



**HAL**  
open science

# Développement de vecteurs lentiviraux regulables pour le transfert de gène dans le système nerveux central.

Lahouari Amar

► **To cite this version:**

Lahouari Amar. Développement de vecteurs lentiviraux regulables pour le transfert de gène dans le système nerveux central.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT: . tel-00168863

**HAL Id: tel-00168863**

**<https://theses.hal.science/tel-00168863>**

Submitted on 30 Aug 2007

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE  
PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Neurosciences

Présentée par :

**Lahouari AMAR**

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

**DEVELOPPEMENT DE VECTEURS LENTIVIRAUX  
REGULABLES POUR LE TRANSFERT DE GENE  
DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL**

Soutenue le 26 février 2007 devant le jury composé de :

Mr. Jean MARIANI  
Mme. Nicole DEGLON  
Mr. André VERDEL  
Mr. Daniel SCHERMAN  
Mr. Jacques MALLET

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse

Alors que la rédaction de ce manuscrit s'achève, j'adresse ma profonde reconnaissance à tous ceux ou celles qui ont permis de concrétiser ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Jacques Mallet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions possibles.

Je voudrais adresser mes remerciements aux membres du jury :

à Mr Jean Mariani, qui a bien voulu présider cette thèse

à Mr Daniel Scherman pour avoir accepté de porter un jugement sur ce travail

à Mme Nicole Déglon et Mr André Verdel d'avoir pris la charge supplémentaire d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie Roland Vogel pour ses conseils avisés qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Un grand Merci à tous les membres du LGN qui ont contribué à ce que ces quatre années de thèse soient enrichissantes et passionnantes. Je tiens à remercier les membres du labo 3, Jeannette, Cédric, Krzysztof pour les passionnantes discussions que nous avons eu. Merci aux membres du labo 5 (en particulier Yasmine, et Philippe) et du labo 6 (Guilane, Sylvie, Marie-Jo) pour leur gentillesse et leurs conseils.

Ce travail de thèse n'aurait pas été aussi agréable sans Mathieu, Angeline, Stéphanie P., Stéphanie M., Nicolas, Cécile et Olfa. Merci pour vos encouragements, votre aide et votre bonne humeur. Merci à Ahn et Paulette pour vos précieux conseils.

Un grand Merci à Chamsy pour son aide et nos nombreux débats animés.

Je souhaite adresser ma gratitude à Delphine et Hamid pour la lecture critique de ce manuscrit et les discussions qui en découlèrent.

Mes remerciements vont également vers tous ceux que j'aime et qui ont fait que cette thèse se déroule dans de bonnes conditions. En particulier, un grand MERCI à Laure qui m'a facilité le quotidien et qui m'a soutenu durant les moments les plus difficiles. Désolé d'avoir été si souvent absent. A ma famille, qui a cru en moi et qui a contribué à leur manière à ce travail.

Enfin, je remercie très sincèrement la Délégation Générale pour l'Armement ainsi que l'Association Française contre les Myopathies de m'avoir financé au cours de ma thèse.

## À mes Parents

*L'homme qui possède la connaissance est capable d'une ligne de conduite qui en découle afin de récolter les avantages de ses acquis ; et celui qui ne fait pas bon usage de ce qu'il connaît est comme l'homme qui, en voyageant, choisit une route dans laquelle il est conscient de s'exposer au danger.*

*Kalila et Dimna*

# SOMMAIRE

<b>LISTES DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAU</b> .....	<b>8</b>
<b>AVANT PROPOS</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>12</b>
<b>I. LA THERAPIE GENIQUE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b> .....	<b>13</b>
I.1. LE CONCEPT DE THERAPIE GENIQUE ET SES ORIGINES .....	13
I.2. LES OUTILS DE TRANSFERT DE GENES .....	16
I.2.1. <i>Les vecteurs non-viraux ou vecteurs synthétiques</i> .....	16
I.2.2. <i>Les vecteurs viraux</i> .....	18
I.2.2.1. Les Herpès virus (HSV).....	19
I.2.2.2. Les Virus Associés aux Adénovirus (AAV) .....	20
I.2.2.3. Les adénovirus .....	22
I.2.2.4. Les lentivirus .....	23
I.2.2.4.1. structure.....	23
I.2.2.4.2. Cycle réplcatif des lentivirus : cas du VIH-1 .....	26
I.3. OBTENTION DES VECTEURS LENTIVIRAUX DERIVES DU HIV-1 .....	30
I.3.1. <i>Caractéristiques et production</i> .....	30
I.3.2. <i>Pseudotypage des vecteurs lentiviraux</i> .....	32
I.3.3. <i>Améliorations des vecteurs lentiviraux</i> .....	33
I.3.3.1. Amélioration de l'efficacité des vecteurs.....	33
I.3.3.2. Amélioration de la biosécurité .....	34
I.3.3.2.1. Des productions améliorées .....	34
I.3.3.2.2. Les vecteurs non intégratifs.....	35
I.3.3.2.3. Les vecteurs à intégrations ciblées.....	36
I.4. VECTEURS LENTIVIRAUX ET TRANSFERT DE GENE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL .....	37
I.5. THERAPIE GENIQUE DES MALADIES NEURODEGENERATIVES .....	39
<b>II. L'ARN INTERFERENCE</b> .....	<b>42</b>
II.1. HISTORIQUE ET DECOUVERTE .....	42
II.2. MECANISME .....	43
II.2.1. <i>Etape d'initiation</i> .....	44
II.2.2. <i>Etape effectrice</i> .....	44
II.3. LES MICROARN .....	45
II.4. ARNi ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION .....	47
II.5. EXPRESSION DES SIARN .....	47
II.6. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES .....	48
<b>III. STRATEGIES DE REGULATION DE L'EXPRESSION D'UN GENE</b> .....	<b>52</b>
III.1. PRE-REQUIS DES SYSTEMES DE REGULATION .....	52
III.2. LES SYSTEMES DE REGULATION DE L'EXPRESSION D'UN TRANSGENE.....	53
III.2.1. <i>Régulation des promoteurs d'ARN polymérase II</i> .....	53
III.2.1.1. Le système de régulation par la tétracycline.....	53
III.2.1.2. Le système de régulation par l'ecdysone .....	56
III.2.1.3. Le système de régulation par le mifépristone ou RU486 .....	59
III.2.1.4. Le système de régulation par le tamoxifène .....	60
III.2.1.5. Le système de régulation par la rapamycine.....	61
III.2.2. <i>Régulation des promoteurs d'ARN polymérase III</i> .....	63
III.2.2.1. Description des promoteurs d'ARN polymérase III .....	63
III.2.2.2. Le promoteur U6 humain .....	64
III.2.2.3. Développement de promoteurs d'ARN polymérase III régulables .....	65

<b>IV. OBJECTIFS DE NOTRE ETUDE.....</b>	<b>68</b>
<b>RESULTATS ET COMMENTAIRES.....</b>	<b>70</b>
<b>I- CONSTRUCTION D'UN VECTEUR LENTIVIRAL POUR PERMETTRE L'EXPRESSION REGULEE D'UN TRANSGENE DANS LE CERVEAU.....</b>	<b>71</b>
<b>II- DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME DE REGULATION DE L'EXPRESSION DE PETITS ARN INTERFERENTS : CONSTRUCTION D'UN VECTEUR LENTIVIRAL POUR LE CONTROLE D'UN GENE ENDOGENE PAR ARN INTERFERENCE. ....</b>	<b>83</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>94</b>
<b>I. CONTRAINTES ET LIMITATIONS DU SYSTEME TETRACYCLINE .....</b>	<b>95</b>
I.1. CONTRAINTES POUR LA CONSTRUCTION D'UN VECTEUR UNIQUE CONTENANT LE SYSTEME TETRACYCLINE	95
I.1.1. <i>Contrainte de taille</i> .....	95
I.1.2. <i>Risque d'interférence entre les promoteurs</i> .....	96
I.2. CONTRAINTES DU SYSTEME TETRACYCLINE POUR UNE APPLICATION CLINIQUE.....	97
I.2.1. <i>Contraintes liées à la dose de doxycycline</i> .....	97
I.2.2. <i>Risque de réponse immunitaire contre le transactivateur</i> .....	101
<b>II. ALTERNATIVES AU SYSTEME TETRACYCLINE .....</b>	<b>102</b>
II.1. SYSTEME DE REGULATION PAR LA RAPAMYCINE .....	102
II.2. REGULATION PHYSIOLOGIQUE .....	102
II.3. REGULATION PAR LES PROTEINES EN DOIGT DE ZINC .....	104
<b>III. CONTRAINTES ET LIMITATIONS DE L'EXPRESSION DES SHARN.....</b>	<b>106</b>
III.1. RISQUE DE SATURATION DE L'ARNi .....	106
III.2. RISQUE DE REONSE IMMUNITAIRE .....	106
III.3. RISQUE DE TOXICITE .....	107
<b>IV. CONTRAINTES LIEES A L'UTILISATION DES VECTEURS LENTIVIRAUX EN VUE D'UNE APPLICATION CLINIQUE.....</b>	<b>107</b>
<b>V. CONSIDERATIONS ETHIQUES ET AVENIR DE LA THERAPIE GENIQUE .....</b>	<b>109</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>112</b>

## LISTES DES ABREVIATIONS

Ψ	séquence d'encapsidation
6-OHDA	6-hydroxydopamine
AAV	adeno-associated virus
ADA	adénosine déaminase
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNi	ARN interférence
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CA	capside
CMV	cytomégalovirus
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CPI	Complexe de Préintégration
cPPT	central Polypurine Tract
DICS	Déficit Immunitaire Combiné Sévère
DICS-X1	Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié au chromosome X
EcR	récepteur de l'ecdysone
ESD	Elément de Séquence Distal
ESP	Elément de Séquence Proximal
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial neurofibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GPx	Glutathione Peroxydase
HSV	Herpes Simplex Virus
IN	intégrase
ITR	Inverted Terminal repeat
LTR	Long Terminal Repeat
MA	matrice
MAIz	maladie d'Alzheimer
MH	maladie de Huntington
miARN	microARN

MLV ou Mo-MLV	Moloney Murine Leukeamia Virus
MP	maladie de Parkinson
NC	nucléocapside
NGF	Nerve Growth Factor
NLS	Nuclear Localisation Sequence (séquence de localisation nucléaire)
PBS	primer binding site (amorce de transcription inverse)
PEI	polyéthylénimine
PGK	Phosphoglycérate Kinase
PPT	polypurine tract
PTGS	Posttranscriptional Gene Silencing
RISC	RNA induced silencing complex
RT	rétrotranscriptase
rtTA	reverse tetracycline Transactivator
RXR $\alpha$	Récepteur alpha au Rétinoïde X
shARN	short hairpin RNA (ARN en épingle à cheveux)
siARN	small interfering RNA (petit ARN interférent)
SIDA	Syndrôme de l'Immunodéficience Acquise
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC	Système Nerveux Central
SOD	Superoxyde Dismutase
TetO	opéron tétracycline
tetR	répresseur dépendant de la tétracycline
TGS	Transcriptional Gene Silencing
TH	Tyrosine Hydroxylase
tTA	tetracycline Transactivator
UTR	Untranslated Region (région non traduite)
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
VSV-G	glycoprotéine G de l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire
WPRE	Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptinal Regulatory Elemen

## Liste des Figures et tableau

- Figure 1 : Stratégies de thérapie génique
- Figure 2 : a) Structure de l'Herpès simplex Virus de type 1 (HSV1)  
b) Représentation schématique du génome de l'Herpès Simplex Virus de type 1
- Figure 3 : Structure du génome de l'AAV
- Figure 4 : a) Représentation schématique de la structure d'un adénovirus.  
b) Structure du génome d'un adénovirus de sérotype 5
- Figure 5 : Structure d'un lentivirus : exemple du VIH-1
- Figure 6 : Structure du génome du VIH-1
- Figure 7 : Phase pré-intégrative du cycle réplicatif du HIV-1
- Figure 8 : Mécanisme de rétrotranscription de l'ARN génomique du VIH-1.
- Figure 9 : Import nucléaire du provirus, formation du complexe de pré-intégration (CPI)
- Figure 10 : Intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte
- Figure 11 : Plasmides de production des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV-G.
- Figure 12 : Mécanisme d'intégration site spécifique catalysée par l'intégrase de phage phiC31
- Figure 13 : Schéma du mécanisme de l'ARN interférence
- Figure 14 : Structure de la protéine Dicer humaine
- Figure 15 : Structure des protéines Argonautes
- Figure 16 : a) Structure des pré-miARN lin-4 et let-7  
b) Mécanisme d'action des miARN lin-4 et let-7
- Figure 17 : Biosynthèse des microARN
- Figure 18 : Stratégie d'expression des siARN
- Figure 19 : a) Système de régulation suppressible par la tétracycline, "Tet-off"  
b) Système de régulation inductible par la tétracycline, "Tet-on"
- Figure 20 : Système de régulation par l'ecdysone
- Figure 21 : Système de régulation par la mifépristone ou RU486
- Figure 22 : Système de régulation par le tamoxifène
- Figure 23 : Système de régulation par la rapamycine
- Figure 24 : Description des différents types de promoteurs d'ARN polymérase III.
- Figure 25 : Structure du promoteur U6 humain

Figure 26 : Mécanisme simplifié de transcription à partir d'un promoteur d'ARN polymérase III

Tableau I : Comparaison des principaux vecteurs de transfert de gène.

## AVANT PROPOS

Au cours des vingt dernières années, les progrès conjoints de la biologie moléculaire, de la biologie cellulaire et de la virologie ont permis la mise au point du transfert de gène, ouvrant ainsi la voie à une nouvelle stratégie thérapeutique : la thérapie génique. Celle-ci repose sur le transfert d'un gène thérapeutique dans une cellule ou un tissu cible et peut avoir différents objectifs : compenser l'absence ou le dysfonctionnement d'un gène, coder une protéine thérapeutique, ou inhiber un gène par le biais du mécanisme d'ARN interférence. La thérapie génique peut s'appliquer à des maladies génétiques, mais également à des pathologies acquises.

D'un point de vue pratique, le gène thérapeutique peut être transféré dans les cellules sous forme d'ADN nu, associé à des molécules chimiques ou incorporé au sein de vecteurs dérivés de virus. Des efforts constants sont fournis afin de développer et sécuriser ce type de vecteurs. Dans un premier temps, le choix du gène thérapeutique (transgène), de la cible (pour limiter l'expression du transgène au type cellulaire le plus approprié) et du promoteur (pour assurer une expression durable et/ou tissu spécifique) sont des éléments indispensables à prendre en compte. Il est ensuite très important de s'affranchir d'éventuels effets secondaires (cytotoxicité, réponse immunitaire) induits par le vecteur. Enfin, un élément important pour une utilisation sécurisée de ces vecteurs en clinique consiste à réguler l'expression du transgène. Ceci permet d'éteindre l'expression du transgène en cas d'effets secondaires indésirables, mais également permet de moduler l'expression du gène thérapeutique en fonction des besoins du patient. Dans ce cadre, notre travail a porté sur la mise au point de systèmes de régulation de l'expression du gène thérapeutique inductibles par la tétracycline (Tet-on).

La première partie de mon travail a consisté à incorporer le système "Tet-on" au sein d'un vecteur lentiviral unique. En effet, jusqu'à présent l'utilisation de ce système de régulation nécessitait deux vecteurs distincts, l'un codant pour le transactivateur, l'autre pour le transgène. Dans notre étude, un même vecteur comportant les deux cassettes a

permis l'expression régulée de différents gènes d'intérêt. En particulier, l'expression régulée de la tyrosine hydroxylase humaine a été validée dans un modèle de la maladie de Parkinson développé chez le rat. L'incorporation du système "Tet-on" dans un vecteur lentiviral unique nous a ainsi permis d'améliorer l'efficacité d'expression et de régulation du gène thérapeutique, et d'apporter un élément de biosécurité supplémentaire pour l'utilisation de ce type de vecteurs.

La deuxième partie de mon travail a consisté à adapter le système « Tet-on » au promoteur d'ARN polymérase III afin de réguler l'expression des shARN. En effet, les systèmes de régulation existants sont adaptés à des promoteurs d'ARN polymérase II et ne peuvent être directement transposés à la technologie de l'ARN interférence. Dans ce cadre, les cassettes d'expression du transactivateur et du shARN ont été intégrées dans un seul vecteur lentiviral. L'expression régulée de la protéine endogène p53 a permis de valider l'efficacité de ce système. Ces résultats constituent une étape supplémentaire vers une utilisation sécurisée des shARN en thérapie génique.

Dans ce manuscrit, je présenterai et discuterai l'ensemble de ces travaux de thèse, après avoir introduit la thérapie génique (en particulier dans le système nerveux central), l'ARN interférence, ainsi que les différents systèmes de régulations de l'expression d'un transgène. Enfin, j'aborderai les considérations éthiques que soulève la thérapie génique avant de conclure, d'un point de vue plus général, sur l'avenir de cette stratégie.

## **INTRODUCTION**

## I. La thérapie génique dans le système nerveux central

### I.1. Le concept de thérapie génique et ses origines

La thérapie génique recouvre toute approche visant à prévenir ou à traiter une maladie par transfert de matériel génétique. Initialement imaginé pour les maladies génétiques, le transfert de gène est désormais envisagé pour de nombreuses pathologies innées ou acquises. Le traitement consiste à exprimer un gène, qui code une protéine thérapeutique, ou une séquence nucléotidique. Deux stratégies sont envisagées pour introduire un gène thérapeutique (transgène) dans les cellules de l'individu : la thérapie génique *ex vivo* et la thérapie génique *in vivo*. La première méthode (figure 1) consiste en la greffe (préférentiellement l'autogreffe) de cellules génétiquement modifiées en culture. Le principe est de récupérer des cellules du malade à traiter, de les cultiver, et d'y transférer le gène thérapeutique. Ces cellules sont ensuite réintroduites chez le malade. La seconde approche (figure 1) est fondée sur l'introduction *in vivo* du gène thérapeutique dans la circulation sanguine, ou directement au sein du tissu cible, conférant ainsi directement aux cellules du malade la propriété de synthétiser le facteur thérapeutique (Kirschstein and Skirboll, 2001).

La thérapie génique a bénéficié de l'essor de la biologie moléculaire à la fin des années soixante. En 1966, Edward Tatum et Joshua Lederberg avaient émis pour la première fois la possibilité de la manipulation des gènes chez l'homme (Tatum, 1966). La première preuve expérimentale fût apportée par Paul Berg en 1972, qui tira profit du virus recombinant dérivé du virus simien, SV40 pour transférer du matériel génétique exogène dans des cellules de mammifères (Jackson et al., 1972). La découverte de matériel génétique d'origine virale au sein du génome de cellules transformées par des virus oncogènes, papovavirus et rétrovirus a ouvert la voie au transfert de gène (Sambrook et al., 1968; Hill and Hillova, 1972). Des lors, les progrès conjoints de la biologie moléculaire, de la biologie cellulaire et de la virologie ont rendu possible le transfert de gène thérapeutique dans les

cellules somatiques chez l'homme pour restaurer une fonction cellulaire déficiente (Friedmann and Roblin, 1972).

Le premier essai clinique de thérapie génique fut réalisé par Martin Cline en 1980 chez deux patientes atteintes de  $\beta$ -thalassémie grâce à une approche *ex vivo*. Des cellules de moelle osseuse génétiquement modifiées *in vitro* par un plasmide codant la  $\beta$ -globine humaine ont été injectées dans la circulation sanguine. Cette tentative prématurée ne donna pas de résultats probants (Wade, 1981). Les conditions éthiques insatisfaisantes dans lesquelles cet essai a été réalisé ont conduit le RAC (Recombinant Advisory Committee) à édicter en 1985 une charte soumettant les tentatives de transfert de gène chez l'homme à une réglementation très stricte et la mise en place d'une commission, le HGTS (Human Gene Therapy Subcommittee) chargée d'en évaluer la sécurité et l'acceptabilité éthique. Cette réglementation, initialement mise en place aux Etats-Unis, fut adoptée par la communauté internationale.

Les premiers essais de thérapie génique réalisés en accord avec les règles édictées par le RAC ont débuté en 1990 et concernent une maladie immunitaire grave, le déficit immunitaire combiné sévère (DICS). Deux équipes, l'une américaine et l'autre italienne ont conduit en parallèle un essai de thérapie génique contre la forme de DICS causée par un déficit en adénosine déaminase (ADA). La première équipe aux Etats-Unis a engagé un essai sur deux petites filles de 4 et 9 ans (Blaese et al., 1995). Pendant deux ans, ces deux patientes ont reçu des autogreffes de lymphocytes T modifiés à l'aide d'un vecteur rétroviral codant l'ADA humaine. L'état d'une des deux patientes s'est amélioré nettement après cette intervention. Cinq et dix ans après l'intervention, ses lymphocytes T produisaient encore l'ADA (Blaese et al., 1995; Mullen et al., 1996; Muul et al., 2003). En revanche, l'autre enfant a développé des anticorps dirigés contre les protéines contenues dans le sérum de veau foetal utilisé lors de la culture des lymphocytes T, mais également des anticorps dirigés contre l'enveloppe rétrovirale qui ont persistés pendant toute l'étude, aboutissant à un rejet des cellules greffées (Muul et al., 2003). En parallèle, l'équipe de Claudio Bordignon à Milan, a réalisé un autre protocole de thérapie génique *ex vivo*. Les précurseurs médullaires CD34+ des enfants atteints d'ADA-DICS ont été modifiés à l'aide de vecteurs rétroviraux murins codant l'ADA humaine et réinjectés dans la moelle osseuse (Bordignon et al., 1995). Cependant, l'efficacité de ce traitement se révéla transitoire, en raison de la faible

proportion de cellules transduites greffées (Bordignon et al., 1995). L'augmentation du nombre de cellules exprimant le transgène greffées, a permis de restaurer les fonctions immunitaires des enfants traités (Aiuti et al., 2002). Ces résultats constituent une étape importante dans le traitement des patients atteints d'ADA-SCID. Dans le même temps, L'équipe d'Alain Fischer en France (Cavazzana-Calvo et al., 2000) et celle de Thrasher au Royaume-Uni (Howe and Thrasher, 2003) ont mené avec succès un essai clinique pour une autre forme de DICS, le DICS lié au chromosome X (DICS-X1). Les enfants souffrant de cette maladie présentaient des mutations du gène codant la sous unité  $\gamma_c$ , commune à plusieurs récepteurs de cytokines, conduisant à un défaut complet de développement des lymphocytes T et des cellules « natural killer ». En l'absence de greffe de moelle osseuse allogénique, la maladie est létale au cours de la première année de vie, ce qui nécessite le confinement des patients dans un environnement stérile (Cavazzana-Calvo et al., 2005). Dix patients pour la première étude et quatre pour la deuxième ont été traités par transfert *ex vivo* du gène  $\gamma_c$  dans leurs précurseurs médullaires CD34+ à l'aide d'un vecteur rétroviral murin. Une correction stable du déficit immunitaire a été obtenue chez sept et quatre des patients avec un recul de plus de cinq ans pour les essais les plus anciens (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Toutefois, la survenue dans l'essai d'Alain Fischer, près de trois ans après le traitement d'une prolifération clonale de lymphocytes T chez trois des enfants traités pour DICS-X1 a soulevé la question des risques inhérents à cette approche (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a). Chez deux patients, c'est un événement de mutagenèse insertionnelle survenu au sein du locus du même proto-oncogène, LMO-2, qui est responsable de la prolifération anarchique des lymphocyte T. L'insertion du provirus dans le premier intron dans l'un des cas, et à proximité du promoteur dans l'autre, a provoqué un effet enhancer du LTR (Long Terminal Repeat) viral sur la transcription du gène LMO-2 (Hacein-Bey-Abina et al., 2003b). Chez le troisième enfant, le gène LMO-2 ne semble pas être impliqué dans la prolifération clonale (Kaiser, 2005). Cependant, plusieurs sites d'intégrations semblent être impliqués dans cette lymphoprolifération (Hacein-Bey-Abina et al., 2006). Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre la génotoxicité du rétrovirus dans les cellules hématopoïétiques. Toutefois, les travaux de l'équipe d'Alain Fischer et d'Adrian Thrasher ont démontrés l'efficacité thérapeutique du transfert de gène et ont mis en évidence les problèmes soulevés par cette approche. Ceci nécessite de revoir le rapport bénéfice/risque pour chaque pathologie, mais également de

mettre en place des méthodes thérapeutiques plus efficaces qui passent par le développement d'outils de transfert de gène plus performants et plus sûrs.

## ***1.2. Les outils de transfert de gènes***

Comme nous l'avons vu précédemment, la thérapie génique consiste à introduire un gène d'intérêt thérapeutique au sein d'une cellule ou d'un tissu cible. Ce gène peut être transféré sous forme d'ADN nu, complexé à des molécules chimiques ou intégré au sein de vecteurs dérivés de virus.

Plusieurs types de vecteurs sont aujourd'hui disponibles. Ces vecteurs sont regroupés en deux catégories, les vecteurs non viraux (ou vecteurs synthétiques) et les vecteurs viraux. Le choix de l'un ou l'autre de ces vecteurs est basé sur différents critères : la taille et le type du gène thérapeutique, la cellule dans laquelle l'expression du transgène est ciblée ainsi que la durée et le contrôle de l'expression du transgène. Il est également nécessaire de réduire au maximum toute toxicité (cytotoxicité ou réponse immunitaire) induite par le vecteur.

### **I.2.1. Les vecteurs non-viraux ou vecteurs synthétiques**

Les vecteurs non-viraux sont constitués d'ADN nu, d'ADN complexé à des polymères cationiques comme la poly-lysine, ou à des lipides cationiques pour permettre le passage de l'ADN à travers la membrane cellulaire (Park et al., 2006). Leur avantage par rapport aux vecteurs viraux est d'assurer une plus grande sécurité, d'être synthétisés plus aisément à grande échelle et de pouvoir, en théorie, transférer des séquences d'ADN de plus grande taille.

L'ADN nu peut être transféré dans un tissu ou un organe par injection directe (Wolff et al., 1990; Schwartz et al., 1996), par électrotransfert (ou électroporation) (Kreiss et al., 1999; Gehl, 2003), projeté dans les tissus à l'aide d'un pistolet à ADN (Jiao et al., 1993) ou encore via la circulation sanguine (Zhang et al., 1999). Cette dernière approche, bien que

séduisante, s'est révélée très peu efficace en raison de la dégradation très rapide de l'ADN nu (Mahato, 1999) et d'une demi-vie plasmatique très courte (Houk et al., 2001). Vu son innocuité, le transfert d'ADN nu exprimant le VEGF (vascular endothelial growth factor) a d'ores et déjà été utilisé chez l'homme dans le cadre des affections vasculaires pour promouvoir la revascularisation (Rauh et al., 2001). L'injection directe d'ADN nu dans le muscle n'a pas permis d'obtenir un niveau d'expression suffisant pour induire un effet thérapeutique (Davis et al., 1993). C'est pourquoi, afin d'augmenter l'efficacité de transfection (*in vitro* ou *in vivo*), l'administration d'ADN nu est généralement associée à des méthodes chimiques (complexes cationiques), ou bien à des méthodes physiques (microinjection, électrotransfert...) (Trollet et al., 2006). Des progrès tangibles ont été obtenus après électrotransfert d'ADN dans le muscle squelettique où une expression à long terme (plus d'un an) du transgène a été obtenue (Bigey et al., 2002; Deleuze et al., 2002).

L'association de l'ADN avec des polymères cationiques comme la poly(L-lysine) (Ward et al., 2001), le polyéthylénimine (PEI) (Lungwitz et al., 2005), ou des polymères lipidiques cationiques, forme des complexes chargés positivement, qui permettent de condenser l'ADN et de favoriser son passage à travers la membrane cellulaire (Hirko et al., 2003). L'utilisation de ce type de vecteurs s'est révélée particulièrement efficace *in vivo* et notamment dans le système nerveux central (SNC) (Abdallah et al., 1996; Li et al., 2004). Toutefois, l'injection intracérébrale d'ADN à l'aide de liposomes a une efficacité limitée quant à la stabilité de l'ADN et à l'expression du transgène (Kofler et al., 1998). Ce rendement a pu être amélioré par l'injection continue à l'aide d'une pompe osmotique (Imaoka et al., 1998; Hadaczek et al., 2006). Cependant, les risques d'infections limitent l'utilisation clinique de cette approche. Pour franchir cette limite, le gène d'intérêt peut être apporté dans le CNS par l'utilisation de liposomes protégés par du polyéthylène glycol et couplés avec des anticorps, comme l'anticorps OX26 qui reconnaît le récepteur à la transferrine de rat (Pardridge, 2002). L'injection systémique de ces complexes liposomes-anticorps, permet le passage de la barrière hématoencéphalique, via la reconnaissance du récepteur transferrine, et le ciblage des cellules neurales. En dépit du fait que cette méthodologie permet une expression du transgène dans les cellules de l'ensemble du système nerveux central, elle n'offre pas la possibilité d'une expression durable, localisée et cellule spécifique du transgène.

Bien que l'efficacité de ces techniques s'améliorent quotidiennement, leur application au système nerveux central reste encore limitée et nécessite un développement accru avant de supplanter l'emploi des vecteurs viraux.

### **I.2.2. Les vecteurs viraux**

Les vecteurs viraux, qui utilisent les propriétés des virus à transférer leur matériel génétique dans les cellules, sont particulièrement intéressants. Dans le cadre de ce travail, nos efforts se sont portés sur l'utilisation des vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1. Nous porterons une attention particulière aux vecteurs HIV-1, et une description plus succincte sera faite des autres types de vecteurs. Pour la compréhension des paragraphes suivants, il est important de distinguer les notions d'infection et de transduction. L'infection désigne l'accomplissement d'un cycle répliatif complet. En revanche, la transduction désigne l'entrée d'un vecteur viral et l'expression du transgène dans une cellule.

La plus grande partie des approches de thérapie génique expérimentale et clinique est basée sur l'utilisation des vecteurs de transfert de gène dérivés des virus. Les virus sont des agents infectieux qui ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur des cellules qu'ils ont infectées. Ils utilisent la machinerie transcriptionnelle de la cellule à leur propre fin pour se répliquer et produire les protéines virales dont ils ont besoin. Les virions ainsi produits sont libérés hors de la cellule et peuvent à leur tour infecter d'autres cellules. Un vecteur viral de thérapie génique utilise les propriétés infectieuses du virus, c'est-à-dire sa capacité à introduire son matériel génétique dans une cellule, mais les séquences responsables de la répliation sont remplacées par le transgène. Le virus devient alors non répliatif. Cependant, pour certaines applications, et notamment pour une thérapie génique du cancer, certains vecteurs répliatifs sont également développés (Galanis et al., 2001).

Quatre principaux types de vecteurs viraux sont utilisés à l'heure actuelle : les vecteurs dérivés des Adénovirus, des virus associés aux adénovirus (AAV), des virus de l'Herpès, et des rétrovirus, parmi lesquels les lentivirus (Tableau I).

### I.2.2.1. Les Herpès virus (HSV)

Les Herpès virus sont des virus enveloppés à ADN double brin linéaire de 152 kb (figure 2a (Todar, 2006)). Les virus de la famille « Herpes Simplex Virus » (HSV) sont naturellement neurotropes, mais ils ont la capacité d'infecter une large gamme de cellules. L'entrée du virus dans l'organisme se fait généralement en périphérie par les muqueuses ou la peau. Le virus est ensuite transporté de façon antérograde et rétrograde le long des axones et va s'établir durablement dans les neurones à l'état latent (Chiocca et al., 1990; Yamamura et al., 2000). Le virus traverse de manière sélective la synapse, mais peut occasionnellement provoquer la lyse de la cellule infectée (Norgren and Lehman, 1998). Sous l'effet de certains stimuli, des épisodes de réactivation apparaissent, caractérisés par une nouvelle phase de production et d'excrétion virale.

Afin d'exploiter leur grande capacité de clonage (de l'ordre de 150 kb) et leur capacité à atteindre un corps neuronal après inoculation périphérique, deux types de vecteurs dérivés des HSV ont été développés : les amplicons (Saeki et al., 1998) et les vecteurs défectifs pour la réplication (Lilley et al., 2001).

Les amplicons ne conservent du virus que les séquences *cis*-actives qui permettent la réplication et l'encapsidation du vecteur contenant le transgène (figure 2b (Frampton et al., 2005)) . Ces vecteurs sont produits à l'aide de vecteurs helpers ou transcomplémentants qui fournissent en *trans* tous les gènes de structure et de régulation nécessaires (Frenkel et al., 1994). Afin d'éviter la contamination de virus helper dans les stocks, les plasmides amplicons sont amplifiés à l'aide d'un génome HSV dépourvu de séquences d'encapsidation, et intégré soit dans un chromosome artificiel bactérien (Saeki et al., 1998) soit dans une série de cinq cosmides (Fraefel et al., 1996). De cette façon, les gènes viraux exprimés en *trans* sont dépourvus de signaux d'encapsidation ce qui réduit la fréquence d'apparition de virus helper, due à l'absence d'homologie de séquence entre amplicons et séquences transcomplémentantes. Plus récemment, l'utilisation d'un système cre-loxP a permis d'améliorer considérablement les titres des stocks viraux d'amplicons en réduisant le taux de contamination par le virus auxiliaire (Logvinoff and Epstein, 2001; Zaupa et al., 2003).

Les vecteurs HSV défectifs pour la réplication sont mutés ou délétés du maximum de gènes viraux (Palmer et al., 2000; Lilley et al., 2001). Leur production se fait à partir de cellules qui possèdent les gènes capables de compléter en *trans* les fonctions manquantes. Les dernières versions de ce type de vecteurs sont délétées de nombreux gènes précoces. L'expression du transgène est contrôlée par un promoteur contenant des éléments de régulation de l'expression de transcrits associés à la latence du virus (Lilley et al., 2001), ou sous contrôle d'autres promoteurs (promoteur CMV « cytomégalovirus » ou promoteur NSE « neuron-specific-enolase »). Dans ce cas, la cassette d'expression est placée à une distance appropriée de la région transcrite au cours de la période de latence (Palmer et al., 2000).

L'utilisation potentielle des vecteurs dérivés de HSV en clinique est actuellement remise en cause, d'une part à cause de la cytotoxicité du virus auxiliaire dans le cas de vecteurs HSV-amplicons ou bien de l'expression des gènes viraux dans celui des vecteurs recombinants (Bowers et al., 2003). D'autre part, l'incapacité de ces vecteurs à exprimer des transgènes pendant la phase de latence limite leur utilisation. De plus, comme 70 à 95 % des hommes sont porteur du virus HSV-1, l'administration d'un vecteur herpétique pourrait réactiver le virus sauvage et provoquer une encéphalite chez les patients traités (Mammette, 2002).

#### I.2.2.2. Les Virus Associés aux Adénovirus (AAV)

Le virus AAV est un parvovirus de petite taille (20 à 25 nm), non enveloppé et à ADN simple brin de 4,7 kb. Son génome code pour trois protéines de capsid (Cap) et quatre protéines de réplication (Rep), impliquées dans la réplication et la régulation en *trans* de l'expression des gènes. Ces régions sont encadrées par des séquences de 145 pb appelées ITR (Inverted Terminal Repeat), nécessaires en *cis* pour la réplication et l'assemblage des particules virales (figure 3 (Vasileva and Jessberger, 2005)). Ce virus nécessite pour sa réplication l'aide de virus auxiliaires tels que l'adénovirus, l'herpès ou le virus de la vaccine (Hoggan et al., 1966; Lai et al., 2002).

En l'absence de virus auxiliaires, l'AAV sauvage s'intègre préférentiellement dans un locus spécifique du chromosome 19 humain, AAVS1 en position q13.3-qter (Kotin et al., 1990; Kotin et al., 1992; Berns and Giraud, 1996; Linden et al., 1996).

La première preuve expérimentale d'utilisation des AAV comme vecteurs de transfert de gène a été apportée en 1984 (Hermonat and Muzyczka, 1984). Les premiers vecteurs utilisés ont gardé leur capacité de s'intégrer dans le chromosome 19 (Shelling and Smith, 1994), mais leurs faibles capacités de clonage ont limité leur utilisation. La suppression de la totalité de leurs séquences virales à l'exception des ITR a permis d'augmenter leurs capacités de clonage (jusqu'à 4,6 kb), mais également de s'affranchir de l'effet inhibiteur exercé par la région *rep* sur l'expression des gènes (Pereira et al., 1997). La question de l'intégration du vecteur AAV est toujours débattue à l'heure actuelle. Dans certains types cellulaires (cellules épithéliales et cellules musculaires), les vecteurs AAV restent majoritairement sous forme épisomales (Kearns et al., 1996; Duan et al., 1999), ce qui limite les risques de mutagenèse insertionnelle et l'activation d'oncogènes (Tenenbaum et al., 2003). Toutefois, ces vecteurs peuvent s'intégrer de façon aléatoire dans le génome de la cellule en prolifération (Rutledge and Russell, 1997) ou quiescente (Du et al., 1996; Wu et al., 1998). L'intégration semble être favorisée à proximité de séquences régulatrices de gènes (Miller et al., 2002; Nakai et al., 2003; Miller et al., 2005a), induisant des réarrangements chromosomiques comme des délétions ou des translocations, avec comme conséquence le risque de perturber l'expression des gènes (Nakai et al., 2005).

Les vecteurs AAV se sont révélés efficaces pour transduire des neurones (Kaplitt et al., 1994). Ils ont été utilisés avec succès dans des modèles animaux de maladie de Parkinson (MP)(Bjorklund et al., 2000; Muramatsu et al., 2002; Wang et al., 2002; Li et al., 2006), de la maladie de Huntington (MH)(McBride et al., 2003; Kells et al., 2004; Xia et al., 2004), ou de lésions de la moelle (Lu et al., 2003; Ruitenberg et al., 2004). De plus, ces vecteurs ont montré une absence de toxicité après une (Chamberlin et al., 1998) ou plusieurs injections (Mastakov et al., 2002) dans le cerveau. Toutefois, une réponse humorale dirigée contre la capsid après une première injection de virus recombinants a été rapportée, dans ces modèles (Manning et al., 1998; Sabatino et al., 2005) ou chez des animaux naturellement préimmunisés (Gao et al., 2003; Zaiss and Muruve, 2005). La présence chez l'homme d'anticorps circulants dirigés contre l'AAV sauvage peut compromettre l'injection répétée

de vecteur AAV (Chirmule et al., 2000). En effet, le sérotype le plus répandu dans la population est l'AAV-2 qui est également celui le plus utilisé comme vecteur de transfert de gène (Chirmule et al., 1999; Moskalenko et al., 2000). Une solution serait d'utiliser l'un des 8 sérotypes différents (Grimm and Kay, 2003; Wu et al., 2006), des sérotypes non-humains (Gao et al., 2003) ou des AAV chimériques combinant deux sérotypes (Bowles et al., 2003). Dans ce sens, une étude a montrée que des anticorps neutralisants dirigés contre chaque sérotype ne réagissaient pas ou peu de manière croisée après administration musculaire (Riviere et al., 2006).

### I.2.2.3. Les adénovirus

Les adénovirus ont été mis en évidence en 1953 par Rowe à partir de tissus d'amygdales et de végétations prélevés sur des enfants (Rowe et al., 1953). Aujourd'hui, 51 sérotypes humains ont été mis en évidence (De Jong et al., 1999; Ebner et al., 2006). Les adénovirus sont des virus à ADN double brin de 36 kb et d'environ 80 nm de diamètre. Ce sont des virus dépourvus d'enveloppe mais entourés d'une capsidie icosaédrique (figure 4a, (Russell, 2000)). Le génome se compose d'unités de transcriptions précoces (E1-E4), intermédiaires (IX, IVa2) et tardives (MLTU, Major Late Transcription Unit), ainsi que des éléments non codants nécessaires en *cis* pour la propagation et l'assemblage du virus. La séquence  $\Psi$  et les séquences ITR qui servent d'origine de réplication, se trouvent aux extrémités du génome (figure 4b).

Les vecteurs adénoviraux utilisés comme vecteurs de transfert de gène sont dérivés des adénovirus de sérotype 2 ou 5 du groupe C. Le génome viral reste épisomal, ce qui entraîne une expression transitoire dans les cellules en division, mais une expression prolongée du transgène est observée dans les cellules quiescentes. On distingue des vecteurs de « première génération », délétés des régions E1 et éventuellement E3, des vecteurs de « deuxième génération » qui comportent une mutation supplémentaire dans E2, et des vecteurs de « troisième génération » délétés de E4 en plus de E1 et éventuellement E3. Les derniers nés des vecteurs adénoviraux sont dits vecteurs "gutless" et sont délétés de la totalité des gènes viraux à l'exception des séquences ITR et de la séquence d'encapsidation.

Les vecteurs adénoviraux “gutless” sont produits dans des cellules 293 en présence d’un virus auxiliaire capable d’apporter en trans les facteurs nécessaires à leur réplication et leur encapsidation. Chez l’animal, les vecteurs adénoviraux présentent un large tropisme cellulaire et se sont révélés efficaces dans le SNC (Le Gal La Salle et al., 1993; Horellou et al., 1994; Mallet et al., 1994). De plus, ils ont la capacité d’être transporté de façon rétrograde le long de l’axone (Ridoux et al., 1994; Ghadge et al., 1995). La forte inflammation (Byrnes et al., 1995) induite par la première génération de vecteurs adénoviraux a été réduite par l’utilisation des vecteurs « gutless » (Mitani et al., 1995). Ce dernier type de vecteur permet une expression à long terme du transgène dans le cerveau (Thomas et al., 2000). Chez l’homme, l’utilisation de ces vecteurs peut être entravée par la présence d’anticorps neutralisants produits suite à une primo-infection par un adénovirus sauvage. Cette limite peut être dépassée par l’utilisation de vecteurs adénoviraux non humains (canins par exemple) (Klonjkowski et al., 1997). Une deuxième limitation à l’utilisation de ces vecteurs est liée à la présence de virus auxiliaires contaminants (de l’ordre de 0,01 à 1% des particules virales totales) (Logvinoff and Epstein, 2001; Sakhuja et al., 2003). Ceci demeure un point faible qu’il faudra résoudre en vue d’une application clinique de ces vecteurs.

#### **I.2.2.4. Les lentivirus**

##### *I.2.2.4.1. structure*

Les lentivirus (ou virus lents) appartiennent à la famille des rétrovirus qui se caractérisent par un génome composé de deux molécules d’ARN à polarité positive. Lors du cycle d’infection, cet ARN est rétrotranscrit en ADN, formant ainsi le génome proviral. Celui-ci s’intègre alors dans le génome de la cellule hôte et utilise sa machinerie cellulaire pour former de nouveaux virions qui sont libérés par bourgeonnement hors de la cellule. D’un point de vue structural, les virions sont des particules sphériques enveloppées, d’un diamètre de 80 à 120 nm, présentant un “core” (ou nucléocapside) interne, qui protège le génome (figure 5, (Goldschmidt, 2004)).

Comme tous les rétrovirus, les lentivirus contiennent les gènes de structures *gag*, *pro*, *pol* et *env*. Le gène *gag* code les protéines MA (matrice intramembranaire), CA (capside, qui protège le core) et NC (nucléocapside formant le core qui protège le génome viral). Le gène *pro* est imbriqué dans les gènes *gag* ou *pol* et code la protéine PR (protéase responsable du clivage des produits des gènes *gag* et *pol*). Le gène *pol* code les deux enzymes nécessaires au cycle de réplication du virus : la rétrotranscriptase (RT) qui permet de convertir le génome ARN en ADN et possède en plus une activité RNaseH nécessaire au cycle de rétrotranscription, et l'intégrase (IN) nécessaire à l'intégration du génome proviral dans le génome de la cellule hôte. Enfin, le gène *env* est essentiel pour la liaison du virus et son entrée dans la cellule hôte. Il code deux sous unités protéiques de l'enveloppe : SU (glycoprotéine de surface externe, gp120) et TM (protéine transmembranaire, composant interne de la glycoprotéine de l'enveloppe, gp41). La glycoprotéine de surface est nécessaire pour la liaison aux récepteurs cellulaires, alors que la glycoprotéine transmembranaire est responsable de la fusion avec la membrane cellulaire (Coffin, 1996) (exemple du VIH-1, figure 6).

En plus des gènes de structures, les lentivirus contiennent également des gènes accessoires et de régulation nécessaires à l'expression des gènes viraux, à l'assemblage des particules virales et aux pouvoirs pathogènes des virus.

Le génome des rétrovirus est formé de deux molécules d'ARN polyadénylées et coiffées, de 7 à 12 kb de longueur. Chez tous les rétrovirus, les extrémités du génome viral sont composés de séquences non codantes constitué par :

- La séquence R : séquence répétée à chaque extrémité du génome, indispensable à la transcription inverse pour assurer un transfert correct des chaînes en cours de synthèse. Le site d'initiation de la transcription se situe en 5' de cette séquence. En 5', cette séquence est coiffée, alors que celle en 3' est polyadénylée.

- La séquence U5 : située en 5' du génome entre R et le site de fixation de la première amorce de la transcription inverse (PBS). Elle forme l'extrémité 3' du génome proviral. L'extrémité 3' contient un des sites *att* nécessaires au génome proviral.

- La séquence L, dite région "leader" : située entre PBS et le codon d'initiation de la traduction du gène *gag*. Elle contient le premier signal d'épissage commun aux messagers

viraux ainsi que les signaux spécifiques pour l'encapsidation du génome viral dans le virion (la séquence  $\Psi$ ).

- La séquence PPT (Polypurine Tract) : séquence riche en A/G, nécessaire à la synthèse du brin positif d'ADN durant la rétrotranscription. Chez les lentivirus, cette séquence est aussi présente en position centrale dans le génome et est appelée central polypurine tract ou cPPT.

- La séquence U3 : séquence unique en 3' située entre le PPT et R. Elle contient les signaux de régulation de l'expression virale mais aussi le signal de polyadénylation chez la plupart des rétrovirus. Elle porte également à son extrémité 3', une séquence *att*, nécessaire à l'intégration.

La duplication des séquences U3 et U5 lors de la rétrotranscription forme, avec la séquence R aux extrémités du génome proviral, le LTR (Long Terminal Repeat) (figure 6).

Les lentivirus sont constitués de 8 espèces de virus actuellement répertoriés (Büchen-Osmond, 2006), mais le plus connu et le plus étudié est le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) (figure 5).

Le VIH est responsable d'une maladie chronique à évolution lente : le syndrome de l'immunodéficience acquise ou SIDA. Le VIH se caractérise par la présence de plusieurs gènes accessoires : *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* et *rev*. Seules les protéines Tat et Rev sont indispensables au cycle viral.

- La protéine Tat augmente l'initiation de la transcription des gènes viraux à partir du LTR viral et l'efficacité d'élongation des ARN transcrits.

- La protéine Rev est un transactivateur post-transcriptionnel qui permet l'export nucléaire de l'ARN viral non épissé.

- La protéine Vpr (protéine Virale R) joue un rôle dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration et diminue le taux de mutations au cours de la rétrotranscription (Mansky et al., 2000; Chen et al., 2004). De plus, elle conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Goh et al., 1998) et augmente l'activité des promoteurs transcriptionnels et ainsi la production virale (Wang et al., 1995; Agostini et al., 1996).

- La protéine Nef (Facteur Négatif), contrairement à son nom, agit comme un facteur positif en augmentant la réplication virale et l'infectivité (Schiavoni et al., 2004; Witte et al., 2004).

- La protéine Vif (Facteur d'Infectivité Virale) joue un rôle important dans la pathogénicité du virus. Vif interagit spécifiquement avec l'ARN viral (Dettenhofer et al., 2000; Zhang et al., 2000; Khan et al., 2001) et les précurseurs protéiques Gag ou Gag-Pol (Huvent et al., 1998) ce qui permet son encapsidation au sein d'un complexe nucléoprotéique. Enfin, Vif pourrait également jouer un rôle dans la stabilisation du core du virus (Hoglund et al., 1994; Ohagen and Gabuzda, 2000).

- La protéine Vpu régule négativement l'expression membranaire du récepteur CD4 (Chen et al., 1993). Elle favorise le relargage des virions (Gottlinger et al., 1993).

#### *1.2.2.4.2. Cycle répliatif des lentivirus : cas du VIH-1*

Dans le cadre de ce manuscrit, seul le cycle répliatif du VIH-1, qui est à l'origine du vecteur lentiviral que nous avons utilisé pour notre étude sera présenté. Toutefois, le cycle de vie du VIH-1 est similaire à celui de tous les membres du genre des lentivirus.

Le VIH-1 infecte en priorité les lymphocytes CD4+, mais d'autres cellules du système immunitaire peuvent être atteintes, notamment les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, ainsi que les cellules des systèmes lymphatique, hématopoïétique et nerveux.

Le cycle répliatif du VIH-1 se divise en deux phases principales :

a) Une phase dite pré-intégrative, qui débute par la reconnaissance de la cellule hôte, l'entrée du virus et sa décapsidation, puis se poursuit par l'étape de rétrotranscription, d'import nucléaire du génome viral et se termine par l'intégration de l'ADN proviral. Ces étapes sont principalement réalisées par les protéines virales présentes dans le virion.

b) Une phase post-intégrative, qui débute par l'étape de transcription du provirus intégré, puis la traduction des protéines virales, l'assemblage et la maturation du virion et enfin par le bourgeonnement des particules virales. Au cours de cette phase, le virus détourne la machinerie de transcription, d'épissage, de transport et de traduction de la cellule par

l'action de certaines protéines virales comme Tat et Rev pour effectuer sa propre réplication.

a) La phase pré-intégrative (figure 7 (Didierjean, 2005))

a.1. Entrée du virus dans la cellule hôte

L'entrée du virus et la libération de son matériel génétique dans la cellule cible nécessitent trois étapes (Cooley and Lewin, 2003):

- L'entrée est initiée par la fixation du virus à la cellule cible via la reconnaissance spécifique entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et le récepteur cellulaire CD4 (Dalglish et al., 1984; Maddon et al., 1986). Cette interaction induit le changement conformationnel de la protéine virale gp120 qui permet ainsi un attachement sélectif au co-récepteur de la cellule cible.

- L'association du complexe gp120/CD4 au co-récepteur libère le peptide de fusion de la protéine virale gp41. L'insertion de ce peptide dans la membrane plasmique de la cellule hôte facilite le rapprochement et la fusion des membranes cellulaire et virale. Deux types de co-récepteurs sont impliqués dans l'entrée du virus : CXCR-4 et CCR5 (récepteurs aux chimiokines) (Zaitseva et al., 1997).

- La fusion des deux membranes est suivie par l'entrée de la capsid dans la cellule infectée.

Il est à noter que les vecteurs dérivés du VIH-1 sont généralement pseudotypés par une enveloppe appartenant à un autre virus. L'entrée du vecteur dans la cellule hôte sera par conséquent conditionnée au type d'enveloppe utilisée.

a.2. Etape de décapsidation et de rétrotranscription

La fusion entre les membranes virales et cellulaires entraîne l'entrée du virus encapsidé à l'intérieur du cytoplasme. Le virus subit ensuite une étape de "décapsidation" qui conduit à la libération du complexe viral nucléoprotéique : le complexe de

rétrotranscription. La cyclophiline A, présente dans les particules virales et associée au “core”, jouerait un rôle dans le processus de décapsulation (Aiken, 1997). Le complexe de rétrotranscription est composé de l'ARN génomique viral, l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup>, et de différentes protéines virales et cellulaires.

La synthèse de l'ADN proviral double brin (ou provirus) à partir de l'ARN viral (servant de matrice) et de l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup> (utilisé comme amorce) est réalisée au cours de l'étape nommée rétrotranscription, sous l'action de la RT virale.

a.3. Etape de rétrotranscription ou synthèse du provirus (figure 8 (Goldschmidt, 2004)).

La rétrotranscription est une étape clé du cycle répliatif de HIV-1 qui s'effectue selon un processus schématisé dans la figure 8. L'initiation de la rétrotranscription débute par la fixation de l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup> par sa partie 3'-terminale sur la séquence PBS, située en aval de la région U5 du LTR 5'. Orchestré par la RT, la synthèse du brin (-) d'ADN démarre à l'extrémité 3' de l'ARNt et se poursuit jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN viral. Cette petite séquence d'ADN néosynthétisée va ensuite s'apparier à la séquence R en 3' et servir d'amorce pour la rétrotranscription du brin (-). Simultanément, la RT (via son activité RNase H) détruit la matrice ARN au fur et à mesure que progresse la rétrotranscription. Seuls les hétéroduplex ARN/ADN correspondant aux séquences des PPT central et 3' résistent à la dégradation par la RNase H et permettent l'initiation de l'étape suivante. La synthèse du second brin d'ADN (+) est amorcée en deux points d'initiation de la rétrotranscription. Elle s'effectue à la fois à partir du PPT3' mais également à partir du PPT central (cPPT). Le fragment d'ADN initié au PPT3' est synthétisé jusqu'au PBS3'. Ce fragment d'ADN synthétisé subit alors un saut de brin et s'apparie avec le PBS5'. A ce niveau se poursuit la synthèse d'ADN jusqu'au CTS central. Au même moment, un fragment d'ADN de brin (+) est synthétisé depuis le cPPT jusqu'au PBS 3'. Ces doubles étapes d'élongation conduisent à la double synthèse de la séquence comprise entre le cPPT et le CTS, permettant la formation d'une structure ADN à trois brins sur 99 nucléotides dénommée ADN « flap » central ou triplex central. Cette structure conditionne la translocation nucléaire du génome viral (Zenou et al., 2000).

Le produit final de la rétrotranscription est une molécule d'ADN double brin linéaire contenant un « ADN flap » central et deux extrémités identiques, les LTR, contenant les séquences U3, R et U5.

#### a.4. Import nucléaire du provirus (figure 9 (Sherman and Greene, 2002))

Le matériel génétique des lentivirus est transporté dans le noyau sous forme d'un complexe dénommé "Complexe de Pré-Intégration" (CPI) (Sherman and Greene, 2002). Ce complexe est obtenu après l'étape de rétrotranscription et comprend l'ADN proviral néosynthétisé, des protéines virales comme l'intégrase, la MA, et Vpr (Miller et al., 1997) et des protéines cellulaires comme la protéine HMG I (High Mobility Group) (Farnet and Bushman, 1997) et BAF (Barrier to Autointegration Factor) (Lin and Engelman, 2003). De plus, la présence de séquences de localisation nucléaires (NLS) au sein des protéines IN (Bouyac-Bertoia et al., 2001), MA (Bukrinsky et al., 1993; Haffar et al., 2000) et Vpr (Jenkins et al., 1998), ainsi que la séquence du « flap central » (Zennou et al., 2000) facilite l'import nucléaire du CPI. Toutefois, à l'heure actuelle, de nombreux doutes subsistent sur le mécanisme exact de l'import nucléaire du CPI (Piller et al., 2003).

#### a.5. Intégration du provirus (figure 10 (Goldschmidt, 2004))

Dans le noyau, le provirus existe sous 3 formes : sous forme circulaire à un ou deux LTR, qui ne s'intègre pas, dont le rôle n'est pas encore élucidé, ou sous forme linéaire qui s'intègre dans le génome de la cellule hôte. Cette réaction est catalysée par l'intégrase virale qui reconnaît spécifiquement des séquences de 5 à 10 nucléotides appelées *att* ou "Inverted Repeat" (IR), situées aux extrémités des deux LTR du génome viral. A chaque extrémité 3', l'intégrase clive un dinucléotide GT pour libérer un dinucléotide CA porteur d'un groupement hydroxyle. Par la suite, cette enzyme clive l'ADN génomique cellulaire, puis lie chacune des extrémités 3'-OH de l'ADN viral aux extrémités 5'-phosphate de l'ADN cellulaire. Enfin, les discontinuités obtenues au niveau des sites de ligation sont réparées par l'excision des nucléotides viraux et cellulaires non appariés. Cette dernière fait intervenir des protéines cellulaires, telles que HMG I et BAF (Barrier to autointégration factor) (Chen and Engelman, 1998). Dans la cellule, le nombre et les sites d'intégration du provirus sont

multiplés (Jung et al., 2002). Toutefois, il a été rapporté des sites préférentiels d'intégration ou « hotspot » dans des loci actifs du génome cellulaire (Schroder et al., 2002).

#### b) Phase post-intégrative

Cette phase débute par les étapes de synthèse des ARN viraux, suivie de la production des protéines virales, de l'assemblage des particules nucléoprotéiques, puis se termine par le bourgeonnement des particules à l'extérieur de la cellule et la maturation protéolytique des virions. Le développement d'outils de transfert de gène à partir du VIH-1 consiste à ne conserver que la phase d'intégration du provirus dans le génome et à supprimer la phase post-intégrative.

### **1.3. Obtention des vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1**

#### **1.3.1. Caractéristiques et production**

Ce qui caractérise un vecteur par rapport au virus dont il dérive, est son incapacité à se répliquer après son entrée dans la cellule cible. Un vecteur lentiviral n'exploite que les phases précoces ou pré-intégratives du cycle viral. Ces différentes étapes sont indépendantes de la synthèse de protéines virales, de sorte que la majeure partie du génome viral peut être déléetée et remplacée par une (des) séquence(s) d'intérêt(s). Les séquences virales qui doivent être conservées sont celles qui agissent en *cis* (RRE pour l'export des génomes ARN,  $\Psi$  pour l'encapsidation, PBS pour l'amorce de la rétrotranscription, PPT et cPPT pour la synthèse du brin positif, LTR et séquence *att* pour l'intégration du provirus). Toutefois, pour la production des particules virales, il est nécessaire d'apporter en *trans* les séquences d'expression des protéines de structures (*gag*), des enzymes (*pol*) et de l'enveloppe pour permettre au génome du vecteur d'être encapsidé et enveloppé correctement, ainsi que les protéines accessoires Tat et Rev.

Le principe de production de ces vecteurs repose sur la co-transfection transitoire de trois plasmides dans des cellules HEK-293T (figure 11) :

- le plasmide de transcomplémentation dans lequel les séquences LTR5',  $\Psi$  et LTR3' ont été délétées afin d'empêcher l'encapsidation de l'ARN transcrit par ce plasmide et sa rétrotranscription.
- le plasmide d'enveloppe dans lequel les gènes codant les protéines d'enveloppe du VIH-1 peuvent être remplacées par les gènes codant les protéines d'enveloppe d'autres virus. C'est le pseudotypage.
- le plasmide d'expression du génome ARN vecteur, qui sera encapsidé dans la particule virale est quant à lui composé de :
  - La (les) cassette(s) d'expression(s) du (des) Transgène(s) d'intérêt(s)
  - Deux LTR, pour la rétrotranscription
  - La séquence  $\Psi$  pour l'encapsidation de l'ARN vecteur dans les capsides
  - La séquence RRE sur laquelle se fixe la protéine Rev

Après la co-transfection transitoire de ces trois plasmides dans des cellules HEK-293T, le surnageant est récolté et les particules virales sont concentrées par ultracentrifugation (Naldini et al., 1996b) (figure 11). Les particules recombinantes peuvent être titrées, d'une part en mesurant la quantité de particules physiques, et d'autre part en mesurant la quantité de particules infectieuses. Pour quantifier les particules physiques, la protéine virale p24 de la capsid est dosée par ELISA. Cette quantité, exprimée en ng de p24 par  $\mu\text{l}$ , ne reflète pas la qualité des particules virales produites, c'est à dire leur capacité à transduire efficacement une cellule. Les particules infectieuses sont quantifiées en transduisant des cellules avec des dilutions croissantes du stock du vecteur et en dénombrant les cellules exprimant le transgène. L'efficacité de transduction est alors exprimée en TU (Transducing Units) par ml.

Afin de garantir la biosécurité des vecteurs lentiviraux, l'utilisation de trois plasmides permet de réduire les risques d'encapsider les ARN codés par les gènes viraux, mais également de s'affranchir des risques de recombinaison entre les diverses séquences d'ADN codant pour le vecteur et celles codant pour les gènes du virus. Dans ces

conditions, la reconstitution biologique d'un rétrovirus compétent pour la réplication (RCR) au cours de la production de particules de vecteurs viraux nécessite trois événements successifs de recombinaison. En effet, le remplacement dans le plasmide transcomplémentant des LTR par un promoteur CMV en 5' et par un signal de polyadénylation en 3', réduit considérablement les risques de recombinaisons homologues entre ce plasmide et le plasmide vecteur. De plus, l'absence de la séquence  $\Psi$  dans le plasmide transcomplémentant empêche l'encapsidation des ARNm codant les gènes viraux.

### I.3.2. Pseudotypage des vecteurs lentiviraux

La présence des glycoprotéines d'enveloppe à la surface des virus détermine leur affinité pour un type cellulaire, un tissu ou une espèce donnée. C'est ce qu'on appelle le tropisme. Le changement d'enveloppe pour la production de vecteurs lentiviraux modifie leurs caractéristiques. Des particules virales qui portent l'enveloppe d'un autre virus (hétérologue), ou une enveloppe dont la séquence est manipulée (chimérique), sont appelées des pseudotypes. La glycoprotéine d'enveloppe la plus utilisée pour les vecteurs lentiviraux, et en particulier pour ceux qui dérivent du HIV-1, est la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G). Celle-ci permet d'obtenir des vecteurs capables de transduire un large panel de cellules de mammifère, mais également de poissons, d'amphibiens ou d'insectes (Burns et al., 1993). VSV-G est l'unique protéine membranaire intrinsèque des vésiculovirus dont fait partie le VSV. Elle remplit à ce titre de nombreuses fonctions au cours du cycle viral. Celui-ci débute par l'adhésion du vecteur à la membrane par la reconnaissance de la glycoprotéine G et d'un récepteur cellulaire, ce qui induit l'endocytose de la particule virale. L'abaissement du pH dans le compartiment endosomal active la glycoprotéine G, ce qui déclenche le processus de fusion membranaire entre les membranes virales et endosomales, libérant ainsi le génome viral dans le cytoplasme (Rolls et al., 1994). Le récepteur du VSV n'est pas connu actuellement avec certitude. Pendant longtemps, le seul récepteur proposé était la phosphatidylsérine (Schlegel et al., 1983). Toutefois, une étude récente vient de montrer que la phosphatidylsérine n'est pas le récepteur de surface cellulaire du VSV, mais que ce lipide pouvait être impliqué dans les phases précoces

d'entrée du virus (Coil and Miller, 2004). De même, la clathrine serait également impliquée dans le processus d'endocytose des particules virales (Sun et al., 2005).

La reconnaissance, l'intégration dans la cellule hôte et la décapsidation des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV-G suivent probablement le schéma pré-intégratif des virus VSV. En revanche, la rétrotranscription, l'import nucléaire et l'intégration de l'ADN proviral suivent probablement le schéma pré-intégratif du VIH-1. Quoi qu'il en soit, le pseudotypage des vecteurs lentiviraux avec VSV-G a permis non seulement d'élargir le tropisme des vecteurs, mais également de conférer une stabilité aux particules virales permettant ainsi leur concentration par ultracentrifugation (Burns et al., 1993; Yee et al., 1994; Akkina et al., 1996; Bartz and Vodicka, 1997).

### **I.3.3. Améliorations des vecteurs lentiviraux**

Les performances des vecteurs dérivés du HIV-1 ont été améliorées, soit dans le sens d'une plus grande efficacité, soit dans le sens d'une meilleure sécurité.

#### **I.3.3.1. Amélioration de l'efficacité des vecteurs**

L'amélioration de leur efficacité s'est portée au niveau des titres de production, de l'efficacité de transduction et de l'efficacité de l'expression du transgène.

Des lignées cellulaires dites « lignées d'empaquetages » exprimant de façon stable VSV-G ont été développées (Kafri et al., 1999; Klages et al., 2000). Ces lignées permettent de s'affranchir de la variabilité des productions des stocks de vecteurs, et ouvrent également la voie à une production à grande échelle de ces vecteurs. Toutefois, la cytotoxicité observée suite à l'expression constitutive de VSV-G représente une limite à cette technique. Cette limite peut être levée en contrôlant l'expression de VSV-G via un promoteur inducible par la doxycycline (Kafri et al., 1999; Farson et al., 2001; Xu et al., 2001a) ou par l'ecdysone (Pacchia et al., 2001). Ces lignées permettent un rendement significatif de particules infectantes.

Le deuxième axe d'amélioration de l'efficacité des vecteurs porte sur leur potentiel transductionnel. L'utilisation de VSV-G a permis d'accroître le tropisme des particules recombinantes et donc l'efficacité de transduction (Naldini et al., 1996b). D'autre part, l'introduction de la séquence ADN flap centrale a permis de favoriser l'import nucléaire des vecteurs et d'augmenter leur efficacité de transduction (Follenzi et al., 2000; Zennou et al., 2001).

Enfin, les modifications qui visent à améliorer l'expression du transgène interviennent à deux niveaux :

(1) Au niveau transcriptionnel, l'ajout d'une séquence MAR (Matrix Attachment Region ou séquence d'attachement à la matrice) améliore la conformation du provirus dans la chromatine, ce qui favorise la fixation des facteurs de transcriptions cellulaires et donc l'expression du transgène (Park and Kay, 2001; Lutzko et al., 2003). De plus, l'utilisation de promoteurs forts ubiquitaires et/ou adaptés au tissu ciblé permet une transduction efficace et à long terme du transgène (Boulos et al., 2006).

(2) Au niveau post-transcriptionnel, l'ajout de séquences telles que la séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element) ou les régions 3' ou 5' non traduites (UTR) a permis de favoriser la stabilité des ARNm et l'expression du transgène (Zufferey et al., 1999; Brun et al., 2003; Hlavaty et al., 2005). Toutefois, Klein et collaborateurs ont montré que l'efficacité de la séquence WPRE pouvait dépendre du promoteur et du type cellulaire utilisé (Klein et al., 2006). De plus, une activité oncogène du WPRE a été rapportée (Kingsman et al., 2005), mais à cette date aucune autre étude n'est venue infirmer ou confirmer ce résultat.

### **I.3.3.2. Amélioration de la biosécurité**

#### *I.3.3.2.1. Des productions améliorées*

Afin de renforcer la biosécurité des vecteurs lentiviraux, plusieurs modifications ont été apportées :

- l'utilisation de quatre plasmides (séparation de Rev dans un quatrième plasmide), permet de diminuer le risque de formation de RCR (Dull et al., 1998).

- le remplacement du promoteur LTR 5' par un promoteur ubiquitaire CMV permet de s'affranchir de Tat sans affecter le titre ou l'efficacité de transduction des particules virales (Dull et al., 1998).
- la substitution de système rev/RRE d'export nucléaire de l'ARN viral par le système d'export issu d'autre virus réduit le risque de formation de RCR (Gasmi et al., 1999).
- la délétion des quatre gènes accessoires (*vpr*, *vif*, *nef* et *vpu*) dans le plasmide transcomplémentant améliore la biosécurité des vecteurs lentiviraux sans affecter l'efficacité de transduction des vecteurs (Zufferey et al., 1997; Kim et al., 1998).
- la délétion des séquences enhancer de la région U3 du LTR 3' dans le plasmide vecteur rend le LTR 5' non fonctionnel pour toute recombinaison. Les vecteurs qui possèdent cette délétion sont dits vecteur SIN (pour *self-inactivating*) ou encore delta-U3 (Miyoshi et al., 1998; Zufferey et al., 1998; Iwakuma et al., 1999).

#### *1.3.3.2.2. Les vecteurs non intégratifs*

La mutagenèse insertionnelle des vecteurs lentiviraux est un des risques de la thérapie génique. Afin d'éviter ce risque, plusieurs équipes parmi lesquelles celles du LGN, ont développé de nouveaux vecteurs non intégratifs. La stratégie consiste à empêcher l'intégration du provirus dans le génome hôte et de favoriser les génomes circulaires épisomaux. Pour cela, deux approches ont été utilisées. La première consiste à l'utilisation de vecteurs qui portent des mutations dans la séquence *att* (Nightingale et al., 2006). La deuxième consiste à utiliser des mutants d'intégrase incapable de catalyser la réaction d'intégration (Philippe et al., 2006; Yanez-Munoz et al., 2006). Ces vecteurs se sont révélés particulièrement efficaces pour une expression à long terme des transgènes *in vitro* et *in vivo*. En effet, une expression du transgène de plus de six mois est obtenue après injection du vecteur non intégratif dans la rétine (Philippe et al., 2006; Yanez-Munoz et al., 2006). Le développement des vecteurs lentiviraux non-intégratifs constitue un pas important pour l'application clinique des vecteurs lentiviraux dans des cellules quiescentes ou lorsqu'une expression transitoire dans des cellules en division est requise.

### I.3.3.2.3. Les vecteurs à intégrations ciblées

Une voie alternative pour s'affranchir du problème de mutagenèse insertionnelle consiste à développer des vecteurs à intégration ciblée. Deux stratégies sont actuellement explorées. La première stratégie serait d'utiliser la recombinase unidirectionnelle de phage phiC31 (Groth et al., 2000; Thyagarajan et al., 2001; Chalberg et al., 2005; Chalberg et al., 2006). L'intégrase phiC31 est une enzyme du phage phiC31 du genre *Streptomyces*. Cette enzyme catalyse la recombinaison au niveau de deux sites d'attachement, attB et attP. Le site attP est localisé dans le génome du phage phiC31, alors que attB est retrouvé dans le génome hôte *Streptomyces* (figure 12) (Ginsburg and Calos, 2005). Cette intégrase s'est révélée fonctionnelle dans les cellules humaines HEK-293 (Groth et al., 2000). L'intégrase phiC31 a permis de catalyser avec une fréquence de 15% l'intégration d'un plasmide porteur du site attB et exprimant un transgène dans le génome de cellules HEK-293 contenant une copie du site attP (Thyagarajan et al., 2001). Pour les 85 % restant, l'intégration a lieu au niveau de pseudo-sites attP, présent naturellement dans le génome des cellules humaines (Thyagarajan et al., 2001). Il est donc envisageable d'utiliser cette intégrase pour le développement de vecteurs lentiviraux à intégration ciblée. La deuxième stratégie consiste à modifier la spécificité de l'intégrase du HIV1 en fusionnant celle-ci avec un domaine de reconnaissance à l'ADN spécifique, tel que le domaine de liaison à l'ADN des protéines en doigt de zinc (Bushman and Miller, 1997; Tan et al., 2004). En effet, les virions qui portent une intégrase fusionné avec la protéine en doigt de zinc zif268, sont compétant pour la réplication et l'intégration (Bushman and Miller, 1997). Cette dernière s'effectue préférentiellement à proximité du site de liaison de zif268 (Bushman and Miller, 1997). De même, l'utilisation de l'intégrase fusionné avec la protéine en doigt de zinc E2C permet l'intégration du provirus à proximité du site de liaison de E2C (Tan et al., 2004). Bien que ces intégrases ne soient pas encore efficace, ces travaux constituent un pas important dans le développement de vecteur à intégration ciblée, ce qui ouvre la voie à une thérapie génique plus sûr.

#### **1.4. Vecteurs lentiviraux et transfert de gène dans le système nerveux central**

Les vecteurs lentiviraux sont considérés comme des outils de choix pour le transfert de gène dans le SNC. En effet, ils sont capables de transduire à la fois les cellules en division et les cellules quiescentes (Naldini et al., 1996a; Blomer et al., 1997). De plus, avec une capacité de clonage qui est de 8 kb, ils possèdent une capacité de clonage supérieure à celle de l'AAV (4,5 kb) (Naldini et al., 1996b). Enfin, leur tropisme peut être aisément modifié grâce à un pseudotypage à l'aide d'une large variété d'enveloppes (Watson et al., 2002; Wong et al., 2004). L'injection directe *in vivo* des vecteurs lentiviraux a permis de transduire une large variété de cellules du SNC parmi lesquelles les neurones (Naldini et al., 1996a; Blomer et al., 1997), les astrocytes (Consiglio et al., 2004), les cellules souches nerveuses adultes (Geraerts et al., 2006), les oligodendrocytes (McIver et al., 2005), la microglie (Balcaitis et al., 2005) et les cellules de gliome (Miletic et al., 2004). Pour toutes ces raisons, les vecteurs dérivés du VIH-1 sont des vecteurs lentiviraux particulièrement intéressants pour les applications dans le SNC (Jakobsson and Lundberg, 2006).

Les vecteurs lentiviraux utilisés sont généralement pseudotypés avec VSV-G (Emi et al., 1991). L'injection de ce type de vecteur dans le cerveau de rongeurs et de primates permet une expression stable et à long terme du transgène (Blomer et al., 1997; Kordower et al., 1999). Une transduction essentiellement neuronale a été rapportée après injection de lentivirus VSV-G dans l'hippocampe de rats (Naldini et al., 1996b; Blomer et al., 1997; Deglon et al., 2000; Baekelandt et al., 2002), dans le striatum et la substance noire de primates (Kordower et al., 1999). Toutefois, le tropisme neuronal des vecteurs pseudotypés par VSV est controversé. En effet, l'expression majoritairement neuronale dépendrait du promoteur utilisé (Jakobsson et al., 2003; Jakobsson et al., 2004). Il semblerait que ces promoteurs aient une faible activité dans les cellules gliales *in vivo* (Jakobsson et al., 2003).

Dans certains cas, l'expression restreinte à un certain type cellulaire peut s'avérer nécessaire. Par exemple, l'expression dans le striatum de modèles animaux de maladie de Parkinson (MP) de facteurs neurotrophiques tel que le GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) a conduit à un « sprouting » aberrant dans des structures non désirées

(Georgievska et al., 2002). Cet effet secondaire peut être limité en restreignant l'expression du GDNF aux astrocytes. Ceci peut être effectué de deux façons différentes : en utilisant un promoteur spécifique des astrocytes tel que le promoteur GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Jakobsson et al., 2004), en modifiant les protéines de l'enveloppe du vecteur lentiviral. Un large panel d'enveloppes issues de différents virus a été utilisé pour générer des pseudotypes de vecteurs lentiviraux. En plus du VSV, différentes souches de la rage (Mazarakis et al., 2001), du virus mokola (Brizard M., soumis), du « Lymphocytic Choriomeningitidis Virus » (LCMV) (Watson et al., 2002; Wong et al., 2004; Stein et al., 2005), du virus de la rivière Ross (Kang et al., 2002) ont été utilisés. Ces enveloppes modifient le tropisme des vecteurs. Par exemple, les vecteurs lentiviraux pseudotypés avec l'enveloppe du virus de la rivière Ross ciblent plus efficacement les cellules gliales que les neurones (Kang et al., 2002), alors que ceux pseudotypés avec le LCMV ciblent préférentiellement les cellules souches neurales (Stein et al., 2005) et les cellules de gliomes (Miletic et al., 2004; Steffens et al., 2004). En outre, les vecteurs lentiviraux dérivés de l'EIAV (Equine infectious anemia virus) pseudotypés avec l'enveloppe de la rage peuvent être transportés par un transport rétrograde, ce qui permet leur injection à la périphérie (Mazarakis et al., 2001). Cependant, il semble que le pseudotypage des vecteurs lentiviraux ne dérivant pas de l'EIAV par cette enveloppe ne leur confère pas cette propriété de transport (Sarkis et al., données non publiées).

Le transfert de gène dans le SNC peut être compromis par une réponse immunitaire innée ou adaptative contre les composants du virion ou du produit du transgène. L'un des atouts des vecteurs lentiviraux réside dans leur faible potentiel immunogène. En effet, contrairement aux AAV (Peden et al., 2004), aux HSV (Wood et al., 1994) et aux adénovirus (Wood et al., 1996; Kajiwara et al., 1997; Kajiwara et al., 2000), l'injection dans le SNC de rat n'induit pas de réaction immunitaire dirigée contre le vecteur (Abordo-Adesida et al., 2005) ni d'extinction de l'expression du transgène (Kafri et al., 1997). Ces données ouvrent la voie à l'utilisation de ces vecteurs en thérapies humaines. Cependant, l'éventuelle nécessité d'une injection répétée de vecteur pour le traitement de certaines pathologies du SNC, soulève à nouveau ce problème. En effet, la réponse immunitaire liée à des injections répétées de vecteurs est mal connue. Un début de réponse est apporté par les études menées dans notre laboratoire ainsi que celui de Baekelandt et ses

collaborateurs. Suite à l'injection successive intracérébrale d'un vecteur lentiviral dérivé du VIH-1, l'expression du transgène n'est pas diminuée malgré une réponse humorale dirigée contre l'enveloppe du vecteur (Baekelandt et al., 2002; Abordo-Adesida et al., 2005; Brizard M, submitted). Ces études suggèrent que l'injection répétée de vecteur lentiviraux n'altère pas l'expression du transgène, ouvrant la voie à leur application clinique.

### ***1.5. Thérapie génique des maladies neurodégénératives***

Les maladies neurodégénératives se caractérisent par la mort lente et progressive des neurones (Rego and Oliveira, 2003). Celle-ci peut être engendrée par la production aberrante de radicaux libres (Olanow and Arendash, 1994), par un transport axonal interrompu (Stamer et al., 2002) ou par le dépôt d'agrégats toxiques (A $\beta$ , ou  $\alpha$ -synucléine) (Hardy and Orr, 2006).

Deux approches de thérapie génique sont envisageables pour ce type de pathologies. La première d'ôte thérapie génique restauratrice ou substitutive, consiste à pallier les déficits induits par la mort neuronale. La deuxième d'ôte thérapie génique de protection, consiste à protéger les neurones de la dégénérescence. Dans le cadre d'une thérapie génique de substitution, des enzymes de biosynthèse (Tyrosine hydroxylase, GTP cyclohydrolase, Aromatic-acid decarboxylase...) peuvent permettre de palier le déficit en neurotransmetteurs induit par la mort neuronale. En revanche, dans le cadre d'une thérapie génique de protection, différents facteurs thérapeutiques peuvent être envisagés, notamment les facteurs trophiques tels que le NGF (Nerve Growth Factor), le BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor), le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), le GDNF, les enzymes anti-radicaux libres tels que la SOD (Superoxyde Dismutase) ou GPx (Glutathion Peroxydase), ou les enzymes antiapoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xL. Ces facteurs se sont montrés particulièrement efficaces pour protéger les neurones lors d'un apport direct dans le cerveau sous forme de protéines dans des modèles murins et de primates (Alberch et al., 2004; Kirik et al., 2004; Tuszynski and Blesch, 2004). Basés sur ces résultats, des essais cliniques d'infusion intracérébroventriculaire du GDNF ont été entrepris. Un premier essai clinique de phase I a été entrepris par Nutt et ses collègues

(Nutt et al., 2003). Cet essai testant l'infusion intracérébroventriculaire de GDNF à l'aide d'une canule, n'a abouti à aucune amélioration des symptômes moteurs des patients et au contraire a révélé la survenue d'effets secondaires associés à la localisation du GDNF dans le ventricule. Par la suite, une étude de phase I a été réalisée par une équipe britannique dans laquelle la protéine GDNF était infusée directement à l'aide d'un cathéter relié à une pompe dans le putamen de cinq patients parkinsoniens (Gill et al., 2003; Patel et al., 2005). L'infusion chronique de GDNF a permis une amélioration significative des fonctions motrices chez tous les patients. Une analyse post mortem a révélé que ces effets bénéfiques étaient en particulier la résultante de formation de collatérales dans le striatum (Love et al., 2005). Bien que l'ensemble de ces résultats ait été confirmé un an après par une étude de phase I portant sur dix patients (Slevin et al., 2005), l'interprétation des résultats de ces études cliniques est limitée par l'absence de groupe contrôle ayant reçu un placebo et par le faible nombre de patients participants. Récemment, une nouvelle étude est venue contredire ces résultats (Lang et al., 2006). Contrairement aux premières études, cet essai n'a vu aucune amélioration significative des symptômes des patients traités en comparaison des patients ayant reçu le placebo. Ces résultats ont poussés les instigateurs à arrêter l'essai, sans que ne soit évalué les causes du manque d'efficacité du GDNF. Cependant, le caractère protéique de ces facteurs limite leur utilisation à long terme. Leur instabilité, leur vitesse de dégradation ainsi que leur inactivation par les protéines plasmatiques limitent leur efficacité. De plus, le franchissement de la barrière hématoencéphalique constitue un obstacle supplémentaire à l'injection intraveineuse de ces protéines thérapeutiques. L'administration directe et continue par voie intracérébroventriculaire ou intraparenchymateuse est une méthode invasive et associée à un risque élevé d'infections. Enfin, l'instabilité des facteurs trophiques nécessite l'administration de grandes quantités de protéines. Ces limites peuvent être contournées par l'expression locale et à long terme de ces facteurs thérapeutiques par le biais de vecteurs viraux. Plusieurs approches expérimentales ont démontré l'efficacité de vecteurs exprimant des facteurs neurotrophiques dans les modèles de maladies neurodégénératives. En particulier, nous avons montré pour la première fois au laboratoire que des vecteurs adénoviraux exprimant le GDNF sont efficace pour prévenir la mort des neurones dopaminergiques dans des modèles murins de maladie de Parkinson (MP) (Bilang-Bleuel et al., 1997). D'autres études émanant du LGN ou d'autres laboratoires sont venues confirmer l'effet protecteur du

GDNF exprimé par des vecteurs adénoviraux (Connor et al., 1999; Connor et al., 2001; Do Thi et al., 2004; Do Thi et al., 2006) ou lentiviraux (Bensadoun et al., 2000; Kordower et al., 2000) sur la mort des neurones dopaminergiques dans des modèles de MP. Les vecteurs viraux se sont également révélés efficaces dans des modèles de la maladie d'Alzheimer (MAIz) (Zou et al., 2002; Wu et al., 2004; Tuszynski et al., 2005), de la maladie de Huntington (MH) (Bemelmans et al., 1999; de Almeida et al., 2001; Regulier et al., 2002; Kells et al., 2004) ou encore de maladies neuromusculaires comme la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) (Aebischer et al., 1996; Acsadi et al., 2002; Klein et al., 2005) ou l'Amyotrophie Spinale (Haase et al., 1997; Haase et al., 1999; Watabe et al., 2001). De même, l'expression des facteurs antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Waldmeier, 2003), mais aussi des enzymes SOD et GPx, ont permis de prévenir la mort neuronale dans des modèles de MAIz (Blomer et al., 1998; Barkats et al., 2000), de MP (Ridet et al., 2006) et de SLA (Azzouz et al., 2000).

La thérapie génique des maladies neurologiques nécessite une expression stable et à long terme du (des) facteur(s) thérapeutique(s). Les vecteurs lentiviraux remplissent cette obligation, puisque le transgène est détecté plus de seize mois après l'injection dans le SNC (Kordower et al., 2000; Balaggan et al., 2006). De plus, leur simplicité d'utilisation, leur biosécurité et leur production aisée en font des vecteurs de choix pour une application thérapeutique aux pathologies du système nerveux. En outre, la transduction par un vecteur lentiviral ne semble pas affecter les propriétés électrophysiologiques du neurone (Dittgen et al., 2004). Cependant, dans des approches de neuroprotections, il sera nécessaire de cibler les astrocytes pour l'expression des facteurs neurotrophiques. L'utilisation de l'enveloppe du virus mokola permet de répondre à ce besoin (Brizard M., soumis). Ces caractéristiques sont des éléments importants pour l'application des vecteurs lentiviraux en thérapie génique humaine. Toutefois, afin de garantir l'utilisation clinique de ces vecteurs, il est nécessaire de contrôler l'expression du facteur thérapeutique et ceci afin de moduler l'apport de la protéine thérapeutique en fonction des besoins du patient, mais également d'arrêter le traitement en cas de complications graves. Les différents systèmes de régulation et leur incorporation dans des vecteurs lentiviraux seront documentés plus en détail dans le chapitre III.

## II. L'ARN interférence

La biologie moléculaire est rentrée dans l'ère post-génomique et permet aujourd'hui de caractériser des gènes impliqués dans des processus physiopathologiques et de les définir comme cibles thérapeutiques. Jusqu'à présent, l'expression d'un gène pouvait être modifiée (surexpression ou Knock-out) en agissant directement sur le génome (ADN). Depuis la fin des années 80, cet objectif est également devenu possible au niveau de l'ARN, molécule qui constitue le support de la traduction de l'information génétique en protéine. La mise en œuvre des premiers outils développés (stratégie antisens, ribozyme...), bien que spécifiques et directs dans le principe, s'est révélée peu efficace. Cette voie a connue un nouveau regain d'intérêt suite à la découverte d'un mécanisme nommé l'ARN interférence (ARNi).

### II.1. Historique et découverte

En 1990, Richard Jorgensen, désireux de renforcer la couleur pourpre des fleurs de pétunias, introduisit dans cette plante une copie supplémentaire du gène impliqué dans la pigmentation, la chalcone synthase. Contre toute attente, il obtint le résultat inverse de celui escompté : certaines plantes transgéniques avait des fleurs blanches (Napoli et al., 1990). Ainsi, l'ajout du gène codant pour une protéine dont la synthèse était déjà assurée par un gène endogène avait conduit à l'inhibition de l'expression de cette protéine. L'analyse moléculaire mit en évidence que cette dépigmentation résultait de la dégradation spécifique des l'ARNm de chalcone synthase (Van Blokland et al., 1994). C'est la première preuve expérimentale qui montre que l'introduction d'une copie supplémentaire d'un gène pouvait entraîner simultanément son inactivation ainsi que celle du gène endogène. Cette extinction de l'expression de gène fût alors appelée phénomène de co-suppression car l'équipe de Richard Jorgensen pensait que l'extinction simultanée du gène endogène et exogène homologue découlait d'une interaction entre eux (Napoli et al., 1990). Quelques années plus tard, ce phénomène fût relié au phénomène de dégradation de l'ARN observé chez le ver *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) par les chercheurs de l'université d'Ithaca, Su

Guo et Kenneth Kemphus. Ces derniers, pour définir le rôle du gène *par-1* dans le développement embryonnaire du ver ont injecté de l'ARN antisens dirigé contre l'ARN messager (ARNm) de *par-1* chez *C. elegans*. Comme attendu, ils obtinrent une inhibition de l'expression de *par-1*. Cependant, l'injection d'ARN sens *par-1* a conduit au même résultat mais ce phénomène ne put être expliqué (Guo and Kemphues, 1995). Il fallut attendre les travaux de Fire et Mello pour qu'une explication soit proposée. Ces chercheurs ont montré que l'introduction d'ARN double brin (ARNdb) dans des cellules de *C. elegans* pouvait réduire l'expression spécifique de protéines en se liant à leur ARNm (Fire et al., 1998). La formation d'ARNdb par complémentarité des bases entre les ARN sens et antisens explique l'inhibition de *Par-1* observée par Guo et Kemphus. Ce mécanisme fut nommé ARN interférence (ARNi) ou inhibition post-transcriptionnelle (en anglais "Post-Transcriptional Gene Silencing" PTGS).

L'ARNi est un mécanisme conservé au cours de l'évolution qui se retrouve dans de nombreux organismes : les plantes, la drosophile, *C. elegans* et les mammifères y compris l'homme (Fire et al., 1991; Romano and Macino, 1992; Pal-Bhadra et al., 1997).

## **II.2. Mécanisme**

Le mécanisme de l'ARNi est un processus cellulaire présent chez les eucaryotes qui régule l'expression génique de façon transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (Hannon, 2002). L'ARNi est déclenché par la présence d'ARNdb provenant soit de transposons (Sijen and Plasterk, 2003; Vastenhouw and Plasterk, 2004), de virus (Lecellier and Voinnet, 2004) ou d'une nouvelle classe d'ARN régulateurs non-codants, les microARN (miARN) (Lee et al., 2003). Au niveau post-transcriptionnelle, la reconnaissance d'ARNdb entraîne soit l'élimination de l'ARNm correspondant, soit l'arrêt de la traduction de la protéine. Ceci se fait par un mécanisme en deux étapes : une étape d'initiation et une étape effectrice (figure 13 (Dykxhoorn et al., 2003)).

### II.2.1. Etape d'initiation

L'étape d'initiation de l'ARNi débute par la reconnaissance de l'ARNdb par une nucléase. Celle-ci entraîne la coupure de l'ARNdb et conduit à la formation de petits ARN de 19 à 25 nucléotides, les siARN (pour "small interfering RNA"). Ces siARN comportent des extrémités 3' symétriques avec deux nucléotides débordants (Elbashir et al., 2001a).

Les études biochimiques menées chez la drosophile par Bernstein et ses collègues en 2001, ont montré que la nucléase responsable de la formation des siARN était une ribonucléase de la famille de la RNase III, appelée Dicer (Bernstein et al., 2001). Cette enzyme, très conservée du ver *C. elegans* aux mammifères, est localisée dans le cytoplasme, ce qui indique que le mécanisme d'ARNi est essentiellement un processus cytoplasmique (Billy et al., 2001). La protéine Dicer possède un domaine ARN hélicase dans sa région N-terminale, un domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille), deux domaines RNase III et un motif de liaison à l'ARNdb dans sa région C-terminale (figure 14) (Cerutti et al., 2000; Carmell and Hannon, 2004).

### II.2.2. Etape effectrice

Une fois formés, les siARN s'associent à un complexe dénommé RISC ("RNA Induced Silencing Complex"), qui catalyse la dégradation des ARNm ou inhibe leur traduction (Doench et al., 2003; Zeng et al., 2003). La différence de stabilité thermodynamique dans l'appariement des deux brins du siARN à chacune des extrémités détermine le brin du siARN qui sera sélectionné. Le brin dont l'extrémité 5' est la plus faiblement appariée est préférentiellement incorporé dans le complexe RISC (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003).

Le complexe RISC dont la taille varie de 150 kDa (Martinez et al., 2002a) à 500 kDa (Hammond et al., 2000; Nykanen et al., 2001), a une composition variable selon les espèces. Chez la drosophile, où il a été identifié, il est composé d'au moins quatre protéines dont une protéine de la famille Argonaute : Argonaute 2 (Ago2) (Hammond et al., 2000; Hammond et al., 2001). Cette dernière est l'enzyme responsable de la coupure de l'ARNm cible (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004) Les protéines Argonautes sont des protéines

basiques d'une centaine de kDa. Elles possèdent un domaine PAZ permettant de lier l'ARN simple brin (Song et al., 2003) et un domaine Piwi, possédant une activité RNase H, situé à son extrémité C-terminale (figure 15) (Carmell et al., 2002; Hammond, 2005). La plupart des organismes possèdent plusieurs gènes argonautes et le choix de l'argonaute contenu dans le complexe semble influencer la fonction de RISC. Ainsi, en présence d'Ago2 le complexe RISC provoque le clivage de l'ARNm cible, alors qu'en présence d'Ago1 il bloque la traduction (Denli and Hannon, 2003). En plus des protéines argonautes, le complexe RISC contient une hélicase ainsi qu'une nucléase (Hannon, 2002). La nucléase Tudor-SN (Tudor Staphylococcal Nuclease) a été proposée comme étant l'enzyme responsable du clivage des ARNm (Caudy et al., 2003). Cependant, d'autres études sont venues contredire cette hypothèse. En effet la nucléase Tudor-SN est une exonucléase calcium-dépendante, alors que l'endonucléase contenue dans le complexe RISC possède une activité dépendante du magnésium (Martinez and Tuschl, 2004; Schwarz et al., 2004). Le complexe RISC contient également la protéine FXR (Fragile-X-related Protein), qui semble permettre la liaison à l'ARN (Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002), ainsi que la protéine VIG (Vasa intronic gene), dont la fonction est inconnue, mais qui contient également un domaine de liaison à l'ARN (Caudy et al., 2002).

### **II.3. Les MicroARN**

Le décryptage des mécanismes moléculaires régissant le développement du ver *C. elegans* a conduit en 1993 à l'identification du premier microARN (miARN) (Lee et al., 1993). Ce dernier est exprimé par le gène *lin-4* en un petit ARNdb non codant en forme de tige boucle de 22 nucléotides (figure 16a). *lin-4* contrôle la transition du stade larvaire L1 au stade L2. En effet, le mutant *lin-4* réitère en permanence la phase L1 de son développement. Toutefois, le phénotype sauvage peut être restauré par l'expression d'un fragment d'ADN codant un petit ARN de 22 nucléotides qui se fixe sur plusieurs sites de la région 3'UTR de l'ARNm de *lin-14*. Cette fixation provoque l'arrêt de la synthèse de la protéine LIN-14 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) qui est un répresseur de la transition du stade larvaire L1 au stade L2 (Wightman et al., 1993). En 2000, soit sept ans après la découverte de *lin-4*, un nouveau miRNA, *let-7*, a été identifié chez ce ver. Il contrôle la transition entre le stade

larvaire L4 et le stade adulte. Le gène *let-7* code pour un miRNA de 21 nucléotides qui inhibe l'accumulation des protéines LIN-41 et LIN-42 en se fixant sur la région 3'UTR des ARNm correspondants. (Reinhart et al., 2000). L'ARNm de *lin-41* contient également un site de complémentarité de *lin-4* dans la région 3'UTR, mais *lin-4* ne semble pas réguler l'expression de *lin-41* (figure 16b) (Slack et al., 2000). Le gène *let-7* a la particularité d'être conservé au cours de l'évolution. Ainsi, l'identification d'homologues de *let-7* dans de nombreuses espèces animales a conduit à la recherche systématique de miARN chez d'autres espèces. Ainsi, les miARN ont été mis en évidence dans divers organismes parmi lesquels les plantes (Reinhart et al., 2002; Mallory and Vaucheret, 2006), les insectes (Lai, 2002; Brennecke et al., 2003; Stark et al., 2003), les vers (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000) et les vertébrés (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2002; Mourelatos et al., 2002).

Les miARN constituent une classe d'ARN non codant de 21 à 25 nucléotides qui contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel (Hutvagner and Zamore, 2002; Filipowicz et al., 2005). Les miARN sont transcrits par une ARN polymérase II (Lee et al., 2004) ou III (Borchert et al., 2006) en un pri-miARN d'environ 125 nucléotides. Celui-ci est ensuite clivé dans le noyau par la protéine Drosha pour libérer un précurseur en forme d'épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides, dénommé pré-miARN (Lee et al., 2003). Ce dernier est alors exporté du noyau vers le cytoplasme par la protéine Exportin-5 (Lund et al., 2004) où il est pris en charge par la nucléase Dicer qui le découpe pour former des miARN matures de 22 nucléotides (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001; Cavaille, 2004) (figure 17). Les miARN matures sont ensuite incorporés dans le complexe RISC qui permet leur appariement par homologie de base à l'ARNm complémentaire. Une complémentarité partielle du miARN à l'ARNm conduit à la répression de la traduction (Grishok et al., 2001) alors qu'une complémentarité parfaite conduit au clivage de l'ARNm (Hutvagner and Zamore, 2002).

#### **II.4. ARNi et régulation de la transcription**

Le mécanisme de l'ARNi ne semble pas agir uniquement au niveau de l'ARNm. En effet, des études récentes ont montré que la machinerie de l'ARNi affecte également l'expression des gènes en agissant directement sur le génome. Il s'agit alors d'un mécanisme d'extinction transcriptionnelle appelé TGS (Transcriptional Gene Silencing) (Almeida and Allshire, 2005; Bayne and Allshire, 2005).

Cette action directe de l'ARNi sur la chromatine a été mise en évidence chez la plante. L'introduction d'ARNdb dans les cellules d'*Arabidopsis thaliana* déclenche la méthylation de l'ADN correspondant (Wassenegger et al., 1994; Mette et al., 2000). Depuis, plusieurs travaux ont montré l'existence de TGS dans d'autres espèces, notamment la levure (Noma et al., 2004; Verdel et al., 2004), *C. elegans* (Dudley et al., 2002; Grishok et al., 2005), la drosophile (Pal-Bhadra et al., 1997) et l'homme (Kim et al., 2006). Récemment, il a été démontré que certaines protéines impliquées dans le mécanisme d'ARNi avaient un rôle dans les mécanismes de réarrangement du génome (Mochizuki et al., 2002), la répression de l'expression des gènes (Janowski et al., 2006; Kim et al., 2006) et dans la ségrégation des chromosomes (Provost et al., 2002; Volpe et al., 2002; Hall et al., 2003).

#### **II.5. Expression des siARN**

L'inhibition spécifique de gènes peut être obtenue dans des cultures de cellules par l'apport de molécules de siARN chimiquement synthétisées (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001b). Toutefois, ces méthodes ne permettent qu'une inhibition à court terme de l'expression d'un gène. Une inhibition à plus long terme peut être obtenue par la synthèse endogène de ces siARN par un vecteur plasmidique (Brummelkamp et al., 2002; Miyagishi and Taira, 2002; Sui et al., 2002; Yu et al., 2002) ou par un vecteur viral (Abbas-Terki et al., 2002; Qin et al., 2003; Rubinson et al., 2003). Deux stratégies sont possibles pour synthétiser les siARN dans les cellules à partir de ces vecteurs (figure 18). La première repose sur l'utilisation de deux promoteurs indépendants pour exprimer les brins sens et antisens du siARN, qui s'hybrident après leur synthèse dans le noyau (Miyagishi and Taira, 2002). La seconde consiste à exprimer le brin sens et antisens du siARN à partir du même

promoteur sous la forme d'une structure en forme d'épingle à cheveux, le shARN (« short hairpin RNA »)(Paddison et al., 2002; Yu et al., 2002). Cette boucle sera coupée par l'enzyme Dicer pour former un siARN fonctionnel.

La présence d'une extrémité polyA empêche l'effet inhibiteur des siARNs (Xia et al., 2002). Les shARNs doivent par conséquent être exprimés par l'ARN polymérase III qui permet la synthèse d'ARN d'une taille réduite puisque cinq Thymidines suffisent pour arrêter la transcription. Les promoteurs de l'ARN polymérase III, comme le promoteur H1 (Abbas-Terki et al., 2003 ; Tiscornia et al., 2003), 7SK (Czuderna et al., 2003; Sotirova et al., 2006) ou le promoteur U6 (Qin et al., 2001, Rubinson et al., 2003 ; Stewart et al., 2003), ont été utilisés avec succès pour exprimer les shARNs.

Plusieurs études ont montré que l'expression intracellulaire des siARN par des vecteurs plasmidiques et viraux a permis une inhibition plus efficace du gène cible qu'avec une administration exogène des siARN (Brummelkamp et al., 2002; Lee et al., 2002; Miyagishi and Taira, 2002). De plus, le système basé sur l'expression de shARN est plus efficace que le système basé sur la synthèse du duplex siARN à partir de deux promoteurs (Yu et al., 2002). L'utilisation de vecteurs, et particulièrement des vecteurs lentiviraux, permet d'envisager une expression à long terme des shARN.

## ***II.6. Applications thérapeutiques***

L'ARNi s'est révélé être une innovation importante en médecine moléculaire moderne, au point que le magazine Science la déclare « découverte scientifique de l'année » en 2002 (Couzin, 2002). En effet, l'ARNi est un mécanisme physiologique qui peut être exploité pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Contrairement aux stratégies antisens ou triple hélice, qui nécessitent des concentrations importantes, les siARN requièrent peu de molécules pour activer l'ARNi, évitant ainsi de déclencher des effets secondaires. En outre, l'un des avantages majeurs de l'ARNi est sa très haute spécificité. L'introduction d'une seule mutation au sein du siARN abolit l'effet d'extinction post-transcriptionnelle (Martinez et al., 2002b; Miller et al., 2003; Dykxhoorn et al., 2006;

Schwarz et al., 2006). Cette spécificité importante ouvre la voie à l'utilisation de la technologie ARNi pour éteindre spécifiquement l'expression d'allèles portant une mutation, une insertion ou une délétion. De ce fait, les applications médicales de l'ARNi sont considérables. Elles peuvent concerner les pathologies causées par des allèles dominants portant des mutations comme le cancer (Gartel and Kandel, 2006) ou les maladies neurodégénératives (Davidson and Paulson, 2004; Miller et al., 2005c; Thakker et al., 2006), mais également pour combattre les infections virales (Lecellier and Voinnet, 2004; Ketzinel-Gilad et al., 2006).

Plusieurs travaux ont démontré les applications possibles de l'ARNi dans des modèles cellulaires et animaux. Un siARN dirigé contre l'allèle mutant de la protéine suppresseur de tumeur p53 s'est révélé efficace *in vitro* pour inhiber l'allèle mutant sans affecter l'allèle p53 sauvage, permettant ainsi la restauration du phénotype anti-oncogène de la protéine p53 sauvage (Martinez et al., 2002b). Cette stratégie peut donc constituer un outil thérapeutique intéressant pour guérir les pathologies associées aux mutations de p53 comme le syndrome de Li-Fraumeni. L'ARNi s'est également révélé efficace pour inhiber l'expression de protéines oncogènes issues d'une translocation chromosomique, qui sont à l'origine de nombreux cancers hématopoïétiques. Dans ce cas, le siARN a été conçu pour cibler la jonction entre les deux messagers (Wilda et al., 2002). Cette approche a permis de supprimer la cytotoxicité causée par la surexpression du récepteur aux androgènes comprenant des répétitions d'acides aminés glutamine, modèle de l'atrophie musculaire spinobulbaire (SBMA) (Caplen et al., 2002).

En ce qui concerne le SNC, malgré le nombre important d'études documentant la capacité des siARN à réduire l'expression d'un gène dans des cultures de neurones (Krichevsky and Kosik, 2002; Higuchi et al., 2003; Leucht et al., 2003; Bhattacharya et al., 2004; Vasko et al., 2005; Jeske et al., 2006) et dans les cellules gliales (Nicchia et al., 2003; Gan et al., 2004; Zhang et al., 2004; Lee et al., 2005; Rozovsky et al., 2005; Takenaga and Kozlova, 2006), deux problèmes majeurs se posent : 1) la présence de la barrière hématoencéphalique restreint l'entrée des siARN à partir de la circulation périphérique, ce qui rend inefficace toute approche systémique pour inhiber un gène dans le cerveau et 2) la variété cellulaire considérable du SNC rend difficile une inhibition spécifique dans un seul

type de cellule. Par conséquent, il est nécessaire d'exprimer les siARN localement et spécifiquement dans les structures cérébrales atteintes. De plus, au niveau cellulaire, il est important de maîtriser le type cellulaire ciblé afin d'éviter tout effet non désiré. Pour répondre à ces contraintes, l'utilisation des vecteurs viraux représente un moyen pour permettre l'application de l'ARNi en thérapeutique humaine. De nombreuses études ont montré l'utilisation de vecteurs viraux pour l'expression de shARN dans le système nerveux central. La preuve de principe a été apportée pour la première fois en 2002 par l'équipe de Beverly Davidson qui a montré que l'injection d'un vecteur adénoviral codant un siARN dirigé contre l'eGFP pouvait éteindre l'expression de ce gène dans le striatum de souris transgéniques le surexprimant (Xia et al., 2002). Un an plus tard, Chris Van den Haute et collaborateurs ont montré l'efficacité des vecteurs lentiviraux dans ce type d'approches (Van den Haute et al., 2003). L'injection d'un vecteur codant un siARN dirigée contre l'eGFP dans le striatum de souris, suivie une semaine après de l'injection d'un vecteur lentiviral codant la protéine, a conduit à une inhibition de l'expression de celle-ci de plus de 75%. Cette inhibition s'est maintenue six mois après transduction, démontrant ainsi l'efficacité d'un vecteur lentiviral pour une expression à long terme d'un shARN (Van den Haute et al., 2003).

Les vecteurs viraux se sont révélés efficaces pour déclencher l'ARNi dans différents modèles murins de pathologies. En particulier cette stratégie a été utilisée dans un modèle murin (modèle G93A) de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). La SLA familiale est une maladie neurodégénérative caractérisée par la mort des motoneurones dans le cerveau et la moelle épinière, résultant de la mutation (G93A) du gène de la SOD1 (Cu/Zn Superoxyde dismutase 1). L'injection dans la moelle d'un vecteur lentiviral exprimant un shARN dirigé contre la SOD1 dans ce modèle, a permis de retarder l'apparition de la maladie, ainsi que la réduction de l'atrophie musculaire (Raoul et al., 2005). Des résultats similaires ont été obtenus après injection intramusculaire d'un vecteur EIAV (Ralph et al., 2005) ou d'un AAV (Miller et al., 2005b) dans le même modèle. D'autres preuves expérimentales de la capacité des vecteurs viraux à exprimer un shARN dans des pathologies du système nerveux central ont été apportées. Ainsi, des vecteurs recombinants AAV ont été utilisés pour traiter par ARNi des modèles murins de maladies par expansion de polyglutamine, telles que la maladie de Huntington (Harper et al., 2005) ou l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 (SCA1, spinocerebellar ataxia type 1) (Xia et al., 2004). Des

vecteurs lentiviraux exprimant des shARN ont également été utilisés dans des modèles de maladie d'Alzheimer (Singer et al., 2005) et de Parkinson (Sapru et al., 2006).

### III. Stratégies de régulation de l'expression d'un gène

#### III.1. Pré-requis des systèmes de régulation

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre I), pour des raisons de biosécurité, l'application clinique de la thérapie génique nécessite le développement de systèmes permettant le contrôle de l'expression de gènes introduits dans les cellules. Quel que soit le système de régulation choisi, celui-ci doit lui-même répondre à certaines exigences d'efficacité et de sécurité. Ainsi, il est nécessaire d'obtenir un système de régulation qui réponde aux critères suivants (Toniatti et al., 2004) :

- **spécificité** : Le système ne doit pas interférer avec les réseaux de régulation endogènes et ne doit pas être activable par un ligand endogène.
- **sélectivité** : l'induction doit se faire uniquement par un inducteur exogène non toxique
- **inductibilité** : le système doit avoir un niveau d'expression basal faible et une induction rapide et élevée.
- **biodisponibilité** : l'inducteur doit être une drogue biodisponible par voie orale et capable de pénétrer les types tissulaires ciblés.
- **réversibilité** : l'inducteur doit avoir une cinétique d'élimination rapide dans tous les tissus pour permettre des cycles répétés et rapides d'induction/répression.
- **faible immunogénicité** : l'activateur de transcription et l'inducteur doivent avoir un potentiel immunogène le plus faible possible.
- **dose-dépendance** : la réponse du système doit être modulable par variation de la concentration de l'inducteur.
- **flexibilité** : les composants du système de régulation doivent être constitué de modules interchangeable. En effet, en fonction des différentes configurations thérapeutiques ou tissus à cibler, il est nécessaire d'optimiser ou d'adapter le système.

En thérapie génique, la stratégie thérapeutique repose sur l'apport, ou l'inhibition par le mécanisme de l'ARNi, d'un gène. Dans le premier cas, l'expression du transgène se fait sous le contrôle d'un promoteur d'ARN polymérase II. En revanche, dans le deuxième cas, l'expression des siARN se fait sous le contrôle d'un promoteur d'ARN polymérase III. Plusieurs systèmes de régulation ont été décrits pour moduler l'expression des transgènes pour chacun de ces promoteurs.

### **III.2. Les systèmes de régulation de l'expression d'un transgène**

#### **III.2.1. Régulation des promoteurs d'ARN polymérase II**

##### **III.2.1.1. Le système de régulation par la tétracycline**

Le système de régulation par la tétracycline développé par Gossen et Bujard en 1992 dérive de l'opéron de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 d'*Escherichia coli* (Gossen and Bujard, 1992). Chez la bactérie, la résistance est assurée par une protéine dont l'expression est induite par la tétracycline. Celle-ci ou son analogue, la doxycycline (Dox), induit un changement conformationnel de la protéine répresseur de la transcription (TetR), ce qui conduit à la dissociation des séquences opérateurs (TetO). Par contre, en absence de tétracycline, TetR se dimérise et se lie sur TetO.

Pour créer le système de régulation, Gossen et Bujard ont mis à profit la capacité du Tet R à se lier au TetO en absence de tétracycline. Pour ce faire, ils ont remplacé le domaine d'activation de la transcription de TetR par le domaine d'activation de la transcription VP16 du virus HSV pour générer une protéine transactivatrice artificielle tTA (tetracycline Transactivator). Sept copies de la séquence de TetO ont été placées en amont d'un promoteur minimal CMV. Ainsi, en absence de tétracycline, la protéine de fusion tTA se fixe sur TetO et active la transcription. En revanche, en présence de tétracycline, la tTA subit un changement de conformation qui empêche sa fixation sur TetO et inactive ainsi la transcription (Gossen and Bujard, 1992) (figure 19a). Ce système appelé "Tet-off", a permis une induction de l'expression d'un gène rapporteur d'un facteur  $10^5$  dans des cellules HeLa

exprimant de façon stable tTA en l'absence de tétracycline dans le milieu de culture (Gossen and Bujard, 1992). Chez des souris transgéniques exprimant la luciférase ou la  $\beta$ -galactosidase sous contrôle du système "Tet-off", l'arrêt de l'apport en doxycycline a permis d'augmenter jusqu'à 5000 fois le taux d'expression du gène considéré (Furth et al., 1994). Ce système a également été utilisé *in vivo* pour réguler l'expression de l'EPO (Bohl et al., 1997), d'immunoglobulines (Perez et al., 2004) ou encore de la tyrosine hydroxylase dans le cerveau (Corti et al., 1999b; Corti et al., 1999a). Afin de réduire les interactions possibles entre tTA et des facteurs cellulaires endogènes, le domaine d'activation VP16 du tTA a été amputé de 12 acides aminés. Ces modifications ont permis de créer un nouveau transactivateur tTA mieux toléré à une forte concentration intracellulaire (Baron et al., 1997).

Le système « Tet-off » implique un apport continu de l'antibiotique pour inhiber l'expression du gène d'intérêt, ce qui risque d'entraîner la nécessité de traitement assez long avec l'antibiotique. Partant de ce constat, l'équipe d'Hermann Bujard a identifié un mutant de TetR ayant un phénotype inverse, qui se fixe sur TetO en présence de tétracycline. Ce nouveau transactivateur nommé rtTA (reverse tetracycline Transactivator) possède quatre acides aminés mutés dans TetR. Par analogie à "Tet-off", ce système a été nommé "Tet-on" (Gossen et al., 1995) (figure19b).

L'activation du système Tet-on s'est révélée plus rapide que celle du système Tet-off, qui dépend de l'élimination de la doxycycline. En effet, un facteur d'induction supérieur à 1000 a été observé dans des cellules HeLa exprimant le rtTA de façon constitutive en présence de doxycycline dans le milieu de culture. De même, chez des souris transgéniques exprimant le gène rapporteur luciférase sous contrôle du système "Tet-on", l'apport de doxycycline a permis d'induire l'expression du transgène d'un facteur supérieur à  $10^5$  (Kistner et al., 1996). Toutefois, le système Tet-on est moins sensible à l'inducteur que le système Tet-off, ce qui soulève la question de la concentration minimale de doxycycline nécessaire pour induire le système Tet-on de façon efficace *in vivo*. Cependant, cette faible sensibilité du rtTA à la doxycycline peut devenir un avantage et peut être exploité pour permettre une régulation différentielle de deux gènes différents avec deux concentrations d'antibiotiques différentes. Ainsi, les deux transactivateurs tTA et rtTA ont été utilisés pour moduler indépendamment l'expression de deux gènes rapporteurs. Ceux-ci peuvent être maintenus

dans un état de pré-activation à une concentration intermédiaire de doxycycline (Baron et al., 1999). Plus récemment, une approche par évolution virale a permis d'isoler des variants de rtTA qui, en présence de doxycycline, sont 25 fois plus sensibles et 5 fois plus actifs que le rtTA original sans affecter l'activité basale en absence de l'inducteur (Das et al., 2004).

En plus de la faible sensibilité à l'inducteur, le système Tet-on présente une activité résiduelle due à une affinité du rtTA au TetO en absence de doxycycline. Pour remédier à cette fuite d'expression en absence de l'inducteur, des mutations aléatoires sur le transactivateur tTA ont été effectuées. Cette stratégie a permis d'isoler deux nouveaux transactivateurs dénommés rtTA2-S2 et rtTA2-M2 qui possèdent une meilleure sensibilité à l'inducteur et une activité basale réduite en absence de doxycycline (Urlinger et al., 2000). rtTA2-S2 présente un niveau basal plus faible que rtTA2-M2, mais ce dernier présente néanmoins l'avantage d'être environ 10 fois plus sensible à la doxycycline. (Urlinger et al., 2000; Lamartina et al., 2002). Ces nouveaux transactivateurs ont été utilisés avec succès *in vivo* pour contrôler l'expression de nombreux transgènes après transfert dans différents tissus, et avec une grande variété de vecteurs (Aurisicchio et al., 2001; Lamartina et al., 2002; Salucci et al., 2002; Koponen et al., 2003). Toutefois, malgré les améliorations apportées, ces nouveaux transactivateurs présentent toujours une fuite d'expression importante en absence d'inducteur. Pour réduire la fixation du rtTA sur les TetO en absence d'inducteur, un répresseur de la transcription ou "silencer" tTS (tetracycline Transcriptional Silencer), également dépendant de la tétracycline, a été utilisé (Freundlieb et al., 1999). En absence de doxycycline, tTS se fixe sur TetO à la place du rtTA, ce qui inhibe efficacement la transcription. En revanche, en présence de doxycycline, cette répression est levée, ce qui entraîne la fixation de rtTA et induit la transcription. Le tTS est une protéine de fusion entre le domaine répresseur de KRAB (Kruppel-Associated Box) de la protéine humaine Kid-1 et le domaine de fixation à l'ADN de TetR. Plusieurs études ont montré que la combinaison du système rtTA avec tTS permet de réduire l'expression basale d'un gène *in vivo* (Zhu et al., 2001; Salucci et al., 2002; Lamartina et al., 2003; Mizuguchi et al., 2003). Pour optimiser l'apport de ce système activation /répression, tous les composants ont été introduits dans un seul vecteur adénoviral et évalués *in vitro* et *in vivo* (Salucci et al., 2002; Mizuguchi et al., 2003; Rubinchik et al., 2005; Xiong et al., 2006). Toutefois, il a été montré que l'inclusion de tTS induisait une diminution de l'activation du

transgène (Lamartina et al., 2003), et que cette activation était progressivement perdue dans des cellules CHO transduites avec un vecteur lentiviral exprimant à la fois rtTA2-M2 et tTS<sup>Kid</sup> (Barde et al., 2006). Une faible activité basale et un fort taux d'induction ont toutefois été observés dans cette étude (Barde et al., 2006).

Une approche différente pour contrôler l'expression de rtTA et de ce fait l'expression du transgène en absence d'inducteur, consiste à placer l'expression du rtTA sous "autorégulation" (Chtarto et al., 2003). Cette stratégie a permis *in vitro* une expression basale faible et un niveau d'expression du gène d'intérêt supérieur à celui obtenu avec un promoteur CMV (Markusic et al., 2005).

Les systèmes de régulation par la tétracycline se sont illustrés avec succès dans leurs capacités à contrôler efficacement un gène d'intérêt *in vitro* et *in vivo*, ce qui fait d'eux aujourd'hui des outils de choix pour la régulation de l'expression de gènes dans des cellules de mammifères. Partant de ce constat, nous avons utilisé le système "Tet-on" dans le cadre de notre étude.

### III.2.1.2. Le système de régulation par l'ecdysone

Durant la morphogenèse des insectes, en particulier chez la drosophile, l'ecdysone déclenche une cascade de changements morphologiques via un récepteur hétérodimérique composé du récepteur nucléaire à l'ecdysone (EcR) et du récepteur nucléaire ultraspiracle (USP). En présence de l'hormone, le récepteur EcR complexé à USP se lie à des éléments de réponse (ER) à l'ecdysone qui sont présents dans les régions promotrices de gènes répondant aux ecdystéroïdes, ce qui permet une transactivation de la transcription (Thomas et al., 1993). Basé sur ces observations, l'équipe de Ronald Evans a créé un système de régulation adapté aux mammifères (No et al., 1996). Toutefois, l'origine des composants du système de régulation par l'ecdysone des insectes peut entraîner une réponse immunitaire qui limite l'utilisation de ce type de système en thérapie humaine. Cependant, ce système de régulation n'en demeure pas moins un outil formidable de contrôle de l'expression d'un transgène, qui trouve de nombreuses applications en recherche fondamentale.

Le système de régulation par l'ecdysone repose sur la capacité de cette hormone à dimériser deux protéines pour former un hétérodimère capable de se fixer à des domaines de liaisons sur l'ADN spécifiques situés en amont d'un promoteur. Cette fixation déclenche la transcription. Pour ce faire, le domaine d'activation de EcR a été remplacé par le domaine d'activation VP16 du virus HSV pour générer un transactivateur chimérique EcR/VP16. Le gène USP a été remplacé par son homologue chez les mammifères : le récepteur alpha au rétinoïde X (RXR $\alpha$ ). En présence de l'ecdysone ou de son analogue, la muristérone A, le transactivateur EcR/VP16 se lie à RXR et forme un complexe dimérique qui se lie aux séquences ER situées en amont du promoteur du gène d'intérêt. La transcription est ainsi activée (figure 20). La co-expression de RXR avec le récepteur hétérodimérique dans des cellules 293 permet une stimulation jusqu'à 10<sup>4</sup> fois du gène rapporteur en présence de 1 $\mu$ M de muristérone A (No et al., 1996). Ce système s'est également révélé efficace *in vivo*. Le niveau basal d'expression est très faible en absence de l'inducteur. En revanche, en présence de l'inducteur, une induction significative a été obtenue (No et al., 1996). La nature lipophile de la muristérone A permet la diffusion efficace dans tous les tissus y compris dans le cerveau. De plus, sa durée de vie très courte, son absence de toxicité dans les cellules de mammifères *in vitro* et *in vivo* représentent un avantage certain pour l'utilisation de ce système en thérapie génique expérimentale. Toutefois, il nécessite l'expression simultanée de ces trois composants (Ecr/VP16, RXR et le transgène) dans les cellules cibles et la surexpression du récepteur RXR risque d'entraîner des effets pléiotropiques en interférant avec des voies de transduction endogènes.

RXR est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules de mammifères. Cependant, à l'exception des cellules 293, l'expression basale de RXR dans les cellules de mammifères n'est pas suffisante pour la formation de l'hétérocomplexe EcR/RXR en présence d'ecdysone (Yao et al., 1992; Thomas et al., 1993; Yao et al., 1993). En effet, la formation de l'hétérocomplexe EcR/RXR nécessite un rapport équimolaire entre les deux protéines. Cette limite a été levée par l'expression bicistronique des deux protéines (Ecr et RXR) à partir d'un promoteur CMV, ce qui a permis d'obtenir un taux important d'inductibilité (Wyborski et al., 2001). Ce système a récemment été introduit dans un vecteur lentiviral et évalué *in vivo* (Galimi et al., 2005). Dans cette étude, des cellules souches hématopoïétiques

ont été transduites avec deux vecteurs lentiviraux, l'un exprimant à la fois EcR et RXR et l'autre exprimant le gène rapporteur GFP. Quatre mois après greffe de ces cellules, une expression de GFP a pu être détectée lorsque les animaux ont été traités avec l'analogue de l'ecdysone, démontrant ainsi l'efficacité d'un tel système pour contrôler l'expression d'un gène d'intérêt dans le cadre d'une approche *ex vivo*. Cette approche, nécessite l'utilisation de deux vecteurs viraux.

En parallèle, une nouvelle version du système ecdysone, qui ne nécessite pas de RXR, a été développée. Celle-ci est fondée sur le récepteur à l'ecdysone du ver à soie (*Bombix mori*)(*BmEcR*), qui permet un fort niveau de transactivation après traitement par un agoniste de l'ecdysone, le tebufénozide (Suhr et al., 1998). En tirant profit de cette propriété, Hoppe et ses collègues ont développé un nouveau transactivateur composé pour sa partie de liaison à l'ADN de l'EcR de la drosophile, et pour sa partie activatrice, du domaine activateur de *BmEcR* (Hoppe et al., 2000). Ce transactivateur s'est révélé efficace après transduction de cellules de mammifères par un seul vecteur adénoviral, en présence de ponastérone A (analogue de l'ecdysone) ou d'un diacylhydrazine GS-E (agoniste non stéroïdien de l'ecdysone). La fonctionnalité de ce système a également été démontrée *in vivo* après injection d'un vecteur adénoviral dans le muscle cardiaque de rat et traité ou non avec le GS-E (Hoppe et al., 2000).

La recherche de nouveaux ligands capables d'améliorer l'efficacité du système de régulation par l'ecdysone a conduit à l'identification de plusieurs phytoecdystéroïdes, comme la ponastérone A, qui se sont montrés très efficaces comme activateurs de l'expression d'un transgène *in vitro* et *in vivo* (Saez et al., 2000). De plus, une meilleure sélectivité entre inducteurs a été obtenue par l'utilisation d'un récepteur muté à l'ecdysone de l'espèce *Choristoneura fumiferana* (*CfEcR*) (Kumar et al., 2002). Ce récepteur a perdu la capacité de liaison et de transactivation en présence de stéroïdes, mais pas en présence de ligands non stéroïdiens comme GS-E (Kumar et al., 2002). Ce système peut être utile pour contrôler l'expression de transgènes chez les insectes ou les plantes qui possèdent des ecdystéroïdes endogènes. Pour réduire l'activité basale et augmenter le niveau d'induction, de nouveaux transactivateurs basés sur *CfEcR* ont été utilisés (Karns et al., 2001; Palli et al., 2003; Karzenowski et al., 2005). Une meilleure sensibilité à l'inducteur a été obtenue par l'utilisation d'un nouveau mutant de *CfEcR*, puisqu'une induction maximale a été obtenue

avec une concentration de l'ordre du nanomolaire d'inducteurs non stéroïdiens (Karzenowski et al., 2005).

Les versions actuelles des systèmes de régulation fondés sur le système ecdysone disposent d'une forte sensibilité aux inducteurs stéroïdiens ou, dans le cas des versions qui dérivent de CfEcR, aux ligands non-stéroïdiens. Ces performances, mais également l'absence d'interactions avec des systèmes de mammifères, font de ces systèmes de régulation des outils intéressants pour la régulation temporelle de gènes *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, une étude récente vient de mettre l'accent sur un effet potentiel des ecdystéroïdes dans les cellules de mammifères (Oehme et al., 2006). En effet, l'exposition de cellules de carcinome du colon à la muristéronone A entraîne un effet antiapoptotique via l'inhibition de FasL et TRAIL (Oehme et al., 2006). Ces résultats sont contraires aux précédentes publications selon lesquelles les ecdystéroïdes n'influencent pas la physiologie cellulaire. Ces effets semblent être des effets directs des analogues de l'ecdysone sur la régulation de gènes endogènes.

### III.2.1.3. Le système de régulation par le mifépristone ou RU486

Le système de régulation par le mifépristone est fondé sur les propriétés d'un mutant du récepteur à la progestérone humaine (hPR). Une délétion dans la partie C-terminale du récepteur entraîne la perte de fixation de la progestérone, mais n'empêche pas une interaction avec les antagonistes comme le mifépristone (ou RU486). Une fois activé, le récepteur muté agit comme un agoniste en activant la transcription (Vegeto et al., 1992). Le remplacement du domaine de liaison à l'ADN de hPR par celui de Gal-4 (GL) a éliminé la possibilité d'activation de gènes endogènes, et sa fusion avec le domaine d'activation de VP16 (VP) crée un nouveau transactivateur chimérique (GLVP) fort (figure 21) (Wang et al., 1994). En présence d'une concentration faible (0,01 à 1 nM) de RU486, ce récepteur chimérique s'est révélé particulièrement efficace *in vitro* pour activer un gène endogène placé sous le contrôle d'un promoteur minimal contenant en amont les éléments de réponse de GAL-4 (Wang et al., 1997b). Ce système a également été évalué chez des souris transgéniques exprimant GLVP et l'hormone de croissance (hGH) sous contrôle d'un

promoteur inductible (Wang et al., 1997a). En présence de doses de 250 à 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de RU486, l'expression de hGH a pu être augmentée jusqu'à 3500 fois.

Dans le but d'une éventuelle application chez l'homme, le domaine d'activation VP16 du transactivateur a été remplacé par le domaine d'activation de la sous unité P65 du facteur NF- $\kappa\text{B}$  humain (Burcin et al., 1999). Un niveau basal faible de transactivation a été mesuré en absence d'inducteur. Cependant, le transactivateur étant lui même contrôlé par un promoteur contenant des éléments de réponse de GAL-4, la fuite en absence de ligand a pu être réduite (Abruzzese et al., 2000). Enfin, une nouvelle version du système mifépristone, dénommé GS4, a été développée dans laquelle le domaine GAL4 est tronqué, permettant d'éviter la dimérisation spontanée du transactivateur, réduisant encore le niveau d'expression basale (Nordstrom, 2002).

Les avantages du système de régulation par la mifépristone résident dans la faible activité basale et la rapidité d'induction de l'expression du gène d'intérêt. De plus, une concentration de 50 à 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de mifépristone est suffisante pour induire l'expression du gène rapporteur *in vivo* (Ye et al., 2002). Cette concentration est 40 à 80 fois inférieure à la dose prescrite pour un effet contraceptif. Toutefois, les niveaux d'expression obtenus avec ce système restent faibles par rapport à ceux obtenus avec le système inductible par la tétracycline ou le système inductible par la rapamycine (Xu et al., 2003). Enfin, les dernières versions de transactivateurs développées à cette date contiennent le domaine de liaison à l'ADN de GAL-4 de levure et de ce fait ne sont pas entièrement d'origine humaine. Des risques immunogènes sont donc possibles, réduisant ainsi le potentiel de ce système en thérapie humaine.

#### III.2.1.4. Le système de régulation par le tamoxifène

Contrairement aux systèmes de régulations tétracycline, ecdysone et mifépristone, le système de régulation par le tamoxifène est un système entièrement d'origine humaine ce qui constitue un atout pour toute application clinique. Ce système consiste en un nouveau transactivateur composé du domaine de liaison à l'ADN de HNF1 $\alpha$  (Human hepatocyte Nuclear Factor-1 $\alpha$ ), du domaine muté de liaison au ligand du récepteur à l'oestrogène et pour sa partie activatrice, du domaine activateur de la sous-unité p65 de NF- $\kappa\text{B}$  (figure 22)

(Roscelli et al., 2002). Ce transactivateur chimérique permet la fixation du 4-hydroxytamoxifène (4-OHT), mais a perdu la capacité de lier l'oestradiol. Ainsi en présence de 4-OHT, ce système a permis *in vitro* d'obtenir un taux d'induction de la transcription d'un facteur 1000 et *in vivo* d'un facteur 100. De plus, une expression à long terme (jusqu'à 10 mois) d'erythropoïétine a été obtenue via ce système chez des souris traitées chaque jour avec du 4-OHT (Roscelli et al., 2002).

L'utilisation d'un transactivateur d'origine humaine permet de s'affranchir des effets immunogènes possibles. De plus, le tamoxifène qui est transformé *in vivo* en 4-OHT, est une molécule largement utilisée en clinique. Ces critères sont des éléments en faveur de l'utilisation de ce système en thérapeutique humaine. Cependant, des développements accrus, et particulièrement l'amélioration de l'affinité du transactivateur au tamoxifène sont nécessaires. En effet, les doses de tamoxifène nécessaires à l'activation du système de régulation excèdent les doses prescrites en clinique. Il a été mis en évidence qu'un excès de tamoxifène peut induire des effets secondaires importants et notamment des cancers de l'utérus ou des bouffées de chaleur (Toniatti et al., 2004). Pour s'affranchir de ces effets secondaires, une voie possible serait l'utilisation de l'évolution dirigée pour créer de nouveaux transactivateurs plus affins au tamoxifène et ainsi apporter des garanties supplémentaires à l'utilisation de ce système en thérapeutique humaine.

### III.2.1.5. Le système de régulation par la rapamycine

Ce système de régulation est fondé sur la capacité de la rapamycine, une molécule immunosuppressive à induire la dimérisation de la protéine cellulaire FKBP12 (FK506 Binding Protein) avec la protéine kinase FRAP (FKBP12 Rapamycin-Associated Protein ou mTOR) (Pollock and Clackson, 2002). Partant de ce constat, il a été développé un système de régulation qui repose sur le contrôle de la dimérisation de deux protéines chimériques qui sont inactives à l'état de monomères et forment un facteur de transcription une fois l'hétérodimère formé en présence de rapamycine. La première protéine chimérique est composée du domaine de liaison à l'ADN et la deuxième contient le domaine d'activation de la transcription. Les deux contiennent les domaines de liaison au ligand qui permettent la dimérisation en présence de rapamycine ou son analogue naturel, FK506. Dans ce

système, la première protéine chimère est une fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de la protéine ZFHD1 et trois domaines de liaison à la rapamycine de la protéine FKBP12. La seconde protéine chimère est constituée du domaine de liaison FRB à la rapamycine de la protéine cellulaire humaine FRAP fusionnée au domaine de transactivation de la protéine NFκB p65. (Rivera et al., 1996) (Figure 23). La protéine ZFHD1 reconnaît la séquence consensus spécifique TAATTANGGGNG sur l'ADN (Pomerantz et al., 1995). Le gène cible est sous le contrôle d'un promoteur CMV minimal (Rivera et al., 1996) ou IL-2 minimal (Pollock et al., 2000) qui porte en amont 12 séquences de liaison à ZFHD1. En présence de rapamycine, ce système induit l'expression rapide du gène cible *in vitro* et *in vivo* (Rivera et al., 1996; Magari et al., 1997; Pollock et al., 2000). L'amélioration majeure de ce système a porté sur le domaine d'activation du transactivateur. Ainsi une version plus activatrice a été réalisée en combinant les domaines d'activations des protéines p65 et HSF (Human heat Shock Factor 1) humaines (Pollock et al., 2000).

Le système de régulation par la rapamycine a été inséré avec succès dans différents vecteurs viraux parmi lesquels les vecteurs rétroviraux (Pollock et al., 2000), lentiviraux (Kobinger et al., 2005), adénoviraux (Rivera et al., 1999; Auricchio et al., 2002a; Chong et al., 2002), HSV (Wang et al., 2003) et AAV (Ye et al., 1999; Auricchio et al., 2002b; Lebherz et al., 2005; Rivera et al., 2005).

L'absence d'induction du transgène, ainsi que l'absence d'interaction entre FKBP et FRAP en absence d'inducteur, constituent un avantage certain de ce système de régulation. En comparaison avec le système tétracycline et le système de régulation par les stéroïdes, le système de régulation par la rapamycine présente une sensibilité plus importante à l'inducteur. De plus, comme pour le système tétracycline, le système rapamycine permet une induction rapide et importante de l'expression du transgène comparé au système de régulation par les stéroïdes (Go and Ho, 2002; Xu et al., 2003). Toutefois, les propriétés immunosuppressives de la rapamycine constituent un point faible de ce système de régulation. Pour résoudre ce problème, des analogues de la rapamycine qui n'ont pas d'effets immunosuppresseurs mais qui gardent la capacité de déclencher la transcription, ont été développés. Ces analogues contiennent des modifications des carbones 7 ou 16 de la rapamycine, et conservent la capacité de dimériser les protéines contenant les domaines

FKBP12 et FRB muté (FRB-T2098L) (Pollock and Clackson, 2002; Toniatti et al., 2004). Ces analogues appelés AP22565 et AP21967 ont permis d'activer la dimérisation des deux monomères chimériques et de déclencher la transcription *in vitro* et dans des modèles animaux de greffe (Chong et al., 2002; Pollock and Clackson, 2002). Depuis, d'autres analogues ont été développés, notamment l'AP22594 qui s'est révélé efficace pour contrôler l'expression de l'EPO dans le muscle de singe rhésus après transduction par un vecteur AAV (Rivera et al., 2005). De nouveaux ligands de dimérisation dérivés de FK506 ont également été développés (Pollock and Clackson, 2002).

### III.2. 2. Régulation des promoteurs d'ARN polymérase III

#### III.2.2.1. Description des promoteurs d'ARN polymérase III

Il existe trois types de promoteurs d'ARN polymérase III dénommés promoteurs de types I à III (Paule and White, 2000; Schramm and Hernandez, 2002) :

- Le promoteur de type I est constitué du promoteur du gène de l'ARN5S qui code pour les petits ARN ribosomiaux (Bogenghagen et al., 1980; Sakonju et al., 1980).
- Le promoteur de type II inclut le promoteur du gène VAI de l'adénovirus de type 2 (Fowlkes and Shenk, 1980), ainsi que le promoteur des ARN de transfert (Galli et al., 1981; Hofstetter et al., 1981).
- Le promoteur de type III comprend : le promoteur du gène U6 qui code pour les petits ARN nucléaires qui composent le spliceosome (Das et al., 1988; Kunkel and Pederson, 1988), le promoteur du gène 7SK (Murphy et al., 1986) dont le produit de transcription est impliqué dans la régulation du complexe CDK9/cycline T (Nguyen et al., 2001), ainsi que le promoteur du gène H1 qui code pour des composants de la Ribonucléase P (Bartkiewicz et al., 1989). A la différence des promoteurs de type III, les promoteurs de types I et II sont intragéniques. Ils ne peuvent donc être utilisés pour l'expression régulée des shARN (figure 24).

Nous ne détaillerons ici que cette classe de promoteur et plus particulièrement le promoteur U6 humain, utilisé dans notre étude<sup>1</sup>.

### III.2.2.2. Le promoteur U6 humain

Parmi les promoteurs d'ARN polymérase III, le promoteur U6 est celui qui est le mieux caractérisé. Le promoteur U6 humain est composé de trois éléments de séquences qui sont situés à une position strictement définie du site d'initiation de la transcription : la boîte TATA à la position -24 à -29, un élément de séquence proximal (ESP) de -47 à -66 et un élément de séquence distal (ESD) de -149 à -244 (figure 25) (Das et al., 1988; Kunkel and Pederson, 1989). La boîte TATA et l'ESP constituent le core du promoteur (Hernandez and Lucito, 1988). La délétion, la substitution de séquence et certaines mutations ponctuelles dans la boîte TATA abolissent complètement la transcription (Mattaj et al., 1988; Kunkel and Pederson, 1989; Lobo and Hernandez, 1989; Parry and Mattaj, 1990). De même, la suppression de la boîte TATA conduit à un changement de la transcription qui passe de l'ARN polymérase III à l'ARN polymérase II (Mattaj et al., 1988; Lobo and Hernandez, 1989; Lescure et al., 1991). Egalement, la délétion ou la mutation dans l'ESP abolit la transcription (Kunkel and Pederson, 1988; Lobo and Hernandez, 1989; Parry and Mattaj, 1990). L'ESD induit la transcription à partir du core du promoteur. Ainsi la délétion de l'ESD réduit drastiquement le niveau de transcription (Murphy et al., 1989; Danzeiser et al., 1993).

L'initiation de la transcription à partir du promoteur U6 débute par la reconnaissance de l'ESP par un complexe multiprotéique dénommé SNAPc (« snRNA activating protein complex »). Celui-ci induit la liaison de la protéine TBP (« TATA-Binding Protein ») sur la boîte TATA. Une interaction existe entre les protéines SNAPc et TBP après la fixation respective sur l'ESP et la boîte TATA (Bai et al., 1996; Henry et al., 1996; Sadowski et al., 1996). Cette interaction entraîne la fixation du facteur de transcription TFIIB, qui conduit au recrutement de l'ARN polymérase III (figure 26).

---

<sup>1</sup> L'utilisation de la terminologie « promoteur d'ARN polymérase III » dans la suite de ce manuscrit se rapportera exclusivement à cette classe de promoteur.

L'ESD agit comme un activateur de la transcription en agissant sur le « core » du promoteur (Murphy et al., 1986; Murphy et al., 1987; Das et al., 1988). En effet, la fixation des facteurs de transcriptions, STAF1 (également appelé « SPH binding factor » ou SBF) et Oct-1, sur les sites de liaison présents dans l'ESD (Schramm and Hernandez, 2002) induisent l'activation de la transcription en interagissant avec la protéine SNAPc (Das et al., 1995; Schuster et al., 1998). En particulier, Oct-1 stabilise la fixation du complexe SNAPc sur l'ESP, augmentant ainsi le niveau de transcription (Murphy et al., 1992; Mittal et al., 1996; Mittal et al., 1999).

### III.2.2.3. Développement de promoteurs d'ARN polymérase III régulables

Les systèmes qui permettent de contrôler l'expression d'un transgène font appel à un promoteur d'ARN polymérase II et ne peuvent donc être directement transposés à un promoteur d'ARN polymérase III. L'expression des shARNs par un promoteur d'ARN polymérase III doit répondre à des contraintes imposées par la structure même du promoteur. Plusieurs systèmes ont été développés pour réguler ce type de promoteur.

Le premier est basé sur le système tétracycline. En raison des limites spatiales imposées par la structure du promoteur d'ARN polymérase III, ce système repose sur une stratégie négative. La séquence située entre la boîte TATA et le site de démarrage de la transcription a été remplacée par une seule séquence TetO. En présence de tétracycline, le répresseur Tet (TetR) ne peut se lier à TetO. Par conséquent, les facteurs de démarrage de la transcription peuvent induire la transcription. Inversement, en l'absence de tétracycline, la liaison de TetR sur TetO perturbe la formation du complexe d'initiation de la transcription. Cette stratégie a été utilisée pour construire des promoteurs H1 (van de Wetering et al., 2003; Hosono et al., 2004; Matthess et al., 2005) ou U6 (Czauderna et al., 2003) régulables par la tétracycline afin d'exprimer des shARN. Toutefois, une fuite importante de la transcription a été observée. De même, l'intégration d'un TetO entre l'ESP et la boîte TATA induit une fuite importante de la transcription (Matsukura et al., 2003; Matthess et al., 2005). Cette fuite peut s'expliquer par la présence d'un seul TetO qui ne permet pas une interaction forte et durable entre TetO et le transactivateur. Pour

contourner cette limite, Lin et al. (2004) ont intégré deux séquences TetO de part et d'autre de la boîte TATA et ont démontré une efficacité de régulation plus importante (Lin et al., 2004). De la même façon au laboratoire nous avons construit plusieurs promoteurs chimériques dérivés du promoteur U6 qui contrôlent l'expression de shARN dirigées contre la GFP (shGFPs) (Données non publiées). Nous avons intégré une séquence TetO en amont ou en aval de la boîte TATA, ou deux séquences TetO de part et d'autre de la boîte TATA. Cependant, contrairement aux résultats obtenus par Lin et al, nous avons observé une fuite importante de l'expression de shGFPs.

Le deuxième système est fondé sur la possibilité de contrôler l'activité transcriptionnelle du promoteur d'ARN polymérase III à distance. Dans ce contexte, Wiznerowicz et Trono (2003) ont intégré plusieurs séquences TetO en amont du promoteur H1. Dans ce travail, un nouveau transactivateur a été construit. Celui-ci comprend le domaine de liaison à l'ADN de TetR et pour sa partie effectrice le domaine KRAB. Ce dernier est un domaine retrouvé dans un grand nombre de protéines en doigt de zinc. KRAB inhibe la transcription des promoteurs d'ARN polymérase I, II et III sur une distance de plus de 3 kb du site de liaison, en agissant sur la formation de l'hétérochromatine (Urrutia, 2003). En l'absence de doxycycline, TetR-KRAB se lie sur les TetO et supprime l'activité des promoteurs qui se trouvent à proximité. Inversement, en présence de Dox, TetR-KRAB est séquestré et ne peut se lier aux TetO ce qui entraîne l'expression des transgènes (Deuschle et al. 1995). Toutefois, la capacité de KRAB à interagir avec les machineries transcriptionnelles dépendantes des polymérases II et III à une distance de 3 kb du site de liaison (Margolin et al., 1994 ; Moosmann et al., 1997 ; Senatore et al., 1999) peut conduire à des effets non désirés. Cette stratégie ne permet donc pas d'induire spécifiquement un promoteur de l'ARN polymérase III et donc de réguler uniquement l'expression des shARN.

Pour pallier ce manque de spécificité, un troisième système a été développé. Das et al. (1995) ont construit un nouveau transactivateur (GAL4-Oct2), dans lequel le domaine d'activation de la protéine activatrice GAL4 est remplacé par quatre copies de la portion 143 à 160 du facteurs de transcription Oct-2 dans lesquels tous les résidus glutamines sont mutés en alanine ((Oct-2(4xQ<sup>18</sup>Q→A)). Ces mutations permettent l'activation spécifique du

promoteur U6 (Das et al., 1995). GAL4-Oct2 a été utilisé pour réguler indirectement l'ARNi (Gupta et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs ont remplacé l'ESD du promoteur U6 par 4 séquences de liaison à GAL4. Ceci permet la fixation du transactivateur GAL4-Oct2 et l'activation de l'expression des shARN. Cependant, ils utilisent un système indirect puisque la régulation s'effectue au niveau de l'expression du transactivateur GAL4-Oct2 par le biais de l'ecdysone. L'utilisation de ce système est restreinte puisque trois unités transcriptionnelles sont nécessaires et ne peuvent être insérées dans un seul vecteur (trois vecteurs ont été utilisés).

#### IV. Objectifs de notre étude

La thérapie génique des maladies du système nerveux recouvre toute approche visant à prévenir ou à traiter une maladie par transfert de matériel génétique. Celui-ci peut permettre l'expression d'une protéine thérapeutique ou l'inhibition d'un gène endogène par le biais du mécanisme d'ARN interférence. La thérapie génique nécessite des outils de transfert de gène efficaces. Les vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1 constituent des vecteurs de choix pour le transfert de gènes thérapeutiques dans le système nerveux central. Cependant, pour une utilisation sécurisée de ces vecteurs en clinique, il est primordial de réguler l'expression du transgène. Ceci permet d'exprimer le gène thérapeutique en fonction des besoins du patient et, si nécessaire, d'éteindre l'expression du transgène en cas d'effets secondaires indésirables. Le système de régulation inductible par la tétracycline (Tet-on) est largement utilisé et s'est révélé efficace *in vitro* et *in vivo*.

Jusqu'à présent, l'expression régulée d'un transgène par la tétracycline nécessitait deux vecteurs lentiviraux, un premier pour exprimer le transactivateur et le second pour exprimer le transgène. Dans le contexte du transfert de gène *in vivo*, il est important de disposer d'un seul vecteur lentiviral pour exprimer à la fois le transactivateur et le transgène.

Au début de ce travail, seules deux équipes avaient proposé des vecteurs lentiviraux uniques dont l'expression du transgène est régulable par la tétracycline. Cependant ces chercheurs ont utilisé le système Tet-off. De plus, ces vecteurs décrits ne permettaient d'exprimer de manière régulable que des petits transgènes comme la GFP. L'utilisation du système Tet-on est indiquée pour cette application.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était :

- d'intégrer le système Tet-on dans un seul vecteur lentiviral et montrer sa capacité à exprimer de façon régulée des gènes thérapeutiques tels que la tyrosine hydroxylase *in vitro* et dans un modèle de la maladie de Parkinson

- d'adapter le système Tet-on au promoteur d'ARN polymérase III, d'incorporer l'ensemble de ce système dans un seul vecteur lentiviral et de valider sa capacité à réguler l'expression de shARN.

## **RESULTATS ET COMMENTAIRES**

## **I- Construction d'un vecteur lentiviral pour permettre l'expression régulée d'un transgène dans le cerveau.**

Article 1 :

**A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain.**

Roland VOGEL, Lahouari AMAR, Anh DO-THI, Paulette SAILLOUR and Jacques MALLET

Hum Gene Ther. 2004

Lorsque nous avons entrepris ce travail, de nombreuses équipes, parmi lesquelles le LGN avaient validé la fonctionnalité du système Tet, que ce soit dans des animaux transgéniques (Zhu et al., 2002), ou au sein de vecteurs adénoviraux (Corti et al., 1999b), AAV (Fitzsimons et al., 2001) et HSV (Schmeisser et al., 2002).

Le contrôle de l'expression d'un transgène nécessite l'apport de deux cassettes d'expression : la première permet l'expression du transactivateur et la deuxième l'expression du transgène. Ainsi, l'expression régulée d'un transgène par le système Tet-off a pu être obtenue par l'expression indépendante des deux cassettes via deux vecteurs lentiviraux distincts (Vigna et al., 2002).

En vue d'une éventuelle application clinique, il est nécessaire que la quantité de vecteur administrée au patient soit la plus faible possible et ceci afin de réduire les risques de mutagenèse insertionnelle. En effet, il a été rapporté suite à l'essai clinique sur des enfants atteints d'un déficit immunitaire sévère lié au chromosome X, le développement d'une leucémie chez deux de ces patients (Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Cette leucémie est due à l'insertion du vecteur rétroviral au sein du locus du proto-oncogène LMO-2. L'insertion du provirus a entraîné un effet enhanceur du LTR viral sur la transcription du gène LMO-2, et induit une expression aberrante de la protéine, responsable de la transformation cellulaire (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a).

Afin de limiter ce type d'effets secondaires, la possibilité d'insertion des deux cassettes d'expression dans un même vecteur a été envisagée. Cependant, la possibilité

d'insertion des deux cassettes d'expression dans un même vecteur lentiviral était jusqu'alors limitée par la présence de la séquence polyA qui empêchait la production des particules virales. C'est pourquoi, nous avons développé un seul vecteur lentiviral qui permet l'expression contrôlée d'un transgène thérapeutique par le système Tet-on. Les deux cassettes d'expression ont été intégrées au sein du génome lentiviral de part et d'autre de la séquence d'import nucléaire appelée séquence "Flap".

La cassette d'expression du transgène introduite a été placée sous le contrôle d'un promoteur CMV minimal (CMVmin) qui contient en amont les sept domaines de fixation du transactivateur. Afin d'augmenter l'expression du transgène, une séquence WPRE a été intégrée en aval du transgène. La deuxième cassette qui permet l'expression du transactivateur rtTA2M2 sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycérate kinase (PGK) a été orientée en antisens par rapport à la synthèse du génome du vecteur. L'orientation antisens permet la transcription du génome du vecteur pendant la production des particules virales. Pour s'affranchir de la séquence poly(A) du LTR3', une séquence poly(A) unidirectionnelle qui dérive du gène de l'hormone de croissance bovine (BGHpoly(A)) a été intégrée dans la deuxième cassette comme séquence de polyadénylation du transcrit rtTA2M2 (figure 1). Afin de supprimer les effets transactivateurs entre les promoteurs des deux cassettes d'expression, la séquence insulatrice de la  $\beta$ -globine de poulet a été insérée entre les deux cassettes d'expression (Bell et al., 1999). Afin de maintenir la séquence Flap dans une position centrale, une séquence stuffer de 300 pb a été intégrée en position opposée à la séquence insulatrice (figure 1).

Nous avons étudié la capacité de ce vecteur à exprimer de façon régulée un transgène *in vitro* et *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons montré que le vecteur lentiviral permettait l'expression contrôlée d'un gène rapporteur, la luciférase dans des cultures primaires d'astrocytes. En présence de 600 ng/ml de Dox, une expression efficace de la luciférase a été obtenue, qui était en corrélation avec la quantité de vecteur administrée (figure 2A et 2B). En absence de l'inducteur, aucune expression de la luciférase n'a été détectée par immunohistochimie (figure 2C). L'effet de l'inducteur est détectable après deux jours de traitement, mais maximal après quatre jours (figure 3A et 3B). Celui-ci se poursuit pendant au moins 14 jours (figure 3A). Le même niveau d'induction a été observé que le traitement avec la Dox débute le jour de la transduction ou 7 jours après (figure 3B).

Après arrêt du traitement, l'expression de la luciférase revient à son niveau basal. Celui-ci correspond à 1% du niveau maximal de l'activité luciférase. La courbe dose-réponse montre qu'une concentration de 600 ng/ml est nécessaire pour induire efficacement l'expression du transgène (figure 3C).

Ce vecteur a été injecté dans le striatum de rat. Les animaux sont traités ou non avec la doxycycline (0, 02 ou 3 mg/ml) dans l'eau de boisson pendant une période de 10 jours. Les rats sont ensuite sacrifiés, et leur cerveau est prélevé pour analyse enzymatique et immunohistochimique. En présence de 3 mg/ml de doxycycline, une activité totale luciférase de  $2,7 \times 10^7$  RLU/s est mesurée. En revanche, en absence de doxycycline, cette activité ne représente que 2% de l'activité totale (figure 4A). Lorsque les animaux sont traités avec 3 mg/ml de Dox dans l'eau de boisson, l'expression du transgène a pu être détectée (figure 4B). En revanche, aucune expression de la luciférase n'a pu être détectée en absence de Dox (figure 4C).

Ce système a ensuite été validé dans un modèle de la maladie de Parkinson. Cette maladie est caractérisée par la perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire. L'une des approches thérapeutiques pour cette maladie consiste à apporter l'enzyme limitante de biosynthèse de la dopamine, la tyrosine hydroxylase (TH) dans le striatum (Azzouz et al., 2002). Dans cette approche, il est nécessaire de contrôler l'expression de la TH afin de limiter les effets secondaires, comme la dyskinésie, due à la production incontrôlée de dopamine (Ma et al., 2002). Le gène de la TH a été introduit dans notre vecteur régulable. *In vitro*, ce vecteur a permis de réguler l'expression de la TH grâce à l'ajout de 600 ng/ml de doxycycline dans le milieu de culture (Figure 5A). Aucune immunoréactivité n'est observée en absence de doxycycline (figure 5B). *In vivo*, ce vecteur lentiviral a été ensuite injecté par voie stéréotaxique dans le striatum gauche de rat dans des modèles de lésions à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Les cellules exprimant la TH ont été révélées par immunohistochimie chez les animaux traités avec 3 mg/ml de Dox dans l'eau de boisson (figure 6A). Aucune cellule TH positive n'a été détectée chez les animaux injectés et non traités avec la Dox (figure 6B).

En résumé, nous avons construit un seul vecteur lentiviral qui permet l'expression régulée de protéines thérapeutiques dans le SNC.



















## **II- Développement d'un système de régulation de l'expression de petits ARN interférents : construction d'un vecteur lentiviral pour le contrôle d'un gène endogène par ARN interférence.**

Article 2 :

**Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter.**

**Lahouari Amar**, Mathieu Desclaux, Nicole Faucon-Biguet, Jacques Mallet and Roland Vogel

Nucleic Acids Research, 2006

En 2001, l'équipe de Thomas Tuschl a mis en évidence la possibilité de déclencher dans des cellules de mammifère le mécanisme de l'ARNi par transfection de petits ARN double brin chimiquement synthétisés, les siARN (Elbashir et al., 2001b). La limite majeure de cette étude est l'inhibition transitoire de l'expression d'un gène. Une inhibition à plus long terme peut être obtenue par la synthèse endogène de shARN par un vecteur plasmidique (Brummelkamp et al., 2002; Paddison et al., 2002) ou par un vecteur viral (Abbas-Terki et al., 2002; Barton and Medzhitov, 2002; Qin et al., 2003; Tiscornia et al., 2003). Une fois introduits dans la cellule, ces shARN sont rapidement clivés en siARN *in situ*. Toutefois, l'inhibition constitutive d'un gène n'est pas adaptée à l'étude de la survie cellulaire, de la régulation du cycle cellulaire ou du développement. De telles études nécessitent une inhibition conditionnelle de l'expression d'un gène ciblé. L'inhibition conditionnelle d'un gène peut également se révéler particulièrement importante pour une application thérapeutique, car elle permet de contrôler l'expression des shARN par une molécule inductrice. Le traitement peut ainsi être adapté aux besoins du patient, ou arrêté en cas de complications graves. Dans ce contexte, nous avons développé un système inductible d'expression des shARN qui repose sur le système "Tet-on" et ne requiert l'utilisation que d'un seul vecteur viral.

La présence d'une extrémité poly(A) empêche l'effet inhibiteur des siARN (Xia et al., 2002). Les shARN doivent par conséquent être exprimés par l'ARN polymérase III qui permet la synthèse d'ARN d'une taille réduite, puisque cinq résidus Thymidines consécutifs suffisent pour arrêter la transcription. Au cours de cette étude nous avons utilisé le promoteur U6.

La boîte TATA et l'ESP du promoteur U6 sont reconnus par les facteurs de démarrage de la transcription. L'ESD de ce promoteur interagit avec les facteurs de transcription STAF1 et Oct1, qui activent la machinerie transcriptionnelle (Schramm and Hernandez, 2002). La délétion de l'ESD réduit drastiquement l'efficacité de la transcription (Danzeiser et al., 1993). Cet élément est par conséquent déterminant pour l'activation de la transcription. Toutefois, il est possible de réactiver un promoteur U6 dépourvu de l'ESD lorsque cet élément est remplacé par plusieurs sites de liaison du transactivateur GAL4 de levure. La transcription est alors induite par un transactivateur qui contient le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 fusionné avec différents domaines transactivateurs (Das et al., 1995). L'utilisation en quatre copies identiques d'une partie du domaine transactivateur du facteur de transcription Oct2 dans lequel tous les résidus glutamines sont mutés en alanine ((Oct-2(4xQ<sup>18</sup>Q→A)) a permis la réactivation transcriptionnelle du promoteur U6. De plus, ces mutations assurent l'activation spécifique du promoteur U6 (Das et al., 1995).

En nous basant sur ces résultats, nous avons développé une stratégie nouvelle, qui découle de la stratégie décrite ci-dessus. Nous avons utilisé un facteur de transcription chimérique qui comprend le domaine de liaison à l'ADN de rtTA (Urlinger et al., 2000) fusionné avec le domaine d'activation de la protéine mutée Oct2 (Oct-2(4xQ<sup>18</sup>Q→A) (Figure 1A). Nous avons remplacé au sein du promoteur U6 humain l'ESD par sept TetO (figure 1B). Les cassettes d'expression des shARNs et du transactivateur rtTA-Oct2 ont été intégrées dans le même vecteur lentiviral (figure 2A).

Dans une première étape de notre travail, nous avons évalué la capacité de notre système à contrôler l'expression de la GFP dans une lignée 293T exprimant de façon stable cette protéine (293T-GFP). En présence de doxycycline le transactivateur se lie sur les séquences TetO et doit ainsi activer la transcription (figure 1D). Inversement, en l'absence

de doxycycline, le transactivateur ne peut se lier aux séquences TetO et par conséquent aucun effet ARNi ne doit être détecté (figure 1C). Nous avons transduit les cellules 293T-GFP avec le vecteur lentiviral permettant la synthèse régulée de shGFPs. L'analyse par "northern blot" montre une expression de shGFP dans les cellules transduites et cultivées en présence de doxycycline (figure 2B). En revanche, en absence de l'inducteur, aucun signal au-dessus de seuil de détection n'a été détecté dans les cellules transduites. L'expression de la GFP a été analysée par FACS, avant et après induction par la doxycycline. L'incubation des cellules transduites en présence de doxycycline conduit à une inhibition importante de l'expression de la GFP (figure 3A). La diminution du nombre de cellules GFP positives est corrélée avec la quantité de vecteur viral utilisé pendant la transduction (figure 2C). Nous avons caractérisé l'efficacité de ce système en utilisant un clone cellulaire. Nous avons évalué le temps et la dose de doxycycline nécessaires pour obtenir une induction maximale de l'ARNi. Une réduction significative de l'expression de la GFP a été observée après un jour de traitement et une diminution de plus de 90% a été mesurée après quatre jours de traitement (figure 3B). La concentration de doxycycline nécessaire pour l'induction maximale de shARNs a été évaluée par des expériences de dose-réponses. Une inhibition de plus de 90% a été observée en présence de 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de doxycycline (figure 3C). L'arrêt du traitement a conduit au retour au niveau basal de l'expression de la GFP après 4 jours (figure 3D). Ce résultat montre la réversibilité de ce système de régulation.

La deuxième partie de ce travail a consisté à évaluer la capacité de ce système de régulation à contrôler l'expression d'un gène endogène. Nous avons choisi le gène p53 comme gène endogène car sa détection est aisée et un shARN efficace a été précédemment décrit (Brummelkamp et al., 2002). Nous avons construit un second vecteur qui contient un shARN dirigé contre la p53 humaine. Des cellules 293T, MCF-7 et A549 ont été transduites avec différentes quantités de vecteur et incubées en présence ou en absence de 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Dox. Les analyses par « western blot » ont montré une inhibition de plus de 90% de la protéine p53 en présence de 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de doxycycline, alors qu'aucune diminution significative n'a été mesurée en absence de doxycycline (figure 4). Ces résultats montrent l'efficacité de ce système à réguler l'expression d'une protéine endogène.

En conclusion, nous avons développé un système de régulation qui permet une expression contrôlée par la doxycycline de shARN et démontré son inductibilité, sa réversibilité et sa stabilité dans le déclenchement de l'ARNi dans des cellules de mammifères.















## **DISCUSSION**

Dans ce travail, nous avons développé des vecteurs lentiviraux permettant l'expression régulée de facteurs thérapeutiques de nature protéiques ou nucléotidiques. Cette régulation est basée sur l'utilisation de la dernière version du système Tet-on, qui repose sur le transactivateur rtTA2-M2.

Ce travail a été effectué suivant deux axes. Le premier a porté sur le développement d'un vecteur lentiviral unique capable d'exprimer à la fois les cassettes d'expression du transgène et du transactivateur. La deuxième partie de ce travail a consisté au développement d'un nouveau système de régulation de l'ARN interférence et à son introduction dans un seul vecteur lentiviral.

## **I. Contraintes et limitations du système tétracycline**

### ***I.1. Contraintes pour la construction d'un vecteur unique contenant le système tétracycline***

#### **I.1.1. Contrainte de taille**

L'utilisation d'un vecteur lentiviral unique, ainsi que l'expression régulée d'un transgène constituent deux éléments importants de biosécurité. Ceci permet de réduire les risques liés à la dose du vecteur, mais également de contrôler l'expression du transgène. L'intégration du système de régulation Tet-off dans un seul vecteur lentiviral a précédemment été décrite (Kafri et al., 2000; Vigna et al., 2002). Ces vecteurs ont été utilisés pour l'expression régulée d'un petit transgène comme la GFP (800 pb). Pour exprimer à partir de ces vecteurs, à la fois le transactivateur et le petit transgène, deux cassettes chevauchantes ont été utilisées (Kafri et al., 2000; Vigna et al., 2002). Celles-ci font toutes les deux appel à la séquence polyA du LTR3' du vecteur. Toutefois, leur capacité à transférer un transgène de grande taille, comme la luciférase ou la TH (1800 pb) n'a jamais été rapportée. Dans un des vecteurs construits (Vigna et al., 2002), le promoteur inductible par la tétracycline (CMV minimal) a été intégré au sein du LTR3' pour exprimer le

transgène. Ceci compromet la biosécurité du vecteur qui ne peut plus être considéré comme un vecteur SIN (self-inactivating) (établis par la délétion U3 dans le LTR3') défectif pour la répliation (Zufferey et al., 1998). Pour certaines applications l'utilisation du système Tet-on est nécessaire. Dans ce contexte, nous avons i) inséré l'ensemble du système Tet-on au sein d'un seul vecteur lentiviral, et ii) avons validé la capacité de ce système à réguler un transgène de grande taille tel que la TH dans un modèle animal de la maladie de Parkinson.

### I.1.2. Risque d'interférence entre les promoteurs

Pour répondre à l'exigence de sécurité et prévenir les difficultés potentielles causées par la taille du gène thérapeutique, nous avons inséré deux cassettes d'expressions indépendantes dans le génome viral en exploitant la séquence unidirectionnelle poly(A) du gène de l'hormone de croissance bovine. L'intégration de deux cassettes d'expression dans un même vecteur risquait de générer des interférences transcriptionnelles entre le promoteur CMV (qui dirige l'expression du transgène) et le promoteur PGK (qui contrôle l'expression du transactivateur rtTA2-M2). Pour réduire ce risque, nous avons intégré entre les deux cassettes d'expression la séquence insulatrice de la  $\beta$ -globine de poulet (Bell et al., 1999), une séquence « stuffer » et la séquence centrale « flap ».

Pour évaluer la capacité de ce vecteur à exprimer efficacement et de façon régulée l'expression d'un transgène, nous avons utilisé la luciférase comme gène rapporteur. Nous avons évalué la fuite d'expression du promoteur CMV minimal en absence de doxycycline. Cette fuite d'expression est de l'ordre de 1 à 2% de l'activité à l'état induit *in vitro* et *in vivo* respectivement. Une activité basale de 1% à l'état éteint a également été rapportée lorsque l'expression régulée de la luciférase est exprimée à partir de deux vecteurs (Vigna et al., 2002). Ce résultat suggère que l'activation basale du promoteur CMV minimal dans notre étude est due à l'effet transactivateur de l'environnement chromosomique dans lequel le génome est intégré, plutôt qu'à la transactivation par un effet activateur du promoteur PGK utilisé pour exprimer le transactivateur. Les séquences « stuffer », « flap » et insulatrice sont donc suffisantes pour supprimer les effets transactivateurs entre les promoteurs des deux cassettes d'expression dans le vecteur.

## **I.2. Contraintes du système tétracycline pour une application clinique**

### **I.2.1. Contraintes liées à la dose de doxycycline**

#### a) Expression d'un facteur thérapeutique

L'expression régulée d'un facteur thérapeutique tel que la TH, nécessite *in vivo* une dose de 3 mg/ml de doxycycline dans l'eau de boisson après injection du vecteur lentiviral dans le striatum de rats. Cette concentration a été utilisée après injection du vecteur lentiviral exprimant le gène rapporteur luciférase dans le striatum de rats. Nous avons également tenu compte des études qui ont été préalablement publiées. Le système Tet-on nécessite 10 à 15 fois plus de doxycycline que le système Tet-off. Ce dernier requiert une concentration de 0,2 mg/ml de doxycycline dans l'eau de boisson pour réguler l'expression d'un transgène après injection stéréotaxique d'un vecteur lentiviral dans le striatum de rats (Kafri et al., 2000). Nous avons donc utilisé une concentration de 3 mg/ml de doxycycline dans l'eau de boisson pour induire efficacement l'expression du transgène. Cependant, Georgievska et ses collaborateurs ont montré qu'une concentration de 1 mg/ml de doxycycline dans l'eau de boisson est suffisante pour induire l'expression de GDNF après transfert de ce gène dans le striatum de rats (Georgievska et al., 2004). Il est donc envisageable de diminuer la dose de doxycycline dans le cadre de notre système.

Une concentration de 3 mg/ml de doxycycline est relativement importante pour une application éventuelle du système rtTA en clinique humaine et en particulier pour les pathologies du SNC. Les rats utilisés dans notre étude pesaient environ 300 g et chacun consommaient en moyenne 20 ml d'eau par jour. Une concentration de 3 mg/ml de doxycycline dans l'eau de boisson est équivalente à un apport journalier de 200 mg/kg soit l'équivalent de 14 g de doxycycline pour un homme de 70 kg. Utilisée à des fins antibactériennes, la doxycycline nécessite des doses de l'ordre de 100 mg d'antibiotique pour un patient de 70 kg. Des intoxications sévères ont été rapportées chez l'homme après une injection systémique journalière de 3,5 à 6 g de tétracycline (Schultz et al., 1963). La régulation de l'expression de gène basée sur le rtTA2-M2 n'est donc pas satisfaisante pour une application clinique de ce système dans les pathologies du SNC et ne peut être

envisagée dans ces conditions. Il est donc indispensable d'améliorer l'affinité du transactivateur du système Tet-on à l'inducteur ou de développer des molécules inductrices plus efficaces pour une utilisation sécurisée de ce système. Pour ce faire, l'équipe de Ben Berkhout a rapporté le développement par évolution dirigée d'un nouveau transactivateur rtTA (Das et al., 2004). Celui-ci est 5 fois plus actif (aux doses maximales de doxycycline) et 25 fois plus sensible à l'inducteur que le rtTA original (Gossen et al., 1995). Alors que le rtTA original nécessite *in vitro* 1000 ng/ml de doxycycline pour être actif, ce nouveau variant ne requiert que 40 ng/ml de doxycycline (Das et al., 2004). Récemment, le même laboratoire a utilisé cette technique pour isoler un nouveau variant de rtTA encore plus sensible et plus actif que le rtTA original (Zhou et al., 2006). Ce dernier est 7 fois plus actif et 100 fois plus sensible à la doxycycline que le rtTA développé par Gossen et Bujard (Gossen et al., 1995). Ce nouveau variant du rtTA ne nécessite plus que 10 ng/ml pour activer la transcription à partir du promoteur CMV minimal.

L'amélioration constante de l'affinité à l'inducteur du transactivateur, ainsi que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle constituent des éléments importants pour une utilisation du système Tet-on *in vivo*.

## b) Expression de shARN

Contrairement à un facteur thérapeutique, dont l'expression s'effectue à partir d'un promoteur d'ARN polymérase II, l'expression régulée d'un shARN se fait à partir d'un promoteur d'ARN polymérase III tel que le promoteur U6 minimal. Nous avons évalué la concentration nécessaire pour une expression maximale de shARN par des expériences de doses réponses. Il s'avère que l'expression inductible de shARN nécessite également une concentration de doxycycline importante. Dans ce cas, pour obtenir une inhibition maximale, une concentration de 6  $\mu\text{g/ml}$  de Dox a été utilisée. Cette concentration, plus de dix fois supérieure aux concentrations nécessaires pour activer un promoteur CMV minimal par le transactivateur rtTA2-M2 (Urlinger et al., 2000), est tout à fait surprenante. Alors que le domaine de fixation à la doxycycline du transactivateur rtTA-Oct-2 n'a pas été modifié, la sensibilité du transactivateur à la doxycycline aurait théoriquement dû être la même que celle du rtTA2-M2.

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce phénomène : d'une part, le domaine de transactivation Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) peut affecter l'affinité de la doxycycline en agissant sur l'accessibilité ou la structure du site de liaison à la doxycycline. D'autre part, l'hydrophobicité globale du domaine Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A), peut affecter les caractéristiques du domaine de liaison à l'ADN.

Le domaine Oct-2 (Q→A) est composé de quatre copies de la séquence polypeptidique Q<sup>18</sup>III (Q→A) qui comprend 18 résidus d'acides aminés (Das et al., 1995). Quatorze de ces 18 acides aminés sont non-polaires et hydrophobes et quatre acides aminés sont polaires. Dans ce cadre, le domaine Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) peut être considéré comme un ensemble hydrophobe qui facilite la formation du complexe d'initiation de la transcription après la fixation au promoteur U6 minimal. La séquence peptidique Q<sup>18</sup>III(Q→A) correspond aux résidus d'acides aminés 143 à 160 du facteur de transcription humain Oct-2, dans lequel tous les résidus glutamine sont changés en alanine. Puisque ces mutations portent sur six des dix huit acides aminés, Q<sup>18</sup>III(Q→A) peut être considéré comme un peptide synthétique individuel. Ces modifications permettent l'activation exclusive du promoteur d'ARN polymérase III. (Das et al., 1995). Pour cette raison, ce facteur de transcription est incapable d'activer d'autres promoteurs dans le voisinage du site d'intégration. L'utilisation d'un promoteur PGK pour exprimer le transactivateur remplit également cette condition puisqu'il ne permet pas de transactiver des promoteurs dans le voisinage du site d'intégration du vecteur.

L'expression régulée d'un shARN nécessite une concentration importante de doxycycline *in vitro*. Celle-ci limite l'utilisation de ce système *in vivo*. Il s'agira donc d'améliorer l'affinité du transactivateur rtTA-Oct2 à l'inducteur afin de réduire la concentration de doxycycline nécessaire pour induire l'expression de shARN et permettre son utilisation *in vivo*. Une possibilité serait d'utiliser la technologie d'évolution dirigée pour sélectionner des variants de rtTA-Oct2 plus sensibles à l'inducteur et plus actifs. Une autre voie serait d'utiliser des promoteurs d'ARN polymérase II pour exprimer des shARN. Ceci permet d'exprimer des shARN par des promoteurs tissus spécifiques, mais également à l'utilisation des systèmes de régulation dépendant de promoteur d'ARN polymérase II. Pour ce faire, deux stratégies sont possibles. La première consiste en l'utilisation d'une séquence poly(A) minimal pour arrêter la transcription. (Xia et al., 2002;

Unwalla et al., 2004; Unwalla et al., 2006). Cette dernière n'empêche pas la formation par Dicer d'un siARN fonctionnel (Xia et al., 2002). La deuxième stratégie consiste dans l'expression de shARN avec une structure qui mime les miARN (Dickins et al., 2005; Stegmeier et al., 2005; Zhou et al., 2005; Du et al., 2006; Xia et al., 2006). Il s'agit de remplacer la région qui code pour un miARN mature par la séquence qui code pour un shARN qui cible le gène de son choix (Stegmeier et al., 2005). Les miARN artificiels se sont révélés efficaces pour inhiber l'expression d'un gène cible (Zeng et al., 2002). Cette approche a d'ores et déjà été utilisée pour l'expression régulée de shARN par le système tétracycline par des vecteurs rétroviraux (Dickins et al., 2005) ou des vecteurs lentiviraux (Stegmeier et al., 2005; Shin et al., 2006).

Le développement de système d'expression de shARN par un promoteur d'ARN polymérase II est un pas important, puisqu'il ouvre la voie à l'utilisation de l'ensemble des systèmes de régulation connus (système tétracycline, rapamycine, ecdysone...). Il permettra également l'expression de shARN par des promoteurs tissus spécifiques.

### c) Tet-on ou Tet-off ?

Les systèmes de régulation développés par l'équipe d'Hermann Bujard offrent aujourd'hui le choix entre deux systèmes de régulation dans lesquels l'induction de l'expression se fait en absence (Tet-off) ou en présence (Tet-on) de doxycycline. Le choix de l'un ou l'autre de ces deux systèmes doit être fait en fonction du modèle expérimental, le but étant de limiter l'emploi de l'antibiotique. En thérapie génique, dans le cadre d'une stratégie de neuroprotection pouvant être limitée dans le temps, le choix du système de régulation portera sur le système Tet-on. En revanche, dans le cas d'une stratégie substitutive, visant à remplacer une fonction essentielle à long terme, le système Tet-off sera plus approprié.

Le choix du système de régulation se fera également en fonction de ses cinétiques d'induction et d'extinction du transgène. Pour les deux systèmes, les niveaux d'expression des transgènes atteignent le niveau de base en une à deux semaines après l'induction de l'inhibition de l'expression du transgène *in vivo* (Kistner et al., 1996; Corti et al., 1999b;

Corti et al., 1999a; Georgievska et al., 2004). Avec le système Tet-on, les taux maximaux d'induction de l'expression *in vivo* du transgène peuvent être obtenus avec un délai de quelques jours (Kistner et al., 1996; Mansuy et al., 1998). Le système Tet-off est caractérisé par de plus lentes cinétiques d'induction puisqu'une inhibition complète de l'expression du transgène est obtenue deux semaines après l'apport de 1 mg/ml de doxycycline dans l'eau de boisson (Corti et al., 1999b; Corti et al., 1999a). La réinduction de l'expression maximale du transgène nécessite de dix semaines (Corti et al., 1999a) à plus de trois mois (Harding et al., 1998) après retrait de la doxycycline. Ce temps d'induction de l'expression du transgène est dû à la demi-vie biologique de la tétracycline et de ses dérivés. Lorsqu'elles sont administrées, ces molécules s'accumulent dans le tissu musculaire et dans le tissu osseux et de ce fait leur élimination de l'organisme est plus lente. Cependant, une réinduction plus rapide de l'expression du transgène *in vivo* est possible en diminuant les doses de doxycycline (Kistner et al., 1996) et ceci sans modifier la fonctionnalité du système Tet-off. En effet une dose de 20 µg/ml de doxycycline permet une inhibition de l'expression du transgène 1 jour après traitement et une réinduction totale de l'expression une semaine après retrait de l'antibiotique de l'eau de boisson (Kistner et al., 1996).

### **I.2.2. Risque de réponse immunitaire contre le transactivateur**

L'efficacité des systèmes de régulation par la tétracycline en tant "qu'interrupteurs moléculaires" ne fait plus aucun doute. Toutefois, leur utilisation potentielle en thérapie génique, soulève la question fondamentale de l'immunogénicité éventuelle des éléments constituant le système tétracycline, en particulier du transactivateur chimérique. Des efforts importants ont été réalisés pour réduire cette réponse, et notamment par l'utilisation de domaines protéiques d'origines humaines. Cependant, le risque d'une réponse immunitaire n'est jamais éliminé, car la protéine de fusion contient une jonction peptidique qui peut être reconnue comme un élément étranger (Rivera et al., 1996). L'étude de la réponse immunitaire contre le transactivateur chimérique est peu évaluée dans les études de thérapie génique qui utilisent un système de régulation. Il a été rapporté cependant une réponse immunitaire humorale et cellulaire dirigée contre le rtTA2-M2 après électrotransfert dans le muscle de macaques (Latta-Mahieu et al., 2002) ou après

injection intramusculaire d'un vecteur adénoviral chez la souris (Lena et al., 2005). Cette réponse limite l'expression à long terme du transactivateur. Une absence de réponse immunitaire dirigée contre le rtTA a été observé chez le macaque après injection intramusculaire d'un vecteur AAV qui exprime de façon régulé l'EPO (Favre et al., 2002). Toutefois, ce phénomène n'a été observé que chez un seul animal sur six transduits, ce qui ne permet pas de conclure à une absence de réponse immunitaire dirigée contre le transactivateur.

## **II. Alternatives au système tétracycline**

### ***II.1. Système de régulation par la rapamycine***

L'utilisation clinique de systèmes de régulation et en particulier du système tétracycline nécessitera des études complémentaires afin d'évaluer la réponse immunitaire dirigée contre la protéine transactivatrice en fonction de la dose et du type de vecteur utilisé. Pour s'affranchir d'une éventuelle réponse immunitaire chez l'homme du système tétracycline, une possibilité serait d'utiliser des systèmes de régulations d'origine humaine comme le système de régulation par la rapamycine (Rivera et al., 1996). Récemment une étude menée chez le singe rhésus n'a montré aucune réponse immunitaire apparente après l'injection intramusculaire d'un vecteur AAV qui permet l'expression régulée d'EPO par le système rapamycine (Rivera et al., 2005). Le système de régulation par la rapamycine peut être une approche prometteuse pour l'expression régulée d'une protéine thérapeutique en thérapie génique. Egalement, le développement de systèmes de régulation basés sur la technologie des protéines en doigt de zinc peut être une autre approche pour une thérapie génique sûre et efficace.

### ***II.2. Régulation physiologique***

De nombreux systèmes de régulation nécessitent l'utilisation d'un transactivateur chimérique qui peut entraîner une réponse immunitaire. Une approche alternative serait de

placer le transgène d'intérêt sous contrôle d'éléments de régulation physiologiques (Miller and Whelan, 1997; Varley and Munford, 1998). En effet, une régulation endogène de protéine thérapeutique a été permise à partir d'un promoteur induit par des stimuli inflammatoires (Varley and Munford, 1998). Ces promoteurs ont été intégrés au sein de vecteurs viraux. Une expression régulée du facteur thérapeutique a été observée *in vivo* en fonction de l'état inflammatoire des animaux (Miagkov et al., 2002; van de Loo et al., 2004). Une régulation physiologique est également envisagée pour le traitement du diabète. Dans ce contexte, des promoteurs dont l'activité est régulée par les taux de glucose sont utilisés pour contrôler la synthèse de gènes thérapeutiques comme ceux codant pour l'insuline, le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), ou des facteurs immunosuppresseurs (Varley and Munford, 1998). Une étude récente a montré la capacité du promoteur à contrôler l'expression de différents transgènes dans le SNC en réponse à une lésion cytotoxique (Jakobsson et al., 2006). Des vecteurs lentiviraux exprimant soit la bêta-galactosidase sous le contrôle du promoteur GFAP, soit la GFP sous contrôle du promoteur de l'enképhaline ont été injectés dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA, ou à l'acide iboténique (Jakobsson et al., 2006). La GFAP est une protéine des filaments intermédiaires qui est surexprimée lors de la réactivité gliale qui a lieu après la lésion. L'expression de l'enképhaline est augmentée après la déplétion en dopamine induite par la liaison à la 6-OHDA. L'expression de la bêta-galactosidase et de la GFP est induite dans les astrocytes et dans les neurones respectivement, dans le cerveau des rats lésés. L'expression des transgènes augmente en fonction de la sévérité de la lésion.

Cette approche de régulation dépendante d'un état pathologique permet un contrôle du transgène sans l'apport de molécule inductrice et sans l'expression d'un transactivateur, ce qui devrait permettre d'éviter une réponse immunitaire. L'application thérapeutique d'un système de régulation dépendant d'un état physiologique nécessite encore des développements, mais l'accroissement de nos connaissances sur la physiopathologie des maladies et la disponibilité d'éléments de réponses répondant à des stimuli propres aux conditions pathologiques permettra un jour l'utilisation de ce type de système de régulation chez l'homme.

### ***II.3. Régulation par les protéines en doigt de zinc***

La disponibilité de méthodes rapides et robustes pour contrôler l'expression des gènes est primordiale pour l'étude de la fonction de ces gènes, mais également pour des interventions thérapeutiques. Cette dernière approche devient possible grâce à l'utilisation des protéines en doigt de zinc (ZFP, zinc-finger proteins). Les ZFP sont des facteurs de transcription qui possèdent deux domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine effecteur (activateur ou répresseur) qui agit sur la transcription. Ce type de protéine comporte des éléments répétés avec une forme de doigts de gant. Il existe plusieurs types de ZFP, caractérisés par leur motif de liaison à l'ADN. Les ZFP à motif Cys2-His2 représentent les protéines les plus communes chez les eukaryotes (Beerli and Barbas, 2002). Chaque doigt de zinc reconnaît précisément 3 paires de bases consécutives. En utilisant deux protéines comportant chacune trois doigts de zinc pouvant être individuellement choisis, la reconnaissance s'effectue sur une séquence spécifique de 18 nucléotides. Cette méthode permet ainsi de cibler de manière spécifique et unique une séquence d'intérêt connue. Le domaine en doigt de zinc Cys2-His2 est particulièrement intéressant pour la construction de facteurs de transcription synthétiques. Alors que les domaines de liaison à l'ADN de nombreuses protéines se lient comme des dimères et utilisent des domaines de reconnaissance non modulables, la modification à la fois de la structure et de la fonction des domaines de liaison des ZFP font de ces dernières des outils de choix pour contrôler la fonction de gènes (Beerli and Barbas, 2002).

Il existe actuellement trois méthodes qui peuvent être utilisées pour affecter l'expression de gènes en utilisant la technologie ZFP. La première consiste à bloquer la transcription d'un gène par la surexpression d'une protéine ZFP chimérique qui, en se fixant de façon spécifique sur la séquence codante du gène à inhiber, va provoquer une gêne stérique et empêcher la transcription (Choo et al., 1994). La deuxième stratégie est également basée sur une gêne stérique mais il s'agira cette fois-ci de cibler le promoteur pour empêcher la fixation des protéines d'initiation de la transcription (Kim and Pabo, 1997). Enfin, la troisième stratégie repose sur la fusion de domaines de régulation de la transcription avec le domaine de liaison à l'ADN des ZFP (Pomerantz et al., 1995; Choo et al., 1997; Beerli et al., 2000a). Cette dernière stratégie a été utilisée avec succès pour générer des régulateurs

d'expression de gènes, qui peuvent être utilisés comme des activateurs ou des inhibiteurs en fonction du domaine effecteur utilisé.

Le développement de protéines ZFP chimériques, qui se lient à des séquences spécifiques de l'ADN, facilite les stratégies de manipulation de l'expression de gènes à la fois dans les cultures de cellules et dans les organismes entiers. Toutefois, une régulation constitutive d'un gène cible n'est pas désirable à long terme. Pour toute application thérapeutique, une régulation réversible par l'apport d'une molécule inductrice est préférable et ceci afin de limiter les effets secondaires et d'augmenter la sécurité. Plusieurs systèmes de régulations ont été décrits (voir plus haut). Ainsi, la fusion des domaines de liaison à l'ADN des ZFP avec les domaines régulateurs de la transcription a permis d'obtenir des protéines modulatrices de la transcription en fonction de l'apport d'une molécule inductrice (Beerli et al., 2000b; Xu et al., 2001b). En effet, la fusion du domaine de liaison du ligand du récepteur aux œstrogènes et du domaine d'activation de la transcription VP16 avec le domaine de liaison à l'ADN de ZFP a permis de contrôler avec succès l'expression de la luciférase (Xu et al., 2001b).

Les composants des systèmes de régulation en vue d'une application clinique ne doivent pas entraîner de réponses immunitaires et dans ce cadre, des composants humains (système rapamycine ou protéine ZFP) doivent être utilisés. De plus, l'utilisation d'un système qui peut être contrôlé par un inducteur exogène est un élément important. Cependant, des développements supplémentaires seront nécessaires. À terme, le clinicien pourra doser la quantité de molécules thérapeutiques (protéine ou shARN) en fonction des besoins de chaque patient et arrêter le traitement en cas de complication grave.

### III. Contraintes et limitations de l'expression des shARN

#### III.1. Risque de saturation de l'ARNi

L'ARNi est un outil puissant pour inhiber l'expression d'un gène au niveau post-transcriptionnel. De plus, une étude récemment publiée par Grimm et al. est venue apporter des éléments supplémentaires en faveur d'une régulation de l'ARNi (Grimm et al., 2006). Ce travail a montré que l'expression à long terme de shARN peut entraîner une létalité importante des souris. Les auteurs montrent que cette mortalité est due à la compétition entre les shARN et les miARN au niveau du transport nucléo-cytoplasmique réalisé par l'exportine 5 (Grimm et al., 2006). La saturation de la voie endogène de l'ARNi peut être donc évitée par le contrôle strict de l'expression des shARN thérapeutiques. Ce résultat confirme la nécessité de développer des systèmes de régulations sûrs et efficaces pour le contrôle de l'expression des shARN.

#### III.2. Risque de réponse immunitaire

L'inhibition spécifique d'un gène par ARNi a ouvert la voie à l'utilisation thérapeutique des siARN. Toutefois, plusieurs études sont venues réduire l'engouement qu'avait suscité cette technologie. En effet, il a été rapporté que les siARN pouvaient activer les cellules du système immunitaire et induire la production de cytokine à la fois *in vitro* et *in vivo* (Sioud and Sorensen, 2003; Kariko et al., 2004). Ils peuvent également activer le système interféron *in vitro* (Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003; Kim et al., 2004). La transfection de monocytes humains avec des siARN synthétiques induit l'expression de TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor) et d'IL6 (Judge et al., 2005). De même, la transfection de cellules mononucléaires sanguines avec des siARN ou des shARN induit l'expression d'INF $\alpha$ , IL6 et de TNF $\alpha$  (Hornung et al., 2005; Judge et al., 2005; Sioud, 2005). L'induction de la réponse immunitaire contre l'ARN a lieu chez la souris et l'homme via certains sous-types de cellules immunitaires et dépend de la séquence et du type de cellules (Wang et al., 2002). Certains motifs (5'-GUCCUCAA-3' et 5-UGUGU-3') présents dans

les siARN/shARN et même dans des ARN simple brin sont des inducteurs de la production de cytokines, et particulièrement d'IFN dans les cellules dendritiques via le TLR7 (« Toll Like Receptor » 7 (Hornung et al., 2005) et de TNF $\alpha$  dans les monocytes probablement via TLR8 (Heil et al., 2004; Sioud, 2005). De manière générale, les ARN riches en GU sont immunostimulateurs, à la fois dans les cellules murines et humaines en activant NF- $\kappa$ B lorsqu'ils sont apportés à forte concentration par un véhicule lipidique dans des cellules HEK-293 exprimant TLR8, suggérant que les ARN contenant des séquences GU sont plus immunostimulateurs (Heil et al., 2004).

### **III.3. Risque de toxicité**

Les effets secondaires des siARN doivent être pris en compte pour toute application thérapeutique. Des effets potentiellement délétères ont été illustrés par des expériences dans lesquelles des souris injectées avec des siARN présentent des signes de toxicité et notamment des niveaux sériques élevés d'aspartate aminotransférase (signe d'atteinte hépatique) et d'une réduction du nombre de lymphocytes et de plaquettes (Judge et al., 2005). Il est donc nécessaire d'éviter les effets secondaires des siARN, tout en conservant une activité ARNi. Pour cela, il faudrait sélectionner une séquence du siARN et éviter les motifs immunostimulateurs (Judge et al., 2005).

## **IV. Contraintes liées à l'utilisation des vecteurs lentiviraux en vue d'une application clinique**

L'utilisation des vecteurs lentiviraux en thérapie génique humaine, et particulièrement pour les pathologies du système nerveux, implique un cahier des charges très strict. En effet, les vecteurs lentiviraux devront avant toute utilisation chez l'homme remplir des conditions de sécurité (absence de mutagenèse insertionnelle) et d'efficacité (expression du transgène forte, spécifique et régulée). Un grand nombre d'études a déjà apporté des éléments en faveur d'une utilisation clinique de ces vecteurs. De plus, pour réduire les effets d'insertions aléatoires et l'activation d'oncogènes, le développement de

vecteurs lentiviraux non-intégratifs (Nightingale et al., 2006; Philippe et al., 2006; Yanez-Munoz et al., 2006) ou à intégration ciblée (Recchia et al., 1999; Kogure et al., 2001) améliore les conditions pour une meilleure sécurité. D'autre part, pour répondre aux exigences d'efficacité, l'utilisation de promoteurs forts et/ou spécifiques d'un type cellulaire (GFAP, NSE...) a permis d'obtenir une expression satisfaisante et spécifique du type cellulaire ciblé. En outre, l'utilisation et la maîtrise de nouvelles enveloppes virales ouvrent la voie vers de nouvelles possibilités de ciblage cellulaire. Enfin, le développement de systèmes de régulation de plus en plus sûrs et efficaces est un élément supplémentaire en faveur du passage des vecteurs lentiviraux en thérapeutique humaine.

L'utilisation en routine des vecteurs lentiviraux implique également une amélioration de la qualité des lots cliniques. En effet, il est possible de retrouver des contaminations de débris cellulaires et de composants du milieu de culture qui se révèlent potentiellement toxiques et immunogènes après l'étape de concentration par ultracentrifugation (Park et al., 2000). En remplaçant cette étape par une purification en chromatographie échangeuse d'ions, on ne retrouve plus de signes de toxicité aiguë ou durable, ni d'inflammation (Scherr et al., 2002). La qualité peut également être améliorée en produisant des vecteurs par des cellules cultivées sans sérum, tout en gardant l'étape d'ultracentrifugation. Les anticorps générés sont faibles et peu neutralisants (Baekelandt et al., 2003).

Enfin, l'homme étant potentiellement l'hôte du VIH-1 et la pathogénie du virus étant suffisamment grave et étendue, se pose le problème des interactions vecteur et virus *in vivo* (Bukovsky et al., 1999). L'utilisation des vecteurs SIN ou delta-U3 permet de s'affranchir de cette interaction (Miyoshi et al., 1998; Zufferey et al., 1998).

Les étapes de développement des vecteurs lentiviraux en terme de biosécurité, d'efficacité, et de qualité des vecteurs produits ont été importantes jusqu'à présent. Toutefois, beaucoup de chemin reste à parcourir pour répondre à l'ensemble des exigences du cahier des charges pour l'utilisation clinique de ces vecteurs lentiviraux, en particulier ceux dérivés du VIH-1.

## V. Considérations éthiques et avenir de la thérapie génique

Il est difficile de décrire les techniques relatives à la thérapie génique sans discuter des questions qu'elles soulèvent au niveau éthique. Il serait d'ailleurs vain de restreindre ces questions au simple transfert de gène. Dans sa perspective thérapeutique, le transfert de gène exige, comme pour tout nouveau médicament, une évaluation stricte du rapport risque/bénéfice. Celui-ci doit être le plus faible possible, en particulier au regard des pratiques thérapeutiques utilisées jusqu'alors. C'est à ce type de thérapie génique que le comité consultatif national d'éthique a donné un avis favorable le 13 décembre 1990. En France, les essais de thérapie génique sont encadrés par la loi Huriot-Sérusclat (loi n°88-1138 du 20/12/88), les lois de bioéthique de juillet 1994 et du 6 août 2004. Elles définissent les règles des essais de thérapie génique chez l'homme et garantissent une protection efficace des patients.

Les préoccupations actuelles de la société concernent le transfert de gène dans un but de modification ou d'amélioration de l'individu. Le transfert de gène dans les cellules somatiques pose le problème d'une éventuelle dérive eugénique de la thérapie génique.

Le transfert de gène dans les cellules germinales, c'est-à-dire toute modification du capital génétique des cellules reproductrices (ovocytes, spermatozoïdes et leurs précurseurs) qui aurait pour conséquence une modification du génome de tout l'individu, est proscrite par toutes les réglementations en matière de transfert de gène thérapeutique chez l'homme. D'ailleurs, pour être accepté, tout protocole de thérapie génique doit démontrer que les vecteurs utilisés n'affecteront pas les cellules germinales du patient. Néanmoins, la preuve de principe du transfert de gène dans les cellules foetales embryonnaires humaines a été apportée par transfection d'ADN (Shamblott et al., 2001). Ces expériences montrent qu'il est possible d'exprimer un gène étranger dans les cellules germinales. Dans ce cadre, afin d'éviter toute dérive délibérée eugénique, il est indispensable de veiller à ce que les cellules germinales modifiées ne soient jamais utilisées dans un but de procréation.

Le transfert de gène chez le fœtus pose également un problème éthique. La thérapie génique *in utero* est pour l'instant envisagée pour des pathologies génétiques extrêmement

graves. En France depuis 1999, le diagnostic préimplantatoire est autorisé dans le cadre de pathologies génétiques graves. Celui-ci permet de choisir *in vitro* les embryons lorsque une maladie génétique grave est crainte. Cependant d'un point de vue éthique, cette pratique soulève de nombreuses questions, en particulier celle d'une dérive eugénique. La thérapie génique *in utero* pourrait être une alternative au diagnostic préimplantatoire. Bien que la technique ne soit pas encore au point, il est probable que le développement de nouveaux outils permettra de dépasser ces limites. Cependant, il est nécessaire de s'assurer que le transfert de gène n'affecte pas les cellules germinales du fœtus, de même, qu'il n'y ait pas de modifications génétiques des cellules de la mère. Enfin, il est nécessaire de s'assurer que ce transfert de gène n'induit pas de risques d'avortement prématuré. En prenant en compte toutes ces conditions, la question qui se pose est de savoir à quel stade du développement le futur enfant doit être soigné ? C'est à cet ensemble de questions que le législateur devra répondre. Pour ma part, il me semble important de maintenir des garde-fous stricts afin d'éviter tout risque d'eugénisme. En tout état de cause, il est important que ces pratiques (diagnostic préimplantatoire ou thérapie génique *in utero*) ne soient autorisées que dans le cas où une maladie grave est crainte chez l'enfant à naître.

L'application du transfert de gène chez l'homme dans un but d'amélioration des compétences physiques est aujourd'hui revenue sur la scène publique dans le cadre du dopage sportif. Chez l'animal, le transfert de gène du facteur de croissance IGF-1 dans les cellules musculaires de souris augmente de 15% la masse musculaire des animaux (Takahashi et al., 2003; Barton, 2006). L'introduction du gène de l'EPO dans les cellules de muscles de primates a conduit à une production d'EPO 10 fois supérieure à la normale associée à une augmentation de plus de 60% du taux de globules rouges (Zhou et al., 1998). Même si cette pratique n'a pas encore été utilisée chez les sportifs de haut niveau, le centre international de lutte antidopage a d'ores et déjà interdit l'utilisation de la thérapie génique pour toute amélioration des capacités physiques des sportifs.

Comme pour tous les autres secteurs de la biologie, l'avenir de la thérapie génique est conditionné par les expériences du passé. Jusqu'alors, les échecs pour guérir une maladie étaient dûs essentiellement à la méconnaissance de certains aspects de la maladie ou au manque d'outils appropriés. Le séquençage complet du génome humain et l'amélioration

des outils de biologie moléculaire et de bioinformatique vont favoriser notre compréhension des processus de nombreuses pathologies. Les résultats de ces études auront un impact considérable dans le choix des stratégies thérapeutiques par transfert de gène. Ces mêmes techniques vont permettre de mieux connaître l'impact du transfert de gène dans des modèles animaux. Ce type d'informations favorisera la prise de position sur la validité médicale et éthique d'un protocole de thérapie génique. Dans le même temps, l'amélioration constante des outils de transfert de gène permet déjà d'accroître les stratégies thérapeutiques et de minimiser les risques éventuels. Il est probable que dans un avenir proche, l'amélioration de l'efficacité de transduction, de la stabilité, de la biosécurité et du tropisme des vecteurs permettra aux prochains essais cliniques d'être plus probants que les précédents. Enfin, il est à prévoir que les vecteurs de transfert de gène seront utilisés comme des outils de correction génique par recombinaison homologe du transgène avec une séquence génomique mutante. De nombreuses études ont montré la faisabilité de ce type de stratégies *in vitro* (Russell and Hirata, 1998; Feederle et al., 2004; Ohbayashi et al., 2005) et *in vivo* (Miller et al., 2006). L'efficacité de cette méthode reste encore à être améliorée, mais elle ouvre la voie au transfert de gène afin de corriger un gène muté.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, Pralong W, Aebischer P (2002) Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther* 13:2197-2201.
- Abdallah B, Hassan A, Benoist C, Goula D, Behr JP, Demeneix BA (1996) A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 7:1947-1954.
- Abordo-Adesida E, Follenzi A, Barcia C, Sciascia S, Castro MG, Naldini L, Lowenstein PR (2005) Stability of lentiviral vector-mediated transgene expression in the brain in the presence of systemic antivector immune responses. *Hum Gene Ther* 16:741-751.
- Abruzzese RV, Godin D, Mehta V, Perrard JL, French M, Nelson W, Howell G, Coleman M, O'Malley BW, Nordstrom JL (2000) Ligand-dependent regulation of vascular endothelial growth factor and erythropoietin expression by a plasmid-based autoinducible GeneSwitch system. *Mol Ther* 2:276-287.
- Acsadi G, Angelov RA, Yang H, Toth G, Thomas R, Jani A, Wang Y, Ianakova E, Mohammad S, Lewis RA, Shy ME (2002) Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum Gene Ther* 13:1047-1059.
- Aebischer P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE (1996) Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2:696-699.
- Agostini I, Navarro JM, Rey F, Bouhamdan M, Spire B, Vigne R, Sire J (1996) The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *J Mol Biol* 261:599-606.
- Aiken C (1997) Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* 71:5871-5877.
- Aiuti A, Vai S, Mortellaro A, Casorati G, Ficara F, Andolfi G, Ferrari G, Tabucchi A, Carlucci F, Ochs HD, Notarangelo LD, Roncarolo MG, Bordignon C (2002) Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med* 8:423-425.
- Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS (1996) High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70:2581-2585.
- Alberch J, Perez-Navarro E, Canals JM (2004) Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog Brain Res* 146:195-229.
- Almeida R, Allshire RC (2005) RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol* 15:251-258.
- Auricchio A, Gao GP, Yu QC, Raper S, Rivera VM, Clackson T, Wilson JM (2002a) Constitutive and regulated expression of processed insulin following in vivo hepatic gene transfer. *Gene Ther* 9:963-971.
- Auricchio A, Rivera VM, Clackson T, O'Connor EE, Maguire AM, Tolentino MJ, Bennett J, Wilson JM (2002b) Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol Ther* 6:238-242.
- Auricchio L, Bujard H, Hillen W, Cortese R, Ciliberto G, La Monica N, Palombo F (2001) Regulated and prolonged expression of mIFN(alpha) in immunocompetent mice mediated by a helper-dependent adenovirus vector. *Gene Ther* 8:1817-1825.

- Azzouz M, Hottinger A, Paterna JC, Zurn AD, Aebischer P, Bueler H (2000) Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet* 9:803-811.
- Azzouz M, Martin-Rendon E, Barber RD, Mitrophanous KA, Carter EE, Rohll JB, Kingsman SM, Kingsman AJ, Mazarakis ND (2002) Multicistronic lentiviral vector-mediated striatal gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and GTP cyclohydrolase I induces sustained transgene expression, dopamine production, and functional improvement in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22:10302-10312.
- Baekelandt V, Eggermont K, Michiels M, Nuttin B, Debyser Z (2003) Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther* 10:1933-1940.
- Baekelandt V, Claeys A, Eggermont K, Lauwers E, De Strooper B, Nuttin B, Debyser Z (2002) Characterization of lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse brain. *Hum Gene Ther* 13:841-853.
- Bai L, Wang Z, Yoon JB, Roeder RG (1996) Cloning and characterization of the beta subunit of human proximal sequence element-binding transcription factor and its involvement in transcription of small nuclear RNA genes by RNA polymerases II and III. *Mol Cell Biol* 16:5419-5426.
- Balaggan KS, Binley K, Esapa M, Iqbal S, Askham Z, Kan O, Tschernutter M, Bainbridge JW, Naylor S, Ali RR (2006) Stable and efficient intraocular gene transfer using pseudotyped EIAV lentiviral vectors. *J Gene Med* 8:275-285.
- Balcitis S, Weinstein JR, Li S, Chamberlain JS, Moller T (2005) Lentiviral transduction of microglial cells. *Glia* 50:48-55.
- Barde I, Zanta-Boussif MA, Paisant S, Leboeuf M, Rameau P, Delenda C, Danos O (2006) Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector. *Mol Ther* 13:382-390.
- Barkats M, Millecamps S, Abrioux P, Geoffroy MC, Mallet J (2000) Overexpression of glutathione peroxidase increases the resistance of neuronal cells to Abeta-mediated neurotoxicity. *J Neurochem* 75:1438-1446.
- Baron U, Gossen M, Bujard H (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* 25:2723-2729.
- Baron U, Schnappinger D, Helbl V, Gossen M, Hillen W, Bujard H (1999) Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1013-1018.
- Bartkiewicz M, Gold H, Altman S (1989) Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with RNase P activity from HeLa cells. *Genes Dev* 3:488-499.
- Barton ER (2006) Viral expression of insulin-like growth factor-I isoforms promotes different responses in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 100:1778-1784.
- Barton GM, Medzhitov R (2002) Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14943-14945.
- Bartz SR, Vodicka MA (1997) Production of high-titer human immunodeficiency virus type 1 pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Methods* 12:337-342.
- Bayne EH, Allshire RC (2005) RNA-directed transcriptional gene silencing in mammals. *Trends Genet* 21:370-373.
- Beerli RR, Barbas CF, 3rd (2002) Engineering polyductyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol* 20:135-141.

- Beerli RR, Dreier B, Barbas CF, 3rd (2000a) Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1495-1500.
- Beerli RR, Schopfer U, Dreier B, Barbas CF, 3rd (2000b) Chemically regulated zinc finger transcription factors. *J Biol Chem* 275:32617-32627.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98:387-396.
- Bemelmans AP, Horellou P, Pradier L, Brunet I, Colin P, Mallet J (1999) Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer. *Hum Gene Ther* 10:2987-2997.
- Bensadoun JC, Deglon N, Tseng JL, Ridet JL, Zurn AD, Aebischer P (2000) Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF. *Exp Neurol* 164:15-24.
- Berns KI, Giraud C (1996) Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 218:1-23.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.
- Bhattacharya M, Babwah AV, Godin C, Anborgh PH, Dale LB, Poulter MO, Ferguson SS (2004) Ral and phospholipase D2-dependent pathway for constitutive metabotropic glutamate receptor endocytosis. *J Neurosci* 24:8752-8761.
- Bigey P, Bureau MF, Scherman D (2002) In vivo plasmid DNA electrotransfer. *Curr Opin Biotechnol* 13:443-447.
- Bilang-Bleuel A, Revah F, Colin P, Locquet I, Robert JJ, Mallet J, Horellou P (1997) Intra-striatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8818-8823.
- Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W (2001) Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14428-14433.
- Bjorklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ (2000) Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res* 886:82-98.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475-480.
- Blomer U, Kafri T, Randolph-Moore L, Verma IM, Gage FH (1998) Bcl-xL protects adult septal cholinergic neurons from axotomized cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2603-2608.
- Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH (1997) Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71:6641-6649.
- Bogenhagen DF, Sakonju S, Brown DD (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell* 19:27-35.
- Bohl D, Naffakh N, Heard JM (1997) Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat Med* 3:299-305.

- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:1097-1101.
- Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P, Ugazio AG, Mavilio F (1995) Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* 270:470-475.
- Boulos S, Meloni BP, Arthur PG, Bojarski C, Knuckey NW (2006) Assessment of CMV, RSV and SYN1 promoters and the woodchuck post-transcriptional regulatory element in adenovirus vectors for transgene expression in cortical neuronal cultures. *Brain Res* 1102:27-38.
- Bouyac-Bertoia M, Dvorin JD, Fouchier RA, Jenkins Y, Meyer BE, Wu LI, Emerman M, Malim MH (2001) HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* 7:1025-1035.
- Bowers WJ, Olschowka JA, Federoff HJ (2003) Immune responses to replication-defective HSV-1 type vectors within the CNS: implications for gene therapy. *Gene Ther* 10:941-945.
- Bowles DE, Rabinowitz JE, Samulski RJ (2003) Marker rescue of adeno-associated virus (AAV) capsid mutants: a novel approach for chimeric AAV production. *J Virol* 77:423-432.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113:25-36.
- Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34:263-264.
- Brizard M HY, Perrin P, Jallet C, Bemelmans AP, Tordo N, Faucon-Biguët N, Mallet J, Sarkis S (submitted) Immune Responses induced by repeated injections of HIV-1 based vectors pseudotyped with VSV and Mokola envelopes into the brain do not preclude sustained transgene expression.
- Brizard M. HY, Mammeri H., Jan C., Bemelmans AP., Serguera C., N. Dufour, P. Colin, Perrin P., Tordo N., Charneau P., Tuffereau C, Hantraye P., Deglon N., Mallet J. and . Sarkis C (soumis) Pseudotyping of HIV-1 based vectors with the Mokola virus envelope : immune reaction and species dependent tropism.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.
- Brun S, Faucon-Biguët N, Mallet J (2003) Optimization of transgene expression at the posttranscriptional level in neural cells: implications for gene therapy. *Mol Ther* 7:782-789.
- Büchen-Osmond D (2006) Retroviridae In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4 Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA
- Bukovsky AA, Song JP, Naldini L (1999) Interaction of human immunodeficiency virus-derived vectors with wild-type virus in transduced cells. *J Virol* 73:7087-7092.
- Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, Lewis P, Goldfarb D, Emerman M, Stevenson M (1993) A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365:666-669.
- Burcin MM, Schiedner G, Kochanek S, Tsai SY, O'Malley BW (1999) Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:355-360.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and

- efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8033-8037.
- Bushman FD, Miller MD (1997) Tethering human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes to target DNA promotes integration at nearby sites. *J Virol* 71:458-464.
- Byrnes AP, Rusby JE, Wood MJ, Charlton HM (1995) Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain. *Neuroscience* 66:1015-1024.
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9742-9747.
- Caplen NJ, Taylor JP, Statham VS, Tanaka F, Fire A, Morgan RA (2002) Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum Mol Genet* 11:175-184.
- Carmell MA, Hannon GJ (2004) RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11:214-218.
- Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16:2733-2742.
- Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM (2002) Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 16:2491-2496.
- Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AM, Tops BB, Silva JM, Myers MM, Hannon GJ, Plasterk RH (2003) A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 425:411-414.
- Cavaille J (2004) [MicroRNA are everywhere]. *Med Sci (Paris)* 20:399-401.
- Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A (2005) Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu Rev Med* 56:585-602.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
- Cerutti L, Mian N, Bateman A (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* 25:481-482.
- Chalberg TW, Genise HL, Vollrath D, Calos MP (2005) phiC31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2140-2146.
- Chalberg TW, Portlock JL, Olivares EC, Thyagarajan B, Kirby PJ, Hillman RT, Hoelters J, Calos MP (2006) Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. *J Mol Biol* 357:28-48.
- Chamberlin NL, Du B, de Lacalle S, Saper CB (1998) Recombinant adeno-associated virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Res* 793:169-175.
- Chen H, Engelman A (1998) The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15270-15274.
- Chen MY, Maldarelli F, Karczewski MK, Willey RL, Strebel K (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *J Virol* 67:3877-3884.
- Chen R, Le Rouzic E, Kearney JA, Mansky LM, Benichou S (2004) Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J Biol Chem* 279:28419-28425.

- Chiocca EA, Choi BB, Cai WZ, DeLuca NA, Schaffer PA, DiFiglia M, Breakefield XO, Martuza RL (1990) Transfer and expression of the lacZ gene in rat brain neurons mediated by herpes simplex virus mutants. *New Biol* 2:739-746.
- Chirmule N, Propert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J (1999) Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 6:1574-1583.
- Chirmule N, Xiao W, Truneh A, Schnell MA, Hughes JV, Zoltick P, Wilson JM (2000) Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J Virol* 74:2420-2425.
- Chong H, Ruchatz A, Clackson T, Rivera VM, Vile RG (2002) A system for small-molecule control of conditionally replication-competent adenoviral vectors. *Mol Ther* 5:195-203.
- Choo Y, Sanchez-Garcia I, Klug A (1994) In vivo repression by a site-specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence. *Nature* 372:642-645.
- Choo Y, Castellanos A, Garcia-Hernandez B, Sanchez-Garcia I, Klug A (1997) Promoter-specific activation of gene expression directed by bacteriophage-selected zinc fingers. *J Mol Biol* 273:525-532.
- Chtarto A, Bender HU, Hanemann CO, Kemp T, Lehtonen E, Levivier M, Brotchi J, Velu T, Tenenbaum L (2003) Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. *Gene Ther* 10:84-94.
- Coffin JM (1996) *Retroviridae: The Viruses and their Replication*, Third Edition Edition.
- Coil DA, Miller AD (2004) Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J Virol* 78:10920-10926.
- Connor B, Kozlowski DA, Schallert T, Tillerson JL, Davidson BL, Bohn MC (1999) Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the striatum and substantia nigra of the aged Parkinsonian rat. *Gene Ther* 6:1936-1951.
- Connor B, Kozlowski DA, Unnerstall JR, Elsworth JD, Tillerson JL, Schallert T, Bohn MC (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene delivery protects dopaminergic terminals from degeneration. *Exp Neurol* 169:83-95.
- Consiglio A, Gritti A, Dolcetta D, Follenzi A, Bordignon C, Gage FH, Vescovi AL, Naldini L (2004) Robust in vivo gene transfer into adult mammalian neural stem cells by lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14835-14840.
- Cooley LA, Lewin SR (2003) HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *J Clin Virol* 26:121-132.
- Corti O, Sanchez-Capelo A, Colin P, Hanoun N, Hamon M, Mallet J (1999a) Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12120-12125.
- Corti O, Sabate O, Horellou P, Colin P, Dumas S, Buchet D, Buc-Caron MH, Mallet J (1999b) A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nat Biotechnol* 17:349-354.
- Couzin J (2002) Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 298:2296-2297.
- Czuderna F, Santel A, Hinz M, Fechtner M, Durieux B, Fisch G, Leenders F, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J (2003) Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res* 31:e127.
- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-767.

- Danzeiser DA, Urso O, Kunkel GR (1993) Functional characterization of elements in a human U6 small nuclear RNA gene distal control region. *Mol Cell Biol* 13:4670-4678.
- Das AT, Zhou X, Vink M, Klaver B, Verhoef K, Marzio G, Berkhout B (2004) Viral evolution as a tool to improve the tetracycline-regulated gene expression system. *J Biol Chem* 279:18776-18782.
- Das G, Hinkley CS, Herr W (1995) Basal promoter elements as a selective determinant of transcriptional activator function. *Nature* 374:657-660.
- Das G, Henning D, Wright D, Reddy R (1988) Upstream regulatory elements are necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III. *Embo J* 7:503-512.
- Davidson BL, Paulson HL (2004) Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol* 3:145-149.
- Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA (1993) Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* 4:151-159.
- de Almeida LP, Zala D, Aebischer P, Deglon N (2001) Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 8:433-446.
- De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ, Khoo SH, Hierholzer JC (1999) Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 37:3940-3945.
- Deglon N, Tseng JL, Bensadoun JC, Zurn AD, Arsenijevic Y, Pereira de Almeida L, Zufferey R, Trono D, Aebischer P (2000) Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 11:179-190.
- Deleuze V, Scherman D, Bureau MF (2002) Interleukin-10 expression after intramuscular DNA electrotransfer: kinetic studies. *Biochem Biophys Res Commun* 299:29-34.
- Denli AM, Hannon GJ (2003) RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci* 28:196-201.
- Dettenhofer M, Cen S, Carlson BA, Kleiman L, Yu XF (2000) Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol* 74:8938-8945.
- Dickins RA, Hemann MT, Zilfou JT, Simpson DR, Ibarra I, Hannon GJ, Lowe SW (2005) Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat Genet* 37:1289-1295.
- Didierjean J (2005) Etude d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de la rétrotranscriptase et de l'intégrase du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg I.
- Dittgen T, Nimmerjahn A, Komai S, Licznanski P, Waters J, Margrie TW, Helmchen F, Denk W, Brecht M, Osten P (2004) Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18206-18211.
- Do Thi NA, Saillour P, Ferrero L, Paunio T, Mallet J (2006) Does neuronal expression of GDNF effectively protect dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease? *Gene Ther*.
- Do Thi NA, Saillour P, Ferrero L, Dedieu JF, Mallet J, Paunio T (2004) Delivery of GDNF by an E1,E3/E4 deleted adenoviral vector and driven by a GFAP promoter prevents

- dopaminergic neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 11:746-756.
- Doench JG, Petersen CP, Sharp PA (2003) siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17:438-442.
- Du B, Wu P, Boldt-Houle DM, Terwilliger EF (1996) Efficient transduction of human neurons with an adeno-associated virus vector. *Gene Ther* 3:254-261.
- Du G, Yonekubo J, Zeng Y, Osisami M, Frohman MA (2006) Design of expression vectors for RNA interference based on miRNAs and RNA splicing. *Febs J* 273:5421-5427.
- Duan D, Yan Z, Yue Y, Engelhardt JF (1999) Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates. *Virology* 261:8-14.
- Dudley NR, Labbe JC, Goldstein B (2002) Using RNA interference to identify genes required for RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4191-4196.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72:8463-8471.
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:457-467.
- Dykxhoorn DM, Schlehner LD, London IM, Lieberman J (2006) Determinants of specific RNA interference-mediated silencing of human beta-globin alleles differing by a single nucleotide polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5953-5958.
- Ebner K, Rauch M, Preuner S, Lion T (2006) Typing of Human Adenoviruses in Specimens from Immunosuppressed Patients by PCR-Fragment Length Analysis and Real-Time Quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 44:2808-2815.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001a) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001b) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
- Emi N, Friedmann T, Yee JK (1991) Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 65:1202-1207.
- Farnet CM, Bushman FD (1997) HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 88:483-492.
- Farson D, Witt R, McGuinness R, Dull T, Kelly M, Song J, Radeke R, Bukovsky A, Consiglio A, Naldini L (2001) A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12:981-997.
- Favre D, Blouin V, Provost N, Spisek R, Porrot F, Bohl D, Marme F, Cherel Y, Salvetti A, Hurtrel B, Heard JM, Riviere Y, Moullier P (2002) Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol* 76:11605-11611.
- Feederle R, Delecluse HJ, Rouault JP, Schepers A, Hammerschmidt W (2004) Efficient somatic gene targeting in the lymphoid human cell line DG75. *Gene* 343:91-97.
- Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15:331-341.
- Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG (1991) Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113:503-514.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.

- Fitzsimons HL, McKenzie JM, During MJ (2001) Insulators coupled to a minimal bidirectional tet cassette for tight regulation of rAAV-mediated gene transfer in the mammalian brain. *Gene Ther* 8:1675-1681.
- Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L (2000) Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25:217-222.
- Fowlkes DM, Shenk T (1980) Transcriptional control regions of the adenovirus VAI RNA gene. *Cell* 22:405-413.
- Fraefel C, Song S, Lim F, Lang P, Yu L, Wang Y, Wild P, Geller AI (1996) Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J Virol* 70:7190-7197.
- Frampton AR, Jr., Goins WF, Nakano K, Burton EA, Glorioso JC (2005) HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system. *Gene Ther* 12:891-901.
- Frenkel N, Singer O, Kwong AD (1994) Minireview: the herpes simplex virus amplicon--a versatile defective virus vector. *Gene Ther* 1 Suppl 1:S40-46.
- Freundlieb S, Schirra-Muller C, Bujard H (1999) A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med* 1:4-12.
- Friedmann T, Roblin R (1972) Gene therapy for human genetic disease? *Science* 175:949-955.
- Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L (1994) Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9302-9306.
- Galanis E, Vile R, Russell SJ (2001) Delivery systems intended for in vivo gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors. *Crit Rev Oncol Hematol* 38:177-192.
- Galimi F, Saez E, Gall J, Hoong N, Cho G, Evans RM, Verma IM (2005) Development of ecdysone-regulated lentiviral vectors. *Mol Ther* 11:142-148.
- Galli G, Hofstetter H, Birnstiel ML (1981) Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* 294:626-631.
- Gan L, Ye S, Chu A, Anton K, Yi S, Vincent VA, von Schack D, Chin D, Murray J, Lohr S, Patthy L, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, Urfer R (2004) Identification of cathepsin B as a mediator of neuronal death induced by Abeta-activated microglial cells using a functional genomics approach. *J Biol Chem* 279:5565-5572.
- Gao G, Alvira MR, Somanathan S, Lu Y, Vandenberghe LH, Rux JJ, Calcedo R, Sanmiguel J, Abbas Z, Wilson JM (2003) Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6081-6086.
- Gartel AL, Kandel ES (2006) RNA interference in cancer. *Biomol Eng* 23:17-34.
- Gasmi M, Glynn J, Jin MJ, Jolly DJ, Yee JK, Chen ST (1999) Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. *J Virol* 73:1828-1834.
- Gehl J (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 177:437-447.
- Georgievska B, Kirik D, Bjorklund A (2002) Aberrant sprouting and downregulation of tyrosine hydroxylase in lesioned nigrostriatal dopamine neurons induced by long-lasting overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in the striatum by lentiviral gene transfer. *Exp Neurol* 177:461-474.

- Georgievska B, Jakobsson J, Persson E, Ericson C, Kirik D, Lundberg C (2004) Regulated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor into rat striatum, using a tetracycline-dependent lentiviral vector. *Hum Gene Ther* 15:934-944.
- Geraerts M, Eggermont K, Hernandez-Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Baekelandt V, Debyser Z (2006) Lentiviral Vectors Mediate Efficient and Stable Gene Transfer in Adult Neural Stem Cells In Vivo. *Hum Gene Ther*.
- Ghadge GD, Roos RP, Kang UJ, Wollmann R, Fishman PS, Kalynych AM, Barr E, Leiden JM (1995) CNS gene delivery by retrograde transport of recombinant replication-defective adenoviruses. *Gene Ther* 2:132-137.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 9:589-595.
- Ginsburg DS, Calos MP (2005) Site-specific integration with phiC31 integrase for prolonged expression of therapeutic genes. *Adv Genet* 54:179-187.
- Go WY, Ho SN (2002) Optimization and direct comparison of the dimerizer and reverse tet transcriptional control systems. *J Gene Med* 4:258-270.
- Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM, Michael SF, Fultz PN, Nowak MA, Hahn BH, Emerman M (1998) HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med* 4:65-71.
- Goldschmidt V (2004) La retrotranscription de HIV-1: étude du complexe d'initiation et des mécanismes de résistance aux inhibiteurs nucléosidiques. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg I.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
- Gottlinger HG, Dorfman T, Cohen EA, Haseltine WA (1993) Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7381-7385.
- Grimm D, Kay MA (2003) From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 3:281-304.
- Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441:537-541.
- Grishok A, Sinskey JL, Sharp PA (2005) Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans*. *Genes Dev* 19:683-696.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34.
- Groth AC, Olivares EC, Thyagarajan B, Calos MP (2000) A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5995-6000.
- Guo S, Kempthues KJ (1995) par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81:611-620.
- Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V (2004) Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1927-1932.

- Haase G, Pettmann B, Bordet T, Villa P, Vigne E, Schmalbruch H, Kahn A (1999) Therapeutic benefit of ciliary neurotrophic factor in progressive motor neuronopathy depends on the route of delivery. *Ann Neurol* 45:296-304.
- Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Akli S, Revah F, Schmalbruch H, Kahn A (1997) Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat Med* 3:429-436.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A (2003a) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348:255-256.
- Hacein-Bey-Abina S, Schmidt M, Le Deist F, Garrigue A, Wulffraat N, Alexander I, G. S-B, JL C, von Kalle C, Fischer A, M. C-c (2006) Gene therapy for severe combined immunodeficiency X1. XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy:17.
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M (2002) Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346:1185-1193.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2003b) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419.
- Hadaczek P, Yamashita Y, Mirek H, Tamas L, Bohn MC, Noble C, Park JW, Bankiewicz K (2006) The "perivascular pump" driven by arterial pulsation is a powerful mechanism for the distribution of therapeutic molecules within the brain. *Mol Ther* 14:69-78.
- Haffar OK, Popov S, Dubrovsky L, Agostini I, Tang H, Pushkarsky T, Nadler SG, Bukrinsky M (2000) Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol* 299:359-368.
- Hall IM, Noma K, Grewal SI (2003) RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:193-198.
- Hammond SM (2005) Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 579:5822-5829.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-296.
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293:1146-1150.
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418:244-251.
- Harding TC, Geddes BJ, Murphy D, Knight D, Uney JB (1998) Switching transgene expression in the brain using an adenoviral tetracycline-regulatable system. *Nat Biotechnol* 16:553-555.
- Hardy J, Orr H (2006) The genetics of neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 97:1690-1699.
- Harper SQ, Staber PD, He X, Eliason SL, Martins IH, Mao Q, Yang L, Kotin RM, Paulson HL, Davidson BL (2005) RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5820-5825.

- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529.
- Henry RW, Ma B, Sadowski CL, Kobayashi R, Hernandez N (1996) Cloning and characterization of SNAP50, a subunit of the snRNA-activating protein complex SNAPc. *Embo J* 15:7129-7136.
- Hermonat PL, Muzyczka N (1984) Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6466-6470.
- Hernandez N, Lucito R (1988) Elements required for transcription initiation of the human U2 snRNA gene coincide with elements required for snRNA 3' end formation. *Embo J* 7:3125-3134.
- Higuchi H, Yamashita T, Yoshikawa H, Tohyama M (2003) Functional inhibition of the p75 receptor using a small interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 301:804-809.
- Hill M, Hillova J (1972) Virus recovery in chicken cells tested with Rous sarcoma cell DNA. *Nat New Biol* 237:35-39.
- Hirko A, Tang F, Hughes JA (2003) Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery. *Curr Med Chem* 10:1185-1193.
- Hlavaty J, Schittmayer M, Stracke A, Jandl G, Knapp E, Felber BK, Salmons B, Gunzburg WH, Renner M (2005) Effect of posttranscriptional regulatory elements on transgene expression and virus production in the context of retrovirus vectors. *Virology* 341:1-11.
- Hofstetter H, Kressman A, Birnstiel ML (1981) A split promoter for a eucaryotic tRNA gene. *Cell* 24:573-585.
- Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55:1467-1474.
- Hoglund S, Ohagen A, Lawrence K, Gabuzda D (1994) Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 201:349-355.
- Hoppe UC, Marban E, Johns DC (2000) Adenovirus-mediated inducible gene expression in vivo by a hybrid ecdysone receptor. *Mol Ther* 1:159-164.
- Horellou P, Vigne E, Castel MN, Barneoud P, Colin P, Perricaudet M, Delaere P, Mallet J (1994) Direct intracerebral gene transfer of an adenoviral vector expressing tyrosine hydroxylase in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 6:49-53.
- Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S, Hartmann G (2005) Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11:263-270.
- Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Xu ZL, Sakurai F, Ishii-Watabe A, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Mayumi T, Hayakawa T (2004) Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum Gene Ther* 15:813-819.
- Houk BE, Martin R, Hochhaus G, Hughes JA (2001) Pharmacokinetics of plasmid DNA in the rat. *Pharm Res* 18:67-74.
- Howe S, Thrasher AJ (2003) Gene therapy for inherited immunodeficiencies. *Curr Hematol Rep* 2:328-334.
- Hutvagner G, Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056-2060.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293:834-838.

- Huvent I, Hong SS, Fournier C, Gay B, Tournier J, Carriere C, Courcoul M, Vigne R, Spire B, Boulanger P (1998) Interaction and co-encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Vif recombinant proteins. *J Gen Virol* 79 ( Pt 5):1069-1081.
- Imaoka T, Date I, Ohmoto T, Yasuda T, Tsuda M (1998) In vivo gene transfer into the adult mammalian central nervous system by continuous injection of plasmid DNA-cationic liposome complex. *Brain Res* 780:119-128.
- Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H (2002) A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* 16:2497-2508.
- Iwakuma T, Cui Y, Chang LJ (1999) Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 261:120-132.
- Jackson DA, Symons RH, Berg P (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2904-2909.
- Jakobsson J, Lundberg C (2006) Lentiviral vectors for use in the central nervous system. *Mol Ther* 13:484-493.
- Jakobsson J, Georgievska B, Ericson C, Lundberg C (2004) Lesion-dependent regulation of transgene expression in the rat brain using a human glial fibrillary acidic protein-lentiviral vector. *Eur J Neurosci* 19:761-765.
- Jakobsson J, Ericson C, Jansson M, Bjork E, Lundberg C (2003) Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors. *J Neurosci Res* 73:876-885.
- Jakobsson J, Rosenqvist N, Marild K, D VA, Lundberg C (2006) Evidence for disease-regulated transgene expression in the brain with use of lentiviral vectors. *J Neurosci Res* 84:58-67.
- Janowski BA, Huffman KE, Schwartz JC, Ram R, Nordsell R, Shames DS, Minna JD, Corey DR (2006) Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat Struct Mol Biol* 13:787-792.
- Jenkins Y, McEntee M, Weis K, Greene WC (1998) Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol* 143:875-885.
- Jeske NA, Patwardhan AM, Gamper N, Price TJ, Akopian AN, Hargreaves KM (2006) Cannabinoid WIN 55,212-2 regulates TRPV1 phosphorylation in sensory neurons. *J Biol Chem*.
- Jiao S, Cheng L, Wolff JA, Yang NS (1993) Particle bombardment-mediated gene transfer and expression in rat brain tissues. *Biotechnology (N Y)* 11:497-502.
- Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23:457-462.
- Jung A, Maier R, Vartanian JP, Bocharov G, Jung V, Fischer U, Meese E, Wain-Hobson S, Meyerhans A (2002) Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* 418:144.
- Kafri T, van Praag H, Gage FH, Verma IM (2000) Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther* 1:516-521.
- Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM (1997) Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 17:314-317.
- Kafri T, van Praag H, Ouyang L, Gage FH, Verma IM (1999) A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol* 73:576-584.
- Kaiser J (2005) Gene therapy. Panel urges limits on X-SCID trials. *Science* 307:1544-1545.
- Kajiwara K, Byrnes AP, Charlton HM, Wood MJ, Wood KJ (1997) Immune responses to adenoviral vectors during gene transfer in the brain. *Hum Gene Ther* 8:253-265.
- Kajiwara K, Byrnes AP, Ohmoto Y, Charlton HM, Wood MJ, Wood KJ (2000) Humoral immune responses to adenovirus vectors in the brain. *J Neuroimmunol* 103:8-15.

- Kang Y, Stein CS, Heth JA, Sinn PL, Penisten AK, Staber PD, Ratliff KL, Shen H, Barker CK, Martins I, Sharkey CM, Sanders DA, McCray PB, Jr., Davidson BL (2002) In vivo gene transfer using a nonprimate lentiviral vector pseudotyped with Ross River Virus glycoproteins. *J Virol* 76:9378-9388.
- Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ (1994) Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* 8:148-154.
- Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D (2004) Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* 172:6545-6549.
- Karns LR, Kisielewski A, Gulding KM, Seraj JM, Theodorescu D (2001) Manipulation of gene expression by an ecdysone-inducible gene switch in tumor xenografts. *BMC Biotechnol* 1:11.
- Karzenowski D, Potter DW, Padidam M (2005) Inducible control of transgene expression with ecdysone receptor: gene switches with high sensitivity, robust expression, and reduced size. *Biotechniques* 39:191-192, 194, 196 passim.
- Kearns WG, Afione SA, Fulmer SB, Pang MC, Erikson D, Egan M, Landrum MJ, Flotte TR, Cutting GR (1996) Recombinant adeno-associated virus (AAV-CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Ther* 3:748-755.
- Kells AP, Fong DM, Dragunow M, During MJ, Young D, Connor B (2004) AAV-mediated gene delivery of BDNF or GDNF is neuroprotective in a model of Huntington disease. *Mol Ther* 9:682-688.
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15:2654-2659.
- Ketzinel-Gilad M, Shaul Y, Galun E (2006) RNA interference for antiviral therapy. *J Gene Med* 8:933-950.
- Khan MA, Aberham C, Kao S, Akari H, Gorelick R, Bour S, Strebel K (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol* 75:7252-7265.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209-216.
- Kim DH, Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ (2006) Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol*.
- Kim DH, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi JJ (2004) Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 22:321-325.
- Kim JS, Pabo CO (1997) Transcriptional repression by zinc finger peptides. Exploring the potential for applications in gene therapy. *J Biol Chem* 272:29795-29800.
- Kim VN, Mitrophanous K, Kingsman SM, Kingsman AJ (1998) Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:811-816.
- Kingsman SM, Mitrophanous K, Olsen JC (2005) Potential oncogene activity of the woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element (WPRE). *Gene Ther* 12:3-4.
- Kirik D, Georgievska B, Bjorklund A (2004) Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:105-110.
- Kirschstein R, Skirboll L (2001) Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions. NIH Reports

- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H, Bujard H (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10933-10938.
- Klages N, Zufferey R, Trono D (2000) A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther* 2:170-176.
- Klein R, Ruttkowski B, Knapp E, Salmons B, Gunzburg WH, Hohenadl C (2006) WPRE-mediated enhancement of gene expression is promoter and cell line specific. *Gene* 372:153-161.
- Klein SM, Behrstock S, McHugh J, Hoffmann K, Wallace K, Suzuki M, Aebischer P, Svendsen CN (2005) GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gene Ther* 16:509-521.
- Klonjowski B, Gilardi-Hebenstreit P, Hadchouel J, Randrianarison V, Boutin S, Yeh P, Perricaudet M, Kremer EJ (1997) A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. *Hum Gene Ther* 8:2103-2115.
- Kobinger GP, Deng S, Louboutin JP, Vatamaniuk M, Rivera VM, Lian MM, Markmann JF, Clackson T, Raper SE, Matschinsky F, Wilson JM (2005) Pharmacologically regulated regeneration of functional human pancreatic islets. *Mol Ther* 11:105-111.
- Kofler P, Wiesenhofer B, Rehrl C, Baier G, Stockhammer G, Humpel C (1998) Liposome-mediated gene transfer into established CNS cell lines, primary glial cells, and in vivo. *Cell Transplant* 7:175-185.
- Kogure K, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Sato Y, Monahan J, Ozawa K (2001) Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int J Hematol* 73:469-475.
- Koponen JK, Kankkonen H, Kannasto J, Wirth T, Hillen W, Bujard H, Yla-Herttuala S (2003) Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther* 10:459-466.
- Kordower JH, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Palfi S, Roitberg BZ, Emborg M, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P (1999) Lentiviral gene transfer to the nonhuman primate brain. *Exp Neurol* 160:1-16.
- Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290:767-773.
- Kotin RM, Linden RM, Berns KI (1992) 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.
- Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI (1990) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2211-2215.
- Kreiss P, Bettan M, Crouzet J, Scherman D (1999) Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer. *J Gene Med* 1:245-250.
- Krichevsky AM, Kosik KS (2002) RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11926-11929.
- Kumar MB, Fujimoto T, Potter DW, Deng Q, Palli SR (2002) A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity: implications for gene switch applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14710-14715.

- Kunkel GR, Pederson T (1988) Upstream elements required for efficient transcription of a human U6 RNA gene resemble those of U1 and U2 genes even though a different polymerase is used. *Genes Dev* 2:196-204.
- Kunkel GR, Pederson T (1989) Transcription of a human U6 small nuclear RNA gene in vivo withstands deletion of intragenic sequences but not of an upstream TATATA box. *Nucleic Acids Res* 17:7371-7379.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-858.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12:735-739.
- Lai CM, Lai YK, Rakoczy PE (2002) Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol* 21:895-913.
- Lai EC (2002) Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30:363-364.
- Lamartina S, Roscilli G, Rinaudo CD, Sporeno E, Silvi L, Hillen W, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G, Toniatti C (2002) Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum Gene Ther* 13:199-210.
- Lamartina S, Silvi L, Roscilli G, Casimiro D, Simon AJ, Davies ME, Shiver JW, Rinaudo CD, Zampaglione I, Fattori E, Colloca S, Gonzalez Paz O, Laufer R, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G, Toniatti C (2003) Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates. *Mol Ther* 7:271-280.
- Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M (2006) Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 59:459-466.
- Latta-Mahieu M, Rolland M, Caillet C, Wang M, Kennel P, Mahfouz I, Loquet I, Dedieu JF, Mahfoudi A, Trannoy E, Thuillier V (2002) Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression. *Hum Gene Ther* 13:1611-1620.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862.
- Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J (1993) An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259:988-990.
- Lebherz C, Auricchio A, Maguire AM, Rivera VM, Tang W, Grant RL, Clackson T, Bennett J, Wilson JM (2005) Long-term inducible gene expression in the eye via adeno-associated virus gene transfer in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 16:178-186.
- Lecellier CH, Voinnet O (2004) RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol Rev* 198:285-303.
- Lee K, Jeon K, Kim JM, Kim VN, Choi DH, Kim SU, Kim S (2005) Downregulation of GFAP, TSP-1, and p53 in human glioblastoma cell line, U373MG, by IE1 protein from human cytomegalovirus. *Glia* 51:1-12.
- Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, Rossi J (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 20:500-505.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.

- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23:4051-4060.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419.
- Lena AM, Giannetti P, Sporeno E, Ciliberto G, Savino R (2005) Immune responses against tetracycline-dependent transactivators affect long-term expression of mouse erythropoietin delivered by a helper-dependent adenoviral vector. *J Gene Med* 7:1086-1096.
- Lescure A, Carbon P, Krol A (1991) The different positioning of the proximal sequence element in the *Xenopus* RNA polymerase II and III snRNA promoters is a key determinant which confers RNA polymerase III specificity. *Nucleic Acids Res* 19:435-441.
- Leucht C, Simoneau S, Rey C, Vana K, Rieger R, Lasmezas CI, Weiss S (2003) The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep* 4:290-295.
- Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K, Muramatsu S (2006) Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther* 13:160-166.
- Li Y, Wang J, Lee CG, Wang CY, Gao SJ, Tang GP, Ma YX, Yu H, Mao HQ, Leong KW, Wang S (2004) CNS gene transfer mediated by a novel controlled release system based on DNA complexes of degradable polycation PPE-EA: a comparison with polyethylenimine/DNA complexes. *Gene Ther* 11:109-114.
- Lilley CE, Groutsi F, Han Z, Palmer JA, Anderson PN, Latchman DS, Coffin RS (2001) Multiple immediate-early gene-deficient herpes simplex virus vectors allowing efficient gene delivery to neurons in culture and widespread gene delivery to the central nervous system in vivo. *J Virol* 75:4343-4356.
- Lin CW, Engelman A (2003) The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol* 77:5030-5036.
- Lin X, Yang J, Chen J, Gunasekera A, Fesik SW, Shen Y (2004) Development of a tightly regulated U6 promoter for shRNA expression. *FEBS Lett* 577:376-380.
- Linden RM, Ward P, Giraud C, Winocour E, Berns KI (1996) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11288-11294.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305:1437-1441.
- Lobo SM, Hernandez N (1989) A 7 bp mutation converts a human RNA polymerase II snRNA promoter into an RNA polymerase III promoter. *Cell* 58:55-67.
- Logvinoff C, Epstein AL (2001) A novel approach for herpes simplex virus type 1 amplicon vector production, using the Cre-loxP recombination system to remove helper virus. *Hum Gene Ther* 12:161-167.
- Love S, Plaha P, Patel NK, Hotton GR, Brooks DJ, Gill SS (2005) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. *Nat Med* 11:703-704.
- Lu YY, Wang LJ, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I (2003) Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res* 45:33-40.

- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303:95-98.
- Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Gopferich A (2005) Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 60:247-266.
- Lutzko C, Senadheera D, Skelton D, Petersen D, Kohn DB (2003) Lentivirus vectors incorporating the immunoglobulin heavy chain enhancer and matrix attachment regions provide position-independent expression in B lymphocytes. *J Virol* 77:7341-7351.
- Ma Y, Feigin A, Dhawan V, Fukuda M, Shi Q, Greene P, Breeze R, Fahn S, Freed C, Eidelberg D (2002) Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: a PET study. *Ann Neurol* 52:628-634.
- Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R (1986) The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47:333-348.
- Magari SR, Rivera VM, Iuliucci JD, Gilman M, Cerasoli F, Jr. (1997) Pharmacologic control of a humanized gene therapy system implanted into nude mice. *J Clin Invest* 100:2865-2872.
- Mahato RI (1999) Non-viral peptide-based approaches to gene delivery. *J Drug Target* 7:249-268.
- Mallet J, Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M (1994) Adenovirus mediated gene transfer to the central nervous system. *Gene Ther* 1 Suppl 1:S52.
- Mallory AC, Vaucheret H (2006) Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet* 38 Suppl:S31-36.
- Mammette A (2002) *Virologie Médicale*: Presse Universitaire de Lyon.
- Manning WC, Zhou S, Bland MP, Escobedo JA, Dwarki V (1998) Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 9:477-485.
- Mansky LM, Preveral S, Selig L, Benarous R, Benichou S (2000) The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *J Virol* 74:7039-7047.
- Mansuy IM, Winder DG, Moallem TM, Osman M, Mayford M, Hawkins RD, Kandel ER (1998) Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron* 21:257-265.
- Markusic D, Oude-Elferink R, Das AT, Berkhout B, Seppen J (2005) Comparison of single regulated lentiviral vectors with rtTA expression driven by an autoregulatory loop or a constitutive promoter. *Nucleic Acids Res* 33:e63.
- Martinez J, Tuschl T (2004) RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 18:975-980.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T (2002a) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110:563-574.
- Martinez LA, Naguibneva I, Lehrmann H, Vervisch A, Tchenio T, Lozano G, Harel-Bellan A (2002b) Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14849-14854.
- Mastakov MY, Baer K, Symes CW, Leichtlein CB, Kotin RM, During MJ (2002) Immunological aspects of recombinant adeno-associated virus delivery to the mammalian brain. *J Virol* 76:8446-8454.
- Matsukura S, Jones PA, Takai D (2003) Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res* 31:e77.

- Mattaj IW, Dathan NA, Parry HD, Carbon P, Krol A (1988) Changing the RNA polymerase specificity of U snRNA gene promoters. *Cell* 55:435-442.
- Matthess Y, Kappel S, Spankuch B, Zimmer B, Kaufmann M, Strebhardt K (2005) Conditional inhibition of cancer cell proliferation by tetracycline-responsive, H1 promoter-driven silencing of PLK1. *Oncogene* 24:2973-2980.
- Mazarakis ND, Azzouz M, Rohll JB, Ellard FM, Wilkes FJ, Olsen AL, Carter EE, Barber RD, Baban DF, Kingsman SM, Kingsman AJ, O'Malley K, Mitrophanous KA (2001) Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum Mol Genet* 10:2109-2121.
- McBride JL, During MJ, Wu J, Chen EY, Leurgans SE, Kordower JH (2003) Structural and functional neuroprotection in a rat model of Huntington's disease by viral gene transfer of GDNF. *Exp Neurol* 181:213-223.
- McIver SR, Lee CS, Lee JM, Green SH, Sands MS, Snider BJ, Goldberg MP (2005) Lentiviral transduction of murine oligodendrocytes in vivo. *J Neurosci Res* 82:397-403.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15:185-197.
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* 19:5194-5201.
- Miagkov AV, Varley AW, Munford RS, Makarov SS (2002) Endogenous regulation of a therapeutic transgene restores homeostasis in arthritic joints. *J Clin Invest* 109:1223-1229.
- Miletic H, Fischer YH, Neumann H, Hans V, Stenzel W, Giroglou T, Hermann M, Deckert M, Von Laer D (2004) Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins. *Hum Gene Ther* 15:1091-1100.
- Miller DG, Rutledge EA, Russell DW (2002) Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet* 30:147-148.
- Miller DG, Trobridge GD, Petek LM, Jacobs MA, Kaul R, Russell DW (2005a) Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. *J Virol* 79:11434-11442.
- Miller DG, Wang PR, Petek LM, Hirata RK, Sands MS, Russell DW (2006) Gene targeting in vivo by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol* 24:1022-1026.
- Miller MD, Farnet CM, Bushman FD (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71:5382-5390.
- Miller N, Whelan J (1997) Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Hum Gene Ther* 8:803-815.
- Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, Yamanaka K, Christian LJ, Gage FH, Cleveland DW (2005b) Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57:773-776.
- Miller VM, Paulson HL, Gonzalez-Alegre P (2005c) RNA interference in neuroscience: progress and challenges. *Cell Mol Neurobiol* 25:1195-1207.
- Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL (2003) Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7195-7200.

- Mitani K, Graham FL, Caskey CT, Kochanek S (1995) Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3854-3858.
- Mittal V, Ma B, Hernandez N (1999) SNAP(c): a core promoter factor with a built-in DNA-binding damper that is deactivated by the Oct-1 POU domain. *Genes Dev* 13:1807-1821.
- Mittal V, Cleary MA, Herr W, Hernandez N (1996) The Oct-1 POU-specific domain can stimulate small nuclear RNA gene transcription by stabilizing the basal transcription complex SNAPc. *Mol Cell Biol* 16:1955-1965.
- Miyagishi M, Taira K (2002) U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 20:497-500.
- Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72:8150-8157.
- Mizuguchi H, Xu ZL, Sakurai F, Mayumi T, Hayakawa T (2003) Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions. *Hum Gene Ther* 14:1265-1277.
- Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA (2002) Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell* 110:689-699.
- Moskalenko M, Chen L, van Roey M, Donahue BA, Snyder RO, McArthur JG, Patel SD (2000) Epitope mapping of human anti-adenovirus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* 74:1761-1766.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16:720-728.
- Mullen CA, Snitzer K, Culver KW, Morgan RA, Anderson WF, Blaese RM (1996) Molecular analysis of T lymphocyte-directed gene therapy for adenosine deaminase deficiency: long-term expression in vivo of genes introduced with a retroviral vector. *Hum Gene Ther* 7:1123-1129.
- Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume A, Matsumura M, Nagatsu I, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I, Ozawa K (2002) Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* 13:345-354.
- Murphy S, Tripodi M, Melli M (1986) A sequence upstream from the coding region is required for the transcription of the 7SK RNA genes. *Nucleic Acids Res* 14:9243-9260.
- Murphy S, Di Liegro C, Melli M (1987) The in vitro transcription of the 7SK RNA gene by RNA polymerase III is dependent only on the presence of an upstream promoter. *Cell* 51:81-87.
- Murphy S, Yoon JB, Gerster T, Roeder RG (1992) Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes. *Mol Cell Biol* 12:3247-3261.
- Murphy S, Pierani A, Scheidereit C, Melli M, Roeder RG (1989) Purified octamer binding transcription factors stimulate RNA polymerase III--mediated transcription of the 7SK RNA gene. *Cell* 59:1071-1080.
- Muul LM, Tuschong LM, Soenen SL, Jagadeesh GJ, Ramsey WJ, Long Z, Carter CS, Garabedian EK, Alleyne M, Brown M, Bernstein W, Schurman SH, Fleisher TA, Leitman SF, Dunbar CE, Blaese RM, Candotti F (2003) Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer

- components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* 101:2563-2569.
- Nakai H, Montini E, Fuess S, Storm TA, Grompe M, Kay MA (2003) AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34:297-302.
- Nakai H, Wu X, Fuess S, Storm TA, Munroe D, Montini E, Burgess SM, Grompe M, Kay MA (2005) Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol* 79:3606-3614.
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996a) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11382-11388.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996b) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
- Nguyen VT, Kiss T, Michels AA, Bensaude O (2001) 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414:322-325.
- Nicchia GP, Frigeri A, Liuzzi GM, Svelto M (2003) Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology, growth, and water transport and induces changes in ischemia-related genes. *Faseb J* 17:1508-1510.
- Nightingale SJ, Hollis RP, Pepper KA, Petersen D, Yu XJ, Yang C, Bahner I, Kohn DB (2006) Transient gene expression by nonintegrating lentiviral vectors. *Mol Ther* 13:1121-1132.
- No D, Yao TP, Evans RM (1996) Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3346-3351.
- Noma K, Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Zofall M, Jia S, Moazed D, Grewal SI (2004) RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet* 36:1174-1180.
- Nordstrom JL (2002) Antiprogesterin-controllable transgene regulation in vivo. *Curr Opin Biotechnol* 13:453-458.
- Norgren RB, Jr., Lehman MN (1998) Herpes simplex virus as a transneuronal tracer. *Neurosci Biobehav Rev* 22:695-708.
- Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER, Jr., Lozano AM, Penn RD, Simpson RK, Jr., Stacy M, Wooten GF (2003) Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 60:69-73.
- Nykanen A, Haley B, Zamore PD (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107:309-321.
- Oehme I, Bossler S, Zornig M (2006) Agonists of an ecdysone-inducible mammalian expression system inhibit Fas Ligand- and TRAIL-induced apoptosis in the human colon carcinoma cell line RKO. *Cell Death Differ* 13:189-201.
- Ohagen A, Gabuzda D (2000) Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* 74:11055-11066.
- Ohbayashi F, Balamotis MA, Kishimoto A, Aizawa E, Diaz A, Hasty P, Graham FL, Caskey CT, Mitani K (2005) Correction of chromosomal mutation and random integration in embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13628-13633.
- Olanow CW, Arendash GW (1994) Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr Opin Neurol* 7:548-558.

- Pacchia AL, Adelson ME, Kaul M, Ron Y, Dougherty JP (2001) An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins. *Virology* 282:77-86.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16:948-958.
- Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA (1997) Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. *Cell* 90:479-490.
- Palli SR, Kapitskaya MZ, Kumar MB, Cress DE (2003) Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur J Biochem* 270:1308-1315.
- Palmer JA, Branston RH, Lilley CE, Robinson MJ, Groutsi F, Smith J, Latchman DS, Coffin RS (2000) Development and optimization of herpes simplex virus vectors for multiple long-term gene delivery to the peripheral nervous system. *J Virol* 74:5604-5618.
- Pardridge WM (2002) Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 1:131-139.
- Park F, Kay MA (2001) Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression in vitro and in vivo. *Mol Ther* 4:164-173.
- Park F, Ohashi K, Kay MA (2000) Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood* 96:1173-1176.
- Park TG, Jeong JH, Kim SW (2006) Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 58:467-486.
- Parry HD, Mattaj IW (1990) Positive and negative functional interactions between promoter elements from different classes of RNA polymerase III-transcribed genes. *Embo J* 9:1097-1104.
- Patel NK, Bunnage M, Plaha P, Svendsen CN, Heywood P, Gill SS (2005) Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann Neurol* 57:298-302.
- Paule MR, White RJ (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 28:1283-1298.
- Peden CS, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ (2004) Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J Virol* 78:6344-6359.
- Pereira DJ, McCarty DM, Muzyczka N (1997) The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol* 71:1079-1088.
- Perez N, Bigey P, Scherman D, Danos O, Piechaczyk M, Pelegrin M (2004) Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by in vivo muscle electroporation. *Genet Vaccines Ther* 2:2.
- Philippe S, Sarkis C, Barkats M, Mammeri H, Ladroue C, Petit C, Mallet J, Serguera C (2006) Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17684-17689.
- Piller SC, Caly L, Jans DA (2003) Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Curr Drug Targets* 4:409-429.
- Pollock R, Clackson T (2002) Dimerizer-regulated gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 13:459-467.
- Pollock R, Issner R, Zoller K, Natesan S, Rivera VM, Clackson T (2000) Delivery of a stringent dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13221-13226.

- Pomerantz JL, Sharp PA, Pabo CO (1995) Structure-based design of transcription factors. *Science* 267:93-96.
- Provost P, Silverstein RA, Dishart D, Walfridsson J, Djupedal I, Kniola B, Wright A, Samuelsson B, Radmark O, Ekwall K (2002) Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16648-16653.
- Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D (2003) Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:183-188.
- Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, Wong LF, Bilsland LG, Greensmith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M (2005) Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11:429-433.
- Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, Guillot S, Haase G, Szulc J, Henderson CE, Aebischer P (2005) Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11:423-428.
- Rauh G, Pieczek A, Irwin W, Schainfeld R, Isner JM (2001) In vivo analysis of intramuscular gene transfer in human subjects studied by on-line ultrasound imaging. *Hum Gene Ther* 12:1543-1549.
- Recchia A, Parks RJ, Lamartina S, Toniatti C, Pieroni L, Palombo F, Ciliberto G, Graham FL, Cortese R, La Monica N, Colloca S (1999) Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adenovirus-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2615-2620.
- Rego AC, Oliveira CR (2003) Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 28:1563-1574.
- Regulier E, Pereira de Almeida L, Sommer B, Aebischer P, Deglon N (2002) Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 13:1981-1990.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16:1616-1626.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901-906.
- Ridet JL, Bensadoun JC, Deglon N, Aebischer P, Zurn AD (2006) Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21:29-34.
- Ridoux V, Robert JJ, Zhang X, Perricaudet M, Mallet J, Le Gal La Salle G (1994) The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells. *Neuroreport* 5:801-804.
- Rivera VM, Ye X, Courage NL, Sachar J, Cerasoli F, Jr., Wilson JM, Gilman M (1999) Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8657-8662.
- Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zoltick PW, Rozamus LW, Clackson T, Wilson JM (2005) Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105:1424-1430.
- Rivera VM, Clackson T, Natesan S, Pollock R, Amara JF, Keenan T, Magari SR, Phillips T, Courage NL, Cerasoli F, Jr., Holt DA, Gilman M (1996) A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* 2:1028-1032.

- Riviere C, Danos O, Douar AM (2006) Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther*.
- Rolls MM, Webster P, Balba NH, Rose JK (1994) Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* 79:497-506.
- Romano N, Macino G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6:3343-3353.
- Roscilli G, Rinaudo CD, Cimino M, Sporeno E, Lamartina S, Ciliberto G, Toniatti C (2002) Long-term and tight control of gene expression in mouse skeletal muscle by a new hybrid human transcription factor. *Mol Ther* 6:653-663.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84:570-573.
- Rozovsky I, Wei M, Morgan TE, Finch CE (2005) Reversible age impairments in neurite outgrowth by manipulations of astrocytic GFAP. *Neurobiol Aging* 26:705-715.
- Rubinchik S, Woraratanadharm J, Yu H, Dong JY (2005) New complex Ad vectors incorporating both rtTA and tTS deliver tightly regulated transgene expression both in vitro and in vivo. *Gene Ther* 12:504-511.
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33:401-406.
- Ruitenber MJ, Blits B, Dijkhuizen PA, te Beek ET, Bakker A, van Heerikhuizen JJ, Pool CW, Hermens WT, Boer GJ, Verhaagen J (2004) Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of brain-derived neurotrophic factor reverses atrophy of rubrospinal neurons following both acute and chronic spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 15:394-406.
- Russell DW, Hirata RK (1998) Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet* 18:325-330.
- Russell WC (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81:2573-2604.
- Rutledge EA, Russell DW (1997) Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol* 71:8429-8436.
- Sabatino DE, Mingozzi F, Hui DJ, Chen H, Colosi P, Ertl HC, High KA (2005) Identification of mouse AAV capsid-specific CD8<sup>+</sup> T cell epitopes. *Mol Ther* 12:1023-1033.
- Sadowski CL, Henry RW, Kobayashi R, Hernandez N (1996) The SNAP45 subunit of the small nuclear RNA (snRNA) activating protein complex is required for RNA polymerase II and III snRNA gene transcription and interacts with the TATA box binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4289-4293.
- Saeki Y, Ichikawa T, Saeki A, Chiocca EA, Tobler K, Ackermann M, Breakefield XO, Fraefel C (1998) Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum Gene Ther* 9:2787-2794.
- Saez E, Nelson MC, Eshelman B, Banayo E, Koder A, Cho GJ, Evans RM (2000) Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14512-14517.
- Sakhuja K, Reddy PS, Ganesh S, Cantaniag F, Pattison S, Limbach P, Kayda DB, Kadan MJ, Kaleko M, Connelly S (2003) Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 14:243-254.

- Sakonju S, Bogenhagen DF, Brown DD (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell* 19:13-25.
- Salucci V, Scarito A, Aurisicchio L, Lamartina S, Nicolaus G, Giampaoli S, Gonzalez-Paz O, Toniatti C, Bujard H, Hillen W, Ciliberto G, Palombo F (2002) Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Ther* 9:1415-1421.
- Sambrook J, Westphal H, Srinivasan PR, Dulbecco R (1968) The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60:1288-1295.
- Sapru MK, Yates JW, Hogan S, Jiang L, Halter J, Bohn MC (2006) Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi. *Exp Neurol* 198:382-390.
- Scherr M, Battmer K, Eder M, Schule S, Hohenberg H, Ganser A, Grez M, Blomer U (2002) Efficient gene transfer into the CNS by lentiviral vectors purified by anion exchange chromatography. *Gene Ther* 9:1708-1714.
- Schiavoni I, Trapp S, Santarcangelo AC, Piacentini V, Pugliese K, Baur A, Federico M (2004) HIV-1 Nef enhances both membrane expression and virion incorporation of Env products. A model for the Nef-dependent increase of HIV-1 infectivity. *J Biol Chem* 279:22996-23006.
- Schlegel R, Tralka TS, Willingham MC, Pastan I (1983) Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* 32:639-646.
- Schmeisser F, Donohue M, Weir JP (2002) Tetracycline-regulated gene expression in replication-incompetent herpes simplex virus vectors. *Hum Gene Ther* 13:2113-2124.
- Schramm L, Hernandez N (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 16:2593-2620.
- Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521-529.
- Schultz JC, Adamson JS, Jr., Workman WW, Norman TD (1963) Fatal Liver Disease after Intravenous Administration of Tetracycline in High Dosage. *N Engl J Med* 269:999-1004.
- Schuster C, Krol A, Carbon P (1998) Two distinct domains in Staf to selectively activate small nuclear RNA-type and mRNA promoters. *Mol Cell Biol* 18:2650-2658.
- Schwartz B, Benoist C, Abdallah B, Rangara R, Hassan A, Scherman D, Demeneix BA (1996) Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain. *Gene Ther* 3:405-411.
- Schwarz DS, Tomari Y, Zamore PD (2004) The RNA-induced silencing complex is a Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease. *Curr Biol* 14:787-791.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.
- Schwarz DS, Ding H, Kennington L, Moore JT, Schelter J, Burchard J, Linsley PS, Aronin N, Xu Z, Zamore PD (2006) Designing siRNA That Distinguish between Genes That Differ by a Single Nucleotide. *PLoS Genet* 2.
- Shamblott MJ, Axelman J, Littlefield JW, Blumenthal PD, Huggins GR, Cui Y, Cheng L, Gearhart JD (2001) Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:113-118.
- Shelling AN, Smith MG (1994) Targeted integration of transfected and infected adeno-associated virus vectors containing the neomycin resistance gene. *Gene Ther* 1:165-169.

- Sherman MP, Greene WC (2002) Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect* 4:67-73.
- Shin KJ, Wall EA, Zavzavadjian JR, Santat LA, Liu J, Hwang JI, Rebres R, Roach T, Seaman W, Simon MI, Fraser ID (2006) A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13759-13764.
- Sijen T, Plasterk RH (2003) Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 426:310-314.
- Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2005) Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 8:1343-1349.
- Sioud M (2005) Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* 348:1079-1090.
- Sioud M, Sorensen DR (2003) Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1220-1225.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor. *Mol Cell* 5:659-669.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839.
- Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, Gash DM, Kryscio R, Young B (2005) Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg* 102:216-222.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10:1026-1032.
- Sotirova VN, Calciano MA, Krueger W, Lalande M (2006) Inclusion of a matrix-attached region in a 7SK pol III vector increases the efficiency of shRNA-mediated gene silencing in embryonic carcinoma cells. *Plasmid* 55:216-226.
- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156:1051-1063.
- Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM (2003) Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol* 1:E60.
- Steffens S, Tebbets J, Kramm CM, Lindemann D, Flake A, Sena-Esteves M (2004) Transduction of human glial and neuronal tumor cells with different lentivirus vector pseudotypes. *J Neurooncol* 70:281-288.
- Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, Hannon GJ, Elledge SJ (2005) A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13212-13217.
- Stein CS, Martins I, Davidson BL (2005) The lymphocytic choriomeningitis virus envelope glycoprotein targets lentiviral gene transfer vector to neural progenitors in the murine brain. *Mol Ther* 11:382-389.
- Suhr ST, Gil EB, Senut MC, Gage FH (1998) High level transactivation by a modified *Bombyx* ecdysone receptor in mammalian cells without exogenous retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7999-8004.

- Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5515-5520.
- Sun X, Yau VK, Briggs BJ, Whittaker GR (2005) Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338:53-60.
- Takahashi T, Ishida K, Itoh K, Konishi Y, Yagyu KI, Tominaga A, Miyazaki JI, Yamamoto H (2003) IGF-I gene transfer by electroporation promotes regeneration in a muscle injury model. *Gene Ther* 10:612-620.
- Takenaga K, Kozlova EN (2006) Role of intracellular S100A4 for migration of rat astrocytes. *Glia* 53:313-321.
- Tan W, Zhu K, Segal DJ, Barbas CF, 3rd, Chow SA (2004) Fusion proteins consisting of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the designed polydactyl zinc finger protein E2C direct integration of viral DNA into specific sites. *J Virol* 78:1301-1313.
- Tatum EL (1966) Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med* 10:19-32.
- Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE (2003) Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther* 3:545-565.
- Thakker DR, Hoyer D, Cryan JF (2006) Interfering with the brain: use of RNA interference for understanding the pathophysiology of psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther* 109:413-438.
- Thomas CE, Schiedner G, Kochanek S, Castro MG, Lowenstein PR (2000) Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7482-7487.
- Thomas HE, Stunnenberg HG, Stewart AF (1993) Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature* 362:471-475.
- Thyagarajan B, Olivares EC, Hollis RP, Ginsburg DS, Calos MP (2001) Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol* 21:3926-3934.
- Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM (2003) A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1844-1848.
- Todar K (2006) Animal Viruses  
<http://www.bactwiscedu/themicrobialworld/AnimalViruseshtml>.
- Toniatti C, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G (2004) Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther* 11:649-657.
- Trollet C, Bloquel C, Scherman D, Bigey P (2006) Electrotransfer into skeletal muscle for protein expression. *Curr Gene Ther* 6:561-578.
- Tuszynski MH, Blesch A (2004) Nerve growth factor: from animal models of cholinergic neuronal degeneration to gene therapy in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 146:441-449.
- Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J (2005) A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 11:551-555.
- Unwalla HJ, Li HT, Bahner I, Li MJ, Kohn D, Rossi JJ (2006) Novel Pol II fusion promoter directs human immunodeficiency virus type 1-inducible coexpression of a short hairpin RNA and protein. *J Virol* 80:1863-1873.

- Unwalla HJ, Li MJ, Kim JD, Li HT, Ehsani A, Alluin J, Rossi JJ (2004) Negative feedback inhibition of HIV-1 by TAT-inducible expression of siRNA. *Nat Biotechnol* 22:1573-1578.
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7963-7968.
- Urrutia R (2003) KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol* 4:231.
- Van Blokland R, Van der Geest N, Mol JNM, Kooter JM (1994) Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover *The Plant Journal* Vol. 6 Page 787-968.
- van de Loo FA, de Hooe AS, Smeets RL, Bakker AC, Bennink MB, Arntz OJ, Joosten LA, van Beuningen HM, van der Kraan PK, Varley AW, van den Berg WB (2004) An inflammation-inducible adenoviral expression system for local treatment of the arthritic joint. *Gene Ther* 11:581-590.
- van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FC, Brummelkamp TR, Agami R, Clevers H (2003) Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* 4:609-615.
- Van den Haute C, Eggermont K, Nuttin B, Debyser Z, Baekelandt V (2003) Lentiviral vector-mediated delivery of short hairpin RNA results in persistent knockdown of gene expression in mouse brain. *Hum Gene Ther* 14:1799-1807.
- Varley AW, Munford RS (1998) Physiologically responsive gene therapy. *Mol Med Today* 4:445-451.
- Vasileva A, Jessberger R (2005) Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nat Rev Microbiol* 3:837-847.
- Vasko MR, Guo C, Kelley MR (2005) The multifunctional DNA repair/redox enzyme Ape1/Ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 4:367-379.
- Vastenhouw NL, Plasterk RH (2004) RNAi protects the *Caenorhabditis elegans* germline against transposition. *Trends Genet* 20:314-319.
- Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonnell DP, O'Malley BW (1992) The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell* 69:703-713.
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303:672-676.
- Vigna E, Cavalieri S, Ailles L, Geuna M, Loew R, Bujard H, Naldini L (2002) Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. *Mol Ther* 5:252-261.
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297:1833-1837.
- Wade N (1981) Gene therapy caught in more entanglements. *Science* 212:24-25.
- Waldmeier PC (2003) Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:303-321.
- Wang L, Mukherjee S, Jia F, Narayan O, Zhao LJ (1995) Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and transactivation of viral long terminal repeat. *J Biol Chem* 270:25564-25569.
- Wang L, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Nakano I, Ozawa K (2002) Delayed

- delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 9:381-389.
- Wang S, Petravicz J, Breakefield XO (2003) Single HSV-amplicon vector mediates drug-induced gene expression via dimerizer system. *Mol Ther* 7:790-800.
- Wang Y, O'Malley BW, Jr., Tsai SY, O'Malley BW (1994) A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8180-8184.
- Wang Y, DeMayo FJ, Tsai SY, O'Malley BW (1997a) Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 15:239-243.
- Wang Y, Xu J, Pierson T, O'Malley BW, Tsai SY (1997b) Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator. *Gene Ther* 4:432-441.
- Ward CM, Read ML, Seymour LW (2001) Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood* 97:2221-2229.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567-576.
- Watabe K, Sakamoto T, Ohashi T, Kawazoe Y, Oyanagi K, Takeshima T, Inoue K, Eto Y, Kim SU (2001) Adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor to injured adult motoneurons. *Hum Cell* 14:7-15.
- Watson DJ, Kobinger GP, Passini MA, Wilson JM, Wolfe JH (2002) Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. *Mol Ther* 5:528-537.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-862.
- Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, Borkhardt A (2002) Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 21:5716-5724.
- Witte V, Laffert B, Rosorius O, Lischka P, Blume K, Galler G, Stilper A, Willbold D, D'Aloja P, Sixt M, Kolanus J, Ott M, Kolanus W, Schuler G, Baur AS (2004) HIV-1 Nef mimics an integrin receptor signal that recruits the polycomb group protein Eed to the plasma membrane. *Mol Cell* 13:179-190.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-1468.
- Wong LF, Azzouz M, Walmsley LE, Askham Z, Wilkes FJ, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Mazarakis ND (2004) Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system. *Mol Ther* 9:101-111.
- Wood MJ, Byrnes AP, Rabkin SD, Pfaff DW, Charlton HM (1994) Immunological consequences of HSV-1-mediated gene transfer into the CNS. *Gene Ther* 1 Suppl 1:S82.
- Wood MJ, Charlton HM, Wood KJ, Kajiwara K, Byrnes AP (1996) Immune responses to adenovirus vectors in the nervous system. *Trends Neurosci* 19:497-501.
- Wu K, Meyers CA, Guerra NK, King MA, Meyer EM (2004) The effects of rAAV2-mediated NGF gene delivery in adult and aged rats. *Mol Ther* 9:262-269.
- Wu P, Phillips MI, Bui J, Terwilliger EF (1998) Adeno-associated virus vector-mediated transgene integration into neurons and other nondividing cell targets. *J Virol* 72:5919-5926.
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14:316-327.
- Wyborski DL, Bauer JC, Vaillancourt P (2001) Bicistronic expression of ecdysone-inducible receptors in mammalian cells. *Biotechniques* 31:618-620, 622, 624.

- Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL (2002) siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 20:1006-1010.
- Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, Paulson HL, Yang L, Kotin RM, Davidson BL (2004) RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10:816-820.
- Xia XG, Zhou H, Samper E, Melov S, Xu Z (2006) Pol II-expressed shRNA knocks down Sod2 gene expression and causes phenotypes of the gene knockout in mice. *PLoS Genet* 2:e10.
- Xiong W, Goverdhan S, Sciascia SA, Candolfi M, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, King GD, Jaita G, Liu C, Kroeger K, Agadjanian H, Medina-Kauwe L, Palmer D, Ng P, Lowenstein PR, Castro MG (2006) Regulatable gutless adenovirus vectors sustain inducible transgene expression in the brain in the presence of an immune response against adenoviruses. *J Virol* 80:27-37.
- Xu K, Ma H, McCown TJ, Verma IM, Kafri T (2001a) Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther* 3:97-104.
- Xu L, Zerby D, Huang Y, Ji H, Nyanguile OF, de los Angeles JE, Kadan MJ (2001b) A versatile framework for the design of ligand-dependent, transgene-specific transcription factors. *Mol Ther* 3:262-273.
- Xu ZL, Mizuguchi H, Mayumi T, Hayakawa T (2003) Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems. *Gene* 309:145-151.
- Yamamura J, Kageyama S, Uwano T, Kurokawa M, Imakita M, Shiraki K (2000) Long-term gene expression in the anterior horn motor neurons after intramuscular inoculation of a live herpes simplex virus vector. *Gene Ther* 7:934-941.
- Yanez-Munoz RJ, Balaggan KS, MacNeil A, Howe SJ, Schmidt M, Smith AJ, Buch P, MacLaren RE, Anderson PN, Barker SE, Duran Y, Bartholomae C, von Kalle C, Heckenlively JR, Kinnon C, Ali RR, Thrasher AJ (2006) Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* 12:348-353.
- Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71:63-72.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366:476-479.
- Ye X, Schillinger K, Burcin MM, Tsai SY, O'Malley BW (2002) Ligand-inducible transgene regulation for gene therapy. *Methods Enzymol* 346:551-561.
- Ye X, Rivera VM, Zoltick P, Cerasoli F, Jr., Schnell MA, Gao G, Hughes JV, Gilman M, Wilson JM (1999) Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science* 283:88-91.
- Yee JK, Friedmann T, Burns JC (1994) Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 43 Pt A:99-112.
- Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6047-6052.
- Zaiss AK, Muruve DA (2005) Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther* 5:323-331.
- Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H (1997) Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 3:1369-1375.

- Zaupa C, Revol-Guyot V, Epstein AL (2003) Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. *Hum Gene Ther* 14:1049-1063.
- Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR (2002) Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 9:1327-1333.
- Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9779-9784.
- Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173-185.
- Zennou V, Serguera C, Sarkis C, Colin P, Perret E, Mallet J, Charneau P (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 19:446-450.
- Zhang G, Budker V, Wolff JA (1999) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 10:1735-1737.
- Zhang H, Pomerantz RJ, Dornadula G, Sun Y (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging process. *J Virol* 74:8252-8261.
- Zhang Q, Fukuda M, Van Bockstaele E, Pascual O, Haydon PG (2004) Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9441-9446.
- Zhou H, Xia XG, Xu Z (2005) An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res* 33:e62.
- Zhou S, Murphy JE, Escobedo JA, Dwarki VJ (1998) Adeno-associated virus-mediated delivery of erythropoietin leads to sustained elevation of hematocrit in nonhuman primates. *Gene Ther* 5:665-670.
- Zhou X, Vink M, Klaver B, Berkhout B, Das AT (2006) Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Ther* 13:1382-1390.
- Zhu Z, Ma B, Homer RJ, Zheng T, Elias JA (2001) Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice. *J Biol Chem* 276:25222-25229.
- Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Elias JA (2002) Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin Cell Dev Biol* 13:121-128.
- Zou L, Yuan X, Long Y, Shine HD, Yang K (2002) Improvement of spatial learning and memory after adenovirus-mediated transfer of the nerve growth factor gene to aged rat brain. *Hum Gene Ther* 13:2173-2184.
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15:871-875.
- Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880.

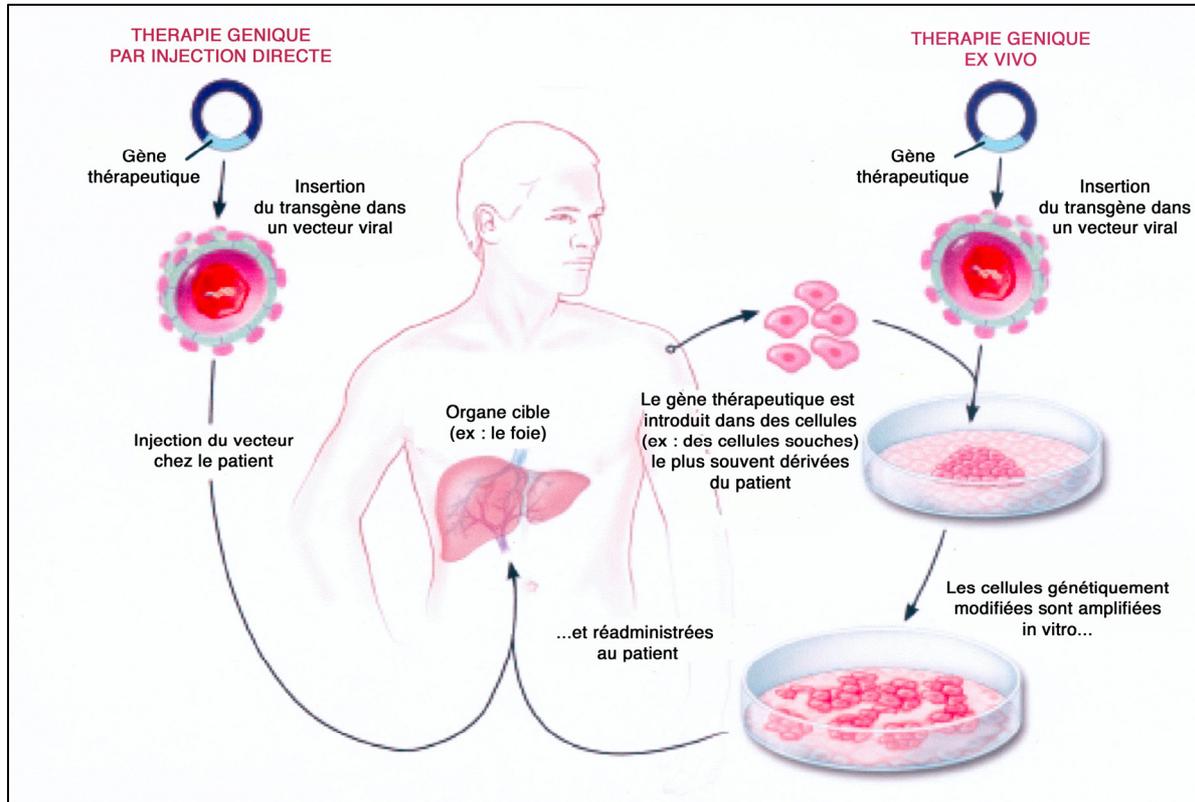


Figure 1 : Stratégies de thérapie génique

A gauche : Thérapie génique directe dite *in vivo*

A droite : Thérapie génique *ex vivo*

(D'après Kirschstein et Skirboll, 2001)

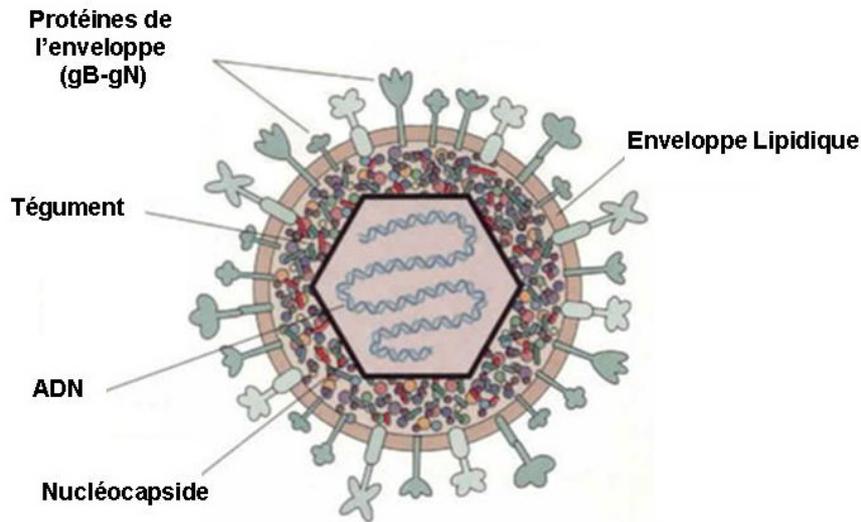


Figure 2a : Structure de l'Herpès simplex Virus de type 1 (HSV1) (d'après Todar, K 2006)

Le virus HSV1 est un virus d'une centaine de nm composé d'un corps dense aux électrons comprenant l'ADN double brin, d'une capsidie icosapentahédrique, d'un tégument (une couche protéique entourant la capsidie) et d'une enveloppe.

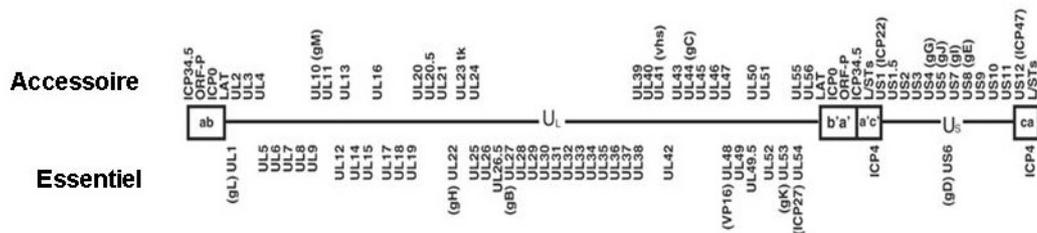


Figure 2b : Représentation schématique du génome de l'Herpès Simplex Virus de type 1 (d'après Frampton, et al. 2005)

Le génome du HSV1 est constitué de deux segments désignés L (long) et S (short :court). Chacun de ces segments est composé d'une séquence unique ( $U_L$  ou  $U_S$ ) flanquée de larges séquences répétées inversées (SRI). Les SRI situées aux extrémités du segment  $U_L$  sont désignées ab et b'a' alors que celles du segment  $U_S$  sont nommées a'c' et ca. La localisation des gènes essentiels (nécessaires pour la réplique virale) et les gènes accessoires (qui peuvent être délétés sans affecter la réplique) sont indiqués.

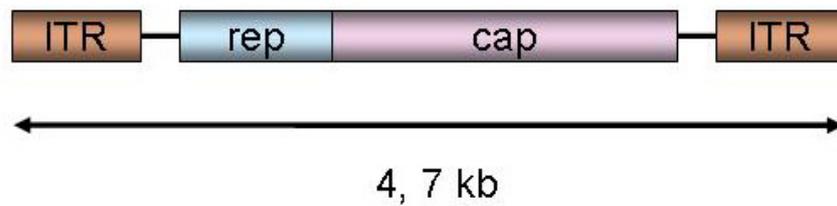


Figure 3 : Structure du génome de l'AAV  
(d'après Vasileva et Jessberger, 2005)

Le génome de l'AAV est encadré par des séquences répétées appelées ITR (Inverted Terminal Repeat). Le gène *rep* code pour des protéines impliquées dans la réplication virale et le gène *cap* code pour des protéines nécessaires pour l'encapsulation du virus. L'AAV s'intègre dans un locus spécifique du chromosome 19 humain, AAVS1.

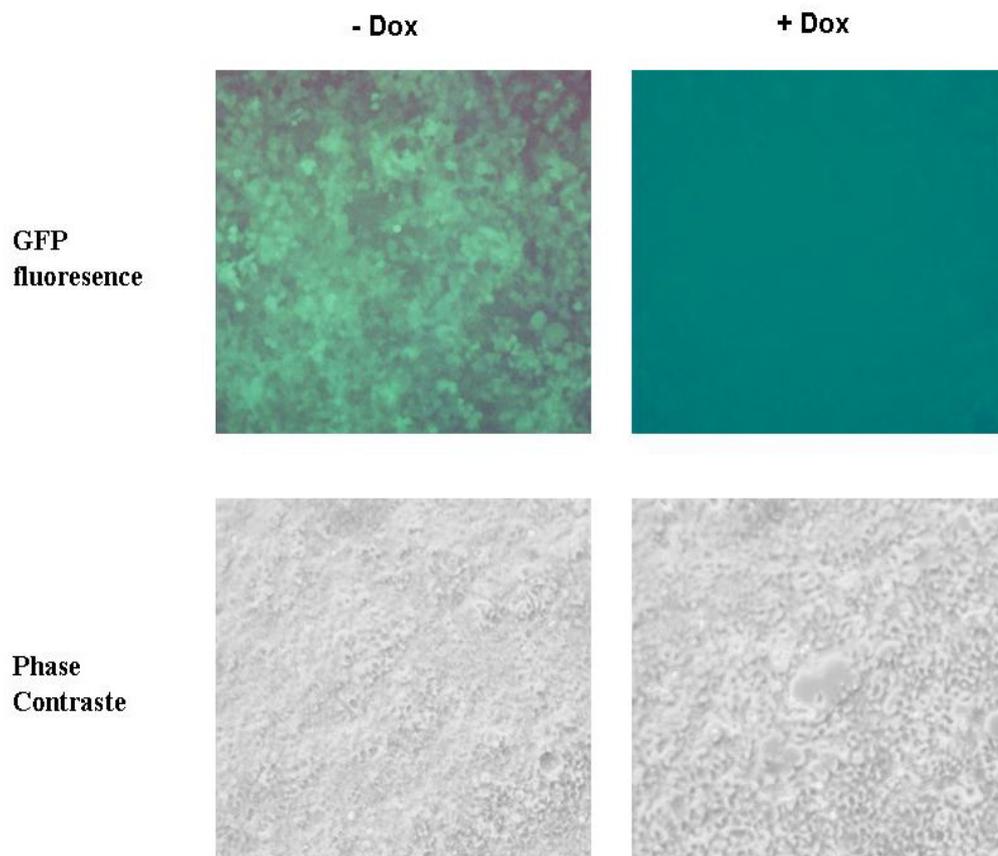


Figure 3A : Caractérisation du système de régulation

Transduction de cellules 293T-GFP par un vecteur lentiviral qui exprime de manière régulable un shARN dirigé contre la GFP. Les cellules sont cultivées en absence ou en présence de 6  $\mu\text{g/ml}$  de doxycycline.

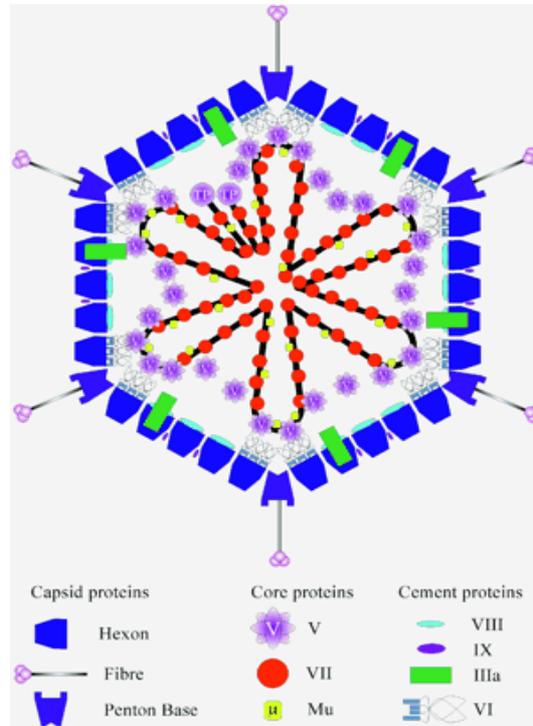


Figure 4a : Représentation schématique de la structure d'un adénovirus. (d'après Russell, WC 2000)

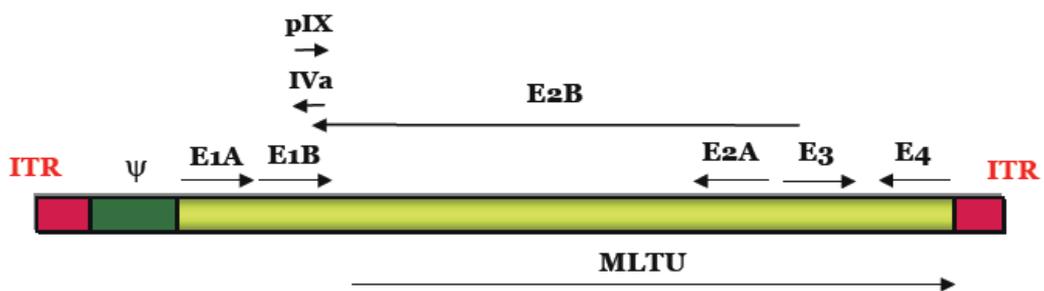


Figure 4b : Structure du génome d'un adénovirus de sérotype 5

Les extrémités du génome sont bordées par les ITR (Inverted Terminal Repeat). Les unités de transcription sont les unités précoces (deE1A à E4), les deux unités intermédiaires pIX et IVa et l'unité majeure tardive MLTU (Major Late Transcription Unit). Ψ est le signal d'encapsidation de l'ADN viral.

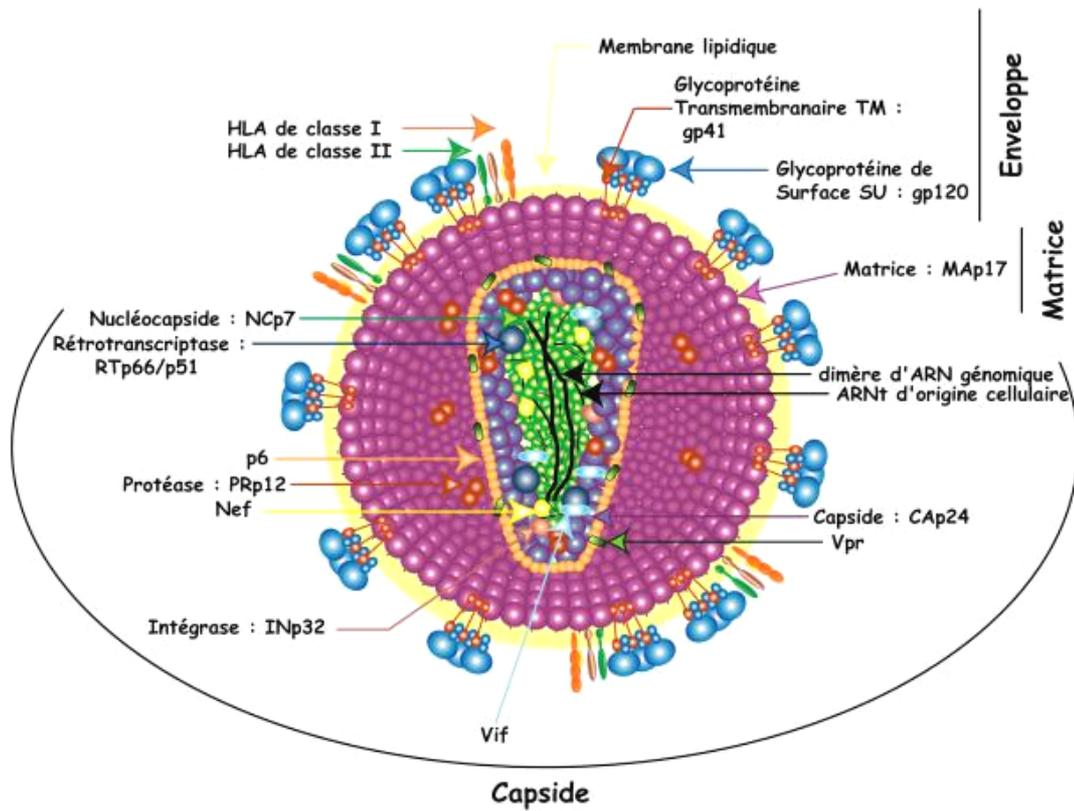


Figure 5 : Structure d'un lentivirus : exemple du VIH-1 (d'après Goldschmidt, V 2004)

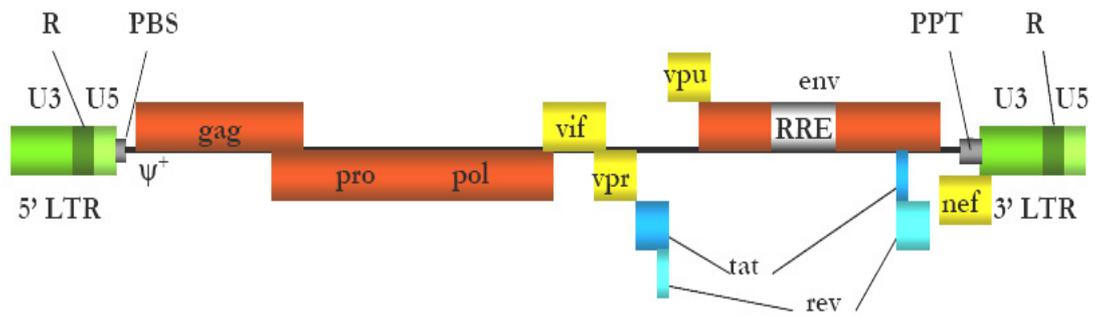


Figure 6 : Structure du génome du VIH-1

*gag*, *pol*, et *env*, gènes de structure. *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*, gènes régulateurs.

LTR : Long Terminal Repeat

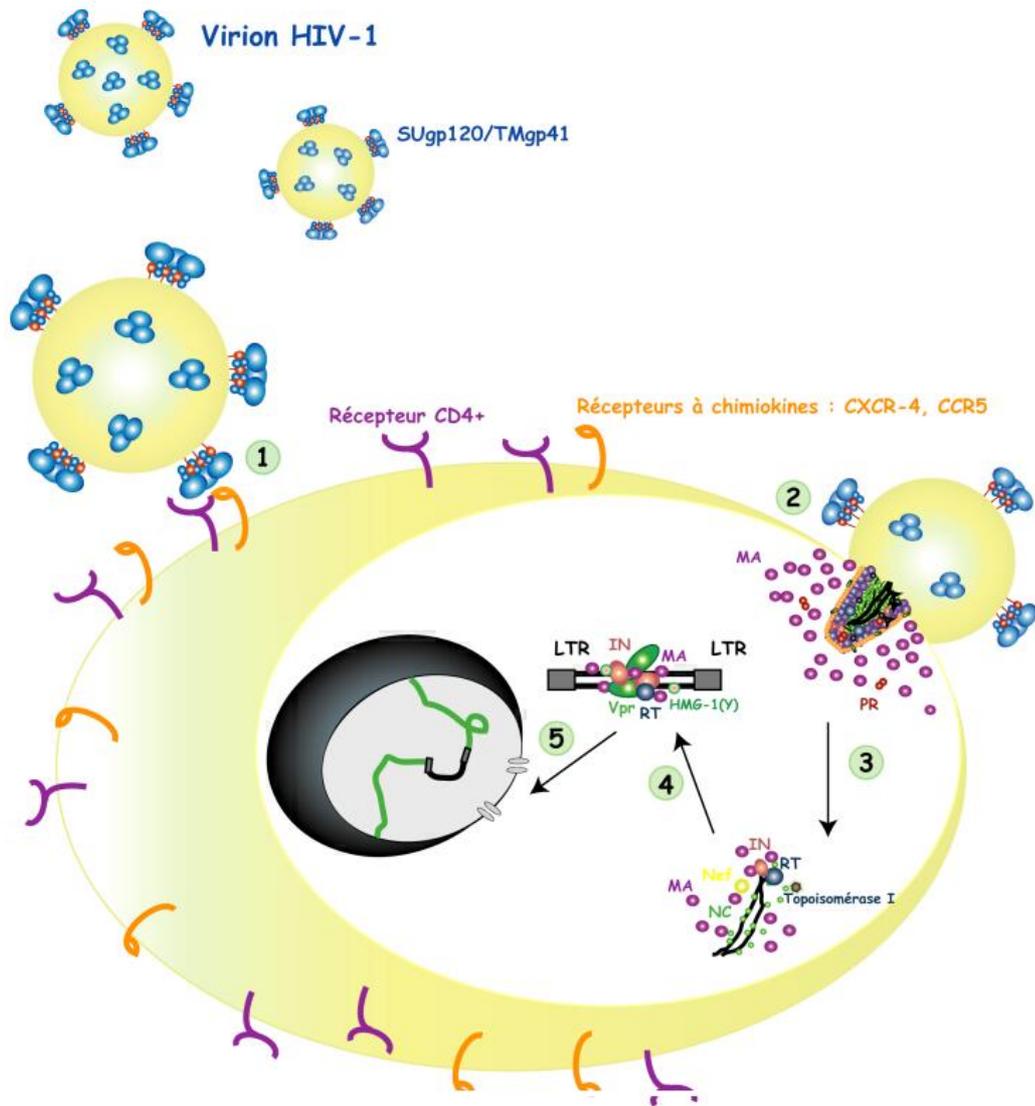


Figure 7 : Phase pré-intégrative du cycle réplcatif du HIV-1 (d'après Didierjean, J 2005)

1) Fixation SUgp120 au récepteur CD4+ ; 2) Fusion des deux enveloppes, entrée du virus dans la cellule et décapsidation ; 3) Rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral double brin ; 4) Formation du complexe de pré-intégration (CPI) ; 5) Intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte.

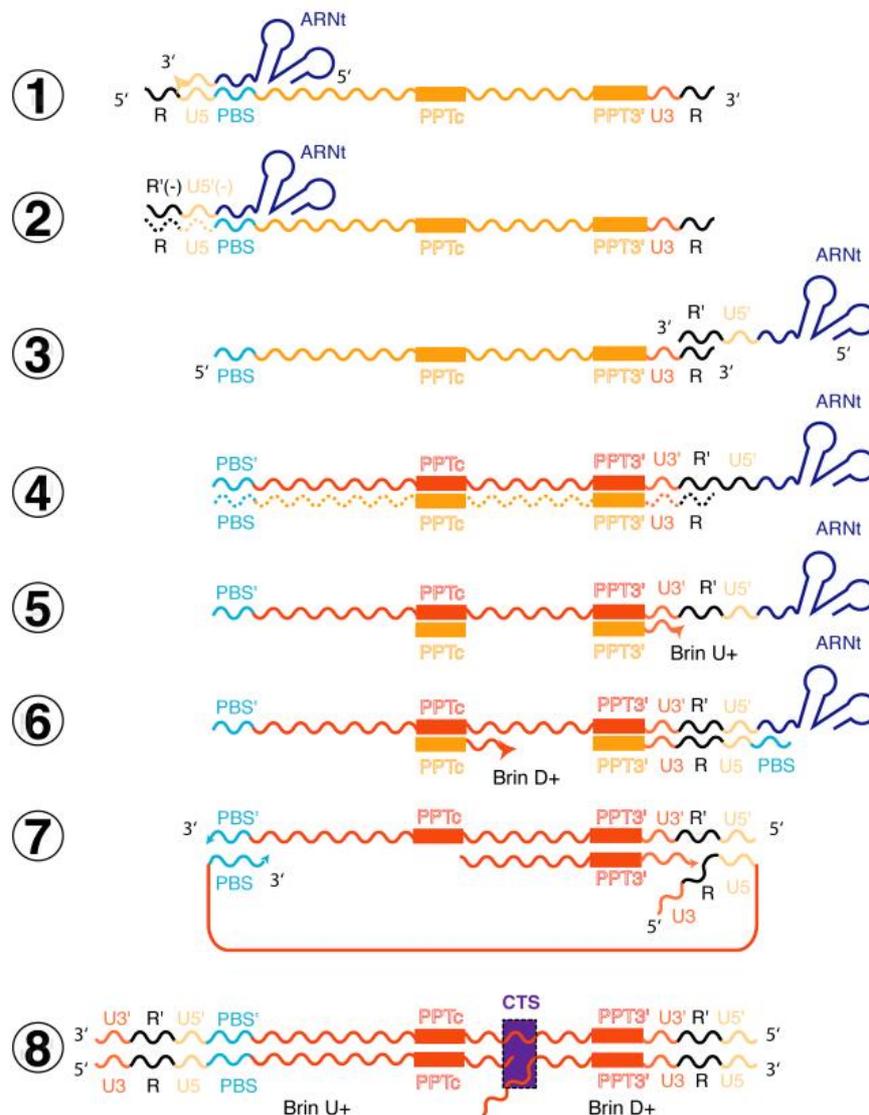


Figure 8 : Mécanisme de rétrotranscription de l'ARN génomique du VIH-1. (d'après Goldschmidt, V 2004)

1) Initiation de la synthèse du brin d'ADN (-) ; 2) Synthèse de l'ADN (-) et dégradation par la RNase H de l'ARN matrice ; 3) Saut du brin d'ADN (-) ; 4) Fin de la synthèse du brin d'ADN (-) et dégradation par la RNase H de la matrice ; 5) Initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) au niveau du PPT3' ; 6) Synthèse de l'ADN (+) et initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) au niveau du PPTc ; 7) Dégradation des amorces ARN et ARNt et saut de brin de l'ADN (+) ; 8) Terminaison de la synthèse des deux brins d'ADN et synthèse d'un "DNA flap" au niveau du CTS.

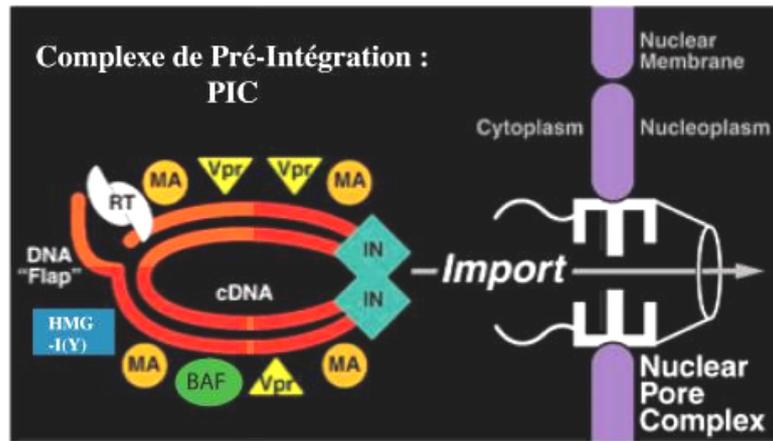


Figure 9 : Import nucléaire du provirus, formation du complexe de pré-intégration (CPI) (d'après Sherman, MP 2002)

Le CPI est composé de l'ADN proviral, des protéines virales MA, Vpr, IN et RT, ainsi que des protéines cellulaires HMG-I et BAF.

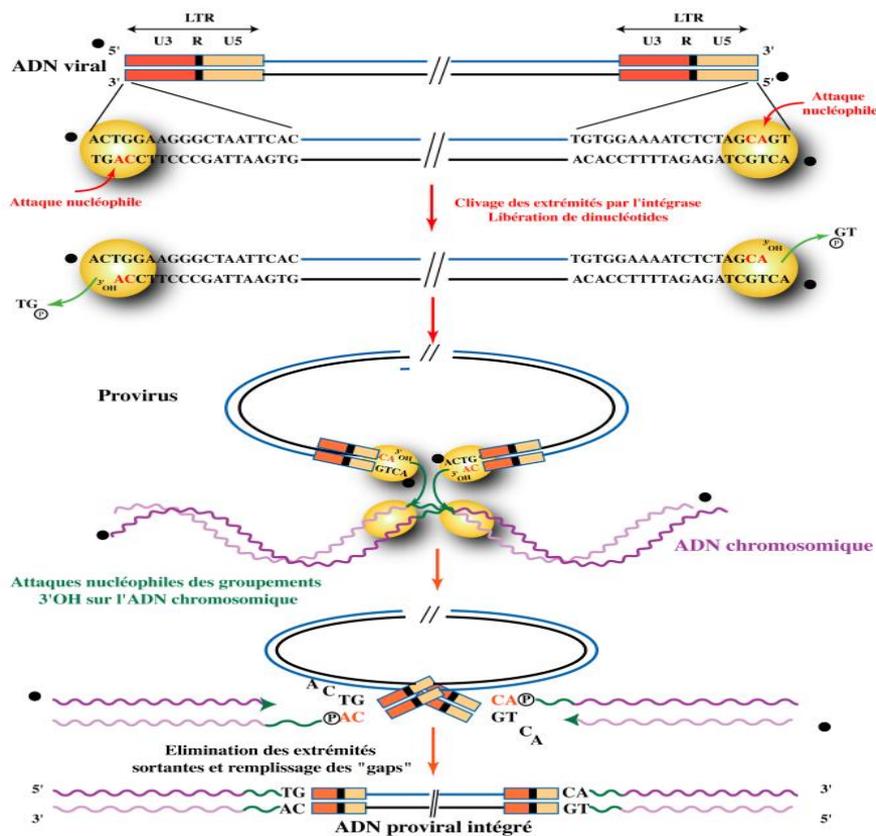


Figure 10 : Intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte (d'après Goldschmith, V 2004) (En jaune est représentée l'intégrase)

L'intégrase clive l'ADN génomique de l'hôte ainsi que les extrémités de l'ADN proviral pour libérer une extrémité CA avec un 3'-hydroxyle. L'ADN proviral est ligé aux extrémités 5' phosphate de l'ADN hôte par l'intégrase. Les extrémités sortantes sont ensuite éliminées et les discontinuités générées au niveau du site de ligation sont réparées par les enzymes cellulaires.

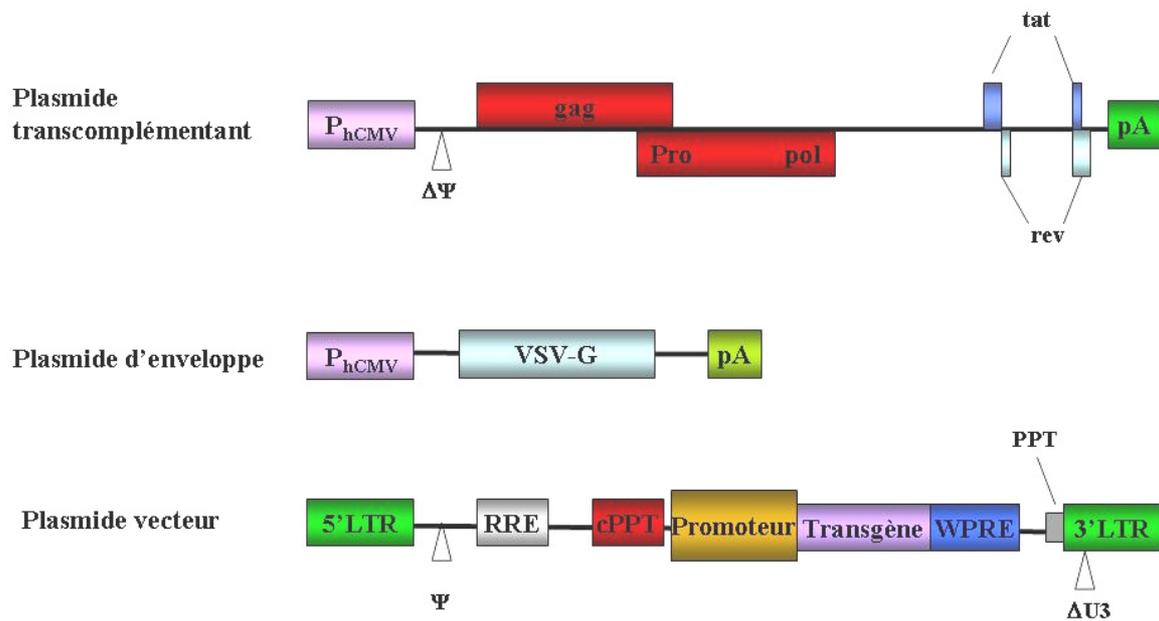


Figure 11 : Plasmides de production des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec VSV-G.

La production des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 nécessite la co-transfection transitoire de ces trois plasmides dans des cellules HEK-293T.

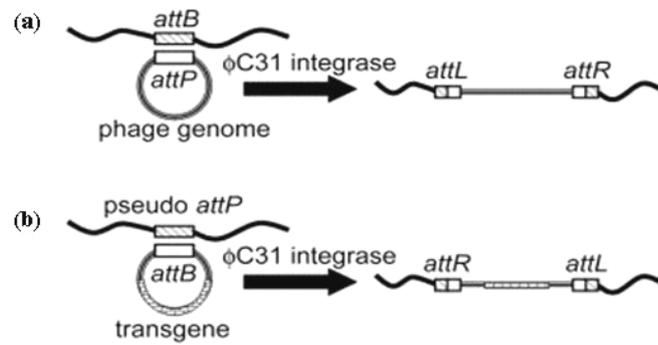


Figure 12 : Mécanisme d'intégration site spécifique catalysée par l'intégrase de phage phiC31 :

Chez *streptomyces*, l'intégrase phiC31 permet la recombinaison entre le site *attB*, présent dans le génome de *streptomyces* et le site *attP* formant les jonctions *attL* et *attR*. b) Dans les cellules de mammifères, phiC31 permet l'intégration d'un plasmide porteur du site *attB* et d'un transgène au niveau de pseudo-sites *attP*. (d'après Chalberg et al., 2005).

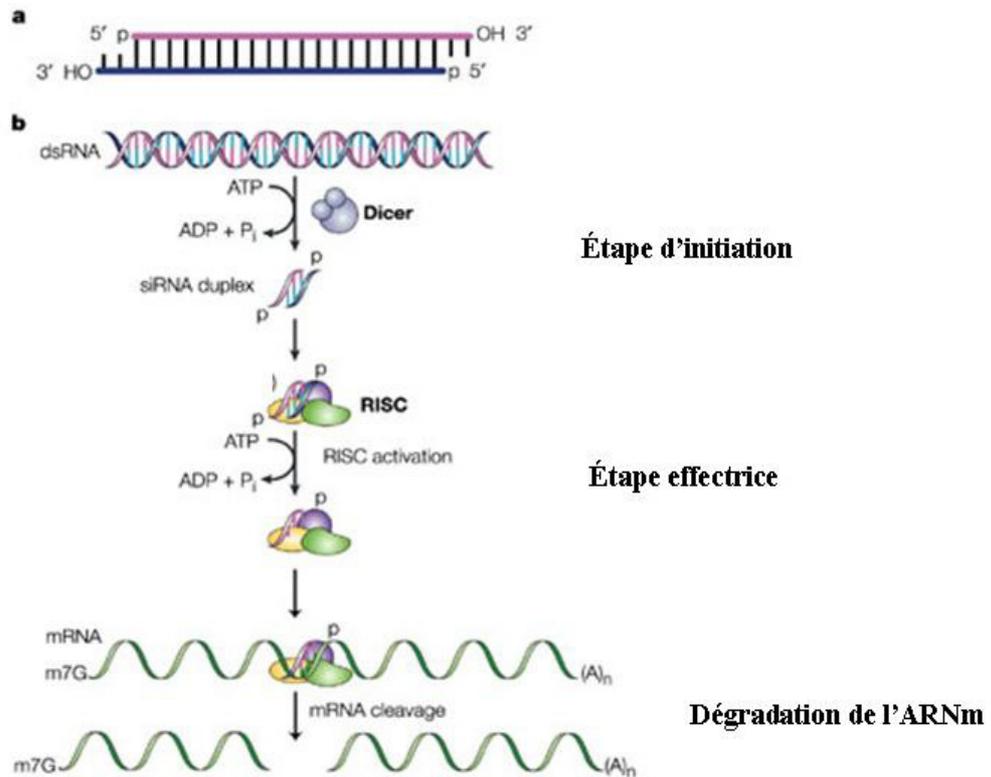


Figure 13 : Schéma du mécanisme de l'ARN interférence

a) Structure d'un siARN. b) Biosynthèse d'un siARN et dégradation de l'ARNm cible.  
(D'après Dykxhoorn, DM 2003)

L'ARNdb est clivé pendant l'étape d'initiation par l'enzyme Dicer pour former de petits fragments d'ARNdb de 19 à 25 nucléotides, les siARN. Au cours de l'étape effectrice, un seul brin du siARN sera incorporé dans le complexe RISC. La liaison par homologie des bases du siARN avec l'ARNm cible entraîne sa dégradation par RISC.

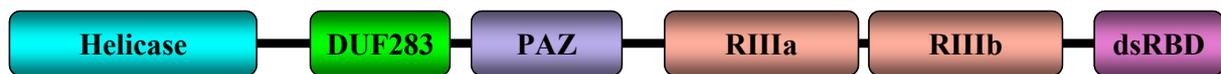


Figure 14 : Structure de la protéine Dicer humaine :  
(d'après Carmell, A et Hannon, GJ 2004)

Dicer appartient à la famille des protéines RNase III et contient deux domaines catalytiques (RIIIa et RIIIb) et d'un domaine de liaison à l'ARNdb (dsRBD). Dicer est également constitué dans sa partie N-terminale d'un domaine hélicase, qui permet de séparer les brins d'ARNdb, suivie par un domaine de fonction inconnue, DUF283, puis d'un domaine PAZ.



Figure 15 : Structure des protéines Argonautes :  
(d'après Filipowicz et al ; 2005)

Les protéines Argonautes présentes dans le complexe RISC sont composées de deux principaux domaines : un domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) dans sa partie N-terminale et d'un domaine PIWI dans sa partie C-terminale. Le domaine PAZ d'une longueur d'environ 120 acides aminés permet de lier l'ARNdb. Le domaine PIWI d'une longueur d'environ 400 acides aminés est responsable de l'activité catalytique de l'ARNm.

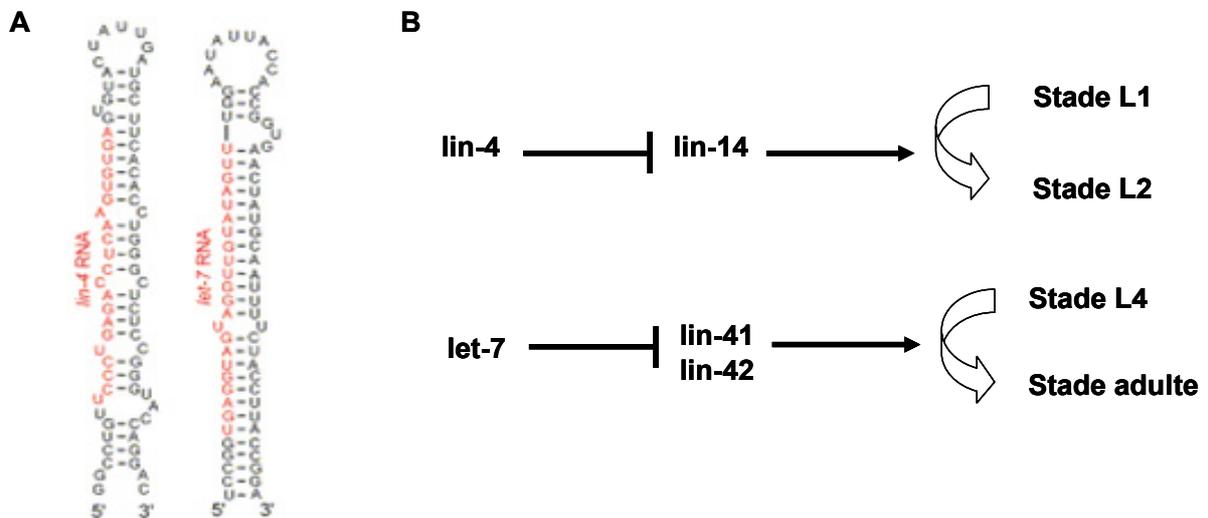


Figure 16 : a) Structure des pré-miARN lin-4 et let-7, membres fondateurs de la famille des microARN. b) Mécanisme d'action des miARN lin-4 et let-7 (figure tirée de Bartel, DP 2004)

a) Avant maturation par la protéine Dicer, l'ARN lin-4 et let-7 ont une longueur d'environ 70 nucléotides et forment une structure en tige-boucle. La maturation produit des molécules de 22 nucléotides (en rouge), partiellement complémentaire de la région 3'-UTR de leurs ARNm cibles

b) Le miARN lin-4 se fixe sur la région 3'-UTR de lin-14 permettant ainsi le passage de stade larvaire L1 vers L2. Le miARN let-7 se fixe sur deux cibles, lin-41 et lin-42, déclenchant le passage de la phase larvaire L4 au stade adulte.

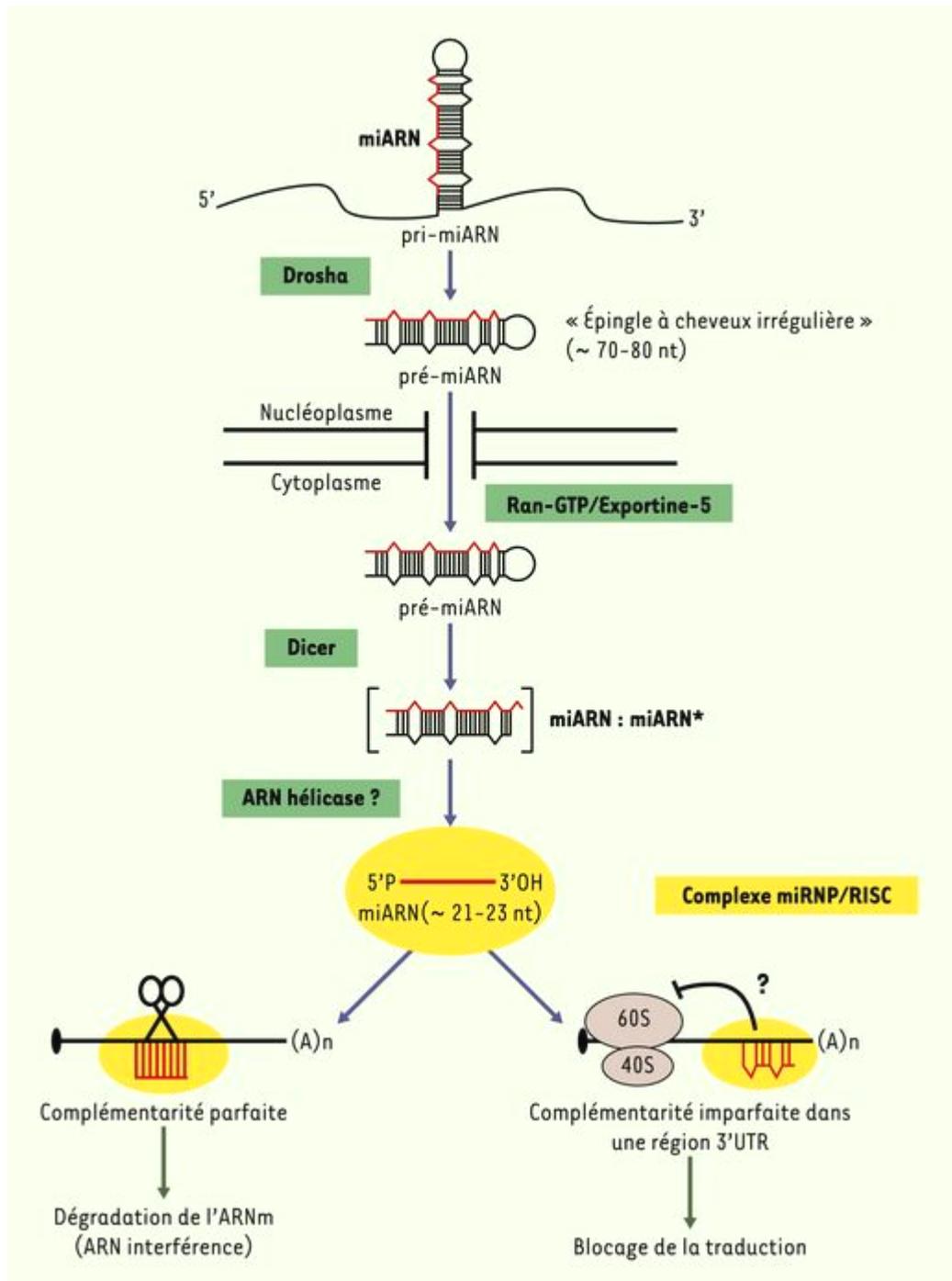


Figure 17 : Biosynthèse des microARN  
(D'après Cavaille, J 2004)

Les miARN sont synthétisés à partir d'un ARN précurseur en tige boucle imparfaite en un ARN double brin d'environ 22 nucléotides. Ce miARN s'associe avec le complexe RISC et s'apparie avec un ARNm. Si la complémentarité est parfaite, il y a dégradation de l'ARNm cible, alors que si la complémentarité est imparfaite, il y a blocage de la traduction. Ce mécanisme d'inhibition n'est pas complètement élucidé.

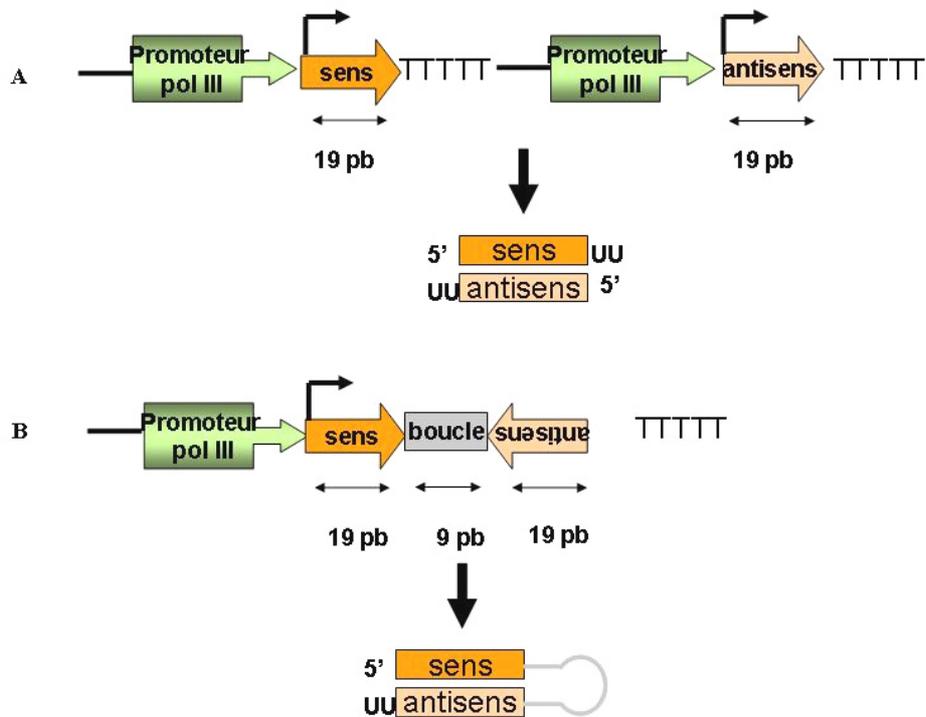


Figure 18 : Stratégie d'expression des siARN

L'expression des siARN se fait par l'intermédiaire de promoteurs d'ARN polymérase III. La succession de 5 résidus thymidines permet de stopper la transcription.

A) Utilisation de deux promoteurs pour la synthèse du brin sens et brin antisens du siARN.

B) Utilisation d'un seul promoteur pour la synthèse d'un siARN en épingle à cheveux, le shARN. Le brin sens et antisens sont séparés par une boucle de 9 pb.

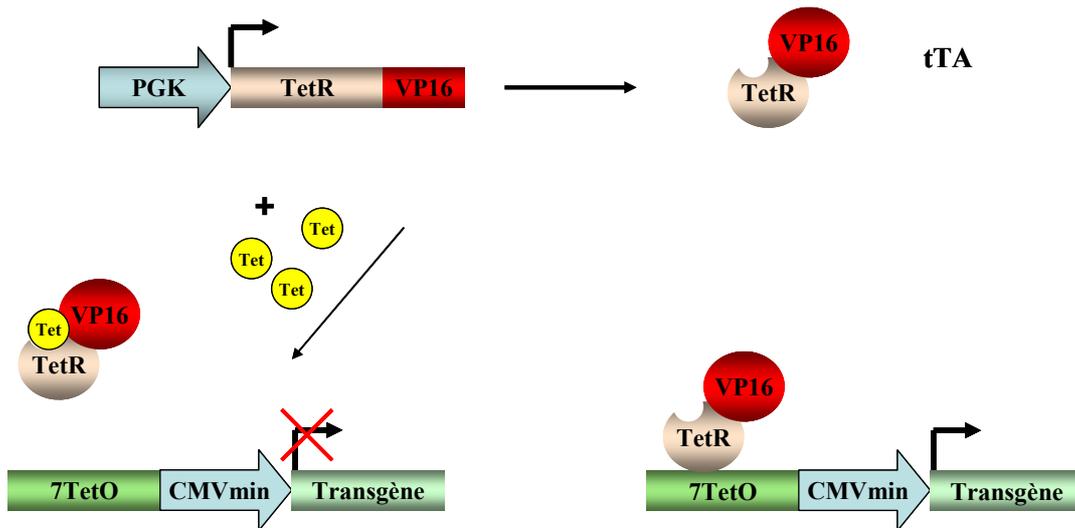


Figure 19a : Système de régulation suppressible par la tétracycline, “Tet-off”

TetR, domaine de fixation à l’ADN du répresseur tétracycline VP16, domaine activateur de la transcription de VP16 du HSV.

En présence de tétracycline ou de doxycycline, le transactivateur tTA ne peut se fixer sur les séquences TetO. La transcription est alors inactivée.

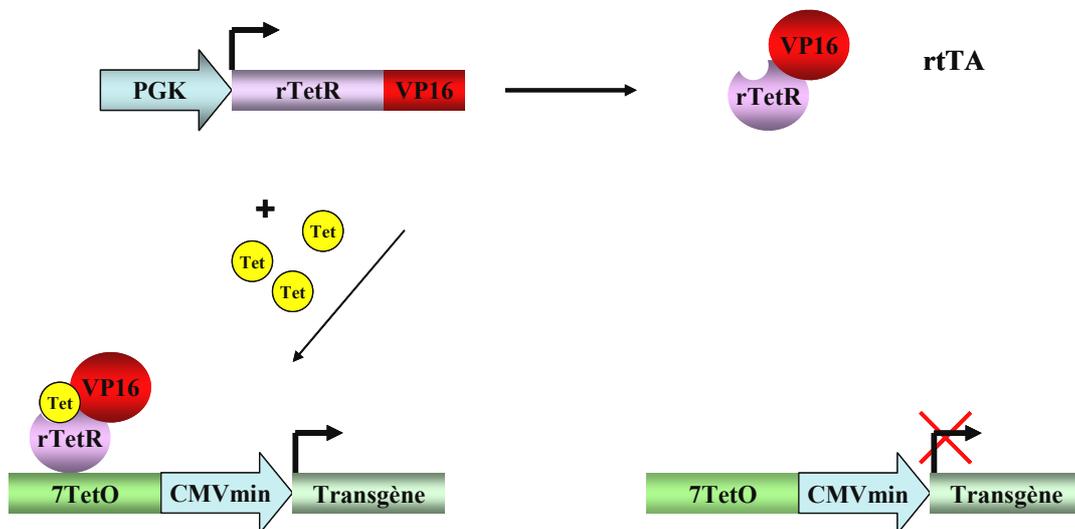


Figure 19b : Système de régulation inducible par la tétracycline, “Tet-on”

rTetR, domaine muté de fixation à l’ADN du répresseur tétracycline.

En présence de tétracycline, le transactivateur rtTA se fixe sur les séquences TetO et déclenche la transcription.

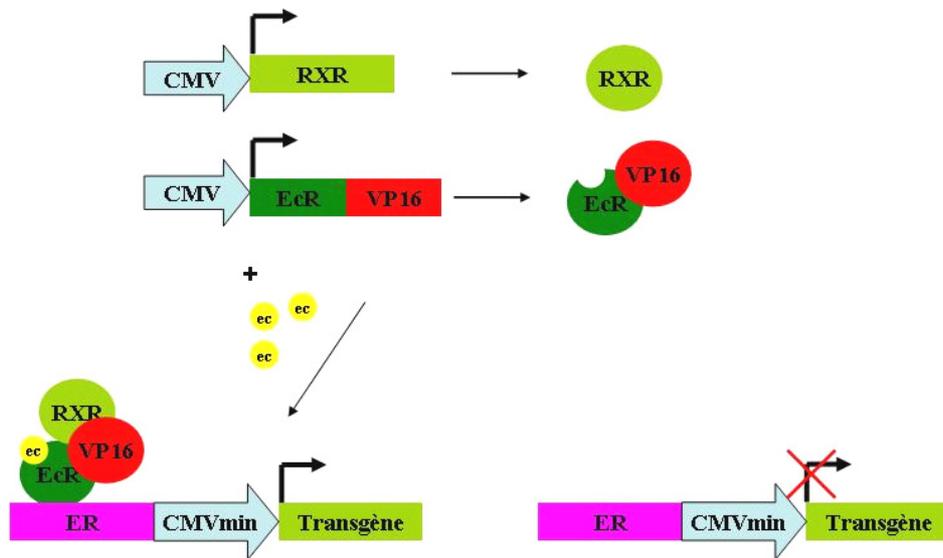


Figure 20 : Système de régulation par l'ecdysone

RXR, Récepteur au Rétinoïde X ; EcR, domaine de liaison à l'ADN du récepteur à l'ecdysone ; VP16, domaine activateur de VP16 du HSV ; ER, Élément de Réponse de EcR.

En présence d'ecdysone, le transactivateur EcR/VP16 se lie à RXR pour former un complexe qui se lie sur les séquences ER en amont du promoteur du gène d'intérêt, déclenchant ainsi la transcription. En revanche, en absence d'ecdysone, il n'y a pas de dimérisation de EcR/VP16 avec RXR. Il n'y a donc pas d'induction de la transcription.

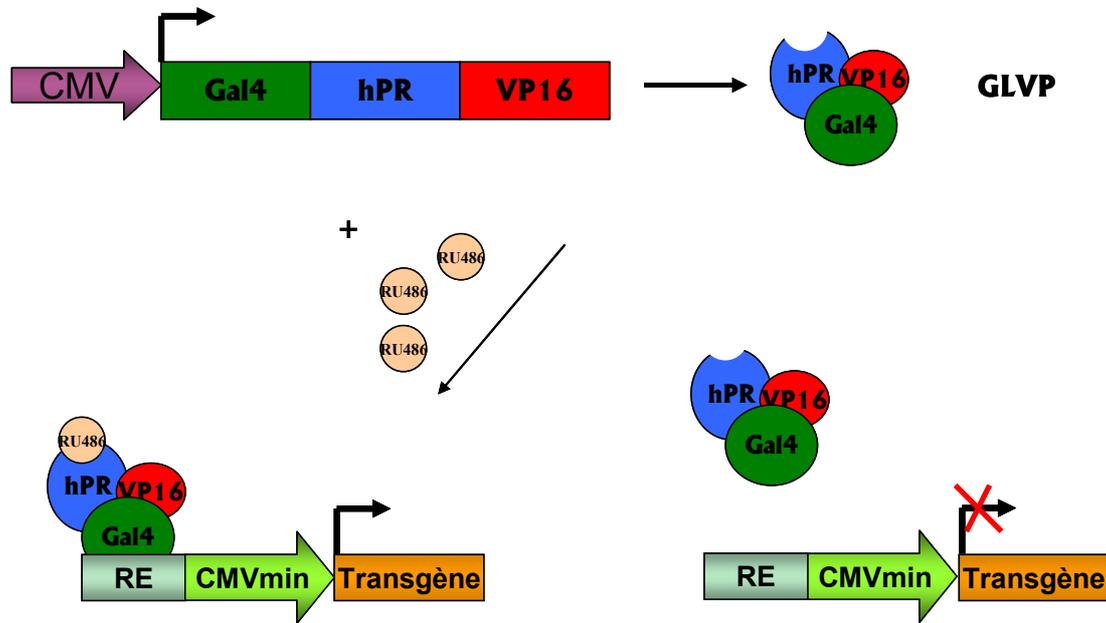


Figure 21 : Système de régulation par la mifépristone ou RU486

Gal4, domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ; hPR, domaine muté de liaison à la mifépristone ; VP16, domaine activateur de VP16 du HSV.

En présence de mifépristone ou RU486, le transactivateur chimérique GLVP se fixe sur les éléments de réponse ER présent en amont du promoteur, déclenchant ainsi la transcription. En revanche en absence de RU486, GLVP ne se fixe pas sur le promoteur. Il n'y a donc pas d'expression du transgène.

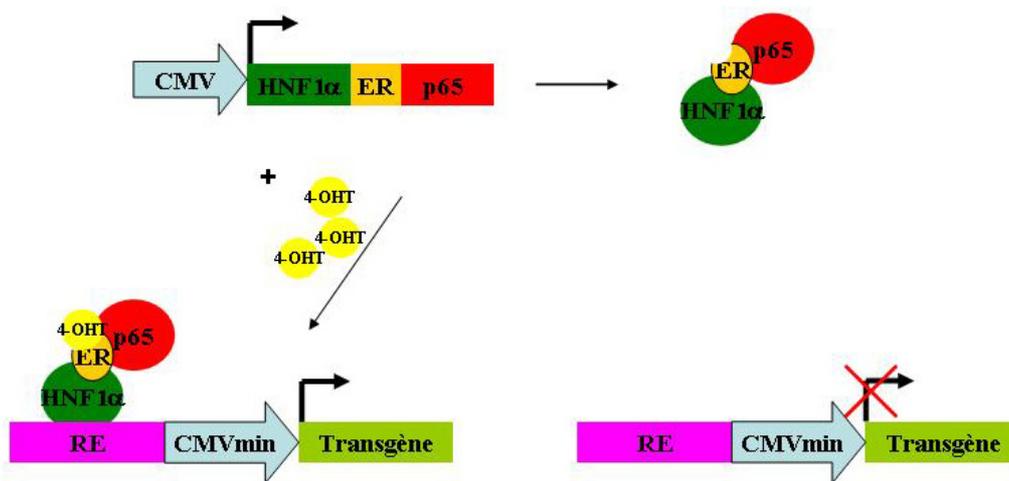


Figure 22 : Système de régulation par le tamoxifène

RE, Response Element., séquence de liaison de HNF1 $\alpha$  ; HNF1 $\alpha$ , domaine de liaison à l'ADN de HNF1 $\alpha$  (Human hepatocyte Nuclear Factor-1 $\alpha$ . ER, domaine de liaison au ligand 4-hydroxytamoxifène (4-OHT). p65, domaine activateur de la sous unité p65 de NF- $\kappa$ B.

En présence de 4-OHT, le transactivateur HNF1 $\alpha$ /:ER/p65 se lie au séquence de liaison de HNF1 $\alpha$  située en amont du promoteur. Cette liaison déclenche l'expression du transgène. En revanche, en absence de 4-OHT, ce transactivateur ne se fixe pas. Il n'y a pas de transcription.

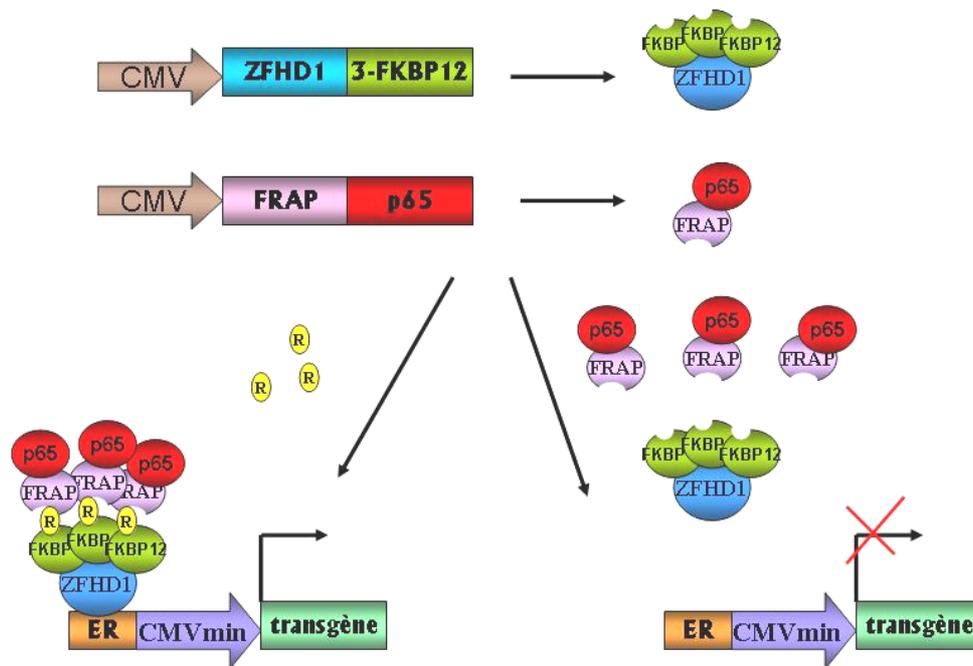


Figure 23 : Système de régulation par la rapamycine (R, rapamycine)

ZFHD1, domaine de liaison à l'ADN de la protéine ZFHD1 ; FKBP12, domaine de liaison à la rapamycine de la protéine FKBP12 ; FRAP, domaine de liaison FRB de la protéine FRAP ; p65, domaine d'activation de la protéine NFκB p65.

En présence de rapamycine, FRAP/p65 se dimérise avec ZFHD1/3-FKBP pour former un hétérodimère qui se fixe sur des éléments de réponses spécifique situés en amont du promoteur. Cette fixation entraîne la transcription. En revanche, en absence de rapamycine, l'hétérodimère ne se fixe pas. Il n'y a pas d'expression du transgène.

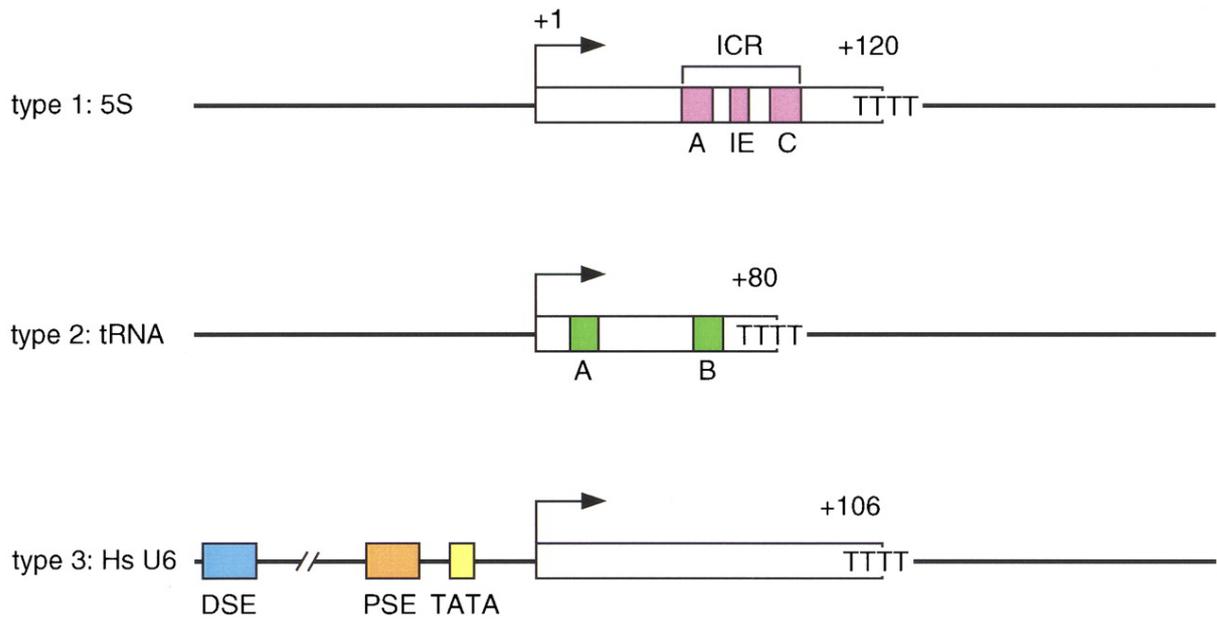


Figure 24 : Description des différents types de promoteurs d'ARN polymérase III. (d'après Schramm et Hernandez, 2002)

Le promoteur de type I comporte une région de contrôle interne (ICR) se laquelle se fixe les protéines d'initiation de la transcription. Il code pour les ARN ribosomiaux. Le promoteur de type II comporte une boîte A et B et code pour des ARN de transfert. Les promoteurs de types III code par exemple pour des ARN nucléaires. Contrairement aux promoteurs de type I et II les promoteurs de types III sont extragéniques.

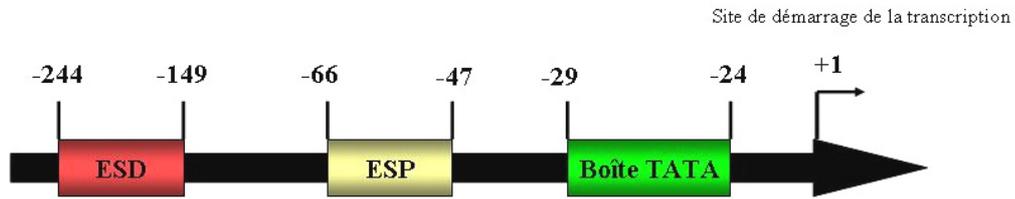


Figure 25 : Structure du promoteur U6 humain  
 ESD, Elément de Séquence Distal, ESP, Elément de Séquence Proximal.

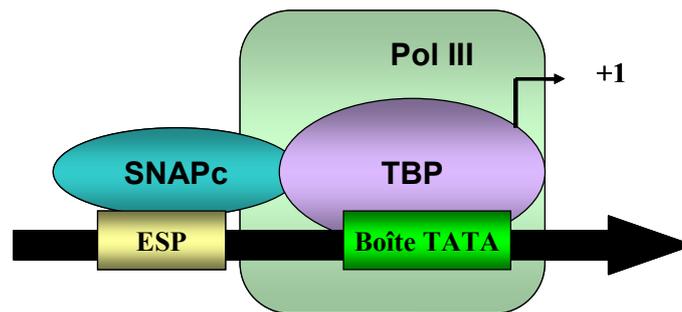


Figure 26 : Mécanisme simplifié de transcription à partir d'un promoteur d'ARN polymérase III.

(Modifié d'après Schramm et Hernandez, 2002)

N'est représenté ici que le "core" du promoteur (ESP et boîte TATA).

Le facteur de transcription SNAPc se fixe sur l'ESP et induit la fixation de la protéine TBP sur la boîte TATA. L'interaction entre SNAPc et TBP recrute l'ARN polymérase III qui démarre la transcription à partir d'un nucléotide précis (une guanine dans le cas du promoteur U6).

	<b>Adénovirus</b>	<b>AAV</b>	<b>HSV</b>	<b>Lentivirus</b>
<b>Type de virus</b>	ADNdb	ADNsb	ADNdb	ARN
<b>Transduction des cellules quiescentes</b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Intégration</b>	non	oui/non (dépendant du type cellulaire)	non	oui
<b>Capacité de clonage</b>	7,5 kb (sauf gutless 37 kb)	4,5 kb	30-150 kb	8 kb
<b>Avantages</b>	- Transduction des cellules quiescentes et en division. - Production à haut titre	- Transduction des cellules quiescentes et en division. - Peu immunogène	- Forte capacité de clonage. - Fort tropisme pour les neurones	- Transduction des cellules quiescentes et en division. - Expression à long terme - Peu immunogène
<b>Inconvénients</b>	- Pas de réadministration (anticorps neutralisants) - Durée d'expression courte - Immunogène	- Pas de réadministration (anticorps neutralisants) - faible capacité de clonage	- Durée d'expression courte - Immunogène	- Risque de mutagenèse insertionnelle

Tableau I : Comparaison des principaux vecteurs de transfert de gène.

# A Single Lentivirus Vector Mediates Doxycycline-Regulated Expression of Transgenes in the Brain

ROLAND VOGEL, LAHOUARI AMAR, ANH DO THI, PAULETTE SAILLOUR, and JACQUES MALLET

## ABSTRACT

A single lentivirus vector allowing doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain was generated by incorporating the tetracycline (Tet)-dependent regulatory system into the backbone of the vector. Two distinct expression cassettes were inserted upstream and downstream from the central Flap sequence that provides for enhanced transduction of nondividing cells. The first cassette was used to express the transgene under the control of the Tet-dependent minimal cytomegalovirus promoter. The second cassette was employed to express constitutively the Tet-dependent transactivator rtTA2-M2, which activates the Tet-dependent promoter after binding of doxycycline (Tet-on system). Vectors carrying luciferase and tyrosine hydroxylase as the transgene were constructed, tested in astroglia-rich primary cultures, and injected into the striata of rats. The constructs allowed *in vitro* and *in vivo* robust expression of the transgene that could be regulated over two orders of magnitude by the addition and withdrawal of doxycycline. The vector may thus be useful for many applications in gene therapy research, including the development of a therapeutic protocol for the treatment of Parkinson's disease based on the restoration of regulated dopamine production.

## OVERVIEW SUMMARY

The use of gene transfer as a therapeutic tool requires the development of vectors that permit to control the expression of the therapeutic gene by administration of small inducer molecules. The treatment could then be adapted to the needs of the patient and, should complications arise, the therapy could be stopped or interrupted. Optimized vectors that only need to be applied to the patient in minimal amounts would contribute further to the safety of gene transfer for human therapy. Therefore, we constructed and characterized a single optimized lentivirus vector allowing doxycycline-regulated expression of transgenes. Transgene expression from this vector can be regulated *in vitro* and *in vivo* over two orders of magnitude by administration and withdrawal of doxycycline. Thus, the vector may be useful for many applications in gene therapy research.

## INTRODUCTION

THE DEVELOPMENT OF VECTORS that allow regulated expression of therapeutic genes is essential for the clinical application of gene therapy. The delivery of genes controlled by a

regulatory system would improve both efficacy and safety by enabling clinicians to adapt the therapy to the needs of the patient and to stop therapeutic gene expression at the onset of any adverse secondary effect. Gene regulation is particularly necessary when the gene transfer vectors permit long-term expression of the transgene. The importance of controlled therapies is most evident in the field of therapeutic angiogenesis and in the treatment of Parkinson's disease. The devastating consequences of unregulated vascular endothelial growth factor (VEGF) synthesis (Yancopoulos *et al.*, 2000) and the occurrence of persistent dyskinesia in patients caused by unregulated synthesis of dopamine by implanted fetal dopaminergic cells (Ma *et al.*, 2002) are well documented.

Several systems that allow transgene expression to be modulated have been developed (Fussenegger, 2001). Among these, the Tet-dependent regulatory system (Gossen and Bujard, 1992) reveals excellent performance *in vitro* and *in vivo*. The initial version of the Tet system was based on an engineered transcription factor that combines functional domains from the *Escherichia coli* Tet repressor protein and the *Herpes simplex* VP16 transactivator. In the absence of doxycycline this transactivator activates a minimal cytomegalovirus (CMV) promoter by binding to the Tet operon repeats incorporated into its 5' region (Tet-off system). In the most recent version a modified

transcription factor (rtTA2-M2) is used: it contains three minimal VP16 transactivator domains (Baron *et al.*, 1997) and a mutated tetracycline-binding domain (Urlinger *et al.*, 2000). This transactivator requires doxycycline to activate the minimal CMV promoter (Tet-on system). The various versions of the Tet system have been successfully used in transgenic animals (Zhu *et al.*, 2002) and have also been integrated into adenoviral vectors (Corti *et al.*, 1999) and adeno-associated viral vectors (Fitzsimons *et al.*, 2001).

Tet-regulated transgene expression in a host cell requires the delivery of two expression cassettes, one to express the transactivator and the other to express the transgene. In RNA virus vectors, such as lentivirus vectors, the possibilities of inserting more than one expression cassette appear to be limited, because termination of transcription due to additional poly(A) sequences must be avoided during vector production. To deliver regulated expression of small transgenes, such as that encoding green fluorescent protein (GFP), by lentivirus vectors, the problem has been overcome by the use of overlapping expression cassettes (Kafri *et al.*, 2000; Vigna *et al.*, 2002); that is, the cassettes required to produce (1) the vector, (2) the transactivator, and (3) the transgene all share the poly(A) sequence in the long terminal repeat (LTR) of the vector. Doxycycline-regulated expression of transgenes has also been obtained by delivering two expression cassettes by two separate lentivirus vectors (Vigna *et al.*, 2002).

The amount of vector administered to patients should be as small as possible, in order to minimize the risk of oncogene activation by the integrating vector genome. In a clinical trial of *ex vivo* gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002), one of four successfully treated patients developed leukemia 30 months after implantation of CD34<sup>+</sup> cells transduced with a Moloney murine leukemia virus vector (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). The leukemia observed was probably due to oncogene activation caused by the integrating vector genome (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003).

Thus, we set out to develop a single, self-inactivating lentiviral vector to deliver Tet-regulated expression of therapeutic genes. Two distinct expression cassettes were integrated into the lentiviral backbone to optimize induction of larger therapeutic genes by doxycycline. To further reduce the amount of vector that has to be applied *in vivo*, the Woodchuck Hepatitis Virus Responsive Element (WPRE) was incorporated: this element increases transgene expression by stabilizing the transgene mRNA (Zufferey *et al.*, 1999). To facilitate transduction of neural cells, the central HIV-1 Flap sequence (Zennou *et al.*, 2001) was inserted into the vector.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmid construction

The plasmid pTrip-EF1 $\alpha$ -eGFP, which contains the backbone of the lentiviral genome including the central Flap sequence (Zennou *et al.*, 2001), was kindly provided by P. Charneau (Pasteur Institute, Paris, France). The plasmids pUHR 10-3 and pUHRT62-1, which contain the components of the Tet system, were kindly provided by H. Bujard (Zentrum für

Molekulare Biologie, Heidelberg, Germany). A *Bam*HI–*Kpn*I DNA fragment containing the WPRE and an *Mlu*I–*Bam*HI DNA fragment containing the tetracycline-regulated minimal CMV promoter and the 3' polylinker *Nde*I–*Spe*I–*Bal*I were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from pNI-WPRE and pUHR 10-3, respectively. The fragments were ligated into the pTrip plasmid from which the EF1 $\alpha$  promoter and the eGFP cDNA had been removed by *Mlu*I–*Kpn*I digestion, resulting in pTrip-CMVmin-WPRE. A 400-bp *Not*I–*Eco*RI DNA fragment containing the lentiviral encapsidation sequence  $\psi$  and the 3' cloning linker *Nhe*I–*Sal*I was generated by PCR from this construct. The fragment was used to replace the 900-bp *Not*I–*Eco*RI fragment in pTrip-CMVmin-WPRE, thereby deleting 500 bp upstream from the Flap sequence. The resulting plasmid was called p $\Delta$ 500Trip-CMVmin-WPRE and an *Mlu*I–*Xho*I fragment containing the minimal enhancer-blocking site of the chicken  $\beta$ -globin insulator (Bell *et al.*, 1999) was inserted between the Flap sequence and the minimal CMV promoter. This fragment was generated by annealing the synthetic oligonucleotides 5'-CGCGTGCTATCGATGGCCTGTGCCCCCT-AGCGGGGAGGGACGTAATTACATCCCTGGGG-GCGCTCTAGAACGC-3' and 5'-TCGAGCGTCTAGAGCG-CCCCAGGGATGTAATTACGTCCCTCCCCGCTAGGGGCAGCAGGCATCGATAGCA-3', which were bought from Qbiogene (Evry, France). *Nde*I–*Bam*HI DNA fragments carrying luciferase and human tyrosine hydroxylase 1 cDNAs were inserted into the resulting plasmid p $\Delta$ 500Trip-Ins-CMVmin-WPRE.

rtTA2-M2 cDNA was recovered from pUHRT62-1 by *Eco*RI–*Bam*HI digestion and inserted into p $\Delta$ 500Trip-CMVmin-WPRE from which the central Flap sequence and the minimal CMV promoter had been removed by *Eco*RI–*Bam*HI digestion. The WPRE sequence in the resulting plasmid p $\Delta$ 500rtTA2-M2-WPRE was replaced by a *Bam*HI–*Kpn*I fragment containing the poly(A) sequences of the bovine growth hormone gene and an *Nhe*I site at the 3' terminus. The poly(A) sequence was amplified by PCR from the pcDNA 3 vector (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). An *Sal*I–*Eco*RI fragment containing the phosphoglycerate kinase (PGK) promoter was amplified by PCR and inserted into the *Sal*I–*Eco*RI site upstream from rtTA2-M2, yielding the plasmid p $\Delta$ 500-PGK-rtTA2-M2-BGHpolyA.

The rtTA2-M2 expression cassette was recovered from p $\Delta$ 500-PGK-rtTA2-M2-BGHpolyA by *Sal*I–*Nhe*I digestion and inserted between the *Sal*I and *Nhe*I sites of p $\Delta$ 500Trip-Ins-CMVmin-Transgene-WPRE, which contained either luciferase or human tyrosine hydroxylase 1 as the transgene. In the resulting plasmid the central Flap sequence between the *Sal*I and *Mlu*I sites was replaced by an *Sal*I–*Mlu*I fragment containing a 300-bp stuffer DNA and the central Flap sequence amplified from pTrip-EF1 $\alpha$ -eGFP by PCR. All plasmid constructs were verified by sequencing with an ABI-PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Courtabeuf, France).

### Production and quantification of vector stocks

Vector particles were produced by transient cotransfection of 293T cells by the vector plasmid, an encapsidation plasmid (p 8.7), and a vesicular stomatitis virus (VSV) expression plasmid (pHCMV-G) as previously described (Zennou *et al.*, 2001).

To quantify the vector stocks the amount of p24 capsid protein was determined by a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) core profile enzyme-linked immunosorbent assay (Beckman Coulter, Roissy, France) as described by the manufacturer. Transducing units (TU) were quantified by an 8-hr incubation of serial dilutions of the vector stocks with HeLa cells in the presence of DEAE-dextran (10  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). To induce transgene expression, cells were incubated for 72 hr with culture medium containing doxycycline (600 ng/ml) and then analyzed by immunocytochemical staining and counting of immunopositive cell colonies. Vector preparations containing  $5.6 \times 10^8$  and  $2.8 \times 10^8$  TU were obtained from  $2 \times 10^8$  transiently transfected 293T cells when the vector construct carried luciferase and tyrosine hydroxylase as the transgene, respectively. A TU-to-p24 ratio of  $6 \times 10^4$  TU/ng of p24 and  $8 \times 10^4$  TU/ng of p24 was determined in the preparations of vectors expressing luciferase and tyrosine hydroxylase, respectively.

#### Characterization of the vectors in vitro

Astroglia-rich primary cultures containing 70–80% astrocytes (Stieg *et al.*, 1980) were prepared from the brains of neonatal Sprague-Dawley rats as described (Hamprecht and Löffler, 1985). In each well of a 12-well dish, 500,000 viable cells were seeded in 1.5 ml of culture medium (90% DMEM, 10% fetal calf serum, penicillin G [20 units/ml], and streptomycin sulfate [20  $\mu\text{g/ml}$ ]) and cultivated at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air in a cell incubator. The medium was renewed after 7 days. After 14 days, when the cultures had reached their final cell density, the medium was again renewed and lentivirus preparations were added. After overnight incubation the medium was replaced by fresh culture medium and doxycycline was added at various concentrations (Sigma-Aldrich). The culture medium was renewed 3, 5, 7, 9, and 12 days after the first application of doxycycline and fresh doxycycline was administered each time. Luciferase activity in the cultured cells was assayed with the luciferase assay system (Promega, Lyon, France). Tyrosine hydroxylase activity was determined by monitoring the release of <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O from [3,5-<sup>3</sup>H]tyrosine (Amersham Biosciences, Orsay, France) as described (Reinhard *et al.*, 1986). Protein was quantified according to the method of Bradford (1976) with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), using bovine serum albumin as standard.

For immunocytochemical analysis cells were cultivated on glass coverslips. The culture medium was removed and cells were washed twice with PBS and fixed by a 10-min incubation at 37°C in 4% paraformaldehyde in PBS. For immunocytochemistry antisera raised against luciferase (Europa Bioproducts, Cambridge, UK) and tyrosine hydroxylase (Institut J. Boy, Strasbourg, France) were used and the peroxidase Vectastain ABC kit (AbCys, Paris, France) was used for detection.

#### Stereotaxic injections

Young adult female Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest St. Isle, France) were anesthetized with a dose of 1 ml/kg body weight of a 1:1 mixture of ketamine (Virbac, Carros, France) and Rompun (Bayer, Puteaux, France). The virus suspension was injected with a 10- $\mu\text{l}$  Hamilton syringe into the

striatum at the following stereotaxic coordinates: (1) +1.8 anterior to bregma (AB), +2.5 lateral to midline (LM), 5 and 4.6 ventral to the dural surface (V); (2) +0.6 AB, +3.2 LM, 5 and 4.6 V; (3) +0.6 AB, +2 LM, 5 and 4.6 V. Five weeks before the administration of the vector carrying tyrosine hydroxylase as the transgene, 6.5  $\mu\text{g}$  of 6-hydroxydopamine (6-OHDA; Sigma-Aldrich) was intrastrially injected at each of the following stereotaxic coordinates: +1.2 AB, +2.5 LM, 5, 4.6, and 4.2 V. Two days before the injection of vector the degeneration of dopaminergic terminals in the striatum was verified by monitoring apomorphine-induced rotational behavior of the animals as described (Horellou *et al.*, 1990).

#### Qualitative and quantitative histological analyses

Ten days after administration of doxycycline in drinking water the animals were killed by decapitation. For immunohistochemistry the brains were removed and immediately frozen in -80°C isopentane. Cryostat sections (16  $\mu\text{m}$  thick) of the frozen brains were fixed by an overnight incubation at 4°C in a solution of 4% paraformaldehyde in PBS. The sections were used for immunohistochemistry with antisera raised against luciferase (Europa Bioproducts) and tyrosine hydroxylase (Institut J. Boy), and the peroxidase Vectastain ABC kit (AbCys) for detection.

To quantify luciferase activity, forebrain tissue containing the striatum was removed by microdissection. The tissue was homogenized in 1.5-ml microcentrifuge tubes (Eppendorf, Le Pecq, France) with 2  $\mu\text{l}$  of cell culture lysis reagent of the luciferase assay system (Promega) per milligram wet tissue and a motor-driven micropestle. The homogenate was centrifuged at 4°C and 12,000  $\times g$  for 5 min. The supernatant was stored on ice. The pellet was homogenized four more times with 300  $\mu\text{l}$  of lysis reagent and centrifuged as described above. The five supernatants were combined, and the total activity of luciferase was determined with the luciferase assay system (Promega).

## RESULTS

#### Construction of the vector

Two expression cassettes were inserted into the backbone of the vector (Fig. 1). The first cassette that was used to express the transgene under the control of the Tet-dependent minimal CMV promoter contained a WPRE sequence (Zufferey *et al.*, 1999), to enhance transgene production, and employed the poly(A) sequence of the vector in the 3' long terminal repeat (LTR). The second cassette, which served to express the Tet-dependent transactivator rtTA2-M2 under the control of the phosphoglyceratekinase promoter, was oriented in the antisense direction with respect to the vector RNA. A monodirectional poly(A) sequence derived from the bovine growth hormone gene was inserted into the second cassette for polyadenylation of the rtTA2-M2 transcript without disturbing transcription of the vector genome during production of the vector. To suppress transactivatory effects between the promoters of the two cassettes the two promoter sequences were separated by the insertion of (1) the minimal enhancer-blocking site of the chicken  $\beta$ -globin insulator (Bell *et al.*, 1999), (2) the central Flap sequence, and (3) a 300-bp stuffer sequence. The central Flap sequence and the stuffer were both derived from HIV-1. The central Flap sequence



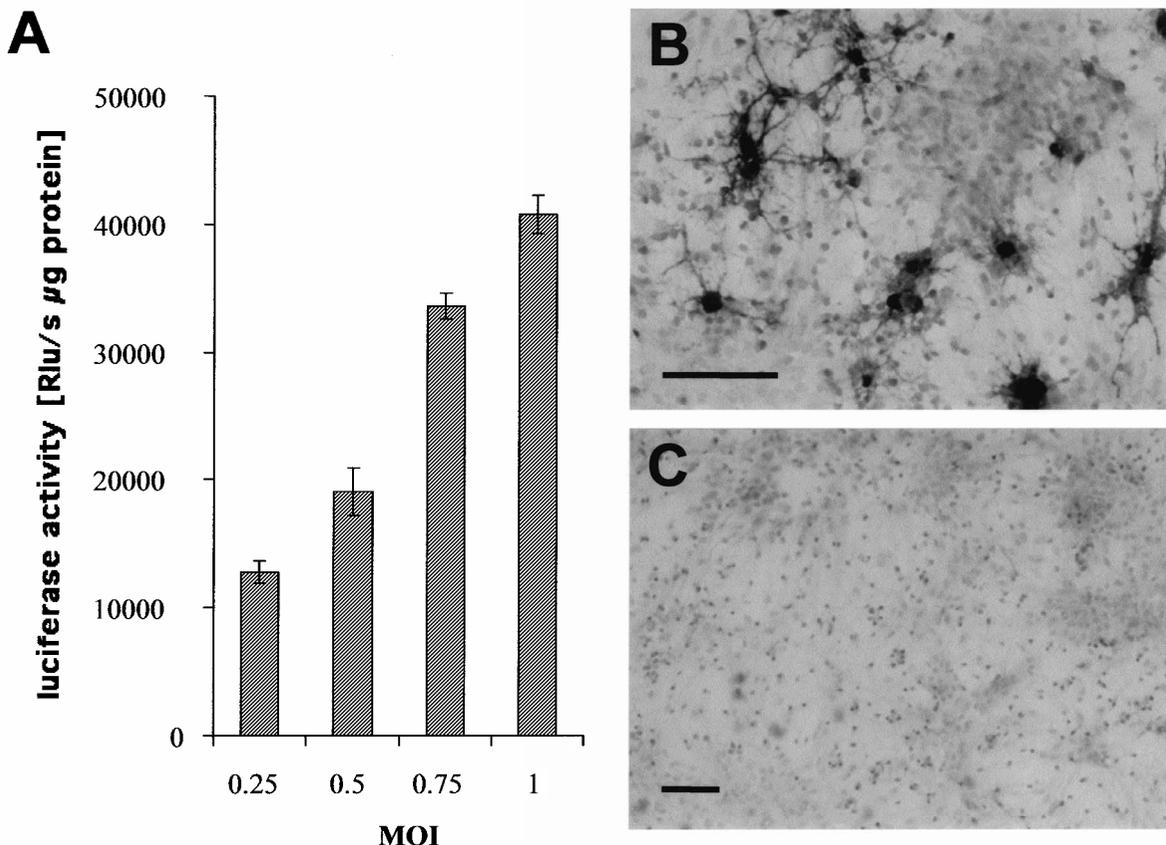
**FIG. 1.** Schematic diagram of the lentivirus vector developed to deliver regulated expression of therapeutic genes. LTR,  $\psi$ , Stuffer, and Flap (the long terminal repeats, the packaging sequence, a 300-bp Stuffer DNA, and the central Flap element, respectively) are sequences derived from HIV-1.  $P_{CMV\ min}$  and  $P_{PGK}$  are the Tet-regulated minimal CMV promoter and the phosphoglycerate kinase promoter, respectively; poly A<sub>(BGH)</sub> is a monodirectional poly(A) site derived from the bovine growth hormone gene, INS is a minimal insulator sequence derived from the chicken  $\beta$ -globin insulator, and WPRE is the Woodchuck Hepatitis Virus Responsive Element. rtTA2-M2 is cDNA encoding the Tet-dependent transactivator rtTA2-M2. Arrows indicate the direction of transcription and the orientation of the poly(A) sequence.

was also employed to improve the transduction of neural cell as previously described (Zennou *et al.*, 2001). The U3 promoter region was deleted from the 3' LTR to obtain a self-inactivating vector as described (Zufferey *et al.*, 1998).

#### Characterization of the vector in astroglia-rich primary cultures

Astroglia-rich primary cultures derived from the brains of newborn rats were transduced with the vector construct carry-

ing luciferase as the transgene. In the presence of doxycycline (600 ng/ml) robust expression of the transgene was obtained, which was monitored by the determination of luciferase activity in lysates from doxycycline-treated, transduced cells. The activity of luciferase correlated with the amount of vector applied for transduction (Fig. 2A). The production of luciferase enzyme in response to doxycycline was also demonstrated immunocytochemically (Fig. 2B). About 2% of the primary cells were immunopositive when cells were transduced with vector corresponding to a multiplicity of infection (MOI) of 1. The



**FIG. 2.** Transduction of astroglia-rich primary cultures with the vector construct carrying luciferase as the transgene. (A) Cells ( $6 \times 10^5$ ) corresponding to  $150 \mu$ g of protein were incubated overnight with various quantities of vector expressed as transducing units (TU) per cell (multiplicity of infection, MOI), and cultivated in the presence of doxycycline (600 ng/ml) for 7 days. Values represent means of specific luciferase activities  $\pm$  SE;  $n = 3$ . (B and C) Production of luciferase in transduced astroglia-rich primary cultures as determined by immunocytochemistry. Cells ( $3 \times 10^5$ ) were incubated overnight with vector (MOI of 1), and cultivated in the presence (B) and in the absence (C) of doxycycline (600 ng/ml) for 7 days. Scale bars:  $100 \mu$ m.

transduced cells clearly revealed astrocytic morphology. No luciferase immunoreactivity was observed when transduced cells were incubated in the absence of doxycycline (Fig. 2C). The effect of the inducer was evident 2 days after the addition of doxycycline (Fig. 3A and B). After 5 days the activity of luciferase reached a plateau, which was stable until the end of the observation period of 14 days (Fig. 3A). This profile was independent of whether doxycycline was added to the culture medium immediately (day 0) or 1 week (day 7) after the administration of vector (Fig. 3B). The withdrawal of doxycycline after 1 week was followed by a decrease in luciferase activity to the background level within 5–7 days (Fig. 3B). We determined the minimal dose of doxycycline required to induce expression of the transgene *in vitro* (Fig. 3C). A concentration of 600 ng/ml was required to fully induce luciferase activity. In the absence of doxycycline enzymatic activity of luciferase was detectable and was 1% of the activity in the fully induced state. No enzymatic activity of luciferase was detected in lysates from cells that had not been transduced by administration of the vector (data not shown).

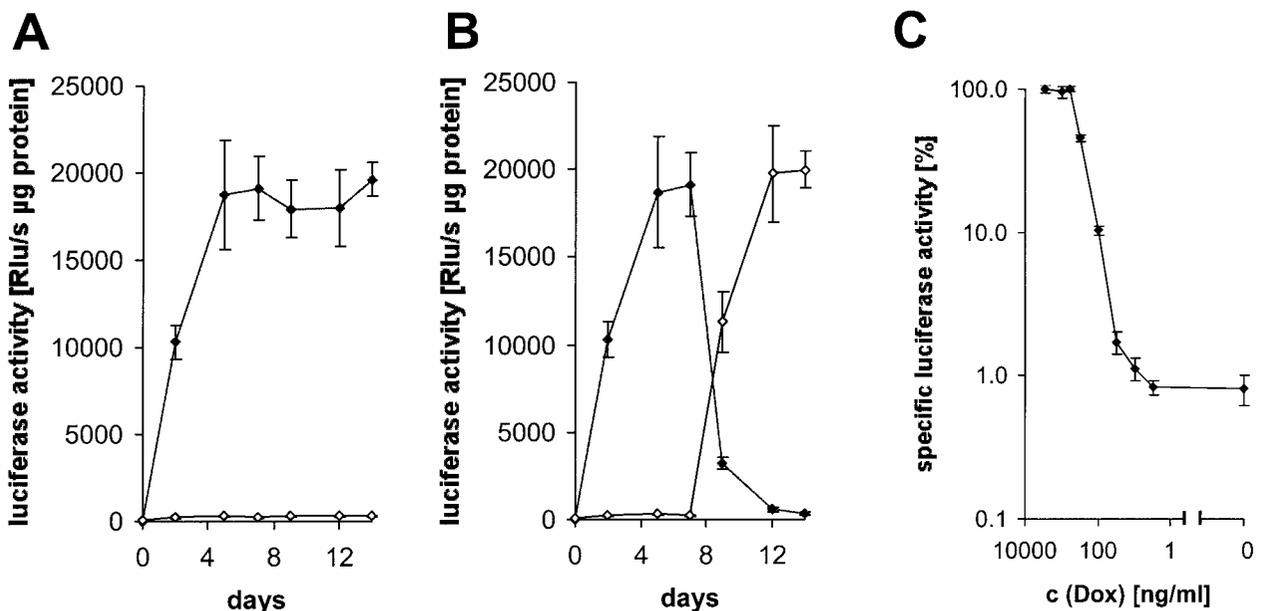
#### Characterization of the vector in vivo

The vector construct carrying luciferase cDNA was injected into the striata of rats (Fig. 4). Two days after surgery the animals were treated for 10 days with doxycycline (0, 0.02, or 3 mg/ml) in the drinking water. The animals were then killed and the brains removed for enzymatic and immunohistochemical analysis. In striatal extracts from animals that had received doxy-

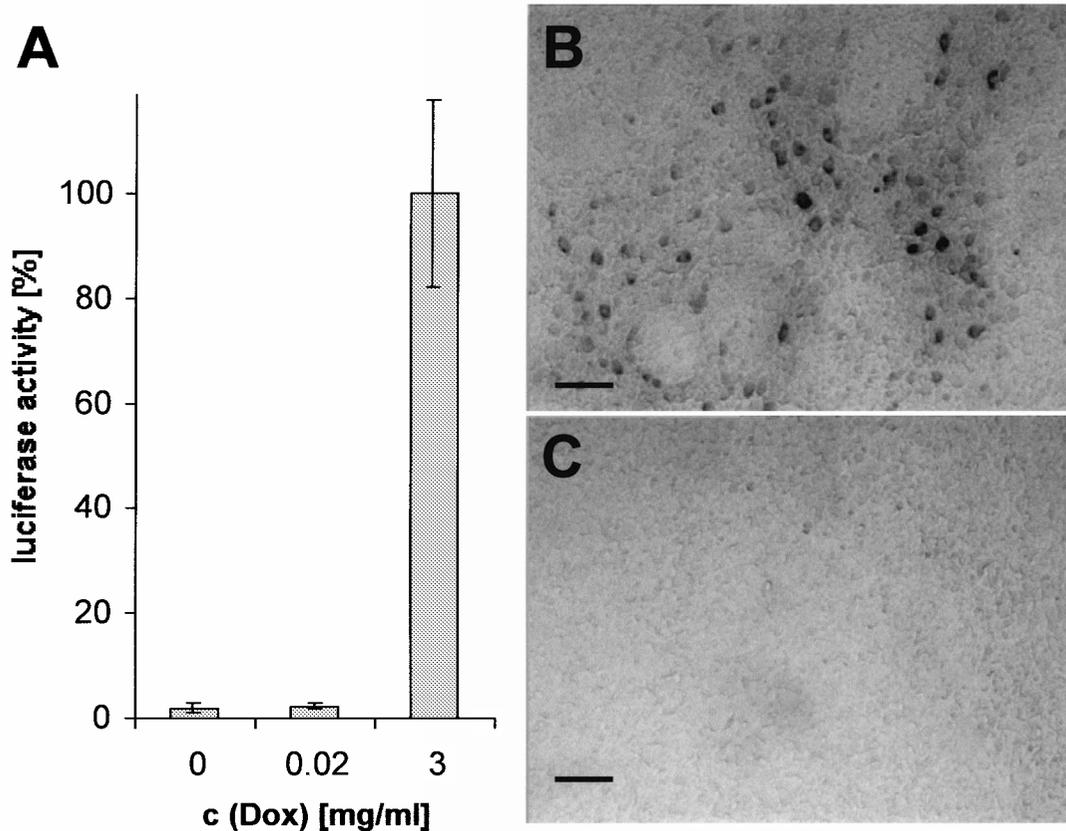
cycline at 3 mg/ml the total enzymatic activity of luciferase was  $(2.1 \pm 0.4) \times 10^7$  RLU/sec ( $n = 3$ ). In extracts from animals that had received either no doxycycline or doxycycline at 0.02 mg/ml, enzymatic activity of luciferase was 2% of that in extracts from animals treated with doxycycline at 3 mg/ml (Fig. 4A). Expression of the transgene was also detected immunohistochemically in striatal sections from animals treated with doxycycline at 3 mg/ml (Fig. 4B). No luciferase immunoreactivity was observed when series of 150 striatal sections were examined covering the injected areas of the striata of animals that had not been treated with doxycycline. A representative area of a representative section is displayed (Fig. 4C).

#### Regulated expression of tyrosine hydroxylase in vitro and in vivo

Restoration of dopamine production is a promising approach for gene therapy of Parkinson's disease (Azzouz *et al.*, 2002; Muramatsu *et al.*, 2002). Regulated delivery of dopamine by regulated expression of tyrosine hydroxylase may allow to avoid the side effects of unregulated dopamine production, such as dyskinesia (Ma *et al.*, 2002). Thus, a vector carrying human tyrosine hydroxylase 1 cDNA as the transgene was generated and tested in astroglia-rich primary cultures. Primary cells ( $4 \times 10^5$ ) were incubated overnight with various quantities of the vector and cultivated in the presence and in the absence of doxycycline (600 ng/ml) for 7 days. Similar to the transductions with the vector carrying luciferase as the transgene, the activity of tyrosine hydroxylase in lysates from cells



**FIG. 3.** Effect of doxycycline on the activity of luciferase in astroglia-rich primary cultures transduced with the vector construct carrying luciferase as the transgene. Cells ( $6 \times 10^5$ ) were incubated overnight with vector (MOI of 0.5) and used to study the regulation of transgene expression by the administration of doxycycline. (A) Luciferase activity in transduced primary cells cultivated up to 14 days in the presence (solid diamonds) and in the absence (open diamonds) of doxycycline (600 ng/ml). (B) Luciferase activity in transduced primary cells cultivated for 7 days in the presence of doxycycline (600 ng/ml) and for 7 days in the absence of doxycycline. Solid diamonds represent cells cultivated in the presence of doxycycline to day 7, open diamonds represent cells that were cultivated in the presence of doxycycline from day 7 to day 14 after transduction. (C) Luciferase activity in transduced primary cells cultivated for 7 days in the presence of various concentrations of doxycycline. Activity in the presence of doxycycline (3000 ng/ml) was defined as 100%, values represent means  $\pm$  SE,  $n = 3$ .



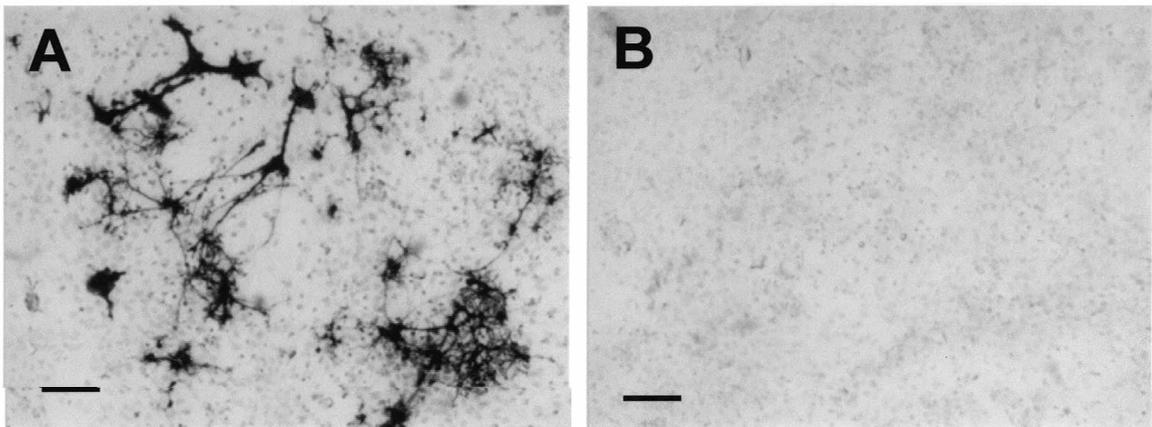
**FIG. 4.** Intra-striatal injection of the vector construct carrying luciferase as the transgene. Vector ( $1.4 \times 10^6$  TU) was injected into each of six sites in the striata of rats (see Materials and Methods). **(A)** Total luciferase activity in striatal extracts from rats that received doxycycline at 0, 0.02, or 3 mg/ml in their drinking water for 10 days. Drinking water containing doxycycline was renewed every day; daily consumption was  $20 \pm 5$  ml/rat. The mean activity ( $2.1 \times 10^7$  RLU/sec) in extracts from animals that received doxycycline (3 mg/ml) in drinking water was defined as 100%; values represent means  $\pm$  SE,  $n = 3$ . **(B)** Immunohistochemical demonstration of luciferase in the striatum of an animal that received doxycycline at 3 mg/ml in its drinking water for 10 days. **(C)** Immunohistochemistry using anti-luciferase antiserum, and striatal sections from an animal that was not treated with doxycycline. A representative area of a representative section is displayed (negative control). Scale bars: 50  $\mu$ m.

cultivated in the presence of doxycycline correlated with the amount of vector applied (data not shown). In lysates of cells that had been transduced with vector corresponding to an MOI of 1 and that had been cultivated in the presence of doxycycline, a tyrosine hydroxylase activity of  $24,800 \pm 1700$  pmol/hr  $\cdot$  mg protein was determined 7 days after transduction ( $n = 3$ ). No activity of tyrosine hydroxylase was detectable in lysates of transduced cells cultivated in the absence of doxycycline, because of the limited sensitivity of the assay for tyrosine hydroxylase activity. Robust expression of tyrosine hydroxylase was also detected immunocytochemically when doxycycline (600 ng/ml) was present in the culture medium (Fig. 5A). About 3% of the primary cells were immunopositive when cells were transduced with vector corresponding to an MOI of 0.5. Again, the transduced cells clearly revealed astrocytic morphology. No tyrosine hydroxylase immunoreactivity was observed when cells were cultivated in the absence of doxycycline (Fig. 5B). The vector was injected into the left striata of rats from which endogenous tyrosine hydroxylase had been removed by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion. Cells expressing the transgene were detected immunohistochemically in animals treated

with doxycycline at 3 mg/ml (Fig. 6A). Series of 100 sections covering the injected areas from the striata of animals that had not received doxycycline were prepared, and screened by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. Neither tyrosine hydroxylase-producing cells nor tyrosine hydroxylase immunoreactivity enhanced over the strongly decreased endogenous level of the 6-OHDA-lesioned striatum could be observed. A representative area of a representative section is displayed (Fig. 6B). In the contralateral (right) striatum into which neither 6-OHDA nor vector was injected tyrosine hydroxylase immunohistochemistry resulted in neuropil staining, indicating intact dopaminergic terminals in the right hemisphere (Fig. 6C).

## DISCUSSION

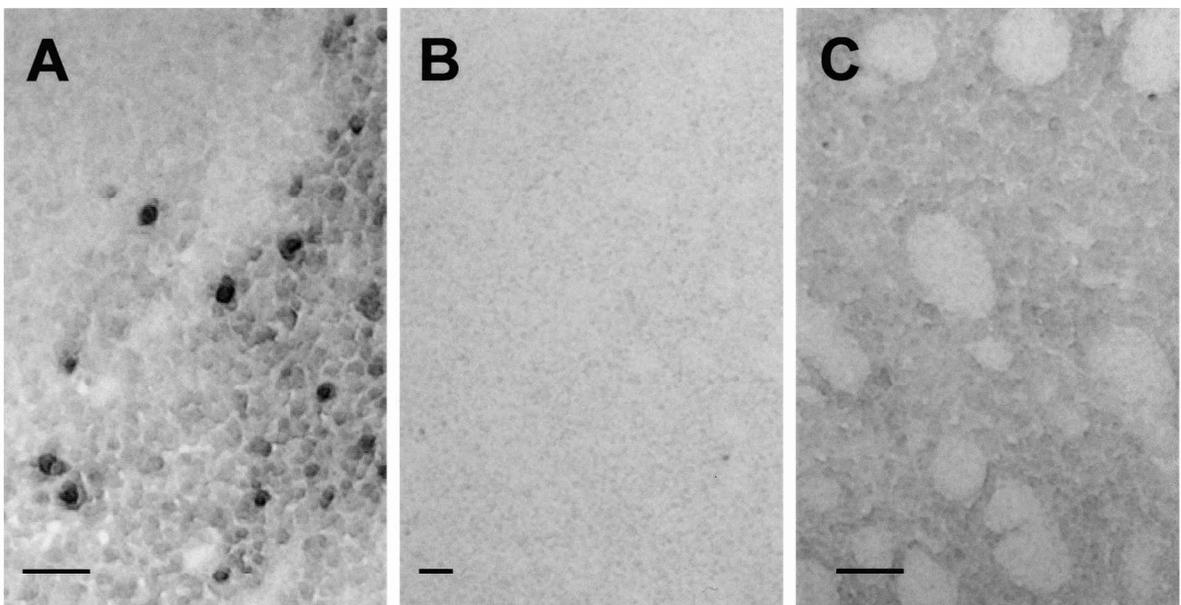
The aim of the study was to develop a lentivirus vector that permits doxycycline-controlled expression of therapeutic transgenes in the brain. A single vector was used to deliver the expression cassettes for both the transgene and the transactivator in order to avoid populations of singly transduced cells and to



**FIG. 5.** Immunocytochemistry revealing doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in astroglia-rich primary cultures after gene delivery by vector carrying human tyrosine hydroxylase 1 as the transgene. Cells ( $3 \times 10^5$ ) were incubated overnight with vector (MOI of 0.5), and cultivated in the presence (A) and in the absence (B) of doxycycline (600 ng/ml) for 7 days. Scale bars: 100  $\mu$ m.

reduce the amount of virus that has to be applied for efficient transduction. Single lentiviral vectors that allow doxycycline-controlled expression of transgenes have already been described (Kafri *et al.*, 2000; Vigna *et al.*, 2002). These vectors employ overlapping expression cassettes, that is, the cassette required to drive production of the genome of the vector from the precursor plasmid, and the cassettes used to express the transacti-

vator and the transgene, share the poly(A) sequence in the 3' LTR of the vector. These systems have been successfully used to deliver regulated expression of small transgenes, such as GFP (800 bp); however, their performance in transferring larger transgenes, such as luciferase and tyrosine hydroxylase (1800 bp), has never been reported. One of these single-vector constructs (Vigna *et al.*, 2002) utilizes the deleted U3 promoter re-



**FIG. 6.** Intra-striatal injection of vector construct carrying tyrosine hydroxylase as the transgene. Vector ( $9 \times 10^5$  TU) was injected into each of six sites in the left striata of rats (see Materials and Methods) from which endogenous tyrosine hydroxylase had been eliminated by 6-OHDA treatment. (A) Immunohistochemical demonstration of tyrosine hydroxylase in cells of the left striatum of an animal that received doxycycline (3 mg/ml) in its drinking water for 10 days. (B) Immunohistochemistry using anti-tyrosine hydroxylase antiserum, and sections of the left striatum from an animal not treated with doxycycline. A representative area of a representative section is shown (negative control). (C) Immunohistochemical demonstration of dopaminergic terminals, using anti-tyrosine hydroxylase antiserum, and a representative section of the right striatum into which neither 6-OHDA nor vector was injected. Scale bars: 50  $\mu$ m.

gion in the 3' LTR to deliver the Tet-dependent promoter required to express the transgene. Thereby, the self-inactivating system established by the deletion of the U3 promoter in the 3' LTR (Zufferey *et al.*, 1998) is compromised, and the safety of that construct is reduced. To avoid safety problems and to prevent potential difficulties caused by the size of the therapeutic gene we inserted two distinct expression cassettes into the backbone of the vector by exploiting the monodirectional poly(A) sequence from the bovine growth hormone gene.

To characterize doxycycline-regulated transgene expression from our vector, we studied a construct carrying luciferase as the transgene. A very sensitive assay of luciferase enzyme activity allowed determination of the background expression of the transgene caused by leakage transcription from the minimal CMV promoter in the absence of doxycycline. This background expression led to detectable enzymatic activity that was 1 and 2% of the activity in the induced state *in vitro* and *in vivo*, respectively. Background activity of 1% in the off-state has also been reported when doxycycline-regulated expression of luciferase was delivered by two lentivirus vectors (Vigna *et al.*, 2002). This suggests that the background activation of the minimal CMV promoter is due to transactivatory effects of the chromosomal environment into which the vector genome is integrated, rather than to transactivation by enhancer elements in the phosphoglycerate kinase promoter used to express the transactivator. Thus, the stuffer sequence, the Flap sequence, and the minimal enhancer-blocking site of the chicken  $\beta$ -globin insulator (Bell *et al.*, 1999) were sufficient to largely suppress transactivatory effects between the promoters of the two expression cassettes in our vector.

Full and reversible induction of luciferase was obtained *in vitro* by the addition and withdrawal of doxycycline (600 ng/ml). This is consistent with the characteristics of rtTA2-M2 (Urlinger *et al.*, 2000). Luciferase activity was induced *in vivo* when doxycycline (3 mg/ml) was added to the drinking water of the rats after the injection of virus. This relatively high concentration was chosen, because doxycycline at 0.2 mg/ml was required to regulate transgene expression in the brains of living rats by the Tet-off system (Kafri *et al.*, 2000) that is regulated *in vitro* by doxycycline at 0.1 ng/ml (Corti *et al.*, 1999). The rats used in our study weighed about 300 g and each consumed about 20 ml of drinking water daily. Thus, 3 mg/ml in the drinking water is equivalent to a daily dose of 200 mg/kg body weight or a daily uptake of 14 g of doxycycline by a 70-kg person. The LD<sub>50</sub> value for rats, determined by a single intraperitoneal administration of doxycycline, is 262 mg/kg body weight (Goldenthal, 1971). Severe intoxications have been reported in humans after daily intravenous applications of 3.5–6 g of tetracycline (Schultz *et al.*, 1963). Antibacterial therapy with doxycycline involves a dose of 100 mg of doxycycline for a 70 kg patient. If the regulatory system is to be able to fulfill clinical requirements at this dose, transgene expression must be induced in rats by a 0.02 mg/ml concentration of doxycycline in drinking water. The application of doxycycline at 0.02 mg/ml in drinking water failed to induce the expression of luciferase *in vivo*. Thus, doxycycline-regulated gene expression based on rtTA2-M2 is unsatisfactory for treating diseases of the central nervous system in humans. For clinical application the transactivator rtTA2-M2 needs to be improved and more suitable inducer molecules must be developed. However, the lentivirus

vector we developed, containing the most recent version of the Tet-dependent regulatory system, could be useful for gene therapy studies using animal models.

Restoration of dopamine production in the striatum by gene transfer of tyrosine hydroxylase, aromatic acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I is a promising approach to treating Parkinson's disease (Azzouz *et al.*, 2002; Muramatsu *et al.*, 2002). Restoration of dopamine production may even help in very late stages of Parkinson's disease, when dopaminergic input to the striatum has almost completely disappeared because of the degeneration of dopaminergic neurons from the substantia nigra. However, the therapeutic production of dopamine must be regulated to avoid side effects, such as dyskinesia (Ma *et al.*, 2002). Regulated expression of tyrosine hydroxylase allows the synthesis of dopamine to be controlled at the rate-limiting step. Therefore, a lentivirus vector carrying human tyrosine hydroxylase 1 cDNA as the transgene was generated. The construct drove robust and regulatable expression of tyrosine hydroxylase and may thus serve to develop a protocol in animal models for the gene therapy for Parkinson's disease based on the restoration of regulated dopamine production.

In summary, we developed a single, self-inactivating lentivirus vector for doxycycline-regulated expression of transgenes and demonstrated robust and regulatable transgene expression from the construct in the central nervous system. The vector should be useful for many applications in gene therapy research using animal models.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pierre Charneau and Hermann Bujard for providing the plasmid pTrip-EF1 $\alpha$ -eGFP and the plasmids pUHR 10-3 and pUHR T62-1, respectively. Furthermore, we are grateful to the European Community for supporting this work by a Marie Curie fellowship to R.V. We thank la Délégation Générale pour l'Armement (DGA) for financial support of L.A., and we also thank l'Université Paris VI (Pierre et Marie Curie), l'Institut pour la Recherche sur la Moelle Epinière (IRME), and Retina France for support of this work.

## REFERENCES

- AZZOUZ, M., MARTIN-RENDON, E., BARBER, R.D., MITROPHANOUS, K.A., CARTER, E.E., ROHLL, J.B., KINGSMAN, S.M., KINGSMAN, A.J., and MAZARAKIS, N.D. (2002). Multicistronic lentiviral vector-mediated striatal gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and GTP cyclohydrolase I induces sustained transgene expression, dopamine production, and functional improvement in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **22**, 10302–10312.
- BARON, U., GOSSEN, M., and BUJARD, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: Novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2723–2729.
- BELL, A.C., WEST, A.G., and FELSENFELD, G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**, 387–396.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.

- CORTI, O., SABATE, O., HORELLOU, P., COLIN, P., DUMAS, S., BUCHET, D., BUCCARON, M.H., and MALLET, J. (1999). A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nat. Biotechnol.* **17**, 349–354.
- FITZSIMONS, H.L., MCKENZIE, J.M., and DURING, M.J. (2001). Insulators coupled to a minimal bidirectional tet cassette for tight regulation of rAAV-mediated gene transfer in the mammalian brain. *Gene Ther.* **8**, 1675–1681.
- FUSSENEGGER, M. (2001). The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol. Prog.* **17**, 1–51.
- GOLDENTHAL, E.I. (1971). A compilation of LD<sub>50</sub> values in newborn and adult animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **18**, 185–207.
- GOSSEN, M., and BUJARD, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5547–5551.
- HACEIN-BEY-ABINA, S., LE DEIST, F., CARLIER, F., BOUNEAUD, C., HUE, C., DE VILLARTAY, J.-P., THRASHER, A.J., WULF-FRAAT, N., SORENSEN, R., DUPUIS-GIROD, S., FISCHER, A., and CAVAZZANA-CALVO, M. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1185–1193.
- HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., LE DEIST, F., WULF-FRAAT, N., MCINTYRE, E., RADFORD, I., VILLEVAL, J.L., FRASER, C.C., CAVAZZANA-CALVO, M., and FISCHER, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348**, 255–256.
- HAMPRECHT, B., and LÖFFLER, F. (1985). Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol.* **109**, 341–345.
- HORELLOU, P., BRUNDIN, P., KALEN, P., MALLET, J., and BJORKLUND, A. (1990). In vivo release of dopa and dopamine from genetically engineered cells grafted to the denervated rat striatum. *Neuron* **5**, 393–402.
- KAFRI, T., VAN PRAAG, H., GAGE, F.H., and VERMA, I.M. (2000). Lentiviral vectors: Regulated gene expression. *Mol. Ther.* **1**, 516–521.
- MA, Y., FEIGIN, A., DHAWAN, V., FUKUDA, M., SHI, Q., GREENE, P., BREEZE, R., FAHN, S., FREED, C., and EIDELBERG, D. (2002). Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: A PET study. *Ann. Neurol.* **52**, 628–634.
- MURAMATSU, S., FUJIMOTO, K., IKEGUCHI, K., SHIZUMA, N., KAWASAKI, K., ONO, F., SHEN, Y., WANG, L., MIZUKAMI, H., KUME, A., MATSUMURA, M., NAGATSU, I., URANO, F., ICHINOSE, H., NAGATSU, T., TERAOKA, K., NAKANO, I., and OZAWA, K. (2002). Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum. Gene Ther.* **13**, 345–354.
- REINHARD, J.F., SMITH, G.K., and NICHOL, C.A. (1986). A rapid and sensitive assay for tyrosine-3-monoxygenase based upon the release of <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O and adsorption of [<sup>3</sup>H]-tyrosine by charcoal. *Life Sci.* **39**, 2185–2189.
- SCHULTZ, J.C., ADAMSON, J.S., WORKMAN, W.W., and NORMAN, T.D. (1963). Fatal liver disease after intravenous administration of tetracycline in high dosage. *N. Engl. J. Med.* **269**, 999.
- STIEG, P.E., KIMMELBERG, H.K., MAZURKIEWICZ, J.E., and BANKER, G.A. (1980). Distribution of glial fibrillary acidic protein and fibronectin in primary astroglial cultures from rat brain. *Brain Res.* **199**, 493–500.
- URLINGER, S., BARON, U., THELLMANN, M., HASAN, M.T., BUJARD, H., and HILLEN, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7963–7968.
- VIGNA, E., CAVALIERI, S., AILLES, L., GEUNA, M., LOEW, R., BUJARD, H., and NALDINI, L. (2002). Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **5**, 252–261.
- YANCOPOULOS, G.D., DAVIS, S., GALE, N.W., RUDGE, J.S., WIEGAND, S.J., and HOLASH, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242–248.
- ZENNOU, V., SERGUERA, C., SARKIS, C., COLIN, P., PERRET, E., MALLET, J., and CHARNEAU, P. (2001). The HIV-1 DNA Flap stimulates HIV vector mediated cell transduction in the brain. *Nat. Biotechnol.* **19**, 446–450.
- ZHU, Z., ZHENG, T., LEE, C.G., HOMER, R.J., and ELIAS, J.A. (2002). Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: Advances and application in transgenic animal modeling. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **13**, 121–128.
- ZUFFEREY, R., DULL, T., MANDEL, R.J., BUKOVSKY, A., QUIROZ, D., NALDINI, L., and TRONO, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* **72**, 9873–9880.
- ZUFFEREY, R., DONELLO, J.E., TRONO, D., and HOPE, T.J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73**, 2886–2892.

Address reprint requests to:

*Dr. Jacques Mallet*  
*LGN/CNRS-UMR 7091, Bât. CERVI*  
*Hôpital de la Pitié Salpêtrière*  
*83 Boulevard de l'Hôpital*  
*75013 Paris, France*

*E-mail:* [mallet@infobiogen.fr](mailto:mallet@infobiogen.fr)

Received for publication June 5, 2003; accepted after revision December 31, 2003.

Published online: January 20, 2004.

# Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter

Lahouari Amar, Mathieu Desclaux, Nicole Faucon-Biguët, Jacques Mallet\* and Roland Vogel

Laboratoire de la Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des Processus Neurodégénératifs (LGN), CNRS-UMR 7091, Bâtiment CERVI, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Received September 21, 2005; Revised November 21, 2005; Accepted February 21, 2006

## ABSTRACT

**RNA interference (RNAi) mediated by expression of short hairpin RNAs (shRNAs) is a powerful tool for efficiently suppressing target genes. The approach allows studies of the function of individual genes and may also be applied to human therapy. However, in many instances regulation of RNAi by administration of a small inducer molecule will be required. To date, the development of appropriate regulatory systems has been hampered by the few possibilities for modification within RNA polymerase III promoters capable of driving efficient expression of shRNAs. We have developed an inducible minimal RNA polymerase III promoter that is activated by a novel recombinant transactivator in the presence of doxycycline (Dox). The recombinant transactivator and the engineered promoter together form a system permitting regulation of RNAi by Dox-induced expression of shRNAs. Regulated RNAi was mediated by one single lentiviral vector, blocked the expression of green fluorescent protein (GFP) in a GFP-expressing HEK 293T derived cell line and suppressed endogenous p53 in wild-type HEK 293T, MCF-7 and A549 cells. RNA interference was induced in a dose- and time-dependent manner by administration of Dox, silenced the expression of both target genes by 90% and was in particular reversible after withdrawal of Dox.**

## INTRODUCTION

The efficient and specific suppression of genes by RNAi (1) constitutes a valuable new tool to study the physiological role

of individual genes *in vitro* and *in vivo*. The method may also be applied to human therapy whenever genes involved in the respective pathology have to be inhibited. Silencing of gene expression by RNAi may be induced in target cells by expressing short hairpin RNAs (shRNAs) yielding small inhibitory RNAs (siRNAs) after *in situ* cleavage (2). Since long poly A tails strongly interfere with the silencing effect (3), shRNAs are appropriately expressed by RNA polymerase III which recognizes a simple run of T residues as a stop signal and therefore does not require a poly A sequence to terminate transcription. As a consequence, respective RNA polymerase III promoters, such as the H1 promoter (4,5) or the U6 promoter (6–8), are widely used to drive the production of shRNAs. Both the H1 and the U6 promoters are constitutively active, and therefore shRNAs can be expressed in a large variety of cells in order to study the consequences of the stable inhibition of target genes. However, constitutive gene silencing cannot be used in the context of transgenic ‘knock-down’ animals when genes essential for cell survival, cell cycle regulation and cell development are analyzed. Such studies require conditional gene silencing induced by administration or withdrawal of a small inducer molecule. Conditional suppression of genes will also be important for therapeutic applications by permitting termination of treatments at the onset of unwanted side effects.

Conditional RNAi can be obtained by expression of shRNAs from a modified RNA polymerase III promoter allowing external control of its activity. A further requirement for drug-induced transcriptional activity is the expression of a heterologous transcription factor that specifically interferes, in the presence or the absence of the inducer molecule, with the activity of the modified promoter but does not interact with the genome of the host cell. Because of their simple structural organization RNA polymerase III promoters offer only a few possibilities for modification. The U6 promoter (9) is composed of a TATA box, a proximal (PSE) and a distal

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 42 17 75 32; Fax: +33 1 42 17 75 33; Email: mallet@chups.jussieu.fr

sequence element (DSE) that are each located at fixed distances upstream from the transcription initiation site. The space between the individual elements are restricted, thereby limiting approaches based on steric interference with the transcription initiation complex. Modifications may be applied neither to the TATA box nor to the PSE since together they form the essential core unit of the promoter recruiting the transcription initiation complex.

In several studies (10–13) regulatory systems have been proposed that employ RNA polymerase III promoter constructs controlled by reversible steric inhibition of the formation of the transcription initiation complex. However, Lin *et al.* observed severe leakiness when using these systems (14). Another recent attempt has been based on a Krab-Tet repressor fusion protein which allows Dox-controlled inhibition of the expression of shRNAs from a H1 promoter juxtaposed with Tet-operon sequences (15). However, this approach may be limited by secondary effects due to the inhibitory activity of Krab on both RNA polymerase II and RNA polymerase III promoters over long distances (16). A third attempt has been based on the activation of an engineered U6 promoter by the recombinant transcription factor Gal4-Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) that constitutively binds to four Gal-4 binding sites replacing the DSE sequence in the promoter construct (17). The transcription factor Gal4-Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) comprises the DNA binding unit of the transactivator Gal-4 from yeast and an artificial transactivation domain referred to as the Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) domain. This transactivation domain is composed of four copies of the peptide sequence Q<sup>18</sup>III(Q→A) comprising the amino acid residues 143 to 160 of the human transcription factor Oct-2 in which all glutamine residues had been changed to alanine. Regulated expression of the transcription factor Gal4-Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) under the control of the ecdysone dependent regulatory system ultimately allowed regulated production of shRNAs from the engineered U6 promoter (18). However, the usefulness of this indirectly regulated expression of shRNAs is limited since three vectors were necessary to mediate expression of all the components required.

In the present study, we set out to develop a regulatory system that (i) allows efficient regulation of RNAi, (ii) does not cause secondary effects and (iii) can be delivered to target cells by one single lentiviral vector. We based our approach on a heterologous transactivator that conditionally binds in the presence of a small inducer molecule to a minimal U6 promoter thereby activating transcription of shRNAs. We investigated whether the Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) domain can be conditionally and functionally linked to a minimal U6 promoter construct via the conditional DNA binding domain of the transactivator rtTA2-M2 that derives from the *Escherichia coli* Tet-repressor protein and mediates dimerization and Doxycycline (Dox)-induced binding to *tet* operator sequences with high affinity (19). We replaced the three minimal VP 16-derived activation domains in rtTA2-M2 (20) by the Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) domain. For conditional binding to an inducible minimal U6 promoter, the functional recognition sites for Staf and Oct-1 within the DSE of the human U6 promoter (21) were replaced by seven *tet* operator sequences. The modified promoter and the engineered transcription factor were capable of together forming a regulatory system allowing conditional RNAi by Dox-dependent expression of shRNAs.

The regulatory system was delivered to target cells by one single lentiviral vector.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmid constructions

The plasmids pUHR 10-3 and pUHRT 62-1, which contain the components of the Tet regulatory system, were kindly provided by H. Bujard (Zentrum für Molekulare Biologie, Heidelberg, Germany). The plasmid pcDNA-Δ that allows the use of BbsI in subsequent cloning experiments was generated by self-ligation of the vector fragment obtained by PstI digestion of the plasmid pcDNA 3 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The core unit of the human U6 promoter that did not contain the functional binding sites for the transcription factors Staf and Oct-1 (21) was amplified by PCR from genomic DNA of HEK293T cells. The oligonucleotides 5'-CGACGCGTTGCAGAGCTCGTTAGAGAGATAATTA-GAATTAATTTGACTGTAAACACAAAG-3' and 5'-CGG-GATCCAGAAGACCACGGTGTTCGTCCTTTCCACAA-GAT-3' (Eurogentec, Angers, France) were the sense and antisense primers respectively, and the DNA fragment amplified contained both a MluI and a SacI site upstream, and a BbsI and a BamHI site downstream from the truncated U6 promoter. The fragment was inserted between the MluI and BamHI sites of pcDNA-Δ yielding the plasmid pcDNA-ΔU6t. A MluI–SacI fragment containing seven *tet* operator sequences was amplified by PCR from pUHR 10-3 and inserted between the MluI and BamHI sites of pcDNA-ΔU6t to give pcDNA-ΔU6min. The DNA fragment encoding shRNAs designed to silence expression of green fluorescent protein (shGFP) was generated by annealing the oligonucleotides 5'-ACCGAAGCTGACCCTGAAGTTCTTCAAGAGAGAGACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTCTCGAGG-3' and 5'-GATCCCTCGAGAAAAAGCAAGCTGACCCTGAAGTTCTCTCTTGAAGAACTTCAGGGTCAGCTTG-3'. Annealing of the oligonucleotides 5'-ACCGACTCCAGTGGTAA-TCTACTTCAAGAGAGTAGATTACCACTGGAGTCTTT-TTCTCGAGG-3' and 5'-GATCCCTCGAGAAAAAGACT-CCAGTGGTAATCTACTCTCTTGAAGTAGATTACCAC-TGGAGT-3' yielded the DNA fragment encoding shRNAs designed to silence expression of p53 (shp53). Both DNA fragments encoding shRNAs were inserted into pcDNA-ΔU6min linearized by BbsI–BamHI digestion. The resulting plasmids were named pcDNA-ΔU6min-shGFP and pcDNA-ΔU6min-shp53, respectively.

An EcoRI–BamHI fragment encoding the conditional DNA binding domain of rtTA2-M2 (19) was amplified by PCR from pUHRT 62-1 using the oligonucleotides 5'-CGGAATTCAC-CATGTCTAGACTGGACAAGAGCAAAG-3' and 5'-CG-GGATCCTGAAGACTACGGTCCGCCGCTTTCCGACTT-TAGCTGT-3' as the sense and antisense primers, respectively. Upstream from the BamHI site the fragment contained a stop codon and a BbsI site allowing extension with a fragment encoding additional amino acid residues. Insertion of the fragment between the EcoRI–BamHI sites of pcDNA-Δ yielded the plasmid pcDNA-Δ/rtTA2-M2trunc. The DNA fragment coding the peptide sequence Q<sup>18</sup>III(Q→A) was generated by annealing the oligonucleotides 5'-ACCGAACCTGTTCG-CTCTCCCGCTGCAACAGCGGGAGCCCTACTGACAT-

CAGCACCGTAGTCTTCG-3' and 5'-GATCCGAAGACTA-CGGTGCTGATGTTCAGTAGGGCTCCCCGCTGTTGCAGC-GGGGAGAGCGAACAGGTT-3' and was inserted into pcDNA- $\Delta$ /rtTA2-M2trunc linearized by BbsI–BamHI digestion. The resulting plasmid contained again a stop codon and a BbsI site upstream from the BamHI site allowing further rounds of extension with the same fragment. Extension with the fragment encoding Q<sup>18</sup>III(Q→A) was repeated three times yielding the plasmid containing the rtTA2-Oct2 cDNA. The sequence encoding rtTA2-Oct2 was recovered by EcoRI–BamHI digestion and inserted into p $\Delta$ 500rtTA2-M2-WPRE (22) from which rtTA2-M2 had been removed by EcoRI–BamHI digestion. A SalI–EcoRI fragment containing the phosphoglycerate kinase (PGK) promoter was amplified by PCR and inserted between the SalI–EcoRI sites upstream from rtTA2-Oct2 yielding p $\Delta$ 500PGK-rtTA2-Oct2-WPRE.

The cassettes allowing shRNA expression were recovered from pcDNA- $\Delta$ U6min-shGFP and pcDNA- $\Delta$ U6min-shp53 by MluI–SpeI digestion and inserted into the lentivector precursor plasmid pTrip-CMVmin-WPRE (22) from which the element CMVmin had been removed by MluI–SpeI digestion. The WPRE sequence was removed from the resulting plasmids (pTrip-U6min-shGFP-WPRE and pTrip-U6min-shp53-WPRE) by SpeI–KpnI digestion and replaced by the rtTA2-Oct2 expression cassette recovered from p $\Delta$ 500PGK-rtTA2-Oct2-WPRE by NheI–KpnI digestion. The resulting plasmids, pTrip-U6min-shGFP-PGK-rtTA2-Oct2-WPRE and pTrip-U6min-shp53-PGK-rtTA2-Oct2-WPRE, were used for the production of lentivirus vector particles.

The DNA fragment encoding the riboprobe for the detection of the GFP silencing siRNAs was generated by annealing the oligonucleotides 5'-GATCCGCAAGCTGACCCTGAAGTTCTTCAAGAGAGAACG-3' and 5'-AATTCGTTCTCTTGAAGAAGTTCAGGGTCAGCTTGCG-3' and was inserted between the BamHI–EcoRI sites of pcDNA 3. All plasmid constructs were verified by sequencing using a ABI-PRISM 13100 DNA sequencer (Applied Biosystems, Courtabeuf, France).

### Cell culture, lentiviral transductions and selection of transduced cells

The HEK 293T, MCF-7 and A549 cell lines were cultivated at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> / 95% air in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 20 U/ml penicillin G and 20  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate. Lentivirus vector particles were produced by transient cotransfection of HEK 293T cells by the vector plasmid, an encapsidation plasmid (p8.7), and a VSV expression plasmid (pHCMV-G) as described (23). Vector stocks were titered by determination of the amount of the p24 capsid protein using an HIV-1 core profile enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Beckman Coulter, Roissy, France). For transduction HEK 293T GFP cells were incubated overnight with vector in the presence of 10  $\mu$ g/ml DEAE dextran (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Transduced cells were selected after 5 days of cultivation in the presence of 6  $\mu$ g/ml Dox using a FACSVantage SE cell-sorting instrument (Becton Dickinson, Rungis, France). Selected clones were expanded and analyzed by fluorescence microscopy and FACS.

### Northern blot analysis

A <sup>32</sup>P-labeled riboprobe was transcribed from the plasmid encoding the riboprobe using [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham Biosciences, Orsay, France) and the Riboprobe System–T7 (Promega, Charbonnières, France). Small RNAs were isolated from aliquots of 10<sup>7</sup> cells with the *mirVana*<sup>TM</sup> PARIS<sup>TM</sup> Kit (Ambion, Huntingdon, UK). Samples containing 3.3  $\mu$ g of small RNAs were denatured by heating at 95°C for 5 min in the presence of 50% formamide. After electrophoresis on a 15% polyacrylamide gel in the presence of 8 M urea the RNA was stained with ethidium bromide and examined on a transilluminator. The RNA was then transferred by electroblotting to a BrightStar-Plus Nylon membrane (Ambion), fixed by ultraviolet (UV) crosslinking and hybridized to the probe. The resulting <sup>32</sup>P-labeled RNA–RNA hybrids were detected by autoradiography using Hyperfilm<sup>TM</sup> MP (Amersham Biosciences).

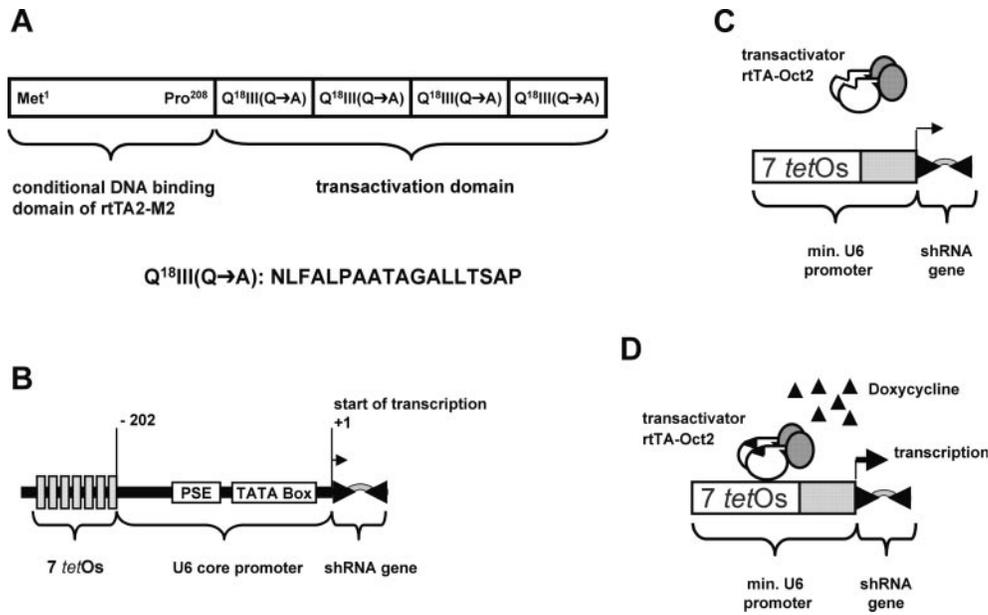
### Western blot analysis

Cell extracts were prepared in lysis buffer [25 mM Tris–HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl] containing a cocktail of protease inhibitors (Roche, Meylan, France). The protein samples (30  $\mu$ g) were separated on SDS–9% polyacrylamide gels and then transferred to Protan nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) in an electroblotting apparatus, using standard procedures (24). Immunodetection was performed as described previously (25), using a monoclonal anti-p53 antibody (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), a monoclonal anti-actin antibody (Chemicon, Hampshire, UK) and an anti-mouse Ig-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Amersham Biosciences).

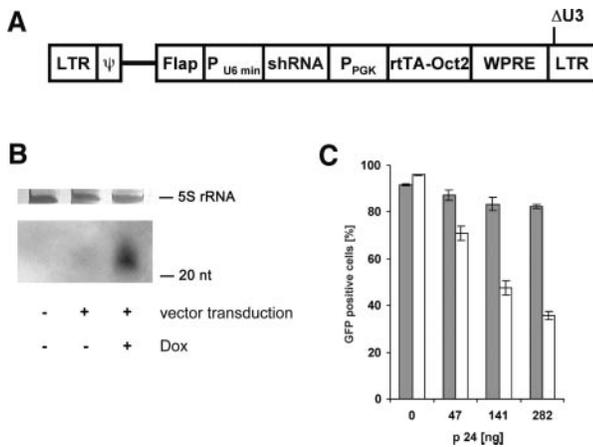
## RESULTS AND DISCUSSION

To achieve regulated RNAi, we engineered a novel Tet-dependent transactivator (Figure 1A) by linking the conditional DNA binding domain of the tetracycline-dependent transactivator rtTA2-M2 (19) to the Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) domain (17) which is capable of specifically activating a minimal U6 promoter (Figure 1A). An inducible minimal U6 promoter was constructed by replacing the functional binding sites (21) for the transcription factors Staf-1 and Oct-1 within the DSE by seven *tet* operator sequences (Figure 1B). In the absence of Dox the recombinant Tet-dependent transactivator will not bind to the minimal U6 promoter (Figure 1C) and as a consequence the shRNA coding sequence will not be transcribed. In contrast, the Tet-dependent transactivator will bind to the minimal U6 promoter in the presence of Dox (Figure 1D), thereby activating the expression of shRNAs.

As a delivery system we designed a single lentivirus vector by inserting two expression cassettes into its backbone (Figure 2A). The first cassette contained the minimal U6 promoter and was used to produce shRNAs. The second cassette was employed to express the engineered transcription factor rtTA2-Oct2 composed of the conditional DNA binding domain of rtTA2-M2 and the Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) activation domain. The transcription factor was constitutively transcribed from the PGK promoter; and the polyA sequence of the vector in the 3' long terminal repeat (LTR) was used for



**Figure 1.** Schematic diagrams illustrating the regulatory system allowing Dox-induced RNAi. (A) Primary structure of the transactivator rtTA-Oct2 composed of the conditional DNA binding domain of rtTA2-M2, and the Oct-2<sup>Q</sup>(Q→A) domain mediating specific induction of a minimal RNA polymerase III promoter (17). (B) Structure of the minimal U6 promoter: The 202 bp sequence upstream from the transcription start site was derived from the human U6 promoter and contains the PSE and the TATA box. Upstream from this sequence, seven *tetOs* have been inserted to allow conditional binding of the transactivator. (C) In the absence of Dox (off state), rtTA-Oct2 does not bind to the operator sequences and hence shRNAs are not synthesized. (D) In the presence of Dox (on state), the transactivator binds and thereby activates the expression of shRNAs designed to induce the degradation of the respective target mRNAs.

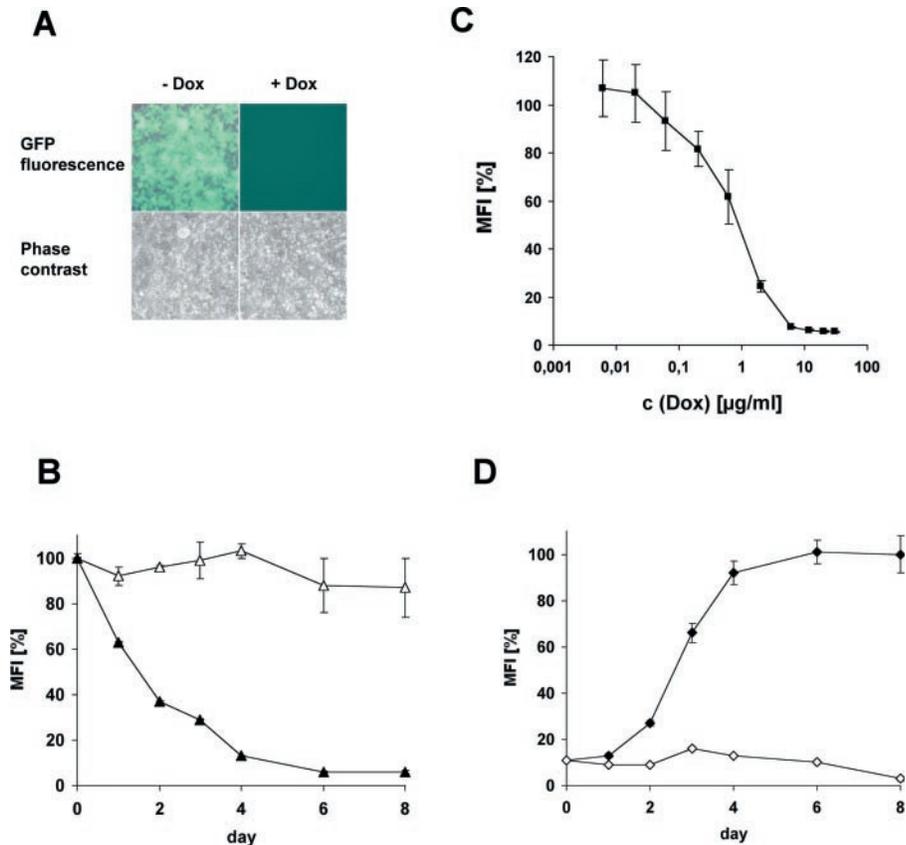


**Figure 2.** A single lentiviral vector mediates Dox-regulated RNAi. (A) Design of the vector: LTR,  $\psi$  and Flap are sequences derived from HIV-1 (the LTRs, the packaging sequence and the central Flap element, respectively). P<sub>U6 min</sub> and P<sub>PGK</sub> are the Tet-regulated minimal U6 promoter and the phosphoglycerate kinase promoter; WPRE is the Woodchuck hepatitis virus responsive element; rtTA-Oct2, the cDNA encoding the transcription factor rtTA-Oct2; and shRNA, the sequence encoding shRNAs. (B and C) Experimental validation of regulated RNAi using a vector that expresses shRNAs designed to silence the expression of GFP. (B) ‘Northern blot’ analysis of Dox-regulated expression of siRNAs from the vector. HEK 293T GFP cells ( $1 \times 10^5$ ) were incubated for 24 h with and without vector corresponding to 141 ng of protein p24, and cultivated in the presence and absence of 6  $\mu\text{g/ml}$  Dox for 7 days. Then, small RNAs were isolated from the cells and probed for siRNAs designed to silence the expression of GFP. 5S-rRNA detected by ethidium bromide staining of the polyacrylamide gel served as an internal control to show equal loading. (C) Experimental validation of RNAi-mediated silencing of GFP. HEK 293T GFP cells ( $8 \times 10^4$ ) were incubated overnight with various quantities of vector expressed as ng of protein p24, and cultivated in the absence (grey bars) and in the presence (white bars) of 6  $\mu\text{g/ml}$  Dox for 5 days prior to FACS analysis. Values are averages of percentages of GFP-positive cells  $\pm$  SE,  $n = 3$ .

polyadenylation. The vector contained a WPRE sequence (26) to enhance the expression of rtTA2-Oct2 and to stabilize the RNA genome of the vector during the production of vector particles in transiently transfected HEK 293T cells. A Flap sequence was also included to improve transduction of non-dividing cells (23). For safety reasons the U3 promoter region was deleted from the 3' LTR so that the vector was self-inactivating (27).

A first vector contained a shRNA encoding sequence which was designed to silence the expression of GFP as described (5). A HEK 293T GFP cell-clone that stably expresses GFP as a transgene was transduced with the vector construct. Cells were cultivated in the presence and absence of Dox (6  $\mu\text{g/ml}$ ) prior to isolating small RNAs from the cultures as well as from controls (non-transduced HEK 293T GFP cells). ‘Northern Blot’ analysis of the RNA samples revealed that siRNAs designed to silence GFP were expressed in transduced cells cultivated in the presence of Dox (Figure 2B). The siRNAs were not detected in non-transduced cells. In transduced cells cultivated without Dox no signal exceeding the detection threshold was observed. ‘Northern Blotting’ did not allow detection of shRNAs probably because of their rapid cleavage into siRNAs by Dicer nuclease.

Subsequently, HEK 293T GFP cells were transduced with various amounts of vector and incubated in the presence and absence of Dox (6  $\mu\text{g/ml}$ ). Incubation with Dox reduced the number of GFP-expressing cells by up to 60% as was determined by FACS analysis (Figure 2C). The decrease in GFP-positive cells correlated with the amount of vector applied. The number of GFP-positive cells among transduced cells incubated in the absence of Dox was 10–15% lower than among non-transduced cells. This difference also correlated with the amount of vector applied and may have been caused



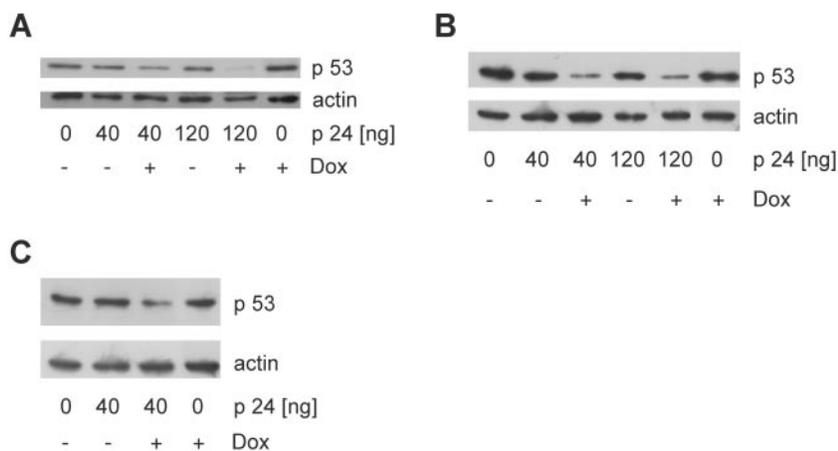
**Figure 3.** Characterization of Dox-regulated RNAi in a representative cell-clone (C9): (A) Microscopic analysis of cells incubated in the presence or in the absence of 6  $\mu\text{g/ml}$  Dox at 72 h after induction. (B) Time course of Dox-induced RNAi: RNAi was induced or not induced at day 0 by administration of 6  $\mu\text{g/ml}$  Dox and mean intensities of GFP fluorescence were measured by FACS analysis at various times after induction. Closed triangles represent intensities of cells incubated with Dox, open triangles give those of untreated cells. The fluorescence intensity observed at day 0 was defined as 100%, values are means  $\pm$  SE,  $n = 3$ . (C) Mean intensities ( $\pm$  SE,  $n = 3$ ) of GFP fluorescence obtained by FACS analysis of cells cultivated for 5 days in the presence of various concentrations of Dox. The fluorescence intensity in untreated cells was defined as 100%. (D) Reappearance of GFP fluorescence after withdrawal of Dox: prior to the analysis, cells were cultivated for 5 days in the presence of 6  $\mu\text{g/ml}$  Dox. At day 0, Dox was withdrawn or not withdrawn and the mean fluorescence intensity was followed by FACS analysis. Closed rhomboids represent values from cells that were not treated with Dox from day 0, open rhomboids give values from cells incubated with 6  $\mu\text{g/ml}$  Dox throughout the experiment. The fluorescence intensity measured 8 days after removal of Dox was defined as 100%, values are means  $\pm$  SE,  $n = 3$ .

by leakage expression of shRNAs in cells containing multiple copies of the vector genome.

To establish uniform conditions for precise characterization of the regulatory system, cell clones were amplified from individual transduced cells. Several clones were obtained that displayed Dox-regulated expression of GFP (see Supplementary Table). Fluorescence microscopy of a representative clone (C9) demonstrated that GFP was only expressed in the absence of Dox (Figure 3A). We then used FACS analysis to study the effect of Dox on the expression of GFP. The addition of Dox to the cells was followed by a significant decrease in GFP fluorescence within 24 h; after 5–6 days the reduction of GFP fluorescence was 90% (Figure 3B). In the absence of Dox there was no change in GFP fluorescence during the incubation. To determine the minimal concentration of Dox required to induce RNAi, cells of the clone C9 were incubated with various concentrations of Dox (Figure 3C). A concentration of 6  $\mu\text{g/ml}$  was required to induce a 90% suppression of GFP within 5 days. Lower concentrations of Dox were either ineffective or caused incomplete or delayed RNAi. To test inducible RNAi for reversibility, cells of the clone C9 were cultivated for 5 days in the presence of Dox. Then Dox was removed, and the expression of GFP was followed. GFP

fluorescence had increased significantly 48 h after the removal of Dox (Figure 3D); however, incubation without Dox for 5–6 days was required to restore maximal expression of GFP. No increase in GFP fluorescence was detected in cells incubated with Dox throughout the experiment.

The next step was to investigate whether the regulation system can be employed for the silencing of other target genes. As a target we chose the p53 gene because of detectable expression in mammalian cells, availability of reliable antibodies to monitor levels of the protein, and the existence of an efficient shRNA (2). Moreover, in a recent study genetic deletion of p53 suppressed neurodegeneration in animal models of Huntington's disease (28). Thus, local and regulated down-regulation of p53 may potentially constitute a novel gene therapy approach for the treatment of Huntington disease patients. We constructed a second vector, which contained a shRNA encoding sequence designed to silence expression of human p53 as described (2). HEK 293T cells, MCF-7 cells and A549 cells were transduced with various amounts of vector and incubated in the presence and absence of Dox (6  $\mu\text{g/ml}$ ) for 5–7 days before protein was extracted from the cultures as well as from non-transduced controls. 'Western blot' analysis of protein samples containing identical amounts of protein



**Figure 4.** 'Western blot' analysis demonstrating silencing of p53 by Dox-regulated RNAi in (A) HEK 293T cells, (B) MCF-7 cells and (C) A549 cells. Cells ( $1 \times 10^5$ ) were incubated overnight with indicated quantities of vector, expressed as ng of protein p24, and then cultivated in the absence and in the presence of 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Dox. After a 5 day (MCF-7 and A549 cells) and a 7 day cultivation (HEK 293T cells), protein was extracted from the cells and analyzed by immunoblotting. Both p53 and actin were detected; the latter served as a control to demonstrate equal loading.

revealed that p53 levels were efficiently reduced when transduced cells were incubated in the presence of Dox (Figure 4). An up to 90% inhibition of the expression of p53 was observed in Dox treated cultures of transduced cells as assessed by densitometric analysis of the Blot data. No down-regulation of p53, or at best some minimal silencing because of leakage expression of shRNAs, was obtained when transduced cells were cultivated in the absence of Dox. The expression of p53 was not reduced when non-transduced cells were incubated in the presence of Dox (6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Considered together, our findings indicate that the engineered minimal U6 promoter was conditionally reactivated by Dox-controlled binding of rtTA2-Oct2 containing the Oct-2<sup>Q(Q→A)</sup> domain for transactivation. The minimal U6 promoter and the recombinant transcription factor together formed a regulatory system allowing conditional RNAi by Dox-controlled production of shRNAs. In particular, the system allowed the expression of the reporter transgene GFP as well as the expression of the endogenous gene p53 to be rendered under external regulation by means of administration of Dox. To fully induce RNAi a Dox concentration of 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was necessary which is more than 10-fold the concentration required to activate a minimal (cytomegalovirus) CMV promoter by the transactivator rtTA2-M2 (19). Indeed, the responsiveness to Dox was similar to that of the Tet-dependent regulatory system which, by using rtTA as a transactivator, requires a Dox concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to induce the expression of transgenes *in vitro* (29). That system was successfully applied in the context of transgenic mice (30). Taken into account that an at least 70% induction of RNAi was already observed in the presence of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Dox (Figure 3C), the regulation system presented here holds promise to be also applicable to animal studies. However, further studies using transgenic mice are required to examine the efficiency of Dox-regulated RNAi *in vivo*.

Nevertheless the finding that 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Dox are necessary to fully induce RNAi in cultured cells is an unexpected result. It may be caused by the Oct-2<sup>Q(Q→A)</sup> transactivation domain which may affect the affinity for Dox by interference with either the accessibility or the structure of the Dox binding site. Secondary intramolecular effects of the transactivation

domain on characteristics of the conditional DNA binding domain can in particular not be ruled out because of the overall hydrophobicity of the Oct-2<sup>Q(Q→A)</sup> domain.

The Oct-2<sup>Q(Q→A)</sup> domain is composed of four copies of the peptide sequence Q<sup>18</sup>III(Q→A) which comprises 18 amino acid residues (17). Fourteen out of the 18 amino acid residues are non-polar and hydrophobic. Four amino acid residues are polar, and charged amino acid side chains are lacking (Figure 1A). Because of these characteristics the Oct-2<sup>Q(Q→A)</sup> domain probably forms a hydrophobic patch which facilitates the formation of the transcription initiation complex after binding in a correct steric orientation to the minimal U6 promoter. The peptide sequence Q<sup>18</sup>III(Q→A) corresponds to the amino acid residues 143 to 160 of the human transcription factor Oct-2 in which all glutamine residues have been changed to alanine. Since the mutations change 6 amino acid residues out of 18, the Q<sup>18</sup>III(Q→A) sequence may almost be considered as an individual synthetic peptide sequence. In particular, it is noteworthy that the Q→A mutations remove the capacity of transactivating RNA polymerase II promoters (17). For this reason and because we use the weak PGK promoter to drive expression of the transactivator, the regulatory system reported in the present study should not cause secondary effects by transactivation of promoters in the vicinity of the vector integration site.

The regulatory system that we developed requires expression of only one heterologous transactivator and can therefore be delivered to target cells by one single lentiviral vector. It is by far more complicated to establish conditional RNAi by ecdysone-regulated expression of the Gal4-Oct-2<sup>Q(Q→A)</sup> transcription factor that in turn activates a minimal U6 promoter construct by constitutive binding. This indirect regulatory approach required expression of additional heterologous components, and as a consequence three vectors were necessary to deliver regulated RNAi to target cells (18). The delivery of our regulatory system by one single lentiviral vector will significantly facilitate the application of conditional RNAi in many instances.

In summary, we have developed a regulatory system allowing Dox-controlled expression of shRNAs and demonstrated inducible, reversible and stable RNAi in mammalian cells.

The system may allow the expression of any gene to be rendered under external control by means of administration of Dox. Inducible RNAi will find applications in genetic studies using transgenic animals and will also open the door for novel gene therapy approaches such as the treatment of Huntington's disease by local and regulated silencing of p53.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Murielle Hurion for technical assistance and to Christophe Parizot (INSERM U 543) for help with the cell-sorting instrument. The authors are also grateful to Hermann Bujard for providing the plasmids pUHR 10-3 and pUHRT 62-1. The authors thank 'la Délégation Générale pour l'Armement (DGA)' for supporting this work through a fellowship to L.A. The authors also thank 'l'Université Paris VI (Pierre et Marie Curie)', 'l'Association française contre les myopathies (AFM)' and 'Rétina France' for financial support of this work. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Hannon,G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244–251.
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R. and Agami,R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550–553.
- Xia,H., Mao,Q., Paulson,H.L. and Davidson,B.L. (2002) siRNA mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1006–1010.
- Abbas-Terki,T., Blanco-Bose,W., Déglon,N., Pralong,W. and Aebischer,P. (2002) Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, **13**, 2197–2201.
- Tiscornia,G., Singer,O., Ikawa,M. and Verma,I.M. (2003) A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 1844–1848.
- Qin,X.-F., An,D.S., Chen,I.S.Y. and Baltimore,D. (2003) Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 183–184.
- Rubinson,D.A., Dillon,C.P., Kwiatkowski,A.V., Sievers,C., Yang,L., Kopinja,J., Zhang,M., McManus,M.T., Gertler,F.B., Scott,F.B. *et al.* (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature Genet.*, **33**, 401–406.
- Stewart,S.A., Dykxhoorn,D.M., Palliser,D., Mizuno,H., Yu,E.Y., An,D.S., Sabatini,D.M., Chen,I.S.Y., Hahn,W.C., Sharp,P.A. *et al.* (2003) Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, **9**, 493–501.
- Schramm,L. and Hernandez,N. (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.*, **16**, 2593–2620.
- van de Wetering,M., Oving,I., Muncan,V., Pon Fong,M.T., Brantjes,H., van Leenen,D., Holstege,F.C.P., Brummelkamp,T.R., Agami,R. and Clevers,H. (2003) Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO rep.*, **4**, 609–615.
- Czauderna,F., Santel,A., Hinz,M., Fechtner,M., Durieux,B., Fisch,G., Leenders,F., Arnold,W., Giese,K., Klippel,A. *et al.* (2003) Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e127.
- Matsukura,S., Jones,P.A. and Takai,D. (2003) Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e77.
- Hosono,T., Mizuguchi,H., Katayama,K., Xu,Z.-L., Sakurai,F., Ishi-Watabe,A., Kawabata,K., Yamaguchi,T., Nakagawa,S., Mayumi,T. *et al.* (2004) Adenovirus mediated Doxycycline inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, **15**, 813–819.
- Lin,X., Yang,J., Chen,J., Gunasekera,A., Fesik,S.W. and Shen,Y. (2004) Development of a tightly regulated U6 promoter for shRNA expression. *FEBS Lett.*, **577**, 376–380.
- Wiznerowicz,M. and Trono,D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: Lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.*, **77**, 8975–8961.
- Moosmann,P., Georgiev,O., Thiesen,H.-J., Hagmann,M. and Schaffner,W. (1997) Silencing of RNA polymerase II and III-dependent transcription by the Krab protein domain of Kox1, a Krüppel-type zinc finger factor. *Biol. Chem.*, **378**, 669–677.
- Das,G., Hinkley,C.S. and Herr,W. (1995) Basal promoter elements as a selective determinant of transcriptional activator function. *Nature*, **374**, 657–660.
- Gupta,S., Schoer,R.A., Egan,J.E., Hannon,G.J. and Mittal,V. (2004) Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 1927–1932.
- Urlinger,S., Baron,U., Thellmann,M., Hasan,M.T., Bujard,H. and Hillen,W. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 7963–7968.
- Baron,U., Gossen,M. and Bujard,H. (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2723–2729.
- Danzeiser,D.A., Urso,O. and Kunkel,G.R. (1993) Functional characterization of elements in a human U6 small nuclear RNA gene distal control region. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4670–4678.
- Vogel,R., Amar,L., Do Thi,A., Saillour,P. and Mallet,J. (2004) A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. *Hum. Gene Ther.*, **15**, 157–165.
- Zennou,V., Serguera,C., Sarkis,C., Colin,P., Perret,E., Mallet,J. and Charneau,P. (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector mediated cell transduction in the brain. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 446–450.
- Towbin,H., Staehelin,T. and Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*, **24**, 145–149.
- Tejedor-Real,P., Vogel,R., Mallet,J. and Faucon-Biguët,N. (2005) Gi/Go protein-dependent presynaptic mechanisms are involved in clozapine induced down-regulation of tyrosine hydroxylase in PC 12 cells. *J. Neurosci. Res.*, **81**, 739–745.
- Zufferey,R., Donello,J.E., Trono,D. and Hope,T.J. (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.*, **73**, 2886–2892.
- Zufferey,R., Dull,T., Mandel,R.J., Bukovsky,A., Quiroz,D., Naldini,L. and Trono,D. (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J. Virol.*, **72**, 9873–9880.
- Bae,B.-I., Xu,H., Igarashi,S., Fujimuro,M., Agrawal,N., Taya,Y., Hayward,S.D., Moran,T.H., Montell,C., Ross,C.A. *et al.* (2005) p53 mediates cellular dysfunction and behavioural abnormalities in Huntington's disease. *Neuron*, **47**, 29–41.
- Gossen,M., Freundlieb,S., Bender,G., Muller,G., Hillen,W. and Bujard,H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766–1769.
- Kistner,A., Gossen,M., Zimmermann,F., Jerecic,J., Ullmer,C., Lubbert,H. and Bujard,H. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 10933–10938.

La thérapie génique est envisagée pour le traitement de nombreuses maladies du système nerveux. Le transfert de gène peut être utilisé pour compenser l'absence ou le dysfonctionnement d'un gène déficient, coder une protéine thérapeutique, ou inhiber un gène par ARN interférence. L'utilisation de vecteurs lentiviraux pour transférer un gène thérapeutique, est une approche prometteuse pour de futures applications thérapeutiques. Cependant, pour une utilisation sécurisée de ces vecteurs, il est nécessaire de contrôler l'expression des gènes thérapeutiques. Ceci permettra d'adapter le traitement aux besoins du patient ou de l'arrêter en cas de complications graves. Dans ce contexte, mon travail a porté sur la mise au point de systèmes de régulation de l'expression de gènes thérapeutiques inductibles par la tétracycline (Tet-on) au sein d'un seul vecteur lentiviral.

Dans une première approche, le système Tet-on a été incorporé au sein d'un vecteur lentiviral unique. Des vecteurs codant la luciférase et la tyrosine hydroxylase (TH) ont été produits et caractérisés *in vitro* et *in vivo*. Ces vecteurs ont permis d'exprimer de façon régulée les transgènes avec une expression induite d'un facteur 100 en présence de doxycycline. Le vecteur TH inductible a été par la suite validé dans un modèle de rat de la maladie de Parkinson pour démontrer son efficacité et la possibilité de réguler un gène thérapeutique *in vivo*.

Le deuxième volet de mon travail a porté sur le développement d'un système inductible d'expression des shARN utilisant un nouveau transactivateur dépendant de la doxycycline capable d'induire la transcription de shARN à partir d'un promoteur d'ARN polymérase III minimal. Après intégration dans un vecteur lentiviral, ce système a permis de contrôler efficacement et de manière réversible l'expression de la GFP et de la protéine p53 *in vitro*. En présence de doxycycline, une extinction de 90 % de l'expression des deux gènes cibles a été obtenue. Cette expression a été réinduite après retrait de la doxycycline. L'efficacité de ce système est dépendante de la dose et du temps de traitement avec la doxycycline.

L'intégration de systèmes de régulations efficaces au sein d'un vecteur lentiviral unique constitue une étape cruciale pour une utilisation sécurisée de ces vecteurs en thérapie humaine.