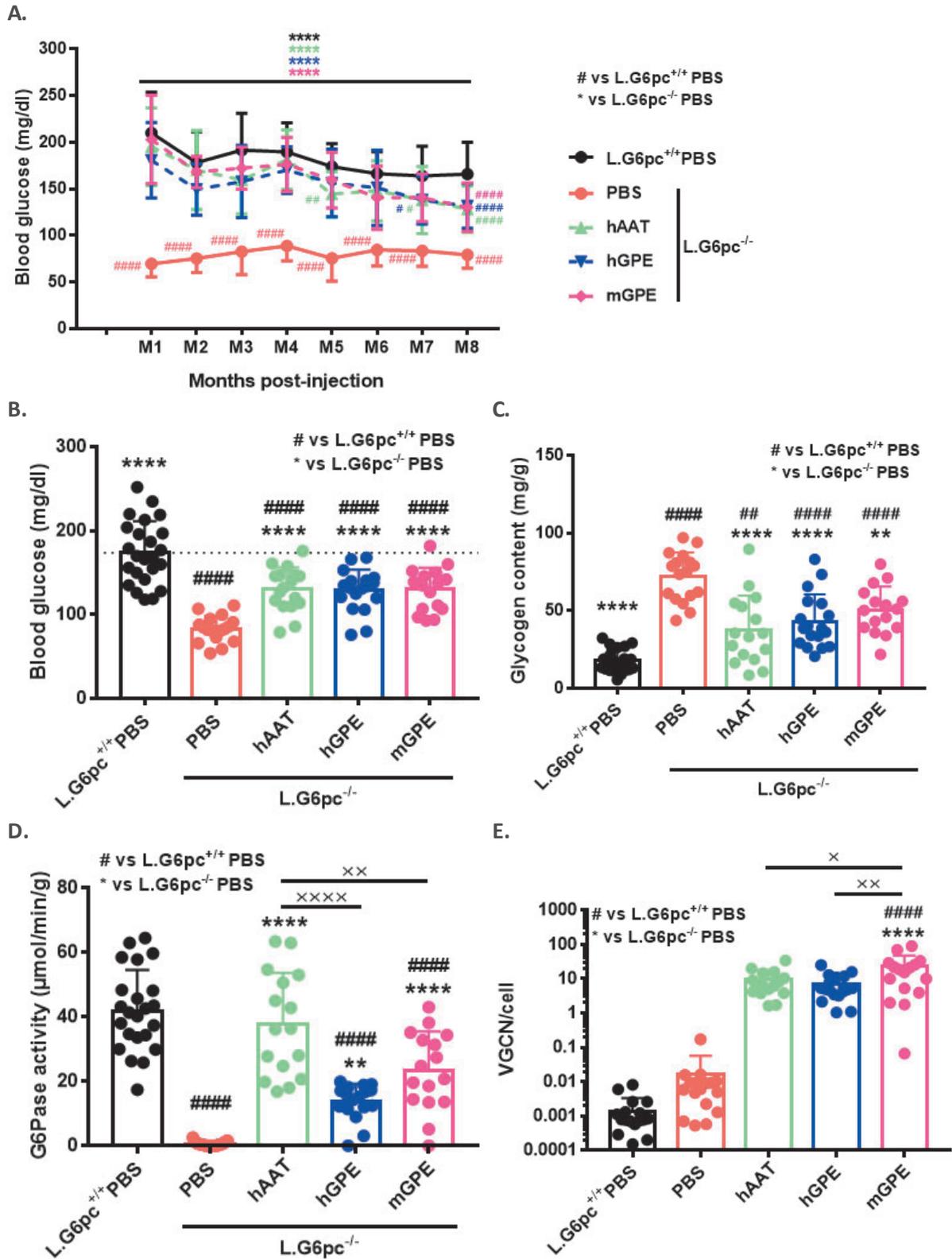


Figure 36: suivi à long-terme des souris L.G6pc^{-/-} injectées avec les vecteurs sous le contrôle des promoteurs hAAT, hGPE et mGPE, dans des conditions accélérant le développement tumoral

Des souris L.G6pc^{-/-} ont été injectées avec différents vecteurs à $2,5 \times 10^{11}$ vg/souris, 6 semaines après le traitement au tamoxifène et ont été nourries par un régime HF/HS. Les analyses ont été conduites 7 à 8 mois après les injections. **A.** Suivi de la glycémie pendant 8 mois. La glycémie a été mesurée après un jeûne de 6 heures. **B.** Glycémie lors de la mise à mort. **C.** Quantité de glycogène hépatique. **D.** Activité G6Pase dans le foie. **E.** VGCN par cellule diploïde dans le foie. Les significativités ont été déterminées par un test ANOVA, ## $p \leq 0,005$, #### $p \leq 0,0001$ versus les souris L.G6pc^{+/+}; ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$ versus les souris L.G6pc^{-/-} PBS; les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Après 7 à 8 mois, 29% des souris L.G6pc^{-/-} ont développé des tumeurs macroscopiques (taille supérieure à 0,5 x 0,5 cm), alors que 8% des souris L.G6pc^{+/+} ont développé des tumeurs. De façon intéressante, seuls 12% des souris injectées avec les vecteurs sous le contrôle du promoteur hAAT ont développé des tumeurs, démontrant un effet préventif des vecteurs sur l'apparition des tumeurs. Au contraire, le traitement par les vecteurs hGPE et mGPE ne semble pas prévenir l'apparition de tumeurs, puisque l'incidence tumorale est similaire à celle du groupe de souris L.G6pc^{-/-} non traitées (Table 4).

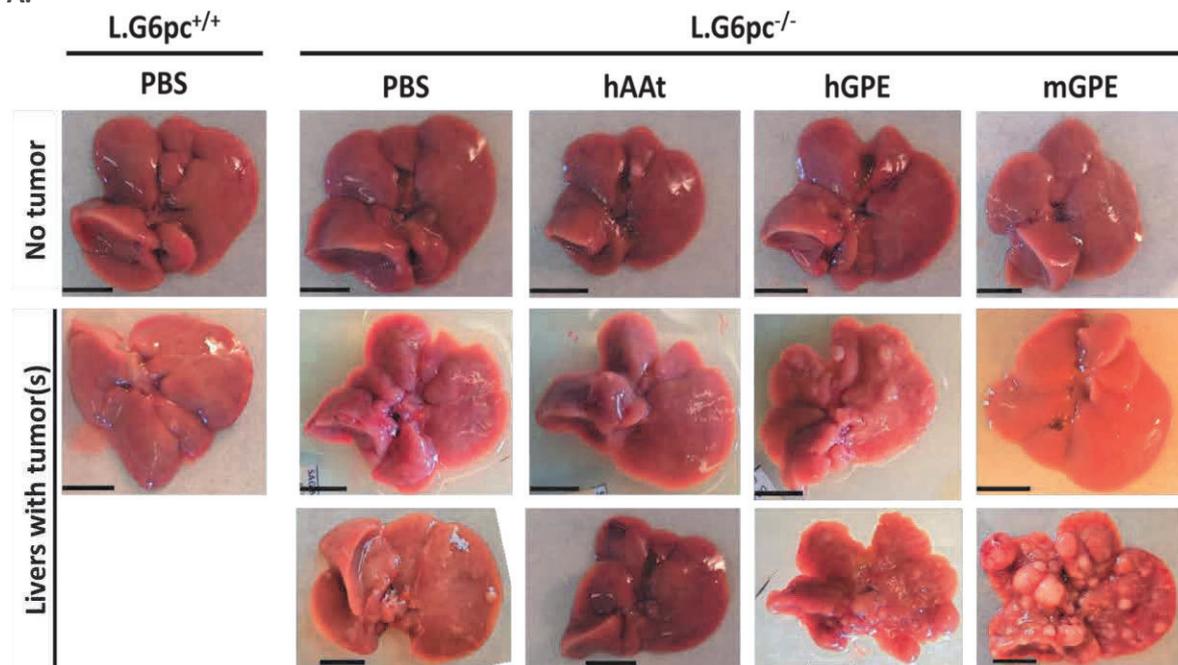
	L. G6pc ^{+/+} PBS	L. G6pc ^{-/-} PBS	hAAT	hGPE	mGPE
Nombre total de souris	24	17	17	18	16
Souris ayant développé des tumeurs (%)	2 (8%)	5 (29%)	2 (12%)	5 (28%)	4 (25%)
Nombre total de tumeurs	2	6	7	19	5

Table 4: développement tumoral chez les souris L.G6pc^{-/-} après administration de vecteurs AAV.

Seuls les nodules macroscopiques, visible lors du prélèvement du foie et de taille supérieure à 0,2 cm ont été comptabilisés.

De façon surprenante, 19 tumeurs avaient un diamètre supérieur à 0,5 cm dans le groupe des souris traitées avec le vecteur hGPE, alors que seules 5 à 7 tumeurs avaient un diamètre supérieur à 0,5 cm dans les foies des souris L.G6pc^{-/-} non traitées ou traitées avec les vecteurs hAAT et mGPE. L'analyse histologique des tumeurs est en cours. Les colorations HPS montrent une amélioration du phénotype hépatique chez les souris L.G6pc^{-/-} traitées avec le vecteur hAAT (Figure 37).

A.



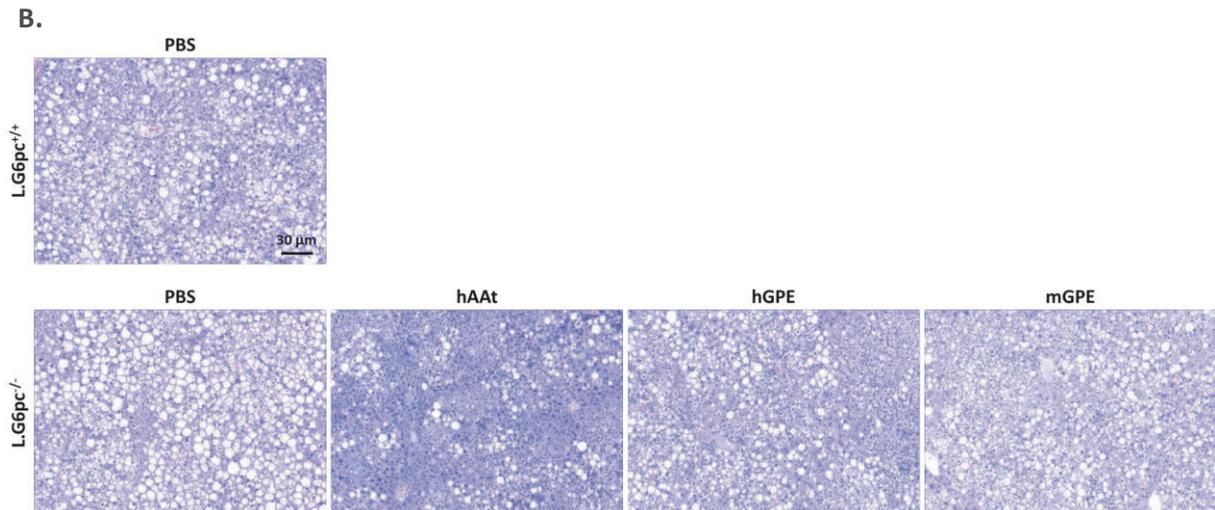


Figure 37: développement tumoral chez les souris $L.G6pc^{-/-}$ sous un régime HF/HS après injection d'AAV.

A. Images représentatives des foies lors de la mise à mort. L'échelle représente 1cm sur l'image. **B.** Images représentatives de colorations HPS (Hémalun, phloxine, safran) de foies tumoraux. L'échelle (30 μm) est indiquée sur les images.

Ces résultats confirment la perte d'expression des vecteurs AAV dans les hépatocytes GSD Ia au cours du temps puisque les glycémies post-prandiales des souris sont plus faibles après 8 mois de traitement comparées aux premiers mois de traitement. Cependant, le vecteur hAAT a permis une prévention du développement tumoral par rapport aux souris $L.G6pc^{-/-}$ non traitées ou les souris $L.G6pc^{-/-}$ traitées avec les vecteurs mGPE et hGPE.

En conclusion, cette étude a permis de corriger le phénotype hépatique jusqu'à 7-8 mois après l'injection et de prévenir la formation de tumeurs hépatiques grâce au vecteur hAAT. Nous avons également développé un vecteur d'expression de la G6PC sous le contrôle du promoteur G6PC murin, mGPE, qui s'est révélé efficace et qui a permis de corriger le phénotype hépatique de la GSD Ia, sans toutefois égaler le promoteur hAAT. De façon surprenante, le promoteur hGPE, utilisé dans les études pré-cliniques récentes^{37,79,80,102,156}, est moins efficace que le vecteur sous le contrôle du promoteur hAAT et ne permet pas de prévenir le développement tumoral hépatique dans notre modèle murin.

Des analyses supplémentaires portant sur le développement tumoral suite à l'injection des vecteurs, notamment le vecteur hGPE, restent à réaliser. Notamment, il serait intéressant d'étudier le métabolisme et sa correction ou non par chaque vecteur, en évaluant l'expression des gènes et des protéines dont l'expression est la plus altérée dans les hépatocytes GSD Ia⁸⁵. De plus, des études d'intégration de l'AAV sont nécessaires, afin d'évaluer si le développement tumoral est lié ou non à l'insertion des vecteurs ou de fragments de vecteur dans le génome des hépatocytes transduits.

C. THERAPIE GENIQUE PAR AAV CIBLANT LE FOIE POUR LA GLYCOGENOSE DE TYPE III

1) Caractérisation des dommages hépatiques et de la tumorigenèse dans la GSD III

Le défaut enzymatique responsable de la GSD III conduit à un métabolisme altéré et entraîne des dommages hépatiques. Avant d'envisager un traitement, nous avons débuté la caractérisation de ces dommages et de leurs conséquences à la fois en termes de fonctionnalité de l'hépatocyte, mais aussi dans le cadre d'approches de thérapie génique. Dans cette étude, nous avons particulièrement étudié les conséquences des perturbations du métabolisme sur le développement tumoral chez des souris âgées de 14 mois.

a. Altérations du métabolisme hépatique chez les souris $Agl^{-/-}$

Chez des souris $Agl^{-/-}$ âgées de 3 mois, le déficit en GDE a conduit à une accumulation de glycogène anormal, dit « dextrine limite » dans le foie¹¹². Cette accumulation de glycogène a été retrouvée chez des souris $Agl^{-/-}$ âgées de 14 mois (Figure 38A), entraînant une hépatomégalie (Figure 38B). Elle est associée à une diminution des taux de glucose et de G6P hépatique disponibles (Figure 38C, D). En accord avec les faibles taux de substrat (G6P), l'activité G6Pase est diminuée (Figure 38E). En conséquence, les souris $Agl^{-/-}$ présentent une glycémie plus faible que les souris saines (104,5 mg/dL chez les souris $Agl^{-/-}$, contre 139,4 mg/dL chez les souris $Agl^{+/+}$), même à l'état nourri (Figure 38F).

Cependant, il faut noter que l'expression de la glycogène phosphorylase hépatique (PYGL), impliquée dans la dégradation des chaînes non branchées du glycogène, semble augmentée (analyse statistique non réalisable). De même, l'expression de la GAA, impliquée dans la dégradation lysosomale du glycogène, semble augmentée (analyse statistique non réalisable). Les augmentations de PYGL et de GAA pourraient être un moyen pour la cellule hépatique de diminuer l'accumulation de glycogène, tout en lui permettant de produire une faible quantité de glucose nécessaire à son fonctionnement.

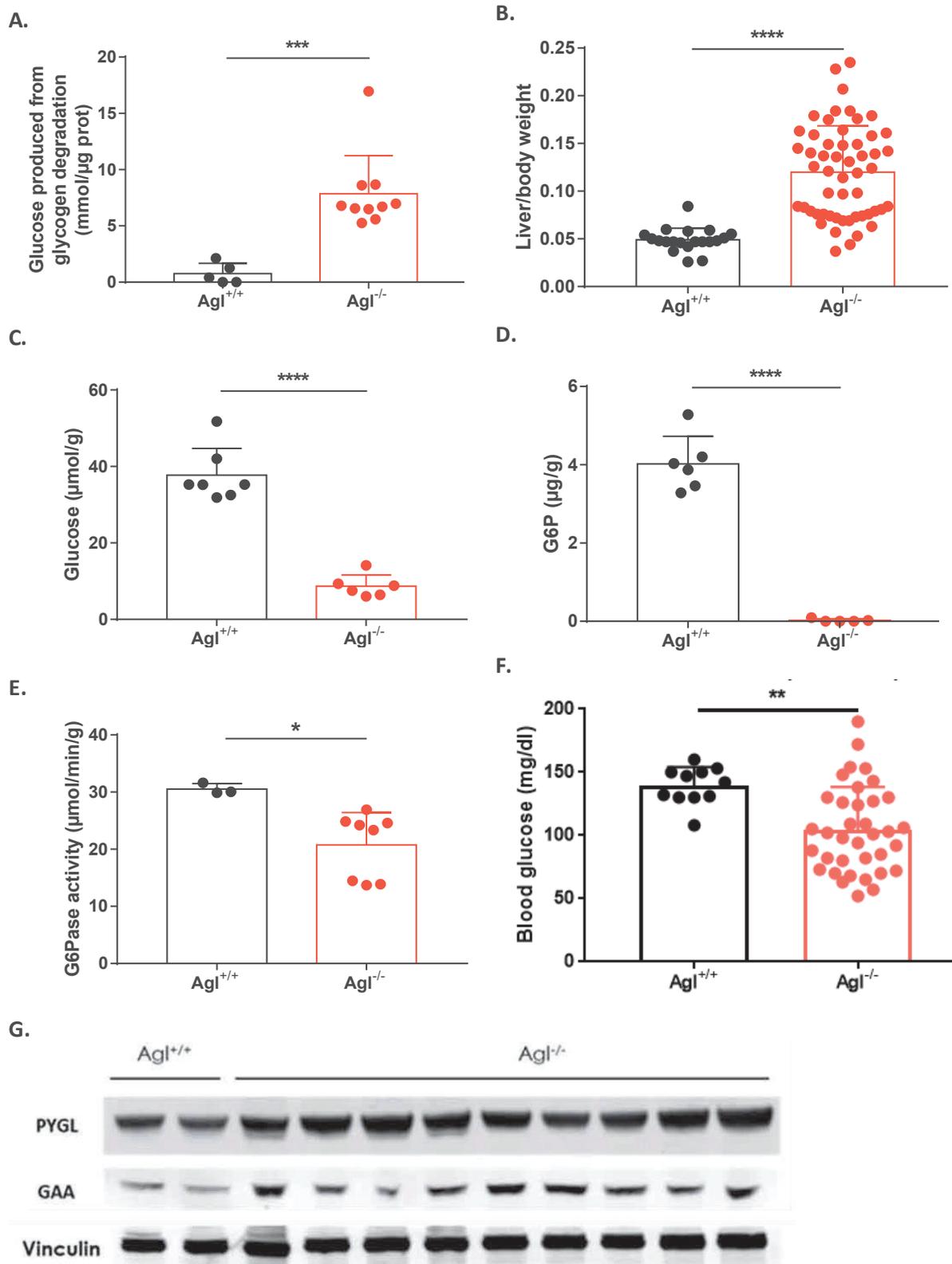


Figure 38: altérations du métabolisme glucidique chez les souris Agl^{-/-}-âgées de 14 mois

A. Mesure du glucose produit après dégradation du glycogène dans le foie chez des souris Agl^{-/-} (barres rouges) et de souris Agl^{+/+} de 14 mois (barres noires). B. Poids du foie exprimé en pourcent du poids de la souris. C. Concentration de glucose hépatique. D. Concentration de glucose-6-phosphate hépatique. E. Activité G6Pase dans le foie. F. Glycémie, à l'état nourri. G. Expression protéique de la glycogène phosphorylase hépatique (PYGL) et de l'alpha-glucosidase acide (GAA). L'expression des protéines est rapportée à celle de la vinculine. Les significativités ont été déterminées par un test de Student, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

En plus de ce métabolisme glucidique modifié, le métabolisme lipidique est également altéré. En raison du faible taux de G6P (Figure 38D), les souris $Agl^{-/-}$ n'accumulent pas de triglycérides ni de cholestérol au niveau hépatique (Figure 39A, B), avec des concentrations inférieures à celles des souris saines. De même, la lipidémie (triglycérides, cholestérol, acides gras non estérifiés) est diminuée chez les souris $Agl^{-/-}$ par rapport aux souris wild-type (Figure 39C-E).

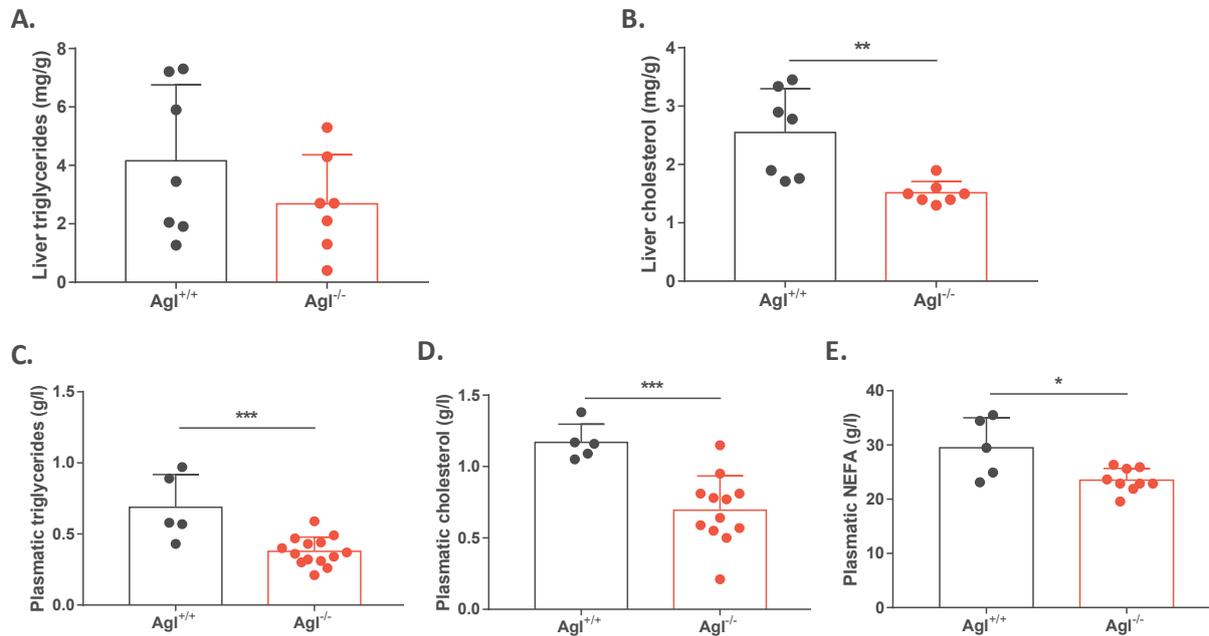


Figure 39 : altérations du métabolisme lipidique chez les souris $Agl^{-/-}$ âgées de 14 mois

A. Quantité de triglycérides dans le foie chez des souris $Agl^{-/-}$ (barres rouges) et de souris $Agl^{+/+}$ de 14 mois (barres noires). **B.** Quantité de cholestérol dans le foie. **C.** Triglycéridémie mesurée à l'état nourri. **D.** Cholestérolémie mesurée à l'état nourri. **E.** Taux sanguins d'acides gras non estérifiés (NEFA) mesurés à l'état nourri. Les significativités ont été déterminées par un test de Student, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

L'altération des métabolismes glucidiques et lipidiques a été confirmée par l'étude de l'expression génique des enzymes impliquées dans ces voies. Au niveau transcriptomique, on observe une diminution de l'expression des enzymes impliquées dans la glycolyse, la lipogenèse *de novo*, et la synthèse du cholestérol ; mais également de l'expression des enzymes de la dégradation des acides gras et du cholestérol (Figure 40), ce qui explique l'absence de stéatose dans les foies des souris $Agl^{-/-}$.

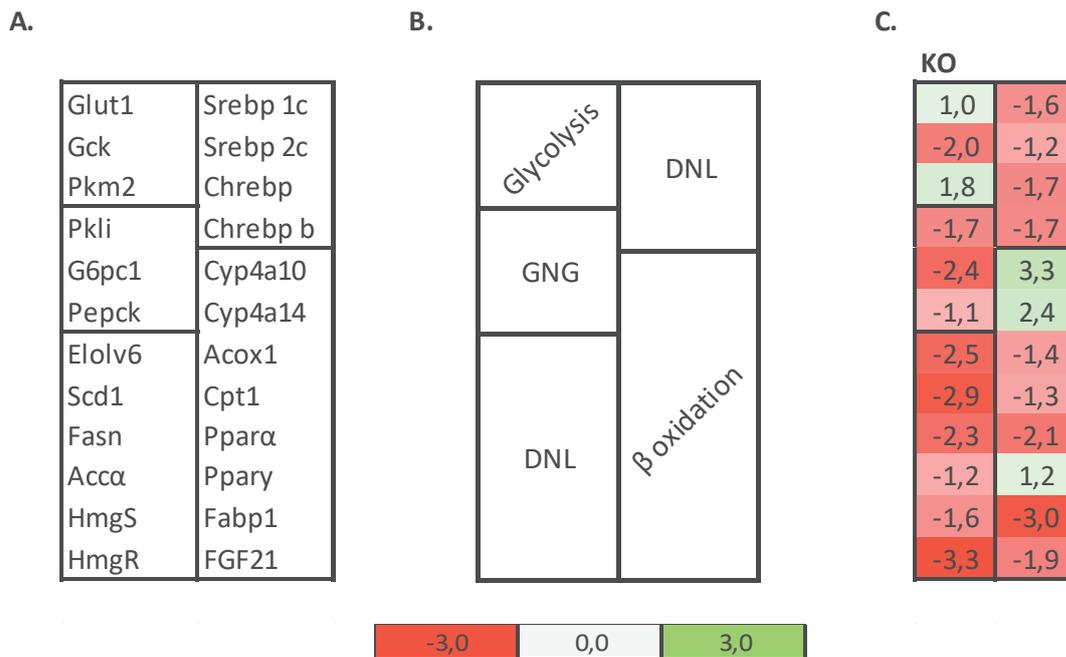


Figure 40: analyse des profils d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique chez les souris $Agl^{-/-}$

A. Liste des gènes analysés. **B.** Fonctions et voies métaboliques des gènes étudiés : la glycolyse (glycolysis), la néoglucogénèse (GNG), la lipogénèse de novo (DNL), la β oxydation des acides gras (β oxidation). **C.** Heatmap indiquant les niveaux d'expression des gènes, mesurés par RT-qPCR, chez des souris $Agl^{-/-}$ de 14 mois, normalisés par rapport à ceux des souris wild-type $Agl^{+/+}$. L'échelle (en n fold) est indiquée en code couleur sous les graphiques.

Ainsi, ces résultats montrent l'absence d'activation de la voie glycolytique et une diminution de la synthèse et de l'oxydation des lipides dans le foie des souris $Agl^{-/-}$ de 14 mois. Les faibles concentrations intracellulaires de glucose et de lipides suggèrent une déplétion énergétique dans ces cellules. Une autre voie pouvant fournir de l'énergie aux cellules est la synthèse des corps cétoniques. Cependant, des données préliminaires n'ont pas montré de différences entre les souris $Agl^{+/+}$ et $Agl^{-/-}$ (non montré).

En conclusion, les souris $Agl^{-/-}$ âgées de 14 mois accumulent, au niveau du foie, du glycogène sous forme de dextrine limite, avec une activation concomitante de la dégradation et de la synthèse du glycogène, responsable des faibles taux de G6P intracellulaires. Par conséquent, les taux de glucose intracellulaire sont très faibles, conduisant à des glycémies plus faibles que les souris saines, même à l'état nourri. La lipogénèse *de novo* étant normalement activée dans les conditions d'excès de glucose, les souris $Agl^{-/-}$ ne développent pas de stéatose hépatique, contrairement aux souris atteintes de GSD Ia⁹². Les taux de lipides intrahépatiques étant faibles chez les souris $Agl^{-/-}$, la voie d'oxydation des lipides est diminuée en l'absence de substrats. Dans les conditions de cette étude, c'est à dire à l'état nourri, la néoglucogénèse n'est pas activée et le glucose ne peut être produit qu'à partir du glycogène synthétisé en masse, mais sans permettre de maintenir une glycémie normale.

b. Etude de la fibrose hépatique chez les souris $Agl^{-/-}$

Comme observés chez les patients ayant une GSD III, les taux transaminases plasmatiques ASAT sont élevés chez souris $Agl^{-/-}$ (Figure 41A). En revanche, les taux transaminases ALAT ne sont pas augmentés (Figure 41B). Ces résultats suggèrent une atteinte hépatique mais aussi musculaire. Le dosage de la créatine kinase plasmatique devrait permettre de confirmer l'atteinte musculaire.

Dans un premier temps, nous avons confirmé la présence d'une fibrose hépatique chez les souris *Agl^{-/-}*. L'analyse histologique a permis de mettre en évidence de grandes plages de tissu fibreux dans les foies des souris *Agl^{-/-}* (Figure 41C). La microscopie électronique à transmission (MET) met en avant l'accumulation de collagène dans les foies GSD III (Figure 41D), contrairement aux foies des souris « wild-type ».

La transformation du tissu hépatique en tissu fibreux est marquée par une forte expression de facteurs marqueurs d'une fibrose, en particulier du facteur profibrotique TGF- β 1. Le TGF- β 1 est une cytokine essentielle à la fibrogenèse hépatique. Produite par les cellules de Kupffer, elle augmente la synthèse des collagènes de type I, III, et IV, des protéoglycanes, et de glycoprotéines par les cellules stellaires hépatiques. Cette voie est activée suite à une inflammation du tissu hépatique, qui est caractérisée chez les souris *Agl^{-/-}* par l'augmentation de l'expression des marqueurs de l'inflammation TNF α et IL6 (Figure 41E). En parallèle, une augmentation de l'expression des gènes clés induits par le TGF- β 1 et associés au développement d'une fibrose (PAI ou actine α) a été mise en évidence dans le foie des souris *Agl^{-/-}* (Figure 41F). De plus, l'expression des facteurs impliqués dans le développement d'une transition-épithéliomésenchymateuse, comme la vimentine (*Vim*) est fortement induite dans le foie des souris *Agl^{-/-}*. *In fine*, la transformation des CSH en myofibroblastes conduit à une augmentation de la synthèse de collagène au niveau hépatique, qui se traduit par une augmentation de l'expression de l'ARNm du gène codant pour la chaîne 1 du collagène (Figure 41F).

Ainsi, nos données suggèrent une forte inflammation et le développement d'une fibrose dans le foie des souris atteintes de GSD III.

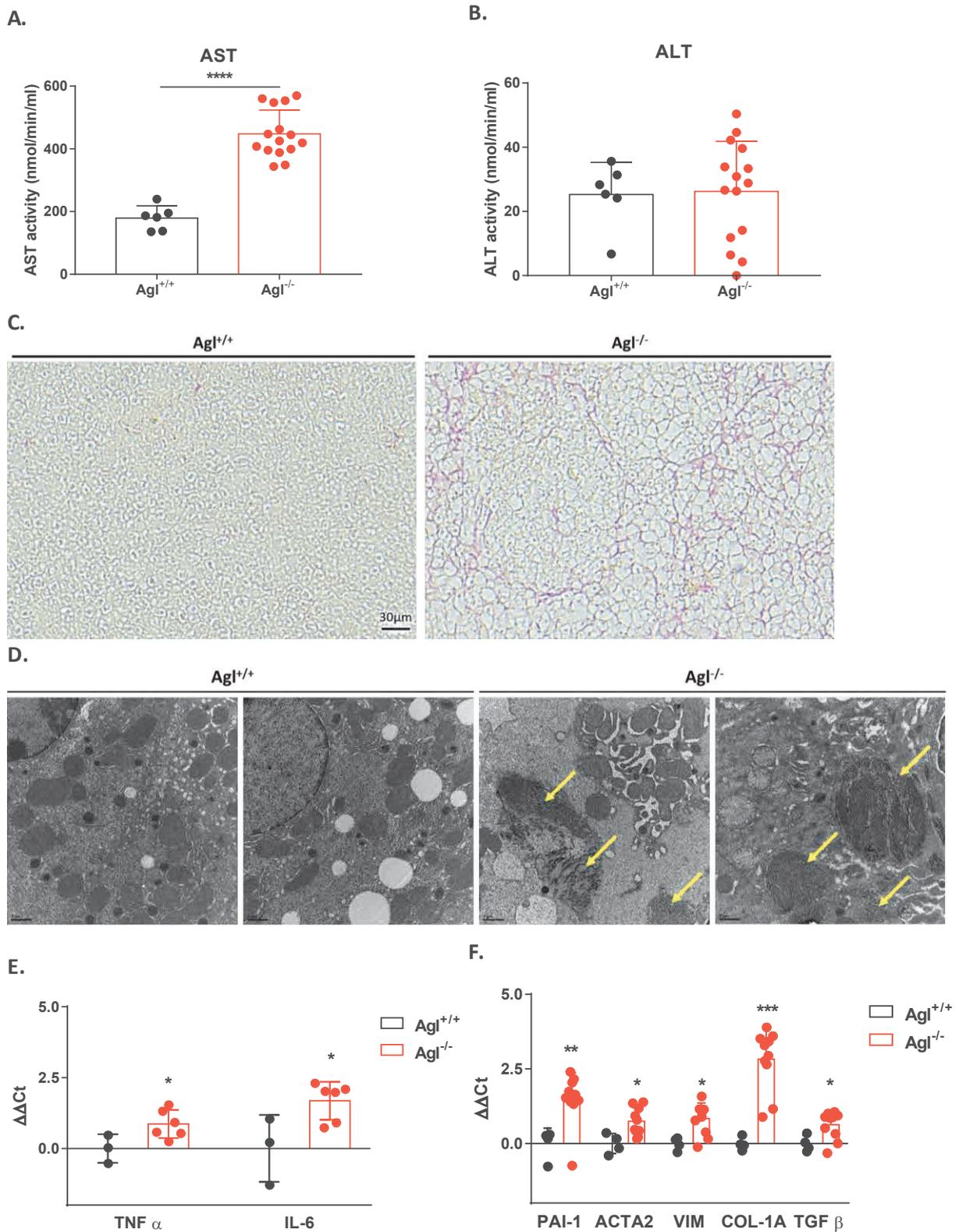


Figure 41: étude de la fibrose dans le foie des souris *Agl^{-/-}*

A. Taux sanguin de transaminase AST chez des souris *Agl^{-/-}* (barres rouges) et de souris *Agl^{+/+}* de 14 mois (barres noires. **B.** Taux sanguin de transaminase ALT. **C.** Coloration de foies au rouge sirius (les fibres de collagène sont colorées en rouge). **D.** Microscopie électronique à transmission sur des foies. L'échelle est indiquée sur les images. Les flèches jaunes indiquent les fibres de collagène. **E.** Expression des ARNm de différents marqueurs de l'inflammation. **F.** Expression des ARNm de différents marqueurs de fibrose hépatique. Les significativités ont été déterminées par un test de Student, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

c. *Etude de la tumorigenèse hépatique chez les souris Agl^{-/-}*

i. Caractérisation des tumeurs hépatiques chez les souris Agl^{-/-}

Dans la colonie de souris GSD III, environ 30% des souris Agl^{-/-} âgées de 14 mois développent des tumeurs macroscopiques (diamètre > 2mm), avec une plus forte incidence chez les femelles (68%) (Table 5). Ce dimorphisme sexuel pourrait être dû aux différentes imprégnations hormonales chez les mâles et les femelles.

Tumeurs macroscopiques (visibles à l'œil nu)	Oui	Non
Nombre de souris (%)	19 (30.6%)	43 (69.4%)
- Dont mâles	- 6 (32%)	- 22 (51%)
- Dont femelles	- 13 (68%)	- 21 (49%)
Nombre de tumeurs	22	X
- Dont AHC	- 7 (31.8%)	
- Dont nodules différenciés^A	- 5 (22.7%)	
- Dont CHC	- 10 (45.5%)	
Nombre médian de tumeurs par souris	1	X

Table 5: fréquence des tumeurs chez les souris Agl^{-/-} de 14 mois.

Les tumeurs comptabilisées sont celles qui ont été observées lors du prélèvement des foies, en surface, et dont la taille est supérieure à 2 mm. ^A Les nodules différenciés font ici référence à des nodules en transition entre AHC et CHC.

A 14 mois, près de 70% des nodules classés histologiquement sont des nodules différenciés, c'est-à-dire en cours de transformation vers un CHC, et 30 % ont été identifiés comme un CHC (lecture réalisée par le Dr J. Calderaro, anatomopathologiste, Hôpital Henri Mondor, Créteil) (Table 5 et Figure 42A). La caractérisation histologique a également montré que ces tumeurs sont associées dans le foie péri-tumoral à une fibrose de grade F1 à F3.

De façon tout à fait intéressante, le marqueur de carcinome hépatique AFP (alpha-fœtoprotéine) permet de différencier les souris Agl^{-/-} ayant développé des tumeurs hépatiques de celles qui n'ont pas développé de tumeurs puisque les taux d'AFP plasmatiques étaient significativement plus élevés chez les souris avec tumeurs (Figure 42B). De même, l'expression du suppresseur de tumeurs PTEN (*phosphatase and TENSin homolog*), un régulateur du cycle cellulaire, était diminuée chez les souris Agl^{-/-} (Figure 42C).

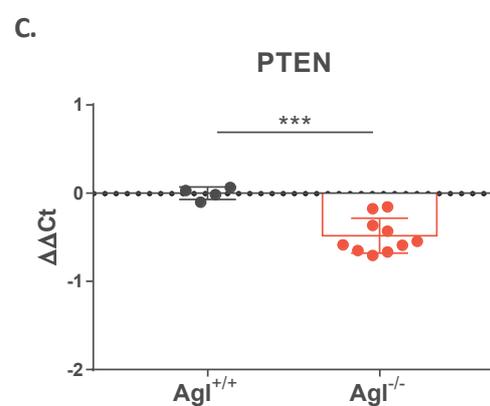
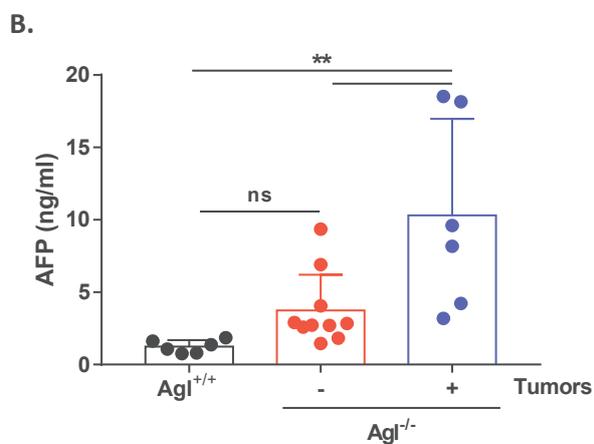
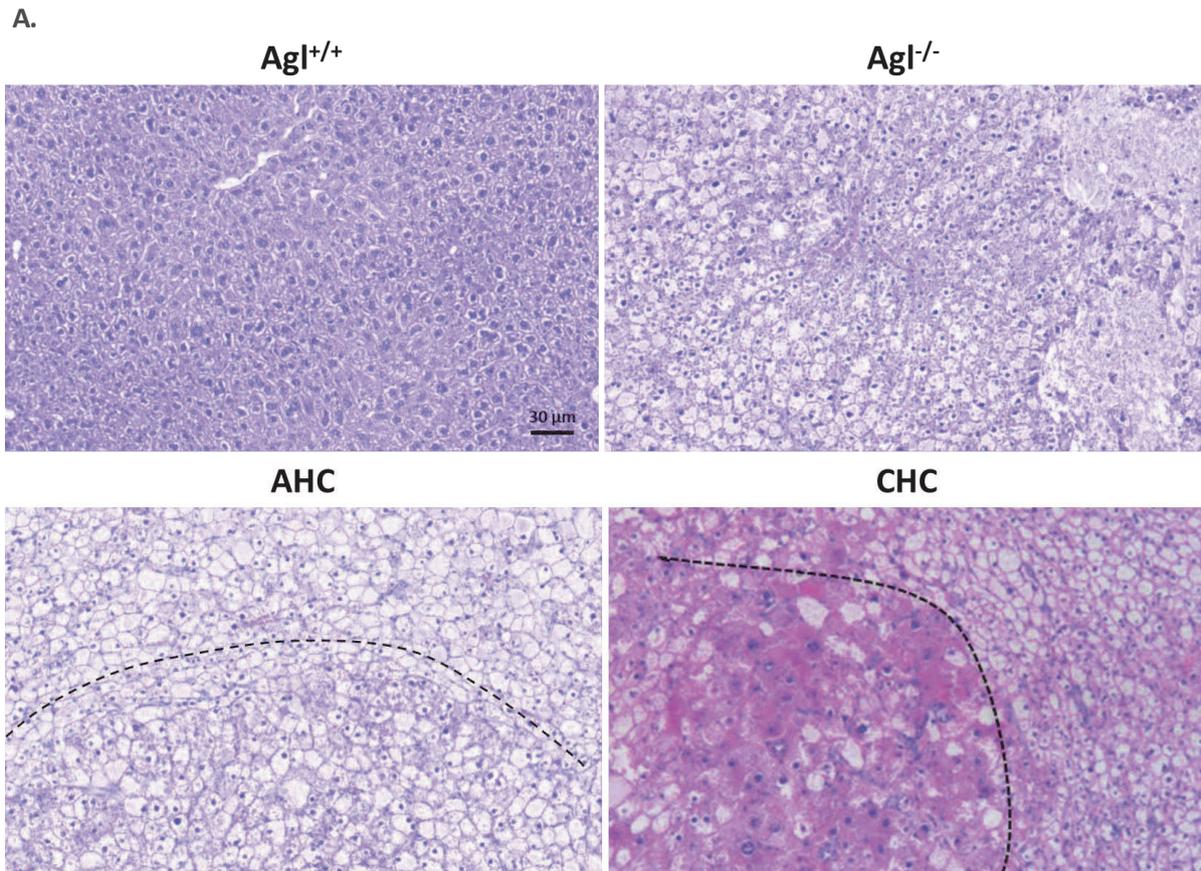


Figure 42: caractérisation du développement de tumeurs hépatiques chez les souris *Agl^{-/-}*

A. Images représentatives de coloration HPS de foies de souris *Agl^{+/+}*, *Agl^{-/-}*, de tumeurs de type AHC et CHC. L'échelle est indiquée sur les images. **B.** Niveaux d'AFP plasmatiques chez les souris *Agl^{+/+}* wild-type (barres noires), et les souris *Agl^{-/-}* n'ayant pas (-) (barres rouges) ou ayant développé (+) (barres bleues) de tumeurs macroscopiques. **C.** Expression de l'ARNm du gène *PTEN* chez les souris *Agl^{+/+}* wild-type (barres noires), et les souris *Agl^{-/-}* KO (barres rouges). Les différences significatives ont été déterminées par un test ANOVA (panneau B) ou un test de Student (panneau C), * $p \leq 0,05$, les barres d'erreur représentent l'écart-type. AHC : adénome hépatocellulaire. CHC : carcinome hépatocellulaire.

ii. Altérations des signalisations conduisant au développement tumoral chez les souris *Agl^{-/-}*

Des analyses de MET ont montré une forte dilatation du réticulum endoplasmique (RE), qui pourrait rendre compte d'un fort stress du réticulum (Figure 43).

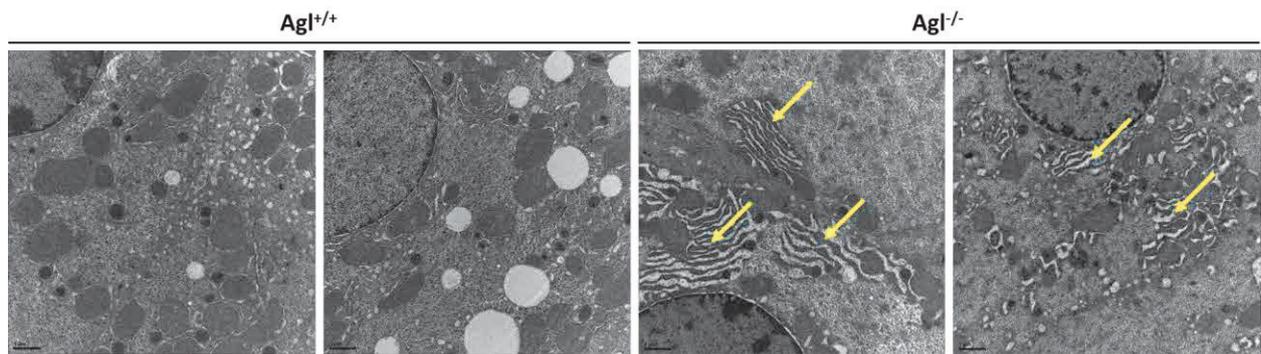


Figure 43: observation de la dilatation du réticulum endoplasmique dans les foies $Agl^{-/-}$

Images obtenues par microscopie électronique à transmission (MET). L'échelle est indiquée sur les images. Les flèches jaunes indiquent le réticulum endoplasmique dilaté.

Les données que nous avons obtenues montrent un stress du RE, qui peut mener par diverses signalisations à une adaptation de la cellule à ce stress ou bien à la mort cellulaire. Des études de caractérisation des différentes voies du stress du réticulum chez les souris $Agl^{-/-}$ sont en cours au laboratoire.

2) Stratégies de thérapie génique pour la GSD III

a. Etude de la transduction du foie par un vecteur AAV chez les souris $Agl^{-/-}$

Comme décrit ci-dessus, les foies des souris $Agl^{-/-}$ sont endommagés en raison d'une fibrose, due à une inflammation hépatique, et au développement tumoral qui s'ensuit.

Dans ce contexte, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses quant à la transduction des foies GSD III :

- (i) En raison de la fibrose hépatique, l'efficacité de transduction des foies GSD III peut être réduite par rapport à celle de foies sains.
- (ii) En raison de la prolifération liée à la tumorigenèse, il est possible qu'on observe une perte d'expression du transgène due à un effet de dilution, comme observé chez les souris nouveau-nés dont le foie est en croissance⁹⁹ ou chez les souris GSD Ia (voire paragraphes III, A, 4), c, ii de l'Introduction ; II, A, 1) des Résultats ; et II, B, 1) des Résultats).

Afin d'élucider ces questions, nous avons étudié la transduction des foies GSD III en parallèle à celle de foies de souris wild-type. Pour cela, des souris $Agl^{+/+}$ et $Agl^{-/-}$ de 6 mois ont été injectées avec un vecteur AAV exprimant le gène humain du facteur de coagulation IX (hFIX) sous le contrôle du promoteur hAAT à $1,5 \times 10^{10}$ vg/mouse (Figure 44).

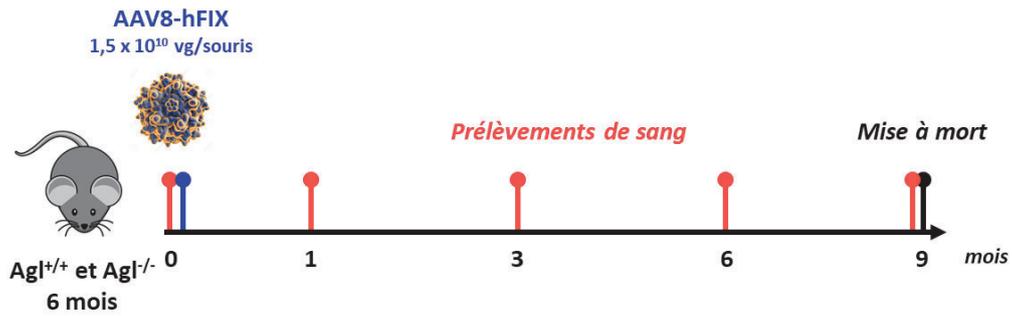


Figure 44: protocole d'évaluation de la transduction de foies de souris GSD III et de la persistance d'expression du transgène

Un mois après l'injection, l'expression du transgène était similaire dans les souris Agl^{+/+} et Agl^{-/-} (Figure 45A). Cela démontre que la problématique d'expression hépatique du transgène dans GSD III n'est pas due à un blocage de la transduction causé par la fibrose comme dans d'autres pathologies¹⁵⁷.

Cependant, avec le temps, l'expression du transgène a diminué (Figure 45B) : les taux de FIX plasmatiques ont été divisés par 5 chez les souris Agl^{-/-} à 9 mois post-injection, par rapport à la première mesure, alors que les taux de FIX sont très similaires chez les souris saines de 1 à 9 mois après l'injection des vecteurs. De plus, le nombre de vecteurs par hépatocytes était fortement diminué chez les souris Agl^{-/-} par rapport aux souris saines (Figure 45C). Ces résultats démontrent une dilution des formes épisomales du vecteur dans un foie en prolifération¹⁴¹ chez les souris Agl^{-/-}.

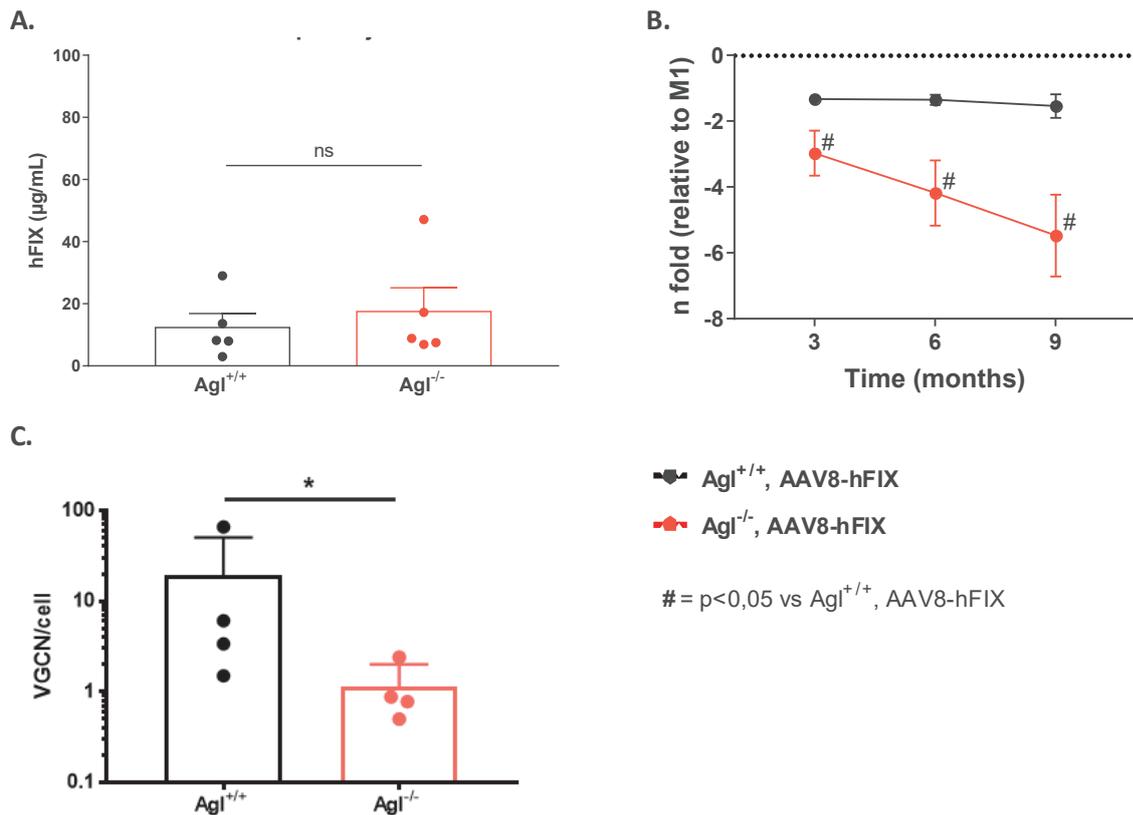


Figure 45: perte d'expression du transgène dans le foie des souris Agl^{-/-} au cours du temps

A. Expression du facteur IX humain dans le plasma de souris Agl^{-/-} 1 mois après l'injection d'AAV à une dose de 1,5 x 10¹⁰ vg/souris. **B.** Perte d'expression du facteur IX humain dans le plasma de souris Agl^{-/-} au cours du temps, par rapport à 1 mois post-injection. **C.** Nombre de copies du génome vectoriel dans le foie. Les significativités ont été déterminées par un test de Student (panneau A), par ANOVA (panneau B), ou par un test de Mann-Whitney (panneau C), # p ≤ 0,05, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

b. Association thérapeutique rapamycine-AAV pour le traitement de la GSD III

Afin de transduire efficacement les hépatocytes, nous avons utilisé un promoteur tandem LiMP (*liver and muscle promoter*, promoteur foie et muscles) qui associe un *enhancer* hépatique (ApoE, *enhancer* du gène humain de l'apolipoprotéine E), fusionné au promoteur hépatique hAAT, et à un promoteur musculaire synthétique (spC5.12). Son efficacité a déjà été démontrée dans un modèle murin de la maladie de Pompe³⁴. De plus, nous avons évalué l'intérêt de pré-traiter les hépatocytes afin de réduire leur prolifération, ce qui permettrait une correction à long-terme du phénotype hépatique de la GSD III grâce au vecteur AAV codant la GDE (AAV9-LiMP-GDE overlapping, AAV9-LiMP-GDEov).

Dans ce contexte, nous avons évalué le potentiel de l'association d'un traitement à la rapamycine, connue pour activer l'autophagie dans le foie¹⁴⁴, et de la thérapie génique dans notre modèle murin de GSD III. Pour cela, nous avons traité des souris $Agl^{-/-}$ de 6 mois quotidiennement avec de la rapamycine à 1,5mg/kg/j pendant un mois, puis administré 2×10^{12} vg/souris d'AAV9-LiMP-GDEov.

Suite à cette injection, le traitement par rapamycine a été continué pendant 14 jours (Figure 46).

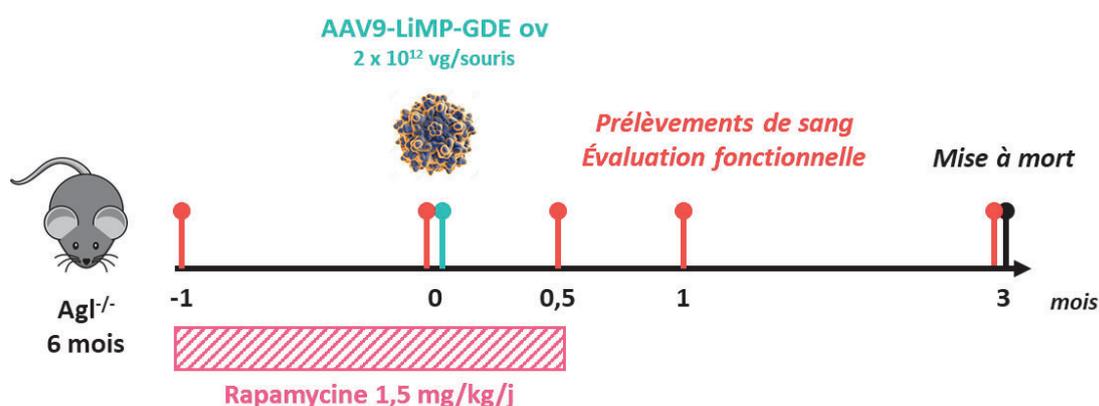
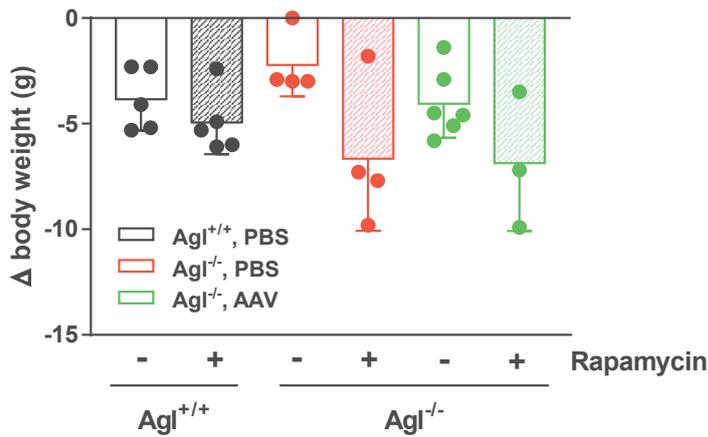


Figure 46: protocole de la co-thérapie rapamycine et vecteur AAV9-LiMP-GDE overlapping et interventions

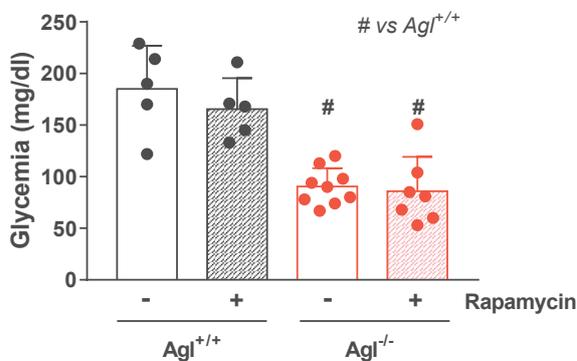
Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet du traitement pharmacologique par rapamycine seul, car l'injection intrapéritonéale fréquente de rapamycine (à une dose de 1,5 mg/kg, trois fois par semaine, une semaine sur deux¹⁵⁸) est connue pour entraîner une perte de poids chez la souris^{158,159}. Comme attendu, le traitement par la rapamycine à une dose de 1,5 mg/kg/j pendant 6 semaines a entraîné une légère perte de poids chez les souris $Agl^{+/+}$, d'environ 13%, qui est retrouvée chez les souris $Agl^{-/-}$ injectées ou non avec le rAAV (19 et 11%, respectivement) (Figure 47A).

Après un mois de traitement, le traitement à la rapamycine n'a pas permis d'améliorer la glycémie (Figure 47B), ni la fonction musculaire (Figure 47C) des souris $Agl^{-/-}$ non traitées par thérapie génique. L'effet de la rapamycine sur l'induction de l'autophagie dans le foie et les muscles des souris $Agl^{-/-}$ est en cours d'analyse.

A.



B.



C.

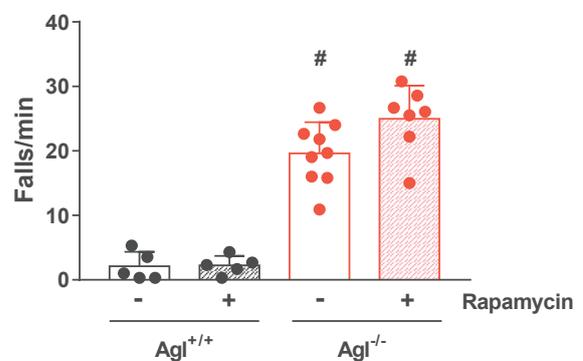


Figure 47: effet d'un traitement à la rapamycine pendant un mois dans un modèle murin GSD III

A. Différence de poids après 6 semaines de traitement quotidien par la rapamycine, à une dose de 1,5 mg/kg, entre le début (J-28 avant l'injection de l'AAV) et la fin (J+14 après l'injection de l'AAV) du traitement par la rapamycine. B. Glycémie après un mois de traitement par la rapamycine, à la dose de 1,5 mg/kg/j, en l'absence de jeûne. C. Test du wire hang après un mois de traitement par la rapamycine, à la dose de 1,5 mg/kg/j. Les significativités ont été déterminées par ANOVA, # $p \leq 0,05$, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Au niveau hépatique, trois mois après l'injection des vecteurs, l'expression de la protéine GDE était similaire entre les souris Agl^{-/-} qui ont reçu l'association thérapeutique par rapport aux souris Agl^{-/-} qui n'ont reçu que l'AAV (Figure 48A). Néanmoins, l'expression a été suffisante pour diminuer l'accumulation de glycogène à des niveaux similaires à ceux des souris Agl^{+/+} dans les deux groupes de souris injectées avec l'AAV (Figure 48B), ainsi que pour corriger la glycémie (Figure 48C). Le traitement par la rapamycine n'a pas eu d'influence sur le nombre de copies du vecteur (Figure 48D).

Ainsi, la transduction du foie des souris Agl^{-/-} par les vecteurs AAV9-LiMP-GDEov a permis de corriger la glycémie et prévenu l'accumulation de glycogène hépatique sur une durée de 3 mois post-injection. En revanche, le prétraitement des souris Agl^{-/-} par la rapamycine n'a pas permis d'améliorer le phénotype hépatique obtenu après thérapie génique.

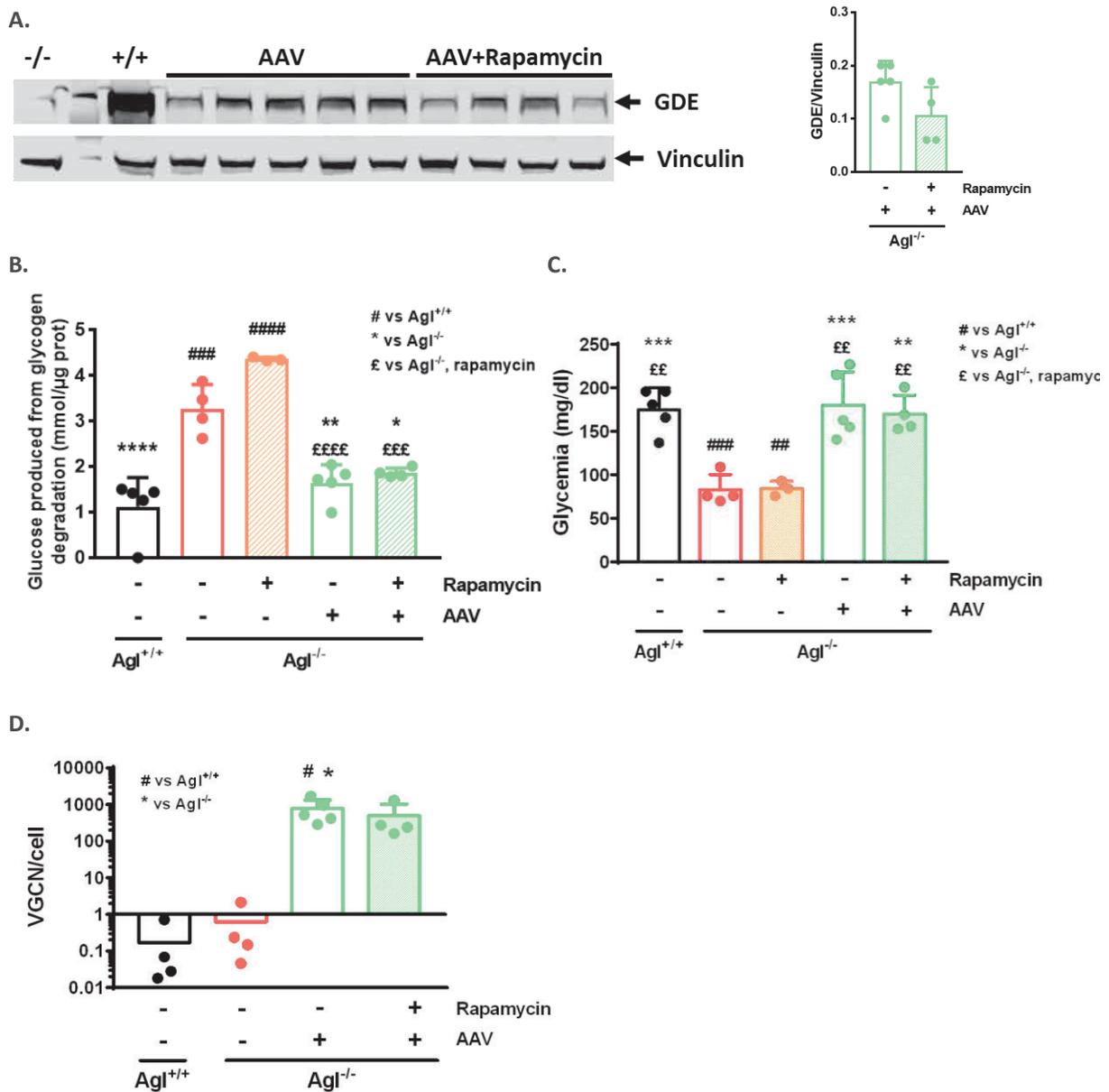


Figure 48: effets de la co-thérapie AAV-rapamycine au niveau hépatique dans un modèle murin de GSD III

A. Expression et quantification de la protéine GDE détectée par western blot dans le foie des souris $Agl^{-/-}$ trois mois après l'injection d'AAV associé ou non à un traitement rapamycine. **B.** Quantification du glycogène. **C.** Glycémie des souris mesurée à l'état nourri. **D.** VGCN dans le foie. Les significativités ont été déterminées par un test de Student, ou par ANOVA selon le cas, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,005$, ### $p \leq 0,0005$, #### $p \leq 0,0001$ versus les souris $Agl^{+/+}$; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$ versus les souris $Agl^{-/-}$ PBS, ££ $p \leq 0,005$, ££££ $p \leq 0,0005$, £££££ $p \leq 0,0001$ versus les souris $Agl^{-/-}$ PBS traitées par la rapamycine, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Au niveau cardiaque, trois mois après l'injection des vecteurs, l'expression de la protéine GDE était similaire chez les souris $Agl^{-/-}$ traitées par AAV avec ou sans la rapamycine (Figure 49A). La thérapie génique a permis de corriger partiellement l'accumulation du glycogène, sans impact du traitement à la rapamycine (Figure 49B). De plus, le traitement par la rapamycine n'a pas modifié le nombre de copies du vecteur dans le cœur (Figure 49C).

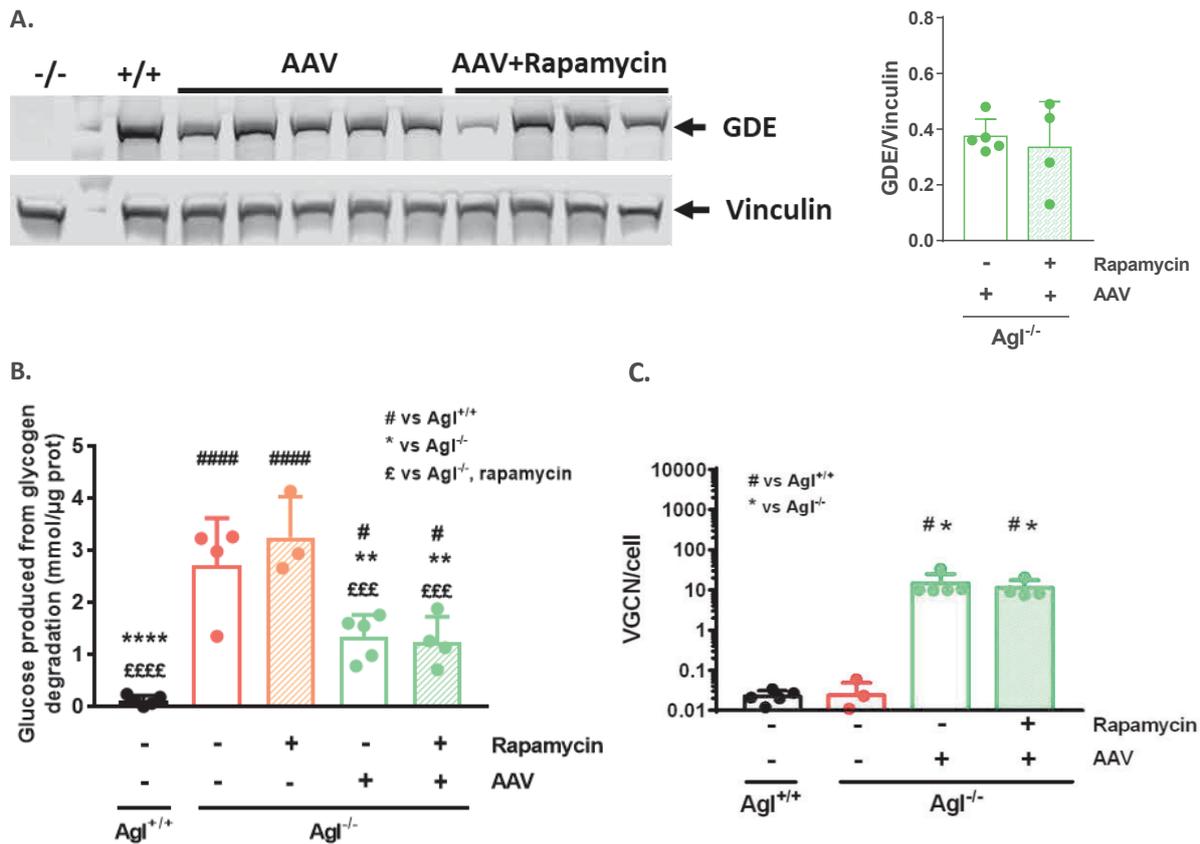


Figure 49: effets de la co-thérapie AAV-rapamycine au niveau cardiaque dans un modèle murin de GSD III

A. Expression et quantification de la protéine GDE détectée par western blot dans le cœur des souris Agl^{-/-}, trois mois après l'injection d'AAV associé ou non à un traitement rapamycine. **B.** Quantification du glycogène. **C.** Glycémie des souris mesurée à l'état nourri. **D.** VGCN dans le cœur. Les significativités ont été déterminées par un test de Student, ou par ANOVA selon le cas, # $p \leq 0,05$, ##### $p \leq 0,0001$ versus les souris Agl^{+/+}; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,0001$ versus les souris Agl^{-/-} PBS, £££ $p \leq 0,0005$, ££££ $p \leq 0,0001$ versus les souris Agl^{-/-} PBS traitées à la rapamycine, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Au niveau des muscles squelettiques, la thérapie génique a permis de détecter l'expression de la GDE au niveau des triceps et des quadriceps. De façon intéressante, l'expression de la GDE était augmentée chez les souris Agl^{-/-} traitées avec l'AAV+rapamycine par rapport aux souris traitées uniquement avec l'AAV, dans le triceps et le quadriceps (Figure 50A). Cela s'est traduit par une diminution de l'accumulation du glycogène plus importante chez les souris Agl^{-/-} traitées avec l'AAV+rapamycine qu'avec l'AAV seul (Figure 50B, C). Le nombre de copies du vecteur dans les muscles n'a pas été modifié par le prétraitement à la rapamycine. (Figure 50E,F). Ces données suggèrent que la rapamycine n'augmente pas l'efficacité d'entrée des AAV dans les cellules, en accord avec ce qui a déjà été décrit¹⁴⁴.

De même, un mois et demi après l'arrêt du traitement à la rapamycine, la force musculaire a été significativement améliorée chez les souris traitées avec la combinaison thérapeutique, contrairement aux souris traitées uniquement avec l'AAV (Figure 50D).

augmentation entre 14 et 28 jours puis une stabilisation jusqu'à 3 mois après l'injection (Figure 51B). Ce schéma de conversion des IgM anti-AAV9 en IgG anti-AAV9 est classique et connu.

Chez les souris $Agl^{-/-}$, AAV traitées à la rapamycine, la concentration d'IgM anti-AAV9 était d'abord élevée 14 jours après l'injection de l'AAV puis a diminué avec le temps (Figure 51A), alors que la concentration d'IgG anti-AAV9 était faible, et n'a augmenté qu'à partir de deux mois après l'injection avant de se stabiliser (Figure 51B). Le traitement à la rapamycine a donc retardé la conversion des IgM anti-capside en IgG anti-capside, ce qui explique « l'accumulation » d'IgM 14 jours après l'injection, et l'augmentation des IgG seulement à partir de deux mois après l'injection¹³⁸. De façon intéressante, on peut noter que bien que des IgG anti-AAV9 apparaissent à deux mois après injection, leur concentration reste inférieure à celle des souris $Agl^{-/-}$ injectées avec l'AAV seul.

Concernant la réponse immunitaire anti-transgène, le co-traitement avec la rapamycine n'a pas modifié les taux d'IgG anti-GDE qui sont apparus à partir d'un mois, à des niveaux faibles (Figure 51C).

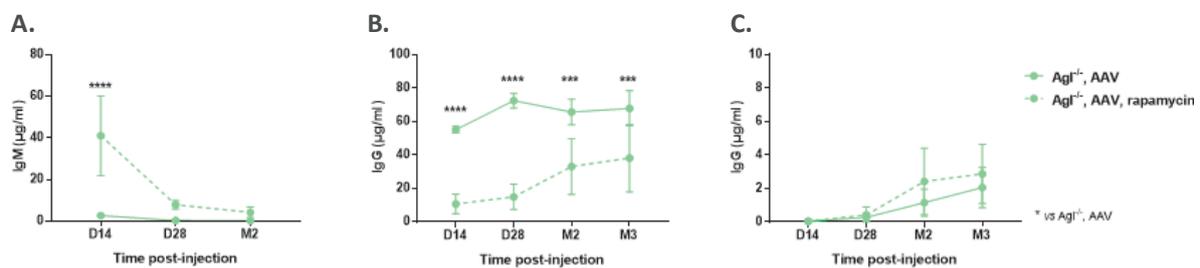


Figure 51: réponse immunitaire dans un modèle murin de GSD III suite à une co-thérapie AAV-rapamycine

A. Taux d'IgM anti-capside (AAV9) 14 jours, 28 jours, et 2 mois chez les souris $Agl^{-/-}$ après l'injection d'AAV, en combinaison ou non avec un traitement rapamycine. **B.** Taux d'IgG anti-capside (AAV9) 14 jours, 28 jours, 2 mois et 3 mois après l'injection d'AAV, en combinaison ou non avec un traitement rapamycine. **C.** Taux d'IgG anti-transgène GDE 14 jours, 28 jours, 2 mois et 3 mois après l'injection d'AAV, en combinaison ou non avec un traitement rapamycine. Les significativités ont été déterminées par ANOVA, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,0001$, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

La faible réponse immunitaire anti-transgène dans le groupe non traité à la rapamycine démontre que la meilleure efficacité observée dans le groupe traité à la rapamycine n'est pas due à une réponse immunitaire mieux maîtrisée.

Afin de confirmer que la réponse immunitaire n'est pas responsable des différences d'efficacité, il serait intéressant d'évaluer la présence de lymphocytes T CD8⁺ dans les muscles squelettiques. En effet, les lymphocytes T CD8⁺ sont responsables d'une réponse immunitaire cytotoxique. La présence d'infiltrats dans les muscles pourrait signifier qu'une réponse immunitaire conduit à l'élimination des cellules musculaires transduites par l'AAV, ce qui pourrait expliquer la baisse de l'accumulation de glycogène dans ces tissus.

Enfin, les colorations hématoxyline éosine des triceps et des quadriceps de souris $Agl^{-/-}$ montrent un effet bénéfique de l'association AAV et rapamycine sur la correction du phénotype musculaire dans le triceps. On observe moins de clarifications cellulaires, et une architecture des fibres musculaires plus semblable à celle des souris $Agl^{+/+}$ (Figure 52).

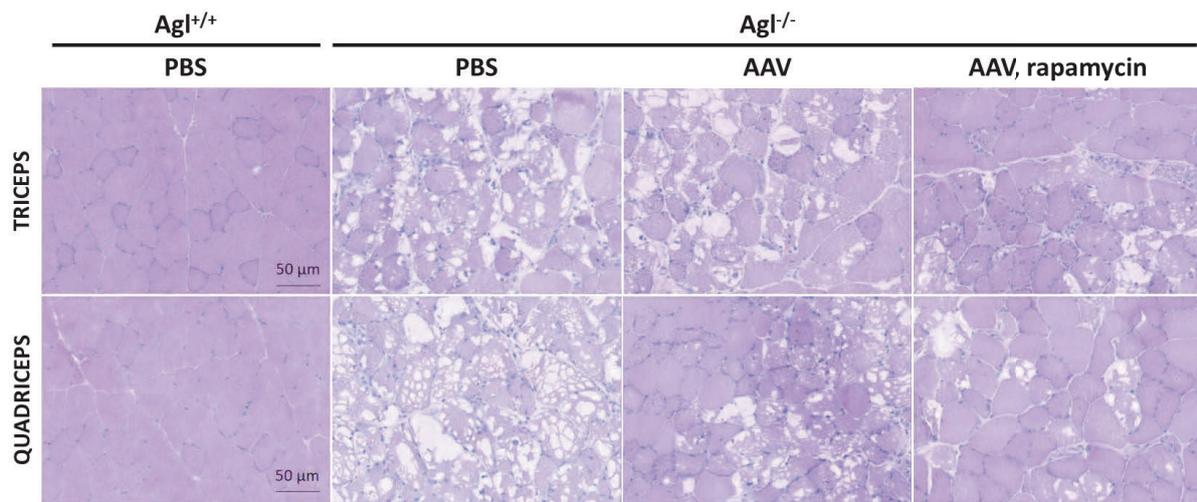


Figure 52: images représentatives de triceps et de quadriceps de souris Agl^{-/-}, traitées ou non par thérapie génique associée au traitement par la rapamycine

Coloration HE (hématoxyline et éosine). Echelle 50 μm.

II. THERAPIE GENIQUE PAR LES VECTEURS AAV CIBLANT LE FOIE POUR L'HYPOPHOSPHATEMIE LIEE AU CHROMOSOME X

A. Contexte de la publication : utilisation du foie en tant que bio-usine

L'XLH est une maladie affectant les tissus minéralisés, tels que les os et les dents, due à des mutations dans le gène *PHEX*. La protéine PHEX étant principalement exprimée dans les tissus minéralisés, une approche de thérapie génique par l'utilisation de vecteurs AAV semble peu envisageable car ces tissus ne seront pas ou très peu transduits. De plus, comme nous l'avons décrit plus haut (voir paragraphe, III, B, 4 de l'introduction), la seule réexpression de *PHEX* dans les os ne suffit pas à corriger le phénotype XLH, dans un modèle murin¹³⁷.

Le mécanisme physiopathologique tel que décrit à ce jour met en jeu le FGF-23, un facteur phosphorégulateur produit par les ostéoblastes qui est responsable de la fuite du phosphate dans les urines au niveau rénal, conduisant à un défaut de minéralisation. Ainsi, le seul paramètre connu et pouvant être régulé au niveau systémique est l'augmentation du FGF-23 dans la circulation. Empêcher l'action du FGF-23 semble efficace puisqu'un traitement récent est l'injection tous les 15 jours d'anticorps anti-FGF23.

Dans cette étude, notre objectif était de faire produire par le foie une protéine sécrétée dans la circulation sanguine et pouvant bloquer l'action du FGF-23 endogène. Nous avons développé un vecteur exprimant un compétiteur du FGF-23 endogène (cFGF-23) qui devrait inhiber l'action du FGF-23 endogène et permettre la réabsorption du phosphate dans la circulation sanguine (Figure 53). Les différents candidats pour neutraliser l'effet de FGF-23 ont été obtenus à partir du C-terminal FGF-23 (acides aminés 180 à 251 du FGF-23 naturel). Nous avons évalué différentes cassettes d'expression du cFGF-23 afin d'augmenter son expression et sa stabilité. Ainsi, nous avons évalué l'intérêt de conserver la séquence du peptide signal naturel (nucléotides 1 à 72 de la séquence du FGF-23 naturel), ou de la remplacer par un peptide signal issu de la chymotrypsinogen B2 (sp7)¹. Certains candidats ont été fusionnés à l'albumine, via un signal de clivage provenant de la séquence du FIX (cFIX), ou directement.

Nous avons donc développé une thérapie génique ciblant le foie grâce à un vecteur AAV8 exprimant notre compétiteur cFGF-23 sous le contrôle du promoteur fort hépatique (hAAT), *in vivo* chez la souris HypDuk, modèle animal reproduisant la pathologie.

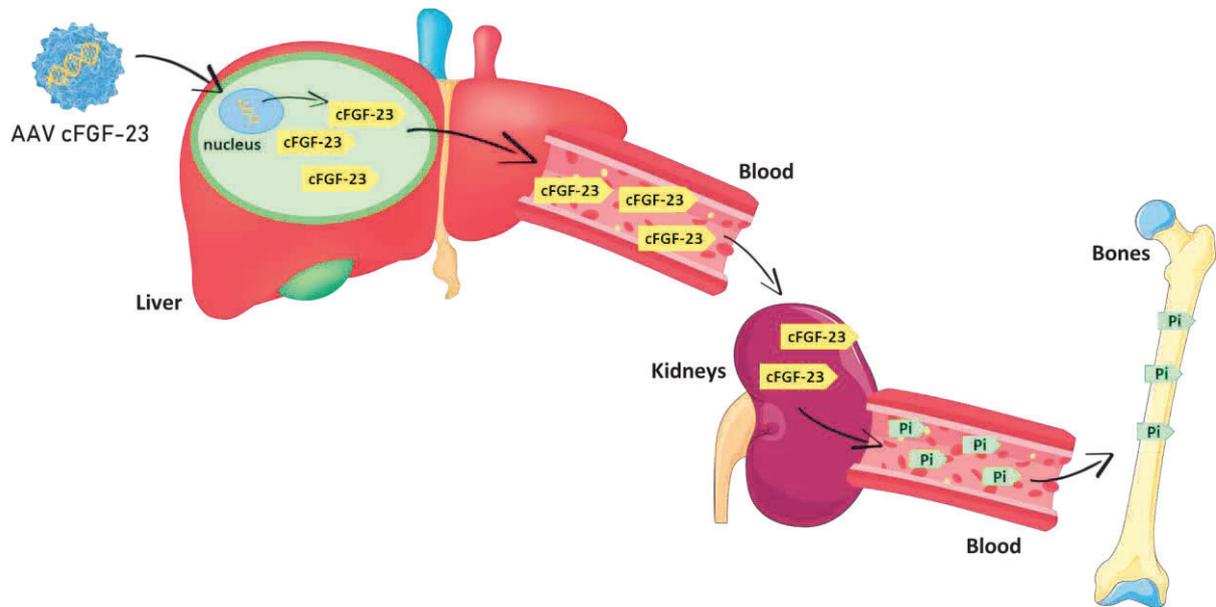


Figure 53: stratégie de thérapie génique pour l'XLH

Le foie est la cible d'un AAV codant un compétiteur du FGF-23 (cFGF-23) modifié pour être sécrétable. Les hépatocytes transduits produisent et sécrètent le cFGF-23 dans la circulation sanguine. Le cFGF-23 atteint ainsi les reins, où par compétition avec le FGF-23 endogène, il permet la réabsorption du phosphate dans la circulation générale, permettant ainsi la minéralisation des tissus osseux.

De plus, il est important de noter que le traitement de la XLH doit être initié très tôt pour permettre la minéralisation des os lors de leur croissance. Il convient donc, dans le cadre d'une thérapie génique qui consiste en une unique injection de vecteurs AAV, d'agir en amont ou au début de cette croissance osseuse. Cette période correspond aux cinq premières semaines de vie de la souris.

Dans cette étude, nous avons traité des souris HypDuk de 1 mois avec une dose de 1×10^{12} vg/souris. Dans les souris HypDuk, l'expression de cFGF-23 dans la circulation sanguine a permis de restaurer des niveaux d'ALP normaux et l'expression du transporteur du phosphate rénal, permettant ainsi une meilleure absorption du phosphate au niveau rénal. En conséquence, la minéralisation des os des souris traitées a été améliorée, et la micro- et macro-architecture des os était similaire à celle des souris wild-type. Ainsi, la croissance (gain de taille totale, gain de poids, gain de taille de la queue), mais aussi la force musculaire des souris HypDuk traitée, ont aussi été améliorées par la thérapie génique.

B. Publication

AAV liver gene therapy-mediated inhibition of FGF23 signaling as a therapeutic strategy for X-linked hypophosphatemia

Volha V. Zhukouskaya*^{1,2,3,4}, **Louisa Jauze***^{1,2,5}, Séverine Charles^{1,2}, Christian Leborgne^{1,2}, Stéphane Hilliquin^{3,6}, Jérémy Sadoine³, Lotfi Slimani³, Brigitte Baroukh³, Laetitia van Wittenberghe¹, Natalie Daniele¹, Fabienne Rajas⁵, Agnès Linglart^{4,7}, Federico Mingozzi^{1,2}, Catherine Chaussain^{3,4,8}, Claire Bardet^{# 3}, Giuseppe Ronzitti^{# 1,2}.

¹Genethon, 91000 Evry, France

²Université Paris-Saclay, Univ Evry, Inserm, Integrare research unit UMR_S951, 91000 Evry, France

³ Université de Paris, Laboratory Orofacial Pathologies, Imaging and Biotherapies URP2496 and FHU-DDS-Net, Dental School, and Plateforme d'Imagerie du Vivant (PIV), Montrouge, France

⁴Centre de référence des maladies rares du métabolisme du calcium et du phosphate, Plateforme d'expertise maladies rares Paris Saclay, filière OSCAR, EndoRare and BOND ERN, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France,

⁵ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1213, Nutrition, diabète et cerveau, Lyon, F-69008, France

⁶ Department of Rheumatology, Cochin Hospital, Université de Paris, Paris, France

⁷Université Paris-Saclay, AP-HP, Service d'endocrinologie et diabète de l'enfant, Service de médecine des adolescents, Hôpital de Bicêtre, INSERM U1185, Le Kremlin-Bicêtre, France,

⁸AP-HP Reference Center for Rare Disorders of the Calcium and Phosphate Metabolism, Dental Medicine Department, Bretonneau Hospital, GHN, 75018 Paris, France

Short title: Liver gene therapy for X-linked hypophosphatemia

* - Authors contributed equally

Corresponding authors :

Giuseppe Ronzitti, PhD,

INSERM U951 "INTEGRARE", Genethon, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 1bis rue De l'Internationale 91000 Evry, France; tel/fax: +33169472990; email: gronzitti@genethon.fr

Claire Bardet, PhD,

Université de Paris, Laboratory Orofacial Pathologies, Imaging and Biotherapies URP2496 and FHU-DDS-Net, Dental School, and Plateforme d'Imagerie du Vivant (PIV), 1 rue Maurice Arnoux 92120 Montrouge, France; tel/fax: +33158076724; email: claire.bardet@u-paris.fr

Abstract

Adeno-associated virus (AAV) gene therapy reached clinical maturity and are now the vector of choice for *in vivo* gene transfer. Although AAV gene therapy approaches were developed to efficiently target multiple tissues, the liver still represents an ideal target for AAV vectors due to the high target efficacy, specificity and stability, the advantageous immunological environment, and the extended clinical expertise available.

X-linked hypophosphatemia (XLH) is a rare disease due to increased fibroblast growth factor 23 (FGF23) secretion from bones resulting in phosphate wasting in kidneys. Decreased circulating phosphate is the primary cause of severe skeletal deformities and short stature that greatly affect patients' quality of life. Conventional treatment for XLH requires life-long repeated supplementation of phosphate and active vitamin D analogs and is associated with severe long-term side effects and poor compliance. Recently, the use of Burosumab (Crysvita[®], Ultragenyx and Kyowa Kirin), a monoclonal antibody for FGF23, has been proposed as an alternative treatment.

Based on the central role of overactive FGF23 pathway in the pathophysiology of XLH, here we devised a liver-targeted AAV gene therapy strategy to inhibit FGF23 signaling and rescue bone pathology with a single injection. Secretion of an FGF23 competing factor (cFGF23) by the liver of a murine model of XLH led to restoration of impaired skeletal phenotype and reduction of osteomalacia in Hyp-Duk mice.

Our data provide proof-of-concept to the use of AAV liver gene therapy for the treatment of XLH, a prototypical disease associated to overexpression of soluble factors in AAV-refractory tissues, thus expanding the reach of this therapeutic modality and providing novel options for the treatment of this disease category.

Main

X-linked hypophosphatemia (XLH, OMIM # 307800, incidence: 3.9/100,000 births)¹ is the most common form of genetic rickets associated to increased levels of fibroblast growth factor 23 (FGF23). Inactivating mutations in the phosphate-regulating endopeptidase homolog X-linked (*PHEX*) gene lead to increased FGF23 secretion from osteocytes and osteoblasts inducing renal phosphate-wasting, hypophosphatemia and impairing the endogenous production of active vitamin D (1,25(OH)₂vitamin D) via the inhibition of 1 α -hydroxylase and the activation of 24-hydroxylase². Chronic hypophosphatemia and low or inappropriately normal levels of active vitamin D lead to mineralization failure that clinically manifests in children as osteomalacia, severe skeletal deformities and short stature and in adults as pseudofractures, precocious and progressive osteoarthritis and enthesopathies^{1,3-5} which reduced significantly the quality of life in the latter category of XLH patients⁶.

Standard treatment for XLH consists of multiple daily intakes of oral phosphate to compensate the renal wasting, and active vitamin D analogs to counteract the deficiency. Although commonly prescribed from infancy to the end of growth, the multiple daily doses are often associated to poor treatment compliance and to side effects at long term^{1,3,4,7}.

Recently, reduced FGF23 signaling through its neutralization by a monoclonal antibody (burosumab, Crysvida®, Ultragenyx) was proposed⁷⁻¹⁴. In children with XLH, bi-weekly subcutaneous injection of Burosumab resulted in healing of rickets, improvement of impaired biochemical parameters and physical ability, and reduction in patient-reported pain and functional disability^{7,10,11}. In adult patients, 6-12 months treatment with Burosumab had an impact on the main features of XLH in adult life by accelerating the healing of active fractures and pseudofractures, and reducing the stiffness and pain^{9,13,14}. However, the high costs^{1,15,16} and the hurdles associated to the repeated administrations of the monoclonal antibody¹ together with the possible insurgence of immunologic reactions¹⁷ may represent a limitation toward a broader application of the antibody treatment. The robust preclinical models¹⁸⁻²⁰ and the extensive clinical data available together with the existing medical need, make of XLH a prototypical disease to develop innovative strategies to address bone diseases.

The use of adeno-associated virus (AAV) for *in vivo* gene replacement reached the maturity and a number of clinical trials supported the safety and efficacy of this strategy²¹⁻²⁴. Among the different tissues targeted by AAV, the liver represents an ideal candidate due to its easy accessibility, its elevated capacity to secrete proteins and the immune tolerant environment²⁵.

Importantly, liver gene therapy with AAV has been used not only to replace missing enzyme activity in hepatocytes but also to secrete proteins, mainly lysosomal, and mediate cross-correction of genetic diseases at a systemic level²⁶⁻³⁰. On the other hand, bone-targeted AAV gene therapy is at the very beginning mainly due to the poor accessibility of this tissue after systemic injection of the viral vector.

Here, we engineered a FGF23 neutralizing factor encoded by an AAV vector targeted to the liver. Our data, obtained in a classical mouse model of XLH, support the feasibility of the use of liver gene therapy to treat the skeletal manifestations of a prototypical disease associated to enhanced secretion of a soluble factor in bones, a tissue refractory to direct AAV gene transfer.

Design of AAV-cFGF23 vector and *in vitro* and *in vivo* efficacy evaluation.

The c-terminal fragment of FGF23 (amino acids 180-251 of the human FGF23, cFGF23) competes with the native FGF23 for the binding to the FGF23 receptor/Klotho complex³¹. However, cFGF23 administered as recombinant protein, was rapidly eliminated from the circulation and required multiple administrations per week in preclinical models, despite the fusion with the stabilizing Fc region of IgG1³². To develop a stable, highly secreted form of cFGF23, we fused the human cFGF23 with the signal peptide of chymotrypsinogen B2 (sp7²⁹) and with human albumin as such or through a cleavable linker derived from human coagulation factor IX³³ (cFIX, **Fig.1A**). The constructions were transfected in human hepatoma cells (Huh-7) in parallel with native human FGF23 and wild-type and codon-optimized versions of cFGF23 coding DNA fused with the FGF23 native signal peptide or sp7. Western blot analysis indicated that native FGF23 was efficiently produced and secreted in the medium of transfected Huh-7 cells (**Fig.1B**, Supplementary **Fig.1A**). As expected, low levels of the cFGF23 fragment were detected despite codon optimization (co) or fusion with the sp7 signal peptide, possibly due to its poor stability in the extracellular medium (**Fig.1C**). The fusion of cFGF23co with sp7 and albumin with or without the cFIX linker greatly improved the secretion in the extracellular medium possibly by stabilization of the resulting fusion protein (**Fig.1B,C**, Supplementary **Fig.1A**).

cFGF23co constructs fused with sp7 and albumin with or without the cFIX linker were then tested *in vivo* and compared to cFGF23 fused with sp7. AAV8 vectors expressing those transgenes under the transcriptional control of the liver-specific apolipoprotein E enhancer,

human alpha-1-anti-trypsin promoter (hAAT) were injected in six week-old wild-type (WT) C57BL/6J mice at the dose of 1×10^{12} vg/mouse (**Fig.1D-F**, Supplementary **Fig.1B,C**). One month after vector injection, mice were bled to measure the expression of the three cFGF23co variants by Western blot. No bands with a size compatible with cFGF-23co were detectable in mice injected with the AAV expressing cFGF-23co fused with sp7 (**Fig.1D**, Supplementary **Fig.1B**). Bands corresponding to the molecular weight of cFGF23co-albumin chimeric proteins were revealed in mice injected with vectors expressing albumin fusion proteins (**Fig.1D**, Supplementary **Fig.1B**). Mice receiving the AAV vector expressing the cFGF23co-albumin fusion containing the cFIX cleavable linker showed significantly higher levels of circulating fusion protein and cleaved FGF23 when compared to its counterpart lacking cFIX (**Fig.1D,E**, Supplementary **Fig.1B**), despite similar transduction as demonstrated by vector genome copy number (VGCN) per diploid genome in liver (Supplementary **Fig.1C**). Importantly, only mice injected with the AAV vector expressing the cFGF23co-albumin fusion with the cFIX cleavable linker showed increased phosphate levels compared to control animals (**Fig.1F**). These data support the hypothesis that the truncated FGF23 is unstable when expressed both *in vitro* and *in vivo*. They also suggest that the fusion with albumin, together with the inclusion of a cleavable linker allow for the efficient secretion of an active cFGF23 in circulation after AAV-mediated liver gene transfer.

In mice, a natural deletion of the murine *Phex* gene leads to increased circulating FGF23, decreased sodium/phosphate co-transporter (NaPi2a) expression in kidney and the consequent phosphate wasting underlying the bone disease in XLH^{2,19}. To verify if liver mediated secretion of the cFGF23-albumin fusion was able to rescue phosphate wasting in Hyp-Duk mice, a murine model of XLH¹⁹, an AAV8 vector expressing the cFGF23co-albumin fusion with the cFIX cleavable linker (AAV-cFGF23) was injected in 4-weeks-old Hyp-Duk mice at the dose of 1×10^{12} vg/mouse (Hyp-Duk, AAV). PBS-injected Hyp-Duk mice (Hyp-Duk, PBS) and WT littermates (WT, PBS) were used as controls (**Fig.1G**). Under these experimental conditions, a single injection of the liver-targeted AAV-cFGF23 (Supplementary **Fig.1D**), restored the expression of NaPi2a in the kidney of AAV injected animals, with levels of expression that were similar to those measured in WT littermates both at mRNA (**Fig.1H**) and protein level (**Fig.1I**). Surprisingly, despite the complete restoration of NaPi2a expression in kidney, we observed only a tendency to the increase in blood phosphate levels in Hyp-Duk mice treated with AAV-cFGF23 (**Fig.1J**) possibly due to the increased phosphate uptake in bones.

Selective competition of the cFGF23 fragment with FGF23 for the FGF23 receptor/Klotho complex binding is associated with increased serum phosphate without impacting the synthesis of 1,25(OH)₂vitamin D³² implicated in the formation of ectopic calcifications³⁴. To verify the safety profile of our construction, we evaluated the levels of expression of 1 α -hydroxylase, the principal enzyme in the synthesis of the active form of the vitamin D, 1,25(OH)₂vitamin D. Three months after AAV-cFGF23 vector injection no difference were observed among groups in the levels of expression of 1 α -hydroxylase in kidney, the primary site of active vitamin D production (Supplementary **Fig.2A**). Consistently, circulating levels of 1,25(OH)₂vitamin D were unchanged among groups (Supplementary **Fig.2B**). Ectopic calcifications, *i.e.* calcium phosphate deposits in soft tissues other than bones, are a consequence of increased calcium and phosphate levels and low FGF23 signaling³⁵. Calcium levels in blood measured at sacrifice were significantly decreased in untreated Hyp-Duk mice and were restored to levels similar to those measured in WT animals in Hyp-Duk mice treated with AAV-cFGF23, without further increase (Supplementary **Fig.2C**). No evidence of kidney calcification was shown by Von Kossa staining in the kidney of animals of the three groups (Supplementary **Fig.2D**).

Three months after vector injection, micro computed tomography (micro-CT) analysis showed complete restoration of the bone defective mineralization (**Fig.2A**). In particular, AAV treatment in Hyp-Duk mice completely rescued three important parameters describing the trabecular structure, namely the bone volume-to-total volume ratio (**Fig.2B**), the number of trabecules per mm (**Fig.2C**) and the trabecular separation (Supplementary **Fig.3A**) to value similar to those measured in WT animals. Significant rescue of the trabecular thickness and trabecular pattern factor was indicative of the improvement in bone microarchitecture (Supplementary **Fig.3B,C**). AAV-cFGF23 treatment also improved the structure of the cortical bone (**Fig.2D**) such as the cortical thickness and the ratio cortical to total cross-sectional area (**Fig.2E,F**). Improved bones structure was further confirmed by histological analyses. Von Kossa staining of proximal tibia showed significant increase of the calcified bone in the ossification zone in AAV-treated Hyp-Duk mice (**Fig.2G**). The poorly mineralized matrix, the osteoid, largely present in untreated Hyp-Duk mice was substituted with calcified bone after treatment with AAV-cFGF23 with levels similar to those measured in WT animals (**Fig.2G,H**). Consequently, AAV-treated Hyp-Duk mice showed fainter alkaline phosphatase (ALP) staining, a marker of osteogenic cell differentiation, compared to untreated Hyp-Duk mice displaying a strong ALP activity at the periphery of the accumulated osteoid. In addition, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining, a marker of bone-resorbing cell, was

observable along mineralized trabecules in AAV-treated Hyp-Duk mice similar to WT mice (Supplementary **Fig.3E,F**).

Consistently with the amelioration of the bones structure, we observed significant improvement of the growth plate structure, responsible for bone elongation as visualized by Safranin O staining (**Fig.2I**). In control Hyp-Duk mice, the columnar structure of chondrocytes in growth plates was severely disorganized, which resulted in the abnormal thickening of the growth plate structure. AAV-cFGF23 treatment restored the columnar structure of the chondrocytes and decreased the total thickness of the growth plate (**Fig.2I**). Consistently, blood levels of total ALP, being a good marker of skeletal health, was significantly decreased in Hyp-Duk mice treated with AAV-cFGF23 when compared with PBS-treated Hyp-Duk (**Fig.2J**).

These results indicate that AAV-cFGF23 treatment in one month-old animals normalized bone mineralization and growth plate abnormalities. We next evaluated the effect of liver gene therapy on the restoration of long bones growth. AAV-cFGF23 injection promoted the elongation of femur and tibia in treated mice together with a general amelioration of the bones structure with a reduction of the distorted epiphysis and diaphysis typically observed in Hyp-Duk bones (**Fig.3A-D**). Phenotypically, AAV-treated Hyp-Duk animals were larger (**Fig.3E**) with significant improved weight overtime (**Fig.3F**). Consistently with the elongation observed in long bones (**Fig.3A-D**), we observed a partial rescue overtime of body and tail length in Hyp-Duk mice after AAV-cFGF23 treatment, suggestive of a general positive effect on the longitudinal bones elongation (**Fig.3G,H**).

Osteoarticular rachitic manifestations are typical in XLH adult patients⁶ and were reported also in hypophosphatemic mice³⁶. We then evaluated the effect of the treatment on sacroiliac arthritis. As expected, untreated Hyp-Duk mice showed multiple erosions and an irregular aspect of the cortical board at micro-CT scan with higher sacroiliac score compared to WT animals (**Fig.3I,J** and Supplementary **Table 2**). In AAV-treated Hyp-Duk mice the treatment rescued signs of sacroiliac arthritis both in terms of morphology and sacroiliac score (**Fig.3I,J** and Supplementary **Table 2**). In addition total body micro-CT scan showed that AAV-treated Hyp-Duk presented similar skeleton features to WT mice with a restoration of vertebral body hypertrophy (Supplementary **Fig.4A,B**). Consistently with an improved bone architecture, a significant reduction in the number of falls in four limb hanging test was seen in AAV-treated Hyp-Duk mice three months after vector injection to levels similar to those measured in WT animals (Supplementary **Fig.4C**).

Discussion

Clinical results define AAV as the vector of choice for *in vivo* gene therapy. Despite the wide application of AAV vectors to correct gene defects in multiple tissues, refractory tissues to AAV vectors represent an important barrier to a wider application of AAV gene therapy. XLH is a pathology due to a molecular defect in the production of FGF23 in bones that results in an overactive FGF23 pathway in the kidney and poor bone mineralization. XLH is an ideal model of cell non-autonomous diseases due to increased function of soluble factors produced in tissues hardly targeted by AAV gene therapy. Here we propose an innovative strategy to interfere with the function of a soluble factor to target refractory tissues by using liver as a bio-factory to secrete a soluble factor interfering with the FGF23 signaling, overactivated in XLH.

Through optimization of the delivery platform, we demonstrated that the inhibition of the FGF23 signaling in kidney through liver-targeted expression of cFGF23 resulted in increased expression of the NaPi2a transporter and complete rescue of bone mineralization and osteomalacia in a mouse model of XLH. In addition, differently from the monoclonal anti-FGF23 antibody treatment⁸, AAV-cFGF23 did not increase blood levels of active vitamin D, expression of 1 α -hydroxylase and calcium deposition in kidneys, thus providing a better safety profile. On the other hand, the partial restoration of bone length that we reported, might result from the administration of the AAV vector to one-month-old animals. At this age, the growth plate, the developmental center for endochondral ossification involved in linear growth is almost completely mature in a mouse³⁷. One potential limitation of our approach is the dose of AAV used to express cFGF23 in mouse liver. However, our construction is based on the human cFGF23 which is not conserved in mice (66% of identity) and is likely to have poor docking to the murine FGF23 receptor. Further investigation in species with higher percent of conservation i.e. non-human primates (95% of identity), will allow for a better definition of the target dose in humans.

In conclusion, our results provide proof-of-concept of the use of the liver-targeted AAV gene therapy in XLH. It also supports the use of liver as a platform to secrete factors able to modulate pathways in tissues refractory to AAV gene therapy further pushing the boundaries of this technology, to expand the number of diseases potentially tackled and ultimately increase patients' access to therapy.

Methods

Methods and any associated references are available in the online version of the manuscript
Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Genethon and the French Muscular Dystrophy Association, the European Research Council Consolidator Grant under grant agreement no. 617432 (to F.M.), the *Agence Nationale de la Recherche* (grant 18-CE14-0018-01), *Fondation pour la Recherche Médicale* (grant DGE20111123012); the DIM *Thérapie Génique*, the *Société Française d'Endocrinologie et de Diabétologie Pédiatrique* and *Novo-Nordisk*.

We are grateful to Coralie Torrens for her kind assistance with the histological techniques; in vivo imaging was performed at the Life Imaging Facility of Paris Descartes University (Plateforme Imageries du Vivant), supported by France Life Imaging (grant ANR-11-INBS-0006) and Infrastructures Biologie-Santé.

Authors contributions

V.V.Z., L.J., S.C., and C.L. performed or directed experimental activities, contributed significantly to experimental design, data analysis, and manuscript writing. V.V.Z., L.J., C.B., and G.R. conceived the study, directed experimental activities and data interpretation and wrote the manuscript. A.L., F.M., C.C., C.B. and G.R. supervised the study and provided important insight into the disease pathophysiology and AAV vector technology. V.V.Z., L.J., S.C., C.L., S.H., L.V.W., N.D., F.R., C.B and G.R. contributed to experimental design and results interpretation. V.V.Z., L.J., S.C., C.L., S.H., J.S., L.S., and B.B. contributed to experimental activities. All authors approved the final manuscript.

Competing interest declaration

L.J., S.C., F.M., and G.R. are inventors in patents applications concerning the treatment of XLH (PCT/EP2020/061015). F.M. is current employee and equity holder of Spark Therapeutics, Inc., a Roche company. All other authors declare no conflict of interest.

Statements of data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request

References

- 1 Haffner, D. *et al.* Clinical practice recommendations for the diagnosis and management of X-linked hypophosphataemia. *Nat Rev Nephrol* **15**, 435-455 (2019).
- 2 Shimada, T. *et al.* FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* **19**, 429-435, doi:10.1359/JBMR.0301264 (2004).
- 3 Linglart, A. *et al.* Therapeutic management of hypophosphatemic rickets from infancy to adulthood. *Endocr Connect* **3**, R13-30 (2014).
- 4 Beck-Nielsen, S. S. *et al.* FGF23 and its role in X-linked hypophosphatemia-related morbidity. *Orphanet J Rare Dis* **14**, 58, doi:10.1186/s13023-019-1014-8 (2019).
- 5 Carpenter, T. O. *et al.* Rickets. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17101, doi:10.1038/nrdp.2017.101 (2017).
- 6 Che, H. *et al.* Impaired quality of life in adults with X-linked hypophosphatemia and skeletal symptoms. *Eur J Endocrinol* **174**, 325-333, doi:10.1530/EJE-15-0661 (2016).
- 7 Carpenter, T. O. *et al.* Burosumab Therapy in Children with X-Linked Hypophosphatemia. *The New England journal of medicine* **378**, 1987-1998 (2018).
- 8 Aono, Y. *et al.* Therapeutic effects of anti-FGF23 antibodies in hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Bone Miner Res* **24**, 1879-1888 (2009).
- 9 Insogna, K. L. *et al.* A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial Evaluating the Efficacy of Burosumab, an Anti-FGF23 Antibody, in Adults With X-Linked Hypophosphatemia: Week 24 Primary Analysis. *J Bone Miner Res* **33**, 1383-1393 (2018).
- 10 Imel, E. A. *et al.* Burosumab versus conventional therapy in children with X-linked hypophosphataemia: a randomised, active-controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* **393**, 2416-2427 (2019).
- 11 Whyte, M. P. *et al.* Efficacy and safety of burosumab in children aged 1-4 years with X-linked hypophosphataemia: a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* **7**, 189-199 (2019).
- 12 Yamazaki, Y. *et al.* Anti-FGF23 neutralizing antibodies show the physiological role and structural features of FGF23. *J Bone Miner Res* **23**, 1509-1518, doi:10.1359/jbmr.080417 (2008).
- 13 Insogna, K. L. *et al.* Burosumab Improved Histomorphometric Measures of Osteomalacia in Adults with X-Linked Hypophosphatemia: A Phase 3, Single-Arm, International Trial. *J Bone Miner Res* **34**, 2183-2191, doi:10.1002/jbmr.3843 (2019).
- 14 Portale, A. A. *et al.* Continued Beneficial Effects of Burosumab in Adults with X-Linked Hypophosphatemia: Results from a 24-Week Treatment Continuation Period After a 24-Week Double-Blind Placebo-Controlled Period. *Calcif Tissue Int* **105**, 271-284, doi:10.1007/s00223-019-00568-3 (2019).
- 15 Collins, M. Burosumab: At Long Last, an Effective Treatment for FGF23-Associated Hypophosphatemia. *J Bone Miner Res* **33**, 1381-1382, doi:10.1002/jbmr.3544 (2018).
- 16 Emma, F. & Haffner, D. FGF23 blockade coming to clinical practice. *Kidney Int* **94**, 846-848, doi:10.1016/j.kint.2018.08.022 (2018).

- 17 Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A. & George, A. J. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 325-338, doi:10.1038/nrd3003 (2010).
- 18 Eicher, E. M., Southard, J. L., Scriver, C. R. & Glorieux, F. H. Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D-resistant) rickets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4667-4671, doi:10.1073/pnas.73.12.4667 (1976).
- 19 Lorenz-Depiereux, B. *et al.* New intragenic deletions in the PheX gene clarify X-linked hypophosphatemia-related abnormalities in mice. *Mamm Genome* **15**, 151-161, doi:10.1007/s00335-003-2310-z (2004).
- 20 Strom, T. M. *et al.* Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum Mol Genet* **6**, 165-171, doi:10.1093/hmg/6.2.165 (1997).
- 21 George, L. A. *et al.* Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N Engl J Med* **377**, 2215-2227, doi:10.1056/NEJMoa1708538 (2017).
- 22 Maguire, A. M. *et al.* Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358**, 2240-2248, doi:10.1056/NEJMoa0802315 (2008).
- 23 Mendell, J. R. *et al.* Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* **377**, 1713-1722, doi:10.1056/NEJMoa1706198 (2017).
- 24 Rangarajan, S. *et al.* AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med* **377**, 2519-2530, doi:10.1056/NEJMoa1708483 (2017).
- 25 Colella, P., Ronzitti, G. & Mingozzi, F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Molecular therapy. Methods & clinical development* **8**, 87-104, doi:10.1016/j.omtm.2017.11.007 (2018).
- 26 Cardone, M. *et al.* Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery. *Hum Mol Genet* **15**, 1225-1236, doi:10.1093/hmg/ddl038 (2006).
- 27 Ferla, R. *et al.* Gene therapy for mucopolysaccharidosis type VI is effective in cats without pre-existing immunity to AAV8. *Hum Gene Ther* **24**, 163-169, doi:10.1089/hum.2012.179 (2013).
- 28 Hinderer, C. *et al.* Liver-directed gene therapy corrects cardiovascular lesions in feline mucopolysaccharidosis type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 14894-14899, doi:10.1073/pnas.1413645111 (2014).
- 29 Puzzo, F. *et al.* Rescue of Pompe disease in mice by AAV-mediated liver delivery of secretable acid alpha-glucosidase. *Sci Transl Med* **9**, doi:10.1126/scitranslmed.aam6375 (2017).
- 30 Ruzo, A. *et al.* Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Ther* **20**, 254-266, doi:10.1038/mt.2011.220 (2012).
- 31 Goetz, R. *et al.* Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 407-412 (2010).
- 32 Johnson, K. *et al.* Therapeutic Effects of FGF23 c-tail Fc in a Murine Preclinical Model of X-Linked Hypophosphatemia Via the Selective Modulation of Phosphate Reabsorption. *J Bone Miner Res* **32**, 2062-2073 (2017).

- 33 Metzner, H. J., Weimer, T., Kronthaler, U., Lang, W. & Schulte, S. Genetic fusion to albumin improves the pharmacokinetic properties of factor IX. *Thromb Haemost* **102**, 634-644, doi:10.1160/TH09-04-0255 (2009).
- 34 Sitara, D. *et al.* Genetic ablation of vitamin D activation pathway reverses biochemical and skeletal anomalies in Fgf-23-null animals. *Am J Pathol* **169**, 2161-2170, doi:10.2353/ajpath.2006.060329 (2006).
- 35 Folsom, L. J. & Imel, E. A. Hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis: genetic models of deficient FGF23 action. *Curr Osteoporos Rep* **13**, 78-87, doi:10.1007/s11914-015-0254-3 (2015).
- 36 Faraji-Bellee, C.-A. *et al.* Development of Enthesopathies and Joint Structural Damage in a Murine Model of X-Linked Hypophosphatemia. *Front Cell Dev Biol* **8**, 854 (2020).
- 37 Fuente, R. *et al.* Marked alterations in the structure, dynamics and maturation of growth plate likely explain growth retardation and bone deformities of young Hyp mice. *Bone* **116**, 187-195, doi:10.1016/j.bone.2018.08.004 (2018).

FIGURE 1

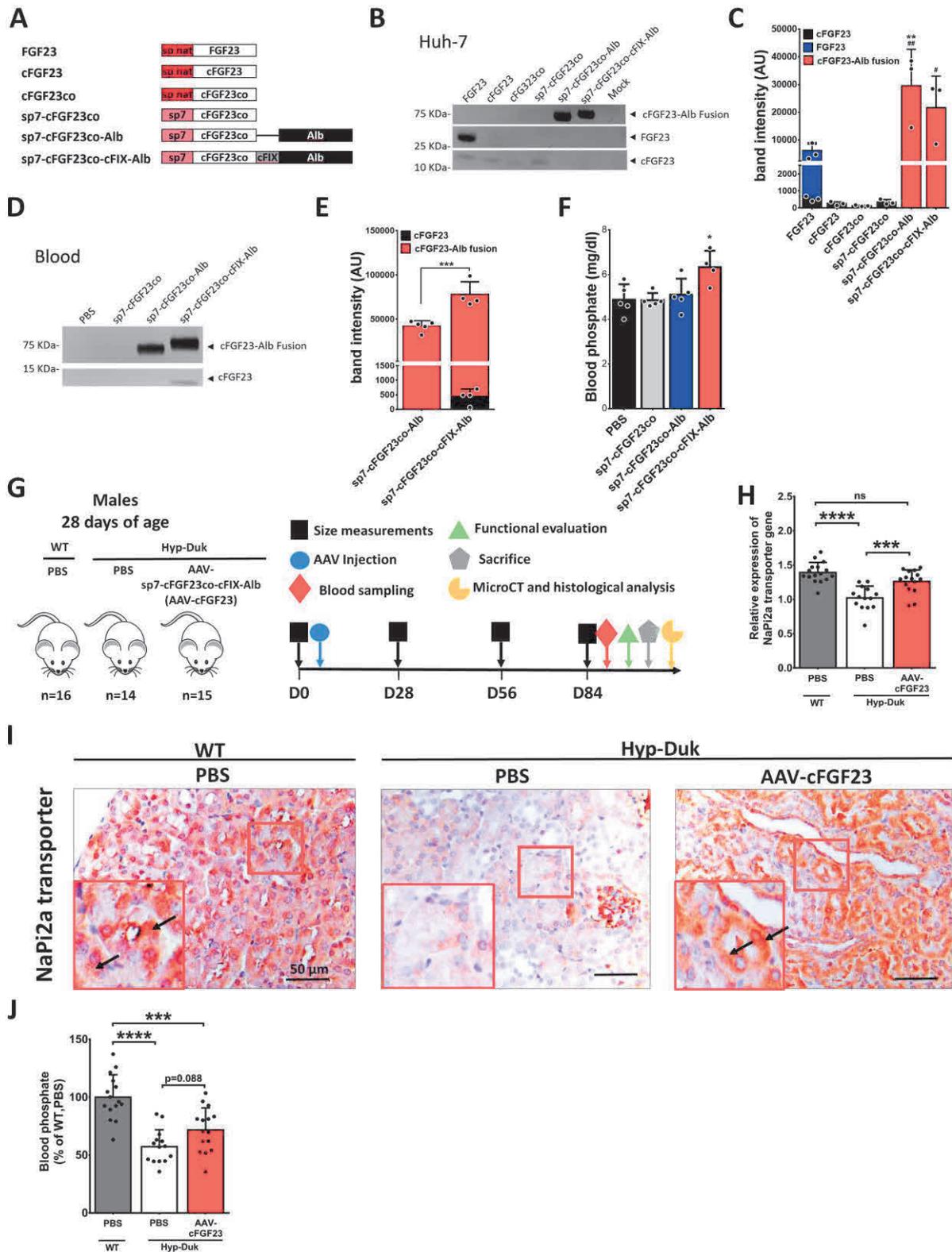


Figure 1. Engineering of the cFGF23 transgene for liver expression results in decreased FGF23 signalling in kidney in a mouse model of XLH. **A.** Description of the FGF23-derived transgene constructions. The native FGF23 signal peptide (sp) was replaced with a heterologous signal

peptide (sp7). Amino acids 180-251 of human FGF23 constitutes the truncated FGF23 (cFGF23) that was codon optimized (co) and fused with amino acids 25-609 of human albumin with or without a cleavable linker derived from amino acids 182-200 of human coagulation factor IX (cFIX). **B,C.** Western-blot quantification of FGF23 isoforms (cFGF23, FGF23 and FGF23-Albumin fusion) expression in the medium of Huh-7 transfected cells. **B.** Representative Western blot. **C.** Quantification of the FGF23 isoforms secreted in the medium of Huh-7 cells transfected with the indicated constructs. **D-F.** C57Bl6/J mice were injected with 1×10^{12} vg/mouse of AAV8 vector expressing sp7-cFGF23co, sp7-cFGF23co-Alb or sp7-cFGF23co-cFIX-Alb under the transcriptional control of the hAAT promoter. **D.** Representative Western blot of the levels of FGF23 isoforms measured in blood one month after vector injection. **E.** Quantification of the expression of cFGF23-Alb fusion in blood. **F.** Blood phosphate levels measured one month after vector injection. **G-J.** One-month-old Hyp-Duk mice were injected with 1×10^{12} vg/mouse of AAV8 expressing sp7-cFGF23co-cFIX-Alb (AAV-cFGF23) and sacrificed three months after injection. PBS-injected WT and Hyp-Duk mice served as controls. **G.** Experimental design. **H.** Expression of the NaPi2a transporter mRNA in kidney **I.** Expression of the NaPi2a transporter (arrows) in the kidneys, obtained by immunohistochemistry. Scale bar is indicated in the pictures. **J.** Blood phosphate levels expressed as % of levels measured in WT mice measured three months after treatment. Statistical analyses were performed by ANOVA in C (**p<0.01 vs. intact FGF23; # p<0.05 and ## p<0.01 vs. cFGF23 measured in cells transfected with native FGF23) and in F, H, J (*p < 0.05; *** p < 0.001; **** p < 0.0001; ns: non significant), and by Student's t test in E (**p < 0.01). All data are shown as mean \pm SD (n=14-16 mice per group).

FIGURE 2

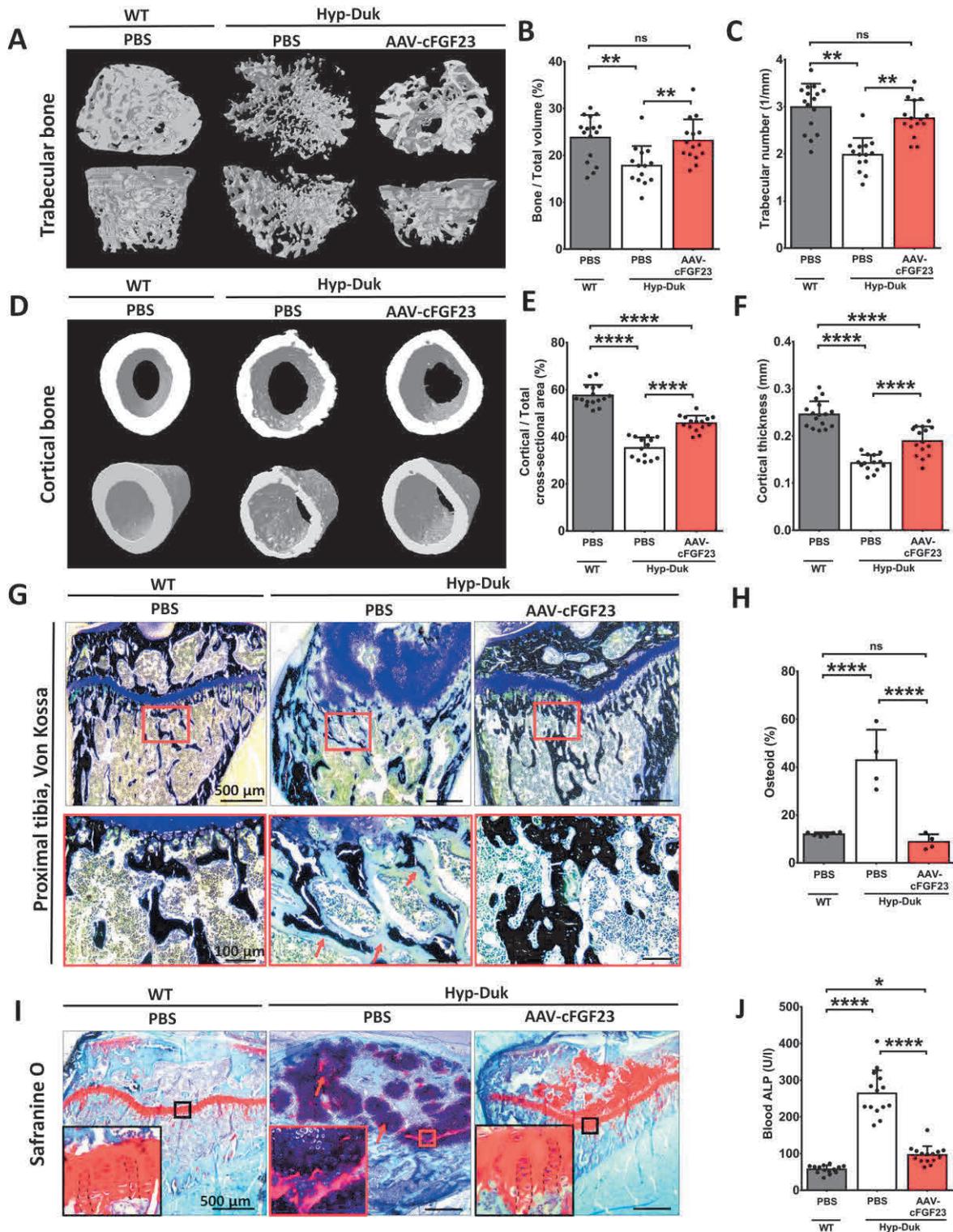


Figure 2. AAV-cFGF23 treatment rescues bone microarchitecture, mineralisation, and growth plate morphology. One-month-old Hyp-Duk mice were injected with AAV-cFGF23 at 1×10^{12} vg/mouse and sacrificed three months after the injection to evaluate the efficacy of AAV-cFGF23 on bones microarchitecture. PBS-injected WT and Hyp-Duk mice served as controls.

A. Micro-CT images of the trabecular bone from femur. **B.** Bone to total volume ratio in the trabecular bone, expressed in percent. **C.** Trabecular number, expressed as trabecules/mm. **D.** Micro-CT images of the cortical bone from femur. **E.** Cortical area to total cross-section area ratio, expressed in percent. **F.** Thickness of the cortical bone wall, expressed in mm. **G.** Von Kossa staining performed on the proximal tibia, highlighting mineralisation (in dark). Red arrows indicate the enlarged areas of non-mineralized collagenous matrix (osteoid, in light blue), a characteristic feature of osteomalacia in untreated Hyp-Duk mice. **H.** Quantification of osteoid in histological series of Von Kossa stainings, expressed in percent of total bone area. **I.** Safranin O staining of the proximal tibia, highlighting the structure of proximal metaphyseal growth plate (in red). Red arrows indicate the abnormal presence of hypertrophic chondrocytes in untreated Hyp-Duk mice compared to WT mice. **J.** Blood levels of alkaline phosphatase measured three months after the injection of the AAV-cFGF23 or PBS. Statistical analyses were performed by ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns: non significant). All data are shown as mean \pm SD (n=4-6 mice per group in H, n=14-16 mice per group in B,C,E,F,J).

parameters measured before and 1, 2 and 3 months after AAV-cFGF23 or PBS treatment in WT and Hyp-Duk animals. **F.** Body weight. **G.** Body size. **H.** Tail length. **I.** Micro-CT images of sacroiliac joint three months after the injection. Multiple erosions and irregular cortical board are indicated with red arrows. **J.** Micro-CT evaluation of sacroiliac joint structure 3 months after AAV-cFGF23 or PBS injections. Statistical analyses were performed by ANOVA in B, D and J (**** $p < 0.0001$, ns: non significant), two-way ANOVA in F-H (# $p < 0.05$ versus WT, PBS, * $p < 0.05$ versus Hyp-Duk, PBS). All data are shown as mean \pm SD (n=10-16 mice per group).

Supplementary information :

- **Supplementary figures p.**
- **Online materials and methods p.**
- **Supplementary Tables p.**

Supplementary Figure 1. Selection of an AAV-cFGF23 candidate and *in vivo* assessment.

Legend: **A.** FGF23 (native, or cFGF23) expression in the medium of the transfected cells, n=3. **B.** cFGF23 expression in the blood of all the injected C57Bl6/J mice, and its ponceau dye. **C.** Vector genome copy number per diploid cell in liver, in the C57Bl6/J mice. **D.** Vector genome copy number per diploid cell in liver, in the Hyp-Duk mice. All data are shown as mean \pm SD. Statistical analysis in C was performed by ANOVA (*p < 0.05).

Supplementary Figure 2. Therapeutic and adverse effect of the AAV-cFGF23 treatment

Legend: Hyp-Duk mice were injected with 1×10^{12} vg/mouse of the candidate and sacrificed three months after the injection, for *in vivo* assessment of the functionality of the cFGF23. PBS-injected WT and Hyp-Duk mice served as controls. **A.** Expression of the Cyp27b1 gene (coding for 1-alpha-hydroxylase) in the kidneys, three months after AAV-cFGF23 or PBS injections. **B.** Blood levels of 1,25(OH)₂vitaminD three months after AAV-cFGF23 or PBS injections. **C.** Blood calcium levels three months after AAV-cFGF23 or PBS injections. **D.** Representative images of Von Kossa staining of the kidneys. All data are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were performed by ANOVA (*p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: non significant). AAV: adenovirus-associated vector; cFGF23: c-terminal tail of fibroblast growth factor 23; 1,25(OH)₂vitaminD: 1,25-dihydroxy-vitamin D.

Supplementary Figure 3. Impact of the AAV-cFGF23 treatment on trabecular bone microarchitecture, markers of bone metabolism and growth plate structure

Legend: Hyp-Duk mice were injected with 1×10^{12} vg/mouse of the candidate and sacrificed three months after the injection, for *in vivo* assessment of the functionality of the cFGF23. PBS-injected WT and Hyp-Duk mice served as controls. **A.** Trabecular separation, expressed in mm. **B.** Trabecular thickness, expressed in mm. **C.** Trabecular pattern factor, expressed as 1/mm. **D.** Representative images of Von Kossa staining performed on proximal tibia highlighting bone mineralized matrix (in dark). Untreated Hyp-Duk mice showed an accumulation of non mineralized collagenous matrix, osteoid (arrows). **E.** Representative pictures of ALP enzyme histochemistry performed on proximal tibia. Untreated Hyp-Duk mice showed ALP activity surrounding the region of osteoid accumulation (arrows). Mineralized bone is indicated with stars. Hyp-Duk mice treated with AAV-cFGF23 showed ALP activity similar to WT mice. **F.** Representative pictures of TRAP enzyme histochemistry performed on proximal tibia. TRAP staining (arrows) showed similar osteoclast activity in Hyp-Duk mice after AAV-cFGF23 treatment, compared to WT mice **G.** Safranin O staining performed on proximal tibia

highlighting the growth plate structure (in red). Untreated Hyp-Duk mice showed a disorganized structure of growth plate with an accumulation of hypertrophic chondrocytes (arrows). These features decreased after the AAV-cFGF23 treatment leading to the restoration of structure and thickness of growth plate in Hyp-Duk AAV mice. All data are shown as mean \pm SD. Statistical analyses were performed by ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: non significant). AAV: adenovirus-associated vector; cFGF23: c-terminal tail of fibroblast growth factor 23; ALP: alkaline phosphatase; TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase; WT: wild-type

Supplementary Figure 4. Additional impact of AAV-cFGF23 treatment on skeleton features and functional ability.

Legend: Hyp-Duk mice were injected with 1×10^{12} vg/mouse of the candidate and sacrificed three months after the injection, for *in vivo* assessment of the functionality of the cFGF23. PBS-injected WT and Hyp-Duk mice served as controls. **A.** Representative images of mice total body assessed at Micro-CT scans. **B.** Representative images of micro-CT from spine. Untreated Hyp-Duk mice showed vertebra hypertrophy, and these features were improved in Hyp-Duk mice treated with AAV-cFGF23. **C.** Four limbs hanging test, three months after AAV-cFGF23 or PBS injections. Results are expressed as the number of falls per minute and are shown as mean \pm SD. Statistical analysis was performed by ANOVA (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns: non significant). AAV: adenovirus-associated vector; cFGF23: c-terminal tail of fibroblast growth factor 23.

Materials and methods

1. Clonings of FGF-23 variants

The different FGF-23 constructs were cloned into an expression cassette optimized for liver expression, including an enhancer derived from apolipoprotein E gene (ApoE), the human alpha-antitrypsin promoter (hAAt), the human hemoglobin subunit beta (HBB2)-derived synthetic intron and the HBB2 polyadenylation signal.

Different variants of FGF-23 were generated, based on the coding sequence of human FGF-23. Full length native FGF-23 was expressed with its natural signal peptide (sp nat) (nucleotides 1-72 from the FGF-23 native sequence).

C-terminal FGF-23 (cFGF-23) constructs were generated based on the coding sequence of human C-terminal FGF-23, corresponding to amino acids 180-251 of the human FGF-23 protein. The codon-optimized version of cFGF-23 were generated using the IDT algorithm. The RRHTR motif, from the native FGF-23 sequence, was included in all the cFGF-23co variants. The cFGF-23co variants were expressed with the natural signal peptide, or with the chymotrypsinogen B2 signal peptide, sp7, (amino acids 1-18 of NP_001020371 7). Chimeric cFGF-23co proteins were generating by fusing cFGF-23co sp7 with human serum albumin without its signal peptide. A cleavable linker derived from human coagulation factor IX (cFIX) was included or not in the sequences, as mentioned.

2. AAV vectors production

AAV vectors used in this study were produced using a slight modification of the adenovirus-free transient transfection methods and purified as described earlier^{1,2}. Briefly, adherent human embryonic kidney cells (HEK293) cells grown in roller bottles were transfected with the three plasmids containing the adenovirus helper proteins, the AAV Rep and Cap genes, and the ITR-flanked transgene expression cassette. After 72 hours of transfection, cells were harvested, lysed by sonication, and treated with benzonase (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany). Vectors were then purified using two successive ultracentrifugation rounds in cesium chloride density gradients. Full capsids were collected, the final product was formulated in sterile phosphate buffered saline containing 0.001% of pluronic (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), and stored at -80°C.

Titers of AAV vector stocks were determined by SDS-PAGE followed by SYPRO Ruby protein gel stain and band densitometry.

3. *In vitro* study

Human hepatocellular carcinoma cells (Huh-7) were transfected by lipofectamine 2000 (11668027, ThermoFisher) with 2 μ g of the constructs indicated in **Fig 1**. Two days after transfection, the medium was harvested and the levels of FGF-23 were analyzed by Western blot. The experiment was performed three times, in duplicates.

4. Western blot

Huh-7 medium after transfection and serum from mice injected with the different AAV vectors were loaded onto a 4-12% gradient polyacrylamide gel to perform SDS-PAGE. After transfer on nitrocellulose, the membrane was blocked and incubated with an anti FGF-23 antibody (MAB2629, R&D system, Minneapolis, MN). The membrane was incubated with the appropriate secondary antibody (Li-Cor Biosciences), and then visualized by Odyssey imaging system and the Image Studio Lite (v5.2) software (Li-Cor Biosciences).

5. *In vivo* study

Mice

Mouse studies were performed according to the French and European legislation on animal care and experimentation (2010/63/EU) and approved by the local Institutional Ethical Board (protocol number 2019-004).

Six week-old C57BL6/J mice were purchased from Charles River Laboratory (Ecully, France), and administered with AAV vectors at 1×10^{12} vg/mouse intravenously via the tail vein. One month after vector injection, the levels of cFGF-23 in circulation were analyzed by Western blot. The number of mice?

The general description of *in-vivo* study is depicted on the **Figure 1**. The HypDuk mouse model was obtained from the Jackson Laboratory. Genotype was determined by qPCR using primers for *Phex* gene, on exon 14: forward 5'-GATCAAATTTTCAGAATCGGACTAC-3', reverse 5'-CCAGAAGAAATCAGACTGTGC-3'. Wild-type (WT) and *HypDuk*^{-/-} littermate males were used for this study.

All mice were housed in standard conditions of temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) in a light-controlled environment, with unlimited access to water and standard pelleted food. Among the mice used into the set of protocols, 10 wild-type, 9 control *Hyp*^{-/-}, and 10 treated *Hyp*^{-/-} had gel food supplementation (DietGel Recovery, Clear H₂O) from birth until 7 days post-injection. DietGel Recovery composition indicated by supplier is: purified water, corn syrup, vegetable oil, hydrocolloids, wheat protein, electrolyte mix, food acid, mineral mix. No phenotype differences

were observed between groups with and without the supplementation, however, the number of pups surviving among the litter was dramatically increased by adding the gel.

The *in-vivo* study was consisted of three independent experiments. Each experiment contained three groups of mice: WT, control *HypDuk*^{-/-} (HypDuk) and treated *HypDuk*^{-/-} (HypDuk AAV). The final number of mice used in this study was the following: 16 WT, 14 control HypDuk and 15 treated HypDuk AAV.

The treatment consisted of intravenous injection of an AAV8-cFGF-23 at the dose of 1×10^{12} vg/mouse performed at 1 month of age. After 3 months (at age of 4 months) all mice were sacrificed.

Growth parameters

Growth parameters (body weight, total body and tail length) were measured before starting the treatment and thereafter, every 2 weeks till the sacrifice on mice anesthetized with isoflurane. Precision scales and a graduated ruler were used for weight and length measurements, respectively. Body length was considered from the muzzle to the beginning of the tail and tail length from the beginning of the tail to its end.

Blood parameters

Blood sample collection was performed from mice anesthetized with isoflurane before injection and at the end of experiment (after 3 months of treatment). At the latter time of follow-up the following blood parameters were measured: phosphate, calcitriol (1,25(OH)₂D₃), calcium (Ca²⁺), and alkaline phosphatase (ALP).

Phosphatemia, and ALP were measured in sera by a colorimetric reaction performed with the FUJI DRI-CHEM NX500 analyzer (FUJIFILM corp, Tokyo, Japan). 1,25(OH)₂D₃ blood levels were assessed on sera by RIA (radio-immuno assay), Immunodiagnostic Systems® (IDS ®), Boldon, UK.

Functional evaluation

Four limb hanging test was performed at the end of experiment (after 3 months of treatment) using a grid that was flipped over. The number of falls over a period of 3 minutes was recorded. The average number of falls per minute was reported for each animal.

6. *Ex vivo* study

Transcriptomic expression evaluation (NaPi2a transporter, 1-alpha hydroxylase)

RNA was extracted from 50 to 100 mg of kidney tissue, using Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to manufacturer's instructions. cDNA was obtained by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) performed using RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

To quantify relative gene expression, RT-PCR was performed using Taqman gene expression assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) on a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Switzerland). The following Taqman gene expression assays were used: 1-alpha-hydroxylase (*Cyp27b1* gene, Mm01165918-g1); NaPi2a transporter (*Slc34a1* gene, Mm00441450-m1); Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Mm99999915-g1). Each sample was tested in duplicate, into 2 repeated measures. Ct values were averaged and the amount of mRNA relative to GAPDH was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method according to the formula $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

VGCN

Vector genome copy numbers were measured by RT-qPCR. Total DNA was extracted from 100 mg of liver tissue, using MagNA Pure 96 DNA according to manufacturer's instructions. The RT-qPCR was performed in LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Switzerland) using SYBR Green mix. Specific primers were as follows: forward 5'-GGCGGGCGACTCAGATC-3', reverse 5'-GGGAGGCTGCTGGTGAATATT-3'.

Micro-X-ray computed tomography analysis

All the mice (WT, HypDuk and HypDuk AAV) were scanned after sacrifice using a high-resolution X-ray micro-computed tomography (micro-CT) device (Quantum FX Caliper, Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA) hosted by the PIV (Plateforme Imageries du Vivant) Platform, EA2496, Montrouge, France. Standard acquisition settings were applied (90 kV, 160 mA) and scans were performed with a field of view alternatively focused on the left hind paw (180s scan time, 20 μm^3 voxel size), the sacroiliac joint (120s, 59 μm^3 voxel size), the hip (180s, 59 μm^3 voxel size), the spine (120s scan time, 40 μm^3 voxel size), and covering the full hip and tibia and the full body (26s, 236 μm^3 voxel size). Micro-CT data sets were analyzed using the inbuilt multiplanar reconstruction tool of Osirix software 5.8 (Pixmeo, Switzerland) in order to achieve series of images aligned over time for each anatomical region of each animal.

Sagittal images of femur and tibia were used to take the measures of femur and tibia length.

Images of full total body, of the dorsal spine and of the sacroiliac joints were reconstructed. Since the sacroiliac joint is one of the most frequent location of structural involvement in adults with XLH, the analysis was focused on this area in order to study the osteoarticular rachitic manifestation. Sacroiliac osteoarthritis was defined as the presence of demineralization of iliac bone, erosions and irregular board of sacroiliac joint. Erosion of the sacroiliac joints were assessed following Faraji-Bellée et al. protocol, which was developed by rheumatologists specialized in the field of rare bone diseases and bone inflammatory diseases. The reader was blind to the status of the mouse. A semi-quantitative score was established, ranging from 0 (normal) to 3 (most severe feature assessed) for sacroiliac erosions (see supplementary Table 1).

Trabecular and cortical bone were analyzed at distal metaphysis and mid-diaphysis of femur, respectively (180s scan time, 10 μm voxel size). For Trabecular analysis: first, image stacks were oriented in the same direction using Dataviewer (Skyscan, release 1.5.2.4; Kontich, Belgium) to determine the region of interest (ROI). Secondly, quantification of the distal metaphysis bone microarchitecture below the growth plate was performed using CT scan Analyser software (Skyscan, release 1.13.5.1). ROI was drawn in the transverse sections along the cortical zone. Batch processing was applied on our data including a median filter (with radius 1) for noise reduction, and adaptive thresholding was performed with a radius of 1. Following segmentation, batch processing calculated 3D parameters of the binary image: bone volume/total volume (BV/TV), trabecular number (TbN), trabecular separation (TbSp), trabecular thickness (TbTh), trabecular pattern factor (TbPf). For cortical bone analysis, image stacks were only oriented in the same direction and Batch processing was applied on our data including a median filter (with radius 1) for noise reduction, and adaptive thresholding was performed with a radius of 1. Following segmentation, batch processing calculated 3D parameters of the binary image: ratio cortical /total cross-sectional area (CtA/TtA), cortical thickness (CtTh)³. Since the femur length of HypDuk mice is significantly shorter than in WT mice, the ROIs were adjusted according to the femur size³. The average femur length of WT mouse in our study was equal to 15.3 mm. Two hundred slices in each ROI (distal metaphysis of femur for trabecular bone and mid-diaphysis of femur for cortical bone) taken in analyses correspond to 2 mm which is equal to 13.1 % of total femur length ($2\text{mm} / 15.3 \text{ mm} \times 100 = 13.1\%$). Consequently, the ROIs for each femur were adjusted according this calculation in order to obtain the 13.1% of total femur length. 3D visualization was performed with software CTVol (Skyscan, release 2.2.3.0)

Murine bone tissue preparation

After sacrifice bones were fixed overnight at 4°C in 70% ethanol solution and dehydrated in a graded ethanol series. Undecalcified samples were embedded in methyl methacrylate (Merck, Rahway, NJ). Serial sections, 5 µm thick, were cut on a microtome (Polycut E microtome, Leica, Wetzlar, Germany). Series of consecutive sections were stained with von Kossa (5% silver nitrate solution, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and counterstained with toluidine blue (pH 3.8), stained with Safranin O Lillie's Trichrome (Sigma-Aldrich).

Enzyme histochemistry

TRAP was used to evaluate osteoclasts by using 2.5 mM naphthol-ASTR-phosphate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 0.36 M N–N-dimethyl-formamide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), and 4 mM salt in pH 5.2 acetate buffer. Nonosteoclastic acid phosphatase activity was inhibited with 100 mM L(+)-tartaric acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) added to the substrate solution. ALP was used to reveal the layer of osteogenic cells (pre-osteocementoblasts and osteocementoblasts) by incubating the sections with naphthol ASTR phosphate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and diazonium fast blue RR salt (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 30 min at 37°C (pH 9) in the presence of MgCl₂.

Immunohistochemistry for NaPi2a transporter expression

Kidney sections embedded in paraffin were deparaffinised in toluene. After rehydration in a graded ethanol series to pure distilled water, the sections were incubated with antigen retrieval solution (sodium citrate buffer pH 6) for 10 min at 90°C. The sections were washed in 1% PBS, treated with glycine 1% for 30 min, incubated with blocking solution (1% bovine serum albumin, tween 0.05%, 10% goat serum) at room temperature for 1 hour and then incubated with the anti-NaPi2a primary antibody (NBP2-13328, Slc34A1 antibody, Novusbio, USA) diluted 1:10. The incubation with primary antibody continued overnight at 4°C in a humidified dark chamber. Sections were washed and then incubated with polyclonal anti-rabbit biotinylated secondary antibody (Vectastatin Elite ABC Kit PK-6101) diluted at 1:200 for 1,5 hours at room temperature in a dark chamber. The sections were washed and treated with 3% H₂O₂ at 37°C for 30 min, then with avidine biotinyne solution for 60 min (Vectastatin Elite ABC Kit PK-6101), washed in 3% PBS and Tris HCL pH 7.6 and reacted with diaminobenzidine (DAB) substrate (Sigma-Aldrich). For nuclear counterstaining, the sections were stained with hematoxylin. Control incubations to assess nonspecific staining consisted of the same procedure except that the primary antibody was replaced by nonimmune serum.

Histological quantification

For histological quantification, the images were processed using Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*) software 2.1.0/1.53c, version for Windows.

Osteoid quantification was performed on the images of left tibia's secondary spongiosa stained with Von Kossa. The ROI was focused on secondary spongiosa. All the ROIs were adjusted according the tibia size (described in the section of micro-CT analysis). Each ROI was split in square fields (from 7 to 12). The total bone area and the osteoid area were calculated in each square field and the results were summarized. Then, the percentage of osteoid was calculated dividing the osteoid area to total bone area.

ALP and TRAP activity quantification was performed on the images of left tibia after enzyme histochemistry. The ROI was focused on the bone area below the growth plate starting from the end of hypertrophic chondrocytes layer and extending caudally for 0.6 mm. This area containing primary and the beginning of secondary spongiosa were divided in 4 square fields. In each square field ALP and TRAP activity quantification was performed and the results were then averaged. The color segmentation plugin was used for detecting ALP activity. For TRAP activity quantification, there were calculated the global length of bone surface and the length of active osteoclasts (attached to the bone surface). Therefore, TRAP activity was expressed as a ratio of the length of active osteoclasts to the bone surface length (%).

7. Statistical analysis

Statistical analysis and graphs were performed with GraphPad Prism for Windows, version 7.0. The results are expressed as Mean±SD for continuous variables. The comparison of continuous variables was performed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), as appropriate. P values of less than 0.05 were considered significant.

Methods references

1. Ayuso, E, Mingozi, F, Montane, J, Leon, X, Anguela, XM, Haurigot, V et al. (2010). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther* 17: 503–510
2. Matsushita, T, Elliger, S, Elliger, C, Podsakoff, G, Villarreal, L, Kurtzman, GJ et al. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5: 938–945

3. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RA, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-1486

Supplementary Table 1: Scoring grid of erosions

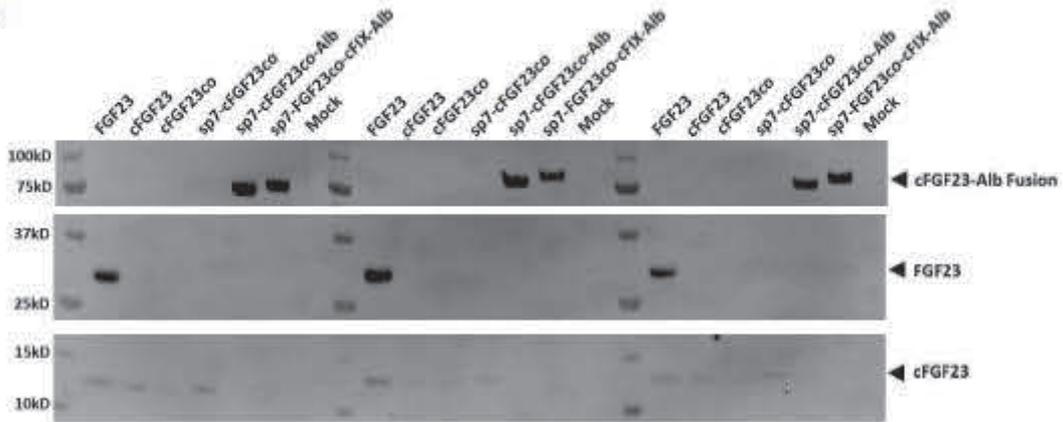
Variables	Score	Description
Erosion of the sacroiliac joints	0	normal
	1	doubtful
	2	< 25% of the articular surface area affected
	2.25	≥ 25% to < 50% of the articular surface area affected
	2.5	≥ 50% to < 75% of the articular surface area affected
	2.75	≥ 75% to < 100% of the articular surface area affected
	3	all the articular surface area affected

Supplementary Table 2: Sacroiliac joint score for erosion in treated HypDuk AAV mice compared to untreated HypDuk and WT mice.

Mice #	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16
WT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
HypDuk	2.75	2.25	2	2.25	2.75	2.25	2.5	2.5	2.5	2	2	2.25	2.25	2.25	-	-
HypDuk AAV	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	-

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

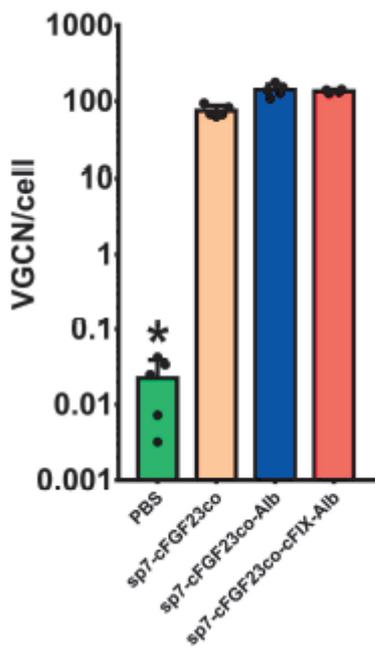
A



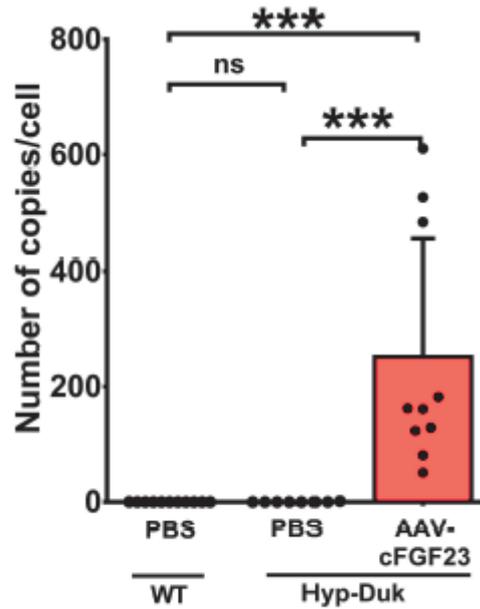
B



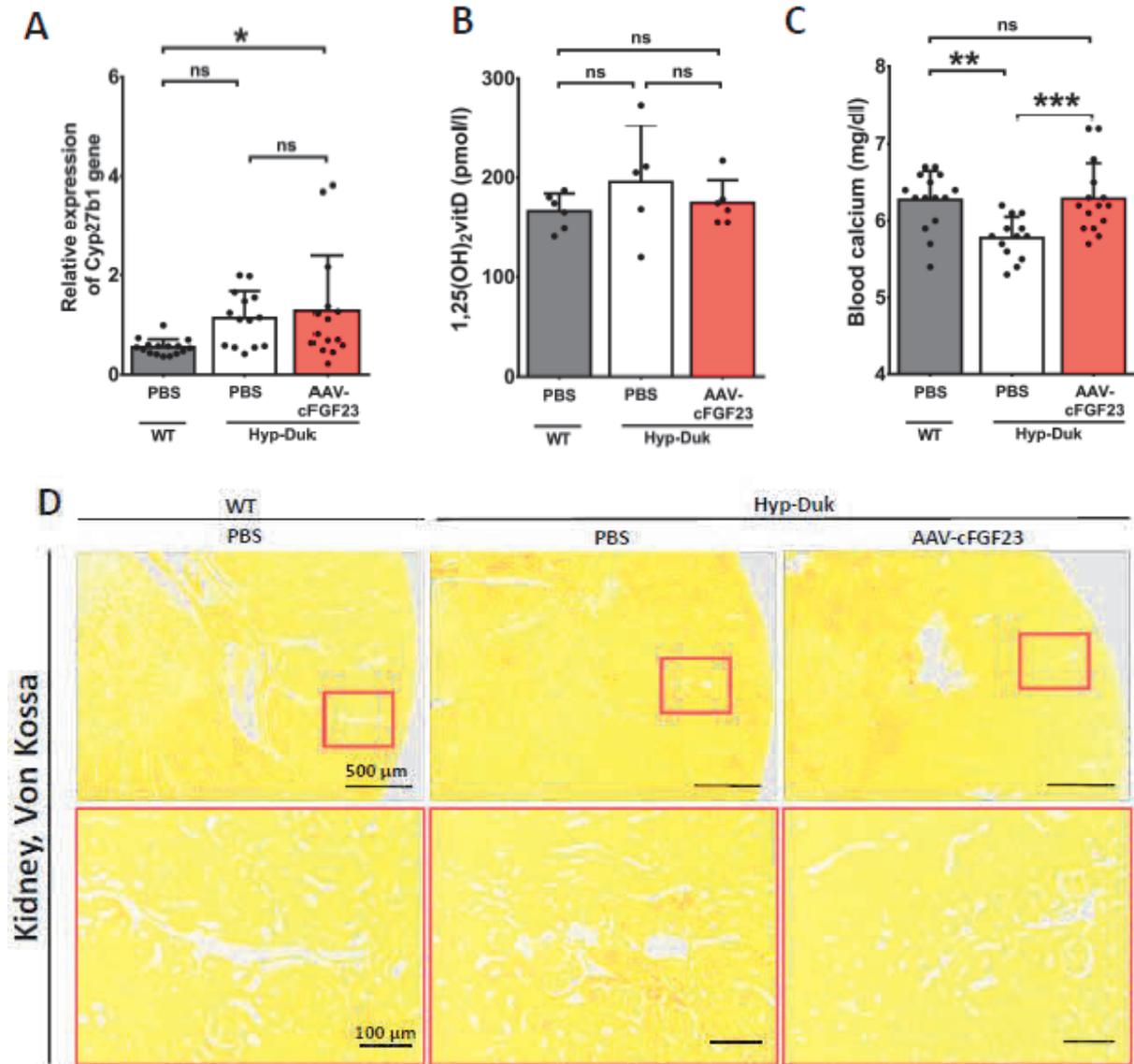
C



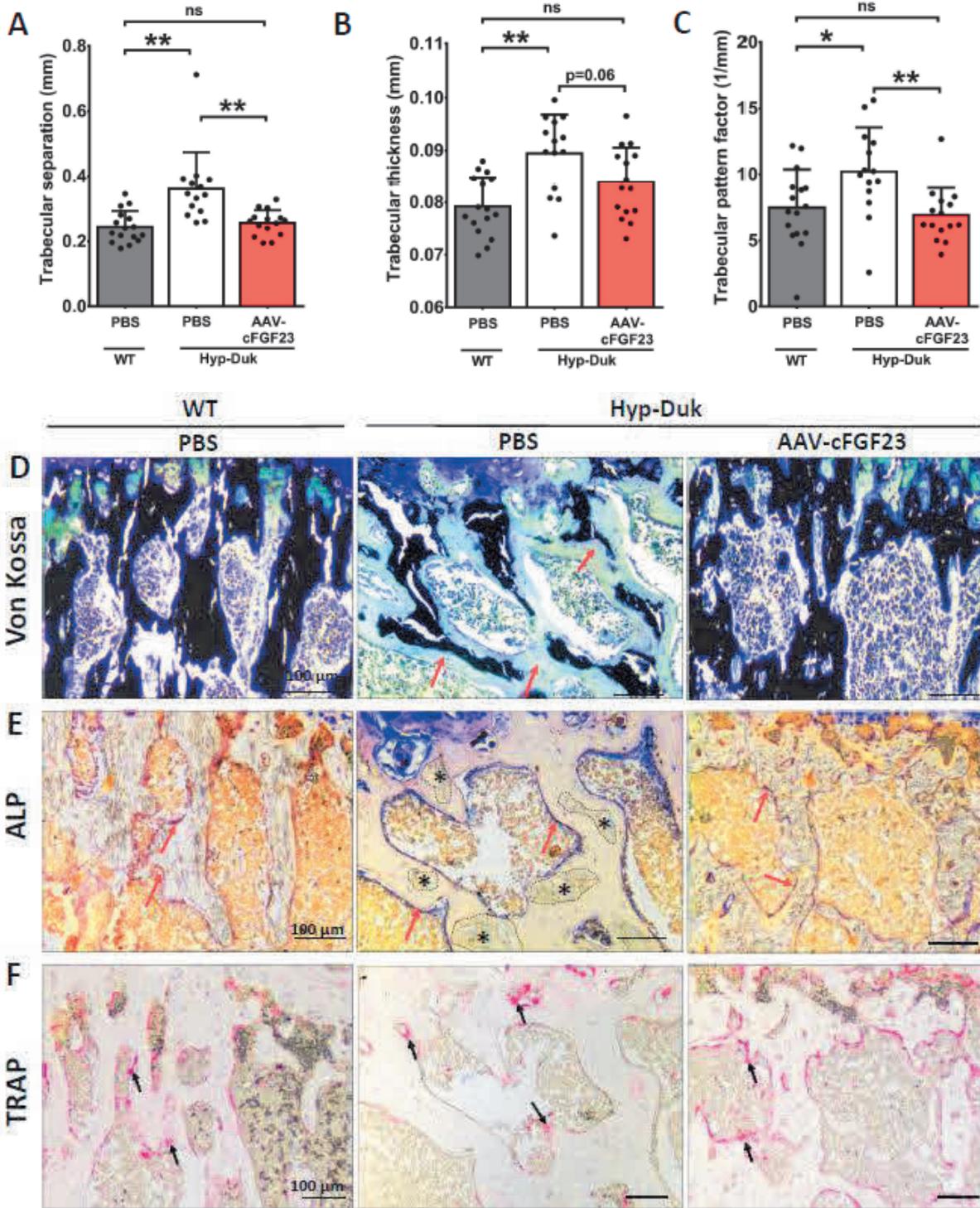
D



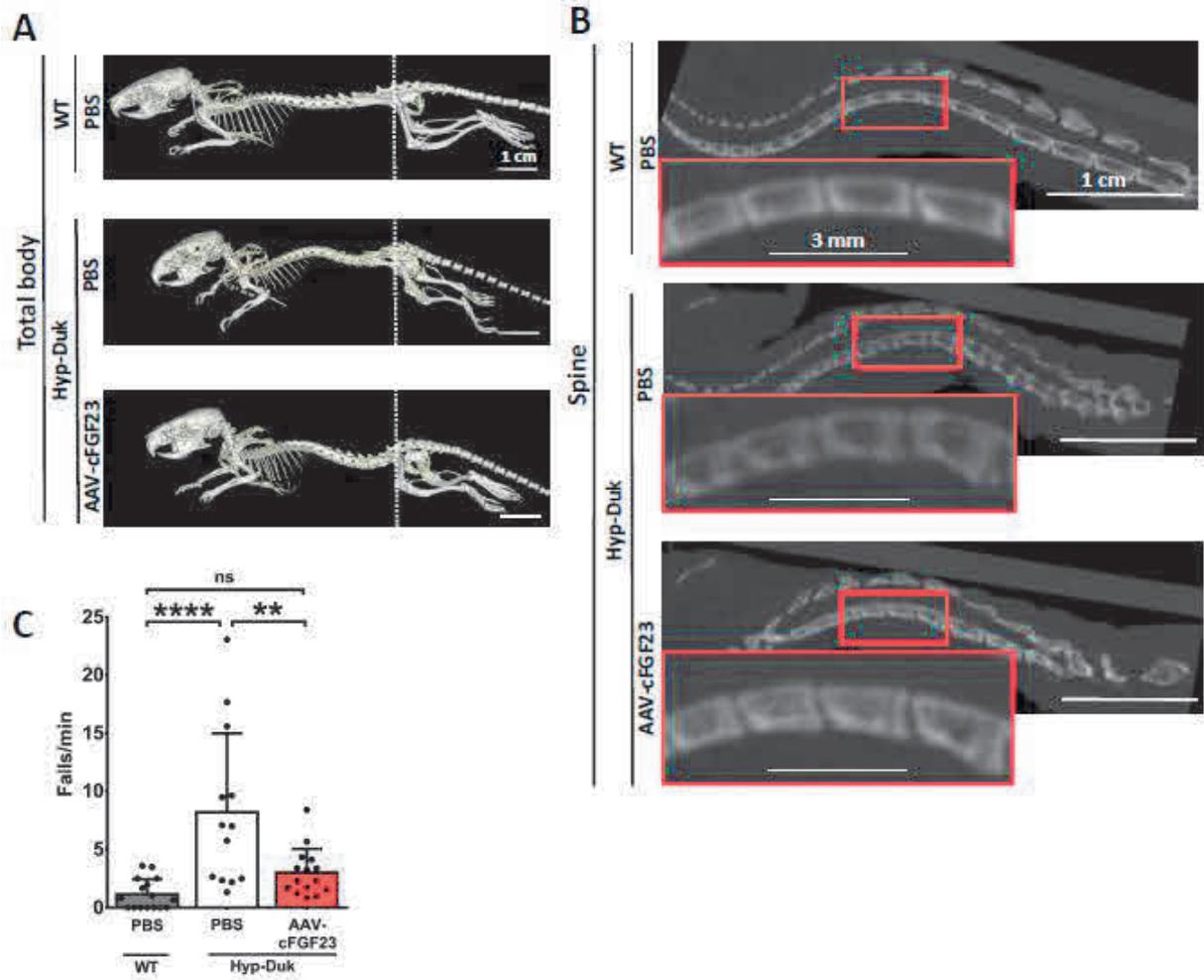
SUPPLEMENTARY FIGURE 2



SUPPLEMENTARY FIGURE 3



SUPPLEMENTARY FIGURE 4



CONCLUSION ET DISCUSSION

La thérapie génique ciblant le foie présente de nombreux intérêts pour le traitement de différentes maladies génétiques, en permettant l'expression d'un transgène exprimé par le foie dans le but de corriger une pathologie hépatique ou de cibler un autre tissu, après sécrétion dans la circulation sanguine. Cependant, le développement d'une stratégie de thérapie génique ciblant le foie peut se heurter à plusieurs difficultés aujourd'hui sans réponse. En effet, la transduction d'un foie dont la structure et/ou la fonction sont endommagées ou avec un fort potentiel prolifératif est potentiellement moins efficace que la transduction d'un foie sain. De plus, dans certaines pathologies, il sera nécessaire de cibler le foie mais aussi un autre tissu, comme les muscles ou les reins, qui sont des tissus plus difficilement transduits par les AAV.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé différentes stratégies de thérapie génique pour trois pathologies pour lesquelles ces problématiques se posent. En effet, la GSD Ia et la GSD III, sont deux maladies métaboliques qui conduisent respectivement à des foies stéatosiques ou fibrotiques, et qui nécessitent également la correction de la maladie dans les reins (GSD Ia) ou les muscles (GSD III). D'un autre côté, l'XLH est une maladie complexe et qui implique des organes, les os et les reins, qui sont peu accessibles aux vecteurs AAV.

A travers cette discussion, nous aborderons les différentes limites de la thérapie génique ciblant le foie et les solutions proposées pour améliorer son efficacité dans des pathologies complexes.

1. Atteinte hépatique et altérations du métabolisme conduisant au développement tumoral dans GSD Ia et GSD III

De façon intéressante, la caractérisation de la tumorigénèse chez les souris $Agl^{-/-}$ nous a permis de mettre en évidence que le développement de CHC dans la GSD III ne repose pas sur les mêmes bases moléculaires que dans la GSD Ia.

Dans la GSD Ia, l'atteinte hépatique se caractérise par une accumulation de glycogène et de lipides, mais sans développement associé d'une fibrose. L'absence de G6Pase conduit à une accumulation de G6P, responsable de l'activation de la lipogenèse *de novo* et du développement d'une stéatose hépatique. Les voies de la glycolyse (effet « Warburg-like ») et des pentoses-phosphate sont aussi activées, ce qui conduit à une augmentation de la synthèse des biomembranes, des nucléotides et des squelettes carbonés, nécessaires à la prolifération cellulaire. Ce métabolisme altéré, similaire à celui des cellules tumorales, conduit à une hausse de la réplication et des divisions cellulaires, et *in fine* à l'apparition de tumeurs⁷⁴. Il est intéressant de noter que plus de 75-80% des patients atteints de GSD I développent à l'âge adulte des tumeurs, généralement classées en AHC, mais avec un fort potentiel de transformation en CHC.

Dans la GSD III, l'absence de GDE conduit à l'accumulation d'un glycogène de structure anormale, la limite dextrine, et à une déplétion en G6P. Les faibles taux de G6P hépatiques ne conduisent pas au développement d'une stéatose, mais à une déplétion en glucose. Ces modifications métaboliques sont à l'origine du stress du réticulum endoplasmique que nous avons observé dans le foie des souris de 14 mois. Lors d'un stress du RE, la réponse aux protéines mal conformées (*unfolded protein response*, UPR) est activée afin de contrôler et diminuer ce stress. Si la cellule ne parvient pas à maîtriser le stress du RE, parce que les dommages sont trop importants, la réponse au stress du RE devient pathologique et l'activation chronique des voies de la réponse UPR peuvent conduire à une inflammation chronique, à l'apoptose des hépatocytes, et à l'activation des CSH conduisant à une fibrose^{160,161}.

De façon intéressante, l'atteinte hépatique dans la GSD III se caractérise par une inflammation du foie et le développement d'une fibrose, dont les premiers signes ont été observés dès l'âge de 3 mois chez les souris *Agl^{-/-}* (données non montrées). Nous avons caractérisé le développement de la fibrose hépatique à 14 mois, dû à l'activation de la voie TGF- β 1 qui pourrait être induite en réponse à l'inflammation. En effet, lors d'un phénomène inflammatoire, les leucocytes et les macrophages libèrent des cytokines et des facteurs de croissance dont le TGF- β . Une inflammation chronique conduit à une activation continue de la voie TGF- β , elle-même entraînant l'activation des cellules stellaires et la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire et à long-terme une fibrose^{3,8}.

De plus, de par leur rôle sur la balance entre survie et mort cellulaire, les voies de la réponse au stress du RE peuvent être impliquées dans la tumorigenèse. Les mutations de protéines impliquées dans la réponse au stress du RE ont été retrouvées dans de nombreux cancers¹⁶². En particulier, la translocation nucléaire du facteur de transcription activateur 6 (ATF6) a été décrite dans de nombreux cancers et notamment des CHC¹⁶³. Au sein des cellules des CHC, ATF6 régule l'expression des gènes du cycle cellulaire et de la prolifération et favorise le développement tumoral. Près de 30% des souris *Agl^{-/-}* ont développé des tumeurs à 14 mois. Ces tumeurs ont été majoritairement classées comme CHC et associées à une fibrose. Ce fort taux de tumorigenèse n'est pas retrouvé chez les patients atteints de GSD III puisque seuls 10 patients ayant développé un CHC ont été recensés dans le monde¹⁰⁵. Neuf d'entre eux présentaient une fibrose ou une cirrhose, et deux présentaient des AHC. L'étude d'une cohorte de patients a établi que 2 à 5% des patients GSD III âgés de 30 ans développent des CHC¹¹³. La différence de fréquence d'apparition des tumeurs entre notre modèle de souris *Agl^{-/-}* et les patients peut s'expliquer par la différence entre le modèle murin et la pathologie humaine, mais aussi par le fait que l'âge des patients ayant une GSD III (inférieur à 50 ans) est encore relativement jeune, en raison de la mise en place relativement récente (fin des années 80) de régimes alimentaires permettant d'éviter des hypoglycémies létales. La fréquence de tumeurs plus élevée dans le modèle murin de GSD III par rapport aux patients en fait un modèle intéressant pour étudier la tumorigenèse hépatique dans un foie fibrotique sans stéatose, pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la GSD III, et enfin pour évaluer les impacts d'approches de thérapie génique sur la tumorigenèse. En particulier, l'exploration des voies de la réponse UPR serait intéressante afin de décrire les signalisations de la tumorigenèse dans la GSD III, et pour envisager des traitements moléculaires.

Ainsi, alors que la séquence de tumorigenèse hépatique est caractérisée dans la GSD Ia par le développement d'une stéatose pure, sans fibrose, qui conduit à l'apparition d'AHC à fort potentiel de transformation en CHC^{70,85,164}, la tumorigenèse dans la GSD III est induite sur un foie fibrotique, voir cirrhotique, en l'absence de stéatose^{105,111,113,118}. La comparaison des mécanismes moléculaires dans ces deux pathologies devrait permettre de mieux comprendre le rôle respectif de la stéatose et de la fibrose dans la tumorigenèse hépatique.

2. Efficacité de la thérapie génique ciblant le foie dans un contexte de prolifération hépatique et de perte de l'expression du transgène au cours du temps

Les études précédentes de thérapie génique pour la GSD Ia ont mis en évidence une perte d'expression du transgène dans le foie avec le temps dans des modèles murins et canins d'inactivation totale du transgène^{77,79,95,97,98,156}. En effet, dans ces modèles, la survie des animaux nécessite un traitement précoce, avec une injection de rAAV dès les premières semaines de vie. A cet âge, le foie n'a pas atteint sa taille adulte et les hépatocytes sont en prolifération ce qui peut expliquer la perte du transgène. Pour maintenir l'efficacité du traitement, la réinjection de vecteurs AAV de sérotypes différents à plusieurs reprises a été nécessaire afin de prévenir les hypoglycémies qui sont létales dans ces modèles

animaux de GSD Ia. Cependant, cette stratégie est difficilement envisageable chez l'homme en raison de réponses immunitaires croisées entre les sérotypes, et les coûts associés au développement des différents produits pour des maladies rares.

En revanche, dans cette thèse, en utilisant le modèle de souris L.G6pc^{-/-} qui est un modèle dont la délétion du gène *G6pc* est induite après activation de la recombinase CRE^{ERT2} par le tamoxifène, le traitement par thérapie génique a été réalisé à l'âge adulte. Le traitement de souris adultes est primordial pour modéliser les conditions d'un essai clinique de thérapie génique qui impliquerait, au moins dans une première phase, des patients adultes. Nous avons mis en évidence une perte d'expression d'un gène rapporteur entre 6 et 9 mois après l'injection du vecteur AAV à une dose de $1,5 \times 10^{10}$ vg/souris, ce qui montre une perte d'expression probablement liée à la prolifération du foie en lien avec le métabolisme et le développement tumoral dans la GSD Ia. De façon intéressante, l'introduction de la G6Pase par un AAV9 a permis une correction complète de la glycémie à jeun pendant les 6 premiers mois chez des souris L.G6pc^{-/-} traitées à une dose de $2,5 \times 10^{11}$ vg/souris, soit environ 8×10^{12} vg/kg c'est-à-dire une dose dans le même ordre de grandeur que celle utilisée en clinique. En effet, ce traitement a permis de prévenir les hypoglycémies post-absorptives caractéristiques des souris L.G6pc^{-/-}, mais aussi l'accumulation de glycogène et l'hépatomégalie. De plus, en utilisant une cassette d'expression optimale pour l'expression hépatique³² permettant l'expression de niveaux physiologiques du transgène dans le foie, nous avons obtenu une correction à long-terme du phénotype hépatique dans des conditions accélérant les dommages hépatiques par un régime HF/HS, et la prévention de l'apparition de tumeurs. Nos résultats soulignent l'importance des études à long-terme pour la GSD Ia pour déterminer la stabilité ou non de l'efficacité du traitement au cours du temps. Une des clés de la thérapie génique ciblant le foie dans un contexte de prolifération comme celui de la GSD Ia semble être de corriger la maladie avec un rAAV, avant que l'atteinte et la prolifération hépatique ne soient trop sévères et qu'un vecteur AAV ne soit plus efficace. Il serait donc également intéressant d'évaluer notre approche chez des souris d'âges différents afin d'évaluer l'effet de la thérapie génique sur la guérison et/ou la prévention des manifestations de la pathologie.

Dans le cas de la GSD III, l'atteinte hépatique pourrait impacter l'efficacité de transduction du foie. En effet, dans des conditions de fibrose hépatique, le flux sanguin au sein du foie et les échanges entre hépatocytes et circulation sanguine sont diminués, ce qui pourrait réduire la quantité d'AAV atteignant les hépatocytes. Dans notre étude, nous avons montré que l'efficacité de transduction à court terme du foie était similaire entre les souris *Agl*^{-/-} et les souris *Agl*^{+/+} traitées par un vecteur AAV exprimant un gène rapporteur. Cependant, à long-terme, nous avons observé une perte d'expression du transgène dans les foies des souris *Agl*^{-/-}. En effet, l'expression du transgène est divisée par cinq 9 mois après l'injection du vecteur. La perte d'expression pourrait aussi être due à l'atteinte et à la prolifération hépatocytaire qui s'ensuit.

Dans ce contexte, nous pouvons nous demander quel est l'impact de la perte du transgène sur la pathologie hépatique à long-terme pour la GSD Ia et la GSD III. L'évaluation de la stabilité de l'expression du transgène est primordiale pour la GSD Ia et la GSD III, et tout autre pathologie dans laquelle le foie est prolifératif, mais également pour d'autres pathologies où le foie n'est pas affecté. En effet, de nombreuses pathologies, y compris les glycogénoses et l'XLH, se manifestent dès l'enfance et requièrent un traitement précoce. Or, en raison de l'effet de dilution des rAAV dans les foies en croissance, l'administration d'un traitement de thérapie génique à des patients dont le foie est encore immature peut conduire à une perte d'expression du transgène. Chez ces patients pédiatriques, des alternatives thérapeutiques pourraient être envisagées jusqu'à ce qu'ils puissent bénéficier de la thérapie génique. Par exemple, des traitements pharmacologiques ou des traitements basés sur les ARNm¹⁶⁵ ou des miRNA¹⁴¹ pourraient être associés au régime alimentaire suivi par ces patients, afin de

corriger la pathologie pendant les premières années de vie. Ce prétraitement permettrait aussi de freiner l'évolution du phénotype hépatique, afin que le foie soit plus « sain » et moins prolifératif avant d'injecter les vecteurs AAV, ce qui éviterait l'effet de dilution du transgène que nous avons mis en évidence dans les deux pathologies.

3. Stratégies pour augmenter l'efficacité de la thérapie génique : choix du promoteur et association thérapeutique

Une des stratégies pour augmenter l'efficacité de la thérapie génique dans un tissu est de jouer sur la cassette d'expression ou la codon-optimisation. La codon optimisation a été présentée comme une stratégie permettant une traduction facilitée et plus efficace. Dans nos études, la codon optimisation n'a pas apporté d'avantages par rapport aux versions sauvages des gènes. En revanche, notre étude montre clairement que l'efficacité de la thérapie génique est fortement liée au promoteur utilisé. Le choix du promoteur est basé sur sa spécificité d'activité tissulaire, auquel peuvent être ajoutées des séquences de régulation.

- Cas de la GSD Ia

La comparaison de différents promoteurs pour le traitement des souris GSD Ia nous a permis de montrer une efficacité supérieure du promoteur hépato-spécifique hAAT. Cette approche nous a permis de corriger le phénotype hépatique jusqu'à 6 mois après l'injection du vecteur et a également permis de prévenir l'apparition de tumeurs hépatiques. En revanche, l'utilisation du promoteur endogène humain hGPE ne permet pas de restaurer une activité G6Pase optimale pour prévenir l'apparition de tumeurs. Chez la souris, le variant murin du promoteur endogène mGPE semble légèrement plus efficace que son équivalent humain, ce qui pourrait être lié à la variabilité des mécanismes d'expression entre les deux espèces. Cependant le vecteur sous le contrôle du promoteur mGPE n'est pas aussi efficace que le vecteur sous le contrôle du promoteur hAAT puisque les niveaux d'activité G6Pase étaient plus faibles et il n'a pas permis la prévention du développement tumoral.

Ces approches sont très intéressantes car le vecteur sous le contrôle du promoteur hGPE qui a été utilisé dans les études précliniques récentes a certes permis une correction à long-terme du phénotype hépatique, mais n'a pas permis la prévention des tumeurs. Au contraire, dans notre étude, le nombre de tumeurs est augmentée chez les souris traitées avec ce vecteur par rapport aux souris traitées avec les vecteurs hAAT, et par rapport aux souris L.G6pc^{-/-} non traitées. L'activité G6Pase requise pour prévenir l'apparition de tumeurs dans les hépatocytes GSD Ia est sujet à controverse. En effet, Kim et al. ont démontré qu'une activité G6Pase supérieure à 3% de l'activité G6Pase wild-type permettait de prévenir l'apparition de tumeurs hépatiques¹⁰⁰. Dans notre étude, en moyenne, la correction d'au moins 30% de l'activité G6Pase de souris saines est suffisante pour corriger la glycémie, mais n'a pas permis de prévenir l'apparition de l'ensemble des tumeurs. De plus, dans une étude récente, une stratégie d'édition du génome permettant l'expression de la G6PC *via* un AAV n'a pas permis la prévention complète d'apparition des tumeurs¹⁶⁶. Dans cette expérience, les cellules tumorales présentaient une activité G6Pase beaucoup plus faible et un nombre de copies du vecteur plus faible que dans le tissu hépatique adjacent. Ces données suggèrent qu'en-dessous d'un certain seuil d'activité G6Pase ou d'un pourcentage minimum d'hépatocytes transduits, les cellules non transduites par les rAAV gardent leur potentiel de transformation en cellules tumorales¹⁶⁶.

Certaines publications ont également établi des liens entre AAV et développement tumoral. En effet, plusieurs équipes ont décrit des événements d'intégration de l'AAV dans le génome des cellules hôtes dans un contexte de recherche préclinique. En 2015, Chandler et al. ont montré que

l'intégration de vecteurs AAV dans le génome des cellules hôtes, au niveau du locus *Rian*, conduit au développement de CHC entre 18 à 22 mois après l'injection des vecteurs à une dose comprise entre 7×10^{12} et 1×10^{14} vg/kg. Le développement de ces CHC suite à l'intégration de l'AAV varie selon le promoteur utilisé. En effet, l'utilisation de vecteurs sous le contrôle du promoteur CBA et du promoteur de la globuline liant la thyroxine (TBG) a été associée à un développement tumoral alors qu'aucune tumeur n'a été observée avec le promoteur hAAT¹⁶⁷. Dans une seconde étude réalisée dans le modèle murin de la maladie de Sandhoff, une large majorité de souris injectées avec un AAV contenant le promoteur CMV à une forte dose de $2,5 \times 10^{14}$ vg/kg ont développé des tumeurs en moins d'un an. Les études d'intégration ont montré des insertions des rAAV dans le même locus *Rian*¹⁶⁸. Enfin, Donsante et al. ont également décrit l'augmentation de la fréquence des CHC chez des souris injectées avec des AAV, avec des intégrations également dans le locus *Rian*¹⁶⁹. A noter, toutes les souris avaient été injectées à quelques jours de vie¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Par ailleurs, Nguyen et al. ont récemment décrit l'insertion de vecteurs AAV dans le modèle canin de l'hémophilie A, dix ans après l'injection des vecteurs codant pour le facteur de coagulation VIII sous le contrôle du promoteur hAAT ou du promoteur TBG. Cependant, aucun chien n'a développé de tumeurs. Dans cette étude, les intégrations du transgène comportant le promoteur hAAT ont été identifiées au niveau de gènes impliqués dans des processus de transformation maligne¹⁷⁰.

De plus, une publication a rapporté l'insertion d'AAV2 sauvage dans 11 biopsies de CHC humain sur 193 analysés. L'intégration du génome de l'AAV sauvage s'est produit au niveau de gènes impliqués dans le développement tumoral. Ces intégrations ont eu lieu dans des foies ne présentant pas de cirrhose (9 cas sur les 11) ni de facteur de risque (6 cas sur les 11)¹⁷¹. La quasi-absence de cirrhose suggère que l'insertion de l'AAV2 sauvage pourrait être la cause du développement de CHC chez ces patients¹⁷².

Enfin, en décembre 2020, uniQure a annoncé qu'un patient inclus dans un essai clinique pour l'hémophilie B a développé une tumeur hépatique, un CHC, un an après l'injection du vecteur AAV. Le patient présentait de multiples facteurs de risques associés au développement de CHC, y compris une hépatite C depuis 25 ans (infection au virus de l'hépatite C), une infection au virus de l'hépatite B, une stéatose hépatique non alcoolique et un âge avancé. Des investigations sont en cours afin de déterminer le rôle de l'AAV dans l'apparition du CHC.

Ainsi, l'intégration des rAAV semble associée au développement tumoral uniquement chez des souris injectées à quelques jours de vie. A cet âge, les hépatocytes prolifèrent car le foie est en pleine croissance, ce qui pourrait expliquer les événements d'intégration.

Or, comme nous l'avons décrit dans cette thèse, les foies GSD Ia et GSD III se caractérisent par un contexte métabolique favorisant la prolifération des hépatocytes⁸⁵. Ainsi, l'intégration des rAAV pourrait être favorisée dans ce contexte et pourrait expliquer le développement tumoral plus important avec certains vecteurs, notamment avec le vecteur AAV9-hGPE-hG6PC, utilisé pour traiter les souris *L.G6pc^{-/-}*, et dont l'efficacité de correction de la pathologie était inférieure. Il est donc essentiel d'analyser les éventuelles intégrations des vecteurs dans le génome de l'hôte, à la fois en caractérisant le locus d'intégration mais aussi la séquence intégrée (complète ou partielle), dans les échantillons de tumeurs GSD I traitées avec les rAAV. Ainsi, nous pourrions établir si le vecteur hGPE a un locus d'intégration préférentiel lié au développement tumoral, avec ou sans expansion clonale des cellules éditées, qui pourrait expliquer l'augmentation du nombre de tumeurs. Ces analyses sont nécessaires afin d'estimer le risque génotoxique du vecteur hGPE, dans un contexte de foie GSD Ia endommagé et en prolifération. Sur le même sujet, Dalwadi et al. ont récemment démontré chez la souris que la transduction par un AAV d'un foie adulte atteint de stéatohépatite non alcoolique ou

dans des conditions de forte prolifération entraîne l'apparition de CHC chez 50% des souris, contre aucune tumeurs dans les foies sains¹⁷³.

Ainsi, ces résultats mettent en avant l'importance du choix du promoteur pour le développement de vecteurs AAV d'une manière générale, et en particulier dans le cadre de pathologies où le foie est endommagé et/ou prolifératif.

Finalement, notre stratégie utilisant le promoteur hAAT est très prometteuse pour le traitement du phénotype hépatique de la GSD Ia, mais elle ne permet pas de cibler efficacement les reins (données non montrées). La pathologie rénale dans la GSD Ia est également sévère, et cet aspect de la maladie ne doit pas être négligé. Des stratégies pour cibler les reins sont nécessaires afin de traiter tous les aspects cliniques de la pathologie. Par exemple, il serait intéressant de modifier la capsid des AAV pour augmenter le tropisme rénal. Les promoteurs endogènes hGPE et mGPE ont un intérêt dans ce contexte. En effet, en plus de pouvoir permettre en théorie le maintien d'une régulation dans le foie de la production de glucose par les hormones comme l'insuline et le glucagon, selon la prise alimentaire, ils pourraient être efficaces dans les reins. En attendant d'obtenir ces vecteurs, il est préférable d'un point de vue clinique de cibler le foie efficacement et durablement pour éviter le développement tumoral. Nous proposons donc d'évaluer l'efficacité de notre approche avec un vecteur AAV8, car ce sérotype est considéré à l'heure actuelle comme le plus efficace pour cibler le foie. De plus, Zhang et al. ont récemment montré qu'une version mutée de la G6PC permet d'obtenir une meilleure activité G6Pase que la version sauvage du gène⁸¹. Ces approches sont intéressantes à évaluer afin d'augmenter encore l'efficacité de notre vecteur AAV candidat dans le foie, en vue d'un développement clinique.

- Cas de la GSD III

Dans le cadre de la GSD III, plusieurs tissus sont affectés. Dans ce contexte, nous avons utilisé un promoteur tandem hépatique et musculaire, le promoteur LiMP³⁴, afin d'obtenir une transduction du foie, du cœur et des muscles squelettiques. Nous avons évalué le potentiel de ce promoteur dans notre modèle murin de la GSD III en association avec un traitement à la rapamycine, une molécule approuvée par les instances sanitaires de régulation. La rapamycine est intéressante pour le traitement de la GSD III. Tout d'abord, administrée quotidiennement à une dose de 1mg/kg chez le modèle canin de la GSD III (de 2 à 16 mois), elle a permis de corriger l'accumulation de glycogène dans le foie et la fibrose hépatique¹²². De plus, la rapamycine active l'autophagie, ce qui est favorable dans le contexte de thérapie génique puisqu'il a été montré que l'induction de l'autophagie augmente la transduction hépatique des vecteurs AAV chez la souris et chez le primate¹⁴⁴. Enfin, la rapamycine est un immunosuppresseur et son administration permet donc de diminuer la réponse immunitaire liée à l'injection d'un vecteur AAV.

De façon surprenante, le prétraitement à la rapamycine n'a pas apporté d'avantage dans le foie des souris $Agl^{-/-}$, contrairement à ce qui avait été décrit chez le primate¹⁴⁴. Cette différence pourrait s'expliquer par les différences dans les protocoles expérimentaux. En effet, Hösel et al. ont injecté des primates non malades, avec une dose unique de rapamycine concomitante à celle de l'AAV. De plus, notre vecteur AAV seul a permis de corriger le foie et le cœur à des niveaux similaires à ceux des souris saines non traitées. Il est donc probable que l'ajout de la rapamycine en co-traitement n'est peut-être tout simplement pas visible car l'AAV seul permet une normalisation des paramètres étudiés. Une possibilité afin d'étudier l'effet du co-traitement rapamycine sur le foie serait de réaliser le même protocole avec une dose d'AAV plus faible, afin de pouvoir mettre en évidence un effet de la rapamycine dans le foie et le cœur. De façon intéressante, cette stratégie a permis d'augmenter l'efficacité de la thérapie génique dans les muscles squelettiques, grâce à un effet synergique de la

rapamycine et de l'AAV dans notre modèle de GSD III. En effet, l'association thérapeutique AAV-rapamycine a permis de corriger l'accumulation de glycogène dans le triceps et le quadriceps à des niveaux similaires à ceux des souris $Agl^{+/+}$, alors que le traitement par les vecteurs rAAV seuls était moins efficace. Ce co-traitement est prometteur pour le traitement de la GSD III, car il permet d'augmenter l'efficacité de la thérapie génique sans augmenter la dose d'AAV.

Finalement, l'analyse de la réponse immunitaire n'a pas permis de conclure que la meilleure efficacité dans les muscles était due à une inhibition de la réponse immunitaire. Il est possible que l'effet de la rapamycine soit lié au métabolisme, et que cet effet ne soit visible que dans les muscles squelettiques car ils sont moins bien transduits par les rAAV que le foie et le cœur. Cet aspect est à explorer dans notre modèle.

Cette association thérapeutique incluant un pré-traitement à la rapamycine serait donc intéressante pour la GSD III. En plus de son action immunosuppressive qui permettrait de réduire les éventuelles réponses cytotoxiques contre la capsid du vecteur, elle présente l'intérêt de pouvoir réduire les doses d'AAV nécessaires pour traiter les muscles, ce qui est un grand avantage pour le développement clinique d'un traitement de thérapie génique pour GSD III.

4. Utilisation du foie comme bio-usine pour le traitement de l'hypophosphatémie liée au chromosome X

Contrairement aux stratégies développées pour traiter la GSD Ia et la GSD III, notre approche de traitement de l'XLH ne vise pas à réintroduire la protéine déficiente PHEX, mais à contrer les effets nocifs du FGF-23 qui est surexprimé par les os et produit dans la circulation générale. Cette approche est tout à fait innovante et originale. Ainsi, nous avons pu établir une preuve de concept pour le traitement de l'XLH par thérapie génique grâce à l'expression par le foie d'une protéine agissant comme un compétiteur du FGF-23.

Cette approche a permis de corriger la principale manifestation de l'XLH : l'ostéomalacie, c'est-à-dire le défaut minéralisation des tissus osseux. Le cFGF-23 agit par compétition avec le FGF-23 endogène pour la fixation sur son récepteur au niveau rénal, contrant ainsi les effets du FGF-23 c'est-à-dire la fuite du phosphate dans les urines et une hypophosphatémie. L'augmentation de la phosphatémie permet de corriger le défaut de minéralisation. En corrigeant l'ostéomalacie osseuse dans notre modèle d'XLH, nous avons obtenu une correction partielle de la taille et du poids des souris, et une correction de leur croissance. Cette stratégie est donc efficace pour le traitement de l'XLH. En vue de son développement clinique, un des paramètres importants à définir est l'âge d'administration du traitement. En effet, comme nous l'avons déjà décrit, l'administration des vecteurs AAV dans un foie en prolifération importante risque de réduire l'efficacité du traitement⁹⁹. D'un point de vue clinique, une possibilité pourrait être de traiter les enfants par l'anticorps Burosumab (Crysvita[®]) jusqu'à un âge où ils pourraient être traités par une injection d'AAV-cFGF-23. Nous n'avons pas conduit d'études de comparaison entre le Burosumab et notre vecteur AAV, mais la thérapie génique présente l'avantage de ne nécessiter qu'une unique injection, au lieu d'injections répétées tous les 15 jours pour l'anticorps.

Suite à l'établissement de cette preuve de concept pour traiter l'XLH, il reste cependant des défis à relever pour évaluer l'efficacité de cette approche à long-terme, et pour utiliser des doses adaptées aux essais cliniques. En effet, cette étude a été réalisée avec une dose de 1×10^{12} vg/souris, ce qui représente une dose de 1×10^{14} vg/kg, dose qui est élevée dans le cadre d'un développement clinique. Cependant, la séquence du cFGF-23 utilisé dans notre étude est la forme humaine alors qu'elle est peu

conservée entre l'homme et la souris (66% d'identité de séquence). Ceci peut expliquer une diminution probable de la liaison du cFGF-23 humain au récepteur murin du FGF-23. Afin de définir une dose minimale efficace, des études sont nécessaires chez des espèces avec un pourcentage d'homologie plus élevé, comme le primate (95% d'identité). Une autre notion intéressante est le traitement de patients adultes. Nous avons vu que la fenêtre thérapeutique est importante dans l'XLH, mais tous les patients affectés ne sont plus dans les limites de cette fenêtre. Aussi, il serait intéressant d'étudier l'effet de notre vecteur chez des souris plus âgées avec pour objectif la prévention des complications à long-terme. En effet, chez les patients adultes, il ne sera plus possible de corriger la croissance et la stature, mais les complications telles que les fractures à répétition et les douleurs osseuses et musculaires pourraient être prévenues ou réduites, ce qui présenterait un gain considérable en termes de qualité de vie.

En conclusion, nous avons tiré parti des avantages de la thérapie génique ciblant le foie dans le cadre de pathologies non hépatiques ou non restreintes au foie. Nous avons développé trois approches de thérapie génique pour trois pathologies génétiques rares, en adaptant nos stratégies pour répondre au contexte physiopathologique et aux spécificités de chaque pathologie. Dans la GSD Ia, l'utilisation d'un promoteur hépatique nous a permis d'obtenir une correction à long-terme du phénotype hépatique et la réduction de la fréquence des tumeurs. Dans la GSD III, nous avons obtenu une correction du phénotype hépatique et du cœur en utilisant un promoteur hybride foie-muscles. De plus, l'association de cette approche avec un traitement par la rapamycine a permis une meilleure efficacité de l'AAV dans les muscles squelettiques pour la GSD III. Dans une perspective clinique, il serait intéressant d'évaluer l'association de la rapamycine avec un unique vecteur AAV permettant l'expression de GDE. Enfin, notre stratégie pour l'XLH est la première à notre connaissance à agir sur la surexpression d'un facteur circulant pour traiter une maladie osseuse. En ciblant le foie, nous avons pu agir au niveau rénal et corriger le défaut de minéralisation des os. Cette technologie ouvre ainsi la voie au traitement d'autres pathologies osseuses caractérisées par une surexpression d'un facteur circulant.

En somme, les avantages de cibler le foie avec AAV sont tels que la thérapie génique ciblant le foie ne peut pas se restreindre à des pathologies uniquement hépatiques, mais pourrait être exploitée pour des pathologies extra-hépatiques.

REFERENCES

1. Puzzo, F. *et al.* Rescue of Pompe disease in mice by AAV-mediated liver delivery of secretable acid α -glucosidase. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
2. Furger, A., Binnie, J. M. O., Alexandra, Lee, B. A. & Proudfoot, N. J. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* **16**, 2792–2799 (2002).
3. Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **6**, 425–456 (2011).
4. Hijmans, B. S., Grefhorst, A., Oosterveer, M. H. & Groen, A. K. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. *Biochimie* **96**, 121–129 (2014).
5. Postic, C. & Girard, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab.* **34**, 643–648 (2008).
6. Mithieux, G., Rajas, F., Gautier-Stein, A. & Soty, M. Adaptation of Hepatic, Renal, and Intestinal Gluconeogenesis During Food Deprivation. in *Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation: From Biology to Policy* (eds. Preedy, V. R. & Patel, V. B.) 2133–2147 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-319-55387-0_37.
7. Soty, M., Gautier-Stein, A., Rajas, F. & Mithieux, G. Gut-Brain Glucose Signaling in Energy Homeostasis. *Cell Metab.* **25**, 1231–1242 (2017).
8. Bedossa, P. & Paradis, V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J. Pathol.* **200**, 504–515 (2003).
9. Flotte, T. R. & Berns, K. I. Adeno-Associated Virus: A Ubiquitous Commensal of Mammals. *Hum. Gene Ther.* **16**, 401–407 (2005).
10. Hermonat, P. L., Labow, M. A., Wright, R., Berns, K. I. & Muzyczka, N. Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J. Virol.* **51**, 329–339 (1984).
11. Mah, C. S. *et al.* Adeno-Associated Virus–Mediated Gene Therapy for Metabolic Myopathy. *Hum. Gene Ther.* **24**, 928–936 (2013).
12. Boutin, S. *et al.* Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum. Gene Ther.* **21**, 704–712 (2010).
13. Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J. & Wilson, J. M. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J. Infect. Dis.* **199**, 381–390 (2009).
14. Srivastava, A., Lusby, E. W. & Berns, K. I. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* **45**, 555–564 (1983).
15. Cassinotti, P., Weitzand, M. & Tratschin, J. D. Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein. *Virology* **167**, 176–184 (1988).
16. Tratschin, J. D., Miller, I. L. & Carter, B. J. Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J. Virol.* **51**, 611–619 (1984).
17. Yan, Z., Zak, R., Zhang, Y. & Engelhardt, J. F. Inverted Terminal Repeat Sequences Are Important for Intermolecular Recombination and Circularization of Adeno-Associated Virus Genomes. *J. Virol.* **79**, 364–379 (2005).
18. Ogden, P. J., Kelsic, E. D., Sinai, S. & Church, G. M. Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. *Science* **366**, 1139–1143 (2019).
19. Surosky, R. T. *et al.* Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J. Virol.* **71**, 7951–7959 (1997).

20. Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 11288–11294 (1996).
21. Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R., Kotin, R. M. & Owens, R. A. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5808–5812 (1994).
22. Daya, S. & Berns, K. I. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 583–593 (2008).
23. Kotin, R. M. *et al.* Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2211–2215 (1990).
24. Kotin, R. M., Linden, R. M. & Berns, K. I. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* **11**, 5071–5078 (1992).
25. Straus, S. E., Sebring, E. D. & Rose, J. A. Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 742–746 (1976).
26. Duan, D. *et al.* Circular Intermediates of Recombinant Adeno-Associated Virus Have Defined Structural Characteristics Responsible for Long-Term Episomal Persistence in Muscle Tissue. *J. Virol.* **72**, 8568–8577 (1998).
27. Duan, D., Yan, Z., Yue, Y. & Engelhardt, J. F. Structural analysis of a adeno-associated virus transduction circular intermediates. *Virology* **261**, 8–14 (1999).
28. Srivastava, A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* **21**, 75–80 (2016).
29. Manno, C. S. *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* **12**, 342–347 (2006).
30. Nathwani, A. C. *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2357–2365 (2011).
31. Nathwani, A. C. *et al.* Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1994–2004 (2014).
32. Collaud, F. *et al.* Preclinical Development of an AAV8-hUGT1A1 Vector for the Treatment of Crigler-Najjar Syndrome. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **12**, 157–174 (2019).
33. Demaster, A. *et al.* Long-term efficacy following readministration of an adeno-associated virus vector in dogs with glycogen storage disease type Ia. *Hum. Gene Ther.* **23**, 407–418 (2012).
34. Colella, P. *et al.* AAV Gene Transfer with Tandem Promoter Design Prevents Anti-transgene Immunity and Provides Persistent Efficacy in Neonate Pompe Mice. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **12**, 85–101 (2019).
35. Jiang, H. *et al.* Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **14**, 452–455 (2006).
36. Kay, M. A. *et al.* Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* **24**, 257 (2000).
37. Lee, Y. M. *et al.* Long-term safety and efficacy of AAV gene therapy in the canine model of glycogen storage disease type Ia. *J. Inherit. Metab. Dis.* **41**, 977–984 (2018).
38. Sabatino, D. E. *et al.* Efficacy and Safety of Long-term Prophylaxis in Severe Hemophilia A Dogs Following Liver Gene Therapy Using AAV Vectors. *Mol. Ther.* **19**, 442–449 (2011).
39. Calne, R. Y. *et al.* Induction of Immunological Tolerance by Porcine Liver Allografts. *Nature* **223**, 472 (1969).

40. Houssin, D. *et al.* Specific transplantation tolerance induced by spontaneously tolerated liver allograft in inbred strains of rats. *Transplantation* **29**, 418–419 (1980).
41. Opelz, G., Wujciak, T., Döhler, B., Scherer, S. & Mytilineos, J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev. Immunogenet.* **1**, 334–342 (1999).
42. Rasmussen, A., Davies, H. F., Jamieson, N. V., Evans, D. B. & Calne, R. Y. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation* **59**, 919–921 (1995).
43. Dobrzynski, E. Induction of antigen-specific CD4+ T-cell anergy and deletion by in vivo viral gene transfer. *Blood* **104**, 969–977 (2004).
44. Cao, O. *et al.* Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood* **110**, 1132–1140 (2007).
45. Poupiot, J. *et al.* Role of Regulatory T Cell and Effector T Cell Exhaustion in Liver-Mediated Transgene Tolerance in Muscle. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **15**, 83–100 (2019).
46. Wang, L. *et al.* In Vivo Gene Transfer Strategies to Achieve Partial Correction of von Willebrand Disease. *Hum. Gene Ther.* **23**, 576–588 (2012).
47. Monteilhet, V. *et al.* A 10 patient case report on the impact of plasmapheresis upon neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 6, and 8. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **19**, 2084–2091 (2011).
48. Leborgne, C. *et al.* IgG-cleaving endopeptidase enables in vivo gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **26**, 1096–1101 (2020).
49. Ashkar, A. A. & Rosenthal, K. L. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr. Mol. Med.* **2**, 545–556 (2002).
50. Mingozi, F. *et al.* CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* **13**, 419–422 (2007).
51. Li, Y. *et al.* Bat adeno-associated viruses as gene therapy vectors with the potential to evade human neutralizing antibodies. *Gene Ther.* (2019) doi:10.1038/s41434-019-0081-8.
52. Büning, H. & Srivastava, A. Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **12**, 248–265 (2019).
53. Chamberlain, K., Riyad, J. M. & Weber, T. Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Hum. Gene Ther. Methods* **27**, 1–12 (2016).
54. Sun, L., Li, J. & Xiao, X. Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat. Med.* **6**, 599–602 (2000).
55. Yan, Z. *et al.* A novel chimeric adeno-associated virus 2/human bocavirus 1 parvovirus vector efficiently transduces human airway epithelia. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **21**, 2181–2194 (2013).
56. Ghosh, A., Yue, Y., Lai, Y. & Duan, D. A Hybrid Vector System Expands Adeno-associated Viral Vector Packaging Capacity in a Transgene-independent Manner. *Mol. Ther.* **16**, 124–130 (2008).
57. Trapani, I. *et al.* Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol. Med.* **6**, 194–211 (2014).
58. Lostal, W. *et al.* Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1897–1907 (2010).
59. Sondergaard, P. C. *et al.* AAV-Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2**, 256–270 (2015).

60. Halbert, C. L., Allen, J. M. & Miller, A. D. Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene. *Nat. Biotechnol.* **20**, 697–701 (2002).
61. Flotte, T. R. *et al.* Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J. Biol. Chem.* **268**, 3781–3790 (1993).
62. Ghosh, A., Yue, Y. & Duan, D. Viral serotype and the transgene sequence influence overlapping adeno-associated viral (AAV) vector-mediated gene transfer in skeletal muscle. *J. Gene Med.* **8**, 298–305 (2006).
63. Chen, Y. H., Keiser, M. S. & Davidson, B. L. Adeno-Associated Virus Production, Purification, and Titering. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **8**, e56 (2018).
64. Grieger, J. C. & Samulski, R. J. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **99**, 119–145 (2005).
65. Mingozi, F. *et al.* Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Sci. Transl. Med.* **5**, 194ra92 (2013).
66. Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C. & Ameneiros-Rodríguez, E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* **5**, 85–100 (2016).
67. Rajas, F., Gautier-Stein, A. & Mithieux, G. Glucose-6 Phosphate, A Central Hub for Liver Carbohydrate Metabolism. *Metabolites* **9**, (2019).
68. Soty, M. *et al.* New insights into the organisation and intracellular localisation of the two subunits of glucose-6-phosphatase. *Biochimie* **94**, 695–703 (2012).
69. Di Mauro, S. Muscle glycogenoses: an overview. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* **26**, 35–41 (2007).
70. Kishnani, P. S. *et al.* Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **16**, e1 (2014).
71. Chou, J. Y. & Mansfield, B. C. Mutations in the Glucose-6-Phosphatase- α (G6PC) Gene that Cause Type Ia Glycogen Storage Disease. *Hum. Mutat.* **29**, 921–930 (2008).
72. Beyzaei, Z. & Geramizadeh, B. Molecular diagnosis of glycogen storage disease type I: a review. *EXCLI J.* **18**, 30–46 (2019).
73. Rake, J. *et al.* Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSDI). *Eur. J. Pediatr.* **161**, S20–S34 (2002).
74. Gjorgjieva, M. *et al.* Progressive development of renal cysts in glycogen storage disease type I. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 3784–3797 (2016).
75. Perry, A. *et al.* Papillary renal cell carcinoma in two young adults with glycogen storage disease type Ia. *JIMD Rep.* **52**, 17–22 (2020).
76. Monteillet, L. *et al.* Intracellular lipids are an independent cause of liver injury and chronic kidney disease in non alcoholic fatty liver disease-like context. *Mol. Metab.* **16**, 100–115 (2018).
77. Ghosh, A. *et al.* Long-term correction of murine glycogen storage disease type Ia by recombinant adeno-associated virus-1-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **13**, 321–329 (2006).
78. Yiu, W. H. *et al.* Complete Normalization of Hepatic G6PC Deficiency in Murine Glycogen Storage Disease Type Ia Using Gene Therapy. *Mol. Ther.* **18**, 1076–1084 (2010).
79. Weinstein, D. A. *et al.* Adeno-associated virus-mediated correction of a canine model of glycogen storage disease type Ia. *Hum. Gene Ther.* **21**, 903–910 (2010).

80. Lee, Y. M. *et al.* Prevention of hepatocellular adenoma and correction of metabolic abnormalities in murine glycogen storage disease type Ia by gene therapy. *Hepatol. Baltim. Md* **56**, 1719–1729 (2012).
81. Zhang, L. *et al.* Gene therapy using a novel G6PC-S298C variant enhances the long-term efficacy for treating glycogen storage disease type Ia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **527**, 824–830 (2020).
82. Weinstein, D. A., in IGSD 2019, Porto Alegre, Brazil, 2019. in.
83. Derks, T., Positive cohort 1 results from the phase 1/2, AAV8-mediated liver-directed gene therapy trial in glycogen storage disease type Ia (GSDIa). in SSEIM, Rotterdam, 2019. in.
84. Waskowicz, L. R. *et al.* Bezafibrate induces autophagy and improves hepatic lipid metabolism in glycogen storage disease type Ia. *Hum. Mol. Genet.* **28**, 143–154 (2019).
85. Gjorgjieva, M. *et al.* Dietary exacerbation of metabolic stress leads to accelerated hepatic carcinogenesis in glycogen storage disease type Ia. *J. Hepatol.* **69**, 1074–1087 (2018).
86. Clar, J. *et al.* Targeted deletion of kidney glucose-6 phosphatase leads to nephropathy. *Kidney Int* **86**, 747–756 (2014).
87. Almodóvar-Payá, A. *et al.* Preclinical Research in Glycogen Storage Diseases: A Comprehensive Review of Current Animal Models. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
88. Lei, K.-J. *et al.* Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse. *Nat. Genet.* **13**, 203–209 (1996).
89. Brix, A. E. *et al.* Glycogen Storage Disease Type Ia in Two Littermate Maltese Puppies. *Vet. Pathol.* **32**, 460–465 (1995).
90. Kishnani, P. S. *et al.* Isolation and nucleotide sequence of canine glucose-6-phosphatase mRNA: identification of mutation in puppies with glycogen storage disease type Ia. *Biochem. Mol. Med.* **61**, 168–177 (1997).
91. Kishnani, P. S. *et al.* Canine Model and Genomic Structural Organization of Glycogen Storage Disease Type Ia (GSD Ia). *Vet. Pathol.* **38**, 83–91 (2001).
92. Mutel, E. *et al.* Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *J. Hepatol.* **54**, 529–537 (2011).
93. Targeted deletion of kidney glucose-6 phosphatase leads to nephropathy. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5678048/>.
94. Progressive development of renal cysts in glycogen storage disease type I | Human Molecular Genetics | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/hmg/article/25/17/3784/2525836>.
95. Beaty, R. M. *et al.* Delivery of glucose-6-phosphatase in a canine model for glycogen storage disease, type Ia, with adeno-associated virus (AAV) vectors. *Gene Ther.* **9**, 1015–1022 (2002).
96. Koeberl, D. D. *et al.* AAV Vector-mediated Reversal of Hypoglycemia in Canine and Murine Glycogen Storage Disease Type Ia. *Mol. Ther.* **16**, 665–672 (2008).
97. Koeberl, D. D. *et al.* Early, sustained efficacy of adeno-associated virus vector-mediated gene therapy in glycogen storage disease type Ia. *Gene Ther.* **13**, 1281–1289 (2006).
98. Luo, X. *et al.* Hepatorenal Correction in Murine Glycogen Storage Disease Type I With a Double-stranded Adeno-associated Virus Vector. *Mol. Ther.* **19**, 1961–1970 (2011).
99. Cunningham, S. C., Dane, A. P., Spinoulas, A. & Alexander, I. E. Gene Delivery to the Juvenile Mouse Liver Using AAV2/8 Vectors. *Mol. Ther.* **16**, 1081–1088 (2008).

100. Kim, G.-Y. *et al.* Glycogen storage disease type Ia mice with less than 2% of normal hepatic glucose-6-phosphatase- α activity restored are at risk of developing hepatic tumors. *Mol. Genet. Metab.* **120**, 229–234 (2017).
101. Kim, G.-Y. *et al.* Downregulation of pathways implicated in liver inflammation and tumorigenesis of glycogen storage disease type Ia mice receiving gene therapy. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 1890–1899 (2017).
102. Brooks, E. D. *et al.* Long-term complications of glycogen storage disease type Ia in the canine model treated with gene replacement therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.* **41**, 965–976 (2018).
103. Sentner, C. P. *et al.* Glycogen storage disease type III: diagnosis, genotype, management, clinical course and outcome. *J. Inherit. Metab. Dis.* **39**, 697–704 (2016).
104. Yang-Feng, T. L. *et al.* Assignment of the human glycogen debrancher gene to chromosome 1p21. *Genomics* **13**, 931–934 (1992).
105. Korlimarla, A., Austin, S., Sun, B. & Kishnani, P. Hepatic Manifestations in Glycogen Storage Disease Type III. *Curr. Pathobiol. Rep.* **6**, 233–240 (2018).
106. Okubo, M., Aoyama, Y. & Murase, T. A Novel Donor Splice Site Mutation in the Glycogen Debranching Enzyme Gene Is Associated with Glycogen Storage Disease Type III. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 493–499 (1996).
107. Endo, Y. *et al.* Molecular analysis of the AGL gene: heterogeneity of mutations in patients with glycogen storage disease type III from Germany, Canada, Afghanistan, Iran, and Turkey. *J. Hum. Genet.* **51**, 958–963 (2006).
108. Cheng, A., Zhang, M., Okubo, M., Omichi, K. & Saltiel, A. R. Distinct mutations in the glycogen debranching enzyme found in glycogen storage disease type III lead to impairment in diverse cellular functions. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2045–2052 (2009).
109. Shaiu, W.-L., Kishnani, P. S., Shen, J., Liu, H.-M. & Chen, Y.-T. Genotype-Phenotype Correlation in Two Frequent Mutations and Mutation Update in Type III Glycogen Storage Disease. *Mol. Genet. Metab.* **69**, 16–23 (2000).
110. Shen, J. *et al.* Mutations in exon 3 of the glycogen debranching enzyme gene are associated with glycogen storage disease type III that is differentially expressed in liver and muscle. *J. Clin. Invest.* **98**, 352–357 (1996).
111. Kishnani, P. S. *et al.* Glycogen storage disease type III diagnosis and management guidelines. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **12**, 446–463 (2010).
112. Vidal, P. *et al.* Rescue of GSDIII Phenotype with Gene Transfer Requires Liver- and Muscle-Targeted GDE Expression. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **26**, 890–901 (2018).
113. Labrune, P., Trioche, P., Duvaltier, I., Chevalier, P. & Odièvre, M. Hepatocellular adenomas in glycogen storage disease type I and III: a series of 43 patients and review of the literature. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **24**, 276–279 (1997).
114. Oterdoom, L. H., Verweij, K. E., Biermann, K., Langeveld, M. & van Buuren, H. R. Hepatocellular Adenomas and Carcinoma in Asymptomatic, Non-Cirrhotic Type III Glycogen Storage Disease. *J. Gastrointest Liver Dis. JGLD* **24**, 515–518 (2015).
115. Karwowski, C., Galambos, C., Finegold, D. & Shneider, B. L. Markedly elevated serum transaminases in glycogen storage disease type III. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **52**, 621–623 (2011).
116. Azael Meza, A., Ayub, M., Cantú, J. M. & Flores, J. Diet therapy in severe clinical expression of debrancher deficiency. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* **22**, 285–288 (1991).

117. Mayorandan, S., Meyer, U., Hartmann, H. & Das, A. M. Glycogen storage disease type III: modified Atkins diet improves myopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 196 (2014).
118. Sentner, C. P., Caliskan, K., Vletter, W. B. & Smit, G. P. A. Heart Failure Due to Severe Hypertrophic Cardiomyopathy Reversed by Low Calorie, High Protein Dietary Adjustments in a Glycogen Storage Disease Type IIIa Patient. *JIMD Rep.* **5**, 13–16 (2012).
119. Brambilla, A. *et al.* Improvement of Cardiomyopathy After High-Fat Diet in Two Siblings with Glycogen Storage Disease Type III. *JIMD Rep.* **17**, 91–95 (2014).
120. Valayannopoulos, V. *et al.* Successful treatment of severe cardiomyopathy in glycogen storage disease type III With D,L-3-hydroxybutyrate, ketogenic and high-protein diet. *Pediatr. Res.* **70**, 638–641 (2011).
121. Dagli, A. I. *et al.* Reversal of glycogen storage disease type IIIa-related cardiomyopathy with modification of diet. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 103–106 (2009).
122. Gregory, B. L., Shelton, G. D., Bali, D. S., Chen, Y.-T. & Fyfe, J. C. Glycogen storage disease type IIIa in curly-coated retrievers. *J. Vet. Intern. Med.* **21**, 40–46 (2007).
123. Yi, H. *et al.* Characterization of a canine model of glycogen storage disease type IIIa. *Dis. Model. Mech.* **5**, 804–811 (2012).
124. Liu, K.-M., Wu, J.-Y. & Chen, Y.-T. Mouse model of glycogen storage disease type III. *Mol. Genet. Metab.* **111**, 467–476 (2014).
125. Pagliarani, S. *et al.* Glycogen storage disease type III: A novel Agl knockout mouse model. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1842**, 2318–2328 (2014).
126. Lim, J.-A., Choi, S. J., Gao, F., Kishnani, P. S. & Sun, B. A Novel Gene Therapy Approach for GSD III Using an AAV Vector Encoding a Bacterial Glycogen Debranching Enzyme. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **18**, 240–249 (2020).
127. Dong, J. Y., Fan, P. D. & Frizzell, R. A. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* **7**, 2101–2112 (1996).
128. Wu, Z., Yang, H. & Colosi, P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **18**, 80–86 (2010).
129. Löser, P., Jennings, G. S., Strauss, M. & Sandig, V. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J. Virol.* **72**, 180–190 (1998).
130. A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium. *Nat. Genet.* **11**, 130–136 (1995).
131. Goetz, R. *et al.* Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 407–412 (2010).
132. Haffner, D. *et al.* Clinical practice recommendations for the diagnosis and management of X-linked hypophosphataemia. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 435–455 (2019).
133. Che, H. *et al.* Impaired quality of life in adults with X-linked hypophosphatemia and skeletal symptoms. *Eur. J. Endocrinol.* **174**, 325–333 (2016).
134. Carpenter, T. O. *et al.* Burosumab Therapy in Children with X-Linked Hypophosphatemia. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1987–1998 (2018).
135. Imel, E. A. *et al.* Burosumab versus conventional therapy in children with X-linked hypophosphataemia: a randomised, active-controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* **393**, 2416–2427 (2019).

136. Portale, A. A. *et al.* Continued Beneficial Effects of Burosumab in Adults with X-Linked Hypophosphatemia: Results from a 24-Week Treatment Continuation Period After a 24-Week Double-Blind Placebo-Controlled Period. *Calcif. Tissue Int.* **105**, 271–284 (2019).
137. Liu, S., Guo, R., Tu, Q. & Quarles, L. D. Overexpression of PheX in Osteoblasts Fails to Rescue the Hyp Mouse Phenotype. *J. Biol. Chem.* **277**, 3686–3697 (2002).
138. Meliani, A. *et al.* Enhanced liver gene transfer and evasion of preexisting humoral immunity with exosome-enveloped AAV vectors. *Blood Adv.* **1**, 2019–2031 (2017).
139. Rajas, F. *et al.* Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem. Cell Biol.* **127**, 555–565 (2007).
140. Jauze, L., Monteillet, L., Mithieux, G., Rajas, F. & Ronzitti, G. Challenges of Gene Therapy for the Treatment of Glycogen Storage Diseases Type I and Type III. *Hum. Gene Ther.* **30**, 1263–1273 (2019).
141. Pursell, N. *et al.* Inhibition of Glycogen Synthase II with RNAi Prevents Liver Injury in Mouse Models of Glycogen Storage Diseases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **26**, 1771–1782 (2018).
142. Yi, H. *et al.* Correction of glycogen storage disease type III with rapamycin in a canine model. *J. Mol. Med.* **92**, 641–650 (2014).
143. Wang, J. *et al.* Rapamycin control of transgene expression from a single AAV vector in mouse salivary glands. *Gene Ther.* **13**, 187–190 (2006).
144. Hösel, M. *et al.* Autophagy determines efficiency of liver-directed gene therapy with a deno-associated viral vectors. *Hepatol. Baltim. Md* **66**, 252–265 (2017).
145. Wartiovaara, J. *et al.* Nephtrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J. Clin. Invest.* **114**, 1475–1483 (2004).
146. Löwik, M. M., Groenen, P. J., Levchenko, E. N., Monnens, L. A. & van den Heuvel, L. P. Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis—a review. *Eur. J. Pediatr.* **168**, 1291–1304 (2009).
147. Katwal, A. B. *et al.* Adeno-associated virus serotype 9 efficiently targets ischemic skeletal muscle following systemic delivery. *Gene Ther.* **20**, 930–938 (2013).
148. Rocca, C. J., Ur, S. N., Harrison, F. & Cherqui, S. rAAV9 combined with renal vein injection is optimal for kidney-targeted gene delivery: conclusion of a comparative study. *Gene Ther.* **21**, 618–628 (2014).
149. Burch, H. B., Brehe, J. E., Chu, C. & Fagioli, S. Gluconeogenic enzymes in defined structures of developing rat nephron. *Curr. Probl. Clin. Biochem.* **8**, 290–298 (1977).
150. Chen, S. Gene Delivery in Renal Tubular Epithelial Cells Using Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 947–958 (2003).
151. Rocca, C. J. & Cherqui, S. Gene Transfer to Mouse Kidney In Vivo. in *Viral Vectors for Gene Therapy* (eds. Manfredsson, F. P. & Benskey, M. J.) vol. 1937 227–234 (Springer New York, 2019).
152. Chung, D. C. *et al.* Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer to Renal Tubule Cells via a Retrograde Ureteral Approach. *Nephron Extra* **1**, 217–223 (2011).
153. Asico, L. D. *et al.* Nephron segment-specific gene expression using AAV vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **497**, 19–24 (2018).
154. Shen, X. *et al.* Transparenchymal Renal Pelvis Injection of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Vectors Is a Practical Approach for Gene Delivery in the Kidney. *Hum. Gene Ther. Methods* **29**, 251–258 (2018).

155. George, L. A. *et al.* Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2215–2227 (2017).
156. Demaster, A. *et al.* Long-term efficacy following readministration of an adeno-associated virus vector in dogs with glycogen storage disease type Ia. *Hum. Gene Ther.* **23**, 407–418 (2012).
157. Siew, S. M. *et al.* Prevention of cholestatic liver disease and reduced tumorigenicity in a murine model of PFIC type 3 using hybrid AAV-piggyBac gene therapy. *Hepatology* (2019) doi:10.1002/hep.30773.
158. Leontieva, O. V., Paszkiewicz, G. M. & Blagosklonny, M. V. Comparison of rapamycin schedules in mice on high-fat diet. *Cell Cycle* **13**, 3350–3356 (2014).
159. Johnson, S. C. *et al.* Dose-dependent effects of mTOR inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. *Front. Genet.* **6**, (2015).
160. Dara, L., Ji, C. & Kaplowitz, N. The contribution of ER stress to liver diseases. *Hepatol. Baltim. Md* **53**, 1752–1763 (2011).
161. Li, X. *et al.* Endoplasmic reticulum stress is the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in liver fibrosis. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* **64**, 1–7 (2015).
162. Greenman, C. *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**, 153–158 (2007).
163. Shuda, M. *et al.* Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* **38**, 605–614 (2003).
164. Calderaro, J. *et al.* Molecular characterization of hepatocellular adenomas developed in patients with glycogen storage disease type I. *J. Hepatol.* **58**, 350–357 (2013).
165. Roseman, D. S. *et al.* G6PC mRNA Therapy Positively Regulates Fasting Blood Glucose and Decreases Liver Abnormalities in a Mouse Model of Glycogen Storage Disease 1a. *Mol. Ther.* **26**, 814–821 (2018).
166. Kang, H.-R. *et al.* Pathogenesis of Hepatic Tumors following Gene Therapy in Murine and Canine Models of Glycogen Storage Disease. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **15**, 383–391 (2019).
167. Chandler, R. J. *et al.* Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J. Clin. Invest.* **125**, 870–880 (2015).
168. Walia, J. S. *et al.* Long-term correction of Sandhoff disease following intravenous delivery of rAAV9 to mouse neonates. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **23**, 414–422 (2015).
169. Donsante, A. *et al.* AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* **317**, 477 (2007).
170. Nguyen, G. N. *et al.* A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells. *Nat. Biotechnol.* **39**, 47–55 (2021).
171. Nault, J.-C. *et al.* Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* **47**, 1187–1193 (2015).
172. La Bella, T. *et al.* Adeno-associated virus in the liver: natural history and consequences in tumour development. *Gut* **69**, 737–747 (2020).
173. Liver injury increases incidence of HCC following AAV gene therapy in mice, *Molecular Therapy - X-MOL* <https://www.x-mol.com/paper/1321687256275324928>.

ANNEXES

Table 1 : liste et séquences des ARNm étudiés

Gène murin	Séquences
<i>Acca</i>	Fwd 5' TGGCAGACCACTATGTTCCA 3' Rev 5' GAGCAGTTCTGGGAGTTTCG 3'
<i>Acta2</i>	Fwd 5' GTCCAGACATCAGGGAGTAA 3' Rev 5' TCGGATACTTCAGCGTCAGGA 3'
<i>Acox1</i>	Fwd 5' CTTGGATGGTAGTCCGGAGA 3' Rev 5' TGCCAAATCCCTCATCTTC 3'
<i>Akt2</i>	Fwd 5' ATGAACGACGTAGCCATTGTG 3' Rev 5' TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT 3'
<i>Atf4</i>	Fwd 5' TGACCTGGAAACCATGCCAG 3' Rev 5' AATGATCTGGAGTGGAGGAC 3'
<i>Atg7</i>	Fwd 5' TGCCTATGATGATCTGTGTC 3' Rev 5' CACCAACTGTTATCTTTGTCC 3'
<i>Axin2</i>	Fwd 5' GATTCCCCTTTGACCAGGTGG 3' Rev 5' CCATTACAAGCAAACCAGAAGT 3'
<i>β catenin</i>	Fwd 5' GTGCAATTCCTGAGCTGACA 3' Rev 5' CTAAAGATGGCCAGCAAGC 3'
<i>Catalase</i>	Fwd 5' AACGCTGGATGGATTCTCCC 3' Rev 5' GCCCTAACCTTTCATTTCCCTTCAG 3'
<i>Chrebp</i>	Fwd 5' ATGACCCCTCACTCAGGGAATA 3' Rev 5' GATCCAAGGGTCCAGAGCAG 3'
<i>Col1a</i>	Fwd 5' GCTCCTCTTAGGGGCCACT 3' Rev 5' CCACGTCTCACCATTGGGG 3'
<i>Col11a</i>	Fwd 5' CTGTAACATGGAACTGGGGAAA 3' Rev 5' CCATAGCTGAACTGAAAACCACC 3'
<i>Cpt1</i>	Fwd 5' AGCAGAGGCTCAAGCTGTTCA 3' Rev 5' ACCTCCATGGCTCAGACAG 3'
<i>Cyp2E1</i>	Fwd 5' CCACCAGCACAACCTCTGAGATA 3' Rev 5' CCCAATAACCCTGTCAATTTCTT 3'
<i>Cyp4A10</i>	Fwd 5' TCCAGCAGTCCCATCACCT 3' Rev 5' TTGCTTCCCAGAACCATCT 3'
<i>Cyp4A14</i>	Fwd 5' TCAGTCTATTTCTGCTGTTC 3' Rev 5' GAGCTCCTTGCTTCAGATGGT 3'
<i>Elovl6</i>	Fwd 5' ACACGTAGCGACTCCGAAGAT 3' Rev 5' AGCGCAGAAAACAGGAGGAAAGACT 3'
<i>Fabp1</i>	Fwd 5' GTCTCCAGTTCGCACTCCTC 3' Rev 5' GCAGAGCCAGGAGAACCTTTG 3'
<i>Fasn</i>	Fwd 5' TTCCAAGACGAAAATGATGC 3' Rev 5' AATTGTGGGATCAGGAGAGC 3'
<i>Fgf-21</i>	Fwd 5' CTGGGGGTCTACCAAGCATA 3' Rev 5' CACCCAGGATTTGAATGACC 3'
<i>Foxo1</i>	Fwd 5' CTCAAGGATAAGGGCGACA 3' Rev 5' GACAGATTGTGGCGAATTGA 3'
<i>G6pc1</i>	Fwd 5' TTACCAAGACTCCCAGGACTG 3' Rev 5' GAGCTGTTGCTGTAGTAGTCG 3'
<i>Gck</i>	Fwd 5' CCCTGAGGGCTTACAGTTC 3' Rev 5' ACGGATGTGAGTGTGAAGC 3'
<i>Glu1</i>	Fwd 5' CTCGCTCTCCTGACCTGTTC 3' Rev 5' TTCAAGTGGGAACCTTGCTGA 3'
<i>Glut1</i>	Fwd 5' GCTGTGCTTATGGGCTTCTC 3' Rev 5' CACATACATGGGCACAAAGC 3'
<i>Gpc3</i>	Fwd 5' CATTGGAAGCTCTGGTGACG 3' Rev 5' GGGAACAAAGCAGCATGGAAA 3'

<i>Hgf</i>	Fwd 5' TTGGGATTCGCAGTACCCTCACAA 3' Rev 5' TAGCCAACCTCGGATGTTGGGTCA 3'
<i>HmgS</i>	Fwd 5' CCGTATGGGCTTCTGTTCAG 3' Rev 5' AGCTTTGTGCGTTCATCAG 3'
<i>HmgR</i>	Fwd 5' AGCTTGCCCGAATTGTATGTG 3' Rev 5' TCTGTTGTGAACCATGTGACTTC 3'
<i>Hnf1α</i>	Fwd 5' TCACAGACACCAACCTCAGC 3' Rev 5' GAGGACACTGTGGGACTGGT 3'
<i>Lect2</i>	Fwd 5' CCCACAACAATCCTCATTTC 3' Rev 5' GTTAGCCCATGGTCCTGCTA 3'
<i>Lgr5</i>	Fwd 5' TGAGCGGGACCTTGAAGATT 3' Rev 5' AATAGGTGCTCACAGGGCTT 3'
<i>Nrf2</i>	Fwd 5' CCGGCTGAATTGGGAGGAAT 3' Rev 5' GAACTAACCCGTGTGGACCAT 3'
<i>Pai-1</i>	Fwd 5' TTCAGCCCTTGCTTGCCCTC 3' Rev 5' ACACTTTTACTCCGAAGTCGGT 3'
<i>Pepck</i>	Fwd 5' AGCCTTTGGTCAACAACCTGG 3' Rev 5' TGCCTTCGGGGTTAGTTATG 3'
<i>Pkli</i>	Fwd 5' CTTGCTCTACCGTGAGCCTC 3' Rev 5' ACCACAATCACCAGATCACC 3'
<i>Pkm2</i>	Fwd 5' TCGCATGCAGCACCTGATT 3' Rev 5' CCTCGAATAGCTGCAAGTGGTA 3'
<i>Pp2A</i>	Fwd 5' ATGGACGAGAAGTTGTTACC 3' Rev 5' CAGTGACTGGACATCGAACCT 3'
<i>Ppara</i>	Fwd 5' CCCTGTTTGTGGCTGTATAA 3' Rev 5' GGGAAAGAGGAAGGTGCATCTG 3'
<i>Pparγ</i>	Fwd 5' AGTCTGCTGATCTGCGAGCC 3' Rev 5' CTTTCCTGTCAAGATCGCCC 3'
<i>Pten</i>	Fwd 5' TGGGTTGGGAATGGAGGGAATGCT 3' Rev 5' GGACAGCAGCCAATCTCTCGGA 3'
<i>Rpl19</i>	Fwd 5' GGTGACCTGGATGAGAAGGA 3' Rev 5' TTCAGCTTGTGGATGTGCTC 3'
<i>Ror</i>	Fwd 5' GCGCAGGCAGAGCTATGC 3' Rev 5' CACGTAATGACACCATAATGGATT 3'
<i>Scd1</i>	Fwd 5' TGGGTTGGCTGCTTGTG 3' Rev 5' GCGTGGGCAGGATGAAG 3'
<i>Sp5</i>	Fwd 5' AGGACAGGAAACTGGGTCGT 3' Rev 5' GATGGCTCGGACTTTGGA 3'
<i>Srebp 1c</i>	Fwd 5' GGCCTAAGTGCCTCAACCT 3' Rev 5' GCCACATAGATCTCTGCCAGTGT 3'
<i>Srebp 2</i>	Fwd 5' GCAGCAACGGGACCATTCT 3' Rev 5' CCCATGACTAAGTCCTTCAACT 3'
<i>Tgf-β1</i>	Fwd 5' CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG 3' Rev 5' GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT 3'
<i>Vim</i>	Fwd 5' CGGCTGCGAGAGAAATTGC 3' Rev 5' CCACTTCCGTTCAAGGTCAAG 3'

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

A. Articles de recherche

1. Vidal P, Pagliarani S, Colella P, Costa Verdera H, **Jauze L**, Gjorgjieva M, Puzzo F, Marmier S, Collaud F, Simon Sola M, Charles S, Lucchiari S, van Wittenberghe L, Vignaud A, Gjata B, Richard I, Laforet P, Malfatti E, Mithieux G, Rajas F, Comi GP, Ronzitti G, Mingozi F. Rescue of GSD III Phenotype with Gene Transfer Requires Liver- and Muscle-Targeted GDE Expression. *Mol Ther*. 2018 Mar 7;26(3):890-901
2. Laforêt P, Inoue M, Goillot E, Lefeuvre C, Cagin U, Streichenberger N, Leonard-Louis S, Brochier G, Madelaine A, Labasse C, Hedberg-Oldfors C, Krag T, **Jauze L**, Fabregue J, Labrune P, Milisenda J, Nadaj-Pakleza A, Sacconi S, Mingozi F, Ronzitti G, Petit F, Schoser B, Oldfors A, Vissing J, Romero NB, Nishino I, Malfatti E. Deep morphological analysis of muscle biopsies from type III glycogenesis (GSD III), debranching enzyme deficiency, revealed stereotyped vacuolar myopathy and autophagy impairment. *Acta Neuropathol Commun*. 2019 Oct 28;7(1):167

B. Revue

3. **Jauze L**, Monteillet L, Mithieux G, Rajas F, Ronzitti G. Challenges of Gene Therapy for the Treatment of Glycogen Storage Diseases Type I and Type III. *Hum Gene Ther*. 2019 Oct;30(10):1263-1273

C. Thèse d'exercice

Thèse de pharmacie 2019: thèse d'exercice et soutenance « Les vecteurs adéno-associés pour le transfert de gène dans les maladies métaboliques : exemple de la glycogénose de type III ». Deuxième prix de pharmacie 2019.

D. Communications orales

1. **Congrès de l'European Metabolic Group (EMG) 2019:** « Linking metabolism impairment and hepatic tumorigenesis in a murine model of type III glycogen storage disease », Lyon, 23-25/05/2019
2. **Journées de l'école doctorale BMIC 2019:** « AAV gene transfer for glycogen storage disease type Ia », Lyon, 27-28/11/2019
3. **Journée académique de la filière G2M 2020:** « Etude du lien entre métabolisme et tumorigenèse hépatique dans un modèle murin de glycogénose de type III », Paris, 25/09/2020
4. **Journées de l'école doctorale BMIC 2020:** « AAV gene transfer for X-linked hypophosphatemia ». Premier prix ex-aequo des présentations orales, Lyon 11-12/11/2020.

E. Communications affichées

1. **83^{ème} congrès de la Société française d'hépatologie (AFEH) 2018:** « Etude du métabolisme et de la tumorigénèse hépatique dans un modèle murin de glycogénose de type III », Lyon, 3-6/10/2018.
2. **Congrès international de myologie Myology 2019:** « Adeno-associated virus vector-based gene therapy strategies for glycogen storage disease type III », Bordeaux, 25-28/03/2019.

F. Communications "grand public"

1. **Journée des Familles de l'Association Francophone des Glycogénoses 2017:** « Nouvelles approches de thérapie génique dans la glycogénose de type III », Evry, 28/10/2017
2. **Journée de la Glycogénose de type III 2017:** « Développement tumoral dans la glycogénose de type III », Paris, 15/05/2018.
3. **Journée des Familles de l'Association Francophone des Glycogénoses 2018:** « Intérêt et défis de la thérapie génique pour le traitement des glycogénoses de type I et III », Lyon, 27/10/2018
4. **Visite du laboratoire U1213 par l'association Gen&Zic et élus du Grand Chalon 2019 :** « La thérapie génique pour le traitement des glycogénoses de type Ia et de type III », Lyon, 23/09,2019

G. Brevets

1. G. Ronzitti, F. Mingozi, L. Jauze, S. Charles. **Gene therapy of fibroblast growth factor 23 related hypophosphatemic diseases.** 19 apr 2019. App. No EP19305518.
2. G. Ronzitti, F. Rajas, L. Jauze, G. Mithieux. **Vectors encoding a glucose-6-phosphatase (G6Pase-a) for gene therapy.** 22 May 2020. App. No EP20305540.