

UNIVERSITÉ D'ÉVRY VAL D'ESSONNE
ÉCOLE DOCTORALE DES GÉNOMES AUX ORGANISMES

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité

GÉNÉTIQUE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

présentée par

Xavier LECLERC

pour l'obtention du grade de

Docteur ès Sciences

ÉVALUATION ET OPTIMISATION
DE
STRATÉGIES DE CORRECTION GÉNIQUE

Thèse soutenue le 19 décembre 2008 devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Francis QUÉTIER

Madame le Docteur Marie DUTREIX

Monsieur le Docteur Jean-Paul FEUGEAS

Monsieur le Professeur Jean-Christophe PAGÈS

Monsieur le Docteur Olivier DANOS

Monsieur le Docteur Antoine KICHLER

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Co-directeur de thèse

Directeur de thèse

Laboratoire de transfert de gènes
CNRS – UEVE – GÉNÉTHON
1bis rue de l'Internationale 91000 EVRY

Résumé

L'approche la plus fréquente de la thérapie génique pour le traitement des maladies génétiques consiste à ajouter en *trans* une copie fonctionnelle du gène qui est défectueux chez les individus atteints. Une alternative attrayante à cette stratégie de *thérapie par les gènes* consiste à corriger *in situ* le gène muté. Cette approche par *thérapie du gène*, ou correction génique, offre potentiellement de nombreux avantages par rapport à la thérapie génique par addition de gène, par exemple le contrôle de l'expression du gène corrigé par son promoteur endogène, l'absence de limite quant à la taille du gène à corriger et la stabilité à long terme de la correction. Aujourd'hui, plusieurs approches de correction génique ont été développées. Parmi ces techniques, celles employant des oligodéoxynucléotides simple-brins, des grands fragments d'ADN simple- ou double-brins et des vecteurs dérivés du virus associé à l'adénovirus (rAAV) sont les plus répandues, bien qu'elles restent limitées à quelques laboratoires, et produisent des résultats difficilement comparables.

Dans un premier temps, nous avons évalué les efficacités de correction génique de chacune de ces trois approches de correction génique dans des conditions optimisées pour la correction pour chacune d'entre elles. En utilisant deux systèmes d'évaluation complémentaires pour la détermination des efficacités de correction génique à un niveau épisomal, il apparaît que les grands fragments d'ADN et les vecteurs rAAV à grande homologie avec leurs cibles s'avèrent produire des efficacités au minimum dix fois plus importantes que celles obtenues avec des oligodéoxynucléotides simple-brins. Dans le cadre de la correction d'un gène intégré stablement au sein de la chromatine, il apparaît une même hiérarchie d'efficacité que lorsque la cible est portée par un épisode avec cependant une baisse très importante des efficacités de correction génique pour l'ensemble des stratégies employées.

Par la suite, nous avons tenté d'optimiser ces stratégies de correction génique en modifiant la nature des agents correcteurs ou en stimulant les mécanismes de réparation de l'ADN pouvant être impliqués dans le processus de correction génique. Parmi ces tentatives, il est apparu que le prétraitement des cellules par un inhibiteur des topoisomérases de type II, la doxorubicine, ou un glycopeptide antibiotique, la phléomycine, permet d'augmenter les efficacités de correction génique de l'ensemble des trois approches et ceci jusqu'à un facteur dix dans le cadre de la correction par un vecteur rAAV d'un gène intégré au sein d'un chromosome.

Mots clés : thérapie génique, correction de gènes, réparation de l'ADN, mutations ponctuelles, oligodéoxynucléotides simple-brins, fragments d'ADN, vecteurs dérivés de l'AAV.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse : le Professeur Francis QUÉTIER, d'en avoir accepté la présidence, le Docteur Marie DUTREIX et le Docteur Jean-Paul FEUGEAS pour l'intérêt et le temps qu'ils ont consacré à ce travail en tant que rapporteurs, le Docteur Olivier DANOS et le Professeur Jean-Christophe PAGÈS d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier encore une fois le Docteur Olivier DANOS de m'avoir initialement accueilli dans son unité de recherche à Généthon et de m'avoir permis de débiter cette thèse.

Je souhaite aussi remercier le Docteur Antoine KICHLER de m'avoir encadré et accompagné au quotidien dans cette aventure. Je le remercie pour sa confiance, pour l'autonomie qu'il m'a laissée, pour ses conseils et son aide précieuse.

Je voudrais également adresser un grand merci aux membres du Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire de l'Université de Versailles au sein duquel j'ai réalisé mon monitorat. Merci au Professeur Bernard MIGNOTTE pour sa confiance et sa sympathie. Immense merci au Docteur Aurore RINCHEVAL, mon tuteur pédagogique avec qui la collaboration fut des plus parfaites. Je souhaite aussi remercier Marie-Pierre, Christelle, Arnaud et Saïd, travailleurs de l'ombre, mais sans qui les séances de travaux pratiques ne seraient pas aussi sympathiques. Enfin, merci aussi aux élèves pour leur sympathie et auprès desquels je me suis senti utile.

J'adresse aussi un immense merci à Muriel AUDIT, pour tant de choses. De m'avoir mis le pied à bord du Généthon il y a maintenant bien longtemps et de m'avoir donné envie d'y rester un peu plus longtemps. Je la remercie aussi pour ses conseils, sa sympathie et son soutien tout au long de cette thèse.

Je remercie également Martine BARKATS, qui me suit depuis mes tous premiers pas dans le monde de la recherche jusqu'à aujourd'hui, pour sa gentillesse, ses conseils avisés, sa bonne humeur, ses attentions toutes particulières à mon égard, sa confiance et pour son gilet vert.

Je souhaite aussi remercier Mauro MEZZINA pour ses conseils et les discussions du soir que nous avons eues.

Merci aussi à tous ceux qui par leur aide scientifique, technique, morale m'ont permis de réaliser ce travail. Tout particulièrement, je souhaite remercier Graziella GRIFFITH et Antonia ZANTA-BOUSSIF pour leurs conseils. Je remercie aussi Philippe RAMEAU pour la cytométrie et surtout sa patience pour trier trois cellules vertes à l'heure pendant une après-midi.

J'adresse aussi un grand merci à tous ceux avec qui j'ai passé de nombreux bons moments. En tout premier lieu, merci à Christian Leborgne pour sa sympathie. Merci aussi aux autres membres du groupe Transfert de gènes non-viral : Bérangère, Déborah, Gilles, Simon, Ludvine et Xavier. Merci aussi à Pascal pour les longues soirées cytométrie, à Daniel, à Isabelle, Marc, Lydie, William, et tous les autres membres de la DDC, à Sandra, Nicolas et Thibault du groupe de Martine, à Karine Poulard, à Cyriaque, Agnès, les Guillaumes et les Cyrils, à Stéphanie pour les 293, à Anne pour les productions de vecteurs rétroviraux, à Sabine pour le séquençage, à Fred de l'informatique pour sa bonne humeur constante, à tous ceux à qui je n'ai pas rendu les deux microlitres de truc et à tous ceux que j'ai oubliés.

Je souhaite aussi remercier l'Association Vaincre la Mucoviscidose d'avoir soutenu ce projet et de m'avoir financé pendant cette thèse.

Enfin, merci à tous ceux de Généthon, de l'AFM et de l'Université que j'ai côtoyés pendant ces longues années et à tous ceux d'autres horizons qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent tous ici une part d'eux-mêmes et l'expression de ma profonde gratitude.

Table des matières

Résumé	i
Remerciements	ii
Table des matières.....	iii
Liste des abréviations et symboles	viii
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xiv
INTRODUCTION.....	0
I – L’ADN, de sa découverte à ses premières manipulations.....	1
1 - Les premières observations	1
2 - Les premiers concepts	1
3 - Les premières manipulations.....	3
4 - Les premières modifications ciblées du génome.....	5
II - La correction génique, une forme de génothérapie.....	8
1 - Principe	8
1.1 - Les acteurs de la correction génique.....	8
1.2 - Le gène cible.....	8
1.3 - Les mécanismes de réparation de l’ADN	9
1.3.1 - Réparation des cassures double-brin de l’ADN	10
1.3.2 - Réparation des mésappariements.....	14
1.3.3 - Réponses aux dommages à l’ADN	15
1.4 - Les agents correcteurs	17
2 - Avantages et inconvénients d’une approche thérapeutique par correction génique	18
3 - Outils pour la correction génique	19
3.1 - Systèmes d’évaluation	19
3.1.1 - Systèmes « cellulaires ».....	19
3.1.2 - Localisation, nature et type de mutation du gène cible.....	20
3.1.3 - Méthodes d’analyses de la réparation	21
3.2 - Agents correcteurs - Stratégies de correction génique.....	22
3.2.1 - Fragments d’ADN double-brins	22
Type d’agents correcteurs	22
Nature de la séquence de l’agent correcteur.....	23
Production et utilisation des fragments d’ADN double-brins	26
Autres stratégies pour augmenter l’efficacité de correction génique	27
3.2.2 - Fragments d’ADN simple-brins.....	29
Production des fragments simple-brins	30
Utilisation des fragments simple-brins.....	30
3.2.3 - Oligonucléotides	32
Séquence des oligodéoxynucléotides simple-brins.....	34
Mécanismes de correction par des oligodéoxynucléotides simple-brins.....	37
Optimisation de l’efficacité de correction par des oligodéoxynucléotides.....	40
3.2.4 - Vecteurs rAAV	42
Biologie du virus associé à l’adénovirus.....	42

Vecteurs rAAV utilisés pour la correction génique	47
Aspects moléculaires de la correction génique par des vecteurs rAAV	48
4 - Applications thérapeutiques et fréquences de correction génique	50
4.1 - Champs d'applications des stratégies de correction génique	50
4.2 - Fréquences de correction génique	51
4.3 - Limites des approches par ciblage de gène	51
4.4 - Application à la correction d'un gène d'intérêt thérapeutique	53
OBJECTIFS	55
RESULTATS.....	56
I - Evaluation des stratégies de correction génique à un niveau épisomal	57
1 - Choix des systèmes d'évaluation	57
2 - Système d'évaluation LucMut.....	58
2.1 - Génération de la cassette d'expression	58
2.2 - Caractérisation de la fonctionnalité de eGFPLucMut.....	61
2.3 - Optimisations des conditions expérimentales.....	64
2.3.1 - Administration des acides nucléiques	64
2.3.2 - Préparation des complexes pour la cotransfection plasmide-agent réparateur.....	66
2.3.3 - Evaluation de la durée optimale d'incubation.....	67
2.4 - Tests préliminaires de correction génique épisomale	68
2.4.1 - Utilisation d'un fragment d'ADN double-brin de 500 pb.....	68
2.4.2 - Normalisation des résultats par l'efficacité de transfection	72
2.4.3 - Choix de la lignée cellulaire HEK293T	75
2.4.4 - Protocole standard pour l'évaluation des efficacités de correction génique épisomale	79
2.5 - Utilisation de fragments d'ADN double-brins de tailles variables.....	79
2.5.1 - Design et production des fragments d'ADN double-brins	80
2.5.2 - Test et comparaison des fragments d'ADN double-brins de longueurs variables	81
2.6 - Utilisation d'oligodéoxynucléotides simple-brins	83
2.6.1 - Design des oligodéoxynucléotides simple-brins.....	84
2.6.2 - Note concernant le protocole standard de correction génique épisomale	85
2.6.3 - Test et comparaison des différents oligodéoxynucléotides simple-brins	86
2.7 - Utilisation de vecteurs AAV.....	89
2.7.1 - Caractéristiques et design du vecteur rAAV-eGFPLuc	90
2.7.2 - Test du vecteur rAAV-eGFPLuc	90
3 - Système d'évaluation meGFP	93
3.1 - Génération et caractérisation de la cassette d'expression	93
3.2 - Utilisation d'oligodéoxynucléotides simple-brins	96
3.2.1 - Design des oligodéoxynucléotides simple-brins.....	96
3.3 - Utilisation des fragments d'ADN double-brins.....	98
3.3.1 - Design des fragments d'ADN double-brins	98
3.3.2 - Test des fragments d'ADN double-brins.....	99
3.4 - Utilisation des vecteurs rAAV.....	102
3.4.1 - Design des vecteurs rAAV.....	102
3.4.2 - Test des vecteurs rAAV	103

II - Evaluation des stratégies de correction génique à un niveau chromosomal	106
1 - Choix et génération du système d'évaluation.....	106
1.1 - Intérêt d'un système chromosomal	106
1.2 - Choix et génération du système d'évaluation	107
1.3 - Optimisation et caractérisation du système d'évaluation.....	109
1.3.1 - Optimisation	109
1.3.2 - Comparaison des approches de vectorisation de type lipofection et nucléofection	110
2 - Comparaison des agents correcteurs	112
2.1 - Efficacité de correction génique du vecteur rAAV.....	112
2.2 - Contrôle qualité de la correction génique	115
2.2.1 - Stabilité du phénotype « corrigé »	115
2.2.2 - Confirmation du génotype	119
III - Optimisation de stratégies de correction génique.....	120
1 - Optimisation des agents réparateurs.....	120
1.1 - Modifications des ADN double-brins.....	120
1.1.1 - Méthode de production	120
1.1.2 Nature des extrémités	121
1.2 - Utilisation de fragments d'ADN simple-brins.....	128
1.2.1 - Utilisation de fragments d'ADN double-brins dénaturés.....	128
1.2.2 - Utilisation de fragments d'ADN simple-brins produits par PCR asymétrique	129
1.3 - Utilisation d'oligodéoxynucléotides modifiés	132
1.3.1 - Utilisation d'oligonucléotides modifiés par inclusion de résidus LNA	132
2 - Conditionnement cellulaire	136
2.1 - Essai de synchronisation de la population cellulaire en phase S	136
2.2 - Utilisation d'agents causant des dommages à l'ADN.....	137
2.2.1 - Utilisation de la doxorubicine	138
2.2.2 - Utilisation de la phléomycine	141
2.2.3 - Utilisation de la thymidine dinucléotide et de l'oligomère pTélo.....	143
DISCUSSION	146
I - Evaluation de stratégies de correction génique.....	147
1 - Correction génique épisomale	147
2 - Correction génique chromosomale.....	151
II - Optimisation de stratégies de correction génique	154
1 - Optimisation des agents correcteurs.....	154
2 - Conditionnement cellulaire	155

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	157
MATERIELS ET METHODES	160
I - Matériels biologiques et réactifs.....	161
1 - Culture cellulaire.....	161
2 - Constructions plasmidiques.....	161
2.1 - Plasmide pEGFP _{Luc} Mut.....	161
2.2 - Plasmide pmeGFP	162
2.3 - Plasmide pSeGFP	163
2.4 - Plasmide pAAV-eGFP _{Luc}	164
2.5 - Plasmide pAAV-SeGFP	164
2.6 - Préparation d'ADN plasmidique	165
3 - Synthèse des oligodéoxynucléotides simple-brins	166
4 - Production de fragments d'ADN double-brins.....	167
4.1 - Amplification et purification des fragments d'intérêt.....	167
4.2 - Double extraction dite au phénol et au phénol-chloroforme.....	170
4.3 - Extraction dite au phénol-chloroforme.....	170
5 - Production de fragments d'ADN simple-brins.....	170
6 - Modification des fragments d'ADN double-brins.....	171
7 - Production, purification et titrage des préparations de vecteurs rAAV	172
7.1 - Production des vecteurs.....	172
7.2 - Purification des vecteurs.....	174
7.3 - Titrage des préparations de vecteurs.....	174
8 - Génération des lignées exprimant stablement les cassettes d'expression.....	175
9 - Caractérisation des lignées exprimant stablement les cassettes d'expression	175
II - Méthodes.....	177
1 - Expérience de correction génique épisomale	177
1.1 - Ensemencement des cellules	177
1.2 - Transfection des cellules	177
1.2.1 - Formation des complexes transfectants	177
1.2.2 - Incubation avec les complexes transfectants	178
1.3 - Infection des cellules	178
1.4 - Incubation des cellules.....	178
2 - Expérience de correction génique chromosomale	178
2.1 - Nucléofection des cellules.....	179
2.2 - Transfection des cellules avec la Lipofectamine	179
2.3 - Infection des cellules par les vecteurs rAAV.....	179

3 - Cytométrie en flux.....	180
4 - Mesure de l'activité luciférase	181
5 - Analyse du cycle cellulaire.....	181
6 - Microscopie à épifluorescence	182
7 - Détermination de température de fusion des oligodéoxynucléotides	182
8 - Séquençage.....	182
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	183

Liste des abréviations et symboles

A : <u>a</u> dénine	G : <u>g</u> uanine
AAV : <u>a</u> deno- <u>a</u> ssociated <u>v</u> irus	GGR : <u>g</u> lobal <u>g</u> enome <u>r</u> epair
ADN : <u>a</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique	h : <u>h</u> eure
ARN : <u>a</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique	HEK293 : <u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney cells
AS : <u>a</u> nti <u>s</u> ens	HEK293T : <u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney cells transformed by SV40 <u>T</u> antigen
ATM : <u>a</u> taxia- <u>t</u> elangiectasia <u>m</u> utated protein	HIV-1 : <u>h</u> uman <u>i</u> mmunodeficiency <u>v</u> irus type 1
ATP : <u>a</u> dénosine <u>t</u> ri- <u>p</u> hosphate	hprt : <u>h</u> ypoxanthine- <u>g</u> uanine <u>p</u> hosphoribosyl <u>t</u> ransferase
ATR : <u>A</u> TM- <u>r</u> elated protein	HR : <u>h</u> omologous <u>r</u> ecombination
<u>b</u> : <u>b</u> ase	IMF : <u>i</u> ntensité <u>m</u> oyenne de <u>f</u> luorescence
BER : <u>b</u> ase <u>e</u> xcision <u>r</u> epair	ITR : <u>i</u> nverted <u>t</u> erminal <u>r</u> epat
C : <u>c</u> ytosine	j : <u>j</u> our
Ca ²⁺ : ion <u>c</u> alcium	kpb : <u>k</u> ilopaire de <u>b</u> ases
CHO : <u>c</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary cells	LNA : <u>l</u> ocked <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
CHO-K1 : <u>c</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary cells (clone <u>K1</u>)	Luc : <u>l</u> uciférase
CMV : <u>c</u> ytomegalovirus	M : <u>m</u> olaire
Ctr : <u>c</u> ontrôle	mg : <u>m</u> illigramme
D-loop : <u>d</u> isplacement <u>l</u> oop	Mg ²⁺ : ion <u>m</u> agnésium
DMEM : <u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle's <u>m</u> edium	min : <u>m</u> inute
DNA : <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid	ml : <u>m</u> illil <u>i</u> tre
DNA-PKcs : <u>D</u> NA- <u>p</u> rotein <u>k</u> inase <u>c</u> atalytic <u>s</u> ubunit	MLHx : <u>M</u> ut <u>L</u> <u>h</u> omologue <u>x</u>
dNTP : <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléotides <u>t</u> ri- <u>p</u> hosphate	MMR : <u>m</u> ismatch <u>r</u> epair
Dox : <u>d</u> oxorubicine	MOI : <u>m</u> ultiplicity of <u>i</u> nfection
dsDNA : <u>d</u> ouble- <u>s</u> tranded <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid	MRN : complexe <u>M</u> re11/ <u>R</u> ad50/ <u>N</u> bs1
EDTA : <u>e</u> thylène <u>d</u> iamine <u>t</u> étra- <u>a</u> cétate	MSC : <u>m</u> esenchymal <u>s</u> tem <u>c</u> ells
eGFP : <u>e</u> nhanced <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein	MSHx : <u>M</u> ut <u>S</u> <u>h</u> omologue <u>x</u>
eGFP _{Luc} : protéine ou gène de fusion <u>eGFP::Luc</u>	MVM : <u>m</u> inute <u>v</u> irus of <u>m</u> ice
ES : <u>e</u> mbryonic <u>s</u> tem cells	
ExoIII : <u>e</u> xonucléase <u>III</u>	

NER : nucleotide excision repair
 NHEJ : non-homologous end joining
 nm : nanomètre
 nt : nucléotide
 ODN : oligodéoxynucléotide
 pA : polyadenylation signal
 pb : paire de bases
 PBS : phosphate-buffered saline
 PCR : polymerase chain reaction
 PLM : phléomycine
 PO : phosphodiester (phosphate oxygène)
 PS : phosphorothioate (phosphate soufre)
 PSM2 : post-meiotic segregation 2
 pTT : thymidine dinucléotide
 rAAV : recombinant adeno-associated virus
 RDO : RNA-DNA oligodéoxynucléotide
 Rep : réparateur
 RLU : relative light unit
 RNA : ribonucleic acid
 RPA : replication protein A
 s : seconde
 S : sens
 scAAV : self-complementary AAV
 ssDNA : single-stranded desoxyribonucleic acid
 ssODN : single-stranded oligodéoxynucléotide
 SV40 : simian virus 40
 SVF : sérum de yeau foetal
 T : thymine
 TCR : transcription-coupled repair
 TFO : triplex-forming oligonucléotide
 Tm : temperature melting
 TSA : trichostatine A
 U : unité
 u : unité
 ZFN : zinc-finger nuclease
 3' : extrémité 3' hydroxyle
 5' : extrémité 5' phosphate
 % v/v : pourcent volume à volume
 °C : degré Celsius
 µg : microgramme
 µl : microlitre
 µm : micromètre

Liste des figures

Figure 1. Cliché par diffraction aux rayons X de l'ADN, représentation schématique de l'ADN et photographie de Rosalind Franklin.	2
Figure 2. Principaux agents causant des dommages à l'ADN, principales lésions et principales voies de réparation.	9
Figure 3. Schéma des différentes étapes de réparation d'une cassure double-brins par recombinaison homologue.	11
Figure 4. Schéma des différentes étapes de réparation d'une cassure double-brins par jonction d'extrémités non-homologues.	13
Figure 5. Schéma des différentes étapes de la réparation des mésappariements.	15
Figure 6. Schéma des différentes étapes de la réponse aux dommages causés à l'ADN.	16
Figure 7. Correction génique par recombinaison homologue.	23
Figure 8. Fréquence de recombinaison en fonction de la longueur du fragment d'ADN.	24
Figure 9. Influence du cycle cellulaire sur la fréquence de recombinaison.	27
Figure 10. Illustration du principe de la méthode GOREC.	29
Figure 11. Efficacités de correction génique de fragments simple-brin.	31
Figure 12. Représentation schématique d'un chiméraplaste et de ses interactions avec sa cible.	33
Figure 13. Influence de la position et du nombre de modifications à introduire au sein de l'oligomère sur l'efficacité de correction génique.	37
Figure 14. Différents mécanismes de correction génique par des oligodéoxynucléotides simple-brins.	38
Figure 15. Structure chimique d'un lien phosphorothioate et d'un résidu de type LNA.	41
Figure 16. Représentation schématique de l'ITR de l'AAV-2.	43
Figure 17. Organisation génomique du génome de l'AAV2 sauvage.	44
Figure 18. Représentation schématique des différentes étapes de la réplication du génome de l'AAV-2.	45
Figure 19. Organisation génomique d'un vecteur rAAV pour la correction de gènes.	47
Figure 20. Efficacités de correction des mutations de type substitution par un vecteur rAAV.	48
Figure 21. Représentation schématique du plasmide peGFPLucMut.	59
Figure 22. Séquences nucléotidiques et protéiques des gènes eGFPLuc et eGFPLucMut.	60
Figure 23. Schéma des protéines eGFPLuc et eGFPLucMut.	60
Figure 24. Comparaison des niveaux d'activité luciférase générés après transfection de cellules HEK293 par les plasmides peGFPLuc et peGFPLucMut.	62
Figure 25. Comparaison des proportions de cellules eGFP positives et de leurs intensités moyenne de fluorescence après transfection de cellules HEK293 par les plasmides peGFPLuc et peGFPLucMut.	63

Figure 26. Comparaison des proportions de cellules eGFP positives et de leurs intensités moyenne de fluorescence après transfection de cellules HEK293 par les plasmides peGFP-C1, peGFPLuc et peGFPLucMut.....	64
Figure 27. Comparaison des efficacités de transfection (proportion de cellules eGFP positives) des différents agents transfectants testés avec le plasmide peGFPLucMut sur des cellules HEK293.....	66
Figure 28. Comparaison des proportions de cellules eGFP positives et des niveaux d'activité luciférase en fonction de la masse de plasmide peGFPLuc, de la masse totale d'acide nucléique et de nature chimique des agents transfectés.....	67
Figure 29. Evaluation de la durée optimale d'incubation après transfection de cellules HEK293 par le plasmide peGFPLucMut.	68
Figure 30. Alignement du plasmide peGFPLucMut et du fragment dsDNA-eGFPLuc 500 Rep.	69
Figure 31. Evaluation des efficacités de correction génique du fragment d'ADN double-brins dsDNA-eGFPLuc 500 Rep en fonction du ratio molaire plasmide cible/agent correcteur.	69
Figure 32. Niveaux d'activité luciférase générés après transfection du plasmide cible peGFPLucMut, de l'agent correcteur dsDNA-eGFPLuc 500 Rep ou des deux simultanément.	70
Figure 33. Alignement du plasmide peGFPLucMut et des fragments dsDNA-eGFPLuc 500 Rep et dsDNA-eGFPLuc 500 Ctr.....	71
Figure 34. Niveaux d'activité luciférase et facteurs de correction générés en fonction du ratio molaire et du type d'agent correcteur.....	72
Figure 35. Efficacités de transfection obtenues pour chaque fragment et pour chaque ratio testé.....	73
Figure 36. Niveaux d'activité luciférase normalisés et facteurs de correction normalisés générés en fonction du ratio molaire et du type d'agent correcteur.	74
Figure 37. Efficacités de correction génique et efficacités de transfection en fonction de la densité cellulaire.....	76
Figure 38. Gains de correction en fonction de la densité cellulaire.....	78
Figure 39. Alignement du plasmide peGFPLucMut et des fragments dsDNA-eGFPLuc 200, 500, 1000 et 2200.....	81
Figure 40. Efficacités de correction génique en fonction du ratio molaire plasmide cible/fragment dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep.	82
Figure 41. Efficacités de correction génique des fragments d'ADN double-brins de différentes longueurs.....	83
Figure 42. Corrélation entre la longueur du fragment d'ADN double-brins utilisé et le facteur de correction génique observée.....	83
Figure 43. Comparaison des efficacités de correction génique par des oligodéoxynucléotides simple-brins en fonction du mode de préparation des complexes transfectants.....	86
Figure 44. Efficacités de correction génique en fonction du ratio molaire plasmide cible/oligodéoxynucléotide ssODN-eGFPLuc 45 AS PS Rep.....	87
Figure 45. Efficacités de correction génique en fonction de la topologie de l'oligodéoxynucléotide ou de la nature de ses extrémités.....	88

Figure 46. Effet de la topologie et de la nature des extrémités de l'oligodéoxynucléotide sur l'efficacité de correction génique.	89
Figure 47. Alignement du plasmide peGFPLucMut et du vecteur rAAV-eGFPLuc 2300.	90
Figure 48. Comparaison des protocoles de correction génique épisomale lors de l'emploi de vecteurs rAAV.	91
Figure 49. Efficacités de correction génique épisomale en fonction de la multiplicité d'infection.	92
Figure 50. Représentation schématique du plasmide pmeGFP.	94
Figure 51. Représentation schématique du plasmide pSeGFP.	94
Figure 52. Séquences nucléotidiques et protéiques des gènes SeGFP et meGFP.	95
Figure 53. Schéma des protéines eGFP et meGFP.	95
Figure 54. Comparaison des cassettes d'expression meGFP et SeGFP.	96
Figure 55. Effet de la nature des extrémités de l'oligodéoxynucléotide sur l'efficacité de correction génique.	98
Figure 56. Alignement du plasmide pmeGFP et des agents correcteurs de type oligomère et fragment d'ADN.	99
Figure 57. Efficacités de correction génique des fragments d'ADN double-brins contrôle et réparateur ciblant le plasmide pmeGFP.	100
Figure 58. Efficacités de correction génique des différents fragments d'ADN double-brins ciblant le plasmide pmeGFP.	100
Figure 59. Alignement du plasmide pmeGFP et des vecteurs rAAV-SeGFP et rAAV-eGFPLuc.	102
Figure 60. Efficacités de correction génique du vecteur rAAV-SeGFP en fonction de la multiplicité d'infection.	103
Figure 61. Comparaison des efficacités de correction génique des vecteurs rAAV-eGFPLuc et rAAV-SeGFP.	105
Figure 62. Comparaison des efficacités de correction génique après nucléofection de masses croissantes des agents correcteurs ssODN-eGFP 35 PO AS Rep et dsDNA-SeGFP 700 Rep.	110
Figure 63. Comparaison des efficacités de transfection et de correction génique épisomale et chromosomale en fonction du mode de vectorisation.	111
Figure 64. Efficacité de correction génique chromosomale du vecteur rAAV-eGFPLuc en fonction de la multiplicité d'infection.	113
Figure 65. Efficacité de correction génique chromosomale des vecteurs rAAV-eGFPLuc et rAAV-SeGFP.	114
Figure 66. Comparaison des efficacités de nucléofection et de transduction.	114
Figure 67. Comparaison des efficacités de correction génique des agents correcteurs ssODN-eGFP 35 PO AS Rep, dsDNA-SeGFP 700 Rep et rAAV-eGFPLuc.	115
Figure 68. Suivi de la stabilité de la correction au cours du temps.	116
Figure 69. Photographies des clones cellulaires CHOMeGFP-12 « corrigés ».	118
Figure 70. Effet du mode de production des fragments d'ADN double-brins sur l'efficacité de correction génique.	121

Figure 71. Effet de la nature des extrémités des fragments d'ADN double-brins sur l'efficacité de correction génique.....	122
Figure 72. Electrophorégramme des fragments d'ADN double-brins digérés par ExoIII.....	124
Figure 73. Effet de la longueur des extrémités 5' dépassantes des fragments d'ADN double-brins sur l'efficacité de correction génique.....	125
Figure 74. Electrophorégramme des fragments d'ADN double-brins digérés par ExoIII et MBN.....	126
Figure 75. Effet de la longueur des extrémités 5' dépassantes des fragments d'ADN double-brins sur l'efficacité de correction génique.....	127
Figure 76. Efficacités de correction génique de fragments d'ADN double-brins dénaturés.....	129
Figure 77. Electrophorégramme des produits de PCR asymétrique.....	131
Figure 78. Efficacités de correction génique des fragments d'ADN simple-brins.....	131
Figure 79. Efficacités de correction génique des oligodéoxynucléotides modifiés par des résidus LNA.....	134
Figure 80. Courbe de dissociation des oligodéoxynucléotides modifiés par des résidus LNA.....	135
Figure 81. Evolution du cycle cellulaire en condition sans sérum.....	137
Figure 82. Structure chimique du chlorure de doxorubicine.....	138
Figure 83. Efficacités de correction génique épisomale après incubation avec la doxorubicine.....	139
Figure 84. Efficacités de correction génique chromosomale après incubation avec la doxorubicine.....	140
Figure 85. Analyse de la distribution des cellules par phase du cycle cellulaire après incubation avec la doxorubicine.....	140
Figure 86. Structure chimique de la phléomycine.....	141
Figure 87. Efficacités de correction génique épisomale après incubation avec la phléomycine.....	142
Figure 88. Efficacités de correction génique chromosomale après incubation avec la phléomycine.....	142
Figure 89. Analyse de la distribution des cellules par phase du cycle cellulaire après incubation avec la phléomycine.....	143
Figure 90. Efficacités de correction génique épisomale d'un fragment d'ADN double-brin après incubation des cellules avec les agents pTpT et pTélo.....	144
Figure 91. Efficacités de correction génique épisomale d'un oligodéoxynucléotide après incubation des cellules avec les agents pTpT et pTélo.....	145
Figure 92. Représentation schématique du plasmide peGFPLucMut.....	162
Figure 93. Représentation schématique du plasmide pmeGFP.....	163
Figure 94. Représentation schématique du plasmide pSeGFP.....	163
Figure 95. Représentation schématique du plasmide pAAV-eGFPLuc.....	164
Figure 96. Représentation schématique du plasmide pAAV-SeGFP.....	165
Figure 97. Schéma illustrant les activités de l'exonucléase III et de la mung bean nuclease.....	172
Figure 98. Analyse par cytométrie en flux du phénotype eGFP de cellules traitées.....	180

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins ciblant le gène eGFPLucMut.	81
Tableau 2. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins ciblant peGFPLucMut.....	85
Tableau 3. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins ciblant pmeGFP.	97
Tableau 4. Liste et caractéristiques des fragments double-brins ciblant pmeGFP.	99
Tableau 5. Fréquences de survie des cellules « corrigées ».	117
Tableau 6. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins générés par digestion enzymatique. ...	123
Tableau 7. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN simple-brins.	130
Tableau 8. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins modifiés par des résidus LNA.....	133
Tableau 9. Température de fusion des oligodéoxynucléotides modifiés par des résidus LNA.	135
Tableau 10. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins ciblant peGFPLucMut.....	166
Tableau 11. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins ciblant pmeGFP.	167
Tableau 12. Liste des oligodéoxynucléotides utilisés pour la synthèse des fragments d'ADN double-brins corrigeant le gène eGFPLucMut.	168
Tableau 13. Liste des oligodéoxynucléotides utilisés pour la synthèse des fragments d'ADN double-brins corrigeant le gène meGFP.	169
Tableau 14. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins corrigeant le gène eGFPLucMut.	169
Tableau 15. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins corrigeant le gène meGFP.....	169
Tableau 16. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN simple-brins.	171
Tableau 17. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins générés par digestion enzymatique. .	172
Tableau 18. Liste et caractéristiques des amorces et sondes utilisées pour le dosage des préparations de vecteurs rAAV.....	175
Tableau 19. Liste et caractéristiques des amorces et sondes utilisées pour le dosage génique du gène meGFP. .	176

INTRODUCTION

I – L'ADN, de sa découverte à ses premières manipulations

1 - Les premières observations

C'est d'abord comme une substance riche en phosphore qu'est décrit l'ADN pour la première fois en 1869 par le suisse Friedrich Miescher. Isolée à partir des noyaux de cellules, il la nomme alors nucléine [Miescher, 1871]. En 1879, Fleming réalise les premières observations de la chromatine puis en 1882, des chromosomes et de la mitose. Vingt ans plus tard, l'allemand Altmann sépare à partir de la nucléine des protéines et une substance acide, l'acide nucléique puis, en 1896, son compatriote Kossel identifie les 4 bases azotées de l'acide nucléique. Enfin, les américains Levene et Jacobs identifient en 1928 l'ose constituant de l'ADN, le désoxyribose. En 1935, on parle alors d'acide désoxyribonucléique mais à cette heure, aucun rapprochement n'est fait entre les caractères d'un organisme et cette molécule, que l'on croit d'ailleurs n'être qu'un vulgaire homopolymère. La banalité de ce qui correspondrait aujourd'hui à sa séquence $ATGC_n$ (Takahashi, 1932), en fait une molécule trop rudimentaire pour supporter une activité biologique aussi fine et complexe que la régulation de l'expression de nos caractères, bien que ces notions aient longuement coexistées.

2 - Les premiers concepts

En effet, les premières lois de la génétique qui prévoient la transmission des caractères au sein de générations successives de pois sont énoncées dès 1866 par Gregor Mendel mais elles passent totalement inaperçues. De Vries redécouvre les lois de Mendel en 1900 et observe l'apparition de mutations spontanées qui l'amènent à proposer un mécanisme d'évolution par mutations. En 1909, Johannsen introduit les concepts de génotype et de phénotype mais il n'y a toujours aucun lien d'établi entre le génotype et l'ADN. Il faut alors attendre les travaux de Morgan en 1913 pour que ce lien soit mis en évidence. Morgan prouve alors l'existence des gènes et de leur localisation chromosomique lors de ses expériences sur la transmission des caractères et des mutations chez la drosophile. Rejoint par Sturtevant, ils établissent la théorie chromosomique de l'hérédité. Leurs conclusions bouleversent mais la nature de leur concept, des plus simples, minimalistes et cartésiens qui soient : les gènes sont organisés linéairement le long du chromosome dans le même ordre que celui des organes par rapport à l'axe du corps pour lesquels ils gouvernent le développement, les aide, par chance, à faire accepter leur découverte. Ils introduisent alors la notion d'hérédité liée au sexe et proposent la première

carte génétique mais on ne fait toujours aucune différence entre l'information génétique et les éléments physiques responsables des caractères observés. La brillante intuition fondamentale de Garrod (1902), qui pense que les supports du génotype et du phénotype sont deux entités chimiques distinctes, celle du phénotype étant de nature protéique, n'est pas suivie car non démontrée. Ce sont Beadle et Tatum qui démontrent en 1941 la relation univoque (vision simpliste cependant mais affinée depuis) entre un gène et une protéine responsable d'une activité catalytique [Beadle and Tatum, 1941]. L'idée que gène et protéine sont deux entités distinctes émerge alors [Schrödinger, 1944]. En 1944, Avery réitère l'expérience de Griffith de 1928 [Griffith, 1928] mais parvient à purifier le facteur transformant responsable de la transformation de pneumocoques non-pathogènes par des pneumocoques virulents préalablement tués [Avery, et al., 1944]. Il s'agit d'ADN, mettant ainsi en évidence le rôle de cette molécule dans le support de l'information génétique. Il faudra cependant attendre huit années pour que cette découverte soit considérée. En 1952, Hershey et Chase confirment ce résultat [Hershey and Chase, 1952]. L'ADN est alors reconnu comme étant le support de l'information génétique et suscite l'attention. Stimulés par l'envie de « voir » un gène, Watson et Crick proposent en 1953 la structure en double-hélice de l'ADN [Watson and Crick, 1953], hypothèse formulée sur la base d'une brillante interprétation des clichés de diffraction de rayons X par des cristaux d'ADN réalisés par Rosalind Franklin et des travaux d'Erwin Chargaff (Figure 1).

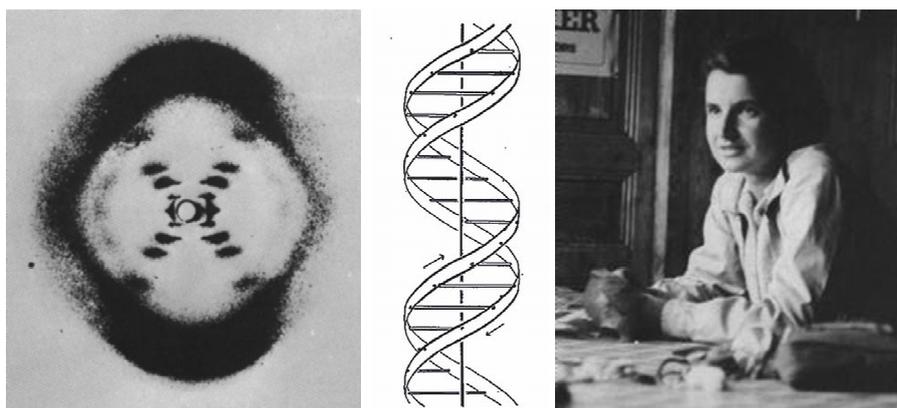


Figure 1. Cliché par diffraction aux rayons X de l'ADN, représentation schématique de l'ADN et photographie de Rosalind Franklin.

A gauche, cliché obtenu par diffraction de rayons X de l'ADN (forme B) pris par Rosalind Franklin (en photographie à droite). Au centre, représentation schématique de la double hélice d'ADN proposée par Watson et Crick dans leur article de Nature de 1953.

En 58, Meselson et Stahl démontrent le caractère semi-réplicatif de l'ADN [Meselson and Stahl, 1958]. Biochimistes et généticiens se rapprochent alors pour donner naissance au dogme central un gène - une protéine qui s'étendra quelques années plus tard à la relation un gène - une maladie génétique. Parallèlement, biochimie et génétique fusionnent pour donner naissance à ce que l'on appelle aujourd'hui la « biologie moléculaire », dont nous pouvons retenir la définition de Michel Morange : « l'ensemble des techniques et découvertes qui ont permis l'analyse moléculaire des processus les plus intimes du vivant, de ceux qui en assurent la pérennité et la reproduction » [Morange, 1994]. Les connaissances en biologie et les outils de recherche nés de cette discipline ont permis un avancement dans tous les domaines de la biologie sans commune mesure depuis le début des années 1970. L'ADN devient manipulable, dans tous les sens du terme, et ses applications se multiplient.

3 - Les premières manipulations

L'expérience fondatrice de Paul Berg en 1972 pose la première pierre de ce qui sera plus tard la technologie de « l'ADN recombinant ». Il démontre qu'il est possible de recombinaison deux molécules d'ADN d'origine distinctes, en l'occurrence d'origine virale et bactérienne. Après linéarisation des deux molécules par l'exonucléase EcoRI et extension des extrémités produites par une transférase terminale pour générer des extrémités cohésives, les deux molécules sont assemblées à l'aide d'une polymérase et d'une ligase [Jackson, et al., 1972, Morrow and Berg, 1972]. L'année d'après, Herbert Boyer réitère l'expérience de Berg en utilisant cette fois-ci un vecteur réplicatif [Cohen, et al., 1973] et génère la première molécule d'ADN hybride eucaryote-procaryote en insérant le gène codant pour les ARN ribosomiaux 18s et 28s d'un amphibien africain (*Xenopus laevis*) dans un plasmide bactérien d'*E. Coli*. Après transformation, il montre que les plasmides recombinants se répliquent et sont propagés dans toute la population bactérienne et observe la présence des ARN ribosomiaux de mammifères chez la bactérie [Morrow, et al., 1974].

Ces prouesses techniques provoquent des inquiétudes, dont Berg et Boyer deviennent bien conscients. Devant la puissance des outils à leur portée, les scientifiques inquiets poussent Berg à organiser la conférence d'Asilomar (USA) en 1975 qui appelait à un moratoire sur les manipulations génétiques, afin d'éviter que des bactéries génétiquement modifiées puissent se disperser dans l'environnement. C'est la première fois qu'apparaissent les termes

d'organismes génétiquement modifiés et les inquiétudes relatives à leur dispersion dans la nature. Ces préoccupations sont néanmoins de courtes durées, le moratoire sera levé deux ans plus tard tandis qu'on produit pour la première fois en 1978 une protéine humaine dans une bactérie, l'insuline [Miller and Baxter, 1980]. En 1983, cette insuline dite recombinante est commercialisée par la compagnie pharmaceutique Eli Lilly au Canada pour le traitement du diabète.

Parallèlement, des expériences de transgénèse sont tentées avec des cellules eucaryotes mais les efficacités de transformation sont extrêmement faibles, trop faibles pour être observées avec des cellules en culture mais suffisantes pour induire une modification du patrimoine génétique des quelques cellules germinales qui pourront être utilisées pour la création d'organismes génétiquement modifiés. C'est le cas en 1982 avec les travaux de Brinster et de Palmiter [Palmiter, et al., 1982] qui créent le premier animal génétiquement modifié en microinjectant dans le pronucleus d'œufs fertilisés de souris un fragment d'ADN contenant le promoteur du gène murin de la métallothionéine I fusionné au gène de l'hormone de croissance du rat. Les résultats de cette première transgénèse animale sont très encourageants : sur les vingt-et-un œufs développés, sept sont transgéniques et présentent un phénotype en relation avec la modification effectuée. Puis le premier végétal transgénique est obtenu en 1983, un plan de tabac résistant à un antibiotique [Hooykaas-Van Slogteren, et al., 1992]. On voit alors apparaître nombre d'animaux et de plantes transgéniques exprimant tel gène et produisant telle protéine, à des fins de recherche ou de production et l'idée de modifier génétiquement une cellule pour la soigner du déficit génétique qui la fait souffrir prend place. Le développement de la biologie moléculaire, avec les incontestables contributions de Howard Temin et David Baltimore avec l'utilisation de la transcriptase inverse, de Kary Mullis avec la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et de Frederick Sanger pour le développement de technique de séquençage de l'ADN, permet aux scientifiques de disposer de matériel génétique et de le recombiner aisément pour construire des molécules au potentiel thérapeutique. Administrées aux cellules par des méthodes physiques de type électroporation ou lipofection [Felgner and Ringold, 1989], elles permettent la correction du défaut génétique en permettant la synthèse de la protéine manquante. Cette nouvelle stratégie thérapeutique, appelée thérapie génique, qui consiste à ajouter au génome d'une cellule un exemplaire sain du gène qui lui fait défaut est prometteuse mais les efficacités de transfert de gènes sont faibles et la construction génétique transférée ne persiste pas au sein de la cellule dans la plupart des cas. Des vecteurs viraux, structures dérivées de

virus capables de transférer un acide nucléique jusqu'au noyau d'une cellule et dans certains cas de l'intégrer stablement au sein de la chromatine, sont utilisés pour administrer plus efficacement des séquences d'intérêt thérapeutique à des cellules. Le premier vecteur viral développé est un vecteur dérivé d'un rétrovirus, le virus de la leucémie murine de Moloney (MoMLV), et est largement utilisé pour le transfert de gènes dans des cellules hématopoïétiques. A cette heure, la thérapie génique sort de l'ancre du mystérieux laboratoire et apparaît aux yeux du public. Elle se propose de corriger des déficits génétiques responsables de maladies aujourd'hui incurables. Depuis l'autorisation du premier essai clinique humain en 1989, la déception et le scepticisme suscités par les résultats obtenus ont été à la mesure de l'enthousiasme du départ, qui était probablement démesuré. Si la thérapie génique reste sans conteste une issue thérapeutique pour nombres de maladies aujourd'hui sans traitement, elle s'est montrée beaucoup plus difficile à manier qu'il n'était prévu à ses tous débuts [Fischer, 2000]. Cependant, se gardant aussi bien d'un optimisme béat que du découragement, les scientifiques ont poursuivi leurs efforts et ont développé de nombreux vecteurs viraux [Kay, et al., 2001] et non-viraux capables de surmonter les problèmes rencontrés comme par exemple ceux liés à l'expression du transgène et à sa taille ou à l'insertion du génome du vecteur au sein de la chromatine. Aujourd'hui, avec ces outils performants, des résultats extrêmement prometteurs ont été obtenus chez le petit animal et les résultats de nombreux essais cliniques chez l'homme sont attendus avec enthousiasme.

4 - Les premières modifications ciblées du génome

Si l'approche thérapeutique par correction génique fut envisagée bien avant celle par addition de gènes, cette dernière la supplante de par les résultats qu'elle génère. Toutefois, avec la puissance des outils d'aujourd'hui, l'approche par correction de gènes semble désormais envisageable.

En 1987, Doetschman et Smithies réalisent une expérience qui assoit les fondements de ce qui serait aujourd'hui une approche thérapeutique théoriquement parfaite, du moins du point de vue du généticien. Les travaux de Mario Capecchi avaient précédemment montré l'efficace remplacement par recombinaison homologue d'une séquence génomique par une autre séquence quasi homologue introduite dans le noyau de cellules de mammifères [Thomas, et al., 1986]. S'appuyant sur ces excellents résultats et stimulés par l'efficacité de correction observée : 1 cellule sur 1000, Doetschman et Smithies réalisent par recombinaison homologue

l'insertion ciblée d'un fragment d'ADN au sein du gène *hprt* délété de son promoteur et de ses premiers exons dans une lignée de cellules embryonnaires ES *hprt*⁻ pluripotentes de souris. La proportion de cellules corrigées était de 1 cellule sur 700 000 mais le fragment d'ADN introduit par électroporation ne l'était effectivement que dans 1 cellule pour 100 000. L'efficacité de correction était alors de 14%, un résultat plus que prometteur [Doetschman, et al., 1987]. Chacun de leur côté, Capecchi et Smithies poursuivent leurs efforts. Capecchi s'attache alors à décrire les facteurs influençant l'efficacité de la recombinaison homologe. Il montre dès 1987 que la recombinaison homologe entre deux séquences coinjectées se fait préférentiellement au milieu de la phase S [Wong and Capecchi, 1987] et que l'efficacité de recombinaison est fonction de l'étendue de l'homologie entre les deux séquences [Thomas and Capecchi, 1987]. Smithies quant à lui s'efforce d'appliquer ces stratégies à la correction de gènes humains mutés [Koller, et al., 1989]. Avec la contribution de Sir Martin Evans, qui apporta les outils nécessaires à une expression plus concrète de ces techniques de modification ciblée du génome de part ses travaux sur les cellules ES et de leurs utilisations pour la création d'animaux génétiquement modifiés [Capecchi, 1989], on voit alors apparaître les premiers modèles animaux de pathologies humaines dont le modèle murin du syndrome de Lesch-Nyan généré par inactivation du gène *hprt* [Kuehn, et al., 1987] ainsi qu'un autre dont le gène *cfr* porte la plus répandue des mutations humaines responsable de la mucoviscidose [Colledge, et al., 1995]. La mise à la disposition de la communauté scientifique de tels outils a permis de nombreux progrès tant dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie que dans le développement d'outils thérapeutiques pour la traiter. C'est d'ailleurs à ce titre que le prix Nobel de médecine et de physiologie a été décerné en 2007 à Mario Capecchi, Oliver Smithies et Sir Martin Evans. En plus des nombreuses applications issues des travaux pour lesquels ils ont été récompensés, on peut également envisager d'appliquer ces techniques de modifications ciblées du génome, qui permettent d'ailleurs d'introduire des modifications aussi discrètes que le remplacement d'une paire de bases par une autre, à la correction d'un gène muté responsable d'une pathologie à des fins thérapeutiques. Si cette alternative séduisante à la thérapie génique par addition de gènes put être dès cette heure imaginée, il fallut attendre quelques années pour qu'elle naisse, du moins au laboratoire, assistée par le développement de vecteurs de transfert de gènes efficaces et nourrie par l'espoir que l'obtention d'un très faible nombre de cellules souches corrigées ne soit pas un élément limitant dans la réalisation d'un protocole thérapeutique, étant par ailleurs montré qu'un faible nombre de cellules souches peut suffire pour reconstituer un organe dans sa totalité. L'année 1996 marque alors un tournant majeur dans l'histoire des modifications

ciblées du génome à des fins thérapeutiques. Les premiers résultats de l'utilisation de fragments d'ADN pour corriger une mutation responsable d'une pathologie apparaissent [Kunzelmann, et al., 1996]. Quelques mois plus tard, une seconde stratégie basée sur l'utilisation d'une chimère ADN-ARN comme séquence donneuse est présentée comme extrêmement prometteuse et suscite l'enthousiasme [Cole-Strauss, et al., 1996, Yoon, et al., 1996]. C'est le début d'une saga au cours de laquelle apparaîtront quasiment autant d'outils pour la correction génique qu'il existe de vecteurs de transfert de gènes.

II - La correction génique, une forme de génothérapie

1 - Principe

La thérapie génique par addition de gènes consiste à ajouter une copie fonctionnelle d'un gène au génome d'une cellule dont ce même gène se trouve être muté et à l'origine d'un déficit fonctionnel causé par l'absence de protéines fonctionnelles. En marge de cette stratégie de thérapie par les gènes, qui s'avère être une correction du phénotype par greffe en un site quelconque du génome d'une version fonctionnelle du gène assurant la suppléance du gène défectueux laissé en place, il existe une alternative séduisante qui consiste en une correction du génotype par réparation de l'anomalie génétique. Cette dernière approche, que l'on pourrait qualifier de thérapie du gène, permet également de voir restaurer la synthèse d'une protéine fonctionnelle mais est accompagnée d'implications majeures qui la distinguent de la thérapie génique par addition de gène et qui assoient le rationnel concernant son utilisation.

1.1 - Les acteurs de la correction génique

Bien que nombreuses, toutes les stratégies de correction génique ont en commun qu'elles s'articulent autour de trois acteurs indispensables à leur réalisation. Ceux-ci sont le gène muté, cible de la réparation, l'agent correcteur, qui est au minimum constitué d'une séquence d'acides nucléiques homologue à la région mutée du gène à réparer mais ne présentant pas la mutation, et le groupe des systèmes de réparation de l'ADN qui viendront opérer les mécanismes de correction du gène muté par l'agent correcteur. Cette situation réunissant une séquence d'ADN mutée ou lésée, une autre sauvage et des protéines de la réparation de l'ADN est en fait analogue à celle rencontrée dans le cas de la réparation conservative d'un gène présentant une lésion.

1.2 - Le gène cible

Le rôle joué par le gène cible est d'être le substrat de la réparation. C'est à lui que viennent les deux autres acteurs de la réparation pour y réaliser la correction.

1.3 - Les mécanismes de réparation de l'ADN

En permanence, notre génome subit de très nombreux dommages [Lindahl, 1993], ou lésions, susceptibles de perturber l'intégrité du génome ou de la cellule, que ce soit à un niveau structural comme dans le cas de l'introduction de cassures double-brins de l'ADN générant une discontinuité de la molécule d'ADN ou à un niveau fonctionnel en modifiant la séquence normalement contenue au sein d'un gène. Heureusement, des mécanismes de réparation de l'ADN existent pour pallier aux conséquences des nombreux types de dommages que peut subir l'ADN. Les principaux agents créant des dommages à l'ADN ainsi que les lésions qu'ils produisent et les voies de réparation impliquées dans leur élimination sont présentées en Figure 2.

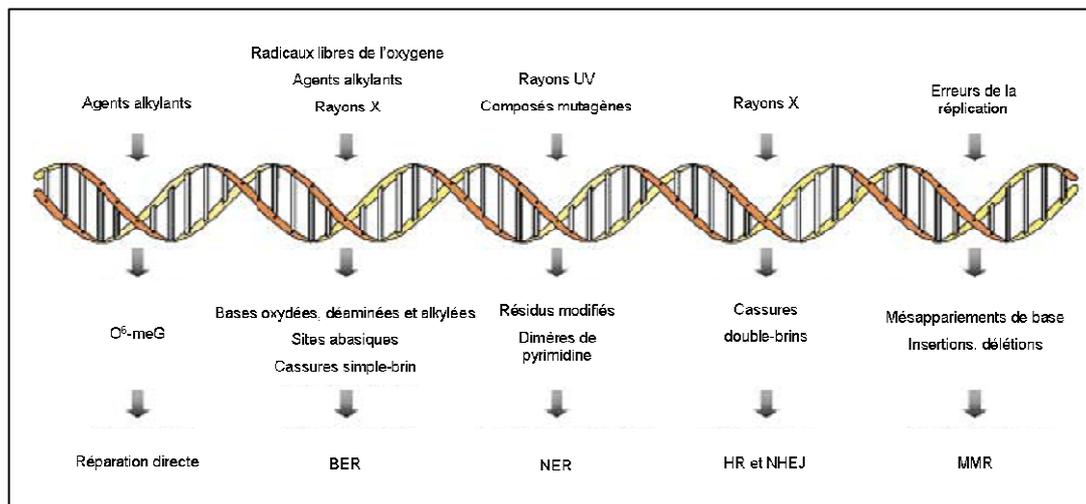


Figure 2. Principaux agents causant des dommages à l'ADN, principales lésions et principales voies de réparation.

BER, base excision repair, NER, nucleotide excision repair, HR, homologous recombination, NHEJ, non-homologous end joining, MMR mismatch repair.

Six grandes voies de réparation apparaissent pour répondre aux besoins suscités par cinq grands types de lésions. Bien que toutes puissent être impliquées dans les mécanismes de correction génique, je ne décrirai en détail que celles dont l'implication est la plus certaine ou pouvant interférer avec celle-ci et ne ferai que présenter brièvement les autres voies de réparation. Parmi, celles-ci, citons la réparation par réversion directe du dommage (*direct repair* ou *direct reversal*) qui permet grâce à des alkylguanine transférase d'éliminer les groupements alkyles des O⁶-alkylguanine (notamment des O⁶-méthylguanine) formées

après irradiation sous rayonnement ultra-violet. Lorsque les bases azotées de l'ADN sont lésées par oxydation, déamination ou alkylation, c'est un mécanisme de réparation par excision de base (BER, *base-excision repair*) qui intervient et au cours duquel la base lésée est hydrolysée par des glycosylases puis le site abasique formé est éliminé par une AP endonucléase conjointement à la repolymérisation du brin lésé par une ligase. Plusieurs variantes de cette voie de réparation existent selon que la glycosylase permettant l'élimination de la base lésée ait elle-même une activité AP endonucléase ou non et selon le type de polymérase puis de ligase impliquées dans la reconstitution de la séquence double-brins (*short patch repair* et *long patch repair*). Enfin, une autre voie de réparation appelée réparation par excision de nucléotide (NER, *nucleotide-excision repair*) permet de restaurer l'intégrité d'une séquence d'ADN lésée par la présence de bases liées à des groupements chimiques ou dimérisées (dimères de pyrimidine). La réparation est effectuée par excision du fragment simple-brin contenant le résidu endommagé sur une longueur d'une trentaine de nucléotides puis par repolymérisation au cours d'étapes faisant intervenir une trentaine de facteurs tels que des protéines liant l'ADN, des endonucléases, des polymérases et des ligases. L'ensemble de ces facteurs est nécessaire à la réparation de séquences non-transcrites comme le sont la plupart des régions du génome valant alors à cette voie le nom de réparation globale du génome (GGR, *global genome repair*). Lorsque le gène lésé est transcrit, des facteurs additionnels sont nécessaires pour qu'ait lieu une forme spécialisée de NER appelée réparation couplée à la transcription (TCR, *transcription-coupled repair*).

1.3.1 - Réparation des cassures double-brin de l'ADN

Lorsque des cassures double-brins apparaissent au sein du génome, quelles qu'en soient leurs origines, deux voies de réparation sont possibles. L'une, dite conservative, permet de restaurer la séquence nucléotidique telle qu'elle était avant qu'elle ne subisse un dommage. Ce type de réparation, qui permet de restaurer l'intégrité physique et fonctionnelle du génome, s'opère grâce à l'implication de nombreux facteurs protéiques et nécessite la présence d'une séquence fonctionnelle pour réparer la séquence lésée par un mécanisme appelé recombinaison homologue (HR, *homologous recombination*). Ce mécanisme hautement complexe n'est pas prédominant chez les eucaryotes supérieurs et s'observe essentiellement pour des cellules en méiose ou se divisant très activement. La recombinaison homologue s'observe principalement en phase S et en phase G2, phases pendant lesquelles une des deux chromatides sœurs peut

servir de séquence donneuse pour la réparation de la seconde. La recombinaison homologue peut également s'effectuer entre deux chromosomes homologues (cas des autosomes), bien que plus rarement. Lorsqu'elle s'effectue entre une séquence lésée par une cassure double-brin et une séquence donneuse non-lésée comme illustré en Figure 3, la première étape consiste à modifier les extrémités double-brins formées au niveau de la lésion pour générer des extrémités 3' dépassantes [Cromie, et al., 2001, Kowalczykowski, et al., 1994, Modesti and Kanaar, 2001, Paques and Haber, 1999].

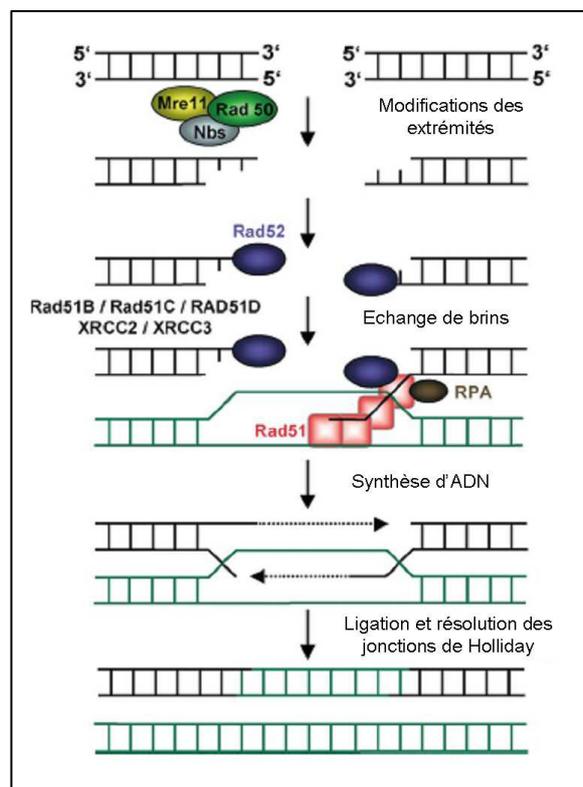


Figure 3. Schéma des différentes étapes de réparation d'une cassure double-brins par recombinaison homologue.

Adapté d'après [Christmann, et al., 2003].

Cette étape de reconnaissance et de modification des extrémités est réalisée par le complexe trimérique MRN composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1, complexe également impliqué dans la voie de réparation de type NHEJ, et par d'autres facteurs apportant l'activité exonucléase 5'-3' nécessaire à la formation des extrémités 3' dépassantes. La protéine Rad52, affine pour l'ADN simple-brin, se lierait à l'extrémité formée et engagerait alors la réparation vers un mécanisme de type recombinaison homologue. La seconde étape de la recombinaison homologue, initiée par la liaison de Rad52 aux extrémités simple-brin 3' dépassantes, occupe

une place centrale dans le mécanisme de recombinaison homologue. La protéine Rad51, homologue de la protéine bactérienne RecA, se polymérise sur l'ADN simple-brin pour former des filaments de nucléoprotéines qui représentent l'élément actif dans la recherche d'homologie au sein de la séquence donneuse et dans la réaction d'échange de brins [Baumann, et al., 1996, Baumann and West, 1998, Gupta, et al., 1997, Ogawa, et al., 1993, Sung, 1994]. Toutefois, la protéine Rad51 présentant une affinité pour l'ADN simple-brin moindre comparée à celle de son homologue bactérien RecA, d'autres facteurs sont nécessaires à la formation des filaments de nucléoprotéines. La protéine RPA (*replication protein A*) élimine les structures secondaires formées au niveau de la région simple-brin tandis que la protéine Rad52 facilite la liaison de Rad51 à l'ADN simple-brin en présence de RPA. D'autres protéines présentant des homologies avec la protéine Rad51 (Xrcc2, Xrcc3, Rad51B, Rad51C et Rad51D) [Thacker, 1999, Thompson and Schild, 2001] faciliteraient également la réaction d'échange de brins comme c'est le cas chez la levure avec les protéines Rad55 et Rad57 [Sung, 1997]. La protéine Rad54 stimulerait aussi cette réaction. Elle pourrait modifier la topologie de l'ADN de façon à promouvoir la réaction d'échange de brins [Essers, et al., 2002] entre les deux séquences et pourrait faciliter l'accès à la cible à réparer en interagissant avec les protéines nucléosomales [Ristic, et al., 2001, Van Komen, et al., 2000].

Enfin, les dernières étapes du mécanisme de recombinaison homologue chez les eucaryotes supérieurs sont mal connues mais seraient très similaires à celles observées chez les bactéries dans lesquelles les protéines RuvA et RuvB assurent la migration de la branche formée tandis que la protéine RuvC catalyse la résolution des jonctions de Holliday. Un complexe aux activités de migration de branches (*branch migration*) et de résolution des jonctions de Holliday similaires à celle du complexe RuvABC chez la bactérie a été identifié chez les eucaryotes [Constantinou, et al., 2001]. Il permettrait la progression de la structure formée des deux molécules jointes réalisant ainsi la repolymérisation de la séquence lésée en utilisant comme matrice la séquence donneuse et, aidée par la protéine Mus81, opèrerait la résolution des jonctions de Holliday pour libérer les deux molécules d'ADN l'une de l'autre [Boddy, et al., 2001, Chen, et al., 2001].

L'autre voie de réparation possible des cassures double-brins est non-conservative et ne restaure que l'intégrité physique du génome qui se voit perdre quelques nucléotides au niveau de la cassure double-brin. Nommée réparation par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ, *non-homologous end joining*), elle entre en compétition avec la recombinaison

homologue et s'effectue sans matrice donneuse de séquence fonctionnelle. Chez les eucaryotes supérieurs, cette voie de réparation prédomine sur la recombinaison homologue et est à l'origine de la réparation de la plupart des cassures double-brins. Elle intervient également dans la recombinaison V(D)J comme dans la maintenance des télomères. Ses mécanismes moléculaires sont relativement simples et sont illustré en Figure 4.

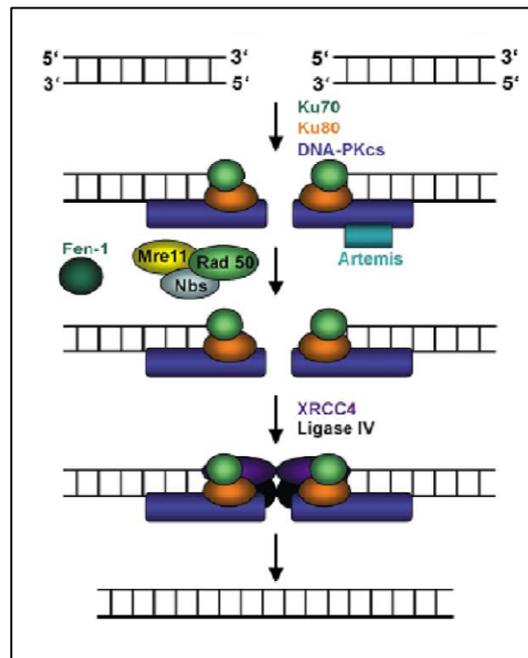


Figure 4. Schéma des différentes étapes de réparation d'une cassure double-brins par jonction d'extrémités non-homologues.

Adapté d'après [Christmann, et al., 2003].

Brièvement, les extrémités double-brins formées par la cassure double-brins sont reconnues et liées par le complexe hétérodimérique Ku70/Ku80 qui recrute la sous-unité catalytique d'une kinase DNA-dépendante (DNA-PKcs) pour former le complexe DNA-PK [Dyan and Yoo, 1998, Smith and Jackson, 1999]. La protéine DNA-PKcs est capable de s'autophosphoryler et de phosphoryler de nombreuses protéines comme les protéines Ku, Xrcc4 ou bien même p53, probablement pour les activer. Les extrémités lésées sont alors dégradées sur quelques nucléotides par un mécanisme faisant probablement intervenir les protéines Fen-1 et Artémis puis le complexe formé de Xrcc4 et la DNA Ligase IV interagirait avec les protéines Ku et interviendrait pour joindre et ligaturer les deux molécules [Chen, et al., 2001, Goedecke, et al., 1999, Huang and Dyan, 2002, Nick McElhinny, et al., 2000]. Des études menées chez la levure montrant l'implication du complexe Mre11/Rad50/Xrs2 dans la NHEJ suggèrent

l'implication de son homologue humain, le complexe Mre11/Rad50/Nbs1 dans cette voie de réparation [Critchlow and Jackson, 1998, Haber, 2000].

1.3.2 - Réparation des mésappariements

Bien qu'extrêmement fidèles et douées d'activité dite de lecture d'épreuve (*proof-reading*), les polymérases introduisent toutefois de rares erreurs au sein des séquences qu'elles ont synthétisées, erreurs observables par la formation de distorsions au sein de la double hélice dues à la présence de bases non appariées (mésappariements) ou de bases excédentaires sur l'un des deux brins (insertions et délétions). Chez la bactérie, le mécanisme en charge de l'élimination de ces structures aberrantes et de la restauration de la séquence d'origine est particulièrement bien décrit [Lahue, et al., 1989, Modrich, 1991, Modrich and Lahue, 1996]. Nommé système de réparation des mésappariements (MMR, mismatch repair), il fait intervenir les protéines MutS, MutL et MutH. La protéine MutS reconnaît le mésappariement et s'y lie, puis par translocation le long de la molécule d'ADN, elle recrute la protéine MutL et déclenche la formation du réparosome ou complexe MMR auquel participe la protéine MutH. Cette dernière intervient notamment dans l'étape permettant de discriminer le brin néosynthétisé à repolymériser du brin parental à conserver, cette discrimination étant basée sur le statut méthylé ou non-méthylé des brins d'ADN mis en jeu [Modrich, 1991, Modrich and Lahue, 1996]. Chez les eucaryotes, on retrouve un mécanisme de réparation des mésappariements similaire faisant intervenir trois homologues à la protéine bactérienne MutS, qui sont les protéines MSH2, MSH3 et MSH6 (*pour MutS homologue 2, 3 et 6*), et trois autres homologues à la protéine MutL, les protéines MLH1, MLH3 et PSM2 (*pour MutL Homologue 1 et 3 et post-meiotic segregation 2*) [Harfe and Jinks-Robertson, 2000]. Comme illustré en Figure 5 pour la réparation d'un mésappariement, la première étape consiste en la reconnaissance du dommage par l'hétérodimère MutS α (formé des protéines MSH2 et MSH6) dans le cas de mésappariements ou de petites insertions ou délétions ou par l'hétérodimère MutS β (formé des protéines MSH3 et PSM2) [Hsieh, 2001, Jiricny, 1998] dans le cas d'insertions ou de délétions de tailles variables [Acharya, et al., 1996, Genschel, et al., 1998, Iaccarino, et al., 1998].

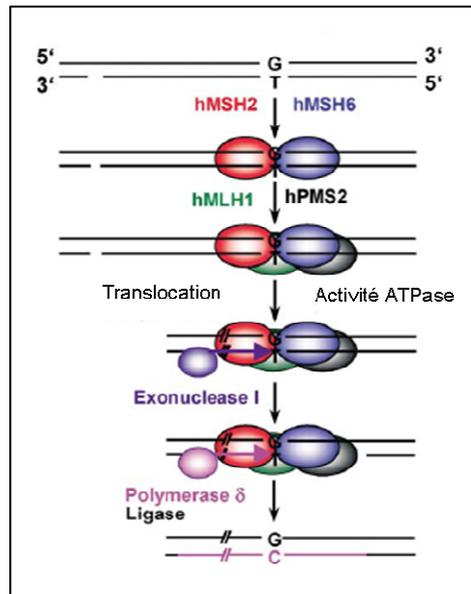


Figure 5. Schéma des différentes étapes de la réparation des mésappariements.

Adapté d'après [Scharer, 2003].

L'un et l'autre déclenchent la formation du complexe de réparation des mésappariements comme le fait MutS chez la bactérie par une activité ATPase. La formation du réparosome se fait alors avec les protéines MLH1 et PSM2 (complexe MutL α) si la réaction est initiée par le complexe MutS α ou avec les protéines MLH1 et MLH3 (complexe MutL β) dans l'autre cas. A la différence de ce qui est décrit chez la bactérie, il n'y aurait pas chez les eucaryotes de discrimination de brin basée sur le degré de méthylation des brins mais probablement un mécanisme couplé à la réplication permettant l'identification du brin néosynthétisé au travers d'une forme de mémoire de la réplication [Jiricny, 1998]. Cette discrimination faite, une césure introduite au sein du brin à resynthétiser est réalisée par l'exonucléase I et sert de point d'entrée pour une dégradation exonucléolytique du brin qui est peut-être assistée par des hélicases [Szankasi and Smith, 1995, Tran, et al., 2001] et suivie d'une repolymérisation par la polymérase δ .

1.3.3 - Réponses aux dommages à l'ADN

Lorsque des lésions de l'ADN apparaissent, leur élimination n'est pas systématique. Les mécanismes de réparation des dommages proprement dit sont inscrits dans un processus régulé qui tient compte d'autres facteurs que le type de lésion à réparer, en l'occurrence leur nombre ainsi que d'autres facteurs encore mal connus. Si ces mécanismes de réparation des

dommages ne sont déjà pas très simples du point de vue moléculaire, leurs régulations et leurs imbrications avec les autres fonctions cellulaires le sont encore moins. Parce que leur régulation fait intervenir de très nombreux facteurs, souvent communs à plusieurs voies de réparation, nous ne présenterons qu'une vision synthétique et simplifiée de ces voies de régulation et ne citerons que les principaux facteurs protéiques impliqués dans la réponse aux dommages causés à l'ADN comme illustré en Figure 6.

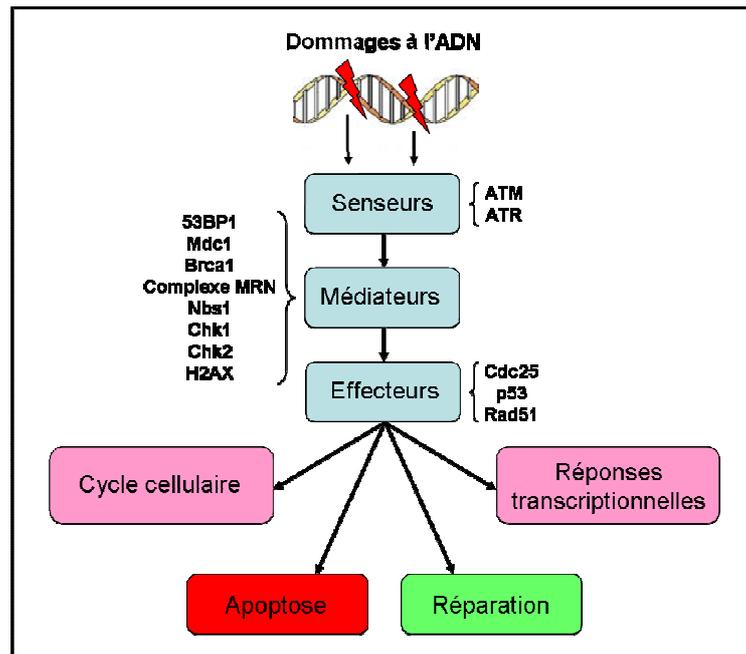


Figure 6. Schéma des différentes étapes de la réponse aux dommages causés à l'ADN.

Dans un premier temps, des *senseurs* tels que les protéines ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) et ATR (ATM related protein) détectent les dommages causés à l'ADN et, en réponse à cette situation, ATR module l'activité de nombreux facteurs appelés *médiateurs*, tels que les protéines 53BP1, Mdc1, Brca1, le complexe MRN, Nbs1, Chk1, Chk2 et la protéine histone H2AX. Ces derniers ordonnent ou interdisent la réparation selon qu'elle semble réalisable ou non (tenant compte de l'étendue des dommages subis ainsi que d'autres facteurs encore mal connus) en activant à leur tour un grand nombre de facteurs appelés *effecteurs* (par exemple Cdc25, p53 ou bien Rad51). Ces facteurs engagent alors la cellule vers une tentative de survie par réparation des dommages causés à l'ADN ou vers l'apoptose. Parallèlement, ils modulent aussi l'activité des protéines contrôlant le cycle cellulaire et ils

activent des facteurs transcriptionnels, lesquels permettent la synthèse d'autres facteurs nécessaires pour orchestrer la réponse programmée.

1.4 - Les agents correcteurs

Si dans les conditions physiologiques, les mécanismes de réparation conservative de l'ADN utilisent nécessairement pour la resynthèse d'une séquence lésée des séquences endogènes comme matrice (par exemple une chromatide sœur ou un chromosome homologue pour la recombinaison homologue ou le brin d'ADN non-lésé ou parental pour la réparation des autres lésions ou des mésappariements), il est nécessaire pour l'expérimentateur désireux de corriger une séquence d'ADN d'introduire au sein du noyau de la cellule la séquence nucléotidique qu'il voudrait voir être utilisée comme matrice pour la réparation du gène ciblé. Cette séquence doit être de type ADN et doit nécessairement contenir une région homologue au gène ciblé au sein de laquelle apparaît la modification de séquence à introduire. Comme nous le verrons plus tard, la séquence d'ADN correctrice, ou agent correcteur, peut être plus ou moins longue (de quelques dizaines de bases ou plusieurs kilobases) et de structure simple ou double-brins. Bien que probablement utilisés comme matrice dans des voies de réparation différentes, tous permettent d'obtenir la modification voulue lorsqu'ils sont efficacement administrés jusqu'au noyau des cellules à traiter. C'est d'ailleurs à ce titre que l'emploi des techniques de transfert de gènes d'aujourd'hui permet de pratiquer des expériences de correction génique avec une relative aisance. En effet, les outils de transfert d'acides nucléiques sont aujourd'hui très performants et rendent alors possible la réalisation d'expériences de correction génique sans recourir à des techniques lourdes de mise en œuvre comme l'est la microinjection nucléaire. D'une part, le développement des techniques physiques (électroporation ou biolistique) et physicochimiques (transfection avec des lipides cationiques ou des polycations) de vectorisation d'acides nucléiques permet d'administrer efficacement des acides nucléiques aux noyaux des cellules. D'autre part, les séquences nucléotidiques à administrer au noyau des cellules peuvent aussi être vectorisées par l'intermédiaire d'un vecteur viral avec les avantages que cela comporte. Aujourd'hui, la plupart des vecteurs viraux de transfert de gènes ont été utilisés pour le transfert d'agents correcteurs en vue d'une correction génique. Parmi eux, on compte les vecteurs viraux dérivés de l'adénovirus (Ad), du virus associé à l'adénovirus (AAV) et du virus responsable de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1).

2 - Avantages et inconvénients d'une approche thérapeutique par correction génique

L'approche de thérapie génique par correction de gènes présente de nombreux avantages comparée à l'approche par addition de gènes, ce qui lui vaut d'ailleurs parfois d'être qualifiée d'approche de thérapie génique parfaite [Lewin, et al., 2005, Liu, et al., 2004]. En effet, le gène corrigé reste sous le contrôle de son promoteur et des autres séquences régulant son niveau d'expression assurant ainsi des niveaux d'expression physiologiques du gène corrigé. Ce point est particulièrement important compte tenu qu'il garantit une expression du gène régulée physiologiquement et limitée aux tissus devant l'exprimer. Aussi, la taille du gène à corriger n'intervient pas comme un facteur limitant comme elle peut l'être dans le cadre d'une thérapie génique par addition pour de grands gènes. Un autre avantage notable d'une approche de correction génique naît du fait que le gène corrigé demeurera théoriquement *ad vitam æternam* en son locus assurant alors sa persistance à long-terme. Par ailleurs, les risques de mutagenèse insertionnelle liés à l'intégration aléatoire au sein du génome de certains vecteurs viraux pourraient être limités. De même, la persistance de l'agent correcteur au sein de la cellule, une fois son action corrective réalisée, étant nullement nécessaire, on peut alors espérer obtenir des cellules corrigées exemptes de tout élément génétique exogène, notamment de séquences d'origine virale ou bactérienne. Enfin, l'approche de thérapie génique par correction de gènes permettrait de soigner des maladies génétiques causées par des mutations dominantes [Chamberlain, et al., 2004, Lewin, et al., 2005] ce qui n'est pas le cas de la thérapie génique par addition de gènes.

Ceci étant, l'approche de thérapie génique par correction de gènes présente un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord, puisqu'elle consiste en partie en un transfert de séquences par les mêmes vecteurs de transfert que ceux utilisés pour la thérapie génique par addition de gènes, les mêmes problèmes liés à l'utilisation de ces vecteurs pourront être rencontrés. Plus encore, les efficacités de correction génique observées sont faibles et ne permettent d'envisager aujourd'hui que des stratégies thérapeutiques où le faible nombre de cellules corrigées n'est pas un facteur limitant pour leur succès. Egalement, bien que la réparation soit particulièrement précise et fidèle [Zheng, et al., 1991], il a été observé que des mutations peuvent être introduites par la réparation [Bertling, 1994]. Enfin, un dernier inconvénient tient au fait que, et c'est particulièrement le cas pour les stratégies basées sur l'utilisation d'agents correcteurs de courtes tailles, il devra être nécessaire de développer pour le traitement d'une même maladie génétique autant d'agents correcteurs que de mutations du gène existant dans la population.

3 - Outils pour la correction génique

3.1 - Systèmes d'évaluation

Si aujourd'hui certaines tentatives de correction génique d'un gène muté impliqué dans une maladie génétique ont été réalisées *in vivo* chez la souris [Andrieu-Soler, et al., 2005, Bertoni, et al., 2005, Miller, et al., 2006], la plupart des expériences de correction génique réalisées se limitent à la correction d'un gène, le plus souvent un gène rapporteur muté, au sein de populations de cellules eucaryotes. Toutefois, de nombreux systèmes divers et variés ont été utilisés pour évaluer les efficacités de correction génique d'un agent correcteur ou pour en étudier les propriétés et mécanismes mis en jeu, ces systèmes se distinguant, entre autre, par le type de cellules utilisé, le gène ciblé et sa localisation nucléaire ainsi que par la méthode de transfert de l'agent correcteur employée (lorsque ce dernier doit être vectorisé par des approches non-virales).

3.1.1 - Systèmes « cellulaires »

Parmi les différents systèmes « cellulaires » utilisés, on compte tout d'abord l'utilisation de souches bactériennes de type *Escherichia coli* [Drury and Kmiec, 2003, Li, et al., 2003] ou de levures de type *Saccharomyces cerevisiae* [Parekh-Olmedo, et al., 2002] mais l'essentiel des expériences de correction génique publiées sont réalisées avec des cellules eucaryotes autres que des levures, notamment des cellules de mammifères d'origine murine ou humaine. Seules quelques publications rapportent des expériences de correction génique réalisées hors de cette classe et concernent essentiellement l'utilisation de cellules d'insecte (lépidoptère) [Mon, et al., 2004]. Parmi les très nombreux types de cellules de mammifères utilisés, la plupart correspondent à des cellules transformées ou immortalisées telles que les lignées cellulaires HEK293 [Nickerson and Colledge, 2003], HeLa [Wu, et al., 2005], HT-1080 [Cornu and Cathomen, 2007], DLD-1 [Brachman and Kmiec, 2005] ou CHO [Adair, et al., 1998] mais on rencontre également des études menées avec des cultures primaires. Il s'agit essentiellement de cultures de cellules fibroblastiques [Hendrie and Russell, 2005] ou musculaires [Isman, et al., 2008] d'origine murine comme de cultures primaires de fibroblastes humains [Trobridge, et al., 2005] ainsi que des cultures de cellules souches embryonnaires (ES, *embryonic stem cell*) [Pierce, et al., 2003] ou mésenchymateuses (MSC, *mesenchymal stem cell*) [Flagler, et al., 2008]. Notons également la possibilité d'utiliser les extraits nucléaires de ces différents

types de cellules pour la réalisation d'expériences de correction génique dite *in vitro* au sens strict du terme (par opposition à *in cellulo*) [Igoucheva and Yoon, 2000].

3.1.2 - Localisation, nature et type de mutation du gène cible

On distingue également deux types d'expériences selon que le gène cible soit intégré au sein de la chromatine (correction génique chromosomale) ou soit porté par un épisode au sein du noyau (correction génique épisomale). Dans le cas d'une correction génique épisomale, sa mise en œuvre est relativement aisée et permet d'évaluer rapidement la fonctionnalité d'un agent correcteur. En effet, il suffit d'administrer l'agent correcteur et sa cible à des cellules en culture. Aussi, les efficacités de correction génique sont beaucoup plus importantes que dans le cas d'expériences de correction génique chromosomale, ce qui facilite les analyses et permet de détecter des événements de correction génique d'agents très peu efficaces. Cependant, ce mode d'évaluation est tout à fait artificiel compte tenu de la position épisomale des gènes ciblés, de leur grand nombre au sein de chaque noyau et du fait de leur coadministration avec l'agent correcteur, ce qui peut favoriser leurs interactions. Pour ces raisons entre autres, ce type d'expérimentation ne peut suffire pour évaluer fidèlement le potentiel des agents correcteurs et il doit être recouru à l'usage de cultures de cellules dans lesquelles le gène cible à corriger est intégré au sein de la chromatine pour la réalisation d'expériences de correction génique chromosomale. Dans ce cas, des populations de cellules contenant une ou plusieurs copies intégrées du gène à corriger doivent être générées. Cela est le plus souvent réalisé par la transfection stable du plasmide cible et parfois par intégration rétrovirale [Cornu and Cathomen, 2007].

Mises à part ces distinctions concernant le type cellulaire utilisé et la localisation du gène cible, on distingue également de nombreux gènes cibles utilisés dans ces expériences. La plupart d'entre eux sont des gènes rapporteurs pour les avantages qu'ils confèrent quant à l'analyse des phénotypes (sauvage ou mutant) aisément distinguables qu'ils engendrent. Il est d'ailleurs le plus souvent fait usage de gènes rapporteurs mutés qui seront par la suite corrigés étant donné qu'il est plus aisé d'observer une faible augmentation d'un signal rapporteur au sein d'un bruit de fond que d'observer une baisse du signal d'un même ordre au sein d'un signal fort [Bennett and Schaack, 2003]. Parmi les gènes utilisés, on rencontre fréquemment le gène eGFP codant pour l'eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) [Radecke, et al.,

2004, Tran, et al., 2003, Yin, et al., 2005], le gène LacZ codant pour la β -galactosidase [Pierce, et al., 2003], le gène Luc codant pour la luciférase [Bennett and Schaack, 2003] ou bien encore le gène codant pour la tyrosinase [Igoucheva and Yoon, 2000]. En marge de l'utilisation de gènes rapporteurs, on rencontre également des études visant à corriger des gènes d'intérêt thérapeutique mutés comme le gène de la β -globine [Khanahmad, et al., 2006] ou le gène *cfir* [Sangiulo, et al., 2002], bien que beaucoup plus rares. Notons pour finir que dans la très grande majorité des cas, les gènes rapporteurs sont mutés par l'introduction de mutations ponctuelles (substitution) de type non-sens ou faux-sens et plus rarement par de petites délétions ou insertions.

3.1.3 - Méthodes d'analyses de la réparation

Les efficacités de correction génique étant parfois très faibles, les méthodes à mettre en œuvre pour évaluer fidèlement la proportion de cellules au sein desquelles des événements de correction génique ont eu lieu doivent être adaptées à cette situation en usant d'analyses très sensibles et en analysant un grand nombre de cellules. Lorsque la mesure de la proportion de cellules corrigées est réalisée par l'analyse du phénotype sauvage ou mutant des cellules traitées, il convient de s'assurer de l'absence de faux-positifs pouvant résulter de la réversion spontanée du gène muté ou d'une invalidation incomplète du gène permettant la production d'une protéine non totalement dépourvue de ses propriétés biologiques. Pour confirmer le phénotype observé, une analyse du produit du gène peut également être réalisée, lorsque cela est possible, au travers d'une identification sélective des protéines mutantes ou sauvages par des techniques immunochimiques. Enfin, pour confirmer que la correction génique a bien eu lieu comme désirée et que le phénotype corrigé observé en est bien la conséquence, l'analyse du matériel génétique des cellules traitées peut être réalisée. Théoriquement, il serait possible dans certains cas de confirmer la correction génique en analysant les transcrits du gène cible, notamment pour le cas de la correction de mutations affectant l'épissage du transcrit du gène mais il n'est pas rapporté d'études le faisant. Naturellement, l'ADN extrait des cellules traitées peut être analysé pour tenter de confirmer l'effective correction du gène muté. Toutefois, il n'est pas souhaitable d'utiliser des techniques d'amplification du matériel génétique par PCR pour détecter de rares séquences corrigées au sein de la population traitée toute entière compte tenu des artefacts pouvant être introduits par cette méthode [De Semir and Aran, 2003] ainsi que de la possible amplification des séquences correctrices, lorsqu'elles

peuvent être amplifiées, persistant au sein de l'échantillon [Maurisse, et al., 2006]. Cependant, après clonage monocellulaire et amplification des cellules traitées, les ADN génomiques des clones formés peuvent être caractérisés par l'étude de leur polymorphisme de longueur des fragments de restriction si la modification de séquence réalisée en génère un [Lombardo, et al., 2007, Radecke, et al., 2004] ou par séquençage.

3.2 - Agents correcteurs - Stratégies de correction génique

Depuis les travaux de Mario Capecchi et de ses collègues, la communauté scientifique dispose, pour réaliser des modifications ciblées du génome, d'une stratégie basée sur l'utilisation de fragments d'ADN double-brins de plusieurs kilobases, mais la nécessité de disposer d'outils pour la correction génique toujours plus performants a fait voir le jour à d'autres agents correcteurs. Aujourd'hui, des grands fragments d'ADN simple-brins sont également utilisés pour la correction génique ainsi que de tous petits, appelés oligodéoxynucléotides (ODN) après qu'ils aient tous deux été vectorisés jusqu'au noyau. Des vecteurs viraux sont également utilisés pour le transfert de séquences d'ADN simple ou double-brins homologues au gène cible. Parmi ces vecteurs, on compte des vecteurs dérivés de l'adénovirus, du virus associé à l'adénovirus (AAV) ou du lentivirus humain HIV-1. Seuls les agents correcteurs les plus utilisés seront présentés ci-après, à savoir les fragments d'ADN double puis simple-brin, les oligodéoxynucléotides simple-brin et pour finir les vecteurs dérivés de l'AAV.

3.2.1 - Fragments d'ADN double-brins

Type d'agents correcteurs

La plupart des modifications ciblées du génome réalisées depuis les travaux de Mario Capecchi ont été obtenues en utilisant des fragments d'ADN double-brins permettant l'insertion d'une séquence additionnelle au sein d'un gène donné. Ces fragments, appelés vecteurs de ciblage de type *ends-in* ou vecteurs d'insertion [Smithies, et al., 1985], s'opposent en quelques sortes aux vecteurs de remplacement, ou vecteurs de ciblage de type *ends-out* [Gong and Golic, 2003], comme ceux utilisés dans des expériences de correction génique visant à remplacer une séquence par une autre et pour lesquels le terme d'agent correcteur peut alors être employé pour les désigner. Pour chacun des ces deux types de vecteurs de

ciblage, la modification du gène ciblé s'opère par des mécanismes de type recombinaison homologue bien qu'il existe plusieurs modèles pour expliquer le détail moléculaire de la recombinaison selon que le vecteur soit d'insertion (modèle de Szostak) [Szostak, et al., 1983] ou de remplacement. Pour ces derniers, les événements de recombinaison les impliquant sont le plus souvent expliqués par un double événement de *crossing-over* se produisant à chaque extrémité du vecteur [Li, et al., 2001] comme illustré en Figure 7.

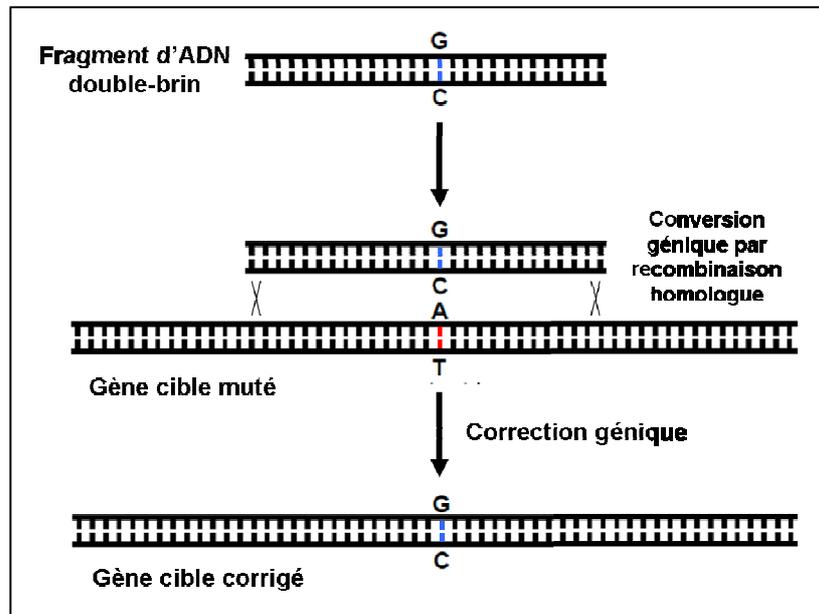


Figure 7. Correction génique par recombinaison homologue.

L'existence d'un autre mécanisme a été suggérée par Leung dans lequel un des deux brins du fragment d'ADN envahit le duplexe chromosomique et forme un long hétéroduplexe qui est assimilé et au sein duquel les mésappariements existants sont corrigés par la voie de réparation des mésappariements [Leung, et al., 1997]. Dans le cas de l'utilisation de courts fragments d'ADN (moins de 1 kilobase), c'est aussi selon ce modèle que la recombinaison s'opèrerait [Leung, et al., 1997].

Nature de la séquence de l'agent correcteur

La nature de la séquence de l'agent correcteur a une influence notable sur l'efficacité de recombinaison. Sa longueur et le degré d'homologie qu'il partage avec sa cible sont des

facteurs influençant fortement l'efficacité de recombinaison. Une première étude montre que lorsqu'un fragment de 9 kb est utilisé, les efficacités de recombinaison sont vingt fois supérieures à celles obtenues avec un fragment de 4 kb [Thomas and Capecchi, 1987]. De nombreuses autres études confirment ce résultat et rapportent que l'efficacité de recombinaison augmente proportionnellement avec la longueur du fragment pour des longueurs allant jusqu'à quinze kilobases comme illustré en Figure 8 pour un vecteur de remplacement [Deng and Capecchi, 1992, Hasty, et al., 1991, Scheerer and Adair, 1994, Shulman, et al., 1990].

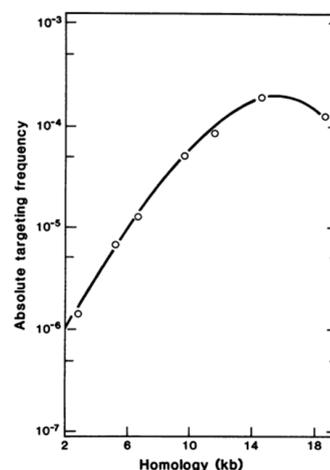


Figure 8. Fréquence de recombinaison en fonction de la longueur du fragment d'ADN.

D'après [Deng and Capecchi, 1992].

Dans le cas de vecteurs d'insertion, il est observé que lorsque l'un des deux bras d'homologie encadrant la séquence à insérer est inférieur à 1 kb, l'efficacité de recombinaison est amoindrie. Toutefois, il est plutôt pensé que cela soit dû à une perte du bras homologue suite à sa dégradation plutôt qu'à une moindre efficacité du vecteur pour la recherche d'homologie et l'échange de brins. Il a également été observé une décroissance de l'efficacité de recombinaison corrélée à la fréquence des petites hétérologies (paires de bases) entre le vecteur et sa cible. Il est par exemple observé une décroissance de l'efficacité de recombinaison d'un facteur 6 lorsque l'homologie que partage le fragment avec sa cible passe de 99,9% à 98,8% [Deng and Capecchi, 1992, Elliott, et al., 1998, van Deursen and Wieringa, 1992], conduisant alors à privilégier l'utilisation de séquences isogéniques [te Riele, et al., 1992]. Notons également que la présence d'un bloc non-homologue au sein du fragment ou à

proximité de ses extrémités n'affecte que légèrement l'efficacité de recombinaison [Hasty, et al., 1992, Mansour, et al., 1990].

La nature des extrémités semble aussi pouvoir affecter l'efficacité de recombinaison. Dans un brevet déposé en 1992 [Selden, et al., 1992], il est rapporté que l'utilisation de fragments d'ADN double-brins présentant de longues extrémités dépassantes en 5' (plusieurs centaines de bases) permet d'obtenir des efficacités de recombinaison cinq à dix fois supérieures. Il est suggéré pour expliquer cet effet que la protéine Rad51, qui se lie aussi bien aux extrémités 3' que 5' dépassantes [McIlwraith, et al., 2000] et qui permet l'échange de brins à partir de chacun d'entre eux, se lierait à ces structures simple-brin et, en interagissant avec le complexe MRN, faciliterait alors l'orientation de la réparation vers un mécanisme de réparation de type recombinaison homologue [Namsaraev and Berg, 1998].

Enfin, l'introduction de résidus modifiés aux extrémités du fragment pourrait modifier leurs propriétés à promouvoir la recombinaison homologue. Dans des cellules de mammifères, on observe jusqu'à mille fois plus d'évènements de recombinaison illégitimes, c'est-à-dire des évènements de recombinaison non-homologues en des loci différents du locus ciblé [Lin, et al., 1985, Thomas, et al., 1986], que d'évènements de recombinaison homologue. Ces évènements, résultant principalement d'un mécanisme de type NHEJ, ne sont pas souhaitables et se font probablement au détriment des évènements de recombinaisons homologues. Pour favoriser ces derniers, il peut être fait l'usage de fragments comportant à leur extrémité 3' un didéoxynucléotide (qui empêche l'élongation du fragment ou sa ligation). Il est alors montré avec un fragment modifié de la sorte et flanqué à chaque extrémité de régions homologues l'une à l'autre, que la ligation de ses extrémités se trouve être réduite d'un facteur cinq comparée à l'efficacité de recombinaison extrachromosomale. Toutefois, la fréquence d'insertion aléatoire du fragment au sein du génome n'est pas modifiée [Chang and Wilson, 1987]. Dans une autre étude, menée chez l'amibe *Dicthyostelium discoideum*, bien que des fréquences d'insertion aléatoire du fragment toujours aussi élevées soient observées, il est rapporté des efficacités de recombinaison plus importantes [Shah-Mahoney, et al., 1997]. Il est aussi évoqué que la présence de ces résidus modifiés puisse stabiliser le potentiel de recombinaison du fragment en le protégeant contre une éventuelle dégradation par des exonucléases cellulaires.

Production et utilisation des fragments d'ADN double-brins

Les fragments d'ADN double-brins utilisés pour la correction génique peuvent être produits par PCR ou isolés à partir de plasmides digérés par des enzymes de restriction dont les sites de reconnaissance encadrent la séquence d'intérêt. De nombreux travaux sont réalisés avec des fragments produits par l'un ou l'autre type de synthèse et il ne semble pas apparaître de différence d'efficacité entre ces deux types de fragments. Une seule étude compare les efficacités de correction génique obtenues après transfection de fragments double-brins d'environ 600 pb produits par PCR ou par digestion enzymatique et montre des efficacités de correction génique accrues d'un facteur 2 avec ces derniers [Tsuchiya, et al., 2005]. Cependant, les deux fragments utilisés ne sont pas totalement identiques. Celui isolé par digestion enzymatique présente de petites extrémités 5' dépassantes tandis que celui produit par PCR à des bouts francs et on ne peut pas exclure que l'effet observé en soit la conséquence compte tenu de l'impact de la nature des extrémités sur les mécanismes de recombinaison. Enfin, notons que quelques publications rapportent que l'utilisation de grands fragments d'ADN double-brin dénaturés par la chaleur pour produire un mélange de fragments simple-brin complémentaires permet d'obtenir des efficacités de correction génique légèrement accrues [Colosimo, et al., 2001, Kunzelmann, et al., 1996].

L'introduction de ces fragments au sein du noyau peut être réalisée de diverses manières. Toutefois, il semble apparaître que les techniques d'administration en masse comme le sont les transfections de fragments d'ADN complexés à des lipides cationiques ou des polycations et les méthodes physiques de type électrotransfert ne permettent pas l'obtention d'efficacité de correction génique aussi importantes que lorsque le fragment est introduit au sein du noyau par microinjection. Dans une étude comparant les efficacités de correction génique obtenues avec un fragment linéaire d'ADN, il est observé des fréquences de recombinaison homologue de 0,8 % lorsque le fragment est microinjecté, tandis que celles observées avec les méthodes d'administration « en masse » sont de l'ordre de 1 à 5 cellules pour dix millions de cellules [Adair, et al., 1998]. Compte tenu que les techniques de type microinjection ne peuvent pas être employées pour des applications *in vivo* et que les fragments d'ADN linéaires sont moins efficacement transfectables que des plasmides circulaires lorsque des techniques d'administration en masse sont employées [Cheng, et al., 1999], il a alors été proposé une

stratégie pour pallier à cette insuffisance [de Piedoue, et al., 2005]. Celle-ci consiste dans un premier temps à exploiter les propriétés topologiques d'un plasmide circulaire pour en assurer son efficace transfert jusqu'au noyau par des techniques d'administration en masse puis à en libérer un fragment d'ADN linéaire après digestion au sein du noyau du plasmide par l'endonucléase I-Sce I dont les sites de reconnaissance encadrent le fragment homologue à libérer.

Autres stratégies pour augmenter l'efficacité de correction génique

D'autres stratégies peuvent également être utilisées pour augmenter les efficacités de correction génique. Parmi elles, on compte tout d'abord des stratégies visant à tirer profit d'une plus forte activité de recombinaison homologue au sein du noyau des cellules traitées. Il est depuis fort longtemps montré que la recombinaison homologue a lieu préférentiellement en milieu de phase S [Wong and Capecchi, 1987] et pour cette raison, traiter les cellules lorsqu'elles sont dans cette phase du cycle cellulaire semble préférable (Figure 9).

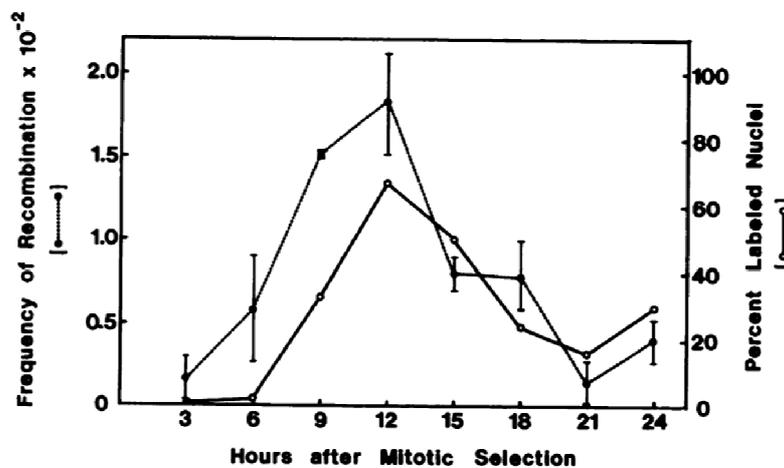


Figure 9. Influence du cycle cellulaire sur la fréquence de recombinaison.

Dans cette expérience, Wong montre l'étroite corrélation existant entre la fréquence de recombinaison (*frequency of recombination*) et la proportion de noyaux en phase S (proportion de noyaux marqués, *percent labeled nuclei*). A différents moments après la sélection de cellules en mitose et leur remise en culture (*hours after mitotic selection*), les cellules sont microinjectées avec les deux molécules recombinantes puis sont incubées dans les conditions nécessaires pour analyser conjointement la proportion de cellules corrigées et la proportion de noyaux en phase S. D'après [Wong and Capecchi, 1987].

Aussi, il est rapporté que l'introduction de cassures double-brins de l'ADN au sein du gène cible stimule très fortement la recombinaison homologue au niveau de ce locus [Smih, et al.,

1995, Taghian and Nickoloff, 1997]. L'utilisation d'endonucléases, de type nucléases à doigts de zinc (ZFN, *zinc-finger nuclease*) ou dérivées d'une méganucléase, spécifiques du gène cible pour introduire une cassure double-brins au niveau de ce locus et y induire la recombinaison permet d'augmenter l'efficacité de correction génique d'environ un facteur 1000 avec des cellules en culture [Epinat, et al., 2003, Porteus, 2006, Urnov, et al., 2005]. Enfin, des oligonucléotides formant des triples hélices (TFO, *triplex forming oligonucleotide*) peuvent également être utilisés pour favoriser la recombinaison homologue au niveau du locus ciblé. Les TFOs sont des petites molécules d'ADN simple-brin, typiquement de 10 à 30 nucléotides de long se liant avec une haute affinité et d'une manière séquence-spécifique dans le grand sillon de duplexes d'ADN au niveau de séquences riches en purine [Seidman and Glazer, 2003]. Lorsqu'ils se lient à proximité de la région ciblée, ils peuvent stimuler la recombinaison intramoléculaire entre deux séquences adjacentes d'un gène en tandem au sein d'un épisode ou d'un chromosome [Faruqi, et al., 2000] et également la recombinaison intermoléculaire entre un fragment d'ADN et une cible intégrée au sein de la chromatine [Knauert, et al., 2006]. En plus de cette propriété de stimulation de la recombinaison homologue, il peut être également tiré parti de leur très forte affinité pour leur cible. En les utilisant liés covalamment aux fragments d'ADN homologues, ils rapprochent ces derniers de leurs cibles et favorisent ainsi leurs interactions, augmentant ainsi l'efficacité de correction jusqu'à un facteur 100 [Chan, et al., 1999, Culver, et al., 1999]. Bien que séduisante, cette approche consistant à utiliser un oligonucléotide bifonctionnel est néanmoins limitée par la difficulté à synthétiser de longues molécules (de plus de 100 résidus), restreignant alors la taille de la région homologue à quelques dizaines de nucléotides et limitant par conséquent le champ des corrections possibles à des mutations discrètes et dans l'environnement immédiat du motif ciblé par le TFO. Pour pallier à cette limitation, une alternative (méthode GOREC pour *guided homologous recombination*) consiste à produire séparément d'une part, un grand fragment d'ADN homologue au gène cible, qui peut être de nature simple ou double-brin, par des techniques conventionnelles et d'autre part, un oligonucléotide simple-brin capable de s'hybrider par une de ses extrémités au fragment d'ADN par complémentarité de bases et présentant à son autre extrémité le TFO comme illustré en Figure 10 pour le cas d'un fragment d'ADN double-brin [Maurisse, et al., 2002].

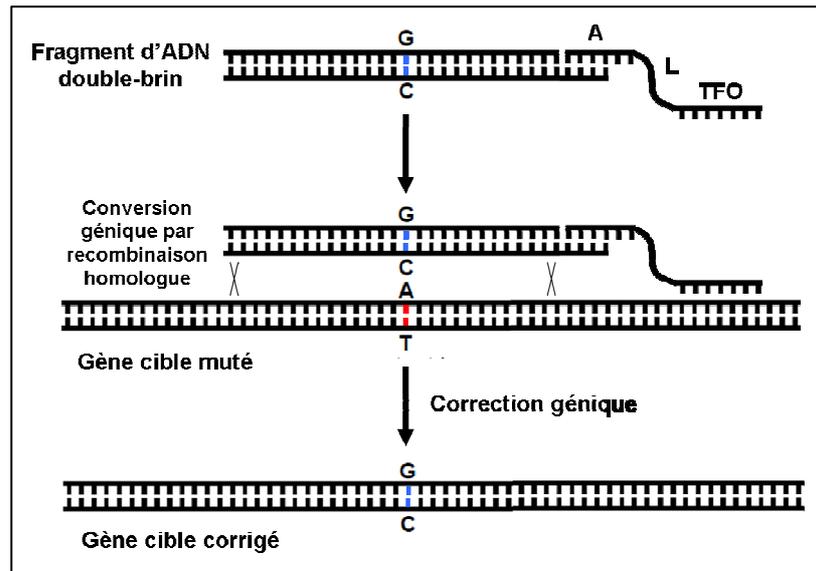


Figure 10. Illustration du principe de la méthode GOREC.

Illustration du principe de la méthode GOREC avec en exemple un fragment d'ADN double-brin lié par l'intermédiaire d'un adaptateur complémentaire à l'extrémité du fragment (A) et d'un lien oligonucléotidique (L) à un motif TFO.

3.2.2 - Fragments d'ADN simple-brins

Une autre approche de correction génique consiste à utiliser de grands fragments d'ADN simple-brins, de séquence sens ou antisens, comme agents correcteurs. Cette méthode s'avère être très attrayante compte tenu des efficacités de recombinaison qu'elle permet d'obtenir et de la moins probable intégration aléatoire du fragment au sein du génome qu'elle semble garantir [Zorin, et al., 2005]. Toutefois, peu d'informations sont disponibles quant aux mécanismes de réparation impliquant ces fragments, bien qu'il s'agisse probablement d'évènements de recombinaison homologue, et très peu de publications rapportent leur utilisation dans le cadre d'expériences de correction génique, probablement en raison de leur difficile production. Une seule équipe étudie le potentiel de ce type de fragments et présente d'ailleurs une stratégie séduisante pour la production de fragments simple-brins de grande taille.

Production des fragments simple-brins

Plusieurs techniques peuvent être envisagées pour la production de fragments d'ADN simple-brins. L'une consisterait à les produire par PCR asymétrique, à partir de fragments d'ADN double-brins et de l'amorce oligonucléotidique nécessaire à l'amplification du fragment d'orientation désirée. Cependant, aucune publication ne rapporte l'utilisation d'une telle technique pour la production de fragments simple-brins utilisés comme agents correcteurs. Une autre stratégie consiste quant à elle à séparer les deux brins d'un mélange de fragments simple-brin complémentaires (obtenus par dénaturation par la chaleur de fragments double-brins). Par exemple, l'utilisation d'un oligodéoxynucléotide biotinylé, complémentaire d'un des deux brins du mélange, permet, après couplage avec des billes magnétiques recouvertes de streptavidine et séparation magnétique, de purifier l'un ou l'autre des fragments. Enfin, une dernière approche est décrite par le Professeur Kamiya et permet la production de fragments d'ADN simple-brins de grandes tailles en associant les avantages liés à la très haute fidélité de la synthèse d'ADN par des systèmes biologiques (comparé aux techniques de PCR) à un haut rendement. Des phagemides (molécules d'ADN simple-brins) contenant la séquence de l'agent correcteur encadrée par des motifs nucléotidiques reconnus par des enzymes de restriction sont produits chez la bactérie *Escherichia coli* après transformation bactérienne et infection par un phage helper. Après extraction des phages récoltés par des techniques conventionnelles et hybridation des phagemides purifiés avec des oligodéoxynucléotides complémentaires des motifs simple-brins reconnus par des enzymes de restriction et digestion par ces mêmes enzymes, le fragment simple-brin libéré contenant la séquence correctrice est alors séparé par électrophorèse sur gel et purifié [Tsuchiya, et al., 2005]. C'est par cette technique que sont produits les fragments simple-brins utilisés dans les expériences dont les résultats sont présentés dans la partie suivante.

Utilisation des fragments simple-brins

Tout d'abord, notons brièvement que ces fragments simple-brins doivent être vectorisés par des approches non-virales comme le sont leurs homologues double-brins. Dans les résultats obtenus par Kamiya présentés ci-après, ces fragments ont été transfectés. Il apparaît dans une première étude que des fragments simple-brins de séquence sens d'environ 600 nucléotides permettent d'obtenir des efficacités de correction génique six fois supérieures à celles générées par un fragment double-brins de même longueur, tandis que son homologue de

séquence antisens n'est pas plus efficace que le fragment double-brin [Tsuchiya, et al., 2005]. Dans une deuxième étude, il montre que la stratégie employée précédemment pour la correction d'une mutation de type substitution peut également l'être pour corriger des insertions ou des délétions d'une paire de base, bien que dans le cas d'une insertion il n'y ait pas d'augmentation de l'efficacité de correction comparé à un fragment double-brins comme illustré en Figure 11A [Tsuchiya, et al., 2005]. Il montre également, à la différence de ce qui est observé pour les fragments double-brins, à savoir que l'efficacité de recombinaison augmente avec la taille du fragment jusqu'à 15 kb, que la longueur optimale du fragment se situe aux environs de 600 nucléotides [Tsuchiya, et al., 2005] comme montré en Figure 11B.

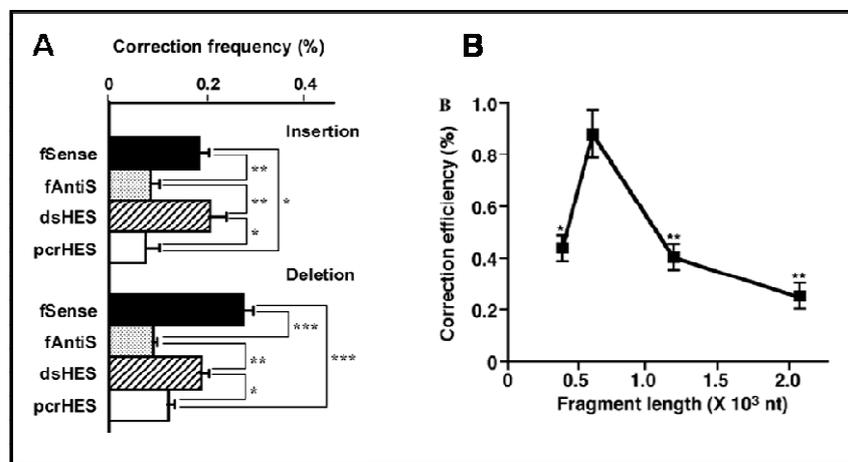


Figure 11. Efficacités de correction génique de fragments simple-brin

Figure 11A : Comparaison des efficacités de correction génique d'une insertion ou d'une délétion par des fragments d'ADN double-brins produits par PCR (pcrHES) ou par digestion enzymatique d'ADN plasmidique (dsHES) et par des fragments simple-brins de séquence sens (fSense) ou antisens (fAntiS) produits à partir de phagemides. D'après [Tsuchiya, et al., 2005].

Figure 11B : Comparaison des efficacités de correction génique d'une mutation de type substitution par des fragments d'ADN simple-brins de séquence sens de différentes longueurs. D'après [Tsuchiya, et al., 2005].

Aussi, l'efficacité de correction ne semble pas dépendante du niveau transcriptionnel du gène cible ni de la répllication de l'épisome le portant [Tsuchiya, et al., 2005]. Enfin, il est suggéré que la correction s'effectue par un mécanisme de type recombinaison homologue impliquant l'assimilation du fragment et la correction des mésappariements par le système MMR (modèle alternatif de Leung) [Tsuchiya, et al., 2005].

Notons pour finir que dans une très récente étude, Kamiya montre que l'utilisation d'un fragment simple-brin de 800 pb hybridé à un oligodéoxynucléotide complémentaire de 35 nucléotides permet d'augmenter l'efficacité de correction génique. L'effet maximal est observé lorsque l'oligodéoxynucléotide s'hybride en 3' du fragment simple-brin générant ainsi des extrémités 5' dépassantes [Tsuchiya, et al., 2008]. Pour expliquer ce résultat, l'auteur suggère que ces fragments à longues extrémités dépassantes seraient plus facilement liés que des fragments simple-brin par la protéine Rad51 qui facilite la réaction d'échanges de brins. D'ailleurs les efficacités de recombinaison observées avec les différentes structures générées (simple-brin, à extrémités 3' dépassantes ou 5' dépassantes) vont de paire avec les affinités de la protéine Rad51 avec ces mêmes substrats [Mazin, et al., 2000].

3.2.3 - Oligonucléotides

De très courts fragments d'acides nucléiques peuvent également être utilisés en tant qu'agents correcteurs pour introduire des modifications ciblées au sein du génome. Nommés oligonucléotides en raison du faible nombre de résidus d'acides nucléiques qui les composent, inférieur à 100 résidus, ils sont représentés par les chimères RNA-DNA, ou chiméraplastes (RDO, *RNA-DNA oligonucleotide*), et les oligodéoxynucléotides simple-brin (ssODN, *single-stranded oligodeoxynucleotide*). Les premiers correspondent à des oligonucléotides bifonctionnels comportant, entre autres, une région correctrice ADN, qui après hybridation avec le brin complémentaire du gène cible fait apparaître un mésappariement susceptible d'être réparé par le système MMR, et une région stabilisatrice ARN qui, en s'hybridant avec l'autre brin du gène cible, stabilise la structure formée (Figure 12).

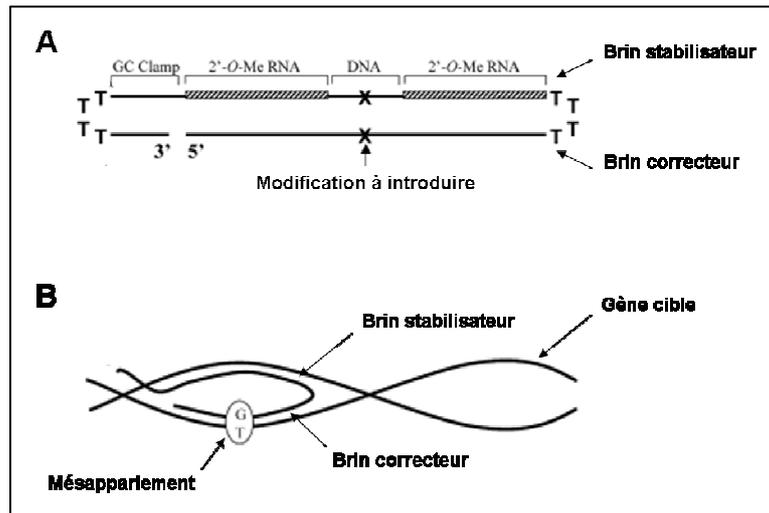


Figure 12. Représentation schématique d'un chiméraplaste et de ses interactions avec sa cible.

Figure 12A : représentation schématique d'un chiméraplaste. En 5' se situe une séquence d'ADN homologue au gène cible, à l'exception de la modification à introduire positionnée au centre, suivie de 4 résidus thymine qui autorisent la formation d'une boucle permettant l'hybridation du brin correcteur avec le brin stabilisateur constitué d'une séquence de type ARN interrompue par un court motif d'ADN au niveau de la modification à introduire. En 3' de la séquence stabilisatrice, une courte région riche en résidus guanine et cytosine interrompue par une seconde boucle qui permet la formation d'une « bride GC » (*GC clamp*) qui stabilise la structure bicaténaire du chiméraplaste. Adapté d'après [Graham, et al., 2001].

Figure 12B : interactions du chiméraplaste avec le gène cible. Le brin stabilisateur envahit la double hélice du gène cible et s'hybride avec le brin génomique complémentaire formant ainsi une boucle de déplacement (*D-loop*, *displacement loop*) au sein de laquelle l'interaction du brin correcteur avec le gène cible conduit à la formation d'un mésappariement dont la réparation par le système MMR peut conduire à l'introduction de la modification au sein du gène cible. Adapté d'après [Graham, et al., 2001].

Présentés en 1996 comme permettant la correction de mutations ponctuelles avec des efficacités très importantes, plus de 30% de correction [Yoon, et al., 1996], ils apparaissent alors comme la solution incontournable pour pallier au manque d'efficacité des autres stratégies de correction génique. Cependant, ces agents correcteurs se sont avérés ne pas être aussi efficaces qu'ils semblaient l'être. Bien que d'autres laboratoires aient également pu obtenir des efficacités de correction très importantes avec ces agents correcteurs [Cole-Strauss, et al., 1996, Kren, et al., 1997], beaucoup d'autres n'ont pu les reproduire [Diaz-Font, et al., 2003, Manzano, et al., 2003]. Aujourd'hui, les résultats difficilement reproductibles que ces agents correcteurs produisent [Albuquerque-Silva, et al., 2001, Taubes, 2002, van der Steege, et al., 2001, Yoon, et al., 2002] et les démonstrations faites que la liaison covalente des brins correcteur et stabilisateur n'est pas nécessaire [Tran, et al., 2003] et que seul le brin

d'ADN correcteur est suffisant pour que la correction ait lieu [Gamper, et al., 2000, Igoucheva, et al., 2001] ont conduit la communauté scientifique à privilégier l'usage d'oligodéoxynucléotides simple-brins comme agents correcteurs et à abandonner celui des chiméraplastes. Pour cette raison, nous ne nous étendrons pas plus sur ces derniers dont le mécanisme de correction correspond à l'un de ceux impliqués dans la correction par des oligodéoxynucléotides simple-brins et ne traiterons à présent que du cas de ces derniers.

Séquence des oligodéoxynucléotides simple-brins

Les oligodéoxynucléotides simple-brins utilisés pour l'introduction de modifications ciblées du génome correspondent au brin correcteur d'un chiméraplaste et les mécanismes de correction mis en jeu sont identiques, bien que la nature chimique et la topologie des oligodéoxynucléotides en autorisent d'autres. De structure simple-brin et d'une longueur d'une quarantaine de résidus de type ADN, ils sont homologues à l'un des deux brins du gène ciblé et contiennent la modification à introduire le plus souvent en position centrale. Chacune de ces caractéristiques est nécessaire pour que la correction ait lieu ou influe sur son efficacité.

En effet, la topologie simple-brin de l'oligodéoxynucléotide semble essentielle pour garantir une efficacité de correction optimale. Il est montré avec des oligodéoxynucléotides complémentaires branchés, qui forment une structure partiellement double-brin, que la correction peut avoir lieu [Olsen, et al., 2003] mais elle apparaît moins efficace qu'avec des structures simple-brins. Aussi, l'utilisation d'un très court fragment d'ADN double-brin généré en hybridant entre eux deux oligodéoxynucléotides simple-brins complémentaires ne produit que des résultats très en deçà de ceux générés par son homologue simple-brin [Radecke, et al., 2004]. Parallèlement, il est montré chez la levure que les protéines Rad51 et Rad54, qui participent à la formation des filaments de nucléoprotéines et favorisent l'appariement des brins, régulent positivement l'efficacité de correction génique avec des oligodéoxynucléotides simple-brins [Liu, et al., 2002] et chez l'homme, des résultats similaires ont été obtenus concernant les protéines Rad51 [Igoucheva, et al., 2002, Thorpe, et al., 2002] et XRCC2 [Olsen, et al., 2003], également impliquées dans l'étape d'appariement des brins. Ces résultats soulignent l'importance de la topologie simple-brin des oligodéoxynucléotides utilisés pour la correction génique et confirment l'hypothèse que la

réparation est initiée par la formation d'un hétéroduplexe oligodéoxynucléotide/gène cible facilitée par la topologie simple-brin de l'oligodéoxynucléotide qui favorise à la fois son interaction avec sa cible mais aussi celle avec les protéines de la réparation telles que Rad51, affines pour l'ADN simple-brin, et qui contribuent à un plus probable appariement des brins.

La longueur de l'oligodéoxynucléotide, généralement comprise entre 20 et 80 résidus, affecte elle aussi l'efficacité de correction bien que d'une manière difficilement prévisible. En effet, il est rapporté par plusieurs équipes des résultats divergents. Une première équipe montre que la longueur optimale est d'environ 45 nucléotides [Igoucheva, et al., 2001] mais une autre montre qu'une longueur de 25 nucléotides génère les meilleurs résultats [Yin, et al., 2005], enfin une troisième obtient les meilleurs résultats avec des oligomères d'environ 70 nucléotides [Parekh-Olmedo, et al., 2003]. L'explication pouvant être apportée pour expliquer ces résultats met en jeu non pas la longueur de l'oligodéoxynucléotide mais les structures secondaires qu'il est susceptible de former et qui peuvent contribuer à une moindre interaction de l'oligomère avec sa cible et les protéines de la réparation impliquées dans l'appariement de brins. Dans ce cas, le choix de la séquence de l'oligodéoxynucléotide ne peut être basé que sur la très délicate étude des structures secondaires formées par l'oligomère si bien qu'il peut être préféré de déterminer la séquence optimale de l'oligomère par des méthodes empiriques.

La séquence de l'oligodéoxynucléotide, selon qu'elle soit complémentaire du brin transcrit (séquence sens) ou non-transcrit (séquence antisens) du gène cible, influe elle aussi sur l'efficacité de correction, là encore d'une manière peu prévisible, bien que dans une moindre mesure. Il est observé dans de nombreuses études que l'utilisation d'un oligomère ciblant le brin non-transcrit permet l'obtention d'efficacités de correction génique accrues [Igoucheva, et al., 2003, Yin, et al., 2005, Yoon, et al., 1996]. L'explication apportée dans un premier temps pour expliquer ce biais suggérait un effet dû à la transcription. Lors de la transcription du gène cible, le complexe transcriptionnel se déplaçant le long du brin transcrit en limiterait son accessibilité tandis que le brin non-transcrit resterait libre et pourrait plus efficacement interagir avec un oligomère le ciblant, en l'occurrence un oligomère de séquence antisens, et le mésappariement formé serait alors corrigé par le système MMR. Toutefois, des résultats divergents de ceux-ci ont été rapportés. Une étude montre qu'un oligomère de séquence sens ciblant le brin transcrit génère de meilleurs résultats que son homologue de séquence complémentaire [Brachman and Kmiec, 2003], une autre observe l'absence de biais dû à

l'orientation de la séquence [Radecke, et al., 2004] et une troisième montre l'existence de ce biais en l'absence de transcription du gène cible [Bertoni, et al., 2005]. Au regard de ces résultats, l'explication formulée précédemment ne semble pas suffire pour expliquer ces phénomènes et une seconde explication impliquant les mécanismes de la réplication a été proposée dans laquelle la nature du brin ciblé, selon qu'il s'agisse du brin avancé ou du brin retardé, affecte l'efficacité de correction. Dans ce modèle, que nous décrivons plus en détail dans la partie suivante, l'oligomère est assimilé au brin néosynthétisé au cours de la réplication et cette assimilation se trouve être facilitée au sein du brin retardé, où l'oligomère s'apparente à un fragment d'Okazaki. Ce biais, dû à l'efficacité avec laquelle l'oligomère peut être incorporé selon l'orientation de la fourche de réplication par rapport à la région ciblée par l'oligomère, explique en partie les effets de brins observés. Considérant ces deux sources de biais, le biais transcriptionnel et le biais réplicationnel, et la difficulté à prévoir leur prévalence pour un gène donné, il reste difficile de définir une règle invitant à utiliser une séquence sens ou une séquence antisens et il convient en conséquence, comme pour la détermination de la longueur optimale de l'oligomère, de privilégier une détermination empirique de l'orientation idéale de l'oligomère.

Enfin, notons pour finir que la position de la modification à introduire au sein de l'oligodéoxynucléotide a également un impact sur l'efficacité de correction génique. Une étude, dont les résultats sont présentés en Figure 13, comparant les efficacités de correction des oligomères au sein desquels la modification à introduire occupe différentes positions montre une baisse modérée de l'efficacité lorsque la modification est refoulée vers l'extrémité 3' et une baisse importante de l'efficacité lorsqu'elle occupe la région 5' de l'oligomère ainsi que son extrémité 5' [Yin, et al., 2005].

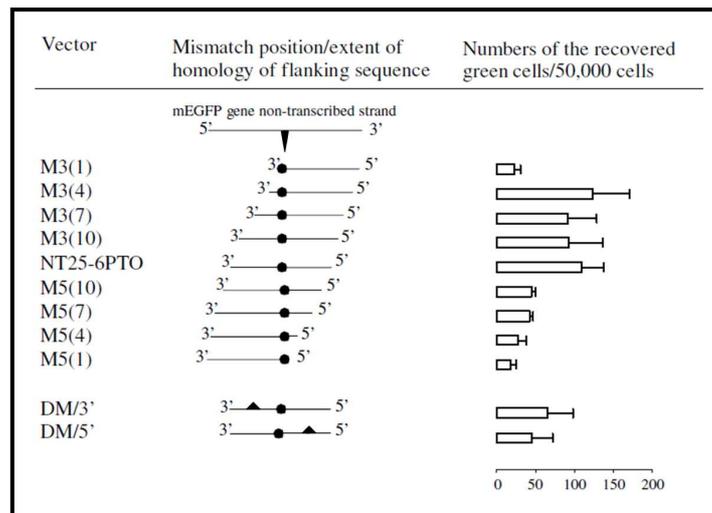


Figure 13. Influence de la position et du nombre de modifications à introduire au sein de l'oligomère sur l'efficacité de correction génique.

Dans cette expérience, les auteurs comparent les efficacités de correction génique d'une mutation ponctuelle (codon stop représenté par le triangle descendant) au sein du gène eGFP par des oligodéoxynucléotides simple-brin de 25 nucléotides de séquence antisens. Au sein du premier groupe d'oligomères (oligomères M3(x), NT25-6PTO et M5(x)), une seule modification à introduire (représentée par le point noir) est présente au sein de l'oligomère et occupe des positions distribuées sur toute sa longueur. Au sein du second groupe (oligomères DM/3' et DM/5'), une modification supplémentaire (mutation silencieuse) est introduite (représentées par les triangles ascendants) dans les régions 5' et 3' de l'oligomère. Sur la droite de la figure, l'histogramme présente les efficacités de correction génique, exprimés en nombre de cellules exprimant le phénotype eGFP pour 50 000 cellules, de chacun des oligomères en face desquels ils sont alignés. D'après [Yin, et al., 2005].

Cette même étude montre également que la présence d'une seconde modification à introduire réduit l'efficacité de correction et ce à plus forte raison lorsque cette seconde modification occupe la région 5' de l'oligomère. Cette dernière observation n'est d'ailleurs pas sans conséquence. Si la faible longueur des oligodéoxynucléotides utilisés limite évidemment l'étendue des modifications possibles à de discrets remaniements n'excédant pas la taille de l'oligomère, ces observations limitent l'usage d'un même oligomère pour l'introduction de multiples modifications.

Mécanismes de correction par des oligodéoxynucléotides simple-brins

Les mécanismes de correction d'une mutation ponctuelle par des oligodéoxynucléotides peuvent être décomposés en deux phases. Une première phase, dite phase d'initiation, est

commune à tous les mécanismes de correction (Figure 14). Bien décrite, elle est suivie d'une seconde phase, dite phase de correction, moins connue et composée par plusieurs modes de correction dépendants de l'activité transcriptionnelle et répliationnelle du gène ciblé.

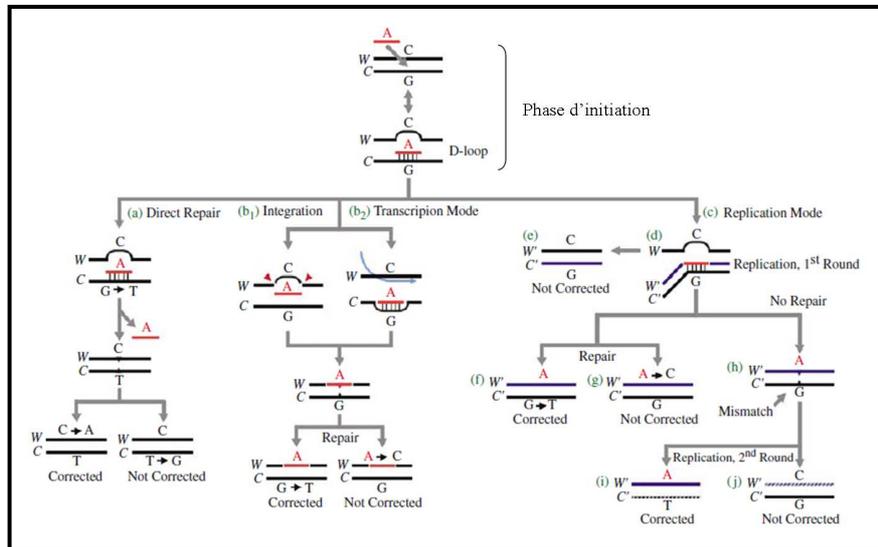


Figure 14. Différents mécanismes de correction génique par des oligodéoxynucléotides simple-brins.

Le détail des événements moléculaires est présenté dans le texte. Le gène cible est représenté en noir, le brin de Watson par un W et le brin de Crick par un C. L'oligomère est représenté en rouge et l'ADN néosynthétisé en bleu. Adapté d'après [Parekh-Olmedo, et al., 2005].

Lors de la phase d'initiation, l'oligomère envahit le duplexe d'ADN du gène cible et s'apparie avec un des deux brins du génome (Figure 14). Cette étape d'appariement des brins est, comme explicité précédemment, dépendante de la structure simple-brin de l'oligomère et fait intervenir certaines protéines de la recombinaison homologue du groupe d'épistasie Rad52 notamment la protéine Rad51 [Igoucheva, et al., 2002, Thorpe, et al., 2002]. D'ailleurs, l'introduction de cassures double-brins au sein de la chromatine, connues pour stimuler la recombinaison homologue, permettent d'obtenir des fréquences de correction plus élevées [Ferrara and Kmiec, 2004, Ferrara, et al., 2004, Suzuki, et al., 2003] semblant alors confirmer l'implication de la recombinaison homologue dans les mécanismes de correction par des oligomères. La structure résultant de l'appariement formé, une D-loop (*displacement loop*) [Drury and Kmiec, 2003], correspond à un intermédiaire réactionnel pouvant alors s'inscrire dans la phase de correction selon plusieurs modes.

Le premier mode (Figure 14a), que l'on pourrait qualifier de direct, correspond au scénario dans lequel le mésappariement formé par l'oligomère et le brin cible est corrigé au sein de la D-loop par excision de nucléotides (NER) ou par le système MMR (dans le cas illustré en Figure 14a, cette réparation conduit à l'excision et au remplacement du nucléotide présent au sein du gène cible). Après détachement de l'oligomère et résolution de la D-loop, un second mésappariement est formé au sein du gène cible. Celui-ci est également réparé par les mêmes mécanismes conduisant alors, selon l'orientation de la réparation, à la conservation de la séquence d'origine ou à l'apparition de la séquence corrigée.

Le deuxième mode, dit mode par intégration (Figure 14b₁), représente la situation où l'oligomère est directement assimilé au sein du brin homologue après résection de ce dernier et intégration de l'oligomère. Pour ce cas de figure, Yoon propose un modèle tentant d'expliquer les biais dus au statut du brin ciblé (brin transcrit ou non-transcrit) et à son activité transcriptionnelle [Huen, et al., 2006, Igoucheva, et al., 2004]. Dans ce mode dit alors transcriptionnel (Figure 14b₂), l'étape d'appariement des brins est facilitée lors du passage d'un premier complexe de transcription par la formation d'une bulle transcriptionnelle au sein de laquelle le brin non-transcrit est librement accessible et s'hybride avec l'oligomère. Par la suite, la D-loop formée empêche le passage d'un second complexe de transcription et constitue alors un signal pour le recrutement de protéines de la réparation par TCR et NER qui réalisent alors l'intégration de l'oligomère au sein du gène cible [Igoucheva, et al., 2003] au sein duquel apparaît un mésappariement pouvant être réparé selon les mêmes modalités que dans le cas du mode direct.

Un dernier mode de correction, dit mode répliqueur (Figure 14c), correspond au cas de figure où l'oligomère est assimilé au sein du gène cible lors de la réplication. Ce mode est initié par la rencontre d'une fourche de réplication avec la D-loop ou par la formation d'une fourche de réplication par la D-loop elle-même. L'oligomère, selon l'orientation de sa séquence, est alors assimilé soit au sein du brin retardé entre deux fragments d'Okazaki soit en 3' du brin avancé et se trouve alors être intégré au génome d'une des deux futures cellules filles de cette première division. Le mésappariement résultant de l'intégration de l'oligomère peut être à ce stade réparé par le système MMR et conduire à la conservation de la séquence d'origine (Figure 14g) ou à l'apparition de la séquence corrigée (Figure 14f). Toutefois, cette dernière éventualité est peu probable compte tenu des dispositions particulières du système MMR pour discriminer le brin néosynthétisé du brin parental et pour conserver la séquence de ce dernier. L'observation faite par ailleurs que la correction est plus efficace dans des

systèmes cellulaires déficients pour la réparation des mésappariements [Dekker, et al., 2003, Ferrara, et al., 2004, Maguire and Kmiec, 2007] et, étant observé par Olsen une distribution asymétrique du phénotype corrigé au sein des deux cellules résultant de la division d'une cellule corrigée depuis moins d'une division [Olsen, et al., 2005], suggère que le mésappariement formé pourrait ne pas être réparé et servirait (Figure 14h), lors de la réplication suivante, de matrice pour la synthèse d'un génome corrigé transmis à seulement l'une des deux cellules filles.

Optimisation de l'efficacité de correction par des oligodéoxynucléotides

Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour augmenter l'efficacité de correction génique des oligodéoxynucléotides simple-brin. Globalement, elles peuvent être décomposées en deux groupes de stratégies : celles contribuant à favoriser les interactions de l'oligomère avec sa cible ou les partenaires cellulaires de la réparation et celles visant à tirer profit d'un contexte physiologique favorable à une correction plus efficace.

Parmi les premières, citons l'utilisation d'oligodéoxynucléotides modifiés par l'inclusion en leur sein de résidus leur conférant des propriétés qui contribuent à favoriser la correction. Tout d'abord, l'oligomère étant sensible à la dégradation par des exonucléases cellulaires, sa protection au niveau de ses extrémités par la présence de quelques résidus liés par des liens de type phosphorothioate qui le rendent insensible à ce type de dégradation, rend un peu plus pérenne sa présence au sein du noyau sous une forme non-dégradée. Son interaction avec sa cible s'en trouve augmentée ce qui contribue à l'obtention d'une efficacité de correction génique accrue [Yin, et al., 2005]. La stabilité de l'appariement formé peut elle aussi être augmentée pour contribuer à une réparation plus efficace. Parmi les solutions existantes, il peut être fait l'usage d'oligomères incluant des résidus modifiés de type LNA (*locked nucleic acid*) dont la forme *endo* du ribose dans laquelle il est bloqué (Figure 15) a une plus forte affinité pour les autres acides nucléiques [Vester and Wengel, 2004].

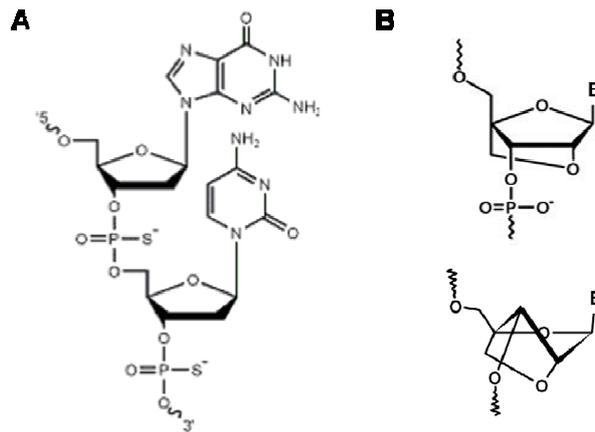


Figure 15. Structure chimique d'un lien phosphorothioate et d'un résidu de type LNA.

En A : structure d'un lien phosphorothioate entre deux résidus de type ADN. Notez la substitution de l'oxygène monovalent par un atome de soufre. En B et en haut : structure chimique d'un résidu de type LNA (*locked nucleic acid*) dans lequel un pont méthylène relie le groupement hydroxyl en 2' avec le carbone 4' du ribose [Jepsen, et al., 2004]. En bas : représentation de la forme *endo* du ribose dans laquelle le résidu est bloqué par la présence du pont méthylène.

Inclus au niveau des extrémités au nombre de quelques résidus, ils stabilisent l'appariement oligomère/brin ciblé et ont permis d'observer des efficacités de correction accrues chez la levure [Parekh-Olmedo, et al., 2002] et chez les mammifères [Andrieu-Soler, et al., 2005]. D'autres modifications peuvent également être apportées à l'oligomère pour stabiliser son interaction avec sa cible. Citons brièvement l'utilisation d'oligomères liant en 5' un agent intercalant susceptible de stabiliser l'appariement tel qu'un groupement psoralen ou acridine, les meilleurs résultats étant obtenus avec ce dernier [de Piedoue, et al., 2007].

Comme précisé précédemment, il peut aussi être tiré profit d'un contexte physiologique favorable à la correction par des oligodéoxynucléotides simple-brin pour obtenir des efficacités de correction augmentées. Le traitement des populations de cellules par des substances connues pour ralentir la progression des fourches de réplication, traduit par un allongement de la phase S, permet d'augmenter les fréquences de correction [Brachman and Kmiec, 2005, Wu, et al., 2005]. Toutefois, cet effet n'est pas dû à l'enrichissement de la population en cellules en phase S, au cours de laquelle il eût pu être pensé que la présence accrue des protéines de la recombinaison homologue du groupe d'épistasie Rad52 aurait favorisé l'appariement de l'oligomère avec sa cible contribuant ainsi à une réparation plus efficace [Wu, et al., 2005], mais probablement à la réponse de type dommages à l'ADN que

les fourches de réplication callées induisent. D'ailleurs, il peut également être fait l'usage de substances créant des dommages à l'ADN de type cassure double-brin dispersés au sein du génome, telles que l'étoposide [Ferrara, et al., 2004] ou la camptothécine [Ferrara and Kmiec, 2004] pour activer la recombinaison homologue et augmenter les fréquences de réparation. Enfin, l'introduction d'une cassure double brin au sein même du gène cible (par une endonucléase spécifique) permet également de stimuler la réparation [Wang, et al., 2008] et de fortement augmenter les fréquences de correction par des oligomères simple-brins [Radecke, et al., 2006].

Notons pour finir que l'usage simultané d'un oligomère ciblant le gène cible et d'oligomères non-spécifiques (de séquences aléatoires) contribue à augmenter significativement les fréquences de correction génique [Maguire and Kmiec, 2004, Shang, et al., 2008], bien qu'aucun des mécanismes responsables de cet effet n'ait été élucidé.

3.2.4 - Vecteurs rAAV

Si, comme il a pu l'être vu précédemment, l'usage d'agents correcteurs constitués d'acides nucléiques et vectorisés par des techniques physiques ou chimiques est relativement répandu, il apparaît en revanche relativement peu d'études concernant l'usage de vecteurs viraux pour le transfert de séquences correctrices au sein du noyau des cellules. Parmi les vecteurs viraux utilisés à ces fins, on compte tout d'abord des vecteurs dérivés du virus associé à l'adénovirus (AAV), qui représentent à eux seuls la majorité des travaux réalisés avec des vecteurs viraux pour la correction génique, mais également des vecteurs dérivés de l'adénovirus [Isman, et al., 2008, Mitani, et al., 1995, Ohbayashi, et al., 2005] ou du lentivirus humain HIV-1 (*human immunodeficiency virus type 1*) [Cornu and Cathomen, 2007, Lombardo, et al., 2007]. Dans les parties suivantes, nous ne présenterons que les vecteurs dérivés de l'AAV dans le cadre de leur usage pour la correction de gènes.

Biologie du virus associé à l'adénovirus

Le virus AAV, découvert en 1965 comme un contaminant des préparations d'adénovirus [Atchison, et al., 1965], est un petit virus non-enveloppé à capsidie icosaédrique d'environ 22 nm de diamètre. Il appartient à la famille des *parvoviridae* et sa réplication étant dépendante de la présence d'un virus auxiliaire (de type adénovirus, virus de l'herpès simplex ou virus de

la vaccine), il est classé parmi les virus du genre des *dépendovirus*. Bien que sa séroprévalence dans la population humaine soit de plus de 80%, l'AAV n'a jamais été associé à aucune pathologie chez l'homme [Tobiasch, et al., 1998]. Virus appartenant au groupe II, il possède un génome ADN simple-brin de polarité (+) ou (-) de 4,7 kb encadré à chaque extrémité par des séquences répétées inversées terminales (ITR, *inverted terminal repeat*) [Srivastava, et al., 1983]. Au cours de l'infection, ce génome est converti en une structure double-brin permettant l'expression des gènes viraux et la production de nouveaux génomes viraux simple-brin. Le génome double-brin persiste à l'état épisomal et peut s'intégrer au niveau de son site d'insertion naturel (AAVS1) identifié sur le chromosome 19 en q13.3-qter [Kotin, et al., 1991, Kotin, et al., 1990, Samulski, et al., 1991].

Dans le cas de l'AAV-2, l'ITR (145 bases) forme une structure en épingle à cheveux en forme de T impliquant la région multipalindromique de 125 nucléotides située en position terminale comme représenté en Figure 16. Cette structure génère une extrémité comportant un groupement hydroxyle en 3' qui, comme nous le verrons, permet d'initier la réplication.

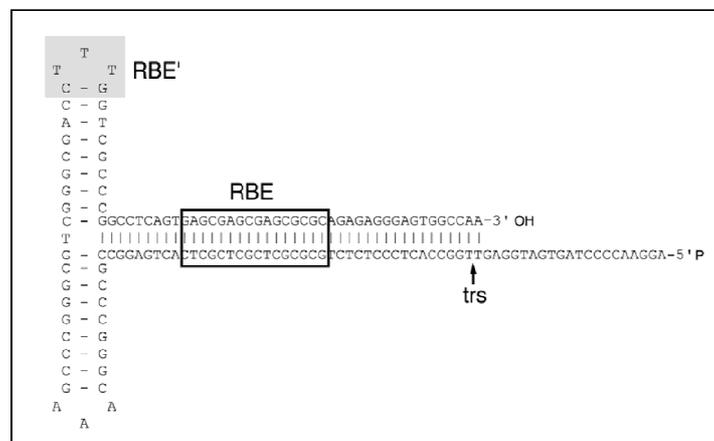


Figure 16. Représentation schématique de l'ITR de l'AAV-2

Représentation schématique de l'ITR de l'AAV-2. Les sigles sont explicités dans le texte. Adapté d'après [Goncalves, 2005].

Entre les deux ITRs sont contenus les gènes viraux *rep* (réplication) et *cap* (capside) codant pour les protéines non-structurales, ou régulatrices, et les protéines structurales respectivement comme illustré en Figure 17.

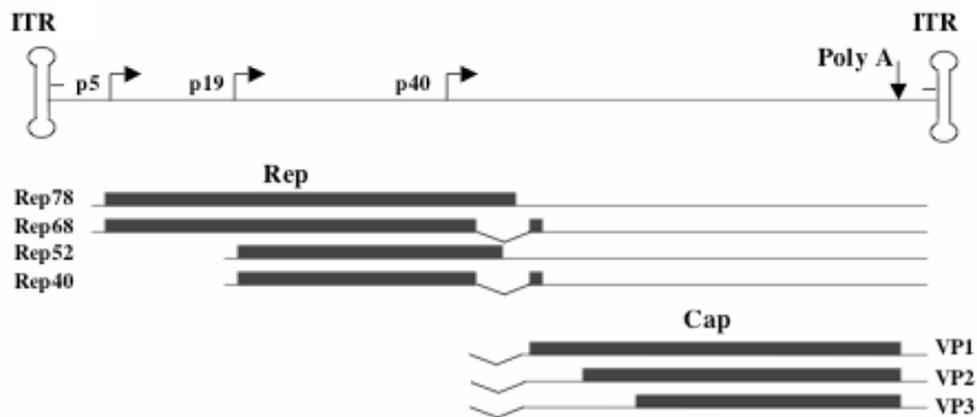


Figure 17. Organisation génomique du génome de l'AAV2 sauvage.

Le génome de l'AAV se compose d'une molécule d'ADN simple-brin de 4979 nucléotides. Les gènes *rep* et *cap* sont encadrés par les séquences ITR de 145 nucléotides. Les protéines Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40 sont codées par des transcrits initiés par les promoteurs p5 et 19 par épissage alternatif. Les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3 sont issues des transcrits initiés par le promoteur p40.

Le gène *rep*, sous l'influence de deux promoteurs situés en p5 et en p19, permet la synthèse de deux transcrits primaires qui sont chacun sujets à un épissage alternatif conduisant alors à quatre transcrits qui permettent la synthèse des protéines régulatrices Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40 nommée ainsi en raison de leurs poids moléculaire apparent. Les protéines Rep78 et Rep68 interviennent comme protéines de liaison et comme endonucléases spécifique de site et de brin [Berns and Giraud, 1996]. Elles participent à la réplication du génome de l'AAV qui nécessite d'ailleurs l'intervention d'une polymérase cellulaire pour la synthèse d'ADN [Ni, et al., 1998]. Au cours de la réplication, dont les évènements moléculaires sont détaillés en Figure 18, elles interagissent avec le site de résolution terminale *trs* (*terminal resolution site*) qu'elles clivent, ainsi qu'avec le site de liaison de Rep, l'élément RBE (*Rep binding element*) et un site de liaison de Rep additionnel, l'élément RBE' (Figure 16), stabilisant le complexe formé de l'élément RBE et des protéines Rep78 et Rep68.

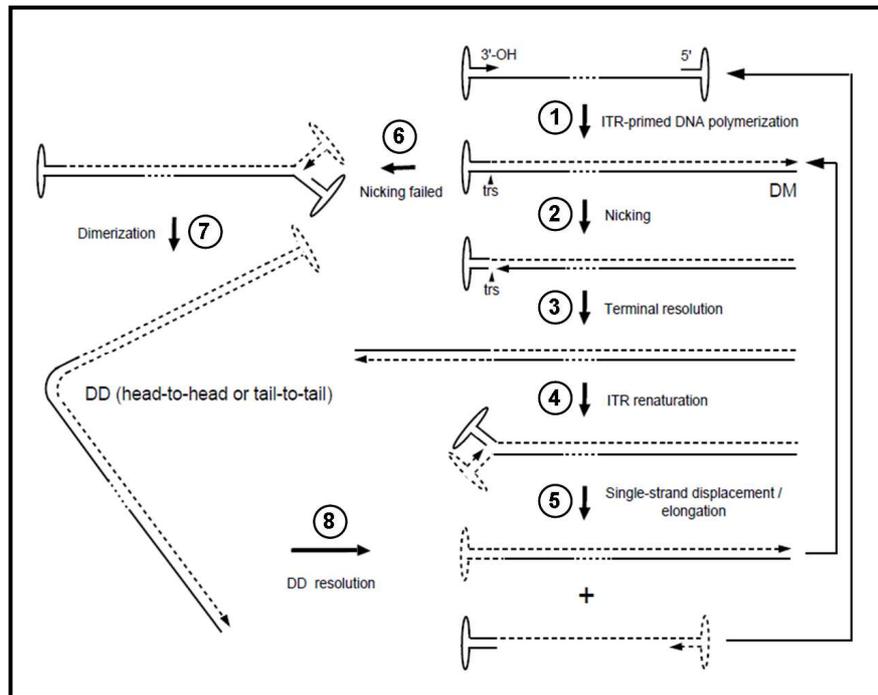


Figure 18. Représentation schématique des différentes étapes de la réplication du génome de l'AAV-2.

L'extrémité 3'-OH du génome viral sert d'amorce pour la synthèse du second brin (ligne discontinue) du génome générant alors un monomère de duplex (1) (DM, *duplex monomer*) puis (2) une césure est introduite au niveau du trs sur le brin parental (ligne continue). (3) : La nouvelle extrémité 3'-OH générée permet la copie de la séquence de l'ITR (résolution terminale) qui s'ensuit d'une renaturation des deux ITRs (4) faisant à nouveau apparaître une extrémité 3'-OH. A ce stade, les duplex formés contiennent deux génomes simple-brin de polarité opposée. L'élongation du second brin d'un deux génomes formant ce duplex (5) conduit à la formation d'un monomère de duplex qui réintègre en amont le processus de réplication. Conjointement, un génome viral simple-brin de polarité opposée à celle du génome d'origine est libéré et peut lui aussi être à nouveau un substrat pour la réplication. Lorsque le clivage au niveau du trs n'a pas lieu (6), la renaturation des deux ITRs situés à l'opposé du trs permet la synthèse du second brin (7) pour former un dimère de duplex (DD, *duplex dimer*) qui après une étape de résolution (8) permet la réintégration des produits de résolution dans le processus de réplication. Adapté d'après [Goncalves, 2005].

Ces deux protéines sont également impliquées dans la régulation positive ou négative de l'expression des gènes de l'AAV selon la présence ou l'absence d'un virus auxiliaire [Pereira, et al., 1997]. Enfin, les protéines Rep52 et Rep40 quant à elles participent à la génération des génomes simple-brin à partir des intermédiaires double-brins de la réplication et favorisent leur accumulation [Chejanovsky and Carter, 1989].

Le gène *cap* permet la synthèse des trois protéines structurales VP1, VP2 et VP3 (*viral protein*) qui sont toutes produites à partir d'un même transcrit primaire dont la synthèse est contrôlé par un promoteur situé en p40 du génome d'AAV (Figure 17). Ce transcrit primaire

est soumis à un épissage alternatif générant deux transcrits. Le plus long d'entre eux permet la synthèse de la protéine VP1 (87 kDa) tandis que la traduction du second transcrit s'effectue à partir de deux codons initiateurs conduisant alors à la synthèse des deux protéines VP2 (72 kDa) et VP3 (62kDa). Ces trois protéines sont assemblées pour former des capsides vides au sein desquelles le génome viral lié au complexe Rep78/68 sera transloqué [Im and Muzyczka, 1989] via des pores [Bleker, et al., 2005] par un mécanisme faisant intervenir les activités hélicase des protéines Rep52 et Rep40 [King, et al., 2001]. Notons que les génomes viraux simple-brin de polarité (+) et (-) issus de la réplication sont encapsidés avec des efficacités comparables [Berns and Adler, 1972].

Après libération des particules virales formées lors de la lyse cellulaire (cas du cycle lytique), celles ci peuvent infecter des cellules. Après une première phase d'attachement aux récepteurs aux protéoglycanes à héparane sulfate [Summerford and Samulski, 1998], l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ [Summerford, et al., 1999], le récepteur au FGF-1 (*fibroblast growth factor 1*) [Qing, et al., 1999] ou le récepteur au facteur de croissance hépatocytaire c-Met [Kashiwakura, et al., 2005] facilite l'internalisation des virions par un mécanisme de type endocytose déclenché par la formation de puits recouverts de clathrine [Bartlett, et al., 2000, Duan, et al., 1999]. La libération des virions de l'endosome fait appel à un mécanisme pH-dépendant [Bartlett, et al., 2000, Douar, et al., 2001] et le transport des capsides au sein du cytoplasme implique les systèmes de transport le long des microtubules [Seisenberger, et al., 2001]. Compte tenu de leur petite taille, les capsides pourraient entrer dans le noyau par le complexe de pore nucléaire bien qu'un mécanisme indépendant de cette structure semble exister [Hansen, et al., 2001, Xiao, et al., 2002]. Après décapsidation et en l'absence d'un virus auxiliaire, l'expression des gènes viraux est réprimée et le génome viral latent peut s'intégrer en son site d'insertion naturel (cas du cycle lysogénique) [Kotin, et al., 1991]. En présence d'un virus auxiliaire, les gènes viraux sont exprimés, le génome viral est répliqué après excision du génome viral latent intégré et la formation des particules virales conduit à nouveau à la lyse cellulaire et à la libération des virions.

Vecteurs rAAV utilisés pour la correction génique

Les vecteurs dérivés de l'AAV utilisés pour la correction génique sont identiques à ceux utilisés pour la thérapie génique par addition de gène (pour des revues voir [Grieger and Samulski, 2005] et [Flotte, 2004]). Ils ne s'en distinguent que par la séquence d'intérêt, ou cargo, qu'ils contiennent entre leurs deux ITRs. Dans le cadre de vecteurs pour la correction génique, le cargo est représenté par la séquence homologue au gène cible (comparable à un vecteur de remplacement) que l'on souhaite utilisée en tant qu'agent correcteur. Il ne peut excéder 4,6 kb [Dong, et al., 1996] (Figure 19) et à ce jour, seuls les ITRs de l'AAV2 ont été utilisées dans le cadre de vecteurs rAAV pour la correction de gènes.

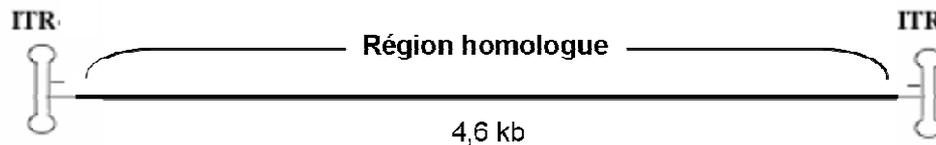


Figure 19. Organisation génomique d'un vecteur rAAV pour la correction de gènes.

Comme avec les fragments d'ADN double-brins, il apparaît des efficacités de correction génique croissantes avec la longueur de l'homologie que partage le vecteur avec sa cible. Un doublement de la longueur homologue conduit à une augmentation d'un facteur 5 de l'efficacité de correction [Hirata and Russell, 2000]. La position de la mutation au sein de la région homologue a elle aussi une influence sur l'efficacité de correction qui est maximale lorsque la mutation est positionnée au centre du fragment et qui décroît fortement si l'un des deux bras homologues fait moins de 50 nucléotides [Hirata and Russell, 2000]. Enfin, tous les types de mutations peuvent être corrigés avec toutefois des efficacités différentes. Il est montré, comme illustré en Figure 20, que les efficacités de correction d'une mutation de type substitution varient en fonction des bases impliquées dans le mésappariement formé par le vecteur et sa cible [Inoue, et al., 2001].

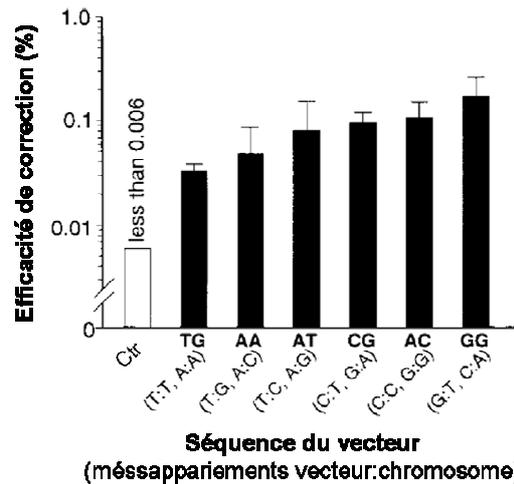


Figure 20. Efficacités de correction des mutations de type substitution par un vecteur rAAV.

Sur l'axe horizontal est donnée la séquence du vecteur. La séquence de la cible est AG et les mésappariements pouvant être formés sont indiqués entre parenthèses. Adapté d'après [Inoue, et al., 2001].

Il apparaît également que les petites insertions (inférieures à 20 pb) sont introduites plus efficacement que les petites délétions [Inoue, et al., 2001] et que l'introduction de grandes insertions (de plus de 2,7 kb) est plus efficace que pour de petites insertions [Hirata, et al., 2002, Kohli, et al., 2004].

Enfin, si de nombreux sérotypes et pseudotypes de vecteurs rAAV sont utilisés pour le transfert de gènes, seuls le sérotype 2 (rAAV2-2) [Russell and Hirata, 1998] et le pseudotype rAAV2-6 [Miller, et al., 2006] composés des ITRs de l'AAV2 et des protéines de capsides de l'AAV2 et de l'AAV6 respectivement ont été utilisés dans le cadre d'expériences de correction génique et ont produits des résultats comparables [Miller, et al., 2006].

Aspects moléculaires de la correction génique par des vecteurs rAAV

Le processus de réparation par un vecteur rAAV a été élucidé depuis peu et fait intervenir un mécanisme de type recombinaison homologue impliquant la forme simple-brin du génome du vecteur. Toutefois, nombres de données orientent déjà en ce sens les hypothèses relatives à son mécanisme de correction.

Tout d'abord, il est observé que les fréquences de correction sont plus importantes lorsque les cellules sont synchronisées et traitées en phase S [Liu, et al., 2004] et qu'elles sont nulles pour des cellules arrêtées en phase G1 [Trobridge, et al., 2005]. Ces résultats, ainsi que ceux concernant la nature des séquences correctrices (longueur de la séquence et position de la mutation), sont similaires à ceux observés dans le cadre de l'usage de grands fragments d'ADN [Deng and Capecchi, 1992, Thomas and Capecchi, 1987] et suggèrent un mécanisme de type recombinaison homologue. Par ailleurs, la fidélité de la réparation et la présence de très rares remaniements uniquement au niveau des régions correspondant aux extrémités de la région homologue portée par le vecteur [Inoue, et al., 1999] sont également des arguments suggérant un mécanisme de type recombinaison homologue. Enfin, il est observé comme avec les grands fragments d'ADN double-brin une très forte augmentation de l'efficacité de correction lorsqu'une cassure double-brins est introduite à proximité de la région à corriger [Miller, et al., 2003, Porteus, et al., 2003] suggérant une fois encore l'implication de la recombinaison homologue dans ces mécanismes de correction.

D'autres données assoient quant à elles l'hypothèse que la forme simple-brin du génome du vecteur soit celle participant aux mécanismes de recombinaison. Tout d'abord, il apparaît que la réparation se produit pendant la période où les génomes viraux sont essentiellement sous leur forme simple-brin [Russell, et al., 1994]. Aussi, l'utilisation d'agents causant des dommages à l'ADN tel que l'étoposide ou l'hydroxyurée connus pour augmenter l'efficacité de transduction en favorisant la synthèse d'ADN et la conversion du génome simple-brin en un génome double-brin [Alexander, et al., 1994, Russell, et al., 1995] ne permet pas d'augmenter l'efficacité de correction [Hirata and Russell, 2000] suggérant l'implication de la forme simple-brin dans ces mécanismes de correction. Enfin, dans une étude comparant les efficacités de correction de vecteurs rAAV contenant des génomes simple- ou double-brins (scAAV, *self-complementary AAV*), il est rapporté que les efficacités de correction sont corrélées aux multiplicités d'infection des particules contenant un génome simple-brin [Hirata and Russell, 2000]. A ce titre d'ailleurs, une expérience de correction génique utilisant un vecteur dérivé d'un autre *parvoviridae*, le virus minute de la souris (MVM, *minute virus of mice*), très similaire au vecteur rAAV de par son organisation génomique mais en différant de par l'encapsidation sélective des génomes de polarité (+) ou (-) qu'il réalise, confirme la possible recombinaison homologue impliquant une séquence simple-brin flanquée de séquences répétées inversées terminales non-homologues au gène cible et pouvant se structurer comme le font les ITRs de l'AAV [Hendrie, et al., 2003]. Dans cette même étude, il

est d'ailleurs montré l'existence d'un biais de brin sur l'efficacité de correction indépendant de la nature codante ou non-codante de la séquence correctrice [Hendrie, et al., 2003].

Notons pour finir que de nombreux facteurs peuvent moduler l'activité de ces mécanismes. Certains sont nécessaires pour que la correction ait lieu. Par exemple, il est rapporté que la microinjection dans le noyau de génomes simple-brin ne permet pas d'obtenir des résultats comparables à ceux d'une infection, suggérant que certains facteurs présents dans les particules sont nécessaires pour la correction [Liu, et al., 2004]. Il est d'ailleurs montré que la protéine Rep78 peut introduire des césures au sein de la chromatine, induire un arrêt du cycle cellulaire en phase S et activer une réponse de type dommages à l'ADN contrôlée par ATM [Berthet, et al., 2005, Winocour, et al., 1988], autant d'éléments qui favorisent la recombinaison homologue. Il est aussi montré que les protéines Rep78 et Rep68 régulent positivement l'activité de la protéine RPA [Stracker, et al., 2004] qui participe à l'initiation de la recombinaison. En revanche, d'autres mécanismes peuvent limiter la correction en entrant en compétition avec la recombinaison homologue [Allen, et al., 2003]. Par exemple, les protéines Ku70 interagissent avec les ITR et orientent la réparation vers un mécanisme de type NHEJ. En leur absence, les efficacités de correction génique peuvent être jusqu'à dix fois plus importantes [Fattah, et al., 2008].

4 - Applications thérapeutiques et fréquences de correction génique

4.1 - Champs d'applications des stratégies de correction génique

De nombreuses applications sont nées des techniques de modifications ciblées du génome, dont la création de modèles animaux ou d'autres organismes génétiquement modifiés pour la recherche. Les progrès récents réalisés permettent d'envisager aujourd'hui l'utilisation des approches de correction génique à des fins thérapeutiques, bien que dans certaines limites inhérentes aux faibles efficacités de réparation que l'on peut obtenir. Précisons d'ailleurs que la thérapie génique par correction de gènes n'est envisageable qu'au niveau somatique et, pour l'instant, limitée aux traitements de maladies monogéniques. De fait, il n'est envisagé à ce jour que des protocoles thérapeutiques pouvant tirer profit des propriétés de reconstitution d'une fonction biologique par des cellules souches ou des cellules précurseurs, ou d'un avantage sélectif (prolifération accrue) conféré aux cellules corrigées par la modification introduite. Précisons également que, pour l'heure, tous les types de mutations ne peuvent pas

être corrigés. Compte tenu des capacités d'insertion et de délétion limitées à plusieurs kilobases des agents correcteurs disponibles aujourd'hui, la correction de très grandes insertions ou délétions n'est pour le moment pas envisageable et l'utilisation des oligodéoxynucléotides simple-brin comme agents correcteurs est limitée à la correction de mutations ponctuelles ou d'insertions et de délétions de quelques paires de bases tout au plus.

4.2 - Fréquences de correction génique

Pour chacun des trois types d'agents correcteurs présentés en détail dans cet ouvrage, à savoir les fragments d'ADN double-brins, les oligodéoxynucléotides simple-brin et les vecteurs rAAV, les fréquences de correction génique observées par les différents laboratoires les étudiant sont très variables. Une des raisons pouvant expliquer ces résultats est la grande diversité des systèmes d'évaluation qui ont été utilisés. Il est pour cette raison particulièrement difficile de les comparer et de proposer une efficacité de correction moyenne pour un type d'agent correcteur. Si l'on excepte les cas où sont utilisés des stratégies faisant intervenir une cassure double-brin au sein du gène cible ou des lésions au sein du génome tout entier pour stimuler la réparation, on observe globalement des fréquences de correction qui sont de l'ordre de 0,01% à 1% pour les oligodéoxynucléotides simple-brin, les fragments d'ADN double-brins et les vecteurs rAAV.

4.3 - Limites des approches par ciblage de gène

De nombreux facteurs viennent limiter l'utilisation des techniques de ciblage de gène notamment à des fins thérapeutiques. Ceux-ci peuvent être répartis en deux groupes. Le premier, concerne les facteurs ou les étapes limitant l'obtention d'efficacités de correction génique élevées tels que l'efficacité avec laquelle l'agent correcteur est administré aux noyaux des cellules à traiter, sa stabilité, l'accessibilité du gène cible, son statut transcriptionnel, sa réplication et la nature des mutations à réparer. En effet, il semble nécessaire pour obtenir les meilleures efficacités de correction d'utiliser des techniques de transfert de gènes particulièrement efficaces (de type électroporation), ce qui restreint d'ailleurs le champ d'application de cette approche à certains tissus dans la mesure où ces techniques ne sont pas nécessairement compatibles avec la plupart des situations cliniques. Une autre limite est liée à la difficulté à administrer des agents correcteurs de très grandes

tailles. Si ceux-ci permettent d'obtenir des efficacités de correction élevées lorsqu'ils sont microinjectés dans le noyau, les techniques de transfert de gènes actuelles ne permettent pas pour l'heure d'envisager leur utilisation compte-tenu des faibles efficacités de transfection obtenues pour ces agents. La stabilité de l'agent correcteur est, elle aussi, un facteur pouvant avoir un impact sur l'efficacité de correction, notamment dans le cadre de l'utilisation d'oligodéoxynucléotides simple-brins. Bien que pouvant être exposés à une dégradation par des exonucléases cellulaires, les agents correcteurs, quels qu'ils soient, doivent conserver leurs caractéristiques pour exprimer au mieux leur potentiel correcteur. Pour cette raison, l'utilisation de certains agents correcteurs doit être envisagée sous une forme protégée contre ces dégradations lorsque cela est possible. D'autres facteurs viennent aussi limiter l'obtention d'efficacités de correction génique élevées. L'accessibilité du gène cible en est un. Effectivement, si celui-ci est présent au sein d'une région très condensée de la chromatine, son interaction avec l'agent correcteur peut s'en trouver amoindrie. Dans ces circonstances, le ciblage de gène est limité à ceux dont l'accessibilité est suffisante pour que la réparation puisse avoir lieu efficacement. D'ailleurs, dans le cadre de l'utilisation d'oligodéoxynucléotides simple-brins, la correction peut être dépendante de la transcription du gène cible, ce qui peut alors limiter leur utilisation à la correction de gènes transcrits. Aussi, compte tenu qu'il est rapporté que la correction du gène cible est dépendante de la réplication, seules des cellules non-quiescentes peuvent être corrigées limitant encore une fois le champ d'application du ciblage de gène. Pour finir, la nature de la mutation à corriger constitue également une limite à l'utilisation de certains agents correcteurs. Pour le cas des oligodéoxynucléotides simple-brins, la correction est limitée à la réparation de mutations ponctuelles ou d'insertions et de délétions de quelques paires de bases. Dans les cas des fragments d'ADN est des vecteurs viraux, elle s'étend jusqu'à la correction de plus grandes insertions ou délétions (quelques kilobases) compte tenu des limites de capacité des agents correcteurs disponibles aujourd'hui.

L'ensemble de ces facteurs sont autant d'éléments limitant l'obtention d'efficacités de correction génique élevées nécessaires pour envisager une utilisation clinique de cette approche. Toutefois, d'autres facteurs, qui n'ont pas nécessairement pour effet d'amoindrir l'efficacité de correction génique, viennent cependant en limiter son utilisation. Ceux-ci, appartiennent au second groupe qui quant à lui, concerne les aspects sécuritaires du ciblage de gènes. En effet, si l'introduction de la modification souhaitée en la position désirée peut être

accomplie, bien qu'avec de faibles efficacités, il convient néanmoins qu'aucune autre modification du génome ne soit introduite lors du traitement. Or, il apparaît qu'avec des grands fragments d'ADN double-brins, en dépit des faibles efficacités de recombinaison homologue, de nombreux événements de recombinaison non-homologue ont lieu. En effet, dans des cellules de mammifères, la recombinaison non-homologue, ou illégitime, est environ 1000 fois plus efficace que la recombinaison homologue [Lin, et al., 1985, Thomas, et al., 1986] et fait essentiellement intervenir un mécanisme de type NHEJ, qui intervient préférentiellement en phase G1 [Takata, et al., 1998]. D'ailleurs, il est rapporté que la NHEJ et la recombinaison homologue sont deux mécanismes intervenant séquentiellement pour la réparation d'une même cassure double-brin [Richardson and Jasin, 2000], la NHEJ précédant la recombinaison homologue [Delacote, et al., 2002, Saintigny, et al., 2001]. De plus, il ne peut être réellement tiré bénéfice de l'introduction d'une cassure double-brin au gène cible pour stimuler la réparation puisque si la fréquence de recombinaison homologue est augmentée, la fréquence de recombinaison non-homologue l'est encore plus eu égard à la spécificité non-absolue des nucléases spécifiques de gènes [Sargent, et al., 1997]. Dans ces circonstances, l'activité cellulaire de recombinaison non-homologue constitue une limite à l'utilisation de vecteurs de ciblage de type ADN double-brins et des stratégies pour en limiter l'activité ou les conséquences doivent être recherchées.

4.4 - Application à la correction d'un gène d'intérêt thérapeutique

Plusieurs laboratoires ont tenté d'appliquer ces techniques à la correction de gènes d'intérêt thérapeutique. On peut mentionner par exemple l'utilisation de fragments d'ADN double-brins pour la correction de mutations au sein du gène *i)* de la dystrophine (gène *dys*), responsables de la myopathie de Duchenne, *ii)* *cfr*, responsable de la mucoviscidose [Sangiulo, et al., 2008], *iii)* β -globine, responsable d'anémie falciforme [Chang, et al., 2006], *iv)* *DNA-PKcs* impliqué dans une immunodéficiência combinée sévère [Zayed, et al., 2006] ou encore pour la conversion du gène *SMN2* impliqué dans l'atrophie musculaire spinale [Sangiulo, et al., 2005]. Des oligodéoxynucléotides simple-brins ont aussi été utilisés pour la correction de mutations impliquées dans des maladies génétiques telles que la maladie de Pompe (gène codant pour l' α -D-glucosidase) [Lu, et al., 2003] ou la mucoviscidose [de Semir, et al., 2003] et pour la conversion du gène *SMN2* [DiMatteo, et al., 2008]. Les vecteurs rAAV ont, quant à eux, été utilisés pour l'inactivation des gènes *COL1A1* et *COL1A2*,

impliqués dans l'ostéogenèse imparfaite [Chamberlain, et al., 2008, Chamberlain, et al., 2004], ou pour la correction d'une mutation au sein du gène *GusB* (codant pour la β -glucuronidase) responsable de mucopolysaccharidose de type VII [Miller, et al., 2006].

OBJECTIFS

A l'heure où ce projet fût dessiné, peu de laboratoires réalisaient des expériences de correction génique en vue de leur application future à des fins thérapeutiques. Chacune des équipes développant des approches de correction génique par des oligodéoxynucléotides simple-brins, des grands fragments d'ADN double-brins ou des vecteurs rAAV se focalisait sur l'optimisation de leur approche et la compréhension des mécanismes impliqués sans chercher à confronter leurs résultats avec ceux d'une autre approche. Les seules comparaisons indirectes réalisées reposaient sur des bases fragiles, tant le gène ciblé, le type cellulaire utilisé, les conditions d'administration employées, les méthodes d'analyses utilisées différaient entre ces laboratoires. Il nous semblait alors particulièrement important d'initier un travail permettant d'évaluer les efficacités de correction génique relatives de ces trois approches.

Le but de ce travail est dans un premier temps d'évaluer les efficacités de correction génique de chacune de ces trois principales approches de correction génique dans des conditions comparables et optimisées pour la correction pour chacune d'entre elles. Par la suite, nous envisageons d'optimiser ces stratégies de correction génique en modifiant la nature des agents correcteurs ou en stimulant les mécanismes de réparation de l'ADN pouvant être impliqués dans le processus de correction génique.

RESULTATS

I - Evaluation des stratégies de correction génique à un niveau épisomal

Dans cette première partie, sont présentés tout d'abord les systèmes utilisés pour évaluer des efficacités de correction génique à un niveau épisomal ainsi que les développements apportés à ces systèmes. Ensuite, sont présentés les résultats de la comparaison de plusieurs stratégies de correction génique à l'aide de ces systèmes.

1 - Choix des systèmes d'évaluation

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreux systèmes permettant l'évaluation de l'efficacité de correction génique à un niveau épisomal d'un agent correcteur ont été développés depuis maintenant plusieurs années. Parmi ceux-ci, nombre d'entre eux font l'usage de gènes rapporteurs, le plus souvent mutés, qui sont la cible d'une expérience de correction génique visant à réparer la séquence nucléotidique sauvage ce qui se traduit par la restauration du phénotype sauvage qui est aisément détectable. La distinction du phénotype mutant ou sauvage permet alors d'évaluer l'efficacité de correction génique de l'agent correcteur considéré. Dans notre étude, nous nous sommes inspirés de ces systèmes pour développer 2 systèmes complémentaires permettant d'évaluer les efficacités de correction génique à un niveau épisomal de différents agents correcteurs.

Le premier le système (LucMut) est constitué d'un plasmide d'expression eucaryote contenant, entre autres, une cassette d'expression d'une protéine de fusion eGFP::luciférase présentant une mutation non-sens n'abolissant que l'activité luciférase de la protéine. L'évaluation de l'efficacité de correction génique est réalisée par la mesure d'une activité enzymatique, l'activité luciférase, au sein de la population cellulaire traitée toute entière et peut être corrélée au niveau d'expression du transgène (efficacité de transfection), mesuré grâce au gène rapporteur eGFP. Ce mode d'évaluation rend compte de l'efficacité de correction génique globale mais ne prédit pas de la distribution de cette activité au sein de la population considérée. Est-elle restreinte à quelques cellules présentant une forte activité luciférase ou est-elle diffuse à toutes les cellules transfectées mais présentant une activité enzymatique moindre ? Pour répondre à cette question, nous avons choisi de développer un second système (meGFP), également basé sur l'utilisation d'un système d'expression

eucaryote qui permet, cette fois, l'expression d'un gène rapporteur codant une protéine eGFP mutée. L'analyse phénotypique des populations traitées permet alors la détermination de la proportion de cellules au sein desquelles un ou des évènements de correction génique ont pu avoir lieu mais aussi d'apprécier dans quelle proportion les plasmides transfectés sont réparés par la mesure des intensités moyennes de fluorescence.

L'utilisation conjointe de ces deux systèmes peut permettre de caractériser finement les différentes stratégies de correction génique étudiées par l'intermédiaire de leurs efficacités de correction génique. Dans les sections qui suivent, ces deux systèmes sont successivement décrits, caractérisés puis utilisés pour l'évaluation et la comparaison des efficacités de correction génique des différents agents correcteurs inclus dans nos études.

2 - Système d'évaluation LucMut

2.1 - Génération de la cassette d'expression

Le plasmide rapporteur mutant utilisé dans cette étude (peGFPLucMut, voir Figure 21), cible de l'expérience de correction génique, dérive du plasmide peGFPLuc (6367 pb). Brièvement, il s'agit d'un vecteur d'expression eucaryote permettant la synthèse d'une protéine de fusion eGFP::luciférase. Plus précisément, ce dernier contient le promoteur précoce du cytomégalovirus humain (ieCMV), permettant une forte et rapide expression du transgène en amont duquel il est placé et dont il contrôle le niveau transcriptionnel. Le gène de fusion eGFPLuc résulte de la fusion de la séquence nucléotidique codant la protéine eGFP codon stop excepté (717 pb) en 3' avec celle codant la protéine luciférase (1638 pb) entre lesquelles un linker de 39 pb est inséré. En 3' du cadre de lecture ouvert constitué par ces trois séquences fusionnées (eGFP-linker-luciférase, 2394 pb), est placé le signal de polyadénylation du virus simiesque SV40 (SV40 polyA) dont la présence permet une maturation et une stabilité accrues du transcrit assurant ainsi une meilleure traduction (voir Figure 21). En outre, le plasmide peGFPLuc contient le gène *aph* (*neo*) codant pour une aminoglycoside phosphotransférase qui confère une résistance à la néomycine et permet l'établissement et la sélection de lignées exprimant stablement une telle construction. Il contient également plusieurs origines de répllication : une origine de répllication procaryote pUC (pUC ORI) permettant la répllication du plasmide au sein de son hôte bactérien par lequel

il a été transformé, une origine de répliquée dérivée du phage f1 (f1 ORI) permettant la production d'ADN simple-brin par l'hôte bactérien transformé et infecté par le phage f1 et une origine de répliquée d'origine virale (SV40 ORI) qui permet la répliquée du plasmide dans un système eucaryote exprimant l'antigène grand T du virus SV40 (SV40 T).

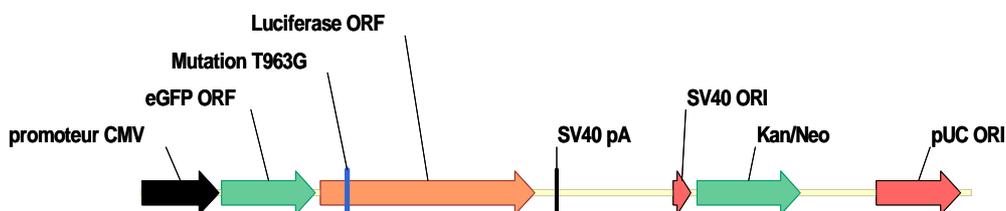


Figure 21. Représentation schématique du plasmide peGFPLucMut.

De 5' en 3' : promoteur du cytomégalo virus humain (CMV), gène de fusion eGFP::Luciférase composé du cadre de lecture ouvert du gène eGFP (eGFP ORF, *eGFP open reading frame*) fusionné en phase avec le cadre de lecture ouvert du gène luciférase (Luciférase ORF) et qui présente en position 963 la mutation T963G introduisant un codon stop, signal de polyadénylation (SV40 pA) et origine de répliquée (SV40 ORI) du virus simiesque SV40, gène *aph* de résistance à la kanamycine et à la néomycine (Kan/Neo) et origine de répliquée bactérienne de type pUC (pUC ORI).

De ce plasmide dérive le plasmide peGFPLucMut par l'introduction d'une mutation ponctuelle non-sens, au sein du cadre de lecture ouvert du gène luciférase et en amont de la région codant le site catalytique de la protéine luciférase identifié en position 400-1000 (de la séquence nucléotidique du cadre de lecture ouvert de la luciférase). Cette mutation a été introduite par mutagenèse dirigée ciblant le nucléotide 207 du cadre de lecture ouvert du gène luciférase (969 du cadre de lecture ouvert du gène de fusion) responsable de la présence d'un acide aminé tyrosine en position 69 de la protéine luciférase (position 321 de la protéine de fusion). La substitution effectuée (transition) conduit au remplacement d'une thymine par une guanine (T963G) introduisant alors un codon stop ambre (TAG) en lieu et place du codon sauvage tyrosine (TAT) (Figures 22 et 23).

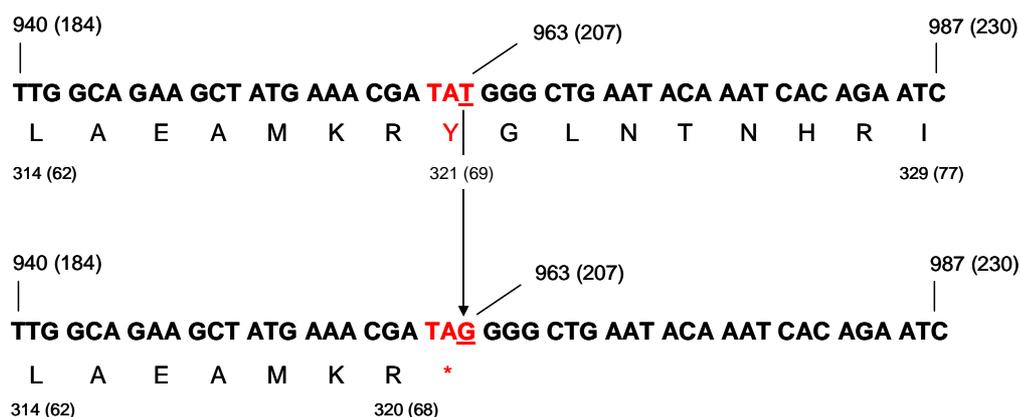


Figure 22. Séquences nucléotidiques et protéiques des gènes eGFPLuc et eGFPLucMut.

Au dessus de la séquence nucléotidique apparaît la position du nucléotide désigné par rapport à la première du gène eGFP ou par rapport à la première base du gène luciférase lorsqu'elle est indiquée entre parenthèses. Sous la séquence protéique apparaît la position de l'acide aminé désigné par rapport au premier acide aminé du gène eGFP ou par rapport au premier acide aminé du gène luciférase lorsqu'elle est indiquée entre parenthèses.

La présence du codon stop devrait permettre un arrêt de la traduction à son niveau et conduire à la synthèse d'une protéine de fusion tronquée uniquement constituée de la protéine eGFP, fonctionnelle, fusionnée en carboxy-terminal avec un peptide de 81 acide aminés correspondant au linker de 13 acide aminés et à l'extrémité amino-terminale de la protéine luciférase (68 acides aminés), théoriquement dépourvue de toute activité enzymatique de type luciférase (voir Figure 23).

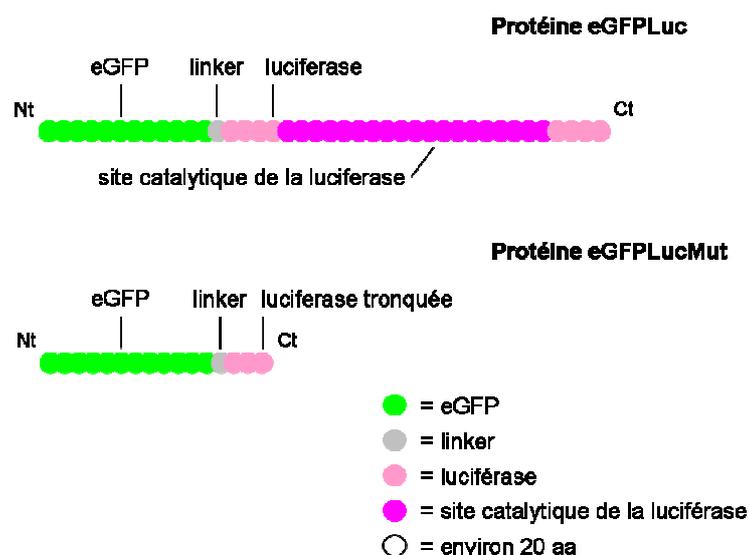


Figure 23. Schéma des protéines eGFPLuc et eGFPLucMut.

2.2 - Caractérisation de la fonctionnalité de eGFPLucMut

S'agissant d'un mutant jamais décrit à ce jour, il est particulièrement nécessaire de le caractériser avec soin. S'il peut-être attendu qu'il permet la synthèse d'une protéine de fusion présentant les mêmes propriétés de fluorescence que la protéine eGFP ou que la protéine eGFPLuc mais exempte d'activité luciférase, il convient de s'en assurer par la réalisation de tests fonctionnels.

Pour ce faire, les plasmides peGFPLuc et peGFPLucMut ont été transfectés dans des cellules HEK293 (human embryonic kidney 293), lignée cellulaire réputée facilement transfectable avec la plupart des agents transfectants. Nous avons utilisé un polymère cationique : la b-polyéthylèneimine branchée de 25 kDa (b-PEI) utilisée au ratio massique b-PEI/ADN 4:2. Les cellules sont transfectées avec 2 μg d'ADN par puits et sont récoltées pour analyse 48 heures après la transfection pour être soumises d'une part à une mesure de l'activité luciférase après lyse des échantillons, et d'autre part, à une évaluation par cytométrie en flux de la proportion de cellules présentant un phénotype eGFP (cellules eGFP+), c'est-à-dire présentant une fluorescence verte (596 nm) lorsque qu'illuminées par une lumière bleue (495 nm) ainsi qu'à une évaluation de l'intensité moyenne de fluorescence de ces mêmes cellules.

Les résultats de la mesure de l'activité luciférase au sein des échantillons de cellules non-transfectées ou transfectées par les plasmides peGFPLuc ou peGFPLucMut sont donnés dans la Figure 24. Lorsque les cellules sont transfectées avec le plasmide sauvage peGFPLuc, une forte activité luciférase ($6,8 \cdot 10^8$ RLU/mg protéine) est détectée au sein de l'échantillon. Elle est d'ailleurs comparable à celle obtenue dans des conditions similaires mais dans lesquelles est utilisé un plasmide permettant l'expression d'une protéine luciférase non-fusionnée sous le contrôle d'un même promoteur. En revanche, lorsque le plasmide peGFPLucMut est utilisé, une très faible activité luciférase est mesurée ($2,3 \cdot 10^4$ RLU/mg protéine) correspondant à une réduction d'un facteur 30 000 de l'activité luciférase comparée à celle obtenue lorsqu'est utilisé le plasmide peGFPLuc. Il persiste toutefois une très faible activité enzymatique lorsque le plasmide mutant est utilisé comme le montre la comparaison entre des cellules transfectées par ce dernier et des cellules non-transfectées (qui génèrent une activité luciférase mesurée à $1 \cdot 10^4$ RLU/mg protéine).

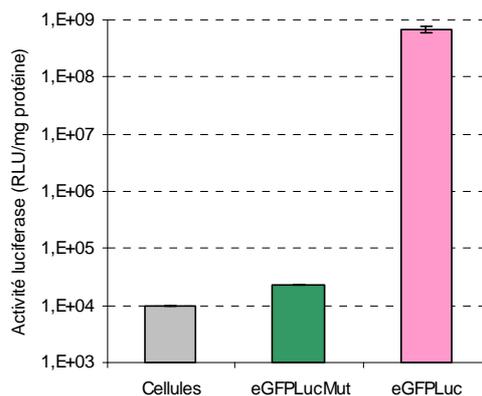


Figure 24. Comparaison des niveaux d'activité luciférase générés après transfection de cellules HEK293 par les plasmides peGFPLuc et peGFPLucMut.

Néanmoins, la très faible activité luciférase générée par la protéine tronquée eGFPLucMut, qui est à peine deux fois supérieure à celle obtenue sans transfection, ainsi que la très forte réduction de son activité enzymatique comparée à celle de la protéine eGFPLuc, permettent raisonnablement de considérer la protéine eGFPLucMut comme un mutant de la protéine eGFPLuc déficient au regard de son activité luciférase. Si cette dernière conclusion est de bon augure pour envisager l'utilisation du plasmide peGFPLucMut dans le cadre d'expériences de correction génique visant à restaurer la séquence sauvage du transgène muté, il convient également d'examiner les propriétés de fluorescence des deux protéines, tronquée ou non. En effet, il convient également de s'assurer que ce dernier critère puisse être utilisé pour déterminer l'efficacité de transfection de chaque échantillon, cette dernière valeur pouvant être utilisée pour normaliser les efficacités de correction génique (activité luciférase) au regard des efficacités de transfection (proportion de cellules eGFP+) si elles tendaient à varier.

L'analyse par cytométrie en flux des échantillons de cette expérience (Figure 25A et 25B) révèle que l'efficacité de transfection obtenue avec le plasmide mutant est inférieure à celle obtenue avec le plasmide sauvage (14% et 25%, Figure 25A) ainsi que l'intensité de fluorescence moyenne, exprimée en unités arbitraires, qui décroît de 1470 ua pour la protéine peGFPLuc à 456 ua pour la protéine peGFPLucMut (Figure 25B).

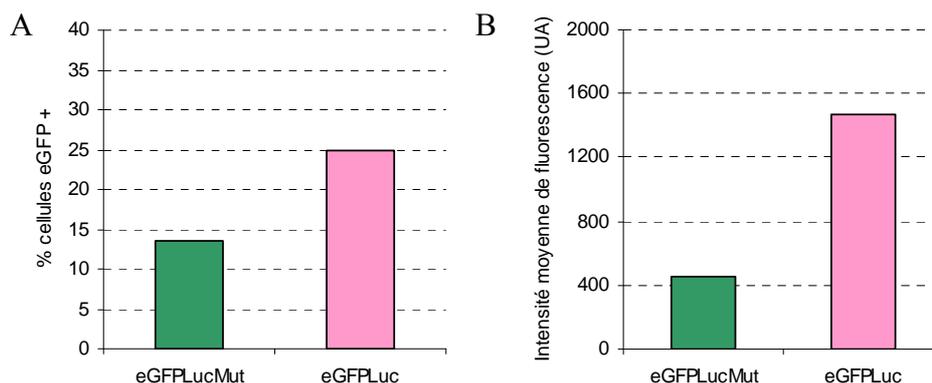


Figure 25. Comparaison des proportions de cellules eGFP positives et de leurs intensités moyenne de fluorescence après transfection de cellules HEK293 par les plasmides peGFPLuc et peGFPLucMut.

En figure 25A : proportions de cellules eGFP+, en figure 25B : intensités moyennes de fluorescence des populations de cellules eGFP+.

Il semble donc que le plasmide peGFPLucMut ne permet pas d'obtenir une expression du phénotype eGFP d'une manière comparable à celle observée avec le plasmide peGFPLuc. Ceci peut-être dû à plusieurs facteurs. Tout d'abord, la protéine de fusion tronquée produite à partir du gène eGFPLucMut peut présenter une moindre fluorescence pour des raisons d'ordre structurel. En effet, si la présence en carboxy-terminal de la protéine eGFP d'un fragment contenant la séquence protéique du peptide linker et de la luciférase ne semble pas affecter ses propriétés de fluorescence comme le montre la figure 26, il ne peut être exclu que la présence seule du court fragment contenant le peptide linker et la région amont de la luciférase puisse avoir un effet sur la conformation de la protéine eGFP et en modifier ses propriétés de fluorescence. La baisse apparente de l'efficacité de transfection et de l'intensité moyenne de fluorescence peut également être due, non pas aux propriétés biologiques modifiées de la protéine tronquée, mais à une régulation particulière de son niveau d'expression. En effet, le plasmide mutant peGFPLucMut conduit à la synthèse d'un ARN messager présentant un codon stop prématuré en position 963 du transcrit d'une longueur totale d'environ 2400 pb ce qui pourrait activer le système NMD (pour *non-sense mediated mRNA decay*), système connu pour dégrader les ARN messager présentant un ou des codons stop dans des positions aberrantes telle qu'une position trop avancée au sein du transcrit, comme c'est le cas ici. Le transcrit du gène eGFPLucMut serait alors soumis à une dégradation sélective ne permettant pas ou permettant seulement un faible niveau de traduction.

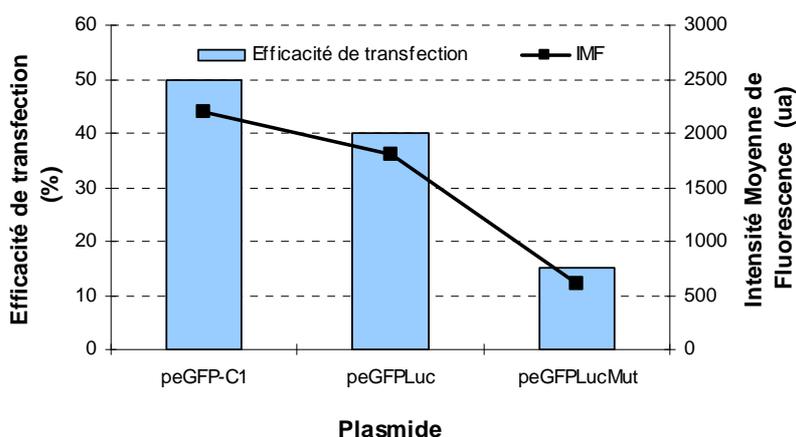


Figure 26. Comparaison des proportions de cellules eGFP positives et de leurs intensités moyennes de fluorescence après transfection de cellules HEK293 par les plasmides peGFP-C1, peGFPLuc et peGFPLucMut.

En conclusion, les résultats présentés dans cette étude montre que i) le plasmide peGFPLucMut permet la synthèse d'une protéine de fusion tronquée eGFPLucMut globalement inactive au regard de son activité luciférase qui est à peine deux fois supérieure à celle de cellules non-transfectées, ii) étant donné la réduction drastique de son activité enzymatique (d'environ un facteur 30 000), il est peut être attendu qu'une faible élévation de la proportion de plasmides sauvages, résultats d'une expérience de correction génique, puisse être détectée et mesurée, et iii) bien qu'une partie des transcrits soit sans doute soumis à une dégradation par le système NMD, nous observons tout de même une expression significative de l'eGFP permettant de déterminer la proportion de cellules transfectées. Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons pensé que le plasmide peGFPLucMut est un outil intéressant pour évaluer l'efficacité de correction.

2.3 - Optimisations des conditions expérimentales

2.3.1 - Administration des acides nucléiques

Si la plupart des nombreux facteurs qui limitent ou favorisent la correction génique sont difficiles à appréhender, lorsqu'ils sont connus, il en est un qu'il est aisé d'examiner si ce n'est indispensable dans la mesure où il est maîtrisable et qu'il peut impacter sur le résultat :

l'efficacité de transfection. En effet, il peut sembler évident que plus les acides nucléiques, substrat et matrice de la correction, seront efficacement administrés jusqu'aux noyaux d'un maximum de cellules, plus leurs interactions seront possibles et ce dans un plus grand nombre de cellules, conduisant alors à l'observation d'une efficacité de correction génique plus élevée. Parce qu'il est souhaitable d'utiliser le système peGFPLucMut dans des conditions optimisées pour la correction permettant la mesure de très faibles activités luciférase, nous avons recherché à optimiser les conditions de transfections.

Pour ce faire, nous avons comparé les efficacités de transfection obtenues lorsque le plasmide peGFPLucMut est utilisé pour transfecter des cellules avec divers agents transfectants et dans diverses conditions de complexation des acides nucléiques. Toutefois, ne pouvant faire varier tous les paramètres de l'expérience de transfection, nous n'avons pas tenté d'optimiser le protocole de culture cellulaire en faisant varier le type cellulaire utilisé, leur densité cellulaire au jour de la transfection ainsi que la durée de la transfection, considérant, sur la base de nombreux résultats obtenus au sein du laboratoire, que les conditions de culture cellulaire utilisées sont optimales pour l'obtention d'efficacités de transfection élevées.

Dans cette étude, six agents transfectants ont été testés ainsi que plusieurs ratios agent transfectant/ADN pour l'administration de 2 ug d'ADN plasmidique peGFPLucMut : la polyéthylèneimine branchée de 25 kDa (b-PEI) utilisée aux ratios massiques agent transfectant/ADN 3:2, 4:2 et 5:2, la polyéthylèneimine linéaire de 22 kDa (l-PEI) aux ratios massiques 1:2, 2:2, 3:2 et 4:2, le DOTAP avec le ratio équivalent de charges/masse d'acide nucléique 4:1, la Lipofectamine aux ratios massiques 3:1 et 4:1, le FuGene aux ratios massiques 3:1, 4:1, 5:1 et 6:1 et le peptide cationique LAH4 aux ratios massiques 4:1, 5:1 et 6:1. Les résultats de l'analyse de cytométrie en flux du phénotype eGFP, exprimés en pourcentage de cellules transfectées (Figure 27), montre que la plupart des agents transfectants testés, quelles que soient leurs conditions d'utilisation, ne permettent pas d'améliorer l'efficacité de transfection au-delà de celle obtenue avec le protocole originel (b-PEI 4:2), à l'exception de la Lipofectamine qui permet d'obtenir au ratio massique agent transfectant/ADN 4:1 une efficacité de transfection de plus de 45%. Au regard de ces résultats, nous avons alors choisi comme agent transfectant la Lipofectamine utilisée au ratio massique agent transfectant/ADN 4:1.

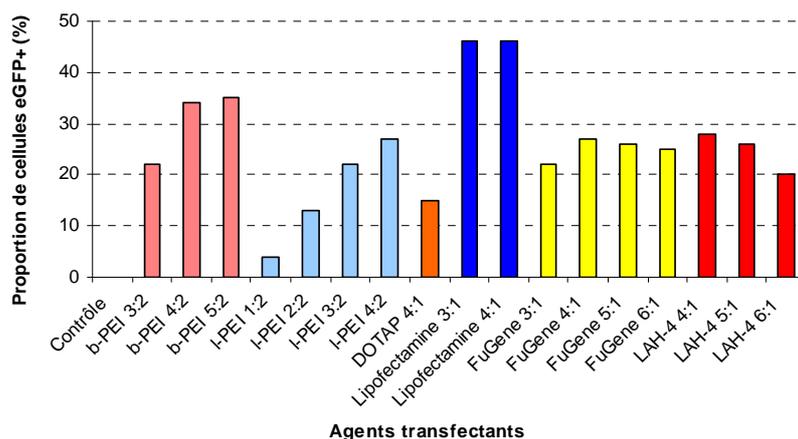


Figure 27. Comparaison des efficacités de transfection (proportion de cellules eGFP positives) des différents agents transfectants testés avec le plasmide peGFPLucMut sur des cellules HEK293.

2.3.2 - Préparation des complexes pour la cotransfection plasmide-agent réparateur

Le protocole de transfection optimisé décrit ci-dessus, basé sur l'administration de 2 ug de plasmides par puits, est néanmoins différent de celui qui sera utilisé dans le cadre d'une expérience de correction génique épisomale. Pour étudier l'impact d'une quantité supplémentaire d'acides nucléiques sur l'efficacité de transfection, des cellules HEK293 ont été transfectées en utilisant la Lipofectamine au ratio massique 4:1, soit par 2 ug de plasmide peGFPLucMut (condition de référence), soit par 4 ug du même plasmide ou enfin par 2 ug du même plasmide additionné soit à 2 ug d'ADN de sperme de saumon (SSP ; constitué de fragments linéaires d'ADN double-brins d'environ 300 pb), soit à 2 ug d'acide polyglutamique (APG), un polymère anionique. Les résultats issus des analyses par cytométrie en flux de la proportion de cellules présentant le phénotype eGFP (Figure 28A) et par dosage enzymatique de l'activité luciférase (Figure 28B) montrent tout d'abord que des efficacités de transfection comparables sont obtenues que soient utilisés 2 ou 4 ug de plasmide peGFPLucMut tant au regard de la proportion de cellules transfectées (36% contre 37% de cellules eGFP+) qu'au regard de l'activité luciférase générée ($1,1 \cdot 10^9$ contre $1,3 \cdot 10^9$ RLU/mg protéine). Il peut aussi être observé que lorsque 2 des 4 ug de plasmides peGFPLucMut sont remplacés par une quantité équivalente d'un polymère cationique, seulement de faibles modifications de l'efficacité de transfection sont détectées (36% et $1,1 \cdot 10^9$ RLU/mg protéine contre 36% et $1,5 \cdot 10^9$ RLU/mg protéine) tandis que lorsqu'ils sont remplacés par une quantité équivalente d'ADN de sperme de saumon, une baisse d'un facteur 2 est observée au regard de chacun des deux critères d'analyse (22% et $6,7 \cdot 10^9$ RLU/mg protéine). Ce résultat contrasté

tend à suggérer que la présence de 2 µg additionnels de matériel transfecté n'amointrit pas nécessairement l'efficacité de transfection (cas de l'acide poly-glutamique) mais qu'elle peut, selon la nature physico-chimique du matériel « additionnel », varier dans des proportions plus importantes (cas de l'ADN de sperme de saumon). Ces observations sont particulièrement importantes car elles nous conduisent à considérer avec attention les éventuels effets que les agents correcteurs utilisés dans nos études pourraient avoir sur l'efficacité de transfection. Il conviendra alors de veiller à ne comparer, lorsque cela sera possible, que des résultats obtenus dans le cadre de l'utilisation de protocoles de transfection mettant en jeu des quantités similaires d'acides nucléiques de nature physico-chimique comparable si ce n'est identique, ou à défaut de considérer l'existence d'un éventuel biais dans les interprétations et conclusions qui découleraient d'une telle étude.

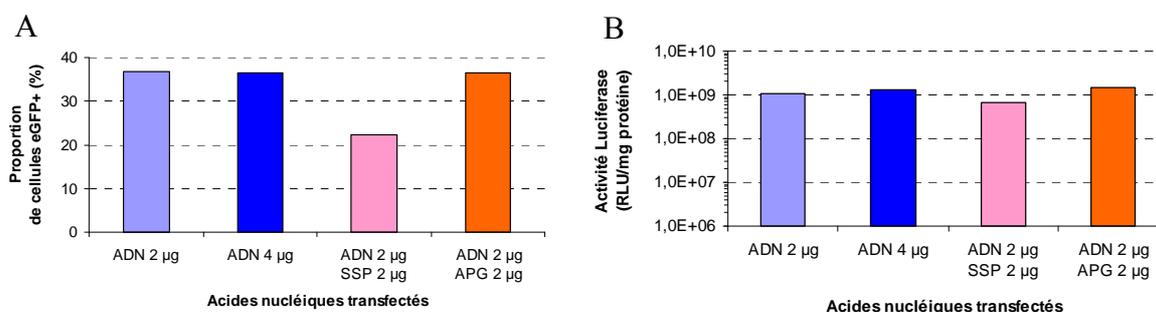


Figure 28. Comparaison des proportions de cellules eGFP positives et des niveaux d'activité luciférase en fonction de la masse de plasmide peGFPLuc, de la masse totale d'acide nucléique et de nature chimique des agents transfectés.

En figure 28A : proportions de cellules eGFP+, en figure 28B : activités luciférases générées après transfection des cellules HEK293 par les quantités d'acide nucléique indiquées. ADN : plasmide peGFPLuc, SSP : ADN de sperme de saumon, APG : acide polyglutamique.

2.3.3 - Evaluation de la durée optimale d'incubation

Si jusqu'à présent nous avons analysé les populations cellulaires traitées 48 heures après la transfection et ce quel que soit le protocole de transfection utilisé, il convient toutefois de s'assurer que cette durée d'incubation est effectivement celle permettant une expression maximale du transgène.

Pour cela, nous avons utilisé le protocole de transfection précédemment décrit (cellules HEK293, 2 µg du plasmide sauvage, Lipofectamine ratio 4:1) tout en faisant varier la durée

d'incubation (24 heures, 48 heures, 72 heures et 6 jours) avant d'analyser les populations cellulaires au regard de leur activité luciférase (Figure 29). Les résultats de cette étude montrent que le maximum d'activité luciférase est observé après une incubation de 48 heures ($7,4 \cdot 10^8$ RLU/mg protéine à 24h, $1,1 \cdot 10^9$ RLU/mg protéine à 48h) et que l'activité luciférase décroît fortement pour des durées d'incubation plus longues ($3,6 \cdot 10^8$ RLU/mg protéine à 72h, $1,1 \cdot 10^9$ RLU/mg protéine à 6 jours). Au regard de ces résultats, nous avons choisi de conserver une durée d'incubation de 48 heures après transfection pour l'ensemble des expériences de correction génique à un niveau épisomal.

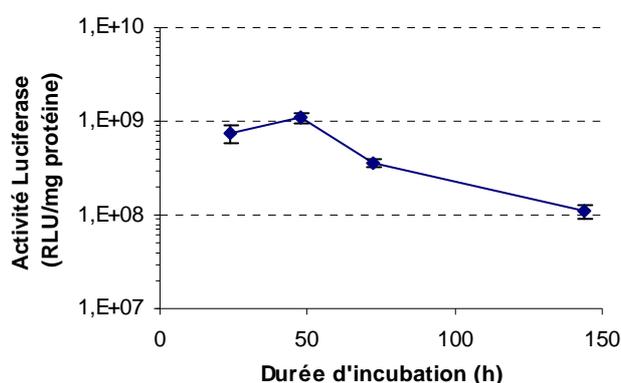


Figure 29. Evaluation de la durée optimale d'incubation après transfection de cellules HEK293 par le plasmide peGFPLucMut.

Suite à ces optimisations du protocole de transfection et d'analyse, nous nous sommes orientés vers l'évaluation proprement dite de l'efficacité de correction génique à un niveau épisomal d'une mutation ponctuelle (portée par le plasmide peGFPLucMut) par des fragments d'ADN double-brins, des oligodéoxynucléotides ou encore des vecteurs AAV. Les résultats de ces études ainsi que les conclusions qui en découlent sont présentés ci-après.

2.4 - Tests préliminaires de correction génique épisomale

2.4.1 - Utilisation d'un fragment d'ADN double-brin de 500 pb

Nous commençons cette première étude, visant à évaluer l'efficacité de correction génique de la mutation ponctuelle introduite au sein du gène de fusion eGFPLuc (plasmide peGFPLucMut) par des fragments d'ADN double-brins, en utilisant comme agent correcteur un fragment d'ADN double-brins de 500 pb, homologue au gène eGFPLuc et ne différant du

gène eGFPLucMut que par un seul nucléotide positionné en son centre comme illustré ci-dessous en Figure 30.

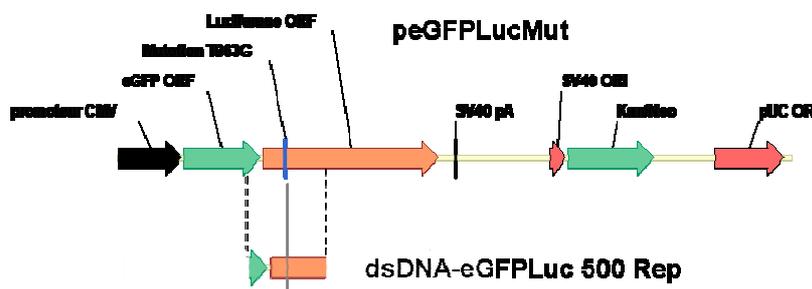


Figure 30. Alignement du plasmide peGFPLucMut et du fragment dsDNA-eGFPLuc 500 Rep.

Pou cela, des cellules HEK293 ont été cotransfectées par le fragment dsDNA Luc 500 Rep et le plasmide mutant dans des proportions variables (ratios molaires plasmide/agent correcteur de 1/0,1, 1/1, 1/2,5, 1/10 et 1/25) en conservant constante la masse de plasmide transfectée (condition 1/0), à savoir 2 µg. Les résultats de cette première expérience, présentés en Figure 31, montrent tout d'abord que lorsque le fragment d'ADN est cotransfecté avec le plasmide, une augmentation de l'activité luciférase d'au moins un facteur 10 comparée à la condition où seul le plasmide est transfecté ($9,1 \cdot 10^5$ RLU/mg protéine pour la condition 1/0,1 contre $7,1 \cdot 10^4$ RLU/mg protéine pour le contrôle 1/0) est mesurée. Enfin, il peut être observé que pour des quantités croissantes de fragments d'ADN utilisés, l'efficacité de correction génique, traduite par le niveau d'activité luciférase, continue d'augmenter - bien qu'atteignant rapidement un plateau : $3,5 \cdot 10^6$ RLU/mg protéine pour la condition 1/1 contre $4 \cdot 10^6$ RLU/mg protéine pour la condition 1/10 - et permet l'obtention d'un facteur de correction voisin de 30 lorsque sont comparées ces conditions à la condition contrôle (condition 1/0).

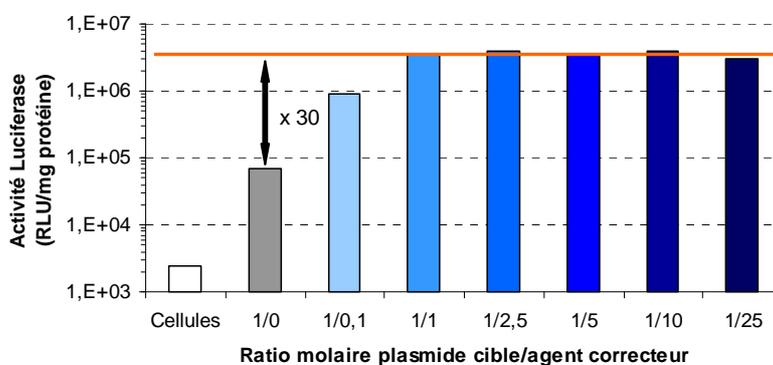


Figure 31. Evaluation des efficacités de correction génique du fragment d'ADN double-brins dsDNA-eGFPLuc 500 Rep en fonction du ratio molaire plasmide cible/agent correcteur.

Si toutefois ces résultats semblent indiquer que le fragment dsDNA Luc 500 Rep, lorsqu'il est cotransfecté avec le plasmide peGFPLucMut, cible de la correction, permet d'observer une augmentation de l'activité luciférase, probable conséquence de la correction du gène eGFPLucMut par le fragment et de l'expression de la protéine eGFPLuc en conséquence, on ne peut exclure qu'il en soit la cause à lui seul. En effet, celui-ci pourrait être, à lui seul, à l'origine de la production d'une protéine présentant une activité luciférase, par exemple en s'intégrant en phase au sein d'un gène transcrit du génome. Si cela peut sembler peu probable, nous l'avons tout de même vérifié. Pour cela, nous avons comparé les activités luciférase générées lorsque les cellules sont transfectées par le fragment en présence ou non du plasmide cible. Lorsque le couple plasmide/fragment, au ratio molaire 1/25, est transfecté, une activité luciférase de 3.10^6 RLU/mg protéine est mesurée tandis que la transfection de la même masse de fragment seul ne permet de détecter une activité luciférase que de $3,6.10^3$ RLU/mg protéine, soit plus de 1000 fois inférieure (Figure 32). Cette très faible activité luciférase observée, d'ailleurs nettement inférieure à celle générée par une masse équivalente de plasmide peGFPLucMut transfecté seul et à peine supérieure à celle générée par des cellules non-transfectées, nous permet d'en conclure que le fragment dsDNA Luc 500 Rep n'est pas à lui seul à l'origine de l'augmentation de l'activité luciférase observée et que celle-ci n'est le résultat que de la cotransfection des nos deux acteurs : plasmide cible peGFPLucMut et agent correcteur dsDNA Luc 500 Rep.

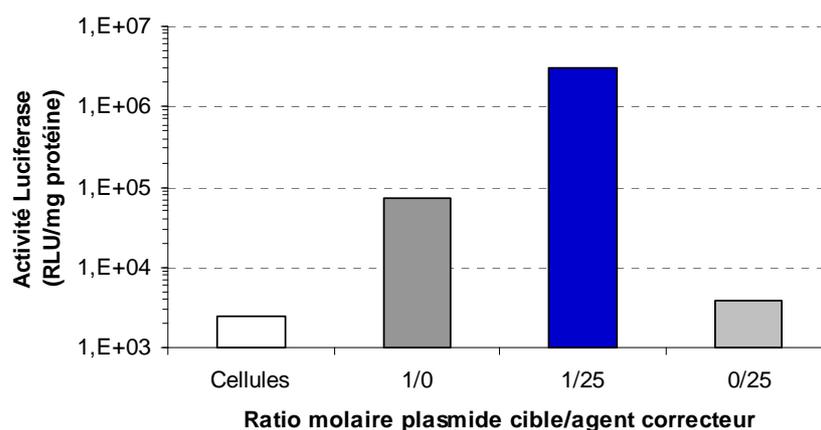


Figure 32. Niveaux d'activité luciférase générés après transfection du plasmide cible peGFPLucMut, de l'agent correcteur dsDNA-eGFPLuc 500 Rep ou des deux simultanément.

Enfin, si l'on peut considérer que l'augmentation d'un facteur 10 de l'activité luciférase (comparaison des conditions 1/0 et 1/0,1) est le résultat d'événements de correction génique survenus lorsque plasmide cible et agent correcteur sont cotransfectés et que l'augmentation de ce facteur jusqu'à 30 (comparaison des conditions 1/0 et 1/1) témoigne d'une augmentation de l'efficacité de correction génique, il reste toutefois difficile d'en déterminer précisément les efficacités relatives de correction génique dans la mesure où, dans cette expérience, les différentes conditions comparées ne sont pas comparables du point de vue de l'efficacité de transfection. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la transfection de plusieurs microgrammes d'acides nucléiques, en sus des 2 µg de plasmide cible, peut, selon sa nature physicochimique, affecter l'efficacité de transfection. Pour ces raisons, nous pensons qu'il est préférable de comparer des conditions dans lesquelles les quantités totales d'acides nucléiques ainsi que leurs natures physicochimiques sont identiques et avons pour cela généré un fragment d'ADN double-brins « contrôle ». Ce dernier, dsDNA-eGFPLuc 500 Ctr, ne diffère du fragment dsDNA Luc 500 Rep que de par la séquence qui le constitue (voir Figure 33). Il contient la séquence mutée du gène eGFPLuc ne permettant pas ainsi, théoriquement, la correction du gène eGFPLucMut. Toutefois, lorsqu'il est transfecté dans les mêmes proportions que le fragment correcteur et parce qu'il est de même nature physicochimique, il permet de reproduire des conditions de transfusions identiques autorisant ainsi la comparaison des activités luciférase générées par de telles conditions.

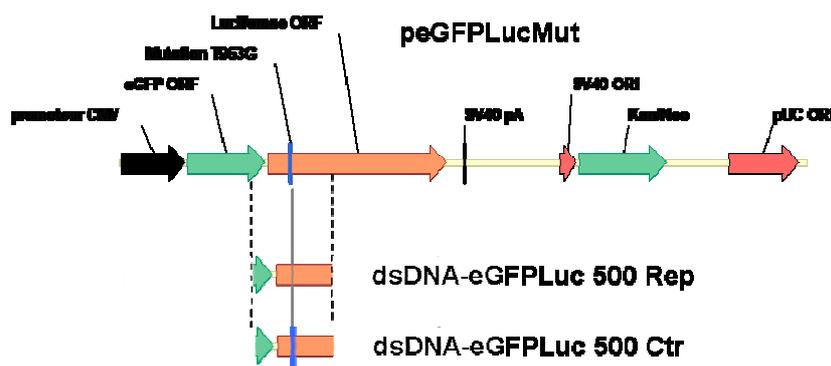


Figure 33. Alignement du plasmide peGFPLucMut et des fragments dsDNA-eGFPLuc 500 Rep et dsDNA-eGFPLuc 500 Ctr.

Dans l'expérience qui suit, et dont les résultats sont présentés en Figure 34, il est l'objet d'une comparaison des activités luciférase obtenues lorsque sont utilisés les fragments dsDNA-eGFP_{Luc} 500 Ctr et dsDNA-eGFP_{Luc} 500 Rep à différents ratios molaires. Il apparaît tout d'abord une faible augmentation de l'activité luciférase lorsque des quantités croissantes de fragment contrôle sont utilisées (Figure 34A). Ceci pourrait s'expliquer par une transfection améliorée dans ces conditions permettant une meilleure expression de la protéine eGFP_{Luc}Mut qui, pour rappel, bien que mutante, n'est pas tout à fait dépourvue d'activité luciférase. Concernant les activités luciférase générées lorsque le fragment correcteur est utilisé, celles-ci sont là encore au moins 10 fois supérieures à celles obtenues avec leurs contrôles (Figure 34A). Si l'on considère désormais comme condition contrôle non plus la condition 1/0 pour chacun des ratios testés mais la condition de même ratio utilisant le fragment contrôle dsDNA-eGFP_{Luc} 500 Ctr, il apparaît alors des facteurs de correction de 44, 10, 27, 21, 14 et 21 pour les ratios 1/0,1, 1/1, 1/2,5, 1/5, 1/10 et 1/25 tandis que des facteurs de correction de 21, 10, 40, 48, 56 et 72 auraient été obtenus si la condition plasmide seul (condition 1/0) avait été choisie comme condition contrôle (Figure 34B).

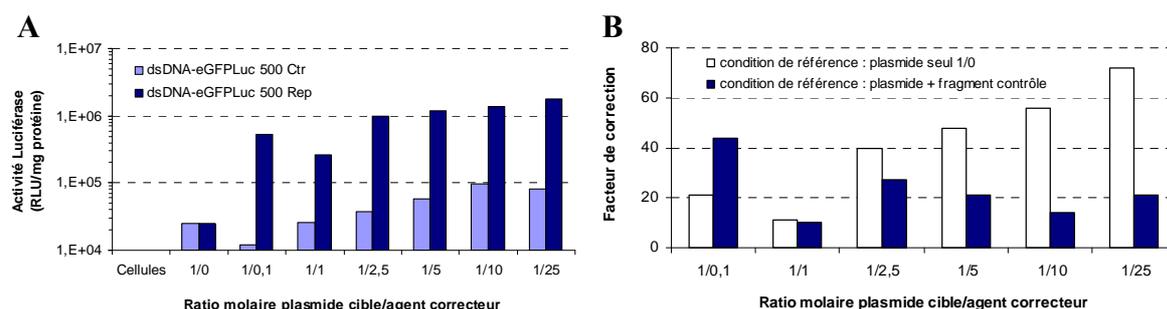


Figure 34. Niveaux d'activité luciférase et facteurs de correction générés en fonction du ratio molaire et du type d'agent correcteur.

Figure 34A : Niveaux d'activité luciférase générés par les fragments dsDNA-eGFP_{Luc} 500 Rep et dsDNA-eGFP_{Luc} 500 Ctr à différents ratios molaires. Figure 34B : facteurs de correction obtenus selon que soit considéré comme condition de référence la condition plasmide seul 1/0 pour l'ensemble des ratios testés avec le fragment correcteur où que soit considéré comme conditions contrôles les conditions représentées par le fragment contrôle aux mêmes ratios que la condition de correction.

2.4.2 - Normalisation des résultats par l'efficacité de transfection

Enfin, s'il a pu être objecté que la transfection de plusieurs microgrammes d'acides nucléiques, en sus des 2 µg de plasmide cible, peut selon sa nature physicochimique affecter l'efficacité de transfection, raison de l'utilisation de fragment contrôle, il peut alors être

également objecté que la masse de fragments (correcteurs ou contrôles) peut, elle aussi, affecter l'efficacité de transfection dans la mesure où elle varie selon les différents ratios. Pour cette raison, l'efficacité de transfection obtenue pour chacune des conditions de transfection décrites ci dessus à été déterminée (Figure 35).

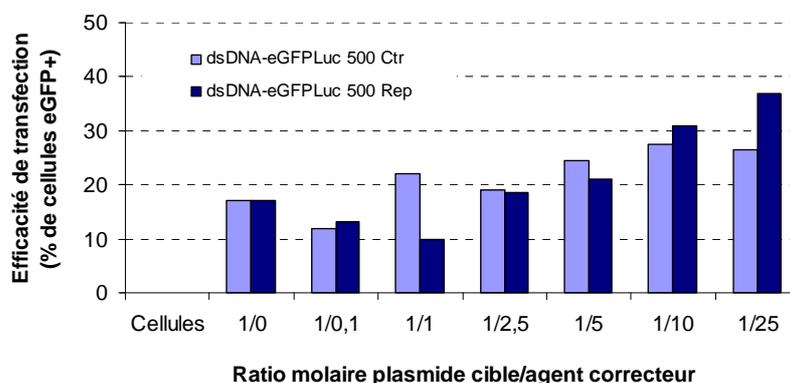


Figure 35. Efficacités de transfection obtenues pour chaque fragment et pour chaque ratio testé.

Les résultats montrent que celle-ci augmente sensiblement avec la masse de fragment transfectée et ce indépendamment du fragment, correcteur ou contrôle, et que, pour un ratio molaire donné, les efficacités de transfection sont à peu près comparables. Ces dernières observations tendent tout d'abord à confirmer un effet dû à la présence du fragment sur l'efficacité de transfection et semble justifier les précautions prises jusqu'à présent concernant l'utilisation d'un fragment contrôle au même ratio molaire qu'est utilisé le fragment correcteur pour évaluer une efficacité de correction génique. Également, parce que cette expérience fait apparaître des efficacités de transfection disparates au travers des différents ratios molaires utilisés, il peut être intéressant de normaliser les niveaux d'activité luciférase par la proportion de cellules transfectées et ainsi pouvoir observer des niveaux d'activité luciférase à efficacité de transfection identique. Sous cette nouvelle forme, les résultats exprimés en RLU/mg protéine/100% de cellules transfectées et présentés en Figure 36A, montrent que l'augmentation sensible de l'activité luciférase avec la masse de fragment correcteur transfecté est essentiellement due à l'augmentation de l'efficacité de transfection puisque après normalisation, l'activité luciférase est identique pour les différents ratios, excepté le ratio 1/1. C'est également le cas avec le fragment contrôle, bien que dans une moindre mesure. D'ailleurs, les facteurs de correction qui peuvent alors être calculés à partir de ces activités luciférases normalisées varient peu comparés à ceux précédemment

présentés : tandis qu'on observait les facteurs de correction de 44, 10, 27, 21, 14 et 21 pour les ratios 1/0,1, 1/1, 1/2,5, 1/5, 1/10 et 1/25, on observe désormais les facteurs de correction de 41, 10, 27, 24, 13 et 16 pour ces mêmes ratios lorsque sont prises en compte les activités luciférase normalisées (Figure 36B).

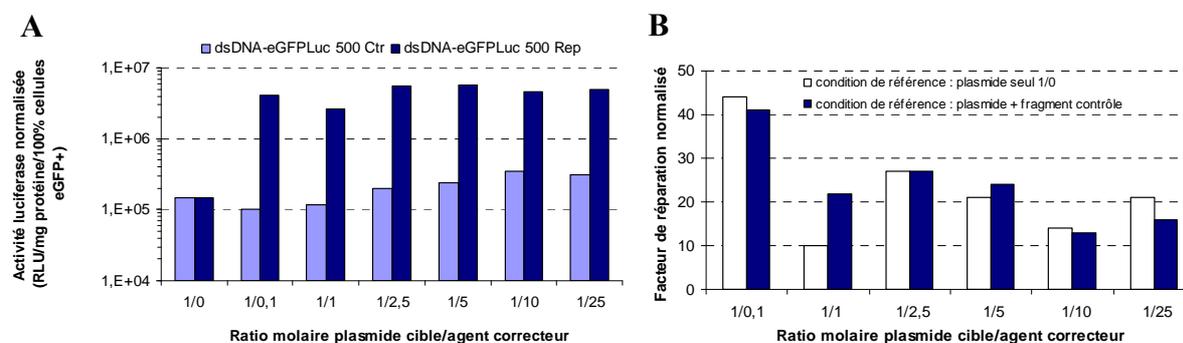


Figure 36. Niveaux d'activité luciférase normalisés et facteurs de correction normalisés générés en fonction du ratio molaire et du type d'agent correcteur.

Figure 36A : Niveaux d'activité luciférase normalisés par rapport à l'efficacité de transfection générés par les fragments dsDNA-eGFPLuc 500 Rep et dsDNA-eGFPLuc 500 Ctr à différents ratios molaires. Figure 36B : facteurs de correction normalisés par rapport à l'efficacité de transfection obtenus selon que soit considéré comme condition de référence la condition plasmide seul 1/0 pour l'ensemble des ratios testés avec le fragment correcteur où que soit considéré comme conditions contrôles les conditions représentées par le fragment contrôle aux mêmes ratios que la condition de correction.

Au vu des différents résultats présentés dans cette partie, il apparaît tout d'abord que la cotransfection du plasmide mutant peGFPLucMut et du fragment d'ADN double-brins dsDNA-Luc 500 réparateur permet d'observer une activité luciférase au moins 10 fois supérieure à celle observée lorsque le fragment d'ADN double-brins dsDNA-Luc 500 contrôle est utilisé. Aussi, l'augmentation de l'activité luciférase observée n'est pas due à la seule présence du fragment d'ADN double-brins dsDNA-Luc 500 Rep, suggérant de ce fait que cette augmentation de l'activité luciférase observée soit le résultat de l'interaction du plasmide mutant avec le fragment réparateur. Il apparaît également que l'efficacité de transfection peut varier d'une condition donnée à une autre, introduisant alors un éventuel biais dans les comparaisons qui seraient réalisées avérant alors nécessaire de normaliser les efficacités de correction par les efficacités de transfection lorsque ces derniers diffèrent entre elles. Toutefois, celles-ci restent proches lorsque sont comparées deux à deux les conditions

utilisant, à un même ratio molaire, les fragments réparateurs et contrôles autorisant alors le calcul d'un facteur de réparation sans qu'y soit pris en compte l'efficacité de transfection.

Utilisant alors les mêmes schémas d'expérience et conditions expérimentales que ceux utilisés ici avec les fragments d'ADN double-brins de 500 pb et appliquant aux résultats obtenus les mêmes analyses que précédemment pratiquées au regard des différentes observations réalisées, il a alors été entrepris d'évaluer les efficacités de correction génique de différents agents correcteurs, à savoir : des fragments d'ADN double-brins ainsi que des oligodéoxynucléotides simple-brin. Malheureusement, cette entreprise s'est avérée infructueuse. En effet, il est apparu au cours de ces expériences une difficulté à reproduire les conditions expérimentales de culture cellulaire. Bien que la lignée cellulaire HEK293 choisie au regard de sa haute transfectabilité semblait idéale pour conduire des expériences de correction génique, il s'est avéré par la suite qu'elle ne l'était pas tout à fait. En raison notamment d'une reprise de la croissance cellulaire après ensemencement très variable, conduisant à l'obtention de cultures cellulaires plus ou moins confluentes et plus ou moins bien transfectées au travers des différentes conditions expérimentales, mais aussi en raison d'une perte massive des cellules traitées (jusqu'à 90%) due à une adhérence variable et semblant dépendante des conditions de transfection.

2.4.3 - Choix de la lignée cellulaire HEK293T

Pour ces motifs, l'utilisation de la lignée HEK293 a été abandonnée et plusieurs lignées cellulaires ont été testées. Parmi celles-ci, nous avons testés les lignées HEK293T, CHO-K1, MRC5, MRC5-V2 et HCT116, lesquelles permettent toutes d'observer de la correction génique suggérant que cette dernière est bien effective quelque soit le type cellulaire, bien que dans des proportions variables. L'une d'entre elles, la lignée cellulaire HEK293T (qui dérive de la lignée HEK293) dans laquelle se trouve exprimée l'antigène grand T du virus simiesque SV40, nous a semblé la plus adéquate pour ce type d'expériences. En effet, cette lignée est beaucoup moins sensible que celle dont elle dérive vis-à-vis des conditions de culture. En particulier, elle est beaucoup plus adhérente que sa consœur et semble moins sensible aux conditions « toxiques » auxquelles elles sont exposées lors de la transfection. Ce dernier aspect permet de garantir la conservation de l'ensemble de la population cellulaire traitée jusqu'au moment de l'analyse. Enfin, il a également pu être montré que les conditions

expérimentales de culture cellulaire et de transfection définies comme optimales pour la lignée HEK293 ont permis l'obtention de résultats tout aussi satisfaisants si ce n'est plus avec la lignée HEK293T. Toutefois, parce qu'aucune étude n'avait été réalisée auparavant pour déterminer l'influence de la densité cellulaire sur les efficacités de transfection et/ou de correction, nous avons réalisé l'expérience suivante.

Des cellules HEK293T ont étéensemencées à différentes confluences s'étalant d'une densité cellulaire de 10% jusqu'à confluence et ont été transfectées soit par un plasmide exprimant la protéine eGFP (peGFP-C1) pour pouvoir déterminer l'efficacité de transfection, soit par le plasmide peGFPLucMut et le fragment d'ADN double-brins dsDNA Luc 1000 réparateur (au ratio molaire 1/10) pour déterminer l'efficacité de correction. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la Figure 37 et montrent que l'efficacité de transfection augmente avec la densité cellulaire jusqu'à un maximum obtenu pour une confluence de 80% (à 10%, 20% et 80% de confluence, on obtient des efficacités de transfection de 23%, 39% et 77% respectivement), tandis que l'efficacité de transfection baisse lorsque la population traitée est confluente.

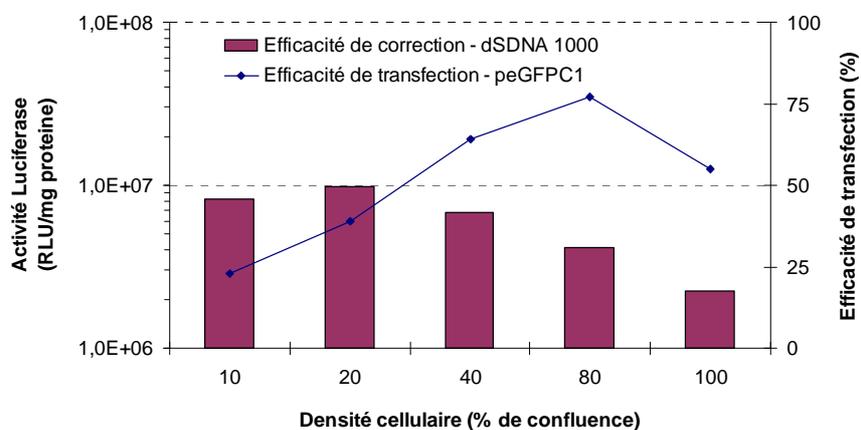


Figure 37. Efficacités de correction génique et efficacités de transfection en fonction de la densité cellulaire.

Figure 37 : les cellules HEK293T sontensemencées aux densités cellulaires indiquées puis sont transfectées par soit par le plasmide cible et le fragment dsDNA-eGFPLuc 500 Rep au ratio 1/10 pour déterminer l'efficacité de correction (représentée par les histogrammes), soit par le plasmide peGFP-C1 pour déterminer l'efficacité de transfection (représentée par la courbe).

D'une manière très intéressante, on peut noter que l'efficacité de correction génique suit une toute autre évolution. Alors que les efficacités de correction maximales sont observées pour des confluences de 10% et 20% ($8,2 \cdot 10^6$ et $9,8 \cdot 10^6$ RLU/mg protéine respectivement), celles-ci décroissent avec l'augmentation de la densité cellulaire pour atteindre à une confluence de 80% une efficacité de correction 2,5 fois inférieure aux efficacités maximales ($4,1 \cdot 10^6$ RLU/mg protéine) et ce quand bien même l'efficacité de transfection d'une telle condition y est au moins 2 fois plus importante. Ces résultats sont particulièrement importants. Ils confirment tout d'abord les hypothèses émises quant aux raisons pouvant conduire à la difficile reproductibilité des résultats lorsque les cellules HEK293 étaient utilisées, à savoir que si la densité cellulaire de la population traitée n'est pas homogène (et par conséquent l'efficacité de correction), alors l'analyse de seulement une fraction de la population (suite à la perte d'adhérence de certaines cellules) ne rendra pas compte fidèlement de l'efficacité de correction obtenue pour une condition donnée.

Aussi, ils sont particulièrement informatifs quant aux conditions qui permettent une meilleure efficacité de correction génique. S'il a pu être logiquement pensé qu'une plus grande proportion de cellules transfectées permettrait d'obtenir une plus importante efficacité de correction, ceci était sans nul doute omettre que les conditions physiologiques cellulaires permettant une transfection efficace ne sont pas nécessairement celles qui sont idéales pour l'avènement d'évènements de correction génique. Comme en témoignent ces résultats et comme le met en exergue la Figure 38 (histogrammes bleus foncé) dans laquelle les résultats sont présentés sous la forme du gain de correction obtenu pour chaque densité cellulaire par rapport à la condition de référence jusqu'alors utilisée, à savoir la condition 80% de confluence, l'utilisation de faibles densités cellulaires permet alors d'observer un gain de l'efficacité de correction supérieur à 2.

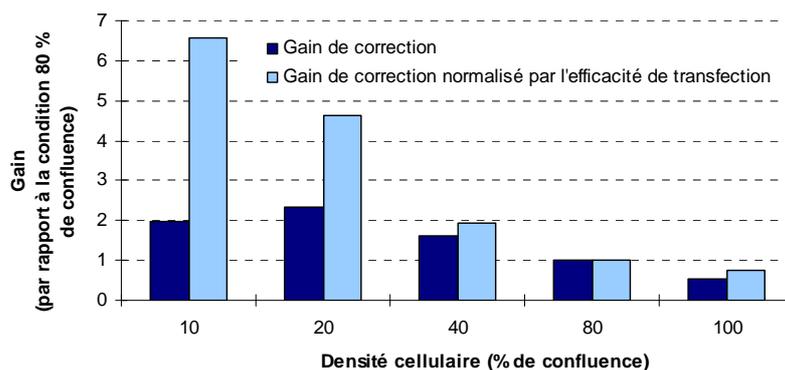


Figure 38. Gains de correction en fonction de la densité cellulaire.

Le gain de correction correspond au rapport des activités luciférase obtenues pour une densité cellulaire donnée sur l'activité luciférase générée par la condition 80% de confluence. Le gain de correction normalisé correspond quant à lui au rapport des activités luciférase normalisées par l'efficacité de transfection obtenues pour une densité cellulaire donnée sur l'activité luciférase normalisée par l'efficacité de transfection générée par la condition 80% de confluence.

Notons également que, si certes ce sont les efficacités de correction telles qu'observées jusqu'à présent qui prévalent, il peut être intéressant d'observer non pas l'efficacité de correction globale, mais celle rapportée à la population transfectée, qui rend plus précisément compte de l'activité correctrice intrinsèque de la population cellulaire dans de telles conditions. Présentés sous cette forme dans la Figure 38 (histogrammes bleu ciel), ces résultats font apparaître pour les plus faibles densités cellulaires des activités correctrices intrinsèques environ 5 fois supérieures à celle observée pour la condition de référence permettant l'obtention de l'optimum de transfection (80% de confluence). Ceci semble traduire un comportement ou un état particulier des cellulesensemencées à faible densité cellulaire favorable à l'avènement de plus nombreux événements de correction génique. Il ne peut d'ailleurs être précisé si le gain observé résulte d'un accroissement du nombre des événements de correction déjà observés ou s'il s'agit de l'apparition d'événements de correction médiés par un autre mécanisme moléculaire qui ne pouvait s'opérer lorsque les cellules étaient traitées à des densités cellulaires supérieures, peut-être parce que ne pouvant se diviser. Quand bien même ce qui sous-tend précisément ce comportement ou cet état ne puisse être identifié pour l'instant, il semble toutefois souhaitable de préconiser l'emploi de faibles densités cellulaires tant parce qu'elles permettent l'obtention d'efficacités de correction accrues, rendant par la même plus aisé la détection de faibles efficacités de correction, mais aussi parce qu'elles ne semblent pas interdire ou limiter certains mécanismes

de correction comme ceux qui seraient par exemple dépendant de la réplication, évènement ayant lieu avec ces nouvelles conditions.

2.4.4 - Protocole standard pour l'évaluation des efficacités de correction génique épisomale

Le but de notre étude étant dans un premier temps de comparer les efficacités de correction génique de différents agents réparateurs, il convient alors avant tout de définir un protocole standardisé permettant l'évaluation de chacun des différents agents réparateurs dans des conditions optimales et comparables et qui devra être utilisé lors des tests et des comparaisons des différents agents correcteurs étudiés.

Tenant compte des résultats obtenus et des observations faites précédemment, il a été choisi d'utiliser dorénavant le protocole standard exposé brièvement ci-après et présenté en détail dans la section Matériels et Méthodes. Il consiste en l'ensemencement de cellules HEK293T en plaque de 24 puits dans des proportions calculées pour obtenir 24 heures plus tard une confluence de 20%. Les cellules sont alors transfectées pendant 3 heures par 1,75 microgramme du plasmide mutant et des proportions variables d'agents réparateurs. L'agent transfectant est la Lipofectamine utilisée au ratio massique 4:1, les complexes Lipofectamine/plasmide et Lipofectamine/agent réparateur étant formés séparément. L'analyse du phénotype est réalisée après 48 heures d'incubation.

2.5 - Utilisation de fragments d'ADN double-brins de tailles variables

Comme il l'est précisé dans l'introduction lors de la présentation des fragments d'ADN double-brins en tant qu'agents correcteurs, l'efficacité de correction génique de ceux-ci est dépendante de la longueur de l'homologie partagée entre le fragment correcteur et sa cible, le plasmide. Pour le confirmer mais aussi pour déterminer la longueur de l'homologie suffisante et nécessaire pour permettre une efficacité de correction optimale, nous avons entrepris de produire des fragments d'ADN double-brins de différentes longueurs et de les comparer au regard de leurs efficacités de correction génique.

2.5.1 - Design et production des fragments d'ADN double-brins

Comme précisé dans la section Matériels et Méthodes, tous les fragments d'ADN double-brins utilisés dans ces études sont produits lors de deux phases d'amplification par PCR séparées d'une étape d'élimination du plasmide matrice (source de faux-positifs) par purification sur gel. A la différence des méthodes principalement employées qui consistent en une digestion du plasmide par des enzymes de restriction, cette méthode présente plusieurs avantages. En plus d'un rendement important permettant la synthèse de lots d'agents correcteurs suffisamment conséquents pour réaliser un grand nombre d'expériences, cette méthode permet la production de fragments de séquences et de tailles désirées.

En utilisant alors les oligodéoxynucléotides présentés dans le Tableau 3 et le plasmide peGFPLuc, nous avons alors produit un premier ensemble de 4 fragments d'ADN double-brins réparateurs de 200, 500, 1000 et 2200 pb (dsDNA-eGFPLuc 200 Rep, dsDNA-eGFPLuc 500 Rep, dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep et dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep) qui seront utilisés comme agents réparateurs. Tous sont homologues au plasmide cible peGFPLucMut à l'exception d'une base positionnée au centre du fragment, celle correspondant à la position de la mutation sur le plasmide peGFPLucMut. De la même manière mais utilisant cette fois comme matrice pour l'amplification le plasmide peGFPLucMut, un second ensemble de fragments d'ADN double-brins de mêmes tailles a été produit (dsDNALuc-200 Ctr, dsDNALuc-500 Ctr, dsDNALuc-1000 Ctr et dsDNALuc-2200 Ctr). Ils seront utilisés comme fragments contrôles. Ces deux ensembles de fragments sont présentés dans le Tableau 1 et en Figure 39. Notons également qu'aucun des fragments produits ne contient tout ou partie de séquences promotrices, lesquelles fragments pourraient permettre une expression du transgène.

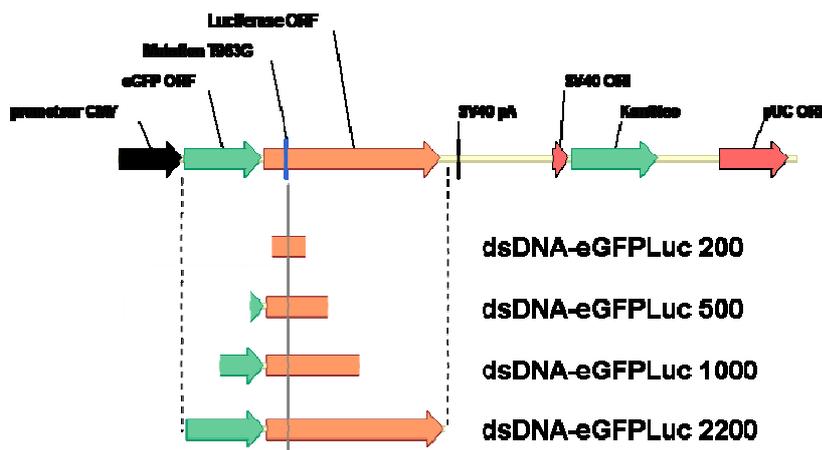


Figure 39. Alignement du plasmide peGFPLucMut et des fragments dsDNA-eGFPLuc 200, 500, 1000 et 2200.

Tableau 1. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins ciblant le gène eGFPLucMut.

Nom du fragment d'ADN double-brins	Oligodéoxynucléotides utilisés pour l'amplification	Matrice amplifiée	Longueur (pb)	Type d'agent correcteur
dsDNA-eGFPLuc 200 Ctr	F200 et R200	peGFPLucMut	195	Contrôle
dsDNA-eGFPLuc 200 Rep	F200 et R200	peGFPLuc	195	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 500 Ctr	F500 et R500	peGFPLucMut	494	Contrôle
dsDNA-eGFPLuc 500 Rep	F500 et R500	peGFPLuc	494	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 1000 Ctr	F1000 et R1000	peGFPLucMut	980	Contrôle
dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep	F1000 et R1000	peGFPLuc	980	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 2200 Ctr	F2200 et R2200	peGFPLucMut	2133	Contrôle
dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep	F2200 et R2200	peGFPLuc	2133	Réparateur

2.5.2 - Test et comparaison des fragments d'ADN double-brins de longueurs variables

Disposant des 4 fragments d'ADN double-brins réparateurs ainsi que de leurs homologues contrôles, nous avons évalué les efficacités de correction génique de chacun d'entre eux dans différentes conditions. Une étude de l'influence du ratio molaire plasmide cible/agent correcteur a été réalisée avec les 4 couples de fragments, réparateurs et contrôles. Dans ces études, les ratios molaires 1/0,1, 1/1, 1/2,5, 1/5, 1/10 et 1/25 ont été utilisés. Tandis que l'ensemble des fragments contrôles génèrent, quelque soit le ratio, des niveaux d'activité luciférase comparables à la condition contrôle (ratio 1/0) et variant peu entre eux (variation inférieure à 50%), on observe avec les fragments réparateurs, et ce dès le ratio molaire 1/0,1,

une franche augmentation de l'activité luciférase d'au moins un facteur 10 pour l'ensemble des 4 fragments de différentes tailles. A partir des ratios molaires 1/5 à 1/10, on observe des activités luciférases au moins 100 supérieures aux contrôles atteignant environ 1.10^7 RLU/mg protéine, ratios au-delà desquels l'activité luciférase cesse d'augmenter. Les résultats présentés en Figure 40, obtenus avec le fragment dsDNA1000Luc Rep, illustrent ce comportement.

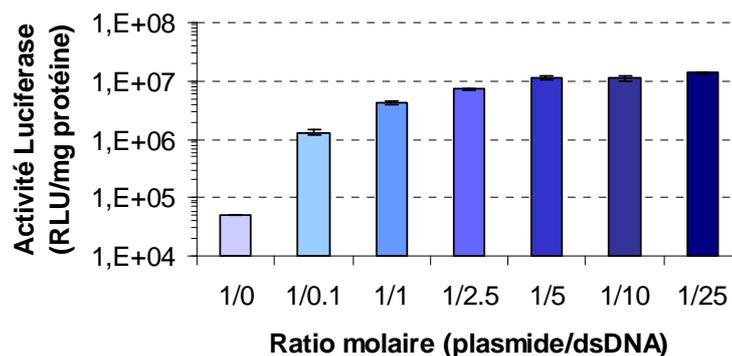


Figure 400. Efficacités de correction génique en fonction du ratio molaire plasmide cible/fragment dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep.

Lorsque comparés au ratio molaire 1/10, ratio molaire pour lequel chacun des 4 fragments produit son efficacité maximale (Figure 41), on observe des activités luciférases augmentant avec la longueur du fragment réparateur et ce jusqu'à 1000 pb ($2,5 \cdot 10^6$, $5,2 \cdot 10^6$ et $9,4 \cdot 10^6$ RLU/mg protéine respectivement pour les fragments réparateurs de 200, 500 et 1000 pb) tandis que le fragment de 2200 pb ne génère qu'une activité luciférase comparable au fragment de 1000 pb ($1,0 \cdot 10^7$ RLU/mg protéine). Conjointement, les activités luciférase générées par chacun des 4 fragments contrôles sont très comparables ($3,9 \cdot 10^4$, $3,8 \cdot 10^4$ et $3,8 \cdot 10^4$ RLU/mg protéine respectivement pour les fragments réparateurs de 200, 500 et 1000 pb) excepté pour le fragment de 2200 pour lequel elle diminue légèrement ($3,0 \cdot 10^4$ RLU/mg protéine). Le calcul des facteurs de correction associés à chaque couple de fragments fait alors apparaître des facteurs de correction de 64, 136, 247 et 330 pour les couples de fragments de 200, 500, 1000 et 2200 pb, semblant alors traduire une dépendance de l'efficacité de correction génique vis-à-vis de la longueur du fragment. Celle-ci augmente linéairement avec la longueur du fragment jusqu'à 1000 pb puis atteint un plateau pour des fragments de longueurs supérieures.

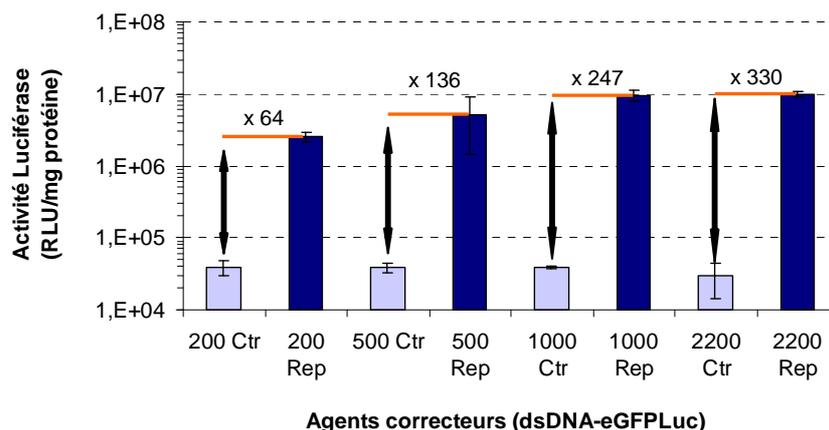


Figure 41. Efficacités de correction génique des fragments d'ADN double-brins de différentes longueurs.

Notons également, tel qu'illustré en Figure 42, l'étroite corrélation de type affine ($y=0,26x+1$), sanctionnée par un coefficient de corrélation linéaire R^2 de 0,992, existant entre la longueur du fragment et le facteur de correction pour des fragments de 1000 bp tout au plus.

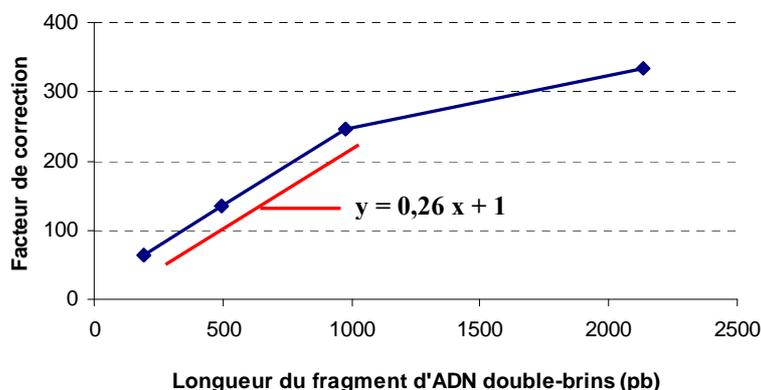


Figure 42. Corrélation entre la longueur du fragment d'ADN double-brins utilisé et le facteur de correction génique observée.

2.6 - Utilisation d'oligodéoxynucléotides simple-brins

Comme il en est fait référence dans l'introduction, l'usage d'oligodéoxynucléotides simple-brins en tant qu'agents correcteurs est très largement répandu, notamment celui des oligodéoxynucléotides simple-brins antisens d'environ 40 nucléotides protégés à leurs extrémités par des liens phosphorothioates en raison de leur efficacité accrue. En effet, il est

rapporté que l'utilisation d'oligodéoxynucléotides d'orientation antisens et/ou protégés à leurs extrémités par des liens phosphorothioate, permet d'obtenir, bien que ce ne soit toujours le cas, des efficacités de correction génique accrues vis-à-vis de leurs homologues sens et/ou sans protection. Il est aussi rapporté que l'efficacité de correction génique varie selon la longueur de l'oligodéoxynucléotide utilisé et ce d'une manière peu prédictible. D'ailleurs, il ne semble pas exister de règle en la matière et la détermination de la longueur optimale de l'oligodéoxynucléotide reste empirique. Pour ces raisons, nous avons évalué les efficacités de correction génique d'oligodéoxynucléotides simple-brins de séquence sens ou antisens, éventuellement protégés à leurs extrémités par des liens phosphorothioates et d'une longueur totale de 35 ou 45 nucléotides.

2.6.1 - Design des oligodéoxynucléotides simple-brins

Ne souhaitant pas évaluer l'influence de la position au sein de la séquence oligodéoxynucléotidique du nucléotide correcteur - c'est-à-dire du nucléotide se trouvant en vis-à-vis avec le nucléotide mutant d'un des deux brins du gène cible - sur l'efficacité de correction, tous les oligodéoxynucléotides utilisés dans cette étude présentent ce nucléotide correcteur en position centrale. Huit d'entre eux sont des 35-mères (notés 35), uniquement composés de résidus liés par des liens phosphodiester (noté PO) ou présentant 3 liens phosphorothioate à chaque extrémité (notés PS) et de séquence sens ou antisens (noté S ou AS) homologue au gène eGFPLuc lorsqu'il s'agit des oligodéoxynucléotides réparateurs (Rep) ou homologue au gène eGFPLucMut pour les oligodéoxynucléotides contrôles (Ctr). 4 autres sont des 45-mères (notés 45). Deux d'entre eux sont des oligodéoxynucléotides réparateurs de séquence antisens protégés ou non par 3 liens phosphorothioates à chaque extrémité (ssODN-eGFPLuc45 AS PO Rep et ssODN-eGFPLuc45 AS PS Rep), le troisième correspond à la version sens de l'oligodéoxynucléotide protégé ssODN-eGFPLuc45 AS PS (ssODN-Luc45 S PS Rep) tandis que le dernier est un oligodéoxynucléotide contrôle de séquence antisens et protégé (ssODN-eGFPLuc45 AS PS Ctr). Tous les oligodéoxynucléotides utilisés dans les études menées ci-après sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins ciblant peGFPLucMut.

Nom de l'oligomère (ssODN-)	Longueur (pb)	Brin ciblé	Nature des extrémités	Séquence oligodéoxynucléotidique (5'-3')	Type d'agent
eGFPLuc45 PO AS Ctr	45	AS	PO	ttctgtgattgtattcagcccctatcgttcatagcttctgcca	Ctr
eGFPLuc45 PO AS Rep	45	AS	PO	ttctgtgattgtattcagcccctatcgttcatagcttctgcca	Rep
eGFPLuc45 PS S Ctr	45	S	PS	<u>tg</u> gcagaagctatgaaacgatagggctgaatacaaatcacagaa	Ctr
eGFPLuc45 PS S Rep	45	S	PS	<u>tg</u> gcagaagctatgaaacgatagggctgaatacaaatcacagaa	Rep
eGFPLuc45 PS AS Ctr	45	AS	PS	<u>tt</u> ctgtgattgtattcagcccctatcgttcatagcttctgcca	Ctr
eGFPLuc45 PS AS Rep	45	AS	PS	<u>tt</u> ctgtgattgtattcagcccctatcgttcatagcttctgcca	Rep
eGFPLuc35 PO S Ctr	35	S	PO	gaagctatgaaacgatagggctgaatacaaatca	Ctr
eGFPLuc35 PO S Rep	35	S	PO	gaagctatgaaacgatagggctgaatacaaatca	Rep
eGFPLuc35 PO AS Ctr	35	AS	PO	tgatttgattcagcccctatcgttcatagcttc	Ctr
eGFPLuc35 PO AS Rep	35	AS	PO	tgatttgattcagcccctatcgttcatagcttc	Rep
eGFPLuc35 PS S Ctr	35	S	PS	<u>ga</u> agctatgaaacgatagggctgaatacaaatca	Ctr
eGFPLuc35 PS S Rep	35	S	PS	<u>ga</u> agctatgaaacgatagggctgaatacaaatca	Rep
eGFPLuc35 PS AS Ctr	35	AS	PS	<u>tg</u> atttgattcagcccctatcgttcatagcttc	Ctr
eGFPLuc35 PS AS Rep	35	AS	PS	<u>tg</u> atttgattcagcccctatcgttcatagcttc	Rep

Légende : AS, antisens, S, sens, PO, phosphodiester, PS, phosphorothioate, Rep, réparateur, Ctr, contrôle. La position de mutation est représentée en gras, les nucléotides liés par un lien phosphorothioate sont représentés soulignés.

2.6.2 - Note concernant le protocole standard de correction génique épisomale

Lors d'expériences préliminaires menées avec l'oligomère ssODN-eGFPLuc 45 PS AS Rep, il est apparu des efficacités de correction génique variables selon le mode de préparation des complexes transfectants employé. En effet, lorsque ceux-ci sont formés par mélange de l'agent transfectant à une solution contenant les deux types d'acides nucléiques (complexes groupés), à savoir le plasmide mutant cible de la réparation et l'agent correcteur, ici un oligodéoxynucléotide simple-brin, l'efficacité de correction génique semble inférieure à celle observée lorsque les mélanges agent transfectant/plasmide et agent transfectant/oligodéoxynucléotide sont formés séparément (complexes séparés). Pour le confirmer, des expériences de correction génique utilisant comme agent correcteur le

ssODN-eGFPLuc45 PS AS Rep et calquées sur celles pratiquées avec les fragments d'ADN double-brins ont été réalisées. Plusieurs ratios molaires plasmide mutant/oligodéoxynucléotide sont testés (1/0, 1/10, 1/100 et 1/400) en utilisant les deux modes de préparation des complexes précédemment définis. Les résultats de cette étude (présentés en figure 43) montrent tout d'abord, quelque soit le mode de préparation de complexes, que les activités luciférase obtenues pour les conditions permettant la correction sont globalement 10 fois plus importante que celle obtenue pour la condition contrôle (ratio 1/0). Nous observons également que l'utilisation de complexes formés séparément permet d'obtenir des efficacités de correction génique légèrement supérieures pour chaque condition. Pour cette raison, ce mode de préparation des complexes a retenu pour la suite des expériences.

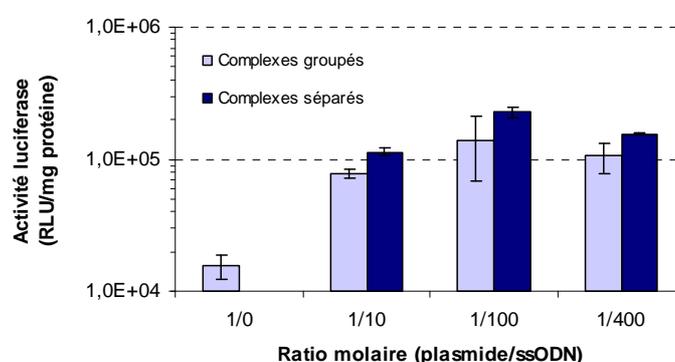


Figure 43. Comparaison des efficacités de correction génique par des oligodéoxynucléotides simple-brins en fonction du mode de préparation des complexes transfectants.

2.6.3 - Test et comparaison des différents oligodéoxynucléotides simple-brins

A l'image des expériences pratiquées avec les fragments d'ADN double-brins, l'étude de l'influence du ratio molaire plasmide cible/agent correcteur a été réalisée en utilisant les ratios molaires 1/0,1, 1/1, 1/10, 1/50, 1/100 et 1/500 (Figure 44). Tandis que l'oligodéoxynucléotide contrôle génère, quelque soit le ratio molaire, des niveaux d'activité luciférase comparables à la condition contrôle (ratio 1/0, résultats non-présentés), on observe avec l'oligodéoxynucléotide ssODN-eGFPLuc45 PS AS Rep et pour l'ensemble des ratios molaires excepté le ratio 1/0,1 des activités luciférase au moins 10 fois supérieures à celles obtenues avec la condition contrôle ou l'oligodéoxynucléotide contrôle.

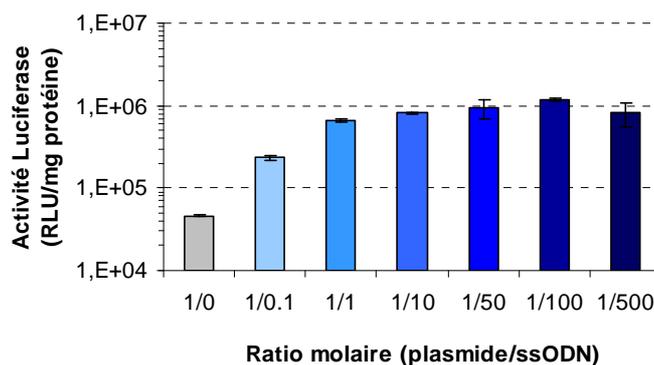


Figure 44. Efficacités de correction génique en fonction du ratio molaire plasmide cible/oligodéoxynucléotide ssODN-eGFPLuc 45 AS PS Rep.

Il apparaît également qu'au-delà des ratios molaires 1/10, l'activité luciférase est maximale et semble atteindre un plateau. Ce comportement est similaire à celui observé avec les fragments d'ADN double-brins correcteurs. Toutefois, il en diffère à deux égards. Tout d'abord, les ratios molaires à utiliser pour obtenir une activité luciférase maximale avec les oligodéoxynucléotides sont 10 fois supérieurs (ratio molaire 1/100) à ceux à utiliser avec les fragments d'ADN double-brins (ratio molaire 1/10) pour atteindre un même but. Aussi, comme l'illustre la Figure 44, les activités luciférases ne dépassent guère 1.10^6 RLU/mg protéine et sont alors environ 10 fois plus faibles que celles obtenues avec les fragments d'ADN double-brins (ces résultats sont issus de la même expérience que celle réalisée dans le même sens avec le fragment d'ADN double-brins dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep présentée en Figure 40).

Définissant alors le ratio molaire 1/100 comme optimal pour l'obtention d'efficacités de correction génique maximales, nous avons alors entrepris de comparer les différents oligodéoxynucléotides précédemment présentés en n'utilisant que ce ratio molaire. Les résultats obtenus et présentés ci-après dans les Figures 45 et 46, sont issus d'une même expérience et peuvent par conséquent être comparés. Si l'on observe les résultats obtenus avec les trois oligomères ssODN-eGFPLuc45 PS AS Rep, ssODN-eGFPLuc45 PS S Rep et ssODN-eGFPLuc45 PO AS Rep ainsi que ceux obtenus avec leur homologue contrôle de même longueur (ssODN-eGFPLuc45 PS AS Ctr), on peut voir comme présenté en Figure 45 que :

- 1) les activités luciférase générés avec les 3 oligodéoxynucléotides réparateurs sont quant à elles au moins 10 fois plus importantes que celle de l'oligomère contrôle,
- 2) pour l'oligodéoxynucléotide de séquence antisens et non-protégé (ssODN-eGFPLuc45 PO AS Rep), on observe un facteur de correction de 14, facteur très en deçà de ceux observés avec les fragments d'ADN double-brins,
- 3) lorsque l'oligodéoxynucléotide antisens protégé est utilisé (ssODN-eGFPLuc45 PS AS Rep), le facteur de correction est de 23, semblant alors confirmer le rôle protecteur des liens phosphorothioate,
- 4) enfin, l'usage de l'oligodéoxynucléotide de séquence sens (ssODN-eGFPLuc45 PS S Rep), génère des activités luciférase environ 2 fois inférieures à son homologue antisens.

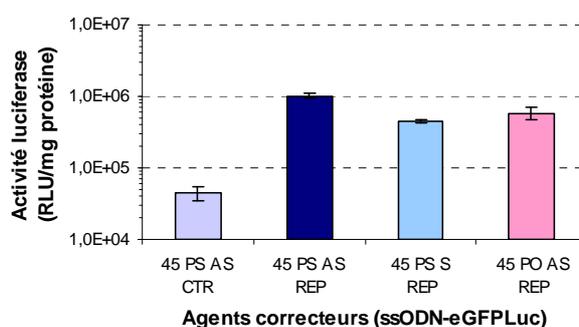


Figure 45. Efficacités de correction génique en fonction de la topologie de l'oligodéoxynucléotide ou de la nature de ses extrémités.

Pour évaluer l'influence de la longueur de l'oligomère mais aussi pour approfondir l'étude de l'influence de l'orientation de la séquence oligodéoxynucléotidique et de la présence de liens phosphorothioate aux extrémités de l'oligodéoxynucléotide, nous avons utilisés des oligomères de 35 nucléotides. Au nombre de huit, ils forment quatre couples d'oligodéoxynucléotides (réparateur et contrôle) de séquence sens ou antisens et comportant ou non des liens phosphorothioate au nombre de trois à leurs extrémités. Lorsque les oligodéoxynucléotides non-protégés sont utilisés (Figure 46), des facteurs de correction de 5,5 et 2,6 pour les oligodéoxynucléotides de séquence antisens et sens respectivement. Parallèlement, lorsque les oligodéoxynucléotides protégés sont utilisés, ce sont des facteurs de correction de 7,9 et 5,7 qui sont obtenus pour les oligodéoxynucléotides antisens et sens respectivement. Ces résultats font apparaître tout d'abord que, quelque soit le couple

d'oligomères de 35 nucléotides utilisé, tous génèrent des activités luciférase inférieures à celles obtenues avec les oligomères de 45 nucléotides, quels qu'ils soient. Il apparaît aussi, comme déjà observé avec les oligomères de 45 nucléotides, que l'utilisation d'oligomères de séquence antisens contribuent à l'obtention de facteurs de correction génique plus importants que ceux obtenus lorsque leurs homologues de séquence sens sont utilisés.

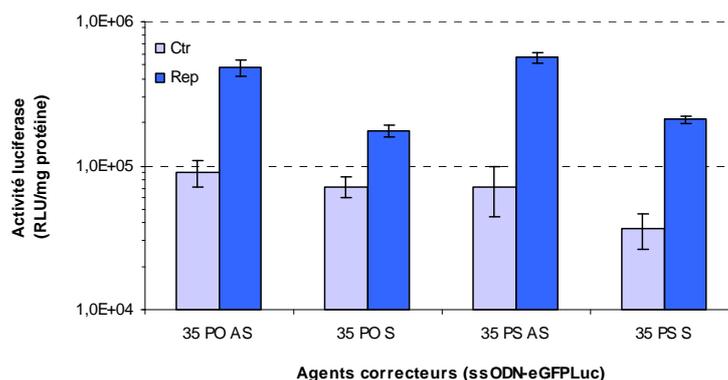


Figure 46. Effet de la topologie et de la nature des extrémités de l'oligodéoxynucléotide sur l'efficacité de correction génique.

En somme, il apparaît i) que l'utilisation d'oligodéoxynucléotides de séquence antisens et protégés à leurs extrémités par des liens phosphorothioate permet effectivement d'observer, quelque en soit leurs longueurs, des efficacités de correction génique accrues, bien que modeste, ii) que l'utilisation d'oligomères de longueur supérieure permet d'obtenir des facteurs de correction plus importants et iii) que les efficacités de correction génique obtenues avec l'oligodéoxynucléotide générant les meilleurs résultats, à savoir le ssODN-eGFPLuc45 PS AS Rep, sont environ 10 fois inférieures à celles observées pour les fragments d'ADN double-brins de 500 pb et plus.

2.7 - Utilisation de vecteurs AAV

Enfin nous clôturerons cette comparaison de différentes stratégies de correction génique en utilisant comme agent réparateur un vecteur rAAV.

2.7.1 - Caractéristiques et design du vecteur rAAV-eGFPLuc

Il s'agit d'un vecteur rAAV2-1, c'est-à-dire un vecteur constitué de la capsid de l'AAV1 et d'un génome flanqué à ses deux extrémités des répétitions inversées terminales (ITR pour inverted terminal repeat) de l'AAV2. Celui utilisé dans cette étude, l'AAV-eGFPLuc, comporte une séquence homologue au gène eGFPLuc de 2,3 kb immédiatement flanquée par les 2 ITRs comme illustré dans la Figure 47. Il est à noter que la séquence correspond à quelques nucléotides près au niveau des extrémités, au fragment d'ADN double-brins de 2200 pb réparateur dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep.

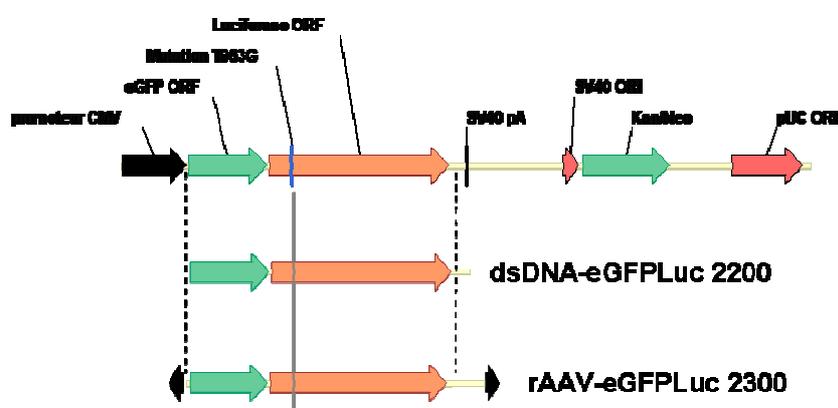


Figure 47. Alignement du plasmide peGFPLucMut et du vecteur rAAV-eGFPLuc 2300.

Notons enfin que la longueur totale du génome du vecteur est de 2,8 kb, longueur suffisante pour assurer la production de particules virales ne contenant qu'un seul génome viral sous forme monomère simple-brin, forme décrite comme permettant l'obtention d'efficacités de correction génique accrues comparées à celles observées lors de l'emploi de vecteurs à génomes de longueur totale inférieure à 2,4 kb, pour lesquels il est observé que les capsides produites contiennent des paires de génomes simple-brins complémentaires ou des génomes viraux double-brins à 1 ITR, droit ou gauche.

2.7.2 - Test du vecteur rAAV-eGFPLuc

Les vecteurs rAAV étant doués de propriétés de transduction, il n'est pas nécessaire de les vectoriser au moyen d'agents transfectants comme doivent l'être les agents correcteurs de type oligodéoxynucléotide ou fragments d'ADN. Néanmoins, le plasmide cible doit l'être.

Pour les expériences de correction, nous avons utilisé le protocole standard auquel se rajoute une étape d'infection par le vecteur viral. D'ailleurs, pour garantir une infection optimale, il a été choisi de ne pas réaliser simultanément les étapes de transfection et d'infection. A ce titre, l'efficacité de transduction d'un vecteur rAAV2-1 a été évaluée lorsque des cellules HEK293T sont infectées dans les conditions du protocole standard. Utilisant pour ce faire un vecteur AAV permettant l'expression d'un gène rapporteur (en l'occurrence le gène eGFP) sous le contrôle d'un promoteur fort identique à celui contrôlant l'expression du transgène eGFP dans le plasmide peGFP-C1 (à savoir un promoteur CMV), il apparaît des efficacités de transduction de l'ordre de 80% pour des multiplicités d'infection (MOI) de 30 000 à 300 000, tandis que l'efficacité de transfection du plasmide peGFP-C1 dans les conditions du protocole standard est d'environ 40%. Ainsi, la plupart des cellules transfectées sont également transduites par le vecteur rAAV. Dans ces circonstances, il apparaît que les proportions de cellules recevant le plasmide et le vecteur et de cellules recevant le plasmide et l'agent correcteur non-viral sont comparables. Ceci permet alors une comparaison honnête des différents agents correcteurs.

L'influence sur l'efficacité de correction génique de la position temporelle de l'étape d'infection vis-à-vis de l'étape de transfection a également été étudiée. Dans cette expérience, dont les résultats sont présentés dans la Figure 48, sont comparées les activités luciférases générées lorsque les cellules sont infectées par des MOI croissantes du vecteur AAV-eGFP_{Luc} et ce avant ou après l'étape de transfection ou bien encore en l'absence de cette dernière.

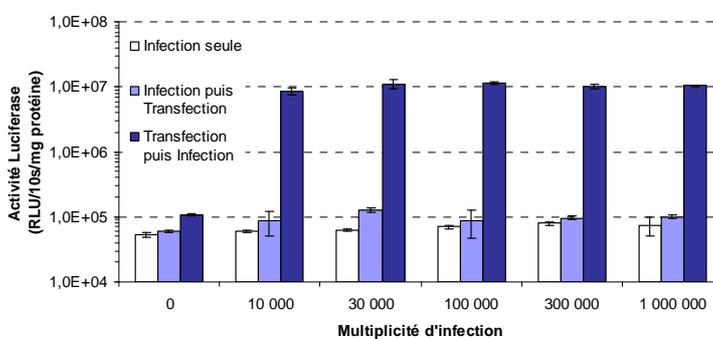


Figure 48. Comparaison des protocoles de correction génique épisomale lors de l'emploi de vecteurs rAAV.

Il apparaît alors que, lorsque l'infection précède la transfection, les activités luciférase observées sont à peine supérieures de 20% à celles générées par les conditions contrôles constituées par les échantillons non-transfectés ou non infectés. En revanche, lorsque l'infection est réalisée après la transfection, il est obtenu, et ce dès la plus faible MOI utilisée (MOI 10 000), des activités luciférase d'environ $1 \cdot 10^7$ RLU/mg protéine qui, comparées aux activités luciférase de leurs contrôles respectifs, font apparaître des facteurs de correction d'environ 100 pour chaque MOI. Au regard de ce résultat, ce dernier mode opératoire a été celui retenu pour la réalisation de l'ensemble des expériences de correction génique à venir utilisant un vecteur rAAV.

Nous avons alors cherché à définir plus finement la relation liant MOI et efficacité de correction génique. En effet, si dans l'expérience précédente les efficacités de correction génique maximales générées par l'usage d'un tel vecteur ont pu être définies, il reste néanmoins intéressant d'évaluer à partir de quelle MOI les efficacités de correction génique maximales sont atteintes. Pour cela, une gamme de MOI étendue vers les faibles valeurs a été utilisée (MOI de 1000 à 300 000) lors de l'expérience présentée ci-après en Figure 49 dans laquelle a d'ailleurs été inclue, au titre de référence, l'oligodéoxynucléotide ssODN-eGFPLuc 45 PO AS Rep utilisé au ratio molaire 1/100.

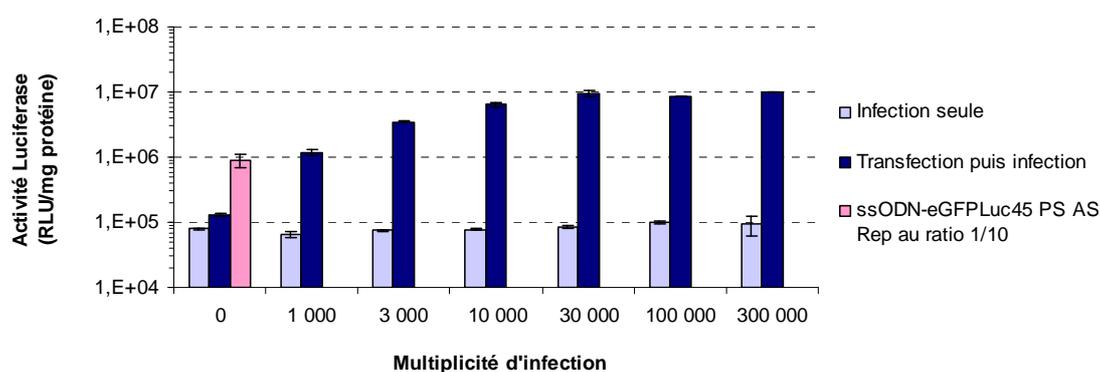


Figure 49. Efficacités de correction génique épisomale en fonction de la multiplicité d'infection.

Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'activité luciférase allant de pair avec l'augmentation de la MOI jusqu'à la MOI de 30 000, valeur au delà de laquelle les activités luciférase sont maximales et atteignent $1 \cdot 10^7$ RLU/mg protéine. A la plus faible MOI, le facteur de correction est d'environ 10, similaire à celui observé avec l'oligodéoxynucléotide

tandis qu'au delà de la MOI de 30 000, il est maximal et d'environ 100, soit comparable à ceux obtenus avec des fragments d'ADN double-brins.

3 - Système d'évaluation meGFP

Pour déterminer la proportion de cellules aux seins desquelles des événements de correction génique ont eut lieu, nous avons développé un deuxième système d'évaluation de l'efficacité de correction génique. Ce système est également basé sur l'utilisation d'un gène rapporteur mutant, à savoir l'eGFP mutée (meGFP) mais dont l'expression du phénotype après correction, mutant ou sauvage, peut être déterminée directement et indépendamment pour chacune des cellules traitées et analysées.

Au regard des efficacités de correction génique qu'il peut être attendu d'obtenir, soit de l'ordre du pourcent, il convient alors d'employer un mode d'analyse permettant une évaluation la plus directe possible du phénotype et ce pour un nombre de cellules suffisamment important (en l'occurrence supérieur à 50 000) pour garantir la représentativité des résultats exprimés. A ces fins, la cytométrie en flux s'impose comme une technique de choix. En effet, elle combine, entre autres, l'avantage de pouvoir déterminer directement l'intensité de l'expression du phénotype conféré par un gène rapporteur codant une protéine fluorescente et ceux d'une analyse à haut débit.

3.1 - Génération et caractérisation de la cassette d'expression

Le plasmide rapporteur mutant (pmeGFP, 4731 pb) utilisé dans cette étude dérive du plasmide peGFP-C1, plasmide correspondant, à l'exception du transgène qu'il comporte, au plasmide peGFPLuc. En effet, ce dernier est obtenu par l'insertion en phase du cadre de lecture ouvert du gène luciférase en aval de celui du gène eGFP au sein du plasmide peGFP-C1. Par conséquent, le plasmide peGFP-C1 présente les mêmes éléments biologiques que le plasmide peGFPLuc (voir Figure 21).

Le plasmide pmeGFP a été obtenu par l'introduction de deux mutations ponctuelles au sein du cadre de lecture ouvert du gène eGFP et en amont des séquences codant pour les régions chromophores de la protéine eGFP (Figure 50). La première est une mutation non-sens.

Introduite par mutagenèse dirigée, elle porte sur le nucléotide 173 du cadre de lecture ouvert du gène eGFP responsable de la présence d'un acide aminé tryptophane en position 58 de la protéine eGFP. La substitution effectuée (transversion) conduit alors au remplacement d'une guanine par une adénine (G173A) introduisant un codon stop ambre (TAG) en lieu et place du codon sauvage tryptophane (TGG) et conduisant alors à la synthèse d'une protéine tronquée de 58 acides aminés. La seconde mutation, de type silencieuse, porte sur le nucléotide 177. Il s'agit d'une transition (C177A) dont la mutation n'affecte pas la séquence protéique mais qui fait apparaître un site de restriction enzymatique MscI lorsque le nucléotide 173 est sauvage. Seule la première des deux mutations (G173A) fera l'objet d'une correction génique, la seconde (C177A) n'étant introduite qu'à des fins d'analyses plus aisées (Figures 52 et 53). Souhaitant également disposer d'un homologue « sauvage » au plasmide pmeGFP, c'est-à-dire n'en différant que du seul nucléotide mutant 173, nous avons alors produit le plasmide pSeGFP par l'introduction de la mutation silencieuse C177A (Figure 51).

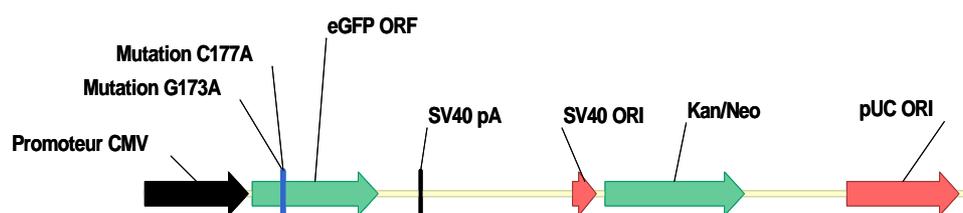


Figure 50. Représentation schématique du plasmide pmeGFP.

De 5' en 3' : promoteur du cytomégalovirus humain (CMV), gène eGFP présentant en position 173 la mutation G173A introduisant un codon stop et la mutation silencieuse C177A en position 177, signal de polyadénylation (SV40 pA) et origine de réplication (SV40 ORI) du virus simiesque SV40, gène *aph* de résistance à la kanamycine et à la néomycine (Kan/Neo) et origine de réplication bactérienne de type pUC (pUC ORI).

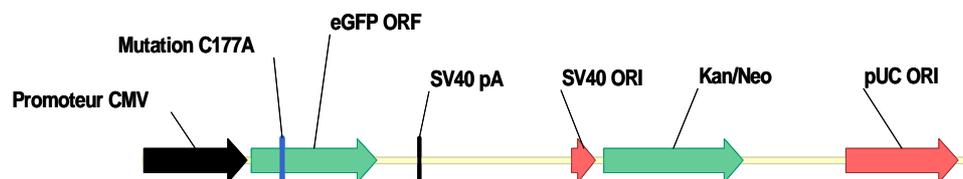


Figure 51. Représentation schématique du plasmide pSeGFP.

Plasmide identique au plasmide pmeGFP à l'exception de la mutation G173A qui est absente de pSeGFP.

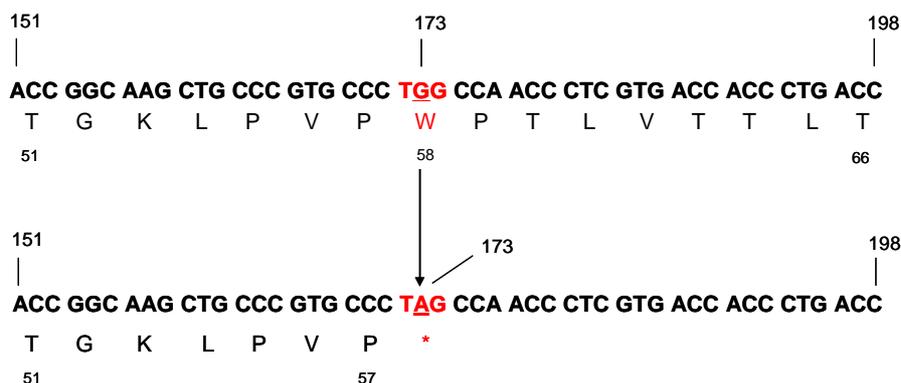


Figure 52. Séquences nucléotidiques et protéiques des gènes SeGFP et meGFP.

Au dessus de la séquence nucléotidique apparaît la position du nucléotide désigné par rapport à la première base du gène eGFP. Sous la séquence protéique apparaît la position de l'acide aminé désigné par rapport au premier acide aminé du gène eGFP. La séquence nucléotidique de la ligne supérieure correspond à celle du gène SeGFP. Sur la ligne inférieure, est présentée la séquence nucléotidique du gène meGFP après l'introduction de la mutation G173A. La mutation C177A, présente sur les deux gènes, n'est pas représentée.

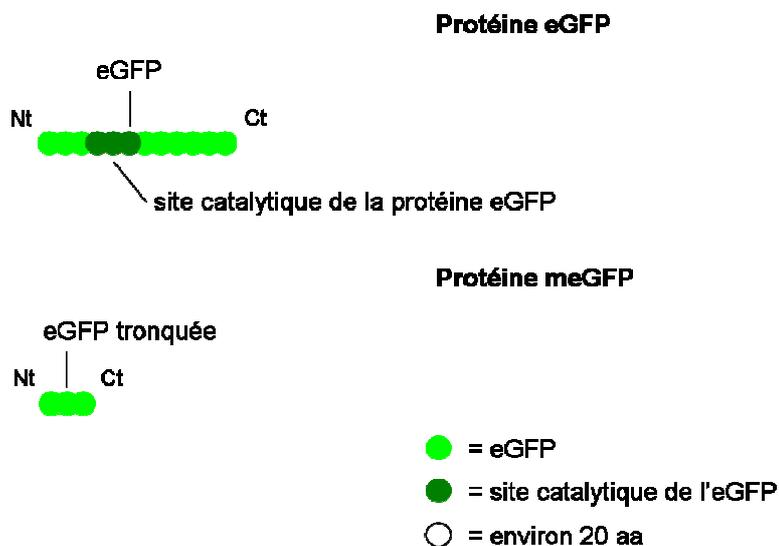


Figure 53. Schéma des protéines eGFP et meGFP.

Bien que la mutation G173A soit décrite comme invalidant totalement les propriétés de fluorescence de la protéine eGFP ainsi formée [Radecke, et al., 2004], nous avons tout de même souhaité le confirmer. Pour cela, des cellules HEK293T ont été transfectées par les plasmides pseGFP ou pmeGFP puis analysées par cytométrie en flux. Il a été observé une

absence totale de cellules présentant un phénotype eGFP positif lorsque les cellules sont transfectées par le plasmide pmeGFP, confirmant alors l'invalidation du gène eGFP (Figure 54). Les cellules transfectées dans les mêmes conditions par le plasmide pSeGFP sont eGFP positives à plus de 75% et présentent une intensité moyenne de fluorescence d'environ 2500.

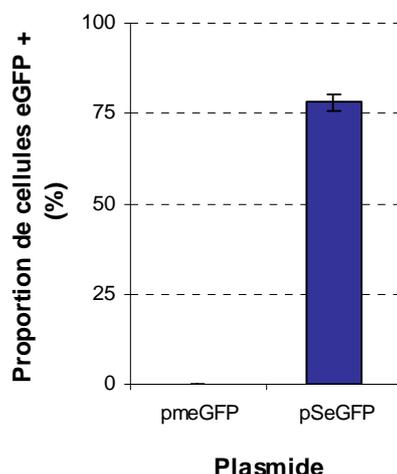


Figure 54. Comparaison des cassettes d'expression meGFP et SeGFP.

Ce deuxième système étant opérationnel, nous avons entrepris de comparer les efficacités de correction génique à un niveau épisomal d'oligodéoxynucléotides, de fragments d'ADN double-brins et de vecteurs rAAV pour corriger la mutation G173A portée par le plasmide pmeGFP.

3.2 - Utilisation d'oligodéoxynucléotides simple-brins

3.2.1 - Design des oligodéoxynucléotides simple-brins

Nous avons choisi d'utiliser comme séquence oligodéoxynucléotidique dans cette étude, la séquence antisens de 35 nucléotides précédemment décrite par le Docteur Frank Radecke et ses collaborateurs [Radecke, et al., 2004] comme étant l'une des plus efficaces pour la correction génique à un niveau épisomal et chromosomal.

Nous avons évalué deux oligomères réparateurs de 35 nucléotides de séquence antisens protégés ou non par trois liens phosphorothioate à chaque extrémité (ssODN-eGFP35 PO AS

Rep et ssODN-eGFP35 PS AS Rep) ainsi que leurs contrôles respectifs (ssODN-eGFP35 PO AS Ctr et ssODN-eGFP35 PS AS Ctr) tels que présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins ciblant pmeGFP.

Nom de l'oligomère (ssODN-)	Longueur (pb)	Brin ciblé	Nature des extrémités	Séquence oligodéoxynucléotidique	Type d'agent
eGFP35 PO AS Rep	35	AS	PO	tggtcacgagggttgctagggcacgggcagcttg	Ctr
eGFP35 PO AS Ctr	35	AS	PO	tggtcacgagggttgccagggcacgggcagcttg	Rep
eGFP35 PS AS Rep	35	AS	PS	<u>tggtcacgagggttgctagggcacgggcagcttg</u>	Ctr
eGFP35 PS AS Ctr	35	AS	PS	<u>tggtcacgagggttgccagggcacgggcagcttg</u>	Rep
eGFP35 PS S Rep	35	S	PS	<u>caagctgcccgtgccctagccaaccctcgtgacca</u>	Ctr
eGFP35 PS S Ctr	35	S	PS	<u>caagctgcccgtgccctgccaaccctcgtgacca</u>	Rep

Légende : AS, antisens, S, sens, PO, phosphodiester, PS, phosphorothioate, Rep, réparateur, Ctr, contrôle. La position de mutation est représentée en gras, les nucléotides liés par un lien phosphorothioate sont représentés soulignés.

Dans la première expérience comparant plusieurs oligodéoxynucléotides simple-brins, seul le ratio molaire 1/100, générant les efficacités de correction les plus importantes pour ce type d'agent correcteur, a été utilisé. Il apparaît tout d'abord une absence de cellules eGFP positives lorsque sont utilisés les oligomères contrôles ssODN-eGFP35 PO AS Ctr et ssODN-eGFP35 PS AS Ctr (Figure 55). En revanche, lorsque l'oligomère réparateur non-protégé ssODN-eGFP35 PO AS Rep est utilisé, 2% des cellules analysées sont eGFP positives bien que présentant une intensité moyenne de fluorescence relativement faible (IMF 200) comparée à celle observée lorsque les mêmes cellules sont transfectées par le plasmide pseGFP (pour rappel : IMF 2500).

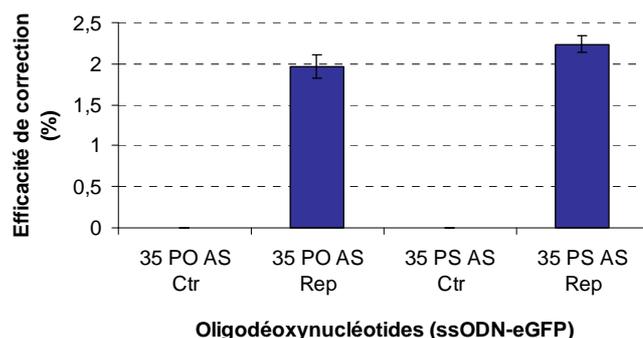


Figure 55. Effet de la nature des extrémités de l'oligodéoxynucléotide sur l'efficacité de correction génique.

Enfin, on observe des résultats similaires lorsque l'oligomère réparateur protégé ssODN-EGFP35 PS AS Rep est utilisé : des efficacités de correction génique à peine supérieures à celles générées par son homologue non protégé sont obtenues (2,2% de cellules eGFP positives) avec une intensité moyenne de fluorescence comparable (IMF 250).

3.3 - Utilisation des fragments d'ADN double-brins

3.3.1 - Design des fragments d'ADN double-brins

Comme précisé précédemment lors de l'utilisation de fragments d'ADN double-brins pour corriger la mutation portée par le plasmide peGFPLucMut, tous les fragments utilisés ne sont homologues au plasmide cible que pour le cadre de lecture du gène ciblé pour les raisons explicitées. Enfin, il est apparu que l'efficacité de correction augmente avec l'allongement du fragment et qu'elle semble optimale pour des longueurs de fragments d'environ 1000 paires de bases et plus. Souhaitant alors réaliser la comparaison la plus fidèle possible tout en utilisant le fragment le plus efficace qu'il puisse être, nous avons produit le plus grand fragment homologue au gène eGFP non-chevauchant avec les régions promotrices. Ce dernier s'étend sur 700 pb et présente le nucléotide correcteur dans une position décentrée vers l'extrémité 5' du gène eGFP (Figure 56). Bien que cette position soit distincte de celle utilisée pour les fragments ciblant le gène luciférase, ce design fut préféré à celui d'un fragment présentant la mutation en position centrale mais de plus courte taille, en l'occurrence de 350 pb.

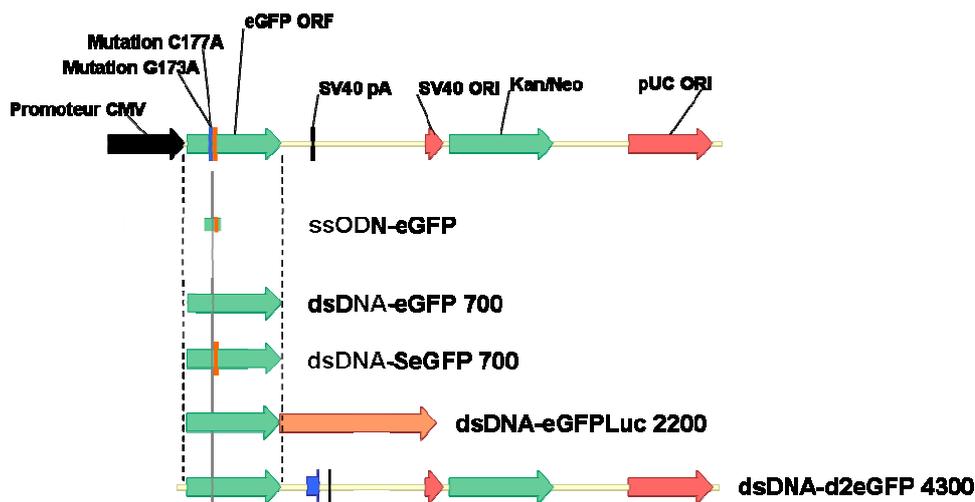


Figure 56. Alignement du plasmide pmeGFP et des agents correcteurs de type oligomère et fragment d'ADN.

Un premier couple de fragments réparateurs et contrôles (dsDNA-SeGFP 700 Rep et dsDNA-meGFP 700 Ctr) a alors été produit selon le protocole décrit pour les fragments correcteurs ciblant le gène luciférase en utilisant les oligodéoxynucléotides présentés dans le Tableau 12 et comme matrice les plasmides pSeGFP et pmeGFP pour les fragments réparateurs et contrôles respectivement. L'ensemble des fragments produits est présenté dans le Tableau 4.

Tableau 4. Liste et caractéristiques des fragments double-brins ciblant pmeGFP.

Nom du fragment d'ADN double-brins	Oligodéoxynucléotides utilisés pour l'amplification	Matrice amplifiée	Longueur (pb)	Type d'agent correcteur
dsDNA-meGFP 700 Ctr	F700 et R700	pmeGFP	732	Contrôle
dsDNA-eGFP 700 Rep	F700 et R700	peGFP	732	Réparateur
dsDNA-SeGFP 700 Rep	F700 et R700	pSeGFP	732	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep	F700 et R2200	peGFPLuc	2133 (732*)	Réparateur

* : longueur homologue à peGFP-C1.

3.3.2 - Test des fragments d'ADN double-brins

Lorsque le fragment contrôle dsDNA-meGFP 700 Ctr est utilisé au ratio molaire 1/10, il n'apparaît aucune cellule eGFP positive tandis que 7,5% des cellules traitées avec le fragment

réparateur dsDNA-seGFP 700 Rep le sont et affichent une intensité moyenne de fluorescence d'environ 400 (Figure 57).

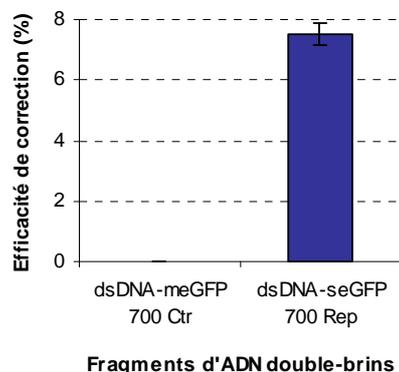


Figure 57. Efficacités de correction génique des fragments d'ADN double-brins contrôle et réparateur ciblant le plasmide pmeGFP.

En marge de cette première comparaison, nous avons également souhaité tester d'autres fragments d'ADN double-brins divergeant des premiers par leur longueur ou parce que leur homologie avec leur cible, exception faite du nucléotide correcteur, n'est pas parfaite. Le premier d'entre eux présente la même étendue d'homologie que le fragment dsDNA-SeGFP 700 Rep mais ne lui est pas totalement homologue. Parce que produit en utilisant comme matrice à amplifier le plasmide peGFP-C1 et non le plasmide pSeGFP, ce fragment (dsDNA-eGFP 700 Rep) diverge de sa cible, le plasmide pmeGFP, par deux nucléotides, les nucléotides 173 et 177 et devrait permettre la réparation des deux mutations introduites G173A et C177A. Bien que seule la réparation de la mutation G173A puisse être détectée, il peut être intéressant d'observer quel impact peut avoir le nombre de mutations à réparer sur l'efficacité de correction de la mutation G173A (voir Figure 56).

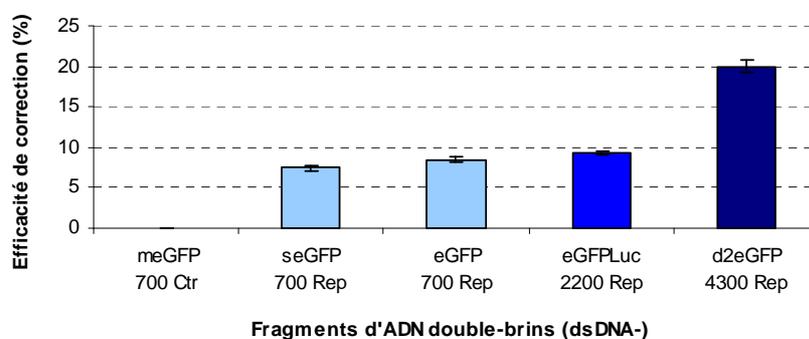


Figure 58. Efficacités de correction génique des différents fragments d'ADN double-brins ciblant le plasmide pmeGFP.

Les résultats présentés dans la Figure 58 montrent des efficacités de correction similaires lorsque sont comparés les oligomères dsDNA-SeGFP 700 Rep et dsDNA-eGFP 700 Rep (7,5% et 8,5% respectivement avec des intensités moyenne de fluorescence comparables) tendant à suggérer que la présence d'une seconde mutation à réparer n'amoindrit pas l'efficacité de correction sans pour autant dire qu'elle l'augmente. Parallèlement, nous avons également utilisé le fragment dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep comme agent correcteur du plasmide pmeGFP. Si ce fragment n'a pas été originellement produit pour réparer les mutations portées par le gène mutant meGFP mais celle portée par le gène de fusion eGFPLuc, il le peut toutefois dans la mesure où il contient une région homologue au gène eGFP. Si la présence d'une mutation additionnelle a pu être évaluée avec le fragment dsDNA-eGFP 700 Rep comme sans incidence notable, ce fragment permettra alors d'évaluer l'impact sur l'efficacité de correction de la présence d'une grande région non-homologue (en l'occurrence de 1500 pb) jouxtant la région homologue au gène ciblé de 700 pb. Lorsque celui-ci est testé, il apparaît une efficacité de correction génique de 9% assortie d'une intensité moyenne de fluorescence d'environ 400. Ces résultats étant similaires à ceux obtenus avec le fragment de référence (le fragment dsDNA-SeGFP 700 Rep), il ne semble pas que la présence d'un long fragment non-homologue avec le gène ciblé par le fragment qu'il jouxte ait d'impact sur l'efficacité de correction génique. Enfin, si jusqu'à présent nous n'avons utilisé que des fragments présentant une région homologue au plasmide ciblé de seulement 700 pb eu égard aux considérations énoncées précédemment, nous avons également souhaité évaluer les efficacités de correction de fragments de plus grande taille, quand bien même ceux-ci ne respecteraient pas ces mêmes considérations. A ce titre, un fragment d'ADN double-brin réparateur de 4300 pb a été produit. Généré par la digestion du plasmide pd2eGFP (4280 pb) par l'enzyme de restriction EcoRI qui clive ce dernier plasmide en amont du transgène eGFP, il est homologue à 100% avec le gène eGFP exception faite du nucléotide correcteur, mais ne l'est qu'à 96,5% avec le plasmide peGFP-C1 dont il diffère par l'absence de promoteur CMV et par la présence en aval du transgène eGFP d'un élément de régulation post-traductionnel de 147 nucléotides (séquence PEST de l'ornithine décarboxylase murine) destiné à accroître la vitesse de dégradation de la protéine avec laquelle il est fusionné (représenté en bleu sur la Figure 56). Lorsqu'utilisé au ratio molaire 1/10, il apparaît plus de 20% de cellules eGFP positives assorties d'une intensité moyenne de fluorescence de 500 soit, au minimum, une efficacité de correction génique 3 fois supérieure à celles observées pour les fragments de 700 pb (Figure 58).

3.4 - Utilisation des vecteurs rAAV

Comme avec le système d'évaluation eGFPLucMut, nous clôturerons cette comparaison de différentes stratégies de correction génique en utilisant comme agent réparateur un vecteur rAAV2-1.

3.4.1 - Design des vecteurs rAAV

Le premier vecteur rAAV utilisé dans cette étude, le vecteur rAAV-SeGFP, présente un génome organisé d'une manière comparable à celle du vecteur rAAV-eGFPLuc utilisé dans l'étude précédente. Son génome ne contient qu'une région homologe au gène ciblé immédiatement flanquée des 2 répétitions inversées terminales ITRs, la région homologe étant quant à elle la plus longue séquence homologe au cadre de lecture ouvert du gène SeGFP, soit une séquence d'environ 700 nucléotides comparable à celle du fragment d'ADN double-brin dsDNA-SeGFP700 Rep (Figure 59).

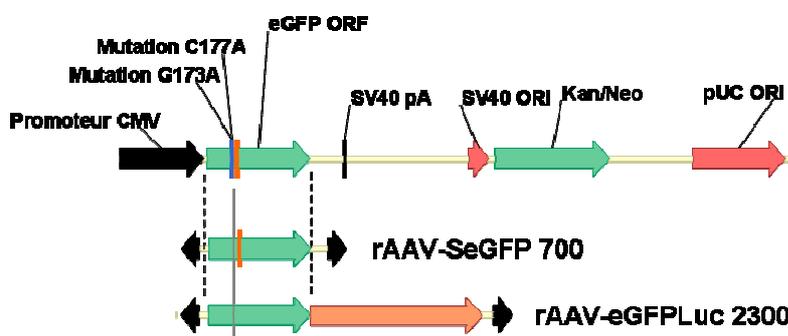


Figure 59. Alignement du plasmide pmeGFP et des vecteurs rAAV-SeGFP et rAAV-eGFPLuc.

A l'image du vecteur rAAV-eGFPLuc, qui lui aussi contient la plus longue séquence homologe possible au gène ciblé et qui fut utilisé pour évaluer l'efficacité de correction génique de vecteurs rAAV, nous utiliserons le vecteur rAAV-SeGFP dans ce même sens. Toutefois, ce vecteur, dont la longueur totale du génome ne fait que 1,1 kb, n'est pas tout à fait comparable au vecteur rAAV-eGFPLuc dans la mesure où les particules produites ne contiennent pas uniquement des génomes viraux à l'état simple-brin mais également des paires de génomes simple-brins complémentaires et des génomes viraux double-brins à 1 ITR, droit ou gauche. Pour cette raison, nous utiliserons aussi le vecteur rAAV-eGFPLuc dans la

mesure où il contient lui aussi une région homologue au gène eGFP permettant la réparation du gène cible meGFP (Figure 59) et parce qu'il a été montré que la présence au sein de la séquence donneuse d'une grande région non-homologue jouxtant la région homologue au gène cible ne modifie pas son efficacité de correction.

3.4.2 - Test des vecteurs rAAV

Les efficacités de correction génique du vecteur rAAV-SeGFP à différentes MOI après transfection du plasmide cible sont présentées dans la Figure 60. En l'absence de transfection et à une MOI de 300 000, il n'apparaît aucune cellule eGFP positive. En revanche, lorsque le plasmide cible pmeGFP est préalablement transfecté, il apparaît des proportions de cellules eGFP positives, et par conséquent des efficacités de correction génique, croissantes de la plus faible MOI utilisée, en l'occurrence 1 000, jusqu'à la MOI de 100 000 pour laquelle l'efficacité de correction maximale semble atteinte, générant 1,25% de cellules corrigées présentant une intensité moyenne de fluorescence d'environ 200, et au delà de laquelle l'efficacité de correction reste constante.

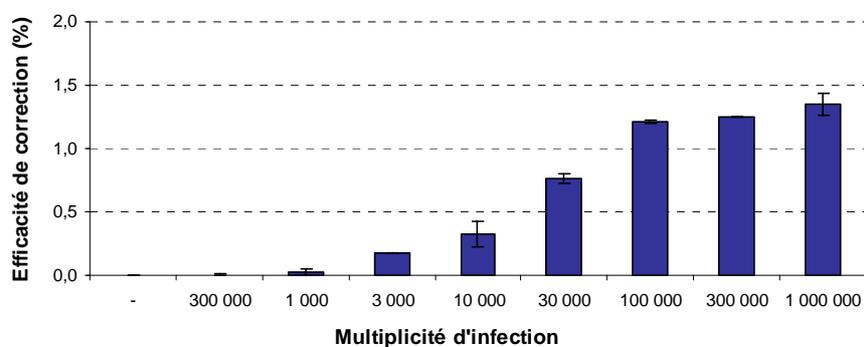


Figure 60. Efficacités de correction génique du vecteur rAAV-SeGFP en fonction de la multiplicité d'infection.

Il peut alors être observé que les résultats générés par ce vecteur rAAV-SeGFP sont très en deçà de ceux qui pouvaient être attendus. En effet, avec ce dernier vecteur, des MOI de 100 000 et plus doivent être utilisées pour atteindre l'efficacité de correction maximale alors que, lors de l'emploi du système eGFPLucMut et du vecteur rAAV-eGFPLuc, elle le fut avec une MOI dix fois inférieure. Aussi, à l'image du fragment dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep et du vecteur rAAV-eGFPLuc qui génèrent des efficacités de correction génique comparables

($1 \cdot 10^7$ RLU/mg protéine et des facteurs de correction d'environ 100), il aurait pu être attendu que le vecteur rAAV-SeGFP génère lui aussi des efficacités de correction comparables à celles obtenues avec le fragment dsDNA-SeGFP 700 Rep (soit d'environ 8% et assortie d'une intensité moyenne de fluorescence de 400) or, elles sont même inférieures à celles obtenues avec oligodéoxynucléotides simple-brins (soit d'environ 2% assortie d'une intensité moyenne de fluorescence de 250). Ces résultats tendraient alors à suggérer que dans le contexte de séquences donneuses apportées par un vecteur rAAV, la réduction de la longueur homologue au gène cible affecte défavorablement l'efficacité de correction d'une manière plus prononcée que dans le cadre de l'utilisation de fragments double-brins transfectés. Toutefois, eu égard au fait que les préparations de vecteurs rAAV-SeGFP sont contaminées par des particules contenant des paires de génomes simple-brins complémentaires ou des génomes viraux double-brins, formes de génomes viraux décrites comme sans notable potentiel correcteur, il convient alors de s'assurer que les résultats obtenus ne soient pas plus le reflet de l'utilisation de ces préparations « contaminées » que celui de l'emploi d'une région homologue restreinte. Pour cela, en s'appuyant sur les résultats de l'étude comparative des fragments dsDNA-eGFP 700 Rep et dsDNA-eGFPLuc 2300 Rep pour la correction du gène meGFP montrant l'absence d'effet dû à la présence d'une grande région non-homologue au gène ciblé au sein du fragment correcteur, nous avons alors utilisé le vecteur rAAV-eGFPLuc, dont la longueur totale du génome viral n'autorise que la formation de particules contenant un seul génome simple-brin, comme agent correcteur du gène meGFP et l'avons comparé au vecteur rAAV-SeGFP.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure 61 et font apparaître que pour chaque MOI utilisée, le vecteur rAAV-eGFPLuc génère des efficacités de correction sensiblement supérieures à celles produites par le vecteur rAAV-SeGFP. Toutefois, il est nécessaire d'utiliser pour chacun des deux vecteurs des MOI de 100 000 et plus pour atteindre l'efficacité de correction génique maximale, cette dernière étant similaire pour les deux vecteurs. Ces résultats confirment effectivement le potentiel correcteur légèrement accru des particules virales ne contenant qu'un seul génome simple-brin. Toutefois, ces fréquences de correction sont nettement inférieures à celles attendues (8%, IMF 400). Au regard la faible augmentation de l'efficacité de correction génique apportée par l'usage d'une préparation de vecteurs de ce type dans cette expérience, il semble alors que les faibles efficacités de

correction génique obtenues le soient en raison de la présence d'une plus courte région homologue .

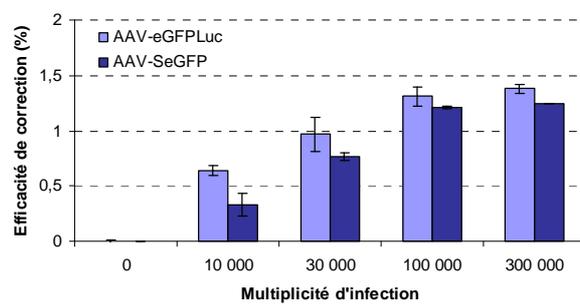


Figure 61. Comparaison des efficacités de correction génique des vecteurs rAAV-eGFPLuc et rAAV-SeGFP.

II - Evaluation des stratégies de correction génique à un niveau chromosomal

Pour faire suite à la comparaison des efficacités de correction de différentes stratégies dans le cadre de la correction d'une mutation ponctuelle au sein d'un gène cible porté par un épisode, nous avons procédé à l'évaluation des efficacités de correction de ces mêmes stratégies lorsque le gène cible est intégré dans un chromosome.

1 - Choix et génération du système d'évaluation

1.1 - Intérêt d'un système chromosomal

Jusqu'à présent, les efficacités de correction génique des différents agents correcteurs ont été évaluées dans le cadre de la correction d'un gène muté porté par un épisode. Si ce mode d'évaluation a été choisi dans un premier temps, c'est en raison des avantages qu'il présente :

- 1) sa mise en œuvre est aisée et rapide ; il suffit de disposer des agents correcteurs, des plasmides rapporteurs mutants et d'une lignée cellulaire pour réaliser une expérience de correction génique,
- 2) les efficacités de correction génique obtenues sont « élevées » rendant possible la détection des efficacités de correction, y compris d'agents correcteurs peu efficaces.

Cependant, il n'est pas évident que les résultats d'une expérience de correction génique sur une cible épisomale puisse prédire les résultats de correction génique lorsque le gène cible est intégré dans un chromosome. En effet, de nombreux aspects distinguent ces deux systèmes d'évaluation et ne peuvent en faire des systèmes totalement comparables pour lesquels toutes les observations faites pour l'un seraient valables pour l'autre. Dans le cas de gènes cibles portés par des épisodes, le nombre de gènes, correspondant au nombre de plasmides présents dans le noyau des cellules transfectées, est important, du moins, supérieur au nombre de copies de plasmides intégrés au sein de la chromatine des lignées cellulaires utilisées pour la correction génique à un niveau chromosomal. Dans ce cas, il peut être attendu des efficacités de correction génique accrues. Aussi, mis à part ces aspects d'ordre stœchiométrique, les deux

systèmes diffèrent également l'un de l'autre de par la nature des mécanismes auxquels peuvent être assujetties les séquences cibles, ainsi que de par la conformation de ces dernières. En effet, dans le cadre d'une correction génique à un niveau épisomal, les plasmides cibles sont présents sous la forme des trois conformations : relâchée, enroulée et surenroulée, tandis que dans le cadre d'une correction génique à un niveau chromosomal, les séquences cibles sont intégrées au sein de la chromatine et sont soumises aux mécanismes de régulation de la condensation de cette dernière. De ce fait, il peut être attendu une accessibilité de l'agent correcteur à sa cible limitée si celle-ci est localisée au niveau d'une région condensée de la chromatine contribuant alors à l'obtention d'efficacités de correction génique réduites. Enfin, les deux systèmes se distinguent de par le statut transcriptionnel du gène cible, aspect particulièrement important puisqu'il est rapporté que son niveau d'expression peut, lui aussi, affecter l'efficacité de correction génique. S'il est transcriptionnellement actif lorsque présent sous le contrôle d'un promoteur viral fort au sein d'un épisome récemment transfecté, le gène cible peut voir son activité transcriptionnelle régulée par des mécanismes cellulaires (condensation chromatinienne, régulation de l'activité promotrice) lorsqu'intégré au sein de la chromatine depuis plusieurs semaines, temps nécessaire à la génération et à la sélection des clones cellulaires, si ce n'est depuis toujours dans le cadre de la correction d'un gène d'intérêt thérapeutique. Sans nécessairement s'opposer, ces deux systèmes ne sont donc pas équivalents et s'il a pu être judicieux d'utiliser de systèmes épisomaux pour s'assurer de la fonctionnalité des agents correcteurs générés et comparer leurs efficacités de correction génique, il n'en est pas moins nécessaire d'utiliser de systèmes chromosomaux pour identifier les stratégies de correction génique les plus efficaces en vue de leur emploi pour la correction d'un gène d'intérêt thérapeutique.

1.2 - Choix et génération du système d'évaluation

Nous avons choisi d'utiliser comme cible de la correction à un niveau chromosomal les mêmes gènes rapporteurs mutants que ceux précédemment utilisés. Pour cela, des clones cellulaires présentant un ou plusieurs exemplaires du plasmide rapporteur mutant intégrés au sein de la chromatine ont été générés par transfection stable suivie de sélection des recombinants. Plus précisément, plusieurs centaines de clones dérivés de la lignée HEK293 ont été obtenus par la transfection stable du plasmide peGFPLucMut ou du plasmide pmeGFP ainsi qu'une dizaine de clones dérivés de la lignée CHO-K1 obtenus par la transfection stable

du plasmide pmeGFP linéarisé par l'enzyme de restriction *Stu*I. La raison pour laquelle un nombre si élevé de clones a été généré découle des problèmes rencontrés pour la sélection de clones recombinants compétents pour la réparation, c'est-à-dire des clones cellulaires aux seins desquels il peut être détecté des événements de correction génique après traitement. En effet, lors du screening par lipofection des clones recombinants dérivés de la lignée HEK293 au regard de leur compétence pour la réparation en utilisant les oligodéoxynucléotides simple-brins ssODN-eGFPLuc 45 PO AS Rep et ssODN-eGFPLuc 45 PS AS Rep ou l'oligodéoxynucléotide simple-brin ssODN-eGFP 35 PO AS Rep en vue de la correction des gènes rapporteurs mutants eGFPLucMut et meGFP respectivement, il n'a pu être détecté aucun clone générant après traitement une augmentation de l'activité luciférase par rapport au contrôle ou la présence de cellules eGFP positives.

Parce que heurtés à des difficultés pour conserver et analyser l'ensemble de la population traitée liées à la faible adhérence des cellules HEK293 notamment lorsqu'elles sont à confluence, nous avons alors généré une vingtaine de clones dérivés de la lignée cellulaire CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) obtenus par la transfection stable du plasmide pmeGFP linéarisé par l'endonucléase de restriction *Stu*I (clones CHO-K1 meGFP). Cette lignée fut choisie au regard de ses propriétés d'adhérence accrues qui autorisent l'emploi de quantités supérieures d'agent correcteur et d'agent transfectant, facteurs influençant défavorablement l'adhérence cellulaire, et permet aussi de réaliser des durées d'incubation post-traitement plus longues permettant une détection plus aisée des cellules corrigées due à une accumulation accrue de la protéine sauvage. Une fois encore, le screening des ces clones par lipofection de l'oligomère ssODN-eGFP 35 PO AS Rep mais aussi par le fragment d'ADN double-brin dsDNA-eGFP 700 Rep dans des conditions variées (densité cellulaire, masse d'agent correcteur, durée d'incubation post-traitement) s'est avéré non-concluant. Face à ce constat d'échec et suite aux entretiens avec différents spécialistes européens de la discipline rencontrés lors de congrès scientifiques (Rafael Yanez-Munoz, Toni Cathomen), il a été envisagé l'emploi d'une technique de vectorisation de l'agent correcteur autre que la lipofection. Nous avons alors tenté de vectoriser les agents correcteurs par nucléofection, un procédé de vectorisation d'acides nucléiques de type électroporation, développé pour délivrer efficacement des acides nucléiques au sein du noyau de cellules réputées difficiles à transfecter. Il a alors été fait usage d'un Nucleofector II (Amaya Biosystem) et du kit de nucléofection correspondant à la lignée cellulaire d'origine de nos clones recombinants. En respectant les recommandations du fabricant notamment quant aux quantités d'acides

nucléiques à utiliser, il est apparu, lors d'un screening de huit des clones CHO-K1 meGFP, qu'au sein de trois d'entre eux des cellules eGFP positives pouvaient être détectées après correction génique par l'oligomère ssODN-eGFP 35 PO AS Rep à une fréquence d'environ 1 cellule pour 100 000 cellules analysées. Parmi ces trois clones compétents pour la réparation, l'un d'entre eux, le clone CHO-K1 meGFP-12, a été choisi pour la réalisation de l'ensemble des expériences de correction génique à venir.

1.3 - Optimisation et caractérisation du système d'évaluation

1.3.1 - Optimisation

Bien que détectables, les événements de correction génique observés lorsque les recommandations du fabricant sont respectées restent rares. Toutefois, lorsque l'on prend soin de cultiver les cellules en présence de l'agent de sélection utilisé pour la sélection des clones recombinants jusqu'à l'avant-veille du jour de la nucléofection, que des masses d'agents correcteurs augmentées au-delà des limites précisées par le fabricant du Nucleofector sont utilisées et que l'analyse est réalisée cinq jours après la nucléofection, il apparaît des efficacités de correction génique supérieures comme en atteste l'expérience présentée en Figure 62 où sont comparées les efficacités de correction génique observées lorsque sont utilisées des masses croissantes de l'oligodéoxynucléotide simple-brin ssODN-eGFP35 PO AS Rep ou du fragment d'ADN double-brin dsDNA-SeGFP 700 Rep. Dans ces conditions, on obtient des efficacités de correction augmentant avec la masse d'agent correcteur pour atteindre des fréquences de 2,7 et 8,1 cellules corrigées pour 100 000 cellules analysées pour les agents correcteurs de type oligodéoxynucléotide et fragment respectivement tandis qu'il n'est pas observé de cellules eGFP positives lorsque sont utilisés les agents correcteurs contrôles. Notons que les intensités moyennes de fluorescence des deux populations de cellules corrigées par chacun des deux types d'agents (oligodéoxynucléotides et fragments d'ADN double-brins) sont comparables et sont environ 20 fois supérieures à celles des populations de cellules CHO-K1 meGFP-12 traitées par les agents correcteurs contrôles.

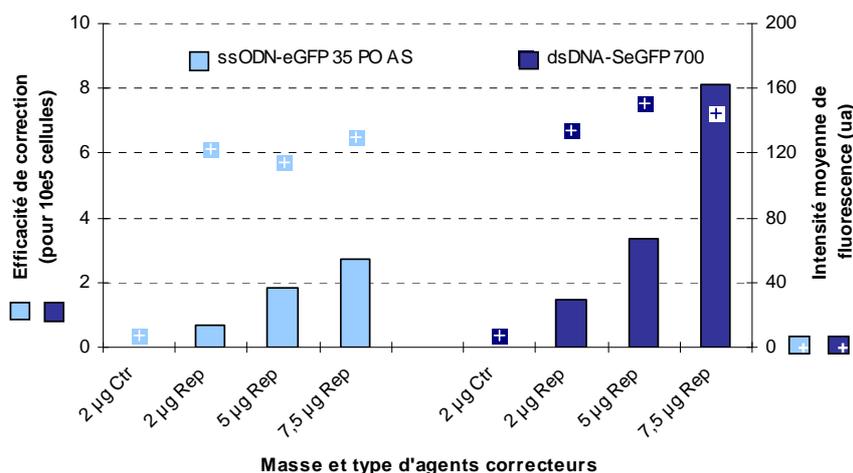


Figure 62. Comparaison des efficacités de correction génique après nucléofection de masses croissantes des agents correcteurs ssODN-eGFP 35 PO AS Rep et dsDNA-SeGFP 700 Rep.

Les cellules CHO-meGFP 12 sont soumises au protocole de nucléofection par 2 µg de l'agent correcteur contrôle (ssODN-eGFP 35 PO AS Ctr ou dsDNA-meGFP 700 Ctr) ou par des quantités croissantes (2, 5 et 7,5 µg) de l'agent correcteur réparateur (ssODN-eGFP 35 PO AS Rep ou dsDNA-SeGFP 700 Rep). Après 5 jours d'incubation, les populations cellulaires sont analysées par cytométrie en flux au regard de leurs proportions en cellules eGFP positives et de leurs intensités moyenne de fluorescence.

1.3.2 - Comparaison des approches de vectorisation de type lipofection et nucléofection

Les résultats obtenus précédemment sont quelque peu surprenants. Tandis que le screening de plusieurs centaines de clones recombinants par lipofection des agents correcteurs n'a pas permis l'identification d'un seul clone compétent pour la réparation, trois le furent sur seulement huit clones CHO-K1 meGFP testés lorsque les agents correcteurs ont été vectorisés par nucléofection. Pour cette raison, nous avons souhaité comparer les efficacités de correction génique à un niveau chromosomal lorsque les agents correcteurs (l'oligodéoxynucléotide simple-brin ssODN-eGFP35 PO AS Rep et le fragment d'ADN double-brins dsDNA-SeGFP 700 Rep) sont vectorisés par lipofection ou par nucléofection dans le cadre d'une expérience réalisée avec le clone CHO-K1 meGFP-12 en prenant en compte les observations précédemment faites. Dans cette même expérience et dont les résultats sont présentés en Figure 63, les efficacités de transfection par lipofection ou par nucléofection de cellules CHO-K1 par le plasmide peGFP-C1 ont été comparées (condition A). Ensuite, les efficacités de correction génique obtenues avec soit l'oligomère simple-brin, soit le fragment d'ADN double-brin dans le cadre d'expériences de correction génique à un niveau épisomal (conditions B pour l'oligomère et condition C pour le fragment) ou

chromosomal (conditions D pour l'oligomère et condition E pour le fragment) ont été évaluées en utilisant l'une ou l'autre des deux méthodes de vectorisation. Les résultats montrent une efficacité de transfection par lipofection d'environ 40% tandis que seulement 7% des cellules nucléofectées sont eGFP positives. De même, alors qu'il est observé des efficacités de correction génique épisomale de 0,6% et 3% pour l'oligomère et le fragment respectivement lorsqu'ils sont vectorisés par lipofection, il est obtenu des efficacités de correction génique épisomale très en deçà de celles-ci lorsque la méthode de transfection par nucléofection fut employée (0,1% pour l'oligodéoxynucléotide simple-brin ssODN-GFP35 PO AS Rep et 0,5% pour le fragment d'ADN double-brins dsDNA-SeGFP 700 Rep).

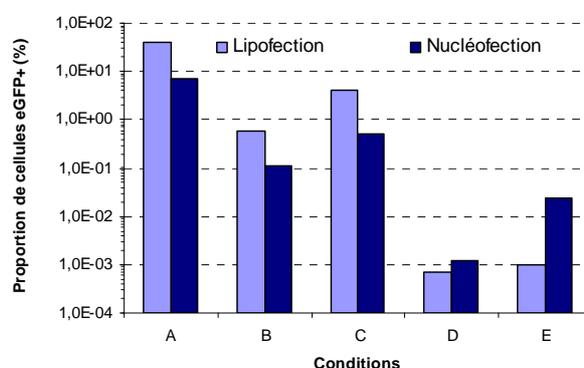


Figure 63. Comparaison des efficacités de transfection et de correction génique épisomale et chromosomale en fonction du mode de vectorisation.

Les cellules CHO-meGFP 12 sont soumises aux protocoles de transfection ou de correction génique par lipofection ou par nucléofection présentés ci-après (conditions A à E) puis sont analysées par cytométrie en flux au regard de leurs proportions en cellules eGFP positives après 2 jours pour les conditions A, B et C et 5 jours pour les conditions D et E. Condition A : efficacité de transfection par lipofection ou par nucléofection de 2 µg du plasmide peGFP-C1, condition B : efficacité de correction génique épisomale avec ssODN-eGFP 35 PO AS Rep (ratio molaire 1/100), condition C : efficacité de correction génique épisomale avec dsDNA-SeGFP 700 Rep (ratio molaire 1/10), condition D : efficacité de correction génique chromosomale avec ssODN-eGFP 35 PO AS Rep (7,5 µg), condition E : efficacité de correction génique chromosomale avec dsDNA-SeGFP 700 Rep (7,5 µg).

En revanche, s'il a pu être observé une baisse flagrante des efficacités de transfection et de correction génique épisomale lorsque les acides nucléiques sont vectorisés par nucléofection, il apparaît dans le cadre d'expérience de correction génique à un niveau chromosomal un comportement différent des efficacités de correction génique. Quelle que soit la méthode de

transfection envisagée, les efficacités de correction génique obtenues lors de l'emploi de l'oligomère sont comparables (0,0007% et 0,0012% pour la lipofection et la nucléofection respectivement). En revanche, lorsque le fragment d'ADN double-brin est utilisé comme agent correcteur, une augmentation de l'efficacité de correction d'un facteur supérieur à 20 est observée lorsque les cellules sont nucléofectées (0,001% et 0,024% pour la lipofection et la nucléofection respectivement). Notons d'ailleurs que dans cette dernière expérience des événements de correction après lipofection des cellules ont pu être observés, même si rares, alors qu'il n'en n'était apparu aucun lors du screening initial sur les cellules HEK293.

2 - Comparaison des agents correcteurs

2.1 - Efficacité de correction génique du vecteur rAAV

Comme pour la nucléofection, les cellules sont cultivées en présence de l'agent de sélection jusqu'à l'avant-veille du jour de l'infection et sontensemencées dans les mêmes conditions que pour la correction génique épisomale. Lorsque qu'infectées par des multiplicités d'infection croissantes du vecteur rAAV-eGFPLuc allant de 10 000 à 1 000 000, il apparaît pour chacune des conditions des événements de correction génique de fréquences croissantes de 2 cellules corrigées pour 100 000 jusqu'à des fréquences de 12 et 16 cellules corrigées pour 100 000 pour les multiplicités d'infection les plus fortes assorties d'intensités moyennes de fluorescence d'environ 150 (Figure 64) comparables à celles observées avec les oligodéoxynucléotides simple-brins. Toutefois, le résultat obtenu pour la multiplicité d'infection de 1 000 000 s'avère ne pas être reproductible, probablement en raison de la toxicité importante générée par de telles conditions d'infection.

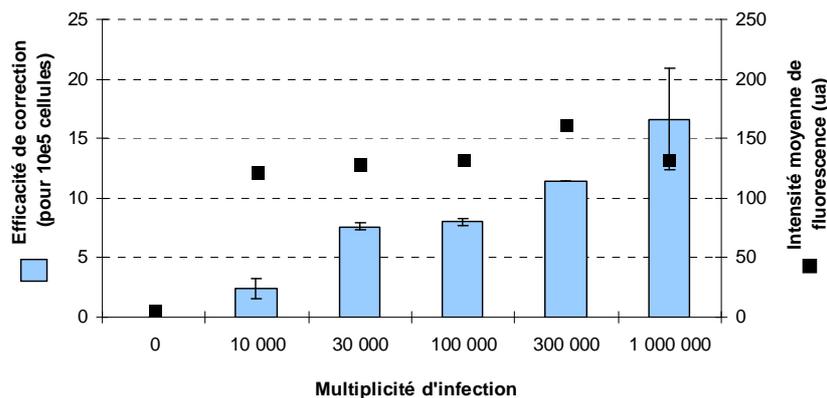


Figure 64. Efficacité de correction génique chromosomale du vecteur rAAV-eGFPLuc en fonction de la multiplicité d'infection.

Les cellules CHO-meGFP 12 sont infectées par des doses croissantes de vecteur rAAV-eGFPLuc (multiplicités d'infection de 10 000 à 1 000 000) puis analysées par cytométrie en flux au regard de leurs proportions en cellules eGFP positives et de leurs intensités moyenne de fluorescence après 4 jours d'incubation.

Comme lors des études des efficacités de correction génique épisomale utilisant le vecteur rAAV-SeGFP, il peut être objecté que les préparations de ce dernier vecteur sont contaminées par des particules ayant encapsidées des formes bicaténaires de génome viral. Observant par ailleurs que les efficacités de correction génique des fragments dsDNA-eGFPLuc 2200 et dsDNA-SeGFP 700 sont comparables (voir Figure 61), nous avons alors préféré conduire les expériences à venir avec le vecteur rAAV-eGFPLuc dans la mesure où sa plus grande longueur de génome garantie la production de particules ne contenant qu'un seul génome sous sa forme simple-brin.

Toutefois, la plupart des expériences présentées ci-après ont également été réalisées avec le vecteur rAAV-SeGFP et ont générées des résultats comparables à ceux présentes ci-après. Notons qu'à la multiplicité d'infection de 300 000, les deux vecteurs rAAV utilisés génèrent des efficacités de correction génique très similaires, de 12 et 11 cellules corrigées pour 100 000 cellules analysées (Figure 65).

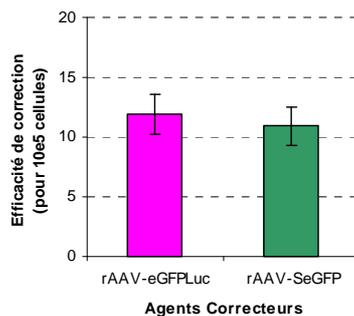


Figure 65. Efficacité de correction génique chromosomale des vecteurs rAAV-eGFPLuc et rAAV-SeGFP.

Les cellules CHO-meGFP 12 sont infectées par des doses identiques de vecteur rAAV-eGFPLuc ou rAAV-SeGFP (multiplicités d'infection de 300 000) puis analysées par cytométrie en flux au regard de leurs proportions en cellules eGFP positives et de leurs intensités moyenne de fluorescence après 4 jours d'incubation.

Bien qu'ayant observé précédemment que l'obtention d'efficacités de transfection accrues n'est pas nécessairement un facteur influant favorablement sur l'efficacité de correction génique, il peut être toutefois intéressant d'évaluer avec quelle efficacité les cellules CHO-K1 sont nucléofectées ou transduites par un vecteur de type rAAV. Utilisant pour ce faire le plasmide peGFP-C1 et un vecteur rAAV2-1 contenant la cassette d'expression du plasmide peGFP-C1 pour la transduction de cellules CHO-K1 (le vecteur rAAV-CMVVeGFP), il est alors obtenu les résultats présentés dans la Figure 66 pour lesquels il est observé une efficacité de nucléofection de 7%. Cette efficacité est de niveau comparable à celle observée après transduction des mêmes cellules par le vecteur rAAV à la multiplicité d'infection de 300 000 (11%).

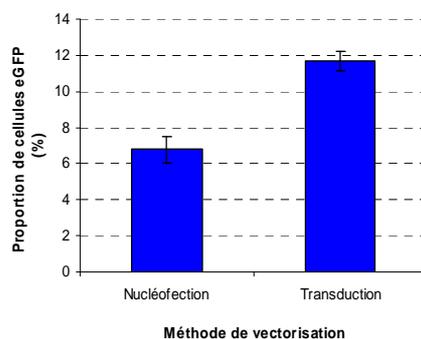


Figure 66. Comparaison des efficacités de nucléofection et de transduction.

Après nucléofection des cellules CHO-meGFP 12 avec 7,5 μ g du plasmide peGFP-C1 ou transduction par le vecteur rAAV-CMVVeGFP à la MOI de 300 000, les cellules sont incubées 48 heures avant analyse de la proportion de cellules eGFP positives par cytométrie en flux.

Dans ces conditions, la comparaison des efficacités de correction génique générées lors de l'emploi de l'une ou l'autre de deux méthodes de vectorisation (vectorisation par nucléofection ou vectorisation virale) est donc possible.

Pour ces raisons, la multiplicité d'infection de 300 000 a été retenue pour l'ensemble des expériences de correction génique par un vecteur rAAV à un niveau chromosomal.

Dans l'expérience présentée ci-après et illustrée en Figure 67 sont comparées les efficacités de correction génique des trois agents correcteurs utilisés jusqu'alors pour la correction du gène muté meGFP, à savoir l'oligodéoxynucléotide simple-brin ssODN-eGFP 35 PO AS Rep, le fragment d'ADN double-brin dsDNA-SeGFP 700 Rep et le vecteur rAAV-eGFPLuc. Leurs efficacités de correction génique respectives sont de 1,2, 24 et 12 cellules corrigées pour 100 000 cellules analysées.

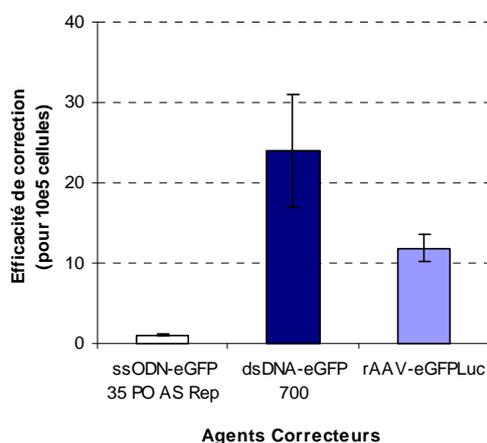


Figure 67. Comparaison des efficacités de correction génique des agents correcteurs ssODN-eGFP 35 PO AS Rep, dsDNA-SeGFP 700 Rep et rAAV-eGFPLuc.

Après nucléofection des cellules CHO-meGFP 12 par 7,5 µg des agents correcteurs ssODN-eGFP 35 PO AS Rep ou dsDNA-SeGFP 700 Rep ou après infection par le vecteur rAAV-eGFPLuc à la MOI de 300 000, les cellules sont incubées jusqu'à analyse de la proportion de cellules eGFP positives par cytométrie en flux.

2.2 - Contrôle qualité de la correction génique

2.2.1 - Stabilité du phénotype « corrigé »

Plusieurs publications rapportent des taux de survie faibles pour les cellules corrigées à un niveau chromosomal par certains agents correcteurs, notamment les oligodéoxynucléotides simple-brins [Engstrom and Kmiec, 2007, Radecke, et al., 2004]. Nous avons en conséquence

souhaité évaluer les capacités de prolifération des cellules corrigées par chacun des trois agents correcteurs utilisés dans l'expérience précédente (l'oligodéoxynucléotide simple-brin ssODN-GFP35 PO AS Rep, le fragment d'ADN double-brin dsDNA-SeGFP 700 Rep et le vecteur rAAV-eGFPLuc). Pour cela, les échantillons cellulaires analysés au cinquième jour ont été réensemencés et cultivés jusqu'au vingt-et-unième jour pour une seconde analyse du même type (Figure 68). Il apparaît que les proportions de cellules corrigées sont à peu près stables au cours du temps même s'il peut être observé une légère augmentation de la proportion de cellules corrigées lors de l'emploi du vecteur rAAV-eGFPLuc.

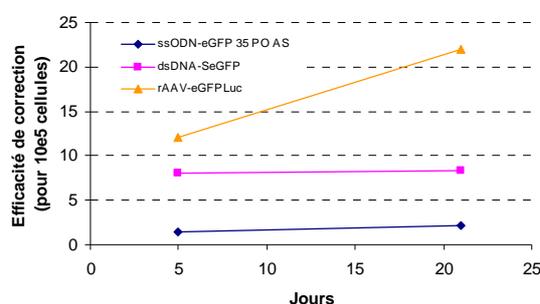


Figure 68. Suivi de la stabilité de la correction au cours du temps.

Après nucléofection des cellules CHO-meGFP 12 par 7,5 μ g des agents correcteurs ssODN-eGFP 35 PO AS Rep ou dsDNA-SeGFP 700 Rep ou après infection par le vecteur rAAV-eGFPLuc à la MOI de 300 000, les cellules sont incubées 5 jours avant une première analyse par cytométrie en flux de la proportion de cellules eGFP positives au sein des populations cellulaires, lesquelles sont alors cultivées pendant 14 jours avant une seconde analyse du même type.

Au travers de cette expérience, il peut être supposé que les cellules corrigées ne présentent pas de défaut de survie ou de prolifération puisqu'elles semblent proliférer à une vitesse comparable à celle de l'ensemble de la population traitée non-corrigée comme en atteste la constance de la proportion de cellules corrigées au sein de l'échantillon. Toutefois, si ces résultats suggèrent des vitesses de prolifération comparables pour ces deux populations traitées (corrigées ou non-corrigées), ils ne précisent pas si celles-ci sont similaires à des populations cellulaires non-traitées. Pour cette raison, les cellules corrigées aux seins des échantillons cellulaires traités ainsi que les cellules d'une population CHOmeGFP-12 non-traitée ont été triées puis isolées à des fins de clonage monocellulaire. Les taux de survie des cellules clonées, indiqués par la proportion de clones cellulaires formés en présence de l'agent

de sélection et présentés dans le Tableau 4, apparaissent très comparables quelle qu'en soit la population cellulaire considérée suggérant alors l'absence de défaut de survie aux seins des populations de cellules corrigées.

Tableau 5. Fréquences de survie des cellules « corrigées ».

Population cellulaire clonée	Proportion de cellules formant colonies (%)	Nombre de cellules clonées
CHO-meGFP-12 non-traitée	85	277
CHO-meGFP-12 corrigée par ssODN-eGFP PO AS Rep	83	277
CHO-meGFP-12 corrigée par dsDNA-eGFP 700 Rep	84	277
CHO-meGFP-12 corrigée par rAAV-eGFPLuc 2400 Rep	82	277
CHO-meGFP-12 corrigée par rAAV-SeGFP 700 Rep	76	95

A l'issue des analyses par cytométrie en flux des proportions de cellules eGFP positives, les populations cellulaires sont triées et les cellules eGFP positives sont clonées (clonage monocellulaire). Les cellules sont incubées jusqu'à 3 semaines et la formation de clones cellulaires attestant de la survie de la cellule clonée est alors observée.

Il est d'ailleurs observé, pour chacun des agents correcteurs utilisés, une transmission clonale du phénotype eGFP positif comme le montrent les photographies présentées en Figure 69, bien qu'il apparaisse une grande hétérogénéité des intensités de fluorescence au sein des cellules d'un même clone.

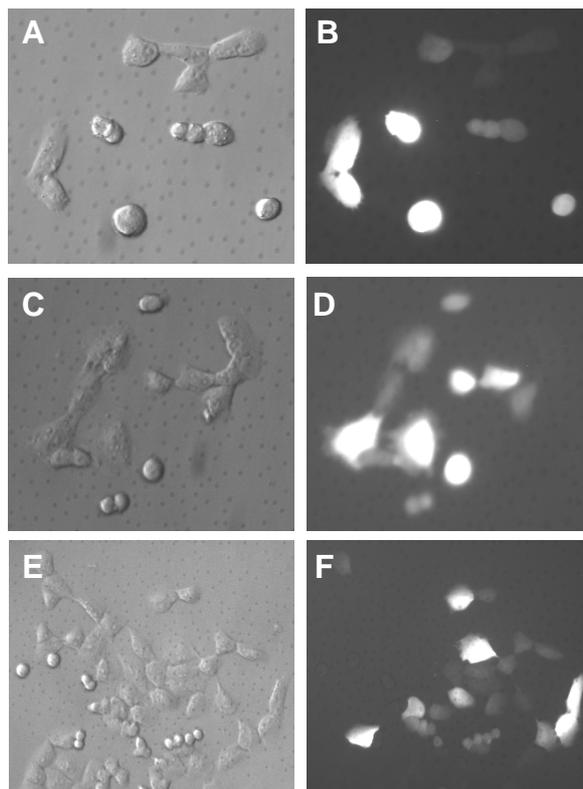


Figure 69. Photographies des clones cellulaires CHOmeGFP-12 « corrigés ».

Après clonage monocellulaire des cellules eGFP positives des populations de cellules traitées par les trois agents correcteurs, les clones cellulaires formés ont été photographiés en contraste de phase (A, C et E) ou sous illumination en lumière bleue pour visualiser les cellules exprimant l'eGFP (B, D et F). (A) et (B) : CHO-meGFP 12 corrigées par ssODN-eGFP 35 PO AS, (C) et (D) : CHO-meGFP 12 corrigées par dsDNA-eGFP 700, (E) et (F) : CHO-meGFP 12 corrigées par rAAV-eGFPLuc 2400.

Enfin, notons que seulement 60% environ des clones cellulaires, formés à partir des cellules corrigées par les différents agents correcteurs, expriment un phénotype eGFP positif observable en microscopie à épifluorescence. Toutefois, lorsque cultivés en présence de 100 nM de Trichostatine A, un inhibiteur des histones déacétylases utilisé pour favoriser l'expression, au moins 90% des clones apparaissent eGFP positifs. Les autres, ne survivants pas ou difficilement à ces conditions de culture, ne peuvent être raisonnablement considérés. Au regard de ces résultats, il semble que la perte du phénotype corrigé soit en très grande partie due à une baisse de l'expression du transgène et non pas à une instabilité de la correction.

2.2.2 - Confirmation du génotype

Au regard de ces derniers résultats, la correction du gène meGFP est stable comme en atteste la stabilité du phénotype sauvage des cellules corrigées. Toutefois, cela ne présume pas obligatoirement qu'il y ait eu correction génique d'un ou des gènes meGFP, ni même du nombre d'entre eux qui ont pu être corrigés au sein de chacun des clones. Pour ces raisons, l'analyse génotypique de 24 clones corrigés pour chaque agent correcteur a été entreprise. Pour cela, une analyse du nombre de copies du gène eGFP a été réalisée par dosage génique par PCR quantitative en temps réel contre le gène eGFP et montre la présence d'environ 20 copies du gène eGFP par génome diploïde. Dans un premier temps, nous avons procédé au séquençage des ADN génomiques extraits des clones corrigés pour tenter d'observer sur l'électrophorégramme le signal généré par la séquence corrigée. Cette tentative fut infructueuse, pour seulement un des 24 clones analysés nous avons pu observer un double signal suggérant que pour la plupart des clones, la proportion de gènes corrigés est faible et ne permet pas d'être détectée sur l'électrophorégramme. En conséquence, d'autres analyses ont alors été entreprises comme la réalisation d'un génotypage par l'étude du polymorphisme de restriction enzymatique du gène ciblé puisque la correction de la mutation ponctuelle G173A au sein du gène meGFP fait apparaître un site de restriction enzymatique MscI. Faute de temps, ces travaux n'ont pu être conduits à leurs termes.

III - Optimisation de stratégies de correction génique

Comme il l'a été vu dans l'introduction et dans les résultats des deux parties précédentes, les évènements de correction génique des agents réparateurs sont rares. C'est pourquoi nous avons cherché en suivant différentes pistes à améliorer l'efficacité de correction. Dans un premier temps, nous aborderons les modifications pouvant être apportés aux agents réparateurs en eux-mêmes en vue d'en améliorer le potentiel correcteur. Puis, nous évaluerons les effets d'un conditionnement cellulaire par des composés pharmacologiques connus pour induire des dommages à l'ADN et son impact sur l'efficacité de correction génique. Enfin, la tentative de développement d'un vecteur rétroviral pour la correction génique sera présentée en fin de partie.

1 - Optimisation des agents réparateurs

1.1 - Modifications des ADN double-brins

1.1.1 - Méthode de production

Jusqu'à présent, tous les fragments d'ADN double-brins utilisés dans nos études ont été produits par PCR. Bien qu'ayant veillé à utiliser les polymérases les plus fidèles, celles-ci présentent néanmoins une fidélité très en deçà de celles des systèmes bactériens impliquées dans la réplication des plasmides. Pour nous assurer que la présence éventuelle, au sein du fragment d'ADN double-brins, de mutations additionnelles introduites lors de la synthèse par PCR n'affecte pas le processus de correction génique, nous avons alors comparé ce dernier à son homologue produit par digestion enzymatique du plasmide le contenant. Dans l'expérience présentée en Figure 70, sont présentées les efficacités de correction génique obtenues dans le cadre du protocole de correction génique épisomale du plasmide peGFPLucMut lorsque sont utilisés soit le fragment d'ADN double-brins de 2,2 kpb produit par PCR (dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep), soit un fragment d'ADN double-brins de même séquence et de longueur voisine (2,4 kpb), produit par la digestion du plasmide peGFPLuc par les endonucléases de restriction NheI et XbaI suivie d'une purification sur gel (dsDNA-eGFPLuc 2400 NX Rep). Il apparaît alors que chacun des deux types de fragments permet l'obtention d'efficacités de correction génique similaires ($9,2 \cdot 10^6$ et $8,5 \cdot 10^6$ RLU/mg protéine pour les fragments dsDNA-Luc 2200 Rep et dsDNA-Luc 2400 NX Rep respectivement). A la

vue de ce résultat, il ne semble pas que le mode de synthèse affecte l'efficacité de correction génique, du moins pour des fragments de cette longueur.

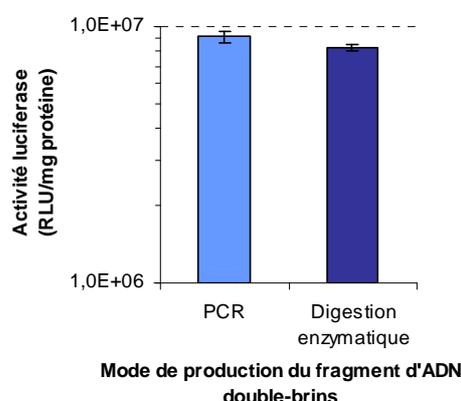


Figure 70. Effet du mode de production des fragments d'ADN double-brins sur l'efficacité de correction génique.

Efficacités de correction génique épisomale après transfection des cellules HEK293T par le plasmide cible peGFPLucMut et le fragment dsDNA-Luc 2200 Rep produit par PCR ou le fragment dsDNA-Luc 2400 NX Rep produit par digestion enzymatique au ratio molaire 1/10.

1.1.2 Nature des extrémités

Lorsque ce travail a été initié, il n'existait que peu d'informations quant à l'influence de la nature des extrémités (à bouts francs, 5' dépassants ou 3' dépassants) du fragment d'ADN double-brin sur son potentiel correcteur. Nous avons alors envisagé qu'un fragment d'ADN double-brin dont les extrémités sont modifiées de façon à se qu'il s'inscrive plus aisément dans le processus de remplacement homologue ; parce que ressemblant à un de ces intermédiaires réactionnels ; puisse générer des efficacités de correction génique accrues. D'ailleurs, il est rapporté que la présence d'une longue extrémité 3' dépassante facilite la recombinaison homologue chez nombre d'organismes (*E. coli*, *S. cerevisiae* et *X. laevis*), bien que ce ne soit pas observé chez les mammifères. Aussi, dans un brevet de 1992 [Selden, et al., 1992], il est prétendu qu'un fragment présentant de longues extrémités 5' dépassantes (de plusieurs centaines de bases) permet l'obtention d'efficacité de recombinaison 10 fois supérieures à celles d'un fragment à bouts francs de même longueur. Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons alors souhaité évaluer le potentiel correcteur de fragments d'ADN double-brins présentant des extrémités de différentes natures.

Dans un premier temps, nous avons produit deux fragments par digestion enzymatique du plasmide peGFPLuc à l'aide des endonucléases AfeI et HaeI pour la génération d'un fragment à bouts francs (dsDNA-eGFPLuc 2400 AH Rep) ou des endonucléases BmtI et BpII pour la génération d'un fragment à extrémités 3' dépassantes (dsDNA-eGFPLuc 2400 BB Rep). Les efficacités de correction génique de ces deux derniers fragments ont alors comparées avec celle obtenue avec le fragment dsDNA-eGFPLuc 2400 NX Rep, fragment à extrémités 5' dépassantes, dans le cadre d'une expérience de correction génique épisomale ayant pour cible le plasmide peGFPLucMut et dans laquelle les fragments réparateurs ont été utilisés au ratio 1/2 compte tenu de leur délicate production. Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure 71 et montrent des niveaux d'activité luciférase similaires pour chacun des trois types de fragments testés ($5,9 \cdot 10^6$, $6,3 \cdot 10^6$ et $5,6 \cdot 10^6$ RLU/mg protéine pour les fragments dsDNA-eGFPLuc 2400 NX Rep, AH Rep et BB Rep respectivement).

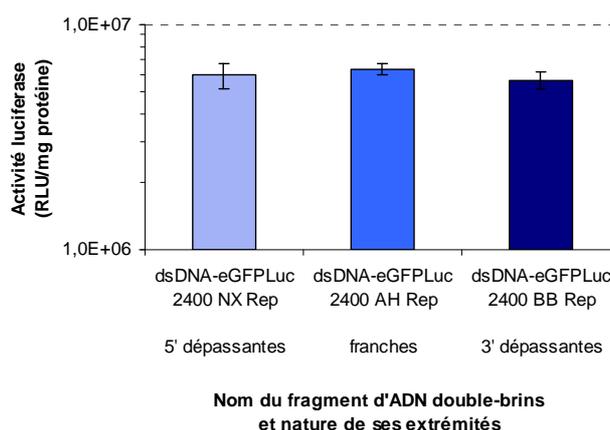


Figure 71. Effet de la nature des extrémités des fragments d'ADN double-brins sur l'efficacité de correction génique.

Efficacités de correction génique épisomale après transfection des cellules HEK293T par le plasmide cible peGFPLucMut et le fragment dsDNA-Luc 2400 NX Rep à extrémités 5' dépassantes, le fragment dsDNA-Luc 2400 AH Rep à extrémités franches ou le fragment dsDNA-Luc 2400 BB Rep à extrémités 3' dépassantes, au ratio molaire 1/2.

Tableau 6. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins générés par digestion enzymatique.

Nom du fragment d'ADN double-brins	Endonucléases utilisées en 5' et en 3'	Nature des extrémités 5' et 3'	Matrice clivée	Longueur (pb)	Type d'agent correcteur
dsDNA-eGFPLuc 2400 NX Rep	NheI et XbaI	5' dépassantes (+4 ; +4)	peGFPLuc Mut	2451	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 2400 AH Rep	AfeI et HaeI	franches	peGFPLuc Mut	2393	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 2400 BB Rep	BmtI et BpII	3' dépassantes (+4 ; +5)	peGFPLuc Mut	2363	Réparateur

Il ne semble pas alors apparaître dans cette expérience que la nature des extrémités du fragment réparateur puisse avoir un impact sur son potentiel correcteur. Toutefois, la longueur du fragment simple-brin dépassant reste de très courte taille pour les deux fragments à extrémités dépassantes testés. Le fragment à extrémités 5' dépassantes ne voit ses extrémités coiffées que d'un très court fragment simple-brin de 4 nucléotides à chacune de ses extrémités et le fragment à extrémités 3' dépassantes que de courts fragments de 4 et 5 nucléotides au niveau de ses extrémités 5' et en 3' respectivement. Dans ces circonstances, il peut être objecté que les extrémités dépassantes générées ne soient pas assez longues pour promouvoir un quelconque effet sur le processus de remplacement homologue. Pour cette raison, nous avons alors cherché à produire des fragments d'ADN double-brins à longues extrémités 5' dépassantes. La méthode employée consiste en une dégradation exonucléolytique 3'→5' de fragments double-brins par l'exodéoxyribonucléase III (ExoIII). Cette enzyme non-processive spécifique pour l'ADN double-brins catalyse la dégradation de l'extrémité 3' et génère ainsi une extrémité 5' dépassante. Notons d'ailleurs que dans le cas de la dégradation de fragment double-brins linéaires, deux extrémités 5' dépassantes de même longueur sont générées dont la taille maximale ne peut dépasser la moitié de la longueur totale du fragment originel (voir Figure 96 page 165 dans la partie Matériels et Méthodes).

Dans une première expérience, cette méthode fut utilisée pour dégrader le fragment dsDNA-eGFPLuc 2400 NX Rep en fragments à plus ou moins longues extrémités dépassantes. Ce dernier fut soumis à l'action de l'ExoIII pendant des temps d'incubation variables à 37°C. Pour vérifier l'effective dégradation du fragment et évaluer la longueur des extrémités 5' dépassantes générées, un aliquot de chacun des échantillons de fragments ainsi qu'un contrôle non-traité ont été utilisés pour la réalisation d'une électrophorèse sur gel d'agarose permettant la détermination de leurs masses moléculaires et indirectement la mesure de la longueur des

extrémités 5' dépassantes. Il apparaît tout d'abord, comme montré en Figure 72, une réduction du poids moléculaire du fragment estimée à environ 100-200 pb lorsque le fragment est exposé au mélange réactionnel même s'il n'est pas incubé (comparaison des échantillons non-traité et incubé t0s) pouvant être due à l'activité de l'ExoIII à la température de travail de +4°C. Puis, il apparaît au décours des temps d'incubation croissants une très légère réduction du poids moléculaire (estimée à environ 100 pb) associée à l'apparition d'une légère trainée dont l'étendue croît avec le temps d'incubation et qui correspond à des fragments de poids moléculaires inférieurs de quelques centaines de bases tout au plus. Il semble donc que les fragments aient pu être dégradés comme attendu quand bien même cette dégradation n'est pas très avancée et n'a pu conduire à l'apparition de fragments à extrémités 5' dépassantes aussi longues que souhaitées, soit jusqu'à plusieurs centaines de bases.

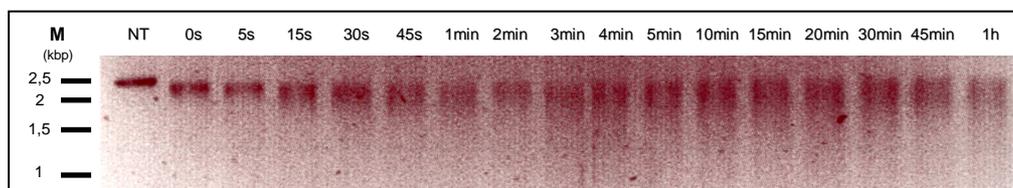


Figure 72. Electrophorogramme des fragments d'ADN double-brins digérés par ExoIII.

Electrophorogramme montrant les masses moléculaires des fragments d'ADN double-brins dsDNA-eGFPLuc 2400 NX après digestion par ExoIII pendant des temps d'incubation variables (conditions $t=5s$ à $t=1h$), nul (condition $t=0s$) ou en l'absence de traitement (NT). NT : non traité, s : seconde, m : minute, h : heure, M : marqueur de masse moléculaire et kbp : kilobases paires de bases.

Le potentiel correcteur des fragments ainsi produits a alors été évalué dans le cadre d'une expérience de correction génique épisomale ayant pour cible le plasmide peGFPLucMut et dans laquelle les fragments réparateurs ont été utilisés au ratio molaire 1/2. Les résultats, présentés en Figure 73, montrent tout d'abord une efficacité de correction génique réduite de plus d'un facteur 2 lorsqu'est utilisé le fragment traité mais non-incubé (t0s) comparé au fragment non-traité. Puis, pour des temps d'incubation croissants, on observe une légère augmentation de l'efficacité de correction génique pour les fragments correspondant aux incubations de courtes durées (jusqu'à 30 secondes) tandis que celle-ci baisse pour les incubations les plus longues.

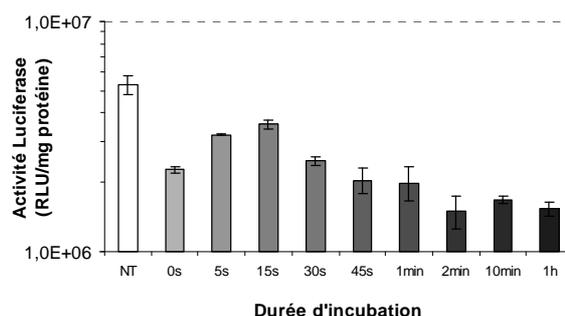


Figure 73. Effet de la longueur des extrémités 5' dépassantes des fragments d'ADN double-brins sur l'efficacité de correction génique.

Efficacités de correction génique épisomale après transfection des cellules HEK293T par le plasmide cible pGFPLucMut et les fragments dsDNA-Luc 2400 NX Rep (ratio molaire 1/2) digérés par ExoIII pendant des temps d'incubation variables (conditions $t=5s$ à $t=1h$), nul (condition $t=0s$) ou en l'absence de traitement (NT).

Au vu de ces résultats, il ne peut être conclu que l'utilisation de fragments à longues extrémités 5' dépassantes puisse améliorer l'efficacité de correction génique dans la mesure où celles enregistrées avec ces fragments modifiés sont inférieures à celle obtenue avec un fragment conventionnel. Toutefois, Si l'on porte un regard simultané sur ces deux éléments de résultats (Figures 72 et 73), il peut être observé pour l'ensemble des échantillons incubés un parallèle entre d'une part, une très légère réduction du poids moléculaire et l'apparition d'une légère trainée dont l'étendue croît avec le temps d'incubation et d'autre part, la légère augmentation de l'efficacité de correction génique pour les plus courtes incubations et la baisse progressive qui s'ensuit pour les incubations les plus longues. Ceci semble alors un effet favorable de la présence de longues extrémités 5' dépassantes compensé par la dégradation d'une partie de l'échantillon.

L'ensemble de ces observations nous invite à reconsidérer notre protocole. Celui-ci est désormais réalisé avec des quantités augmentées d'enzyme pour favoriser la progression de la dégradation de l'extrémité 3' au détriment de la dégradation globale du fragment. Le fragment traité est de plus courte taille (en l'occurrence : le fragment dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep de 1000 pb) pour plus aisément observer la réduction de son poids moléculaire. Enfin, l'étape de digestion par l'exonucléase III est suivie pour une fraction des échantillons d'une digestion par la mung bean nuclease (MBN), enzyme catalysant la dégradation de l'ADN simple-brin dépassant aux extrémités d'un ADN double-brin (voir Figure 96 page 165 dans la partie

Matériels et Méthodes). Ainsi, il devrait pouvoir être confirmé tout d'abord que la réduction du poids moléculaire observée après digestion par ExoIII corresponde effectivement à la dégradation de l'extrémité 3' par l'observation, après digestion par MNB, d'une réduction du poids moléculaire du même ordre. Aussi, il pourra être contrôlé si l'accroissement ou la réduction des efficacités de correction générées par ces fragments modifiés est due à la modification des leurs extrémités. Après migration électrophorétique sur gel d'agarose des échantillons issus de ce protocole, il peut être observé l'électrophorégramme présenté dans la Figure 74. Celui-ci montre tout d'abord, lors du seul emploi de l'ExoIII, une réduction progressive de la masse moléculaire des fragments traités comparée à celle de l'échantillon contrôle non-traité, estimée à quelques centaines de paires de bases et allant de pair avec les temps d'incubation croissants. Il est aussi observable que l'intensité des bandes décroît avec l'allongement de la durée d'incubation. Ceci peut augurer de l'avancement de la digestion par ExoIII, dans la mesure où les extrémités simple-brins générées présentent une affinité réduite pour l'agent intercalant révélant utilisé, mais aussi d'une dégradation globale de l'échantillon. Il apparaît également pour chacun des échantillons traités une très légère bande à environ 250 pb pouvant correspondre aux produits issus de la dégradation la plus avancée d'un fragment de 1 kpb par ExoIII.

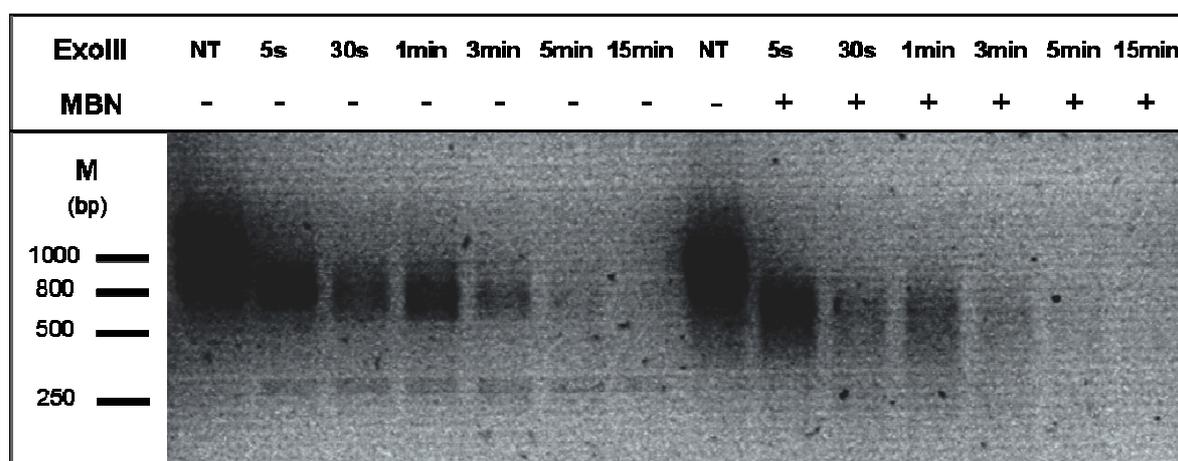


Figure 74. Electrophorégramme des fragments d'ADN double-brins digérés par ExoIII et MBN.

Electrophorégramme montrant les masses moléculaires des fragments d'ADN double-brins dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep après digestion par ExoIII pendant des temps d'incubation variables (conditions $t=5s$ à $t=15min$) ou en l'absence de traitement (NT) suivie (+) ou non (-) d'une digestion par la MBN. NT : non traité, s : seconde, m : minute, M : marqueur de masse moléculaire et bp : paires de bases.

Parallèlement, lorsque ces mêmes échantillons sont soumis à une digestion par la MBN à l'exception du contrôle non-traité, il est observé un profil électrophorétique similaire. Bien que délicate à déterminer compte tenu de l'hétérogénéité du poids moléculaire des fragments au sein des bandes observées, il apparaît toutefois une réduction de la masse moléculaire de ceux-ci plus importante que celle observée lors du seul emploi de l'ExoIII, semblant alors attester de la présence de structures simple-brins aux extrémités des fragments issus de la digestion par ExoIII. Enfin, observons également la disparition de la bande de 250 pb, argument en faveur de l'hypothèse formulée précédemment.

Toujours dans le cadre d'une expérience de correction génique épisomale ayant pour cible le plasmide peGFPLucMut mais dans laquelle les fragments réparateurs ont été utilisés au ratio 1/5, nous avons évalué le potentiel correcteur de l'ensemble des fragments ainsi produits. Les résultats de cette expérience sont présentés en Figure 75 où il n'apparaît pas d'accroissement des niveaux d'activité luciférase générés lorsque sont utilisés les fragments modifiés par l'ExoIII comparé à l'échantillon contrôle non-traité mais seulement une légère baisse pour les incubations les plus longues. Le traitement par l'ExoIII des échantillons de fragments pour les dotés d'extrémités 5' dépassantes ne semble pas améliorer l'efficacité de correction génique.

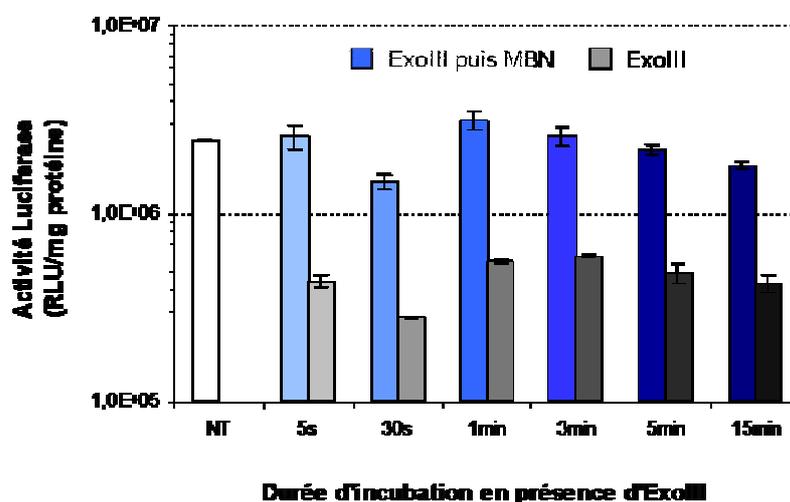


Figure 75. Effet de la longueur des extrémités 5' dépassantes des fragments d'ADN double-brins sur l'efficacité de correction génique.

Efficacités de correction génique épisomale après transfection des cellules HEK293T par le plasmide cible peGFPLucMut et les fragments dsDNA-Luc 1000 Rep (ratio molaire 1/5) digérés par ExoIII pendant des temps d'incubation variables (conditions $t=5s$ à $t=15min$) ou en l'absence de traitement (NT) suivie ou non d'une digestion par la MBN.

Cependant, compte tenu de la dégradation globale des fragments qui semble accompagner la formation des extrémités 5' dépassantes, il ne peut être exclu que leur potentiel correcteur soit augmenté, mais parce que présents en moins grand nombre, ils n'ont pu permettre l'obtention d'efficacités de correction génique supérieures à celle générée par le fragment contrôle non-traité. D'ailleurs, lorsque ces mêmes fragments sont traités par la MBN, il est observé des niveaux d'activité luciférase réduits d'un facteur 5 environ pour chacun des échantillons comparé à leurs homologues non-traités par la MBN. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse précédemment émise dans laquelle l'essentiel du potentiel correcteur des fragments contenus dans nos échantillons traités par l'ExoIII serait supporté par la présence de fragments à extrémités 5' dépassantes.

Toutefois, si l'utilisation de l'exonucléase III semble permettre la création de longues extrémités 5' dépassantes au sein de fragments d'ADN double-brins au potentiel correcteur alors accru, il est important de rappeler que les efficacités de correction génique n'ont pu être augmentées et ce probablement en raison de la délicate modification des fragments. Pour ces raisons, il fut alors envisagé de produire ces fragments grâce à d'autres méthodes, notamment par l'hybridation de longs fragments d'ADN simple-brins complémentaires uniquement au niveau de leurs extrémités 3'.

1.2 - Utilisation de fragments d'ADN simple-brins

1.2.1 - Utilisation de fragments d'ADN double-brins dénaturés

Comme précisé dans l'introduction lors de la présentation des fragments d'ADN double-brins en tant qu'agents correcteurs, ceux-ci sont parfois utilisés dénaturés par un chauffage à 95°C suivi d'un rapide refroidissement à 4°C. Le mélange des fragments d'ADN simple-brin complémentaires ainsi généré permettrait l'obtention d'efficacités de correction génique accrues. Nous avons souhaité nous aussi évaluer cette approche. Utilisant alors le fragment dsDNA-eGFPLuc 500 Rep dénaturé ou non selon les conditions décrites précédemment dans le cadre d'une expérience de correction génique épisomale ciblant le plasmide peGFPLucMut, il apparaît alors les résultats présentés en Figure 76. Ceux-ci montrent que les deux types de fragments génèrent, pour chaque ratio molaire testé, des efficacités de correction génique similaires, qui varient tout au plus de 30% entre les deux types de fragments pour un même

ratio molaire. Au regard de ces résultats, il ne semble pas que la dénaturation des fragments double-brins permette l'obtention d'efficacités de correction génique plus importantes. Toutefois, il n'a pas été confirmé l'effectif état dénaturé des fragments soumis au protocole qui peuvent, et ce à plus forte raison pour des courts fragments comme le fragment de 500 pb utilisé dans cette expérience, se réhybrider et ainsi régénérer le fragment d'origine.

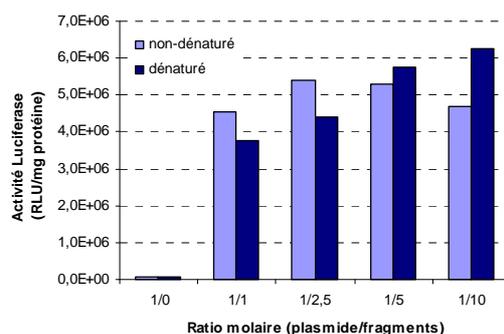


Figure 76. Efficacités de correction génique de fragments d'ADN double-brins dénaturés.

Efficacités de correction génique épisomale après transfection des cellules HEK293 par le plasmide cible peGFPLucMut et les fragments dsDNA-eGFPLuc 500 Rep (ratio molaire 1/10) sous sa forme double-brin (non-dénaturé) ou à l'état de mélange de fragments simple-brins (dénaturé).

1.2.2 - Utilisation de fragments d'ADN simple-brins produits par PCR asymétrique

Comme rapporté dans l'introduction, l'utilisation de fragments d'ADN simple-brins pour la correction génique permet d'obtenir des efficacités de correction parfois accrues comparées à l'utilisation de fragments d'ADN double-brins. A ce jour, les techniques utilisées pour les synthétiser sont laborieuses et onéreuses. L'une d'entre elles nécessite la construction d'autant de phagemides que de fragments à synthétiser. Après production dans un système procaryote et purification, ils doivent être par la suite digérés et purifiés sur gel pour en libérer les fragments d'intérêt. De plus, la digestion nécessite l'usage d'oligodéoxynucléotides en grande quantité pour recréer une structure double-brin au niveau des sites de restriction enzymatique. Pour en témoigner, seul le laboratoire du Professeur Kamiya utilise cette technique. Une autre technique consiste, après production d'un fragment par PCR en utilisant un oligomère amorce biotinyllé, en la capture sélective d'un des deux brins par des techniques de chromatographie d'affinité. Face à constat, nous avons cherché à produire des fragments d'ADN simple-brins destinés à être utilisés en tant qu'agent réparateur par un procédé plus aisé et plus rapide à

mettre en œuvre. Notre choix s'est arrêté sur un mode de production par PCR asymétrique. Utilisant comme matrice un fragment double-brin produit par les méthodes conventionnelles (digestion enzymatique ou PCR), cette technique permet la synthèse en grande quantité de fragments d'ADN simple-brins de même longueur que le fragment double-brin. Le produit final de la réaction de PCR asymétrique ne contenant d'ailleurs qu'une faible proportion (quelques pourcents) du fragment double-brin d'origine, il n'est pas strictement nécessaire de le purifier sur gel. Cette technique a été utilisée pour produire des fragments d'ADN simple-brins sens ou antisens de 1 ou 2,4 kb en utilisant respectivement comme fragments double-brins d'origine les fragments dsDNA-eGFPLuc 1000 et dsDNA-eGFPLuc 2200 et les amorces oligodéoxynucléotidiques correspondantes (voir Tableau 7).

Tableau 7. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN simple-brins.

Nom du fragment d'ADN simple-brin	Oligodéoxynucléotide utilisé	Matrice amplifiée	Longueur (b)	Type d'agent correcteur
ssDNA-eGFPLuc 1000 S Ctr	F1000	dsDNA-eGFPLuc 1000 Ctr	980	Contrôle
ssDNA-eGFPLuc 1000 S Rep	F1000	dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep	980	Réparateur
ssDNA-eGFPLuc 1000 AS Ctr	R1000	dsDNA-eGFPLuc 1000 Ctr	980	Contrôle
ssDNA-eGFPLuc 1000 AS Rep	R1000	dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep	980	Réparateur
ssDNA-eGFPLuc 2200 S Ctr	F2200	dsDNA-eGFPLuc 2200 Ctr	2133	Contrôle
ssDNA-eGFPLuc 2200 S Rep	F2200	dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep	2133	Réparateur
ssDNA-eGFPLuc 2200 AS Ctr	R2200	dsDNA-eGFPLuc 2200 Ctr	2133	Contrôle
ssDNA-eGFPLuc 2200 AS Rep	R2200	dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep	2133	Réparateur

Après vérification de la synthèse d'ADN simple-brin au poids moléculaire attendu par électrophorèse sur gel d'agarose comme illustré dans la Figure 77 pour les fragments correcteurs sens et antisens de 2200 bases, l'ensemble des fragments générés a été purifié.

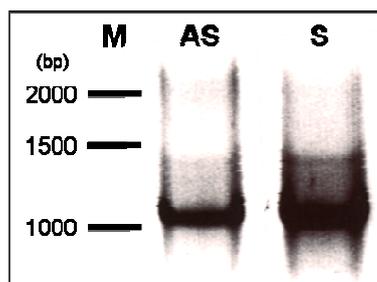


Figure 77. Electrophorégramme des produits de PCR asymétrique.

Electrophorégramme montrant les produits des PCR asymétriques obtenus lors de la production des fragments simple-brins de 2200 bases d'orientation sens (S) et antisens (AS) à partir du fragment d'ADN double-brin dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep. M : marqueur de masse moléculaire, bp : paires de bases.

Alors inclus dans le protocole de correction génique épisomale ciblant le plasmide peGFPLucMut, ces fragments simple-brins ont été testés au ratio molaire 1/10 et comparés à leurs homologues double-brins. Les résultats de cette expérience sont présentés en Figure 78. Contrairement aux résultats obtenus par le Professeur Kamiya, il apparaît des efficacités de correction génique voisines pour les fragments double-brins et simple-brins de 1000 et 2400 nucléotides de long avec seulement un léger accroissement du niveau d'activité luciférase lorsqu'est utilisé le fragment antisens de 2400 bases comparé à son homologue sens.

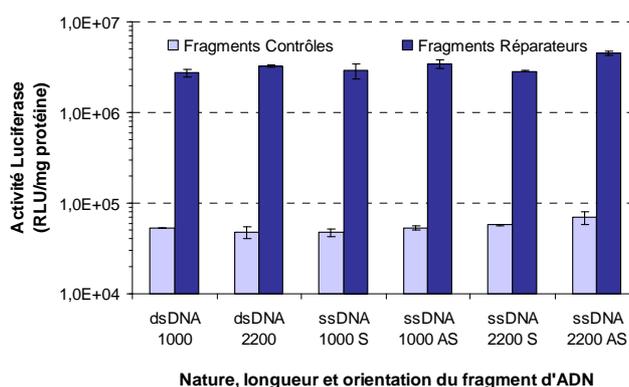


Figure 78. Efficacités de correction génique des fragments d'ADN simple-brins.

Efficacités de correction génique épisomale après transfection des cellules HEK293T par le plasmide cible peGFPLucMut et les fragments dsDNA-eGFPLuc 1000, dsDNA-eGFPLuc 2200, ssDNA-eGFPLuc 1000 S, ssDNA-eGFPLuc 1000 AS, ssDNA-eGFPLuc 2200 S et ssDNA-eGFPLuc 2200 AS, tous utilisés au ratio molaire 1/10. dsDNA : ADN double-brin, ssDNA : ADN simple-brin, 1000 et 2400 : longueur du fragment en bases ou paires de bases, S : brin sens et AS : brin antisens.

Toutefois, bien qu'il n'ait pas été observé de différence substantielle entre les efficacités de correction génique générés par des fragments double-brins ou simple-brins de séquence sens et antisens, ce qui peut être d'ailleurs être du à d'autres facteurs, notamment la séquence utilisée, il n'en reste pas moins intéressant qu'il semble désormais possible d'utiliser ce mode de synthèse pour la production d'agents correcteurs simple-brins sens ou antisens. Si ceux-ci ne génèrent pas d'efficacités de correction génique accrues lorsqu'utilisés sous cette forme, il pourrait être employés par exemple pour permettre la production de fragments à longues extrémités dépassantes en hybridant des ADN simple-brins complémentaires uniquement au niveau de l'une de leurs extrémités.

1.3 - Utilisation d'oligodéoxynucléotides modifiés

Pour faire suite à cette série de développements apportés à la synthèse de fragments d'ADN, nous avons également tenté de modifier la nature physico-chimique des oligodéoxynucléotides à des fins d'efficacités de correction génique plus importantes.

1.3.1 - Utilisation d'oligonucléotides modifiés par inclusion de résidus LNA

Plusieurs types de modification ont été apportés aux oligodéoxynucléotides utilisés dont l'introduction de résidus de type LNA (*locked nucleic acid*), résidu présentant une plus forte affinité pour l'ADN que l'ADN lui-même. Cela se traduit par exemple par une augmentation de la stabilité d'un appariement mettant en jeu deux séquences d'ADN complémentaires incluant un ou plusieurs résidus LNA, ces deux séquences pouvant être par exemple l'oligodéoxynucléotide réparateur et son brin d'ADN cible. Dans ces circonstances, il peut être espéré que si l'association de l'agent réparateur et de sa cible est plus stable, ce qui pourrait se traduire par une durée d'association plus longue, l'efficacité de correction génique soit alors plus importante. D'ailleurs, lorsque ces travaux furent initiés dans notre laboratoire, il était déjà démontré qu'il était possible, chez la levure, d'augmenter l'efficacité de correction génique en utilisant des oligodéoxynucléotides modifiés par l'introduction de résidus de type LNA. Nous avons alors testé dans un premier temps deux oligodéoxynucléotides modifiés par des résidus LNA, le premier (ssODN-eGFPLuc45 LNA4r AS Rep) présentant 4 résidus LNA répartis tout au long de la séquence de l'oligodéoxynucléotide ssODN-eGFPLuc45 PO AS

Rep, le second (ssODN-eGFPLuc45 LNA4.4 AS Rep) en présentant 4 regroupés à chacune des deux extrémités de la même séquence (Tableau 8).

Tableau 8. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins modifiés par des résidus LNA.

Nom de l'oligomère (ssODN-)	Longueur (pb)	Brin ciblé	Nature des extrémités	Séquence oligodéoxynucléotidique (5'-3')	Type d'agent
eGFPLuc45 PS AS Rep	45	AS	PS	<u>ttctgtgattgtattcagcccatatcgtttcatagcttctgcca</u>	Rep
eGFPLuc45 LNA 4r AS Rep	45	AS	PO	ttctgTgattTgtattcagcccatatcgtttcataGcttcTgcca	Rep
eGFPLuc45 LNA 4.4 AS Rep	45	AS	PO	TTCTgtgattgtattcagcccatatcgtttcatagcttctGCCA	Rep
eGFPLuc45 LNA 1.1 AS Rep	45	AS	PO	TtctgtgattgtattcagcccatatcgtttcatagcttctgccA	Rep

Légende : AS, antisens, PO, phosphodiester, PS, phosphorothioate, Rep, réparateur. La position de mutation est représentée en gras, les nucléotides liés par un lien phosphorothioate sont représentés soulignés, les résidus LNA sont représentés en majuscules.

Les expériences conduites avec ces deux agents réparateurs n'ont pas produits les résultats attendus. Lorsque comparé à l'oligodéoxynucléotide utilisé comme référence dans nos études (ssODN-eGFPLuc45 PS AS Rep), il n'a pas été observé d'augmentation significative de l'efficacité de correction génique. Entre temps, Jean-Paul Concordet et ses collaborateurs démontrent l'efficacité supérieure des oligodéoxynucléotides modifiés par des résidus LNA pour la correction génique chez les mammifères, notamment avec un oligodéoxynucléotide présentant 1 résidu LNA à chaque extrémité [Andrieu-Soler, et al., 2005]. Nous avons alors souhaité tester la même configuration sur nos oligodéoxynucléotides (ssODN-eGFPLuc45 LNA1.1 AS Rep) et contrôler l'effective augmentation de la température de fusion des oligodéoxynucléotides modifiés. Les résultats de cette étude sont présentés ci-après. Lorsque les oligodéoxynucléotides modifiés par l'inclusion de résidus LNA sont comparés à l'oligodéoxynucléotide de référence dans le cadre d'expérience de correction génique épisomale visant à corriger le plasmide peGFPLucMut et au regard de leur température de fusion, il apparaît tout d'abord une réduction d'un facteur 3 de l'efficacité de correction génique lorsqu'est employé l'oligodéoxynucléotide modifié par 4 résidus dispersés (Figure 79) alors que sa température de fusion se trouve augmentée de 4°C (Figure 80 et Tableau 9).

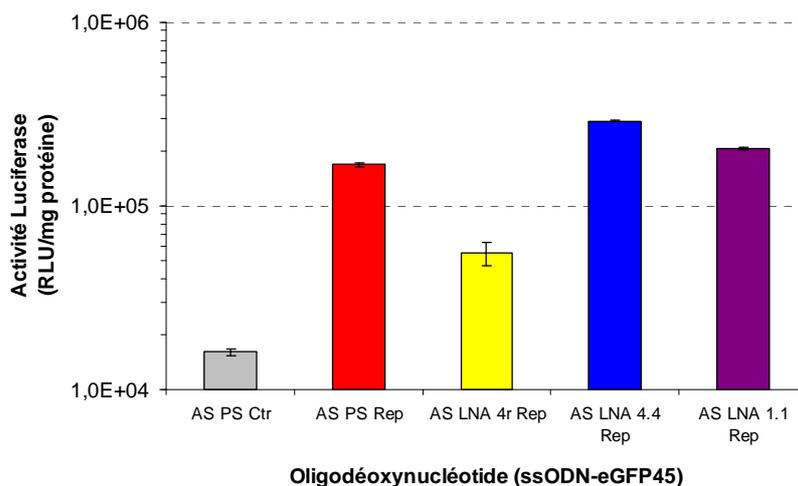


Figure 79. Efficacités de correction génique des oligodéoxynucléotides modifiés par des résidus LNA.

Efficacités de correction génique épisomale après transfection des cellules HEK293T par le plasmide cible peGFPLucMut et les oligodéoxynucléotides présentés dans le Tableau 8. La codification colorimétrique correspond également à celle utilisée pour la Figure 80.

Lorsque l'oligodéoxynucléotide flanqué de 4 résidus LNA à chaque extrémité est utilisé, il est alors obtenu une efficacité de correction génique accrue d'un facteur 2 alors que sa température de fusion n'est pas beaucoup plus augmentée que celle de son homologue à 4 résidus dispersés. Il semble donc que la position des résidus LNA au sein de la séquence affecte l'efficacité de correction génique. Leurs positionnements vers des positions internes semblent altérer le processus de réparation tandis que leurs rejets aux extrémités semblent être une configuration favorable. Enfin, lorsque l'oligodéoxynucléotide flanqué d'un seul résidu LNA à chaque extrémité est utilisé, on obtient une efficacité de correction génique comparable à celle obtenue avec l'oligodéoxynucléotide de référence. Toutefois, il convient d'observer que sa température de fusion n'est pas augmentée, probable raison de l'absence de gain d'efficacité.

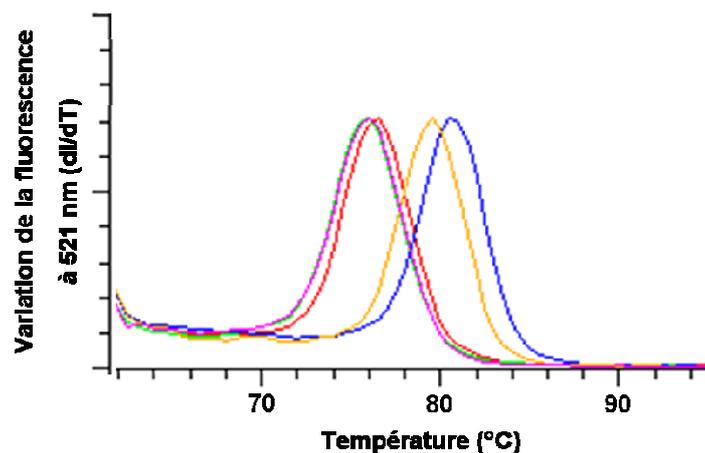


Figure 80. Courbe de dissociation des oligodéoxynucléotides modifiés par des résidus LNA.

Après mélange des oligodéoxynucléotides avec un fragment d'ADN simple-brin complémentaire, les hétéroduplex formés sont chauffés de 60 à 98°C par incrément de 0,2°C toutes les 30 secondes. A chaque palier de température, l'absorbance à 521 nm est mesurée, valeur rendant compte de la quantité d'agent intercalant (Sybr Safe) intercalé au sein de structure double-brins. Le graphique présenté montre les variations d'absorbance à 521 nm par rapport à la température (dI/dT), courbes à partir desquelles sont évaluées les températures de fusion des oligodéoxynucléotides testés. La codification colorimétrique des courbes de dissociation correspond à celle utilisée pour la Figure 79 : ssODN-eGFPLuc 45 AS PS Rep (violet), ssODN-eGFPLuc 45 AS LNA 4r Rep (jaune), ssODN-eGFPLuc 45 AS LNA 4.4 Rep (bleu) et ssODN-eGFPLuc 45 AS LNA 1.1 Rep (rouge).

Oligodéoxynucléotides	Température de fusion (°C)
ssODN-eGFPLuc45 AS PS Rep	75
ssODN-eGFPLuc45 AS LNA 4r Rep	79
ssODN-eGFPLuc45 AS LNA 4.4 Rep	80
ssODN-eGFPLuc45 AS LNA 1.1 Rep	75,5

Tableau 9. Température de fusion des oligodéoxynucléotides modifiés par des résidus LNA.

Au vu de ces résultats, il semble effectivement possible d'augmenter l'efficacité de correction génique en incluant des résidus LNA au sein de l'oligodéoxynucléotide réparateur. Il convient toutefois de veiller à les inclure en des positions les plus externes possibles tout en confirmant expérimentalement l'effective augmentation de la température de fusion de l'oligodéoxynucléotide ainsi généré.

2 - Conditionnement cellulaire

Si la nature physico-chimique ou la topologie des acides nucléiques réparateurs peut être modifiée de façon à ce que l'agent réparateur soit plus efficacement administré jusqu'au noyau des cellules ou qu'il interagisse plus aisément avec ses partenaires (ADN cible de la réparation, protéines de la réparation) pour qu'il s'ensuive une réparation plus efficace, l'état physiologique des cellules au moment du traitement peut lui aussi avoir un impact sur les mécanismes de réparation et par conséquent sur l'efficacité de correction génique. Comme présenté dans l'introduction, il semble que le positionnement au sein du cycle cellulaire affecte l'efficacité de correction génique qui serait plus importante quand les cellules sont en phase S. Aussi, la genèse d'un dommage à l'ADN ou la réponse de type « dommages à l'ADN » qu'il engendre affecte favorablement l'efficacité de correction génique.

Il peut donc sembler judicieux, en outre de faire usage d'agents réparateurs optimisés, de conditionner les cellules à traiter de façon à ce qu'elles soient les plus permissives possibles pour la correction génique lors du traitement. Dans l'étude qui suit, plusieurs stratégies ont été évaluées.

2.1 - Essai de synchronisation de la population cellulaire en phase S

Comme présenté dans les Figures 37 et 38, il est observé des efficacités de correction génique épisodique accrues lorsque les cellules sont traitées à une faible densité cellulaire (10%) comparé à des densités plus importantes et ceci est également observé avec d'autres lignées cellulaires (HEK293 et HCT116). L'hypothèse avancée pour tenter d'expliquer ce phénomène serait que, dans ces conditions de culture, la population serait constituée d'une plus importante proportion de cellules activement prolifératives se traduisant par un enrichissement de population en cellules en phase S. Il fut alors tenté de générer des populations cellulaires enrichies en cellules en phase S en synchronisant la population en arrêtant les cellules en phase G1 par privation de sérum puis en levant le blocage par la remise en culture en présence de sérum. Les tentatives de synchronisation se sont avérées infructueuses. Après ensemencement et incubation en présence de sérum pendant 12 heures, les cellules sont cultivées 24, 48 et 72 heures en absence de sérum. Les résultats (Figure 81) ne montrent qu'une très faible accumulation des cellules en phase G1 lorsque les cellules sont incubées 24 et 48 heures sans sérum (30, 45 et 46% respectivement pour les populations non-

traitée (A), enrichie après 24 heures (B) et 48 heures(C)). Après 72 heures dans les mêmes conditions de culture (E), il apparaît d'une façon surprenante un effondrement de la proportion de cellules en phase G1 (11%) et une accumulation des cellules dans les phases S et G2/M (47 et 42% respectivement). Toutefois, il est également observé le même type de distribution pour une population incubée 72 heures en présence de sérum (D). Au vu de ces résultats, il semble difficile de considérer que nous sommes en mesure d'efficacement synchronisé les populations cellulaires à traiter. De plus, ces résultats sont difficilement reproductibles. Pour ces raisons, cette étude n'a pas été poursuivie.

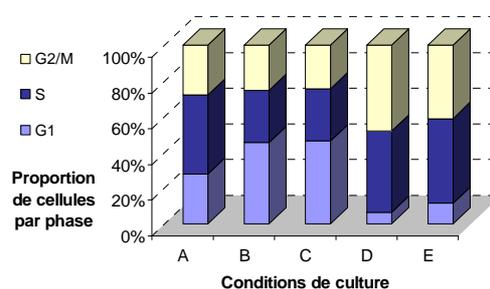


Figure 81. Evolution du cycle cellulaire en condition sans sérum.

Après ensemencement, les cellules HEK293T sont cultivées 48 h en présence de sérum (A), 48 h dont les 24 h dernières en absence de sérum (B), 48 h en absence de sérum (C), 72 h en présence de sérum (D) ou 72 h en absence de sérum (E) puis les cellules sont analysées en cytométrie en flux au regard de leur contenu en matériel génétique après marquage à l'iodure de propidium.

2.2 - Utilisation d'agents causant des dommages à l'ADN

Dans l'introduction, il est fait mention de l'usage de composés pharmacologiques causant des dommages à l'ADN pour améliorer l'efficacité de correction génique. Ceux-ci ont été montrés comme activant certaines voies de réparation et comme perturbant le cycle cellulaire au sein duquel il est alors observé une plus forte proportion de cellules en phase S. Si leur usage s'est étendu aux différentes stratégies de correction génique existantes (oligodéoxynucléotides, fragments d'ADN et vecteurs rAAV), il n'est pas rapporté de substances pharmacologiquement actives améliorant les efficacités de correction génique des trois stratégies abordées dans nos études autres que les composés très toxiques que sont l'étoposide ou l'hydroxyurée. Pour cette raison, nous avons recherché des molécules susceptibles d'induire un dommage à l'ADN ou d'activer une réponse de type « dommages à l'ADN » et en avons comparé les effets sur l'efficacité de correction génique de chacun des trois agents

correcteurs utilisés dans nos travaux. Parmi les composés testés, on compte le chlorure de doxorubicine, la phléomycine, la thymine dinucléotide ainsi qu'un oligomère nommé Télo9.

2.2.1 - Utilisation de la doxorubicine

Le chlorure de doxorubicine, ou doxorubicine (Dox) également appelé adriamycine, correspond à la forme hydroxylée de la daunorubicine, un antibiotique appartenant à la famille des anthracyclines et produit par *Streptomyces peucetius*. Identifiée dès les années 50 pour ses propriétés antitumorales, son usage s'est élargi aux traitements de nombreux cancers (leucémies, lymphome de Hodgkin, myélome multiple, cancers du sein, du poumon, etc...).

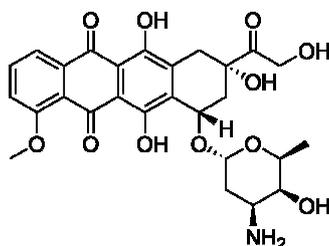


Figure 82. Structure chimique du chlorure de doxorubicine.

Bien qu'entachée d'une cardiotoxicité notable, son usage perdure aujourd'hui pour le traitement de nombreux types de cancers sous sa forme native ou sous des formes modifiées par liaison à des résidus facilitant sa diffusion dans certains tissus ou favorisant sa capture par certains types cellulaires. Elle est décrite pour liée l'ADN par intercalation et pour inhiber les topoisomérases de type II d'une façon empêchant le rescellement des deux brins d'ADN clivés pour libérer l'hélice de ses contraintes d'enroulement. Dans ces circonstances, la transcription peut-être empêchée par la conformation inadéquate de l'ADN et la réplication est perturbée par la rencontre des polymérases et du complexe ternaire ADN-TopoII-doxorubicine qui conduit au détachement de ce dernier sans rescellement des deux brins d'ADN clivés, générant alors des cassures double-brins de l'ADN, lésions du génome connues pour fortement activer des réponses de type « dommages à l'ADN ».

Les effets d'un conditionnement cellulaire par la doxorubicine sur les efficacités de correction génique des trois agents réparateurs que sont l'oligomère ssODN-eGFP 35 PO AS Rep, le fragment d'ADN double-brins dsDNA-eGFP 700 Rep et le vecteur rAAV-eGFPLuc utilisés

pour corriger la mutation portée par le gène meGFP ont été évalués. Tout d'abord, dans le cadre d'expériences de correction génique épisomale réalisées avec des cellules HEK293T préincubées 24 heures en présence de différentes concentrations de doxorubicine, il apparaît pour chacun des trois agents réparateurs des efficacités de correction génique croissantes avec la concentration en doxorubicine jusqu'à 30 nM, concentration au-delà de laquelle l'efficacité de correction génique décroît (Figure 83). A la concentration de 30 nM, un gain d'un facteur 3 environ est observé pour les trois stratégies.

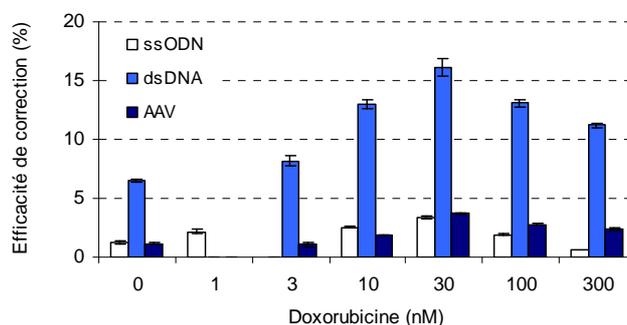


Figure 83. Efficacités de correction génique épisomale après incubation avec la doxorubicine.

Après ensemencement, les cellules HEK293T sont cultivées 24 h en présence de doxorubicine aux concentrations indiquées puis sont transfectées par le plasmide pmeGFP et les agents réparateurs ssODN-eGFP35 PO AS Rep ou dsDNA-SeGFP 700 rep, ou infectées par le vecteur rAAV-eGFPLuc.

Nous avons poursuivi cette étude avec des expériences de correction génique chromosomale réalisées avec le clone CHO-meGFP 12. Après prétraitement à la concentration de 30 nM, il apparaît également des efficacités de correction génique accrues. Les résultats de cette expérience (Figure 84) montrent des gains d'un facteur 5, 2,7 et 1,5 pour les agents réparateurs de type oligodéoxynucléotides, fragments d'ADN et vecteurs rAAV respectivement.

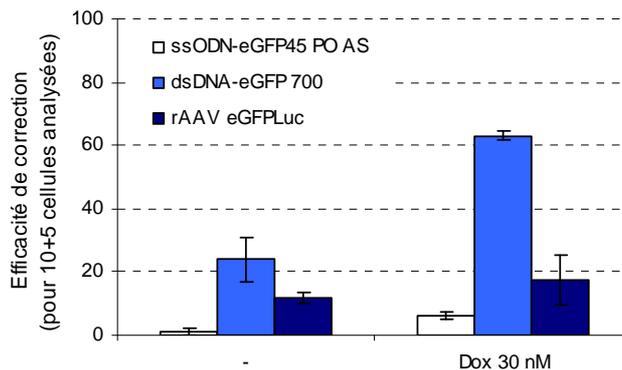


Figure 84. Efficacités de correction génique chromosomale après incubation avec la doxorubicine.

Les cellules CHO-meGFP 12 sont cultivées 24 h en présence de 30 nM de doxorubicine puis sont nucléofectées par les agents réparateurs ssODN-eGFP35 PO AS Rep ou dsDNA-SeGFP 700 rep, ou infectées par le vecteur rAAV-eGFPLuc.

Enfin, l'impact d'une préincubation de 24 heures en présence de 30 nM de doxorubicine sur la distribution des cellules au travers du cycle cellulaire a été mesuré. Les résultats présentés en Figure 85 font apparaître une très forte accumulation des cellules en phase G2/M (86%) comparé à une population cellulaire cultivée sous les mêmes conditions mais en absence de doxorubicine. Notons d'ailleurs que logiquement, dans ces circonstances, la proportion de cellules en phase S se trouve réduite.

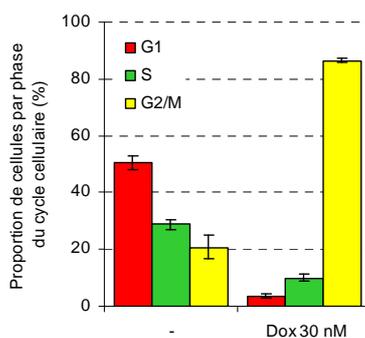


Figure 85. Analyse de la distribution des cellules par phase du cycle cellulaire après incubation avec la doxorubicine.

Après ensemencement, les cellules HEK293T sont cultivées 24 h en présence de 30 nM de doxorubicine puis sont analysées en cytométrie en flux au regard de leur contenu en matériel génétique après marquage à l'iode de propidium.

2.2.2 - Utilisation de la phléomycine

La phléomycine est un glycopeptide aux propriétés antibiotiques. Il appartient à la famille des bléomycines dont son représentant majeur est la bléomycine, substance produite par *Streptomyces verticillus* et découverte dans les années 60. La bléomycine est largement utilisée comme agent antitumoral. Bien que son mode d'action soit mal connu, il semble qu'elle s'intercale dans l'hélice d'ADN, perturbant alors la transcription, et qu'elle induise le clivage d'un ou des deux brins de l'hélice d'ADN suite à la formation de radicaux libres de l'oxygène qu'elle provoque. La phléomycine dérive de la bléomycine par la modification d'une amine terminale qui semble fortement impacter sur ses activités biologiques. Son activité antitumorale est réduite alors que ses propriétés antibiotiques sont conservées, faisant d'elle une substance essentiellement utilisée par le passé pour le traitement d'infections microbiennes (bactéries, champignons). Aujourd'hui, son usage est limité à des fins de recherche expérimentale notamment pour la sélection de transformants résistants à la phléomycine.

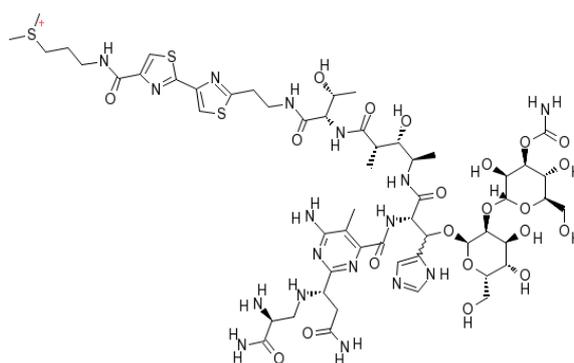


Figure 86. Structure chimique de la phléomycine.

Les effets d'un conditionnement cellulaire par la phléomycine sur les efficacités de correction génique des trois agents réparateurs ont été évalués selon la même méthodologie que pour la doxorubicine. Dans le cadre d'expériences de correction génique épisomale après une préincubation de 24 heures en présence de différentes concentrations subtoxiques de phléomycine, il apparaît tout d'abord des efficacités de correction génique croissantes avec la concentration en phléomycine jusqu'à la concentration maximale testée pour les agents réparateurs ssODN et rAAV, affichant alors un gain d'un facteur 5 environ comparé à la condition contrôle. Lors de l'usage de fragments d'ADN double-brins, il apparaît également des efficacités de correction génique accrues. Toutefois, le maximum d'induction est observé

pour une concentration de 6,5 μM avec un gain inférieur à ceux observés pour les deux autres types d'agents réparateurs. Précisons toutefois qu'au travers de plusieurs expériences de ce type (non-présentées), il est apparu que la concentration de 33 μM générait les gains les plus importants. Au-delà de ces concentrations, l'efficacité de correction génique décroît (Figure 87) jusqu'à retrouver des valeurs voisines de celles observés en l'absence de phléomycine.

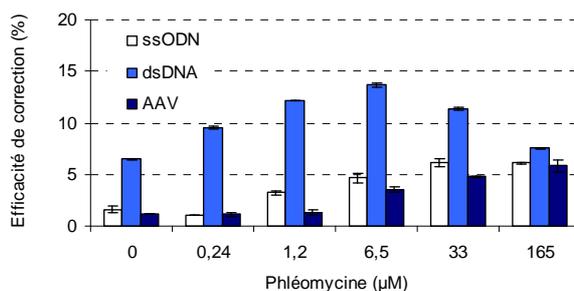


Figure 87. Efficacités de correction génique épisomale après incubation avec la phléomycine.

Après ensemencement, les cellules HEK293T sont cultivées 24 h en présence de phléomycine aux concentrations indiquées puis sont transfectées par le plasmide pmeGFP et les agents réparateurs ssODN-eGFP35 PO AS Rep ou dsDNA-SeGFP 700 rep, ou infectées par le vecteur rAAV-eGFPLuc.

La phléomycine fut alors utilisée dans le cadre d'expériences de correction génique chromosomale à la concentration de 33 μM . Les résultats présentés en Figure 88 font apparaître des efficacités de correction génique fortement accrues en présence de phléomycine. Des gains d'un facteur 6, 4 et 10 pour les agents réparateurs de type oligodéoxynucléotides, fragments d'ADN et vecteurs rAAV respectivement sont observés.

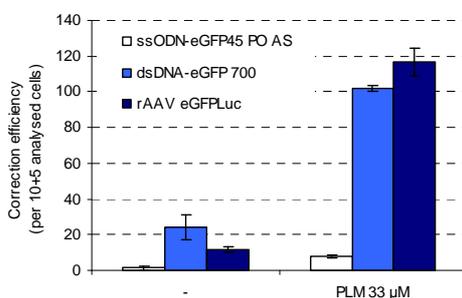


Figure 88. Efficacités de correction génique chromosomale après incubation avec la phléomycine.

Les cellules CHO-meGFP 12 sont cultivées 24 h en présence de 33 μM de phléomycine puis sont nucléofectées par les agents réparateurs ssODN-eGFP35 PO AS Rep ou dsDNA-SeGFP 700 Rep, ou infectées par le vecteur rAAV-eGFPLuc.

Enfin, comme pour la doxorubicine, l'impact du conditionnement par la phléomycine sur la distribution des cellules au travers du cycle cellulaire a également été sondé. Une fois encore, il est observé une forte accumulation des cellules en phase G2/M (60%) avec toutefois une proportion de cellules en phase S inchangée (Figure 89).

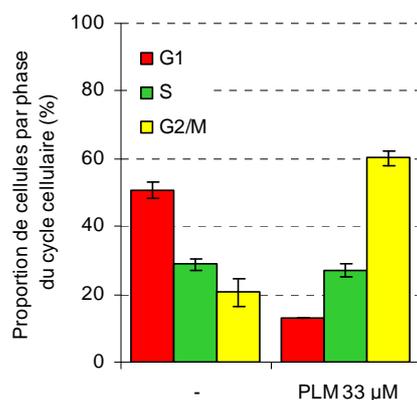


Figure 89. Analyse de la distribution des cellules par phase du cycle cellulaire après incubation avec la phléomycine.

Après ensemencement, les cellules HEK293T sont cultivées 24 h en présence de 33 μ M de phléomycine puis sont analysées en cytométrie en flux au regard de leur contenu en matériel génétique après marquage à l'iodure de propidium.

2.2.3 - Utilisation de la thymidine dinucléotide et de l'oligomère pTélo

Pour faire suite à l'usage de composés pharmacologiques induisant, entre autres, des dommages à l'ADN susceptibles d'engendrer un état physiologique particulier favorable à la correction génique, il fut envisagé d'utiliser des composés permettant non pas l'induction de lésions au sein de la chromatine mais uniquement l'activation des mécanismes de réparation en réponse à ces dommages. Parmi ces derniers, la thymidine dinucléotide 5' phosphate (pTpT) et l'oligomère pTélo (de séquence pGpApGpTpApTpGpApG en partie complémentaire à l'extrémité 3' dépassante des télomères) se présentent comme de bons candidats. La thymidine dinucléotide 5' phosphate, petite molécule non-toxique, est décrite comme activant la plupart des réponses cellulaires engendrées suite à une irradiation aux UV et comme favorisant la réparation de l'ADN suite à cette irradiation [Hadshiew, et al., 2001]. Entre autre, la thymidine dinucléotide active la mélanogenèse, arrête transitoirement le cycle cellulaire en phase S et régule positivement l'expression de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. L'oligomère pTélo est décrit comme présentant les mêmes activités que

la thymidine dinucléotide 5' phosphate [Hadshiew, et al., 2001]. Ces deux molécules ont été utilisées pour activer les mécanismes de réparation tout en s'affranchissant de générer des dommages à l'ADN.

Le conditionnement des cellules par ces deux substances fut alors réalisé de diverses manières. Dans un premier temps, les cellules ont été incubées en présence de pTpT ou de pTélo à des concentrations allant de 1 à 100 μM et pendant des durées d'incubation décrites pour observer les effets escomptés (de 1 à 5 jours). Toutefois, ce mode de préincubation nécessite de grandes quantités de pTpT ou de pTélo. Pour cette raison, ces dernières molécules, qui sont des acides nucléiques, ont également été administrées par transfection d'une façon concomitante à l'administration des acides nucléiques cible et réparateur. Des expériences de correction génique épisomale ont alors été réalisées avec ces cellules conditionnées dans le cadre soit de la correction de la mutation portée par le plasmide peGFPLuc par le fragment d'ADN double-brins dsDNA-Luc 500 Rep, soit de la correction de la mutation portée par le plasmide pmeGFP par l'oligodéoxynucléotide ssODN-eGFP PO AS Rep. Dans aucun des cas, il n'a été observé de modification de l'efficacité de correction génique épisomale excepté pour les cellules préincubées 5 jours en présence des agents pTpT et pTélo. Dans cette expérience, il apparaît une réduction de l'efficacité de correction génique d'environ un facteur 2 quand est utilisé le fragment d'ADN double-brins et ce, quelque soit l'agent pharmacologique testé et la concentration utilisée (Figure 90). Lorsque l'agent réparateur est un oligodéoxynucléotide, des résultats similaires sont observés, bien que moins prononcés (Figure 91).

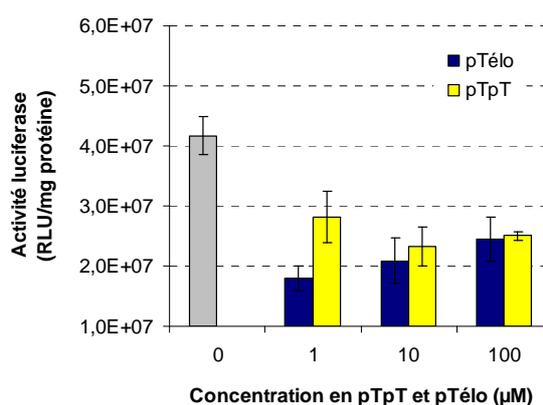


Figure 90. Efficacités de correction génique épisomale d'un fragment d'ADN double-brin après incubation des cellules avec les agents pTpT et pTélo.

Les cellules HEK293T sont cultivées 4 jours en présence de pTpT ou de pTélo aux concentrations précisées puis sontensemencées pour la réalisation d'une expérience de correction génique épisomale. Après ensemencement,

les cellules sont cultivées 24 heures en présence de pTpT ou de pTélo puis sont transfectées par le plasmide peGFPLucMut et le fragment dsDNA-eGFPLuc 500 Rep (ratio 1/10).

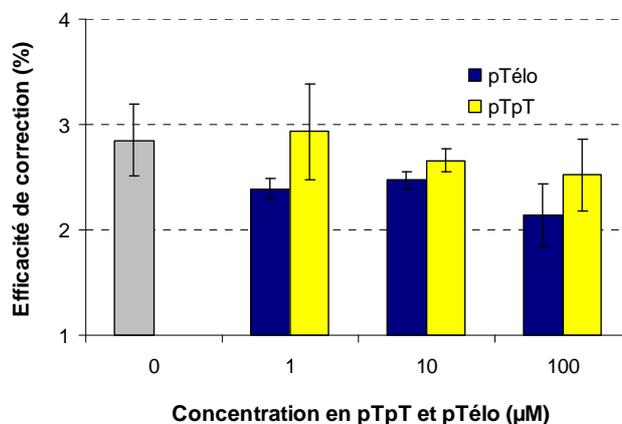


Figure 91. Efficacités de correction génique épisomale d'un oligodéoxynucléotide après incubation des cellules avec les agents pTpT et pTélo.

Les cellules HEK293T sont cultivées 4 jours en présence de pTpT ou de pTélo aux concentrations précisées puis sontensemencées pour la réalisation d'une expérience de correction génique épisomale. Après ensemencement, les cellules sont cultivées 24 heures en présence de pTpT ou de pTélo puis sont transfectées par le plasmide pmeGFP et l'oligodéoxynucléotide ssODN-eGFP 35 PO AS Rep (ratio 1/100).

Au regard de ces résultats négatifs, nous n'avons pas poursuivi ces travaux par l'étude des effets de ces composés pharmacologiques dans le cadre d'expériences de correction génique chromosomale.

DISCUSSION

Lorsque ces travaux ont été initiés en 2004, peu de laboratoires réalisaient des expériences de correction génique en vue de leur application future à des fins thérapeutiques. Les quelques publications relatives à ce sujet émanaient principalement des laboratoires de Dieter Gruenert (San Francisco, USA) pour l'utilisation de fragments d'ADN, des laboratoires de Kyonggeun Yoon (Philadelphie, USA) et d'Eric Kmiec (Newark, USA) pour l'utilisation d'oligodéoxynucléotides et de chimères ADN-ARN et du groupe de David Russell (Seattle, USA) pour l'utilisation de vecteurs rAAV. Chacune de ces équipes se focalisait sur l'optimisation et la compréhension de leur approche sans chercher à comparer leur système aux autres. En fait, les comparaisons se faisaient de manière indirecte, en comparant simplement les fréquences de réparation obtenues. Mais comme le gène ciblé, le type cellulaire utilisé, les conditions d'administration employées, les méthodes d'analyses utilisées différaient entre ces laboratoires, les conclusions de ces comparaisons reposaient sur des bases fragiles.

Il nous semblait donc particulièrement important d'initier un travail permettant d'évaluer l'efficacité des 3 principaux systèmes de réparation en utilisant les mêmes conditions expérimentales. Après avoir effectué ce travail, et compte tenu des faibles fréquences de correction génique obtenues, nous avons tenté d'optimiser ces stratégies de correction génique en modifiant la nature des agents correcteurs ou en stimulant les mécanismes de réparation de l'ADN pouvant être impliqués dans le processus de correction génique.

I - Evaluation de stratégies de correction génique

1 - Correction génique épisomale

Pour comparer le plus fidèlement possible les efficacités de correction génique à un niveau épisomal des trois agents correcteurs étudiés, à savoir des oligodéoxynucléotides simple-brin, des grands fragments d'ADN double-brins ou des vecteurs rAAV, nous avons tout d'abord développé un premier système d'évaluation basé sur l'utilisation du gène de la luciférase muté et fusionné en 5' avec le gène codant l'eGFP. Lorsqu'il est utilisé dans le cadre d'expériences de correction génique épisomale, ce système permet d'évaluer la proportion de plasmides cibles corrigés par la mesure de l'activité luciférase générée et de déterminer l'efficacité de transfection avec laquelle l'agent réparateur et sa cible sont administrés dans le noyau des

cellules par la mesure de la proportion de cellules exprimant l'eGFP. Ce dernier point est non des moindres car il permet de s'assurer que l'ensemble des agents correcteur a été administré avec une même efficacité, ce qui fut fait dans l'ensemble des expériences présentées.

Avec ce système, lorsque des grands fragments d'ADN double-brins sont utilisés pour corriger le gène cible, il apparaît des efficacités de correction croissantes avec la masse d'agent correcteur administré et augmentant avec la longueur de l'homologie qu'il partage avec la cible comme il a pu déjà l'être démontré par Capecchi. Toutefois, tandis que ce dernier démontre que l'efficacité augmente exponentiellement avec la taille du fragment jusqu'à une longueur d'environ 15 kpb lorsqu'il est microinjecté dans le noyau [Deng and Capecchi, 1992], nous avons en revanche observé, lorsque les fragments sont transfectés, une corrélation linéaire, reliant la taille du fragment à l'efficacité de correction, limitée à des fragments de 1 kb et moins. Au delà de cette longueur de fragments, l'efficacité de correction continue d'augmenter mais dans des proportions inférieures à ce que prévoit la corrélation établie avec les autres fragments. Ce résultat n'est pas totalement surprenant. En effet, une des étapes limitantes du transfert d'acides nucléiques par transfection est leur import dans le noyau, lequel peut être réalisé lors de la rupture de la membrane nucléaire en mitose mais également par diffusion au travers des pores nucléaires pour des fragments de moins de 1 kpb [Hagstrom, et al., 1997]. Ceci étant, il existe donc une limite d'exclusion au delà de laquelle les plus grands fragments sont moins efficacement délivrés dans le noyau, ce qui se traduit par la réduction du gain observé dû à l'allongement du fragment pour des fragments de plus de 1 kpb. En revanche, dans le cas de fragments microinjectés dans le noyau, cette limite n'existe évidemment pas et l'administration des fragments est homogène quelles que soient leurs longueurs, raison des résultats obtenus par Capecchi.

Lorsque ce même système a été utilisé pour l'évaluation des efficacités de correction génique des oligodéoxynucléotides simple-brins, il est également apparu des efficacités de correction augmentant avec la quantité d'agent correcteur administré. Toutefois, il a été observé des efficacités légèrement réduites pour les masses d'oligodéoxynucléotides les plus importantes alors que pour de mêmes masses de fragments d'ADN double-brins, l'efficacité de correction génique continue d'augmenter. Il semble alors que le transfert des agents correcteurs jusqu'au noyau ne soit pas un élément aussi limitant dans le mécanisme de correction épisomal par des oligodéoxynucléotides qu'il peut l'être avec des fragments d'ADN double-brins mais aussi que l'administration de trop importantes quantités d'oligodéoxynucléotides puissent réduire l'efficacité de correction génique. Il a également été observé des efficacités de correction

accrues lorsque les oligodéoxynucléotides sont protégés à leurs extrémités par des liens phosphorothioates et cela quelle que soit la longueur de l'oligomère, celui de 45 nucléotides générant des efficacités de correction supérieures à son homologue de 35 nucléotides. Notons pour finir qu'avec ce système, les oligomères de séquence antisens ciblant le brin non-transcrit permettent d'obtenir des efficacités de correction supérieures à celles générées par leurs homologues de séquence sens, semblant confirmer l'existence d'un biais de brin sans qu'il puisse être établi que ce biais de brin soit lié à la transcription du gène cible.

Enfin, lorsque des vecteurs rAAV2.1, dont la taille totale du génome garantit que les particules virales utilisées ne contiennent qu'un génome simple-brin, sont utilisés pour le transfert d'une séquence correctrice de 2,4 kb, il apparaît des efficacités de correction génique croissant avec la multiplicité d'infection jusqu'à une multiplicité d'infection de 30 000 au delà de laquelle l'efficacité de correction cesse d'augmenter. Notons d'ailleurs que ces résultats ont été obtenus lorsque l'étape d'infection suit l'étape de transfection alors que dans le cas d'une cinétique inversée, aucune correction n'a été observée. Ces résultats sont surprenants et difficile à expliquer. Une hypothèse consisterait à considérer que les vecteurs rAAV et les complexes transfectants, empruntant tous deux une même voie d'entrée dans la cellule par endocytose et se libérant de l'endosome par des mécanismes similaires, entreraient en compétition et que dans le cas où l'étape d'infection précède l'étape de transfection, le système endosomal soit « saturé » par les vecteurs rAAV et qu'il ne puisse plus permettre une transfection efficace dans les quelques heures qui suivent l'infection.

Si l'on rapproche ces trois groupes de données comparables, il apparaît pour les conditions optimales d'utilisation de chacun des agents correcteurs testés des efficacités de correction génique au minimum 10 fois supérieures lorsque les fragments d'ADN double-brins ou les vecteurs rAAV sont utilisés comparées aux efficacités de correction obtenues avec les oligodéoxynucléotides simple-brins.

Pour compléter cette étude comparative des efficacités de correction relatives des différents agents testés, nous avons développé un second système d'évaluation, basé sur l'utilisation du gène *eGFP* muté, permettant de déterminer la proportion de cellules au sein desquelles des événements de correction ont eu lieu (cellules eGFP+) ainsi que d'évaluer l'intensité de la réparation au sein des cellules corrigées (traduit par l'intensité moyenne de fluorescence). Il apparaît alors avec ce système des fréquences de correction génique d'environ 2% assorties d'intensités de réparation d'environ 200 avec des oligodéoxynucléotides simple-brins.

Ceux-ci d'ailleurs, lorsqu'ils sont protégés à leurs extrémités par des liens phosphorothioates, génèrent des efficacités de correction à peine supérieures à celles obtenues avec des oligomères non-protégés. Lorsque des fragments d'ADN double-brins de 700 pb sont utilisés pour la correction, 8% des cellules sont corrigées avec une intensité de réparation d'environ 400, soit une efficacité de correction 8 fois plus importante que ne génère l'utilisation d'oligomères simple-brins. Il est également observé un accroissement de la fréquence de correction lorsque la longueur de l'homologie est augmentée à 4 kb dans les proportions attendues pour des fragments de plus de 1 kpb. Plus intéressant est l'observation faite que la présence d'une grande région non-homologue flanquée à une extrémité de la région correctrice du fragment n'affecte pas l'efficacité de correction. En effet, il aurait pu être attendu que, dépassant le seuil des 1 kpb, ce fragment génère des efficacités de correction réduites comparées au fragment de 700 pb or ce n'est pas le cas. Il est alors difficile de proposer une explication à ce résultat, d'autant que, ce fragment ne présentant qu'une seule extrémité libre homologue avec la cible, l'efficacité de l'étape d'appariement des brins peut s'en voir elle aussi affectée. Pour finir, les fréquences de correction génique maximales obtenues avec un vecteur rAAV2.1, homologue aux 700 pb du gène ciblé et utilisé à une multiplicité d'infection de 100 000, sont de l'ordre de 1,5% assorties d'intensité de réparation d'environ 200. Ces efficacités de correction sont en deçà de celles obtenues avec un fragment d'ADN double-brins présentant la même longueur d'homologie et par conséquent de celles attendues étant observé avec le système d'évaluation précédent que des fragments d'ADN et des vecteurs rAAV présentant une même homologie pour leur cible produisent des résultats comparables. Pour expliquer ce résultat, il eût pu être pensé que cela ait pu être dû à la présence de particules ayant encapsidées un génome viral double-brin décrit comme permettant une réparation moins efficace mais les résultats similaires obtenus avec une préparation de vecteurs exemptes de ces formes de génomes viraux et présentant la même longueur homologue montre d'une manière étonnante l'absence de biais dû à cette contamination dans nos expériences de correction génique épisomale. Il semble alors que la réduction de la longueur de l'homologie affecte d'une façon plus prononcée l'efficacité de correction dans le cadre de l'utilisation d'un vecteur rAAV que dans celui d'un fragment d'ADN double-brin.

2 - Correction génique chromosomale

Si l'emploi des systèmes d'évaluation de l'efficacité de correction à un niveau épisomal s'avère utile pour valider la fonctionnalité des agents correcteurs produits, il n'en reste pas moins nécessaire d'évaluer le potentiel correcteur de ces agents dans des conditions plus proches que celles rencontrées dans un contexte thérapeutique notamment celles où les cibles à corriger sont portées par les chromosomes. Il fût alors entrepris de générer par transfection stable des lignées cellulaires contenant les cassettes d'expression mutées intégrées au sein des chromosomes en vue de leur utilisation pour l'évaluation des efficacités de correction génique à un niveau chromosomal. L'absence d'informations précises dans la littérature quant aux conditions requises pour la génération de ces lignées et la sélection des clones utilisés pour ce type d'expérimentation a rendu ce travail laborieux. Celui-ci ne fût accompli que lorsque qu'un ensemble de dispositions ont été réunies, telles que l'emploi de techniques de transfert d'acides nucléiques optimisées de type électrotransfert (nucléofection) pour le cas des oligodéoxynucléotides ou des fragments d'ADN, l'utilisation de grandes quantités d'agent correcteur, le maintien d'une pression de sélection ou bien encore l'utilisation de clones cellulaires ayant intégrés un grand nombre de copies du gène cible à corriger.

Avec ce système, dans des conditions optimisées pour chacun des agents correcteurs testés, à savoir des oligomères de séquence antisens non-protégé de 35 nucléotides, des fragments d'ADN double-brins de 700 pb et les vecteurs rAAV précédemment utilisés, il est respectivement observé des fréquences de correction génique de $2 \cdot 10^{-5}$, $2,4 \cdot 10^{-4}$ et $1,2 \cdot 10^{-4}$, soit une hiérarchie des efficacités de correction comparables à celle observée dans la comparaison des efficacités de correction d'un épisode. Notons encore une fois l'existence d'un facteur dix, en faveur du fragment d'ADN, entre les efficacités de correction des deux acides nucléiques nucléofectés. Le vecteur rAAV quant à lui, utilisé à des multiplicités d'infection augmentées comparées aux conditions d'infection pour la correction épisomale, génère comme précisé des efficacités de correction intermédiaires aux deux autres agents testés et cela indépendamment du vecteur utilisé (rAAV-SeGFP et rAAV-eGFPLucMut) comme observé dans les expériences de correction génique épisomales. Une fois encore, ces résultats sont surprenants compte-tenu des observations rapportées par ailleurs quant à la moindre efficacité de correction des génomes viraux double-brins [Hirata and Russell, 2000] et nous ne pouvons l'expliquer.

Par la suite, nous avons montré que chacune des trois approches permet d'obtenir une correction « stable » des populations de cellules traitées comme en témoignent les études du suivi de la fréquence de correction au cours du temps et de la survie des cellules corrigées ainsi que les clichés photographiques montrant la transmission clonale, bien qu'hétérogène, du phénotype corrigé au sein de clones développés à partir d'une cellule corrigée. Il est cependant important de noter que la première analyse de la fréquence de correction fût réalisée au cinquième jour après le traitement et qu'il n'est par conséquent ni possible de statuer quant au mode transmission de la correction lors des premières divisions cellulaires, ni quant à la fréquence de survie réduite ou au retard de croissance des cellules corrigées pendant les premiers jours d'incubation comme il a pu l'être rapporté par d'autres équipes [Engstrom and Kmiec, 2007, Radecke, et al., 2004].

Toutefois, il convient d'observer que la fréquence des événements de recombinaison non-homologue n'a pas été déterminée dans cette étude. Ce point est important car il conditionne la réelle efficacité de correction dans la mesure où dans le cadre d'une approche thérapeutique, les stratégies générant le meilleur ratio recombinaison homologue / recombinaison non-homologue seront privilégiées. Précisons à ce titre que si la méthode de transfert influence la fréquence de correction génique et que les approches de type électroporation permettent d'obtenir des fréquences plus élevées, il n'apparaît pas pour des cellules CHO de différences entre les fréquences de recombinaison non-homologue obtenues quelle que soit la méthode de transfert utilisée (transfection ou électroporation) [Nairn, et al., 1993, Waldman, et al., 1996]. Dans ces circonstances, le choix d'une approche de transfert de type électroporation pourrait être envisagée pour les agents correcteurs à base d'acides nucléiques. Il reste toutefois très difficile de réaliser un choix entre les deux agents correcteurs testés (oligomères ou fragments double-brins) compte tenu qu'aucune donnée n'est disponible quant aux événements de réparation non désirés générés par des oligodéoxynucléotides simple-brins et que nous n'avons pas non plus déterminé les fréquences de recombinaison non-homologue de ces outils. Concernant l'utilisation de vecteurs rAAV, les mêmes précautions que pour les autres agents correcteurs doivent être prises avec peut-être cependant une attention particulière aux sites d'intégration du génome rAAV. En effet, lors d'une expérience de correction génique avec des vecteurs rAAV chez la souris, il a été montré que les génomes rAAV s'intégraient en un locus particulier du génome murin et pouvaient, en le dérégulant, conduire à la formation d'hépatocarcinomes [Donsante, et al., 2007]. Dans ces circonstances, il convient d'être vigilant non seulement au regard du nombre d'intégrations

aléatoires mais également au regard de leurs sites d'intégrations, bien que ces considérations ne soient pas exclusives de l'utilisation de vecteurs rAAV ou des approches de correction génique mais plutôt générales aux techniques de transfert quelles qu'elles soient, virales ou non-virales.

II - Optimisation de stratégies de correction génique

1 - Optimisation des agents correcteurs

Dans le cadre des expériences visant à accroître le potentiel réparateur des agents correcteurs de type fragments d'ADN double-brins, nous avons tout d'abord montré que le mode de synthèse, par digestion enzymatique d'un ADN plasmidique ou par amplification par PCR, n'affecte pas l'efficacité de correction génique. Ces résultats divergent de ceux rapportés par Kamiya montrant une meilleure correction lorsque les fragments sont produits par digestion enzymatique [Tsuchiya, et al., 2005]. Toutefois, le gain qu'il obtient est faible et il peut être supposé que la qualité accrue de nos fragments produits par deux phases d'amplification ménagée soit à l'origine des bons résultats produits par nos fragments d'ADN double-brins. Par la suite, nous avons souhaité favoriser l'interaction du fragment d'ADN correcteur avec les protéines RPA ou Rad51, impliquées dans l'étape d'échanges de brins, en leur offrant un substrat pour lesquelles elles sont plus affines, à savoir des duplexes ADN à extrémités simple-brin dépassantes. Nous avons tout d'abord montré que la présence d'extrémités 5' ou 3' dépassantes de quelques nucléotides au sein du fragment correcteur n'affecte pas l'efficacité de correction. En revanche, il semble que la présence de longues extrémités 5' dépassantes puisse augmenter le potentiel correcteur d'un fragment d'ADN double-brin, bien que compte tenu des difficultés à produire ce type de fragment, nous n'ayons pu augmenter dans l'absolu les fréquences de correction génique. Ces résultats ne sont pas surprenants et confirment en partie ceux de Kamiya montrant une réparation accrue avec des fragments d'ADN simple-brins présentant une queue 3' double-brin [Tsuchiya, et al., 2008]. Enfin, nous avons montré, comme Kamiya, que des grands fragments d'ADN simple-brin peuvent également être utilisés pour introduire des modifications ciblées au sein d'un gène [Tsuchiya, et al., 2005]. Toutefois, à la différence de celui-ci, nous n'avons pas observé de différence d'efficacité entre les formes double-brins et simple-brins, entre les brins sens et antisens et entre les fragments simple-brins de différentes longueurs. Cependant, ces résultats ne contredisent pas nécessairement ceux de Kamiya étant donné que, comme il le suggère lui-même, les structures secondaires adoptées par les différents fragments simple-brins sont probablement différentes et qu'elles affectent différemment l'efficacité de la réparation par ce type de fragments, rendant alors peu comparables ces résultats.

En complément des optimisations pouvant être apportées aux fragments d'ADN, nous avons évalué l'impact sur l'efficacité de correction de l'inclusion de résidus de type LNA au sein des oligodéoxynucléotides simple-brins utilisés. Comme déjà observé par Jean-Paul Concordet [Andrieu-Soler, et al., 2005], nous avons montré que l'utilisation d'oligomères modifiés à leurs extrémités par des résidus LNA permet d'augmenter l'efficacité de correction génique, bien que ce ne soit pas toujours le cas ou seulement dans de moindres proportions. Cependant, il est apparu au travers de l'étude des températures de fusion des oligomères testés que l'inclusion de résidus LNA ne conduit pas systématiquement à une élévation significative de la température de fusion, expliquant alors nos résultats et suggérant qu'il conviendrait de choisir les positions des résidus LNA sur la base d'une étude thermodynamique en excluant les positions trop internes ayant montré que cette configuration contribue à réduire l'efficacité de correction.

2 - Conditionnement cellulaire

Pour compléter cette étude des optimisations pouvant être apportées aux stratégies de correction génique étudiées, nous avons tenté de stimuler les mécanismes cellulaires de la réparation de l'ADN pour qu'ils participent plus activement aux réactions de correction génique. Parmi les stratégies envisagées, seules celles impliquant l'utilisation de substances induisant des dommages à l'ADN ont permis d'observer des efficacités de correction accrues.

Nous avons pu montrer que le prétraitement des cellules par la doxorubicine, un inhibiteur des topoisomérases de type II qui induit des cassures double-brins, provoque un fort enrichissement de la population en cellules en phase G2 et permet d'augmenter d'environ un facteur trois l'ensemble des efficacités de correction génique à un niveau épisomal et chromosomal. Nous avons également montré qu'un prétraitement par la phléomycine, un glycopeptide antibiotique produisant des effets similaires à la doxorubicine, permet d'observer des efficacités de correction accrues comparables à celles obtenues avec la doxorubicine, à l'exception de l'efficacité de correction chromosomale par un vecteur rAAV qui se voit augmentée d'un facteur dix. Sans qu'il puisse être apporté plus d'informations quant aux mécanismes impliqués pour chacun des trois agents correcteurs dans l'obtention de ces efficacités accrues, il reste cependant intéressant d'observer d'une part que chacune des deux substances utilisées a induit un même effet sur le cycle cellulaire et d'autre part, que les efficacités de correction ont été augmentées dans des proportions comparables et à de mêmes

concentrations d'utilisation de la doxorubicine ou de la phléomycine dans chacun des trois cas. Ceci tendrait à suggérer l'implication d'un mécanisme partagé par chacun des trois agents correcteurs comme par exemple leurs interactions avec les protéines RPA ou Rad51 impliquées dans chacune de voies de réparation de ces trois agents correcteurs. Toutefois, ayant observé un effet particulièrement prononcé lorsque des cellules prétraitées par la phléomycine sont infectées par les vecteurs rAAV, il peut être également pensé qu'un autre mécanisme contribue, en sus de celui suggéré précédemment, à l'obtention des efficacités de correction fortement augmentées dans ce dernier cas.

Notons pour finir que la fréquence des événements de recombinaison non-homologue n'a pas été déterminée dans cette étude bien que celle-ci puisse être augmentée lorsque des cassures double-brins sont introduites au sein du génome [Sargent, et al., 1997]. Ces dernières peuvent, en plus de favoriser la recombinaison non-homologue en des sites aléatoires, introduire des mutations au sein du génome [Sargent, et al., 1997]. Dans ces circonstances, comme il l'a été dit lors de la comparaison des efficacités de correction génique à un niveau chromosomal, il convient de rappeler qu'il n'est pas réellement possible de statuer quant au potentiel de ces approches sans prendre en compte le ratio recombinaison homologue/recombinaison non-homologue ainsi que le potentiel mutagène de chacune de ces approches.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis d'évaluer les efficacités de correction génique des trois types d'agents correcteurs les plus fréquemment utilisés. Il ressort de cette étude que les fragments d'ADN double-brins et les vecteurs rAAV permettent d'obtenir les fréquences de correction génique les plus importantes, tandis que les oligodéoxynucléotides simple-brins non-protégés ne produisent que des résultats médiocres. Il apparaît également que l'utilisation de la doxorubicine ou de la phléomycine peut être envisagée pour augmenter les efficacités de correction de chacune de ces stratégies.

Au regard de ce constat, il apparaît alors nécessaire de poursuivre l'optimisation de ces stratégies de correction génique. Tout d'abord, il peut être envisagé de favoriser les interactions de la séquence d'ADN donneuse avec les différents partenaires cellulaires de la correction. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la correction et des interactions de l'agent correcteur avec son environnement, par exemple du vecteur avec les mécanismes de réparation de l'ADN, serait souhaitable de manière à pouvoir développer des agents correcteurs susceptibles d'interagir avec les partenaires cellulaires favorables à la correction et d'éviter leurs interactions avec ceux la limitant. Aussi, le développement de protocole visant à limiter les activités cellulaires de recombinaison non-homologue doit être poursuivi de façon à en limiter les conséquences ainsi que celui d'agents correcteurs ne pouvant pas être intégrés aléatoirement dans le génome ou à de plus faibles fréquences comme il semble être le cas avec des fragments d'ADN présentant des didéoxynucléotides à leurs extrémités 3' [Chang and Wilson, 1987] ou avec des vecteurs dérivés de l'adénovirus dans certains tissus [Isman, et al., 2008, Mitani, et al., 1995] ou comme il pourrait être le cas avec des ADN simple-brins (oligomères ou fragments) [Zorin, et al., 2005]. Enfin, il conviendrait également d'évaluer le potentiel mutagène (autres modifications non désirées) de ces approches de correction génique dans la mesure où il représente également une limite quant à leur utilisation à des fins thérapeutiques.

Un autre axe d'étude, représenté par les approches visant à favoriser la présence des facteurs cellulaires impliqués dans la correction en introduisant une cassure double-brin au sein du gène cible (cas de l'utilisation de nucléases à doigt de zinc et des méganucléases), mérite tout particulièrement d'être exploré étant donné le potentiel avéré de ces stratégies [Chamberlain, et al., 2004] mais n'est pas sans implication. En effet, compte tenu que la spécificité de ces nucléases n'est pas absolue, des cassures peuvent être introduites en d'autres points du

génomique. Pour les limiter, il serait souhaitable de poursuivre le développement de ces nucléases ainsi que de proposer une stratégie permettant une administration efficace de la nucléase au sein du noyau mais limitée à la phase de traitement.

Enfin, compte tenu du fort impact de la méthode de transfert sur l'efficacité de correction, de la difficulté à appliquer des techniques de type électrotransfert à la plupart des situations cliniques et des dispositions particulières des vecteurs viraux à efficacement transférer leur génome au sein du noyau, il serait intéressant de développer d'autres vecteurs viraux susceptibles de permettre la correction d'un gène et qui pourrait ouvrir la voie à d'autres applications que celles envisageable pour l'heure avec des vecteurs rAAV. D'ailleurs, cette tendance peut déjà s'observer avec l'utilisation de vecteurs dérivés de l'adénovirus ou du lentivirus humain HIV-1 [Cornu and Cathomen, 2007, Isman, et al., 2008, Lombardo, et al., 2007] et d'ailleurs, nous-même avons initié un projet en collaboration avec le Professeur Jean-Christophe Pagès visant à développer un vecteur rétroviral dérivé du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMLV) pour la correction génique.

MATERIELS ET METHODES

I - Matériels biologiques et réactifs

1 - Culture cellulaire

Les lignées cellulaires HEK293 (cellules rénales embryonnaires humaines), HEK293T (cellules HEK293 transformées par l'antigène T du virus simiesque SV40), MRC-5 (fibroblastes pulmonaires humains), MRC-5V2 (fibroblastes pulmonaires humains transformés par l'antigène T du virus simiesque SV40), HCT116 (cellules d'un carcinome colorectal humain) et CHO-K1 (cellules ovariennes de hamster chinois) ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Tissue and Cell Collection, USA) et sont cultivées dans un milieu de culture standard composé du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 4,5 g/l de glucose et 1 mM de pyruvate de sodium, additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes, de 2mM de L-glutamine, de 100 U/ml de pénicilline et de 100 µg/ml streptomycine. Lorsque précisé, le milieu de culture standard peut être additionné de 600 µg/ml de sulfate de généticine pour la sélection des clones dérivés des lignées HEK293 et CHO-K1, de chlorure de doxorubicine, de phléomycine, de thymidine dinucléotide ou de l'oligomère pTélo dilués extemporanément aux concentrations précisées dans du milieu de culture standard. Les cultures cellulaires sont entretenues en culture en flasques de 75 cm² ventilées et incubées dans une enceinte thermostatée à 37°C, dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO₂. Le passage des cellules est réalisé tous les 3 jours. La quantité de cellules à ensemercer est calculée pour assurer une reprise rapide de la croissance ainsi que pour éviter l'obtention d'une culture à confluence avant le passage suivant, assurant ainsi le maintien en permanence de toute la population cellulaire en phase exponentielle de croissance. Seules des cultures cellulaires présentant un nombre de passages inférieur à 15 et exemptes de mycoplasmes ont été utilisées dans nos études.

2 - Constructions plasmidiques

2.1 - Plasmide pEGFPLucMut

Il s'agit d'un dérivé du plasmide pEGFPLuc (6367 pb) commercialisé par Clontech (Palo Alto, USA) dans lequel une mutation ponctuelle non-sens T963G conduisant au remplacement d'un codon tyrosine TAT par un codon stop ambre TAG en amont de la séquence codant le site catalytique de la luciférase a été introduite par mutagenèse dirigée à

l'aide du kit Quick Change site-directed mutagenesis de Stratagene et du couple d'amorces oligonucléotidiques
 mutLuc-F : 5'-TGGCAGAAGCTATGAAACGATAgGGGCTGAATACAAATCACAGAA-3' et
 mutLuc-R : 5'-TTCTGTGATTTGTATTTCAGCCCCcTATCGTTTCATAGCTTCTGCCA-3'
 en respectant les recommandations du fabricant. Une représentation schématique du plasmide et de ses éléments biologiques est proposée en Figure 92.

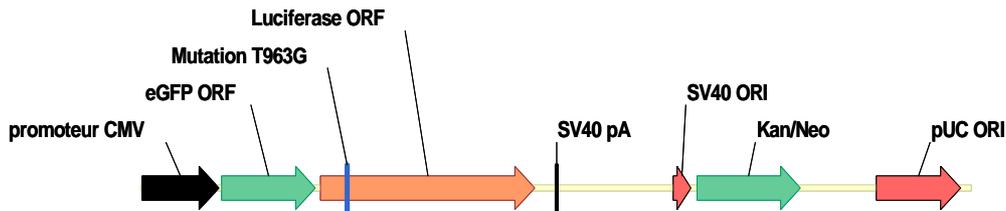


Figure 92. Représentation schématique du plasmide peGFPLucMut.

De 5' en 3' : promoteur du cytomégalo virus humain (CMV), gène de fusion eGFP::Luciférase composé du cadre de lecture ouvert du gène eGFP (eGFP ORF, *eGFP open reading frame*) fusionné en phase avec le cadre de lecture ouvert du gène luciférase (Luciférase ORF) et qui présente en position 963 la mutation T963G introduisant un codon stop, signal de polyadénylation (SV40 pA) et origine de réplication (SV40 ORI) du virus simiesque SV40, gène de résistance à la kanamycine et à la néomycine (Kan/Neo) et origine de réplication bactérienne de type pUC.

2.2 - Plasmide pmeGFP

Le plasmide pmeGFP dérive du plasmide peGFP-C1 (4731 pb) commercialisé par Clontech (Palo Alto, USA) dans lequel deux mutations ponctuelles ont été introduites par mutagenèse dirigée à l'aide du kit Quick Change site-directed mutagenesis de Stratagene et du couple d'amorces oligonucléotidiques mutGFP-F : 5'-CCCGTGCCCTaGCCaACCCTCGTGAC-3' et mutGFP-R 5'-GTCACGAGGGTtGGCtAGGGCACGGG-3'. La première mutation (G173A, codon tryptophane TGG → codon stop ambre TAG) introduit un codon stop en amont de la séquence codant la région chromophore de la GFP tandis que la seconde (C177A, codon proline CCC → codon proline CCA) est une mutation silencieuse. Une représentation schématique du plasmide et de ses éléments biologiques est proposée en Figure 93.

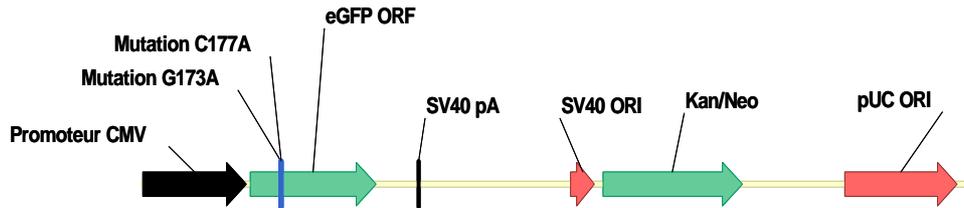


Figure 93. Représentation schématique du plasmide pmeGFP.

De 5' en 3' : promoteur du cytomégalo virus humain (CMV), cadre de lecture ouvert du gène eGFP (eGFP ORF, *eGFP open reading frame*) présentant en position 173 la mutation G173A introduisant un codon stop et en position 177 la mutation silencieuse C177A, signal de polyadénylation (SV40 pA) et origine de réplication (SV40 ORI) du virus simiesque SV40, gène de résistance à la kanamycine et à la néomycine (Kan/Neo) et origine de réplication bactérienne de type pUC.

2.3 - Plasmide pSeGFP

Le plasmide pSeGFP (4731 pb) a été généré par l'introduction de la mutation ponctuelle silencieuse C177A (introduite au sein du plasmide pmeGFP) au sein du plasmide pGFP-C1 par mutagenèse dirigée à l'aide du même kit que précédemment et du couple d'amorces oligonucléotidiques mutSeGFP-F : 5'-CCCGTGCCCTGGCCaACCCTCGTGAC-3' et mutSeGFP-R 5'-GTCACGAGGGTtGGCCAGGGCACGGG-3'. Une représentation schématique du plasmide et de ses éléments biologiques est proposée en Figure 94.

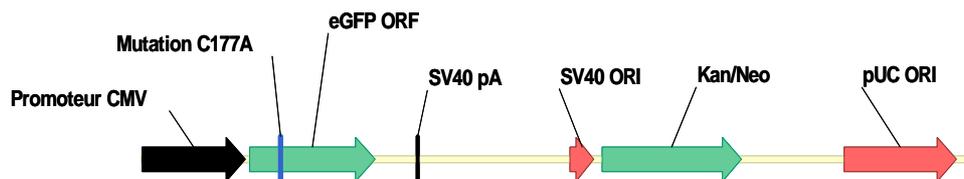


Figure 94. Représentation schématique du plasmide pSeGFP.

De 5' en 3' : promoteur du cytomégalo virus humain (CMV), cadre de lecture ouvert du gène eGFP (eGFP ORF, *eGFP open reading frame*) présentant uniquement en position 177 la mutation silencieuse C177A, signal de polyadénylation (SV40 pA) et origine de réplication (SV40 ORI) du virus simiesque SV40, gène de résistance à la kanamycine et à la néomycine (Kan/Neo) et origine de réplication bactérienne de type pUC.

2.4 - Plasmide pAAV-eGFPLuc

Il s'agit d'un dérivé du plasmide pSMD2-Luc. Ce dernier a été digéré par l'enzyme de restriction XbaI pour libérer un fragment (fragment vecteur) de 4 kpb contenant l'ensemble des séquences permettant la réplication du plasmide en système procaryote et la sélection des transformants ainsi que, à chaque extrémité du fragment les séquences ITR (*inverted terminal repeat*) de l'AAV-2. Parallèlement, le plasmide peGFPLuc a été digéré par les enzymes de restriction NheI et XbaI pour libérer un fragment (fragment insert) de 2,4 kpb contenant le cadre de lecture ouvert codant la protéine de fusion eGFP::Luciférase. Le fragment insert purifié par électrophorèse sur gel d'agarose a ensuite été sous-cloné par ligation avec le fragment vecteur pour générer le plasmide pAAV-eGFPLuc (6467 pb). Une représentation schématique du plasmide et de ses éléments biologiques est proposée en Figure 95.

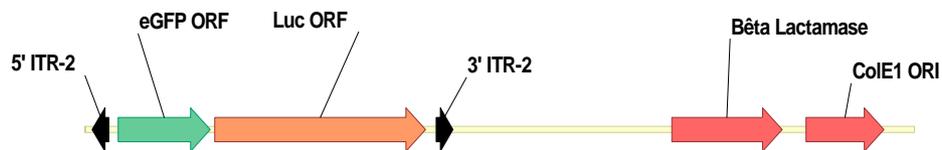


Figure 95. Représentation schématique du plasmide pAAV-eGFPLuc.

De 5' en 3' : répétition inversée terminale de l'AAV-2 (5'ITR-2), gène de fusion eGFP::Luciférase composé du cadre de lecture ouvert du gène eGFP (eGFP ORF) fusionné en phase avec le cadre de lecture ouvert du gène luciférase (Luciférase ORF), répétition inversée terminale de l'AAV-2 (3'ITR-2), gène de résistance à l'ampicilline codant une β -Lactamase (Bêta Lactamase) et origine de réplication bactérienne de type ColE1 (ColE1 ORI).

2.5 - Plasmide pAAV-SeGFP

Le plasmide pAAV-SeGFP (4865 pb) dérive du plasmide pAAV-eGFPLuc dans lequel le fragment EagI-XbaI a tout d'abord été excisé. Pour ce faire, le plasmide pAAV-eGFPLuc a été digéré séquentiellement par les enzymes de restriction EagI puis XbaI puis les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose pour isoler et purifier le fragment XbaI-EagI de 4,9 kbp, lequel a ensuite été ligaturer sur lui-même. Enfin, la mutation ponctuelle silencieuse C177A a été introduite comme décrit pour le plasmide pSeGFP. Une représentation schématique du plasmide et de ses éléments biologiques est proposée en Figure 96.

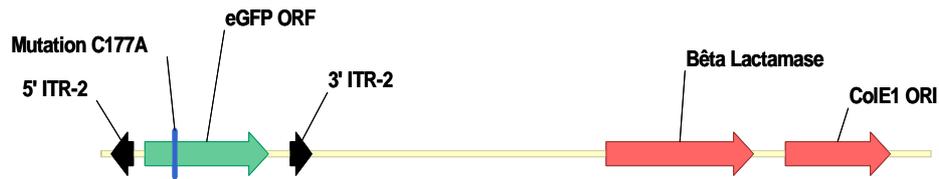


Figure 96. Représentation schématique du plasmide pAAV-SeGFP.

De 5' en 3' : répétition inversée terminale de l'AAV-2 (5'ITR-2), cadre de lecture ouvert du gène eGFP (eGFP ORF, *eGFP open reading frame*) présentant uniquement en position 177 la mutation silencieuse C177A, répétition inversée terminale de l'AAV-2 (3'ITR-2), gène de résistance à l'ampicilline codant une β -Lactamase (Bêta Lactamase) et origine de répllication bactérienne de type ColE1 (ColE1 ORI).

2.6 - Préparation d'ADN plasmidique

Pour la préparation des différents ADN plasmidiques, des bactéries *Escherichia coli* de la souche XL-1 blue ont été utilisées. La purification des plasmides est effectuée selon la réaction de lyse alcaline à l'aide du kit de préparation d'ADN plasmidique Nucleobond commercialisé par Macherey-Nagel. Les culots de plasmides recueillis sont resuspendus dans l'eau et stockés à -20°C . Lorsque les ADN plasmidiques sont destinés à être digérés par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation des guanines contenues au sein des motifs nucléotidiques reconnus par ces mêmes enzymes, la souche bactérienne INV110, déficiente pour la méthylation des séquences GATC (dam négative) et CCWGG (dcm négative), est alors utilisée pour la production.

3 - Synthèse des oligodéoxynucléotides simple-brins

Tous les oligodéoxynucléotides utilisés dans nos études ont été synthétisés par Proligo-Sigma, purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance, resuspendus dans l'eau, aliquotés et stockés à -20°C. Leurs séquences nucléotidiques ainsi que leurs modifications et leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 10 et le Tableau 11.

Tableau 10. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins ciblant peGFPLucMut.

Nom de l'oligomère (ssODN-)	Longueur (pb)	Brin ciblé	Nature des extrémités	Séquence oligodéoxynucléotidique (5'-3')	Type d'agent
eGFPLuc45 PO AS Ctr	45	AS	PO	ttctgtgattgtattcagcccctatcgtttcatagcttctgccca	Ctr
eGFPLuc45 PO AS Rep	45	AS	PO	ttctgtgattgtattcagcccctatcgtttcatagcttctgccca	Rep
eGFPLuc45 PS S Ctr	45	S	PS	<u>tg</u> gcagaagctatgaaacgatagggctgaatacaaatcacagaa	Ctr
eGFPLuc45 PS S Rep	45	S	PS	<u>tg</u> gcagaagctatgaaacgatagggctgaatacaaatcacagaa	Rep
eGFPLuc45 PS AS Ctr	45	AS	PS	<u>tt</u> ctgtgattgtattcagcccctatcgtttcatagcttctgccca	Ctr
eGFPLuc45 PS AS Rep	45	AS	PS	<u>tt</u> ctgtgattgtattcagcccctatcgtttcatagcttctgccca	Rep
eGFPLuc45 LNA 4r AS Rep	45	AS	PO	ttctgTgattTgtattcagcccctatcgtttcataGcttcTgccca	Rep
eGFPLuc45 LNA 4.4 AS Rep	45	AS	PO	TTCTgtgattgtattcagcccctatcgtttcatagcttctGCCA	Rep
eGFPLuc45 LNA 1.1 AS Rep	45	AS	PO	TtctgtgattgtattcagcccctatcgtttcatagcttctgccA	Rep
eGFPLuc35 PO S Ctr	35	S	PO	gaagctatgaaacgatagggctgaatacaaatca	Ctr
eGFPLuc35 PO S Rep	35	S	PO	gaagctatgaaacgatagggctgaatacaaatca	Rep
eGFPLuc35 PO AS Ctr	35	AS	PO	tgattgtattcagcccctatcgtttcatagcttc	Ctr
eGFPLuc35 PO AS Rep	35	AS	PO	tgattgtattcagcccctatcgtttcatagcttc	Rep
eGFPLuc35 PS S Ctr	35	S	PS	<u>ga</u> agctatgaaacgatagggctgaatacaaatca	Ctr
eGFPLuc35 PS S Rep	35	S	PS	<u>ga</u> agctatgaaacgatagggctgaatacaaatca	Rep
eGFPLuc35 PS AS Ctr	35	AS	PS	<u>tg</u> attgtattcagcccctatcgtttcatagcttc	Ctr
eGFPLuc35 PS AS Rep	35	AS	PS	<u>tg</u> attgtattcagcccctatcgtttcatagcttc	Rep

Légende : AS, antisens, S, sens, PO, phosphodiester, PS, phosphorothioate, Rep, réparateur, Ctr, contrôle. La position de mutation est représentée en gras, les nucléotides liés par un lien phosphorothioate sont représentés soulignés, les résidus LNA sont représentés en majuscule.

Tableau 11. Liste et caractéristiques des oligodéoxynucléotides simple-brins ciblant pmeGFP.

Nom de l'oligomère (ssODN-)	Longueur (pb)	Brin ciblé	Nature des extrémités	Séquence oligodéoxynucléotidique	Type d'agent
eGFP35 PO AS Rep	35	AS	PO	tggtcacgagggttgctagggcacgggcagcttg	Ctr
eGFP35 PO AS Ctr	35	AS	PO	tggtcacgagggttgccagggcacgggcagcttg	Rep
eGFP35 PS AS Rep	35	AS	PS	<u>tggtcacgagggttgctagggcacgggcagcttg</u>	Ctr
eGFP35 PS AS Ctr	35	AS	PS	<u>tggtcacgagggttgccagggcacgggcagcttg</u>	Rep
eGFP35 PS S Rep	35	S	PS	<u>caagctgcccgtgccctagccaaccctcgtgacca</u>	Ctr
eGFP35 PS S Ctr	35	S	PS	<u>caagctgcccgtgccctgccaaccctcgtgacca</u>	Rep

Légende : AS, antisens, S, sens, PO, phosphodiester, PS, phosphorothioate, Rep, réparateur, Ctr, contrôle. La position de mutation est représentée en gras, les nucléotides liés par un lien phosphorothioate sont représentés soulignés.

4 - Production de fragments d'ADN double-brins

4.1 - Amplification et purification des fragments d'intérêt

Les différents fragments d'ADN utilisés dans nos expériences ont tous été produits selon un même protocole d'amplification de matrice par PCR (polymerase chain reaction). Pour chaque fragment, une première amplification de 20 cycles est réalisée en utilisant le plasmide comportant la région d'intérêt à amplifier comme matrice, le couple d'amorces oligonucléotidiques correspondant (Tableaux 12 et 13) et les conditions réactionnelles suivantes : matrice 50 ng, amorce nucléotidique sens 100 μ M, amorce nucléotidique antisens 100 μ M, dNTPs 100 μ M, tampon DyNAzyme 1X, MgCl₂ 15 mM, polymérase thermostable DyNAzyme 1 u, volume final de 50 μ l et le programme suivant : 95°C/2 minutes – [95°C/30 secondes - 56°C/30 secondes - 70°C/1 minute/kpb] x20 – 70°C/2 minutes. Le produit de cette première réaction est ensuite soumis à une séparation par électrophorèse sur gel d'agarose. De façon à préserver l'intégrité des fragments à purifier, la détermination de la distance de migration du fragment d'intérêt est réalisée sans agent révélateur de l'ADN et sans exposition du fragment à un rayonnement ultra-violet. Pour cela, la fraction du gel d'électrophorèse correspondant aux marqueurs de masses moléculaires et un échantillon de la préparation à purifier est séparée du reste du gel, puis est incubée 30 minutes dans le tampon salin utilisé pour la migration électrophorétique additionné de bromure d'éthidium permettant. Sous illumination ultraviolette, cette fraction du gel d'électrophorèse permet de visualiser les

fragments d'ADN séparés et d'en déterminer la distance de migration du fragment d'intérêt. Le report de cette distance de migration sur le gel principal permet alors d'identifier la région du gel contenant le fragment d'intérêt, de l'exciser et d'en purifier le fragment qu'elle contient par une double extraction au phénol-chloroforme suivie de précipitation éthanolique ou par élution sur gel suivie de purification sur colonne échangeuse d'anions. Ce dernier, appelé *amplicon de première génération*, est resuspendu dans l'eau, dosé par mesure de la densité optique à 260 nm et par la technique Picogreen, aliquoté et stocké à -20°C. Cet amplicon de première génération est alors utilisé comme matrice pour la réalisation d'une seconde amplification par PCR utilisant le même couple d'amorces oligonucléotidiques et les conditions réactionnelles suivantes : matrice 50 ng, amorce nucléotidique sens 100 µM, amorce nucléotidique antisens 100 µM, dNTPs 100 µM, tampon DyNAzyme 1X, MgCl₂ 15 mM, polymérase thermostable DyNAzyme 1 u, volume final de 50 µl et le programme : 95°C/2 minutes – [95°C/30 secondes - 56°C/30 secondes - 70°C/1 minute/kpb] x25 – 70°C/2 minutes. Le produit de PCR (*amplicon de seconde génération*) est alors purifié par une simple extraction au phénol-chloroforme suivie de précipitation éthanolique ou purifié sur colonne échangeuse d'anions. Les fragments sont resuspendus dans l'eau, dosés par mesure de la densité optique à 260 nm et par la technique Picogreen, aliquotés et stockés à -20°C. Les teneurs en sels et en protéines sont également évaluées par mesure de la densité optique à 230 nm et 280 nm respectivement. L'ensemble de ces fragments est présenté dans les Tableaux 14 et 15.

Tableau 12. Liste des oligodéoxynucléotides utilisés pour la synthèse des fragments d'ADN double-brins corrigeant le gène eGFPLucMut.

Nom de l'oligodéoxynucléotide	Plasmide matrice	Position par rapport à la mutation (5' ; 3')	Séquence oligodéoxynucléotidique (5'-3')
F200-eGFPLuc	peGFPLuc	- 125 ; - 105	gctatgaagagatacgcctg
R200-eGFPLuc	peGFPLuc	69 ; 49	caacaccggcataaagaattg
F500-eGFPLuc	peGFPLuc	- 201 ; - 181	cgccaaaacataaagaaagg
R500-eGFPLuc	peGFPLuc	292 ; 274	cgaacgtgtacatcgactg
F1000-eGFPLuc	peGFPLuc	- 533 ; - 513	tacaactacaacgccacaac
R1000-eGFPLuc	peGFPLuc	446 ; 428	aatctcacgcaggcagttc
F2200-eGFPLuc	peGFPLuc	- 1084 ; - 1064	aaatgtcgtacaactccgcc
R2200-eGFPLuc	peGFPLuc	1048 ; 1027	aatgtagccatccatccttgc

Tableau 13. Liste des oligodéoxynucléotides utilisés pour la synthèse des fragments d'ADN double-brins corrigeant le gène meGFP.

Nom de l'oligodéoxynucléotide	Plasmide matrice	Position par rapport à la mutation (5' ; 3')	Séquence oligodéoxynucléotidique (5'-3')
F700-eGFP (F2200-eGFPLuc)	pSeGFP	-294 ; - 275	aaatgctgtaacaactccgcc
R700-eGFP	pSeGFP	437 ; 418	tgctcaggtagtggttgcg
R2200-eGFPLuc	peGFPLuc	1838 ; 1817	aatgtagccatccatccttgtc

Tableau 14. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins corrigeant le gène eGFPLucMut.

Nom du fragment d'ADN double-brins	Oligodéoxynucléotides utilisés pour l'amplification	Matrice amplifiée	Longueur (pb)	Type d'agent correcteur
dsDNA-eGFPLuc 200 Ctr	F200 et R200	peGFPLucMut	195	Contrôle
dsDNA-eGFPLuc 200 Rep	F200 et R200	peGFPLuc	195	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 500 Ctr	F500 et R500	peGFPLucMut	494	Contrôle
dsDNA-eGFPLuc 500 Rep	F500 et R500	peGFPLuc	494	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 1000 Ctr	F1000 et R1000	peGFPLucMut	980	Contrôle
dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep	F1000 et R1000	peGFPLuc	980	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 2200 Ctr	F2200 et R2200	peGFPLucMut	2133	Contrôle
dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep	F2200 et R2200	peGFPLuc	2133	Réparateur

Tableau 15. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins corrigeant le gène meGFP.

Nom du fragment d'ADN double-brins	Oligodéoxynucléotides utilisés pour l'amplification	Matrice amplifiée	Longueur (pb)	Type d'agent correcteur
dsDNA-meGFP 700 Ctr	F700 et R700	pmeGFP	732	Contrôle
dsDNA-eGFP 700 Rep	F700 et R700	peGFP	732	Réparateur
dsDNA-SeGFP 700 Rep	F700 et R700	pSeGFP	732	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep	F700 et R2200	peGFPLuc	2133 (732*)	Réparateur

* : longueur de la région homologue à peGFP-C1.

4.2 - Double extraction dite au phénol et au phénol-chloroforme

Il s'agit d'une variante de la méthode d'extraction dite au phénol-chloroforme décrite par Sambrook permettant la purification à grande échelle d'un fragment d'ADN produit par PCR après séparation électrophorétique sur gel d'agarose et excision du fragment de gel contenant le fragment d'ADN à purifier.

Protocole : le fragment de gel contenant le fragment d'ADN à purifier est dissous dans l'eau dans un rapport de 200 mg de gel d'agarose à 1% pour 1 ml d'eau par chauffage à 70°C sous agitation mécanique jusqu'à complète dissolution. Cette solution est alors soumise à une première extraction volume à volume contre du phénol pur stabilisé comme suit : les deux phases (aqueuse et organique) sont chauffées à 60°C et vigoureusement mélangées (vortex) puis congelées à -80°C et à nouveau chauffées à 60°C et vigoureusement mélangées avant d'être séparées par centrifugation à température ambiante permettant le recueil de la phase aqueuse. Cette dernière est alors soumise à une extraction classique dite au phénol-chloroforme.

4.3 - Extraction dite au phénol-chloroforme

Il s'agit de l'extraction dite au phénol-chloroforme décrite par Sambrook suivie d'une précipitation éthanolique (éthanol 50% v/v final) en présence d'acétate de sodium 0,12 M. Les fragments ainsi purifiés sont resuspendus dans l'eau.

5 - Production de fragments d'ADN simple-brins

Pour produire les fragments d'ADN simple-brins utilisés dans cette étude, il est fait usage de la technique de PCR asymétrique. Brièvement, celle-ci consiste en une réaction de PCR classique dans laquelle n'est employé qu'une seule des deux amorces oligonucléotidiques utilisées pour la synthèse du fragment double-brins par PCR. Seul des un deux brins de l'ADN matrice peut être synthétisé et s'accumule linéairement à chaque cycle. La PCR asymétrique a été réalisée en utilisant comme matrice les amplicons de première génération, les conditions réactionnelles étant les suivantes : matrice 100 ng, amorce nucléotidique sens 100 µM ou amorce nucléotidique antisens 100 µM, dNTPs 100 µM, tampon DyNAzyme 1X, MgCl₂ 15 mM, polymérase thermostable DyNAzyme 1 u, volume final de 50 µl et le programme : 95°C/2 minutes – [95°C/30 secondes - 56°C/30 secondes - 70°C/1 minute/kpb]

x50 – 70°C/2 minutes. Les fragments ainsi produits sont purifiés, caractérisés et stockés selon les mêmes protocoles que ceux utilisés pour les fragments d'ADN double-brins. L'ensemble des fragments d'ADN simple-brins produits ainsi est présenté dans le Tableau 16.

Tableau 16. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN simple-brins.

Nom du fragment d'ADN simple-brin	Oligodéoxynucléotide utilisé	Matrice amplifiée	Longueur (b)	Type d'agent correcteur
ssDNA-eGFPLuc 1000 S Ctr	F1000	dsDNA-eGFPLuc 1000 Ctr	980	Contrôle
ssDNA-eGFPLuc 1000 S Rep	F1000	dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep	980	Réparateur
ssDNA-eGFPLuc 1000 AS Ctr	R1000	dsDNA-eGFPLuc 1000 Ctr	980	Contrôle
ssDNA-eGFPLuc 1000 AS Rep	R1000	dsDNA-eGFPLuc 1000 Rep	980	Réparateur
ssDNA-eGFPLuc 2200 S Ctr	F2200	dsDNA-eGFPLuc 2200 Ctr	2133	Contrôle
ssDNA-eGFPLuc 2200 S Rep	F2200	dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep	2133	Réparateur
ssDNA-eGFPLuc 2200 AS Ctr	R2200	dsDNA-eGFPLuc 2200 Ctr	2133	Contrôle
ssDNA-eGFPLuc 2200 AS Rep	R2200	dsDNA-eGFPLuc 2200 Rep	2133	Réparateur

6 - Modification des fragments d'ADN double-brins

Les digestions endonucléasiques (endonucléases de restriction NheI, XbaI, AfeI, HaeI, BmtI (New England Biolabs) et BpII (Fermentas)) sont réalisées comme recommandé par le fabricant. La liste des fragments ainsi générés et leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 17. Les digestions exonucléolytiques 3'→5' par l'exodéoxyribonucléase III (ExoIII) sont réalisées à 37°C, dans un volume final de 20 µl contenant des quantités variables de fragments à modifier (0,15 à 1,5 µg) et d'enzyme (1 à 100 u). Les digestions par la mung bean nuclease (MBN) sont réalisées, après inactivation de ExoIII à 80°C pendant 20 minutes, selon les recommandations du fabricant. Le schéma présenté en Figure 97 illustre les activités de l'Exo III et de la mung bean nuclease.

Tableau 17. Liste et caractéristiques des fragments d'ADN double-brins générés par digestion enzymatique.

Nom du fragment d'ADN double-brins	Endonucléases utilisées en 5' et en 3'	Nature des extrémités 5' et 3'	Matrice clivée	Longueur (pb)	Type d'agent correcteur
dsDNA-eGFPLuc 2400 NX Rep	NheI et XbaI	5' dépassantes (+4 ; +4)	peGFPLuc Mut	2451	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 2400 AH Rep	AfeI et HaeI	franches	peGFPLuc Mut	2393	Réparateur
dsDNA-eGFPLuc 2400 BB Rep	BmtI et BpII	3' dépassantes (+4 ; +5)	peGFPLuc Mut	2363	Réparateur

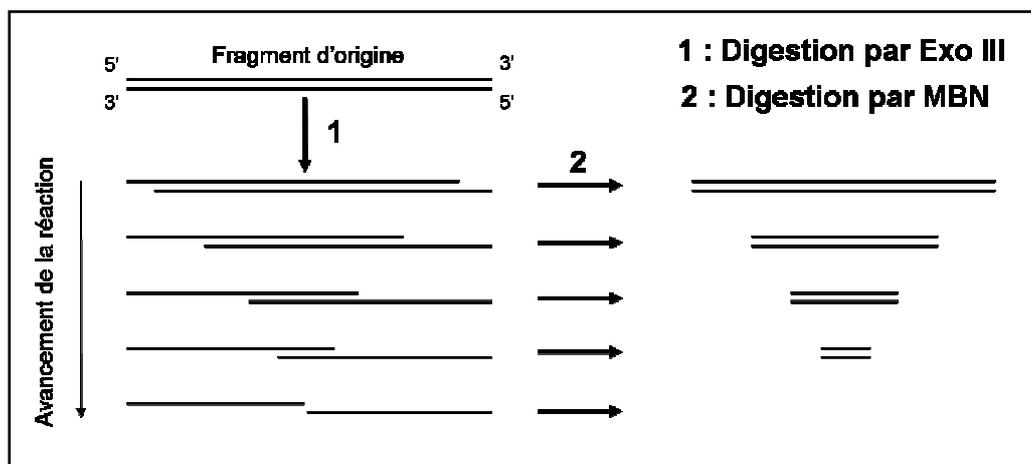


Figure 97. Schéma illustrant les activités de l'exonucléase III et de la mung bean nuclease.

7 - Production, purification et titrage des préparations de vecteurs rAAV

7.1 - Production des vecteurs

La production des vecteurs rAAV2.1 est réalisée par transfection transitoire de cellules HEK293 par les 3 plasmides suivants : 1) le plasmide helper pAAV LT-RCO2 pour le sérotype 1 permettant la synthèse des protéines virales Rep et Cap, 2) le plasmide pXX6 qui permet la synthèse des protéines adénovirales nécessaires à la répllication de l'AAV et 3) le plasmide contenant la séquence d'intérêt (vecteur pAAV-eGFPLuc ou pAAV-SeGFP).

Après ensemencement des cellules à raison de 5 millions de cellules pour une boîte de culture de 175 cm², dans 25 ml de milieu de culture, les cellules sont incubées 24 heures dans une enceinte thermostatée à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO₂ avant d'être transfectées.

Le détail des procédures décrites ci-après est donné pour une boîte de 175 cm² : la transfection est réalisée par complexation des plasmides à la polyéthylèneimine branchée de 25 kDa (PEI) dans une solution saline (NaCl 150 mM) et par dépôt des complexes sur les cultures de cellules. Les complexes sont réalisés par le mélange des trois plasmides (à raison de 25 µg du plasmide pXX6, de 12,5 µg du plasmide helper et 12,5 µg du plasmide vecteur) avec une solution de PEI à 0,6 mM et de NaCl à 150 mM. Les complexes sont alors déposés sur les cellules pour lesquelles le milieu de culture a été remplacé par 14 ml du milieu de transfection. Après 6 heures d'incubation, 12 ml de milieu de culture de « production » sont ajoutés et les cultures sont incubées dans les mêmes conditions pendant 3 jours.

Milieu de culture : DMEM 4,5 g/l de glucose, Glutamax-1 1 mM, sérum de veau fœtal 10%, pyruvate de sodium 1 mM, pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 µg/ml.

Milieu de transfection : DMEM 4,5 g/l de glucose, Glutamax-1 1 mM, sérum de veau fœtal 1%, pyruvate de sodium 1 mM.

Milieu de production : DMEM 1 g/l de glucose, Glutamax-1 1 mM, sérum de veau fœtal 10%, pyruvate de sodium 1 mM, pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 µg/ml.

La récupération des virus est réalisée après récolte des cellules par grattage. Celles-ci sont alors séparées du milieu de production par centrifugation à 1200 tours/minute et resuspendues dans 1 ml de tampon de lyse puis sont soumises à 4 cycles de congélation à -50°C et de décongélation pour faciliter la lyse des cellules et la libération des vecteurs. La suspension obtenue est centrifugée à 2500 tours/minute pendant 15 minutes à 4°C pour séparer les débris cellulaires (culot) de la suspension contenant les vecteurs (surnageant). Le surnageant obtenu est alors traité à la benzonase (100 u) pendant 30 minutes à 37°C pour dégrader les acides nucléiques contaminants la préparation puis la préparation est à nouveau centrifugée (8500 tours/minute pendant 20 minutes). Les vecteurs présents dans le surnageant sont précipités après l'ajout d'un volume de sulfate d'ammonium saturé froid 1M à pH 7 équivalent au volume de surnageant récupéré. Après incubation à 4°C pendant une heure et centrifugation à 10 000 tours/minute pendant 30 minutes à 4°C, les culots sont resuspendus dans une solution saline contenant des ions calcium et magnésium (PBS 1x avec CaCl₂ à 0,9 M et MgCl₂ à 0,5 M).

Tampon de lyse : Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM.

7.2 - Purification des vecteurs

La purification des vecteurs est réalisée par des ultracentrifugations successives sur des gradients de densité. Après réalisation d'un gradient de densité discontinu par le dépôt d'une première phase de densité égale à 1,5 (solution de chlorure de césium à 677 g/l) au fond du tube prévu à cet effet puis d'une seconde phase de densité égale à 1,35 (solution de chlorure de césium à 475 g/l) au-dessus de la précédente, la préparation de vecteurs est déposée au sommet du gradient puis les tubes sont centrifugés à 67 000 tours/minute pendant 14 heures à 8°C. A l'issue de la première ultracentrifugation, un réfractomètre est utilisé pour collecter les fractions de densités comprises entre 1,368 et 1,376 qui sont réunies avant d'être déposées au sommet d'un second gradient de densité et que l'ensemble soit ultracentrifugé dans les mêmes conditions que pour le premier gradient de densité. A l'issue de cette seconde centrifugation, les fractions de différentes densités sont collectées et sont titrées au regard de leur contenu en vecteurs rAAV (voir partie 7.3 – Titrage des préparations de vecteurs). Les fractions les plus riches en vecteurs sont alors regroupées et purifiées par dialyse, grâce à une membrane de dialyse présentant une limite d'exclusion à 10 kDa, contre une solution saline contenant les ions calcium et magnésium (PBS 1x avec CaCl₂ à 0,9 M et MgCl₂ à 0,5 M) à 4°C avec un renouvellement du bain de dialyse toutes les 3 heures. La suspension purifiée obtenue est ensuite à nouveau titrée par la même technique que précédemment.

7.3 - Titrage des préparations de vecteurs

Le titrage des préparations de vecteurs est réalisé par la mesure du nombre de génomes viraux au sein de la préparation de vecteurs. Cette détermination est réalisée par PCR quantitative en temps réel sur des lysats de vecteurs. Un aliquot de 5 µl de la préparation de vecteurs est tout d'abord traité à la DNase I pendant 30 minutes à 37°C pour dégrader les éventuelles séquences contaminantes puis les vecteurs sont lysés par un traitement à la protéinase K pendant 1 heure à 50°C avant d'être stockés à 4°C. La réaction de PCR quantitative est réalisée à l'aide du kit qPCR Master Mix (Applied Biosystems), des amorces oligodéoxynucléotidiques GFP.F et GFP.R ainsi que de la sonde GFP.P (Tableau 18) dans les conditions réactionnelles suivantes : matrice ADN viral (gamme de 0,1 à 10 µl lysat), amorces nucléotidiques GFP.F et GFP.R 100 µM, sonde GFP.P 100 µM, dNTPs 100 µM, tampon Master Mix 1X, volume final de 25 µl et le programme suivant: 95°C/10 minutes – [95°C/15

secondes - 60°C/1 minute] x40 sur un thermocycleur Taqman ABI 7700 HT (Applied biosystems).

Tableau 18. Liste et caractéristiques des amorces et sondes utilisées pour le dosage des préparations de vecteurs rAAV.

Nom	Longueur (b)	Brin ciblé	Séquence oligodéoxynucléotidique (5'-3')
eGFP.F	20	S	catcaatgggcgtggatagc
eGFP.R	24	AS	ggagttgttacgacatttggaaa
eGFP.P	18	S	attccaagtctccacc

8 - Génération des lignées exprimant stablement les cassettes d'expression

Pour générer les lignées cellulaires exprimant stablement les cassettes d'expression, des transfections stables suivies de sélection des recombinants ont été réalisées. Pour ce faire, les cellules,ensemencées la veille et à une densité cellulaire permettant d'obtenir des efficacités de transfection optimales, sont transfectées par le plasmide d'intérêt en utilisant la méthode de précipitation au phosphate de calcium ou par complexation à des lipides cationiques (Lipofectamine, Invitrogen). Après trois jours de culture dans du milieu standard, les cellules sont cultivées deux semaines dans un milieu de sélection (milieu standard additionné de 600 µg/ml de sulfate de généticine). Les cellules résistantes sont récoltées et dissociées par l'action d'une solution de trypsine-EDTA 0,05% à 37°C et par action mécanique jusqu'à l'obtention d'une suspension monocellulaire puis clonées grâce à un trieur de cellules (MoFlow) et cultivées dans du milieu standard.

9 - Caractérisation des lignées exprimant stablement les cassettes d'expression

La détermination du nombre de copies de plasmides intégrés au sein de la chromatine a été réalisée par PCR quantitative en temps réel. Le dosage génique du gène meGFP a été réalisé à l'aide du kit qPCR Master Mix (Applied Biosystems), des amorces oligodéoxynucléotidiques GFP.F et GFP.R ainsi que de la sonde GFP.P (Tableau 19) dans les conditions réactionnelles suivantes : matrice ADN génomique 100 ng, amorces nucléotidiques GFP.F et GFP.R 100 µM, sonde GFP.P 100 µM, dNTPs 100 µM, tampon Master Mix 1X, volume final de 25 µl et le programme suivant: 95°C/10 minutes – [95°C/15 secondes - 60°C/1 minute] x40 sur un thermocycleur Taqman ABI 7700 HT (Applied biosystems).

Tableau 19. Liste et caractéristiques des amorces et sondes utilisées pour le dosage génique du gène meGFP.

Nom	Longueur (b)	Brin ciblé	Séquence oligodéoxynucléotidique (5'-3')
eGFP.F	20	S	catcaatgggcgtggatagc
eGFP.R	24	AS	ggagtgttacgacatttggaaa
eGFP.P	18	S	attccaagtctccacc

II - Méthodes

1 - Expérience de correction génique épisomale

Les expériences de correction génique épisomale sont réalisées soit par la bi-transfection des deux types d'acides nucléiques (le plasmide cible et l'agent réparateur) dans le cas de correction génique par des oligodéoxynucléotides ou des fragments d'ADN simple ou double-brins, soit par transfection de l'acide nucléique cible précédée ou suivie d'une phase d'infection par les vecteurs rAAV lors de l'emploi de ces derniers en tant qu'agents réparateurs. Toutes les transfections, sauf indication, sont réalisées en utilisant comme agent transfectant la Lipofectamine. Chacune des différentes étapes de ces protocoles de correction génique sont présentées ci-après.

1.1 - Ensemencement des cellules

Les cellules HEK293 ou HEK293T sont ensemencées la veille à raison de 80 000 cellules par puits de plaque 24 puits dans un volume final de 1 ml de milieu complet éventuellement additionné de différents composés (doxorubicine, phléomycine, thymidine dinucléotide ou l'oligomère pTélo) aux concentrations indiquées.

1.2 - Transfection des cellules

1.2.1 - Formation des complexes transfectants

Les complexes transfectants composés de plasmides, d'oligodéoxynucléotides ou de fragments d'ADN simple ou double-brins sont formés séparément. La solution de Lipofectamine (Invitrogen) d'une part, et les acides nucléiques à complexer (plasmides, oligodéoxynucléotides ou fragments d'ADN) d'autre part sont préalablement dilués dans de l'Optimem-I (Gibco) aux concentrations finales de 140 µg/ml et 35 µg/ml respectivement. Les complexes transfectants sont alors formés par mélange volume à volume des deux solutions préparées (rapport massique Lipofectamine/acides nucléiques de 4:1) et incubation à température ambiante pendant 10 minutes. Dans le cas de l'utilisation d'agents réparateurs de type acide nucléique (oligodéoxynucléotides et fragments d'ADN), les volumes de complexes transfectants nécessaires à la préparation de la mixture transfectante composée de la cible et de l'agent réparateur aux ratios molaires voulus sont alors mélangés dans un

volume final de 0,5 ml d'Optimem-I. Lors des mesures d'efficacité de transfection ou des expériences de correction génique avec comme agent réparateur un vecteur viral, le volume nécessaire de complexes transfectants composés uniquement de plasmides cibles est également ramené à un volume final de 0,5 ml d'Optimem-I.

1.2.2 - Incubation avec les complexes transfectants

Quel que soit l'agent réparateur utilisé, l'étape de transfection est réalisée en absence de sérum comme suit : le milieu de culture des cellules à traitées est remplacé par le mélange transfectant pendant 3 heures puis est délicatement éliminé avant l'ajout de 1 ml de milieu complet. Si les cellules ont été au préalable infectées par un vecteur viral, elles sont alors lavées avant dépôt du mélange transfectant.

1.3 - Infection des cellules

L'infection est réalisée avant ou après l'étape de transfection. Dans les deux cas, le volume de milieu de culture complet est réduit à 250 µl avant d'être additionné des doses de vecteurs rAAV correspondant aux MOI précisées, ces doses ne dépassant pas un volume supérieur à 10% du volume de milieu de culture. Les durées d'incubation sont de 4 heures et lorsque les étapes d'infection suivent l'étape de transfection, les cellules sont soigneusement lavées entre ces deux étapes. A l'issue de l'étape d'infection, le milieu d'infection est éliminé et remplacé par 1 ml de milieu de complet.

1.4 - Incubation des cellules

A l'issue des traitements par transfection et/ou par infection, les cellules sont incubées dans 1 ml de milieu complet pendant 48 heures jusqu'à l'analyse.

2 - Expérience de correction génique chromosomale

Lors des expériences de correction génique chromosomale, les agents réparateurs, les seuls éléments à être administrés, sont délivrés soit par transfection ou nucléofection lorsqu'il s'agit des oligodéoxynucléotides ou des fragments d'ADN, soit par infection pour les vecteurs

rAAV. Chacune des différentes étapes de ces protocoles de correction génique sont présentées ci-après.

2.1 - Nucléofection des cellules

Les expériences de nucléofection de cellules sont réalisées à l'aide du Nucleofector II (Amaya Biosystem), du kit T recommandé pour la lignée cellulaire CHO-K1 et du programme « high efficiency » U-023. Les cellules (clones dérivés de la lignée cellulaire CHO-K1) sontensemencées la veille dans du milieu complet éventuellement additionné de chlorure de doxorubicine ou de phléomycine, à raison de 2 millions de cellules par flasque de 75 cm². Le jour de la nucléofection, les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS puis sont soigneusement détachées et dissociées par trypsination. Après une très douce centrifugation à 80 x g pendant 10 minutes, les cellules sont reprises dans le tampon du kit T à une concentration de 12 millions de cellules par ml. 100 µl de la suspension cellulaire sont alors utilisés par réaction de nucléofection après mélange avec les acides nucléiques à administrer (2 à 7,5 µg dans un volume maximal de 10 µl). Les cellules sont ensuite délicatement reprises dans du milieu complet préchauffé à 37°C et incubées en plaque 6 puits pendant 5 jours avant analyse.

2.2 - Transfection des cellules avec la Lipofectamine

Les clones cellulaires dérivés de la lignée CHO-K1 sontensemencées la veille à raison de 20 000 cellules par puits de plaque 24 puits dans un volume final de 1 ml de milieu complet éventuellement additionné de chlorure de doxorubicine ou de phléomycine aux concentrations indiquées. La formation des complexes transfectants ainsi que l'étape de transfection sont réalisées comme décrit pour les expériences de correction génique épisomale.

2.3 - Infection des cellules par les vecteurs rAAV

Les clones cellulaires dérivés de la lignée CHO-K1 sontensemencées comme décrit pour les transfections. Le jour de l'infection, le volume de milieu de culture complet est réduit à 250 µl avant d'être additionné des doses de vecteurs rAAV correspondants aux MOI précisées, ces doses ne dépassant pas un volume supérieur à 10% du volume de milieu de culture. Après 12 heures d'incubation avec les vecteurs, le milieu d'infection est éliminé et 2 ml de milieu de complet sont ajoutés. Les cellules sont incubées pendant 5 jours avant analyse.

3 - Cytométrie en flux

Pour l'analyse à haut débit du phénotype eGFP positif ou négatif des cellules soumises aux différents protocoles expérimentaux, un cytomètre en flux de type Facscalibur a été utilisé ainsi que son logiciel d'acquisition et d'analyse des données CellQuest 3.1f (BD). Celles-ci se font à partir de suspensions monocellulaires obtenues comme suit : les cellules à analyser sont lavées au PBS puis détachées de leur support de culture et dissociées par l'action d'une solution de trypsine-EDTA 0,05% à 37°C et par action mécanique. Les cellules sont alors resuspendues dans 10 volumes de milieu standard contenant, entre autres, 10% de sérum de veau fœtal (source de l'apport en α 1-antitrypsine permettant l'inactivation de la trypsine). Les échantillons sont maintenus sur glace jusqu'à analyse. Avant analyse, chaque échantillon est soigneusement resuspendu par action mécanique. L'analyse est réalisée sur 50 000 (correction génique épisomale) ou 500 000 (correction génique chromosomale) événements correspondant à des cellules morphologiquement intactes. Une cellule est alors considérée eGFP positive si elle présente un rapport fluorescence eGFP/autofluorescence augmenté d'un facteur cinq comparé aux cellules appartenant à la population de référence (non traitée) comme illustré en Figure 98. L'efficacité de correction génique correspond alors à la proportion de cellules eGFP positives au sein de la population de cellules morphologiquement intactes. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne +/- écart-type des fréquences relevées.

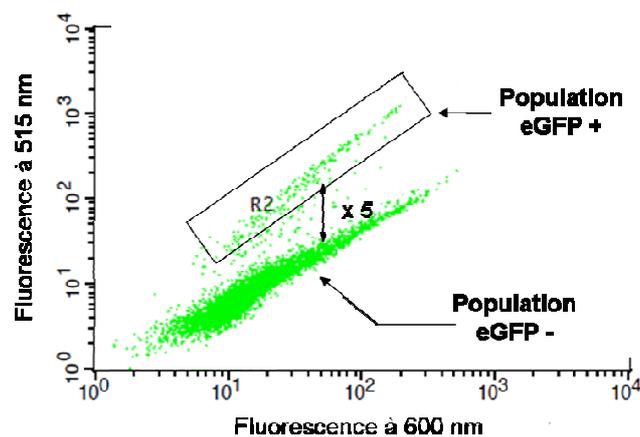


Figure 98. Analyse par cytométrie en flux du phénotype eGFP de cellules traitées.

Graphique représentant les intensités de fluorescence à 600 nm (fluorescence rouge choisie comme reflet de l'autofluorescence cellulaire) et à 515 nm (fluorescence de l'eGFP) des cellules morphologiquement intactes. Dans la partie haute du graphique (fenêtre R2), la population eGFP+ correspond à des cellules corrigées qui présentent un rapport de fluorescence à 515 nm/ fluorescence à 600 nm environ 5 fois plus important que celui de la population eGFP- (partie basse du graphique) qui correspond à des cellules non-corrigées.

4 - Mesure de l'activité luciférase

La mesure de l'activité luciférase au sein des échantillons de cellules à analyser est réalisée par la mesure de la bioluminescence produite lorsque l'enzyme luciférase est mise en présence de son substrat la luciférine. Les cellules à analyser sont lysées dans un tampon de lyse (composé de Tris-phosphate 25 mM, de chlorure de Magnésium 8 mM, de DTT 1 mM, d'EDTA 1 mM, de 15 % de glycérol et de 1 % de Triton-X100) à raison de 250 µl par puits de plaque 24 puits et par un cycle de congélation-décongélation à -80°C. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation, 10 µl du lysat ainsi obtenu sont utilisés pour la mesure de l'activité luciférase. Celle-ci est réalisée, après injection automatique de 50 µl d'un tampon de réaction (tampon de lyse additionné d'ATP 2 mM) et de 50 µl d'une solution de luciférine (Molecular Probes) à 167 µM, par la mesure de la luminescence produite sur une période de 10 secondes grâce à un luminomètre Victor2 (Perkin Elmer). Les résultats obtenus sont alors normalisés en effectuant le rapport de luminescence et de la masse de protéines cellulaires au sein de l'échantillon, la masse de protéines cellulaire étant déterminée par un dosage de Bradford réalisé à l'aide du kit Biorad protein assay (Biorad). Les résultats sont exprimés en unités de lumière relative pour 10 secondes et par milligramme de protéine (RLU/mg protéine). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne +/- écart-type des activités mesurées.

5 - Analyse du cycle cellulaire

Les cellules à analyser sont lavées au PBS puis détachées de leur support de culture et dissociées par l'action d'une solution de trypsine-EDTA 0,05% à 37°C et par action mécanique jusqu'à l'obtention d'une suspension monocellulaire. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois par centrifugation, resuspendues dans une solution de PBS puis fixées pendant 24 heures à 4°C dans une solution d'éthanol 70% v/v froid. Les cellules sont ensuite marquées avec une solution d'iodure de propidium (solution de PBS contenant 40 µg/ml d'iodure de propidium, 20 µg/ml de RNase I exempte de DNase par chauffage à 96°C pendant 10 minutes, 0.1% de sodium dodecyl sulfate) pendant 3 heures à 37°C puis analysées à l'aide d'un cytomètre en flux Facscalibur (BD, Becton, Dickinson and company) et du logiciel d'acquisition et d'analyse CellQuest 3.1f (BD).

6 - Microscopie à épifluorescence

La visualisation des cellules eGFP positives est effectuée grâce un microscope à épifluorescence (excitation à 485 nm, filtre passe-bas à 530+/-15 nm) couplé à une caméra à couple de charges pour la prise de photographies.

7 - Détermination de température de fusion des oligodéoxynucléotides

La détermination de température de fusion des oligodéoxynucléotides est réalisée par la mesure de l'absorbance à 521 nm en fonction de la température d'un échantillon consistant en un mélange d'un agent intercalant fluorescent spécifique de l'ADN double-brins, le Sybr Green, et d'une structure d'ADN double-brin formée de l'oligodéoxynucléotide à caractériser et d'une séquence complémentaire à ce dernier (oligodéoxynucléotide complémentaire de même longueur ou fragment d'ADN simple-brin complémentaire de plus grande longueur). Après un chauffage de l'échantillon pendant 10 minutes à 98°C suivi d'un lent refroidissement jusqu'à 20°C, l'échantillon est chauffé de 60 à 95°C par incrément de 0,2°C toutes les 30 secondes. A chaque pallier de température, l'absorbance à 521 nm est mesurée et normalisée par rapport au signal de fluorescence d'un normalisateur interne. Le calcul des températures de fusion est alors réalisé après déconvolution de la dérivée par rapport au temps du signal de fluorescence à 521 nm. Ces expériences sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur Chromo4 et de son logiciel d'acquisition et d'analyse Opticon3 (Biorad).

8 - Séquençage

Le séquençage des différentes séquences à analyser au cours de cette étude est réalisé par le service de séquençage de Généthon selon la méthode de Sanger, à l'aide de didéoxynucléotides marqués. Le produit de la réaction de séquence est alors analysé par électrophorèse capillaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acharya, S., T. Wilson, S. Gradia, M.F. Kane, S. Guerrette, G.T. Marsischky, R. Kolodner and R. Fishel hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 13629-13634.
- Adair, G.M., J.B. Scheerer, A. Brotheman, S. McConville, J.H. Wilson and R.S. Nairn Targeted recombination at the Chinese hamster APRT locus using insertion versus replacement vectors, *Somat Cell Mol Genet* 24 (1998) 91-105.
- Albuquerque-Silva, J., G. Vassart, J. Lavinha and M.J. Abramowicz Chimeraplasty validation, *Nat Biotechnol* 19 (2001) 1011.
- Alexander, I.E., D.W. Russell and A.D. Miller DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors, *J Virol* 68 (1994) 8282-8287.
- Allen, C., J. Halbrook and J.A. Nickoloff Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining, *Mol Cancer Res* 1 (2003) 913-920.
- Andrieu-Soler, C., M. Casas, A.M. Faussat, C. Gandolphe, M. Doat, D. Tempe, C. Giovannangeli, F. Behar-Cohen and J.P. Concordet Stable transmission of targeted gene modification using single-stranded oligonucleotides with flanking LNAs, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 3733-3742. Print 2005.
- Atchison, R.W., B.C. Casto and W.M. Hammon ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES, *Science* 149 (1965) 754-756.
- Avery, O.T., C.M. MacLeod and M. McCarty Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944, *Mol Med* 1 (1944) 344-365.
- Bartlett, J.S., R. Wilcher and R.J. Samulski Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors, *J Virol* 74 (2000) 2777-2785.
- Baumann, P., F.E. Benson and S.C. West Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro, *Cell* 87 (1996) 757-766.
- Baumann, P. and S.C. West Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair, *Trends Biochem Sci* 23 (1998) 247-251.
- Beadle, G.W. and E.L. Tatum Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 27 (1941) 499-506.
- Bennett, M. and J. Schaack Development of a dual-luciferase fusion gene as a sensitive marker for site-directed DNA repair strategies, *J Gene Med* 5 (2003) 723-732.
- Berns, K.I. and S. Adler Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains, *J Virol* 9 (1972) 394-396.
- Berns, K.I. and C. Giraud Biology of adeno-associated virus, *Curr Top Microbiol Immunol* 218 (1996) 1-23.
- Berthet, C., K. Raj, P. Saudan and P. Beard How adeno-associated virus Rep78 protein arrests cells completely in S phase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 13634-13639. Epub 12005 Sep 13612.
- Bertling, W.M. Gene targeting, in: V. MA (Ed.), *Gene targeting*, CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 1-44.
- Bertoni, C., G.E. Morris and T.A. Rando Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing, *Hum Mol Genet* 14 (2005) 221-233. Epub 2004 Nov 2024.

- Bleker, S., F. Sonntag and J.A. Kleinschmidt Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity, *J Virol* 79 (2005) 2528-2540.
- Boddy, M.N., P.H. Gaillard, W.H. McDonald, P. Shanahan, J.R. Yates, 3rd and P. Russell Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase, *Cell* 107 (2001) 537-548.
- Brachman, E.E. and E.B. Kmiec Targeted nucleotide repair of *cyc1* mutations in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded DNA oligonucleotides, *Genetics* 163 (2003) 527-538.
- Brachman, E.E. and E.B. Kmiec Gene repair in mammalian cells is stimulated by the elongation of S phase and transient stalling of replication forks, *DNA Repair (Amst)* 4 (2005) 445-457. Epub 2005 Jan 2015.
- Capecchi, M.R. Altering the genome by homologous recombination, *Science* 244 (1989) 1288-1292.
- Chamberlain, J.R., D.R. Deyle, U. Schwarze, P. Wang, R.K. Hirata, Y. Li, P.H. Byers and D.W. Russell Gene targeting of mutant COL1A2 alleles in mesenchymal stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta, *Mol Ther* 16 (2008) 187-193. Epub 2007 Oct 2023.
- Chamberlain, J.R., U. Schwarze, P.R. Wang, R.K. Hirata, K.D. Hankenson, J.M. Pace, R.A. Underwood, K.M. Song, M. Sussman, P.H. Byers and D.W. Russell Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta, *Science* 303 (2004) 1198-1201.
- Chan, P.P., M. Lin, A.F. Faruqi, J. Powell, M.M. Seidman and P.M. Glazer Targeted correction of an episomal gene in mammalian cells by a short DNA fragment tethered to a triplex-forming oligonucleotide, *J Biol Chem* 274 (1999) 11541-11548.
- Chang, J.C., L. Ye and Y.W. Kan Correction of the sickle cell mutation in embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 1036-1040. Epub 2006 Jan 1011.
- Chang, X.B. and J.H. Wilson Modification of DNA ends can decrease end joining relative to homologous recombination in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 4959-4963.
- Chejanovsky, N. and B.J. Carter Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication, *Virology* 173 (1989) 120-128.
- Chen, L., K. Trujillo, W. Ramos, P. Sung and A.E. Tomkinson Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes, *Mol Cell* 8 (2001) 1105-1115.
- Chen, X.B., R. Melchionna, C.M. Denis, P.H. Gaillard, A. Blasina, I. Van de Weyer, M.N. Boddy, P. Russell, J. Vialard and C.H. McGowan Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro, *Mol Cell* 8 (2001) 1117-1127.
- Cherng, J.Y., N.M. Schuurmans-Nieuwenbroek, W. Jiskoot, H. Talsma, N.J. Zuidam, W.E. Hennink and D.J. Crommelin Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes, *J Control Release* 60 (1999) 343-353.
- Christmann, M., M.T. Tomicic, W.P. Roos and B. Kaina Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology* 193 (2003) 3-34.
- Cohen, S.N., A.C. Chang, H.W. Boyer and R.B. Helling Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (1973) 3240-3244.
- Cole-Strauss, A., K. Yoon, Y. Xiang, B.C. Byrne, M.C. Rice, J. Gryn, W.K. Holloman and E.B. Kmiec Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide, *Science* 273 (1996) 1386-1389.
- Colledge, W.H., B.S. Abella, K.W. Southern, R. Ratcliff, C. Jiang, S.H. Cheng, L.J. MacVinish, J.R. Anderson, A.W. Cuthbert and M.J. Evans Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model, *Nat Genet* 10 (1995) 445-452.

- Colosimo, A., K.K. Goncz, G. Novelli, B. Dallapiccola and D.C. Gruenert Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments, *Mol Ther* 3 (2001) 178-185.
- Constantinou, A., A.A. Davies and S.C. West Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells, *Cell* 104 (2001) 259-268.
- Cornu, T.I. and T. Cathomen Targeted genome modifications using integrase-deficient lentiviral vectors, *Mol Ther* 15 (2007) 2107-2113. Epub 2007 Nov 2113.
- Critchlow, S.E. and S.P. Jackson DNA end-joining: from yeast to man, *Trends Biochem Sci* 23 (1998) 394-398.
- Cromie, G.A., J.C. Connelly and D.R. Leach Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans, *Mol Cell* 8 (2001) 1163-1174.
- Culver, K.W., W.T. Hsieh, Y. Huyen, V. Chen, J. Liu, Y. Khripine and A. Khorlin Correction of chromosomal point mutations in human cells with bifunctional oligonucleotides, *Nat Biotechnol* 17 (1999) 989-993.
- de Piedoue, G., C. Andrieu-Soler, J.P. Concordet, R. Maurisse, J.S. Sun, B. Lopez, I. Kuzniak, P. Leboulch and J.P. Feugeas Targeted gene correction with 5' acridine-oligonucleotide conjugates, *Oligonucleotides* 17 (2007) 258-263.
- de Piedoue, G., R. Maurisse, I. Kuzniak, B. Lopez, A. Perrin, O. Negre, P. Leboulch and J.P. Feugeas Improving gene replacement by intracellular formation of linear homologous DNA, *J Gene Med* 7 (2005) 649-656.
- De Semir, D. and J.M. Aran Misleading gene conversion frequencies due to a PCR artifact using small fragment homologous replacement, *Oligonucleotides* 13 (2003) 261-269.
- de Semir, D., M. Nadal, J.R. Gonzalez, S. Larriba, A. Avinyo, V. Nunes, T. Casals, X. Estivill and J.M. Aran Suitability of oligonucleotide-mediated cystic fibrosis gene repair in airway epithelial cells, *J Gene Med* 5 (2003) 625-639.
- Dekker, M., C. Brouwers and H. te Riele Targeted gene modification in mismatch-repair-deficient embryonic stem cells by single-stranded DNA oligonucleotides, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) e27.
- Delacote, F., M. Han, T.D. Stamato, M. Jasin and B.S. Lopez An *xrcc4* defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells, *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 3454-3463.
- Deng, C. and M.R. Capecchi Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus, *Mol Cell Biol* 12 (1992) 3365-3371.
- Diaz-Font, A., B. Cormand, A. Chabas, L. Vilageliu and D. Grinberg Unsuccessful chimeraplast strategy for the correction of a mutation causing Gaucher disease, *Blood Cells Mol Dis* 31 (2003) 183-186.
- DiMatteo, D., S. Callahan and E.B. Kmiec Genetic conversion of an *SMN2* gene to *SMN1*: a novel approach to the treatment of spinal muscular atrophy, *Exp Cell Res* 314 (2008) 878-886. Epub 2007 Oct 2024.
- Doetschman, T., R.G. Gregg, N. Maeda, M.L. Hooper, D.W. Melton, S. Thompson and O. Smithies Targeted correction of a mutant *HPRT* gene in mouse embryonic stem cells, *Nature* 330 (1987) 576-578.
- Dong, J.Y., P.D. Fan and R.A. Frizzell Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus, *Hum Gene Ther* 7 (1996) 2101-2112.
- Donsante, A., D.G. Miller, Y. Li, C. Vogler, E.M. Brunt, D.W. Russell and M.S. Sands AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma, *Science* 317 (2007) 477.
- Douar, A.M., K. Poulard, D. Stockholm and O. Danos Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation, *J Virol* 75 (2001) 1824-1833.

- Drury, M.D. and E.B. Kmiec DNA pairing is an important step in the process of targeted nucleotide exchange, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 899-910.
- Duan, D., Q. Li, A.W. Kao, Y. Yue, J.E. Pessin and J.F. Engelhardt Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection, *J Virol* 73 (1999) 10371-10376.
- Dynan, W.S. and S. Yoo Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids, *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 1551-1559.
- Elliott, B., C. Richardson, J. Winderbaum, J.A. Nickoloff and M. Jasin Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells, *Mol Cell Biol* 18 (1998) 93-101.
- Engstrom, J.U. and E.B. Kmiec Manipulation of cell cycle progression can counteract the apparent loss of correction frequency following oligonucleotide-directed gene repair, *BMC Mol Biol* 8 (2007) 9.
- Epinat, J.C., S. Arnould, P. Chames, P. Rochaix, D. Desfontaines, C. Puzin, A. Patin, A. Zanghellini, F. Paques and E. Lacroix A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 2952-2962.
- Essers, J., R.W. Hendriks, J. Wesoly, C.E. Beerens, B. Smit, J.H. Hoeijmakers, C. Wyman, M.L. Dronkert and R. Kanaar Analysis of mouse Rad54 expression and its implications for homologous recombination, *DNA Repair (Amst)* 1 (2002) 779-793.
- Faruqi, A.F., H.J. Datta, D. Carroll, M.M. Seidman and P.M. Glazer Triple-helix formation induces recombination in mammalian cells via a nucleotide excision repair-dependent pathway, *Mol Cell Biol* 20 (2000) 990-1000.
- Fattah, F.J., N.F. Lichter, K.R. Fattah, S. Oh and E.A. Hendrickson Ku70, an essential gene, modulates the frequency of rAAV-mediated gene targeting in human somatic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 8703-8708. Epub 2008 Jun 8718.
- Felgner, P.L. and G.M. Ringold Cationic liposome-mediated transfection, *Nature* 337 (1989) 387-388.
- Ferrara, L. and E.B. Kmiec Camptothecin enhances the frequency of oligonucleotide-directed gene repair in mammalian cells by inducing DNA damage and activating homologous recombination, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 5239-5248. Print 2004.
- Ferrara, L., H. Parekh-Olmedo and E.B. Kmiec Enhanced oligonucleotide-directed gene targeting in mammalian cells following treatment with DNA damaging agents, *Exp Cell Res* 300 (2004) 170-179.
- Fischer, A. Cautious advance. Gene therapy is more complex than anticipated, *EMBO Rep* 1 (2000) 294-296.
- Flagler, K., V. Alexeev, E.A. Pierce and O. Igoucheva Site-specific gene modification by oligodeoxynucleotides in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Gene Ther* 15 (2008) 1035-1048. Epub 2008 Mar 1013.
- Flotte, T.R. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors, *Gene Ther* 11 (2004) 805-810.
- Gamper, H.B., H. Parekh, M.C. Rice, M. Bruner, H. Youkey and E.B. Kmiec The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts, *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 4332-4339.
- Genschel, J., S.J. Littman, J.T. Drummond and P. Modrich Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalph, *J Biol Chem* 273 (1998) 19895-19901.
- Goedecke, W., M. Eijpe, H.H. Offenberg, M. van Aalderen and C. Heyting Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis, *Nat Genet* 23 (1999) 194-198.

- Goncalves, M.A. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector, *Virol J* 2 (2005) 43.
- Gong, W.J. and K.G. Golic Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 2556-2561. Epub 2003 Feb 2514.
- Graham, I.R., S.G. Beattie, V.J. Hill and G. Dickson Oligonucleotide-based gene correction strategies: applications to neuromuscular and cardiovascular diseases, *Croat Med J* 42 (2001) 467-472.
- Grieger, J.C. and R.J. Samulski Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99 (2005) 119-145.
- Griffith, F. The significance of pneumococcal types, *J. Hyg* 27 (1928) 113-159.
- Gupta, R.C., L.R. Bazemore, E.I. Golub and C.M. Radding Activities of human recombination protein Rad51, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 463-468.
- Haber, J.E. Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet* 16 (2000) 259-264.
- Hadshiew, I.M., M.S. Eller, F.P. Gasparro and B.A. Gilchrist Stimulation of melanogenesis by DNA oligonucleotides: effect of size, sequence and 5' phosphorylation, *J Dermatol Sci* 25 (2001) 127-138.
- Hagstrom, J.E., J.J. Ludtke, M.C. Bassik, M.G. Sebestyen, S.A. Adam and J.A. Wolff Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells, *J Cell Sci* 110 (1997) 2323-2331.
- Hansen, J., K. Qing and A. Srivastava Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2, *Mol Ther* 4 (2001) 289-296.
- Harfe, B.D. and S. Jinks-Robertson DNA mismatch repair and genetic instability, *Annu Rev Genet* 34 (2000) 359-399.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez and A. Bradley The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells, *Mol Cell Biol* 11 (1991) 5586-5591.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez and A. Bradley The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells, *Mol Cell Biol* 12 (1992) 2464-2474.
- Hendrie, P.C., R.K. Hirata and D.W. Russell Chromosomal integration and homologous gene targeting by replication-incompetent vectors based on the autonomous parvovirus minute virus of mice, *J Virol* 77 (2003) 13136-13145.
- Hendrie, P.C. and D.W. Russell Gene targeting with viral vectors, *Mol Ther* 12 (2005) 9-17.
- Hershey, A.D. and M. Chase Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, *J Gen Physiol* 36 (1952) 39-56.
- Hirata, R., J. Chamberlain, R. Dong and D.W. Russell Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors, *Nat Biotechnol* 20 (2002) 735-738.
- Hirata, R.K. and D.W. Russell Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors, *J Virol* 74 (2000) 4612-4620.
- Hooykaas-Van Slogteren, G.M., P.J. Hooykaas and R.A. Schilperoort Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. 1984, *Biotechnology* 24 (1992) 382-383.
- Hsieh, P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair, *Mutat Res* 486 (2001) 71-87.
- Huang, J. and W.S. Dynan Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction, *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 667-674.

- Huen, M.S., X.T. Li, L.Y. Lu, R.M. Watt, D.P. Liu and J.D. Huang The involvement of replication in single stranded oligonucleotide-mediated gene repair, *Nucleic Acids Res* 34 (2006) 6183-6194. Epub 2006 Nov 6186.
- Iaccarino, I., G. Marra, F. Palombo and J. Jiricny hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutSalph, *EMBO J* 17 (1998) 2677-2686.
- Igoucheva, O., V. Alexeev, M. Pryce and K. Yoon Transcription affects formation and processing of intermediates in oligonucleotide-mediated gene alteration, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 2659-2670.
- Igoucheva, O., V. Alexeev and K. Yoon Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells, *Gene Ther* 8 (2001) 391-399.
- Igoucheva, O., V. Alexeev and K. Yoon Nuclear extracts promote gene correction and strand pairing of oligonucleotides to the homologous plasmid, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12 (2002) 235-246.
- Igoucheva, O., V. Alexeev and K. Yoon Mechanism of gene repair open for discussion, *Oligonucleotides* 14 (2004) 311-321.
- Igoucheva, O. and K. Yoon Targeted single-base correction by RNA-DNA oligonucleotides, *Hum Gene Ther* 11 (2000) 2307-2312.
- Im, D.S. and N. Muzyczka Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats, *J Virol* 63 (1989) 3095-3104.
- Inoue, N., R. Dong, R.K. Hirata and D.W. Russell Introduction of single base substitutions at homologous chromosomal sequences by adeno-associated virus vectors, *Mol Ther* 3 (2001) 526-530.
- Inoue, N., R.K. Hirata and D.W. Russell High-fidelity correction of mutations at multiple chromosomal positions by adeno-associated virus vectors, *J Virol* 73 (1999) 7376-7380.
- Isman, O., M.L. Roberts, J.E. Morgan, I.R. Graham, K. Goldring, D.J. Lawrence-Watt, Q.L. Lu, M.G. Dunkley, A.C. Porter, T.A. Partridge and G. Dickson Adenovirus-Based Targeting in Myoblasts Is Hampered by Nonhomologous Vector Integration, *Human Gene Therapy* (2008).
- Jackson, D.A., R.H. Symons and P. Berg 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 (1972) 2904-2909.
- Jepsen, J.S., M.D. Sorensen and J. Wengel Locked nucleic acid: a potent nucleic acid analog in therapeutics and biotechnology, *Oligonucleotides* 14 (2004) 130-146.
- Jiricny, J. Replication errors: cha(lle)nging the genome, *EMBO J* 17 (1998) 6427-6436.
- Kashiwakura, Y., K. Tamayose, K. Iwabuchi, Y. Hirai, T. Shimada, K. Matsumoto, T. Nakamura, M. Watanabe, K. Oshimi and H. Daida Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection, *J Virol* 79 (2005) 609-614.
- Kay, M.A., J.C. Glorioso and L. Naldini Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics, *Nat Med* 7 (2001) 33-40.
- Khanahmad, H., M.R. Noori Dalooi, M.A. Shokrgozar, K. Azadmanesh, A.R. Niavarani, M. Karimi, B. Rabbani, M. Khalili, R. Bagheri, F. Maryami and S. Zeinali A novel single step double positive double negative selection strategy for beta-globin gene replacement, *Biochem Biophys Res Commun* 345 (2006) 14-20. Epub 2006 Apr 2025.
- King, J.A., R. Dubielzig, D. Grimm and J.A. Kleinschmidt DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids, *EMBO J* 20 (2001) 3282-3291.

- Knauert, M.P., J.M. Kalish, D.C. Hegan and P.M. Glazer Triplex-stimulated intermolecular recombination at a single-copy genomic target, *Mol Ther* 14 (2006) 392-400. Epub 2006 May 2030.
- Kohli, M., C. Rago, C. Lengauer, K.W. Kinzler and B. Vogelstein Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) e3.
- Koller, B.H., L.J. Hagemann, T. Doetschman, J.R. Hagaman, S. Huang, P.J. Williams, N.L. First, N. Maeda and O. Smithies Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 8927-8931.
- Kotin, R.M., J.C. Menninger, D.C. Ward and K.I. Berns Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter, *Genomics* 10 (1991) 831-834.
- Kotin, R.M., M. Siniscalco, R.J. Samulski, X.D. Zhu, L. Hunter, C.A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi and K.I. Berns Site-specific integration by adeno-associated virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 2211-2215.
- Kowalczykowski, S.C., D.A. Dixon, A.K. Eggleston, S.D. Lauder and W.M. Rehrauer Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*, *Microbiol Rev* 58 (1994) 401-465.
- Kren, B.T., A. Cole-Strauss, E.B. Kmiec and C.J. Steer Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of HuH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide, *Hepatology* 25 (1997) 1462-1468.
- Kuehn, M.R., A. Bradley, E.J. Robertson and M.J. Evans A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice, *Nature* 326 (1987) 295-298.
- Kunzelmann, K., J.Y. Legendre, D.L. Knoell, L.C. Escobar, Z. Xu and D.C. Gruenert Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells, *Gene Ther* 3 (1996) 859-867.
- Lahue, R.S., K.G. Au and P. Modrich DNA mismatch correction in a defined system, *Science* 245 (1989) 160-164.
- Leung, W., A. Malkova and J.E. Haber Gene targeting by linear duplex DNA frequently occurs by assimilation of a single strand that is subject to preferential mismatch correction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 6851-6856.
- Lewin, A.S., P.M. Glazer and L.M. Milstone Gene therapy for autosomal dominant disorders of keratin, *J Invest Dermatol Symp Proc* 10 (2005) 47-61.
- Li, J., L.R. Read and M.D. Baker The mechanism of mammalian gene replacement is consistent with the formation of long regions of heteroduplex DNA associated with two crossing-over events, *Mol Cell Biol* 21 (2001) 501-510.
- Li, X.T., N. Costantino, L.Y. Lu, D.P. Liu, R.M. Watt, K.S. Cheah, D.L. Court and J.D. Huang Identification of factors influencing strand bias in oligonucleotide-mediated recombination in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 6674-6687.
- Lin, F.L., K. Sperle and N. Sternberg Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 1391-1395.
- Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature* 362 (1993) 709-715.
- Liu, L., S. Cheng, A.J. van Brabant and E.B. Kmiec Rad51p and Rad54p, but not Rad52p, elevate gene repair in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded oligonucleotide vectors, *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 2742-2750.

- Liu, X., Z. Yan, M. Luo, R. Zak, Z. Li, R.R. Driskell, Y. Huang, N. Tran and J.F. Engelhardt Targeted correction of single-base-pair mutations with adeno-associated virus vectors under nonselective conditions, *J Virol* 78 (2004) 4165-4175.
- Lombardo, A., P. Genovese, C.M. Beausejour, S. Colleoni, Y.L. Lee, K.A. Kim, D. Ando, F.D. Urnov, C. Galli, P.D. Gregory, M.C. Holmes and L. Naldini Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery, *Nat Biotechnol* 25 (2007) 1298-1306. Epub 2007 Oct 1228.
- Lu, I.L., C.Y. Lin, S.B. Lin, S.T. Chen, L.Y. Yeh, F.Y. Yang and L.C. Au Correction/mutation of acid alpha-D-glucosidase gene by modified single-stranded oligonucleotides: in vitro and in vivo studies, *Gene Ther* 10 (2003) 1910-1916.
- Maguire, K.K. and E.B. Kmiec Enhancement of in vivo targeted nucleotide exchange by nonspecific carrier DNA, *Methods Mol Biol* 262 (2004) 209-219.
- Maguire, K.K. and E.B. Kmiec Multiple roles for MSH2 in the repair of a deletion mutation directed by modified single-stranded oligonucleotides, *Gene* 386 (2007) 107-114. Epub 2006 Aug 2026.
- Mansour, S.L., K.R. Thomas, C.X. Deng and M.R. Capecchi Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse int-2 locus by homologous recombination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 7688-7692.
- Manzano, A., Z. Mohri, G. Sperber, M. Ogris, I. Graham, G. Dickson and J.S. Owen Failure to generate atheroprotective apolipoprotein AI phenotypes using synthetic RNA/DNA oligonucleotides (chimeraplasts), *J Gene Med* 5 (2003) 795-802.
- Maurisse, R., J.P. Feugeas, E. Biet, I. Kuzniak, P. Leboulch, M. Dutreix and J.S. Sun A new method (GOREC) for directed mutagenesis and gene repair by homologous recombination, *Gene Ther* 9 (2002) 703-707.
- Maurisse, R., Y. Fichou, D. De Semir, J. Cheung, C. Ferec and D.C. Gruenert Gel purification of genomic DNA removes contaminating small DNA fragments interfering with polymerase chain reaction analysis of small fragment homologous replacement, *Oligonucleotides* 16 (2006) 375-386.
- Mazin, A.V., E. Zaitseva, P. Sung and S.C. Kowalczykowski Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing, *EMBO J* 19 (2000) 1148-1156.
- McIlwraith, M.J., E. Van Dyck, J.Y. Masson, A.Z. Stasiak, A. Stasiak and S.C. West Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins, *J Mol Biol* 304 (2000) 151-164.
- Meselson, M. and F.W. Stahl The replication of DNA, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 23 (1958) 9-12.
- Miescher, F. *Medicinischem-chemische Untersuchungen* (1871).
- Miller, D.G., L.M. Petek and D.W. Russell Human gene targeting by adeno-associated virus vectors is enhanced by DNA double-strand breaks, *Mol Cell Biol* 23 (2003) 3550-3557.
- Miller, D.G., P.R. Wang, L.M. Petek, R.K. Hirata, M.S. Sands and D.W. Russell Gene targeting in vivo by adeno-associated virus vectors, *Nat Biotechnol* 24 (2006) 1022-1026. Epub 2006 Jul 1030.
- Miller, W.L. and J.D. Baxter Recombinant DNA--a new source of insulin, *Diabetologia* 18 (1980) 431-436.
- Mitani, K., M. Wakamiya, P. Hasty, F.L. Graham, A. Bradley and C.T. Caskey Gene targeting in mouse embryonic stem cells with an adenoviral vector, *Somat Cell Mol Genet* 21 (1995) 221-231.
- Modesti, M. and R. Kanaar Homologous recombination: from model organisms to human disease, *Genome Biol* 2 (2001) REVIEWS1014. Epub 2001 Apr 1026.
- Modrich, P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair, *Annu Rev Genet* 25 (1991) 229-253.

- Modrich, P. and R. Lahue Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology, *Annu Rev Biochem* 65 (1996) 101-133.
- Mon, H., T. Kusakabe, J.M. Lee, Y. Kawaguchi and K. Koga In vivo DNA double-strand breaks enhance gene targeting in cultured silkworm cells, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139 (2004) 99-106.
- Morange, M. Histoire de la biologie moléculaire, La Découverte, Paris, 1994.
- Morrow, J.F. and P. Berg Cleavage of Simian virus 40 DNA at a unique site by a bacterial restriction enzyme, *Proc Natl Acad Sci U S A* 69 (1972) 3365-3369.
- Morrow, J.F., S.N. Cohen, A.C. Chang, H.W. Boyer, H.M. Goodman and R.B. Helling Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (1974) 1743-1747.
- Nairn, R.S., G.M. Adair, T. Porter, S.L. Pennington, D.G. Smith, J.H. Wilson and M.M. Seidman Targeting vector configuration and method of gene transfer influence targeted correction of the APRT gene in Chinese hamster ovary cells, *Somat Cell Mol Genet* 19 (1993) 363-375.
- Namsaraev, E.A. and P. Berg Branch migration during Rad51-promoted strand exchange proceeds in either direction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 10477-10481.
- Ni, T.H., W.F. McDonald, I. Zolotukhin, T. Melendy, S. Waga, B. Stillman and N. Muzyczka Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection, *J Virol* 72 (1998) 2777-2787.
- Nick McElhinny, S.A., C.M. Snowden, J. McCarville and D.A. Ramsden Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends, *Mol Cell Biol* 20 (2000) 2996-3003.
- Nickerson, H.D. and W.H. Colledge A comparison of gene repair strategies in cell culture using a lacZ reporter system, *Gene Ther* 10 (2003) 1584-1591.
- Ogawa, T., X. Yu, A. Shinohara and E.H. Egelman Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament, *Science* 259 (1993) 1896-1899.
- Ohbayashi, F., M.A. Balamotis, A. Kishimoto, E. Aizawa, A. Diaz, P. Hasty, F.L. Graham, C.T. Caskey and K. Mitani Correction of chromosomal mutation and random integration in embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 13628-13633. Epub 12005 Sep 13627.
- Olsen, P.A., C. McKeen and S. Krauss Branched oligonucleotides induce in vivo gene conversion of a mutated EGFP reporter, *Gene Ther* 10 (2003) 1830-1840.
- Olsen, P.A., M. Randol and S. Krauss Implications of cell cycle progression on functional sequence correction by short single-stranded DNA oligonucleotides, *Gene Ther* 12 (2005) 546-551.
- Palmiter, R.D., R.L. Brinster, R.E. Hammer, M.E. Trumbauer, M.G. Rosenfeld, N.C. Birnberg and R.M. Evans Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes, *Nature* 300 (1982) 611-615.
- Paques, F. and J.E. Haber Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (1999) 349-404.
- Parekh-Olmedo, H., M. Drury and E.B. Kmiec Targeted nucleotide exchange in *Saccharomyces cerevisiae* directed by short oligonucleotides containing locked nucleic acids, *Chem Biol* 9 (2002) 1073-1084.
- Parekh-Olmedo, H., J.U. Engstrom and E.B. Kmiec The effect of hydroxyurea and trichostatin a on targeted nucleotide exchange in yeast and Mammalian cells, *Ann N Y Acad Sci* 1002 (2003) 43-55.
- Parekh-Olmedo, H., L. Ferrara, E. Brachman and E.B. Kmiec Gene therapy progress and prospects: targeted gene repair, *Gene Ther* 12 (2005) 639-646.

- Pereira, D.J., D.M. McCarty and N. Muzyczka 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 (1997) 1079-1088.
- Pierce, E.A., Q. Liu, O. Igoucheva, R. Omarrudin, H. Ma, S.L. Diamond and K. Yoon Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells, *Gene Ther* 10 (2003) 24-33.
- Porteus, M.H. Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases, *Mol Ther* 13 (2006) 438-446. Epub 2005 Sep 2019.
- Porteus, M.H., T. Cathomen, M.D. Weitzman and D. Baltimore Efficient gene targeting mediated by adeno-associated virus and DNA double-strand breaks, *Mol Cell Biol* 23 (2003) 3558-3565.
- Qing, K., C. Mah, J. Hansen, S. Zhou, V. Dwarki and A. Srivastava Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2, *Nat Med* 5 (1999) 71-77.
- Radecke, F., I. Peter, S. Radecke, K. Gellhaus, K. Schwarz and T. Cathomen Targeted chromosomal gene modification in human cells by single-stranded oligodeoxynucleotides in the presence of a DNA double-strand break, *Mol Ther* 14 (2006) 798-808. Epub 2006 Aug 2014.
- Radecke, F., S. Radecke and K. Schwarz Unmodified oligodeoxynucleotides require single-strandedness to induce targeted repair of a chromosomal EGFP gene, *J Gene Med* 6 (2004) 1257-1271.
- Richardson, C. and M. Jasin Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells, *Mol Cell Biol* 20 (2000) 9068-9075.
- Ristic, D., C. Wyman, C. Paulusma and R. Kanaar The architecture of the human Rad54-DNA complex provides evidence for protein translocation along DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 8454-8460.
- Russell, D.W., I.E. Alexander and A.D. Miller DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 5719-5723.
- Russell, D.W. and R.K. Hirata Human gene targeting by viral vectors, *Nat Genet* 18 (1998) 325-330.
- Russell, D.W., A.D. Miller and I.E. Alexander Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 8915-8919.
- Saintigny, Y., F. Delacote, G. Vares, F. Petitot, S. Lambert, D. Averbeck and B.S. Lopez Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells, *EMBO J* 20 (2001) 3861-3870.
- Samulski, R.J., X. Zhu, X. Xiao, J.D. Brook, D.E. Housman, N. Epstein and L.A. Hunter Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19, *EMBO J* 10 (1991) 3941-3950.
- Sangiulo, F., E. Bruscia, A. Serafino, A.M. Nardone, E. Bonifazi, M. Lais, D.C. Gruenert and G. Novelli In vitro correction of cystic fibrosis epithelial cell lines by small fragment homologous replacement (SFHR) technique, *BMC Med Genet* 3 (2002) 8.
- Sangiulo, F., A. Filareto, P. Spitalieri, M.L. Scaldaferri, R. Mango, E. Bruscia, G. Citro, E. Brunetti, M. De Felici and G. Novelli In vitro restoration of functional SMN protein in human trophoblast cells affected by spinal muscular atrophy by small fragment homologous replacement, *Hum Gene Ther* 16 (2005) 869-880.
- Sangiulo, F., M.L. Scaldaferri, A. Filareto, P. Spitalieri, L. Guerra, M. Favia, R. Caroppo, R. Mango, E. Bruscia, D.C. Gruenert, V. Casavola, M. De Felici and G. Novelli Cftr gene targeting in mouse embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR), *Front Biosci* 13 (2008) 2989-2999.
- Sargent, R.G., M.A. Brenneman and J.H. Wilson Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination, *Mol Cell Biol* 17 (1997) 267-277.

- Scharer, O.D. Chemistry and biology of DNA repair, *Angew Chem Int Ed Engl* 42 (2003) 2946-2974.
- Scheerer, J.B. and G.M. Adair Homology dependence of targeted recombination at the Chinese hamster APRT locus, *Mol Cell Biol* 14 (1994) 6663-6673.
- Schrödinger, E. What is a life? The Physical Aspect of the Living Cell, Cambridge University Press, Cambridge, 1944.
- Seidman, M.M. and P.M. Glazer The potential for gene repair via triple helix formation, *J Clin Invest* 112 (2003) 487-494.
- Seisenberger, G., M.U. Ried, T. Endress, H. Buning, M. Hallek and C. Brauchle Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus, *Science* 294 (2001) 1929-1932.
- Selden, R.F., M.W. Heartlein and D. Treco Eur. Patent EP 0 649 464 B1, (1992).
- Shah-Mahoney, N., T. Hampton, R. Vidaver and D. Ratner Blocking the ends of transforming DNA enhances gene targeting in *Dictyostelium*, *Gene* 203 (1997) 33-41.
- Shang, X.Y., D.L. Hao, X.S. Wu, W.X. Yin, Z.C. Guo, D.P. Liu and C.C. Liang Improvement of SSO-mediated gene repair efficiency by nonspecific oligonucleotides, *Biochem Biophys Res Commun* 376 (2008) 74-79. Epub 2008 Sep 2002.
- Shulman, M.J., L. Nissen and C. Collins Homologous recombination in hybridoma cells: dependence on time and fragment length, *Mol Cell Biol* 10 (1990) 4466-4472.
- Smih, F., P. Rouet, P.J. Romanienko and M. Jasin Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells, *Nucleic Acids Res* 23 (1995) 5012-5019.
- Smith, G.C. and S.P. Jackson The DNA-dependent protein kinase, *Genes Dev* 13 (1999) 916-934.
- Smithies, O., R.G. Gregg, S.S. Boggs, M.A. Koralewski and R.S. Kucherlapati Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination, *Nature* 317 (1985) 230-234.
- Srivastava, A., E.W. Lusby and K.I. Berns Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome, *J Virol* 45 (1983) 555-564.
- Stracker, T.H., G.D. Cassell, P. Ward, Y.M. Loo, B. van Breukelen, S.D. Carrington-Lawrence, R.K. Hamatake, P.C. van der Vliet, S.K. Weller, T. Melendy and M.D. Weitzman The Rep protein of adeno-associated virus type 2 interacts with single-stranded DNA-binding proteins that enhance viral replication, *J Virol* 78 (2004) 441-453.
- Summerford, C., J.S. Bartlett and R.J. Samulski AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection, *Nat Med* 5 (1999) 78-82.
- Summerford, C. and R.J. Samulski Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions, *J Virol* 72 (1998) 1438-1445.
- Sung, P. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein, *Science* 265 (1994) 1241-1243.
- Sung, P. Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase, *Genes Dev* 11 (1997) 1111-1121.
- Suzuki, T., A. Murai and T. Muramatsu Low-dose bleomycin induces targeted gene repair frequency in cultured melan-c cells using chimeric RNA/DNA oligonucleotide transfection, *Int J Mol Med* 12 (2003) 109-114.
- Szankasi, P. and G.R. Smith A role for exonuclease I from *S. pombe* in mutation avoidance and mismatch correction, *Science* 267 (1995) 1166-1169.

- Szostak, J.W., T.L. Orr-Weaver, R.J. Rothstein and F.W. Stahl The double-strand-break repair model for recombination, *Cell* 33 (1983) 25-35.
- Taghian, D.G. and J.A. Nickoloff Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells, *Mol Cell Biol* 17 (1997) 6386-6393.
- Takata, M., M.S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara and S. Takeda Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *EMBO J* 17 (1998) 5497-5508.
- Taubes, G. Gene therapy. The strange case of chimeraplasty, *Science* 298 (2002) 2116-2120.
- te Riele, H., E.R. Maandag and A. Berns Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 5128-5132.
- Thacker, J. A surfeit of RAD51-like genes? *Trends Genet* 15 (1999) 166-168.
- Thomas, K.R. and M.R. Capecchi Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, *Cell* 51 (1987) 503-512.
- Thomas, K.R., K.R. Folger and M.R. Capecchi High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome, *Cell* 44 (1986) 419-428.
- Thompson, L.H. and D. Schild Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability, *Mutat Res* 477 (2001) 131-153.
- Thorpe, P., B.J. Stevenson and D.J. Porteous Optimising gene repair strategies in cell culture, *Gene Ther* 9 (2002) 700-702.
- Tobiasch, E., T. Burguete, P. Klein-Bauernschmitt, R. Heilbronn and J.R. Schlehofer Discrimination between different types of human adeno-associated viruses in clinical samples by PCR, *J Virol Methods* 71 (1998) 17-25.
- Tran, N.D., X. Liu, Z. Yan, D. Abbotte, Q. Jiang, E.B. Kmiec, C.D. Sigmund and J.F. Engelhardt Efficiency of chimeraplast gene targeting by direct nuclear injection using a GFP recovery assay, *Mol Ther* 7 (2003) 248-253.
- Tran, P.T., J.A. Simon and R.M. Liskay Interactions of Exo1p with components of MutLalpha in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 9760-9765. Epub 2001 Jul 9731.
- Trobridge, G., R.K. Hirata and D.W. Russell Gene targeting by adeno-associated virus vectors is cell-cycle dependent, *Hum Gene Ther* 16 (2005) 522-526.
- Tsuchiya, H., H. Harashima and H. Kamiya Factors affecting SFHR gene correction efficiency with single-stranded DNA fragment, *Biochem Biophys Res Commun* 336 (2005) 1194-1200.
- Tsuchiya, H., H. Harashima and H. Kamiya Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA, *J Gene Med* 7 (2005) 486-493.
- Tsuchiya, H., T. Sawamura, H. Harashima and H. Kamiya Correction of frameshift mutations with single-stranded and double-stranded DNA fragments prepared from phagemid/plasmid DNAs, *Biol Pharm Bull* 28 (2005) 1958-1962.
- Tsuchiya, H., M. Uchiyama, K. Hara, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, H. Inoue, H. Harashima and H. Kamiya Improved gene correction efficiency with a tailed duplex DNA fragment, *Biochemistry* 47 (2008) 8754-8759. Epub 2008 Jul 8722.

- Urnov, F.D., J.C. Miller, Y.L. Lee, C.M. Beausejour, J.M. Rock, S. Augustus, A.C. Jamieson, M.H. Porteus, P.D. Gregory and M.C. Holmes Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases, *Nature* 435 (2005) 646-651. Epub 2005 Apr 2003.
- van der Steege, G., P.H. Schuilenga-Hut, C.H. Buys, H. Scheffer, H.H. Pas and M.F. Jonkman Persistent failures in gene repair, *Nat Biotechnol* 19 (2001) 305-306.
- van Deursen, J. and B. Wieringa Targeting of the creatine kinase M gene in embryonic stem cells using isogenic and nonisogenic vectors, *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 3815-3820.
- Van Komen, S., G. Petukhova, S. Sigurdsson, S. Stratton and P. Sung Superhelicity-driven homologous DNA pairing by yeast recombination factors Rad51 and Rad54, *Mol Cell* 6 (2000) 563-572.
- Vester, B. and J. Wengel LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA, *Biochemistry* 43 (2004) 13233-13241.
- Waldman, B.C., J.R. O'Quinn and A.S. Waldman Enrichment for gene targeting in mammalian cells by inhibition of poly(ADP-ribosylation), *Biochim Biophys Acta* 1308 (1996) 241-250.
- Wang, Z., Z.J. Zhou, D.P. Liu and J.D. Huang Double-stranded break can be repaired by single-stranded oligonucleotides via the ATM/ATR pathway in mammalian cells, *Oligonucleotides* 18 (2008) 21-32.
- Watson, J.D. and F.H. Crick Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* 171 (1953) 737-738.
- Winocour, E., M.F. Callaham and E. Huberman Perturbation of the cell cycle by adeno-associated virus, *Virology* 167 (1988) 393-399.
- Wong, E.A. and M.R. Capecchi Homologous recombination between coinjected DNA sequences peaks in early to mid-S phase, *Mol Cell Biol* 7 (1987) 2294-2295.
- Wu, X.S., L. Xin, W.X. Yin, X.Y. Shang, L. Lu, R.M. Watt, K.S. Cheah, J.D. Huang, D.P. Liu and C.C. Liang Increased efficiency of oligonucleotide-mediated gene repair through slowing replication fork progression, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 2508-2513. Epub 2005 Feb 2504.
- Xiao, W., K.H. Warrington, Jr., P. Hearing, J. Hughes and N. Muzyczka Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2, *J Virol* 76 (2002) 11505-11517.
- Yin, W.X., X.S. Wu, G. Liu, Z.H. Li, R.M. Watt, J.D. Huang, D.P. Liu and C.C. Liang Targeted correction of a chromosomal point mutation by modified single-stranded oligonucleotides in a GFP recovery system, *Biochem Biophys Res Commun* 334 (2005) 1032-1041.
- Yoon, K., A. Cole-Strauss and E.B. Kmiec Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA.DNA oligonucleotide, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 2071-2076.
- Yoon, K., O. Igoucheva and V. Alexeev Expectations and reality in gene repair, *Nat Biotechnol* 20 (2002) 1197-1198.
- Zayed, H., R.S. McIvor, D.L. Wiest and B.R. Blazar In vitro functional correction of the mutation responsible for murine severe combined immune deficiency by small fragment homologous replacement, *Hum Gene Ther* 17 (2006) 158-166.
- Zheng, H., P. Hasty, M.A. Brenneman, M. Grompe, R.A. Gibbs, J.H. Wilson and A. Bradley Fidelity of targeted recombination in human fibroblasts and murine embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 8067-8071.
- Zorin, B., P. Hegemann and I. Sizova Nuclear-gene targeting by using single-stranded DNA avoids illegitimate DNA integration in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot Cell* 4 (2005) 1264-1272.

PUBLICATION