

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE: 2022

THESE 2022/TOU3/2047

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

Fabien ROBERT

**Etude *in-vivo* d'un nouveau vecteur lentiviral
dans le traitement de la drépanocytose
par thérapie génique**

Date de soutenance

12 septembre 2022

Co-directrices de thèse :

Dr. Karine SII-FELICE et Dr. Isabelle LAJOIE-MAZENC

JURY

Président :	Pr. Elisa BOUTET
1er assesseur :	Pr. Bettina COUDERC
2ème assesseur :	Dr. Isabelle LAJOIE-MAZENC
3ème assesseur :	Dr. Karine SII-FELICE





PERSONNEL ENSEIGNANT

de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2020

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie Analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie – Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie – Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie – Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie Pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie – Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie Analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie Analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie – Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie – Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTA A. (*)	Parasitologie
Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique

Attaché Temporaire d'Enseignement
et de Recherche (ATER)

M. TOUBLET F-X.	Chimie Thérapeutique
-----------------	----------------------

REMERCIEMENTS

À ma co-directrice de thèse, Karine Sii-Felice,

Je te remercie pour ton accompagnement tout au long de cette aventure, de ces journées au laboratoire, de ce travail intense et de ta passion pour le métier, mais aussi tous ces bons moments et ta bonne humeur.

À ma co-directrice de thèse, Isabelle Lajoie-Mazenc,

Je vous remercie pour votre encadrement et votre accompagnement durant ces années d'étude de pharmacie, et je suis honoré de finir ce beau cursus à vos côtés pour ma thèse d'exercice de pharmacien.

Aux membres du Jury, Elisa Boutet et Bettina Couderc

Je vous remercie pour votre temps et votre investissement durant cette thèse, mais aussi pour vos enseignements et votre accompagnement.

Au chef d'équipe de mon laboratoire d'accueil, Emmanuel Payen

Je te remercie pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire pour y effectuer ce beau projet, et pour m'avoir consacré ton temps, tes conseils et tes connaissances.

À toute l'équipe de mon laboratoire d'accueil,

Et je remercie particulièrement Camille Filardo pour sa bonne humeur à la paillasse !

À Juan,

Je te remercie pour ta présence au quotidien, ta bonne humeur, pour ton aide et ton soutien scientifique et technique durant cette thèse, et aussi pour tous ces bons moments.

À toute ma famille,

Je vous remercie particulièrement pour votre soutien sans faille, vos encouragements et votre amour.

Aux copains de la faculté de pharmacie,

Je vous remercie pour ces belles années de fac, ces soirées d'intégration et de désintégration, cette bonne ambiance et ces souvenirs inoubliables.

Aux copains de Toulouse,

Je vous remercie pour ces merveilleux moments et pour toutes ces soirées, passées et futurs.

Aux copains d'enfance de Perpignan,

Merci pour me supporter depuis toutes ces années et pour ces belles amitiés qui durent depuis longtemps.

À mes colocataires Rue des Roses,

Je vous remercie pour m'avoir supporté durant les mois de réalisation de ce beau projet de thèse d'exercice, m'avoir fait répéter et améliorer mon accent anglais.

À mon laboratoire actuel pour ma thèse de Science, INSERM UMR-S999,

Merci pour me supporter et m'accompagner dans la suite de mon projet professionnel après la faculté de pharmacie, et pour m'avoir aidé et fait répéter ma thèse d'exercice.

TABLE DES MATIERES

PERSONNEL ENSEIGNANT	I
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIERES	IV
ABBREVIATIONS	VII
LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX	IX
1. INTRODUCTION	1
1.1. Erythroïèse	1
1.2. Hémoglobine	2
1.2.1. Les différentes hémoglobines	2
1.2.2. Hémoglobine et développement	3
1.2.3. Les différents gènes impliqués	5
1.3. La drépanocytose	5
1.3.1. Les hémoglobinopathies	5
1.3.2. La distribution géographique	6
1.3.3. Physiopathologie de la drépanocytose	8
1.3.4. Les manifestations cliniques	11
1.4. Prise en charge de la drépanocytose	11
1.4.1. Dépistage en France	11
1.4.2. Prise en charge et traitements symptomatiques	13
1.4.3. Les traitements curatifs	14
1.5. La thérapie génique	15
1.5.1. Généralités sur la thérapie génique	15
1.5.2. Le choix du vecteur	16
1.6. Thérapie génique chez les patients drépanocytaires	17
1.6.1. Edition génomique à l'aide de nucléase	18
1.6.2. Addition de gène à l'aide de LVV	20
1.7. Suspensions d'effets indésirables liés à l'utilisation de BB305	22
1.7.1. 2020 : Syndrome myélodysplasique	22
1.7.2. En 2021 : Suspicion de syndrome myélodysplasique et leucémie aigüe myéloïde	23
1.7.3. Aucun cas d'oncogenèse rapporté	23
1.8. Futurs défis dans la thérapie génique pour le traitement de la drépanocytose	24
1.8.1. Sélection des cellules transduites	24
1.8.2. Optimisation thérapeutique du vecteur	25

2. CONTEXTE SCIENTIFIQUE DU PROJET	27
2.1. Hypothèse	27
2.1.1. α -thalassémie, drépanocytose et amélioration clinique	27
2.1.2. α -thalassémie, trait-drépanocytaire et chaînes de globines	28
2.1.3. Importance de l'affinité entre les chaînes de globines	28
2.1.4. Hypothèse de recherche	29
2.2. Historique de LVβ-shα2	30
2.3. Objectif de ces travaux	31
3. MATERIELS ET METHODES	32
3.1. Souris	32
3.2. Isoélectrofocalisation	33
3.3. Production des LVV et titration	34
3.4. Enrichissement en CSH	34
3.4.1. En utilisant du 5-fluorouracile	34
3.4.2. En utilisant la déplétion en cellules hématopoïétiques différenciées	35
3.5. Culture et transduction des CSH	35
3.6. Transplantation	36
3.7. Extraction d'ADN et qPCR pour la détermination du VCN moyen	37
3.8. Extraction d'ARN, transcription inverse et qPCR	38
3.9. Analyse de la déformation des globules rouges	39
3.10. Hématologie	39
3.11. Cytométrie	40
3.11.1. CFC exprimant la GFP	40
3.11.2. Cellules Lin-/low	40
3.11.3. Prise de greffe	40
3.12. Analyses statistiques	41
3.12.1. t-test de Student	41
3.12.2. Modèle mathématique de corrélation entre le ratio des ARNm α -globine/ β -globine et le VCN	41
4. RESULTATS	42
4.1. Mise en place et choix de la méthode d'enrichissement en CSH et du milieu de culture des cellules transduites avant transplantation	44
4.2. Mise en place de l'expérience d'analyse de déformation des globules rouges	45
4.2.1. Déformation à 1% d'oxygène	49
4.2.2. Cellules déformées permanentes circulantes et cycles de désoxygénation/réoxygénation	49
4.2.3. Paliers de désoxygénation	50
4.2.4. Déformation à 3% d'oxygène	50
4.2.5. Déformation en faucille	51

4.2.6.	Conclusion et protocole final	51
4.3.	Evaluation de LVβ-shα2 <i>in-vivo</i>	53
4.3.1.	Analyse de la transduction des CSH	53
4.3.2.	Analyse de la NFS	54
4.3.3.	Analyse de la prise de greffe	56
4.3.4.	Analyse du VCN	56
4.3.5.	Analyse des ARNm humain	57
4.3.6.	Expression relative des chaines de globines	59
4.3.7.	Déformation des globules rouges	59
5.	DISCUSSION	63
5.1.	Conclusions des résultats du projet	63
5.2.	Hypothèses pour expliquer l'absence d'amélioration phénotypique malgré l'effet moléculaire	64
5.2.1.	Hypothèse 1 : Conditions d'expérimentation	65
5.2.2.	Hypothèse 2 : Analyse trop précoce	66
5.2.3.	Hypothèse 3 : Modèle inadapté	66
6.	PERSPECTIVES	68
6.1.	Transduction et différenciation de CSH de patients drépanocytaires <i>in-vitro</i>	68
6.2.	Utilisation de lignée érythroïde <i>in-vitro</i>	68
6.3.	Transplantation de CSH de patients drépanocytaires dans un modèle murin humanisé	69
	ANNEXES	70
	Annexe 1. Protocole de dépistage néonatale de la drépanocytose chez les enfants à risque (VIDAL Recos, 2022).	70
	Annexe 2. Prise en charge des complications de la drépanocytose chez l'enfant et l'adolescent (VIDAL Recos, 2022).	71
	BIBLIOGRAPHIE	72
	SERMENT DE GALIEN	79
	SUMMARY IN ENGLISH	81
	RESUME EN FRANÇAIS	82

ABBREVIATIONS

5-Fu	5-Fluorouracile
AAV	Virus adéno-associés <i>Adeno Associated Virus</i>
ADNc	ADN complémentaire
AVC	Accidents Vasculaires Cérébraux
CCMH	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CD	Cluster de Différenciation
CFC	Cellules progénitrices capable de former une colonie <i>Colony Forming Cells</i>
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Pression
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
EMA	<i>European Medecine Agency</i>
EPO	Erythropoïétine
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
Hb	Hémoglobine
HbA	Hémoglobine A
HbA ^{T87Q}	Hémoglobine thérapeutique portant la mutation Thr87Gln
HbAS	Trait Drépanocytaire (allèle $\beta^A\beta^S$)
HbF	Hémoglobine Foetal
HbS	Hémoglobine S drépanocytaire <i>Sickle Hemoglobine</i>
IEF	Isoelectrofocalisation
IL	Interleukine
LTR	Séquence terminale longue répétée <i>Long Terminal Repeat Sequence</i>

LVV	Vecteurs lentiviraux <i>Lentiviral Vector</i>
MOI	Multiplicité d'infection <i>Multiplicity Of Infection</i>
NHEJ	System de jonction d'extrémités non-homologues <i>Non-Homologous End-Joining</i>
NO	Monoxyde d'azote / Oxyde nitrique
NT	Non-transduites
pKi	Point Isoélectrique
PO ₂	Pression partielle en oxygène
qPCR	Réaction de polymérisation en chaine quantitative <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RP-HPLC	Chromatographie en phase inverse <i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic Method</i>
SCF	Facteur de croissance de cellules souches <i>Stem Cell Factor</i>
shARN	Petit ARN en épingle à cheveux <i>Short Hairpin RNA</i>
SMD	Syndrome MyéloDysplasique
SUSAR	Suspensions d'effets indésirables graves inattendus <i>Suspected Unexpected Serious Adverse Reactions</i>
SVF	Sérum de Veau Fœtal
UTR	Régions non-traduites <i>Untranslated Regions</i>
VCN	Nombre de copie de vecteur lentiviral par cellule <i>Vector Copy Number</i>
WT	Sauvage <i>Wild-Type</i>

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figures

Figure 1. Les différentes étapes de l'érythropoïèse.	1
Figure 2. Structure quaternaire de l'hémoglobine.	3
Figure 3. Les différentes chaînes de globines.	4
Figure 4. Cartes du monde de la drépanocytose et du paludisme.	7
Figure 5. Physiopathologie de la drépanocytose.....	10
Figure 6. Acteurs français dans la politique de dépistage néonatale de la drépanocytose. ...	12
Figure 7. Critères de dépistage de la drépanocytose des nouveau-nés en France métropolitaine.....	12
Figure 8. Utilisation des adénovirus, virus adéno-associés et lentivirus dans des essais cliniques.	15
Figure 9. Essais cliniques utilisant la thérapie génique pour la drépanocytose en 2020.....	18
Figure 10. Représentation des LVV.	26
Figure 11. Choix du milieu de culture et d'enrichissement en CSH.	43
Figure 12. Environnement et taux d'oxygène auxquels sont confrontés les cellules dans les vaisseaux sanguins chez l'Homme.....	45
Figure 13. Analyse de la proportion de globules rouges déformés en condition hypoxique.	47
Figure 14. Photos de globules rouges en condition hypoxique.	48
Figure 15. Schéma récapitulatif du protocole final choisi pour l'analyse de déformation future chez les souris transplantées.	52
Figure 16. Protocole expérimental des expériences de transplantations	53
Figure 17. Transplantation de cellules transduites provenant de souris SAD dans des souris syngéniques C57BL/6J CD45.1.....	55
Figure 18. Analyse des ARNm humains dans les souris transplantées.....	58
Figure 19. Pourcentage de globules rouges déformés chez les souris transplantées selon le groupe BB305 ou LV β -sh α 2 en fonction du VCN 2 mois post-transplantation.	61
Figure 20. Photo de globules rouges des souris transplantées avec les cellules transduites au microscope confocal.....	62

Tableaux

Tableau 1. Sondes / amorces utilisées pour le calcul des VCN et des analyses RT-qPCR..	39
Tableau 2. NFS.....	54

1. INTRODUCTION

1.1. Erythropoïèse

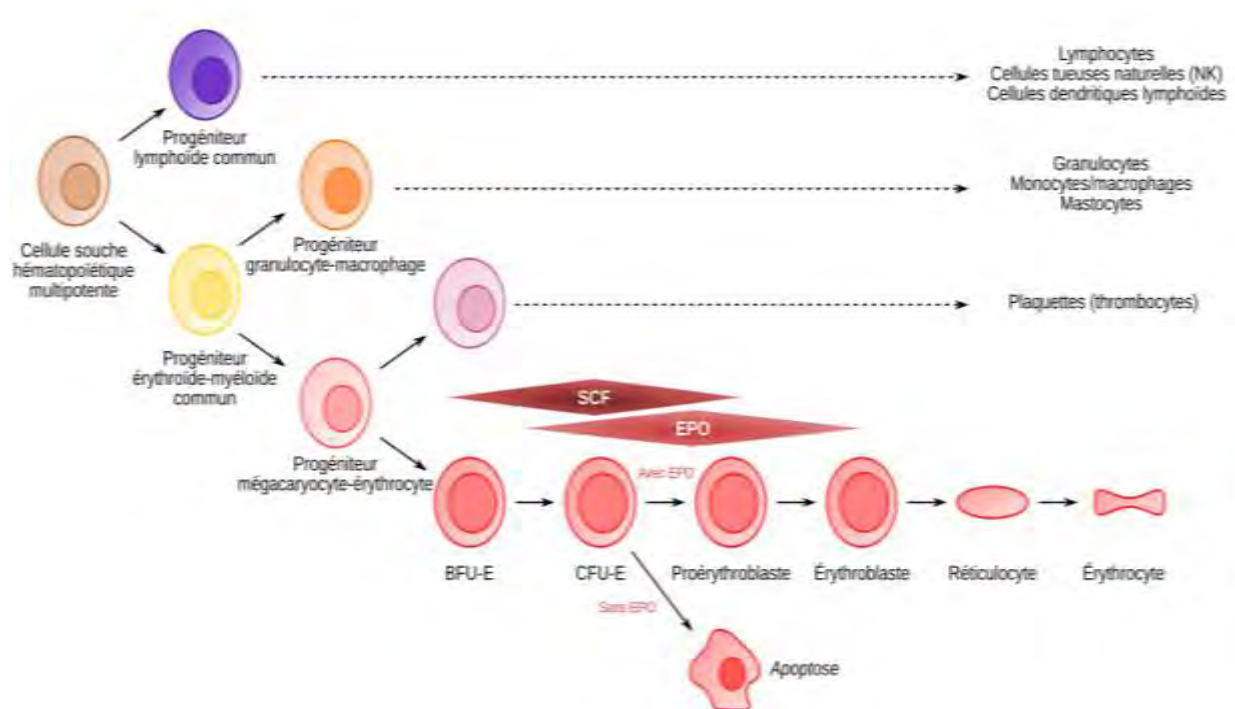


Figure 1. Les différentes étapes de l'érythropoïèse.

Modèle hiérarchique (de Pascal Combemorel, Planet-Vie, 2012).

Chez un Homme adulte, 200 milliards de globules rouges (également appelés hématies ou érythrocytes) sont produits chaque jour à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes dans la moelle osseuse : ce processus est appelé l'érythropoïèse ¹. Un globule rouge est énucléé : il ne possède pas de matériel génétique pour se reproduire ou se réparer, et possède donc une espérance de vie de 120 jours ². Selon le modèle classique de la différenciation hématopoïétique, pour arriver à des globules rouges matures, les CSH passent par différents progéniteurs, avec une différenciation et une spécialisation croissante, mais une diminution de leur potentiel multipotent et de leur auto-renouvellement. Tout d'abord, on trouve la cellule souche myéloïde (pouvant aussi donner les granulocytes et monocytes/macrophages), puis le progéniteur mégacaryocyte-érythrocyte (pouvant aussi donner les plaquettes). De ce dernier se spécialise la lignée érythrocyte : BFU-E (*burst forming unit-erythroid*), CFU-E (*colony forming unit-erythroid*), proérythroblaste, érythroblaste, et après énucléation, réticulocyte et érythrocyte (également appelé globule rouge ou hématie). Au cours de la différenciation,

différentes cytokines sont nécessaires, dont les deux principales, l'érythropoïétine (EPO) et un facteur de croissance de cellules souches appelé *stem cell factor* (SCF) (**Figure 1**)³. Cette vision hiérarchique est remise en cause ces dernières années avec des analyses de traceurs de lignée chez la souris ou des analyses en cellule unique avec des approches multiomiques (*single-cell analysis*) : le dogme d'un système pyramidale binaire laisserait place à un continuum d'états réversibles et transversales entre les différentes lignées hématopoïétiques, guidé par l'environnement cellulaire et physiologique^{4,5}.

Au niveau embryonnaire, l'érythropoïèse s'effectue dans différentes régions au cours de vagues d'érythropoïèse successives : c'est l'érythropoïèse primitive. La première vague d'érythropoïèse commence au niveau des ilots sanguins de la vésicule vitelline durant les 8 premières semaines de gestation. Ensuite la deuxième vague va se faire au niveau du foie fœtal entre la 8^{ème} et 32^{ème} semaine de gestation, et enfin l'érythropoïèse définitive va commencer au niveau de la moelle osseuse après la 32^{ème} semaine de gestation.

1.2. Hémoglobine

1.2.1. Les différentes hémoglobines

L'hémoglobine (Hb) est le principal composant d'un globule rouge, avec une concentration chez des sujets sains variant de 13 à 18 g/dL pour un homme et de 12 à 16 g/dL pour une femme. La production d'Hb est une véritable usine protéique : chaque globule rouge contient 270 millions de molécule d'Hb, capable chacune de fixer 4 molécules d'oxygène. Cette métalloprotéine permet donc le transport de l'oxygène dans le corps, des poumons aux tissus cibles. L'Hb a une structure quaternaire qui contient 4 sous-unités formés d'un assemblage de 2 chaînes de globine de type α et assimilés (ζ), et de 2 chaînes de globine type β et assimilés (γ , ϵ et δ) variant selon l'âge. Ces 4 sous-unités sont assemblées autour d'une cavité centrale, et sont stabilisées par des liaisons hydrogènes. Chaque chaîne de globine contient une cavité avec en son centre une molécule d'hème (quatre hèmes au total) (**Figure 2**)⁶. L'hème permet la liaison à l'oxygène. En l'absence d'oxygène, les molécules d'hème de l'Hb désoxygénée (aussi appelé désoxyhémoglobine) se lient à une molécule d'eau.

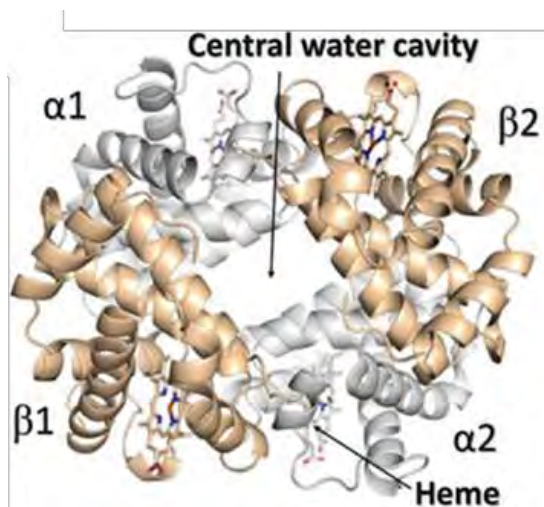


Figure 2. Structure quaternaire de l'hémoglobine.
(de M. H. Ahmed et al. 2020)

1.2.2. Hémoglobine et développement

L'Hb est également impactée par le développement ontogénique, et sa composition diffère selon l'étape embryonnaire/adulte grâce à une expression successive des chaînes de globines dans le temps. Jusqu'à la 10^{ème} semaine de développement embryonnaire, il y a trois types d'Hb prédominantes : HbE Gower-1 (avec deux chaînes ζ et deux chaînes ϵ , formant un hétérotétramère $\zeta_2\epsilon_2$), HbE Gower-2 ($\alpha_2\epsilon_2$) et HbE Portland-1 ($\zeta_2\gamma_2$). À partir de la 6^{ème} semaine de gestation, l'Hb foétale ($\alpha_2\gamma_2$), aussi appelé HbF, augmente et devient prédominante.

À la 40^{ème} semaine de gestation, un évènement majeur a lieu, le changement dans l'expression génique des 2 chaînes de globine type β et assimilés, que l'on appelle aussi switch de l'Hb. Les chaînes de γ -globine sont remplacées progressivement par des chaînes de β -globine, grâce à différents mécanismes complexes comme la méthylation du gène de la γ -globine, ou la mise en place de répresseur de la γ -globine comme **BCL11A**⁷. Ce changement joue un rôle important dans la compréhension de la physiopathologie de la drépanocytose et sur les différentes thérapies mises en place.

À l'âge adulte, l'humain a principalement de l'HbA ($\alpha_2\beta_2$), une petite quantité d'HbA2 ($\alpha_2\delta_2$, 2–3%) et moins de 1% d'HbF (**Figure 3A**)⁸.

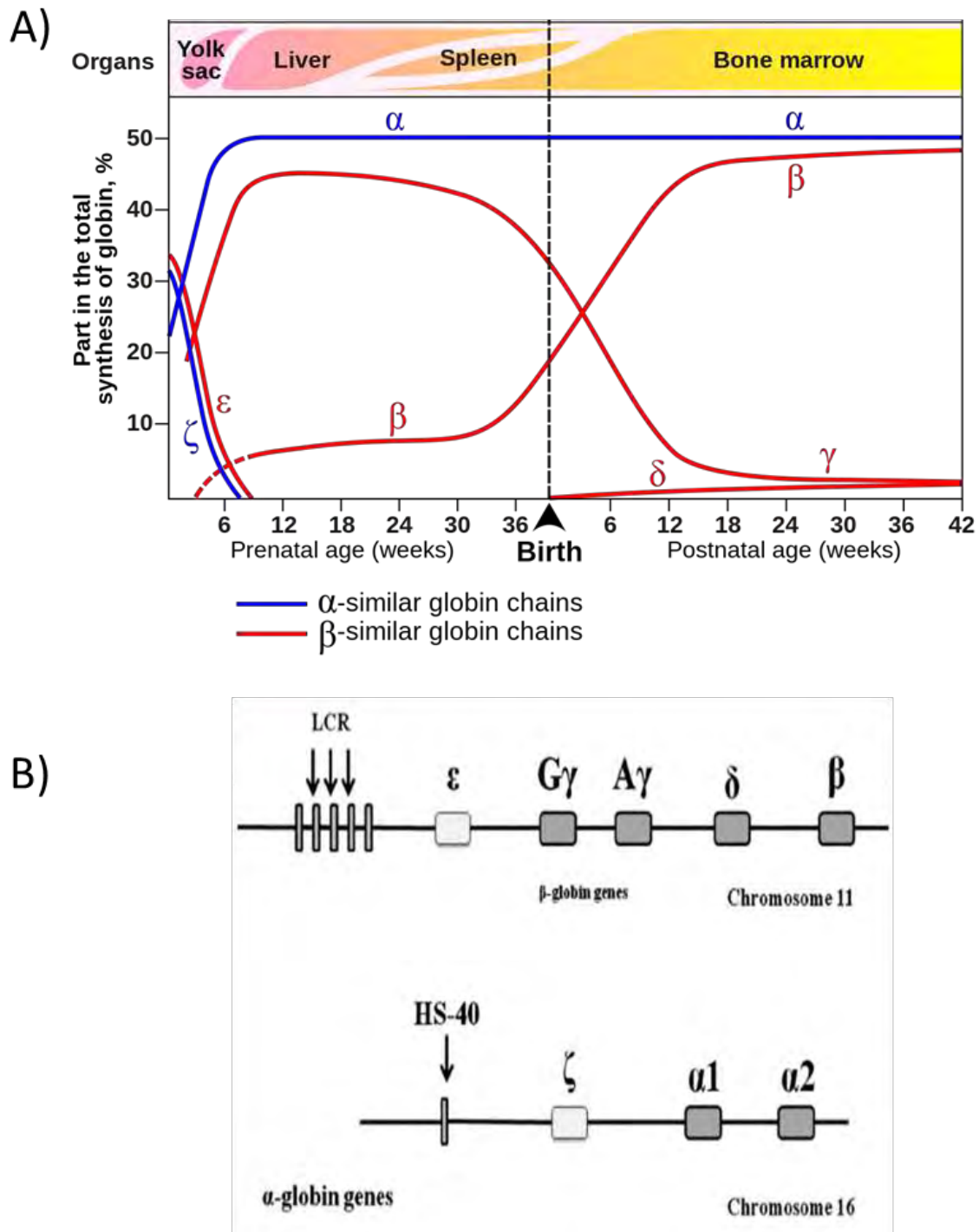


Figure 3. Les différentes chaînes de globines.

A) Changement de l'hémoglobine : expression génique des différentes chaînes de globines en fonction de la localisation de production, durant l'érythropoïèse embryonnaire, foetal et adulte (de W.G. Wood et al. 1976). **B)** Loci de la β -globine et de l' α -globine sur les chromosomes 11 et 16. LCR et HS-40 sont des éléments majeurs de la régulation des locus de la β -globine et de l' α -globine, respectivement (de D. Costa et al. 2015).

1.2.3. Les différents gènes impliqués

Les chaînes de globines humaines sont codées par deux clusters de gènes, chacun sous la régulation d'éléments cis-régulateurs (*cis-regulatory element*) spécifiques du tissu érythroïde. Ces éléments permettent l'expression séquentielle des différents gènes du cluster durant le développement grâce à leurs interactions spécifiques avec les promoteurs individuels de chaque gène ^{9,10}.

Le locus pour l' α -globine et ses assimilés est localisé sur le chromosome 16, et est régulé par HS-40 ⁹. Il contient le gène HBZ (codant pour l' ζ -globine embryonnaire) et les gènes HBA1 et HBA2 (codant pour les α -globines adultes, respectivement $\alpha 1$ et $\alpha 2$). HBA1 et HBA2 sont très similaires et encodent pour la même protéine : la différence entre les deux gènes vient des introns, et des régions non-traduites (UTR pour *untranslated regions*) en 5' et 3' de ces gènes.

Le locus pour la β -globine et ses assimilés se situe quant-à-lui sur le chromosome 11, et est régulé par LCR ¹⁰. Il contient le gène HBE (codant pour l' ϵ -globine embryonnaire), HBG2 et HBG1 (codant pour les γ -globines fœtales différant par un seul acide aminé, respectivement γG et γA), HBD (codant pour la δ -globine adulte) et HBB (codant pour la β -globine adulte) (**Figure 3B**) ⁸.

1.3. La drépanocytose

1.3.1. Les hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies, regroupant l'ensemble des pathologies génétiques affectant l'hémoglobine, touchent environ 300 000 naissances par an à travers le monde. Elles incluent les maladies causées par les mutations provoquant une altération de la production d'hémoglobine, comme les thalassémies, et les mutations provoquant une altération de structure de l'hémoglobine, comme la drépanocytose ¹¹.

1.3.2. La distribution géographique

La drépanocytose, également appelé anémie falciforme, est une maladie autosomale récessive causée par une simple mutation dans le gène de la β -globine. Chez les patients ayant au moins un allèle muté, plusieurs mécanismes permettent une protection contre l'infection du *Plasmodium falciparum*, un parasite responsable du paludisme ^{12,13}. D'un point de vue évolutionniste, la drépanocytose a donc une forte prévalence dans les régions tropicales et subtropicales endémiques pour le *Plasmodium falciparum*, majoritairement en Afrique sub-saharienne, Moyen-Orient et l'Inde : les patients drépanocytaires ayant un « avantage » pour survivre au paludisme (**Figure 4A et B**) ¹². Avec la migration des populations, la drépanocytose est devenue de plus en plus fréquente dans les pays non-tropicaux, et est devenue la maladie génétique la plus fréquente en France ¹⁴. Selon les prédictions issus des données de l'Assurance Maladie Française durant la période de 2006 à 2016, la prévalence de la drépanocytose se situe entre 19 800 et 32 400 patients en France, avec un âge médian de 31-33ans ¹⁵.

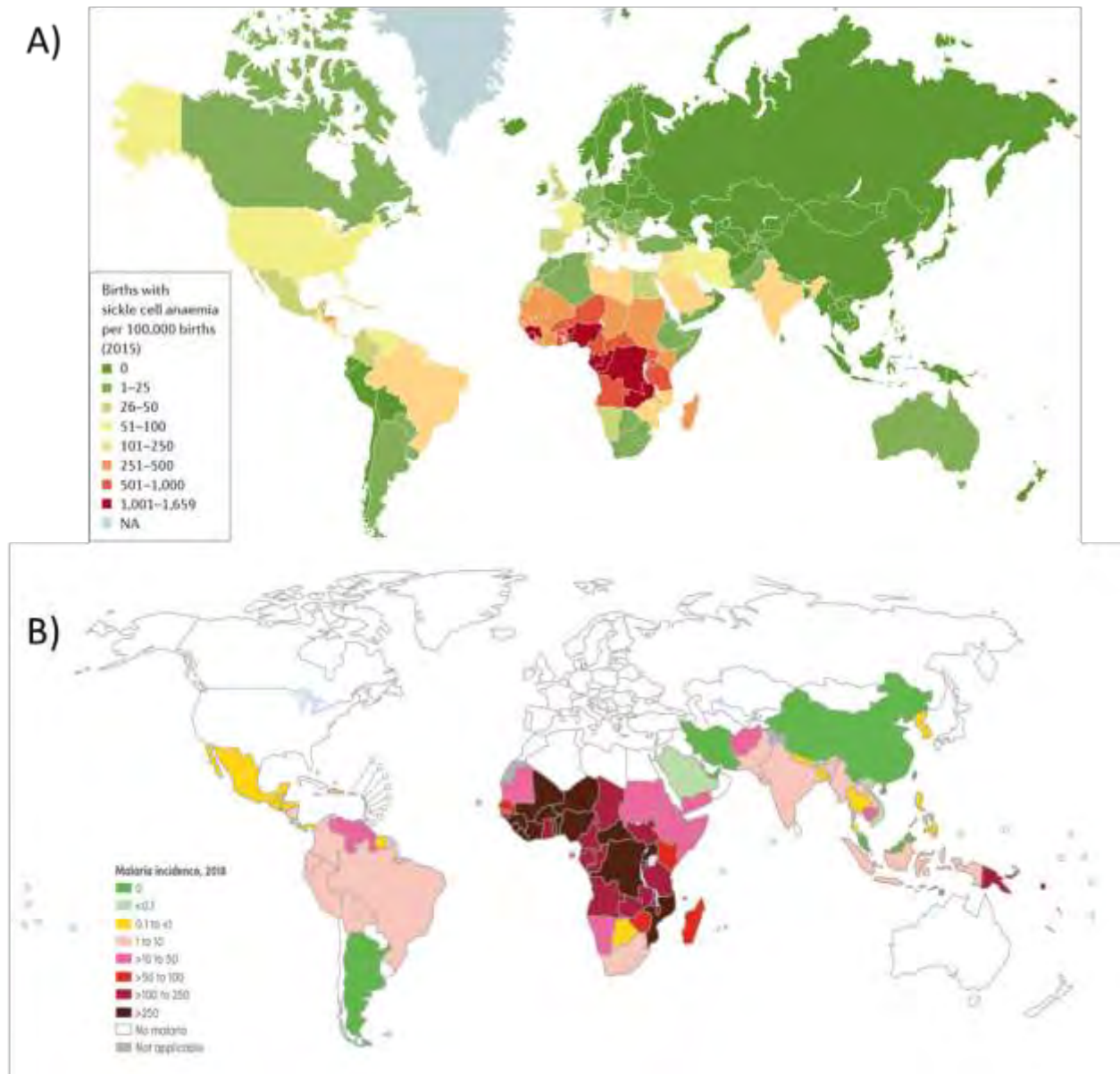


Figure 4. Cartes du monde de la drépanocytose et du paludisme.

A) Nombre de naissance d'enfants drépanocytaires pour 100 000 naissances en 2015 (de Gregory J. Kato et al. 2018). **B)** Incidence du paludisme en 2018 (de World Malaria Report 2019).

1.3.3. Physiopathologie de la drépanocytose

La drépanocytose est causée par une seule substitution de nucléotide, avec un changement d'une adénine par une thymine dans le gène de la β -globine (c.20A>T). Il en résulte le changement de l'acide aminé en position 6 de la chaîne mature de la β -globine, avec le remplacement d'un acide glutamique hydrophile par une valine hydrophobe (p.Glu6Val) (**Figure 5A**). Cela engendre la formation d'une hémoglobine anormale ($\alpha_2\beta^S_2$) appelé Hémoglobine S (HbS) pour « *Sickle hémoglobine* ».

Les patients drépanocytaires ont au moins un allèle β^S et peu/pas de β -globine normale, c'est-à-dire homozygote $\beta^S\beta^S$, hétérozygote $\beta^S\beta^0$ ou $\beta^S\beta^+$. Les allèles β^0 et β^+ sont impliqués dans des formes de β -thalassémie, une autre hémoglobinopathie autosomale récessive caractérisée par une absence (β^0) ou une diminution (β^+) des chaînes de β -globine.

Les patients hétérozygotes pour la drépanocytose ayant l'autre allèle sain ($\beta^S\beta^A$) ont ce qu'on appelle **le trait drépanocytaire (HbAS)** : il n'y a pas de répercussion clinique chez ces patients car la production d'HbA est suffisante, mais ils peuvent transmettre le gène à la descendance ¹⁶.

À basse pression d'oxygène, sous forme de desoxyhémoglobine, les acides aminés hydrophobes de la chaîne de β -globine (phénylalanine en position 85 et leucine en position 88) créent une niche hydrophobe pour la valine en position 6 nouvellement présente dans la chaîne β^S -globine mutée. Cette interaction n'est pas présente avec l'acide glutamique ayant un résidu hydrophile en position 6 dans la chaîne de β -globine saine ¹⁷.

Il en résulte l'agrégation et la polymérisation de l'HbS en long filaments, déformant les globules rouges. Ces derniers deviennent rigides avec une forme de faucille (d'où le nom d'anémie falciforme) pouvant facilement se briser dans les capillaires sanguins mais également les boucher, provoquant les manifestations cliniques de la maladie comme les crises vaso-occlusives (**Figure 5B**). L'anémie hémolytique qui en résulte, détectable par analyse sanguine, est un paramètre important de la maladie. Les patients développent aussi une inflammation chronique.

D'un point de vue moléculaire, l'hémolyse induit le découplage de l'oxyde nitrique synthase endothéliale, provoquant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la baisse du monoxyde d'azote (également appelé oxyde nitrique ou NO) disponible. Les ERO causent des dégâts à la membrane des globules rouges et augmentent l'hémolyse, l'inflammation vasculaire et l'activation endothéliale. En même temps, la baisse de la disponibilité en NO augmente l'activation plaquettaire. Il en résulte l'adhésion des globules rouges, globules blancs et plaquettes à l'endothélium, ce qui ralentit ou arrête le flux sanguin, induisant une vaso-occlusion dans la microcirculation et une hypoxie locale. De la xanthine oxydase est libérée par les tissus endommagés par la répétition de l'alternance ischémie/reperfusion, et augmente la production de ERO. L'hypoxie et l'adhésion endothéliale sont des éléments majeurs qui contribuent à l'augmentation de la polymérisation de l'Hb, ce qui entretient le cercle vicieux de la maladie **(Figure 5C)**¹⁸.

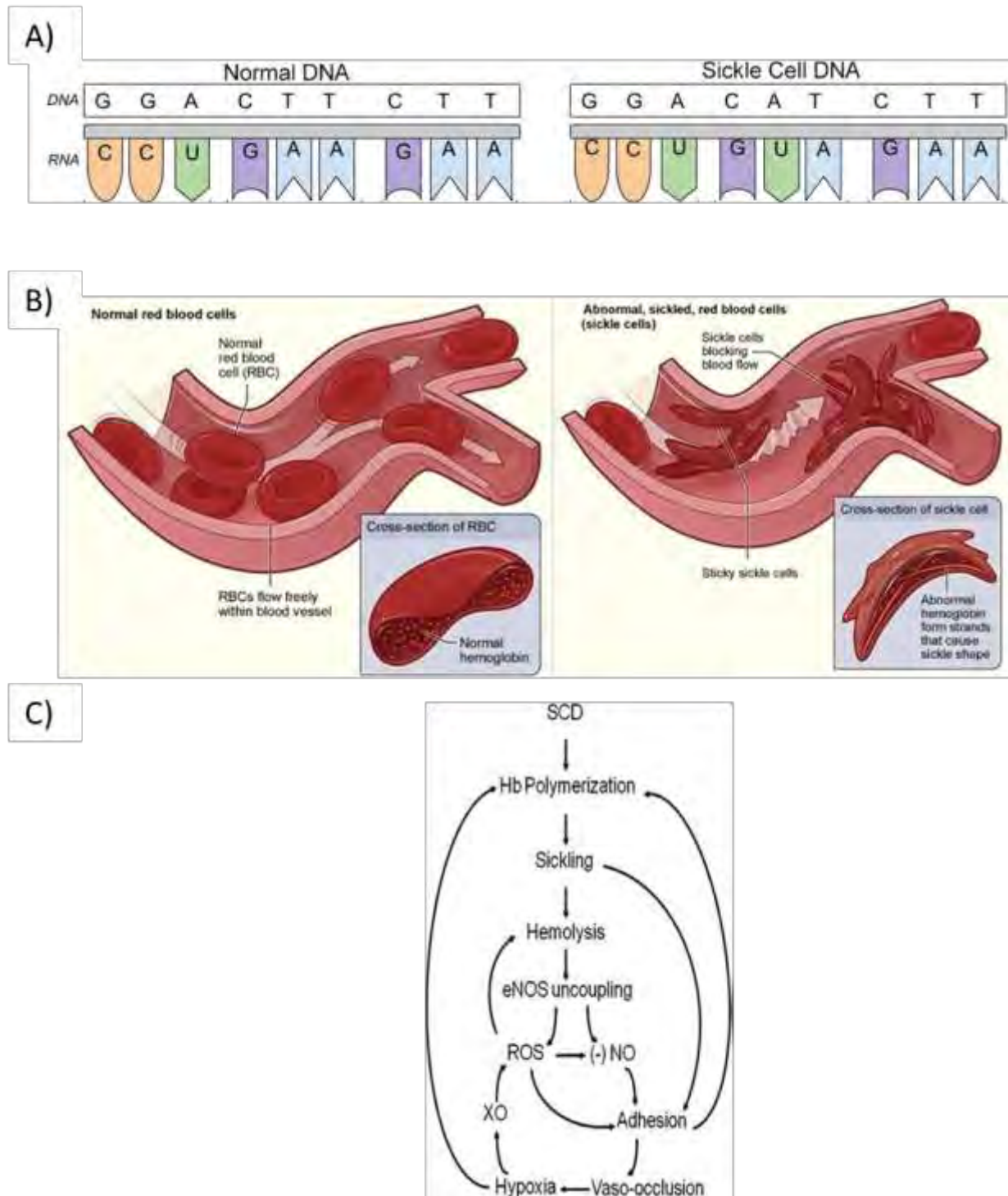


Figure 5. Physiopathologie de la drépanocytose.

A) Mutation du gène de la β -globine dans la drépanocytose (de biologycorner.com) **B) Mécanisme de déformation des globules rouges drépanocytaires.** À gauche : Globules rouges normaux dans un vaisseau sanguin. À droite : Globules rouges déformés bloqués à un embranchement dans un vaisseau sanguin. La coupe du globule rouge déformé montre la polymérisation de l'HbS en filaments. (de National Heart, Lung and Blood Institute, Maryland, United-States, 2020). **C) Cercle vicieux du stress oxydatif dans la pathogénèse de la drépanocytose.** (de E. Chirico et al., 2012). *eNOS* : *Endothelial nitric oxide synthase* ; *ROS* : *Reactive Oxygen Species* ; *XO* : *Xanthine oxidase* ; *NO* : *Nitric oxide*

1.3.4. Les manifestations cliniques

Les manifestations cliniques apparaissent lors du changement de l'HbF en HbA (switch de l'Hb), soit quelques semaines après la naissance. Elles incluent une anémie hémolytique chronique, des crises vaso-occlusives extrêmement douloureuses pouvant entraîner des ischémies tissulaires et des dommages aux organes irréversibles, un risque d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) accru, un syndrome thoracique aigu caractérisé par un état fébrile avec des douleurs thoraciques associées à des symptômes respiratoires (toux et dyspnée), des douleurs chroniques secondaires à une ostéonécrose, une inflammation chronique, une augmentation de la susceptibilité aux infections pouvant entraîner des sepsis fulminants et une vasculopathie artérielle chez certains patients ^{16,19}.

1.4. Prise en charge de la drépanocytose

1.4.1. Dépistage en France

Pour diagnostiquer la maladie, la recherche de l'HbS dans le sang du patient est nécessaire. Deux techniques doivent être utilisées pour confirmer le diagnostic. L'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) propose les associations des techniques de dépistage suivantes : Isoélectrofocalisation (IEF) + Chromatographie Liquide Haute Pression par échange de cations (CLHP) ou CLHP + Electrophorèse capillaire. Des tests génétiques sont réalisés pour lever le doute devant certains cas cliniques complexes, mais ils ne sont pas effectués de façon systématique.

Beaucoup d'acteurs sont impliqués dans l'organisation de ce dépistage massif. Au niveau national on trouve l'AFDPHE, le ministère de la santé, et la Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAMTS). Au niveau régional, sont impliqués dans le processus les maternités, les laboratoires d'analyses, les médecins traitants et des associations (**Figure 6**).

Chez les nouveaux-nés de parents originaires de pays endémiques, un dépistage néonatal est nécessaire. Cela inclut les pays d'Afrique sub-saharienne, le Moyen-Orient, l'Inde, mais aussi les départements d'Outre-mer, le Brésil, l'Afrique du Nord, l'Italie du Sud, la Grèce et la Turquie (**Figure 7**).

Si le diagnostic est positif, une confirmation du résultat est effectuée sur un nouvel échantillon de sang de l'enfant. Un dépistage des deux parents est effectué si possible, pour identifier si l'enfant est hétérozygote $\beta^S\beta^S$ ou si il est hétérozygote $\beta^S\beta^0$ (la présence de l'HbF chez les nouveaux-nés ne permet pas de différencier ces deux cas).

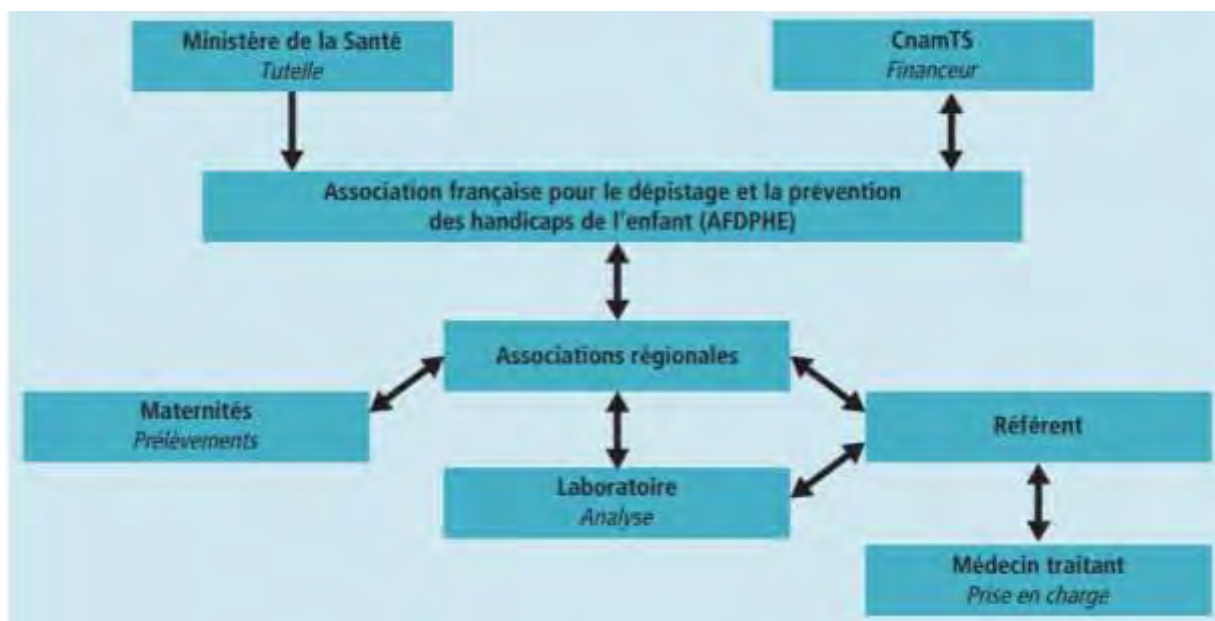


Figure 6. Acteurs français dans la politique de dépistage néonatale de la drépanocytose.

(J. Bardakdjian-Michau et M. Roussey, 2012).

Origine géographique des populations concernées par la drépanocytose (régions à risque) :
 Départements français d'outre-mer : Antilles, Guyane, la Réunion, Mayotte
 Tous les pays d'Afrique subsaharienne et le Cap-Vert
 Amérique du Sud (Brésil), Noirs d'Amérique du Nord
 Inde, Océan Indien, Madagascar, Île Maurice, Comores
 Afrique du Nord : Algérie, Tunisie, Maroc
 Italie du Sud, Sicile, Grèce, Turquie
 Moyen-Orient : Liban, Syrie, Arabie Saoudite, Yémen, Oman

Actuellement, pour que le nouveau-né soit testé :

- 1- Les deux parents doivent être originaires d'une région à risque.
- 2- Un seul des deux si le deuxième n'est pas connu.
- 3- S'il existe des antécédents de syndrome drépanocytaire majeur dans la famille.
- 4- S'il existe un doute pour les critères 1, 2, 3.

Figure 7. Critères de dépistage de la drépanocytose des nouveau-nés en France métropolitaine.

(J. Bardakdjian-Michau et M. Roussey, 2012)

1.4.2. Prise en charge et traitements symptomatiques

La prise en charge consiste à l'éducation thérapeutique des parents : ils doivent pouvoir reconnaître les signes cliniques des complications de la maladie pour pouvoir avoir les bons réflexes, et consulter en urgence si nécessaire. Une surveillance paraclinique annuelle est nécessaire, notamment avec des Doppler transcrânien pour prévenir la survenue d'AVC.

Chez l'enfant, une supplémentation en acide folique (également appelé vitamine B9) est mise en place. Cette vitamine est importante pour la division et la synthèse de l'ADN : comme la durée de vie des globules rouges de patients drépanocytaires est beaucoup plus courte, cela permet d'assurer un bon renouvellement et une bonne production dans la moelle osseuse. La vaccination est importante, car le risque infectieux est plus important chez les patients drépanocytaires en bas âge. Une antibioprophylaxie contre le pneumocoque est initiée dès deux mois et jusqu'au cinq ans du nouveau né avec une pénicilline orale : la phénoxyéthylpénicilline (Oracilline en France) (**Annexe 1**)¹⁹⁻²¹.

Chez l'adulte, le risque infectieux est moindre. Peu d'options thérapeutiques sont disponibles. Les patients sont principalement traités avec des thérapies de support toute la vie. Les transfusions sanguines répétées sont nécessaires pour palier à l'anémie, mais également pour prévenir les complications majeures comme les ischémies tissulaires ou les crises vaso-occlusives. Mais à cause de la présence de fer dans les globules rouges, un traitement chélateur du fer est souvent nécessaire après les transfusions pour éviter les surcharges martiales (également appelé hémossidérose) et les atteintes des différents organes, dont les conséquences peuvent être dramatiques et plus délétères que la maladie elle-même. Des analgésiques sont utilisés pour les crises douloureuses, ainsi que des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (**Annexe 2**)^{20,21}.

Une molécule fréquemment utilisée est l'hydroxycarbamide (ou hydroxyurée, aussi connu sous le princeps Hydréa en France), un myélosuppresseur oral qui a montré une efficacité dans l'amélioration des manifestations cliniques de la maladie. Le mécanisme protecteur principal est l'induction de l'expression de l'HbF^{22,23}, connu pour son pouvoir inhibiteur sur la polymérisation de l'HbS drépanocytaire²⁴. Ce traitement entraîne également une diminution de l'inflammation chronique par diminution des globules blancs, une diminution des molécules d'adhésion à

l'endothélium et une augmentation de molécules vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote ^{22,25}. Mais en dépit de son efficacité sur la fréquence des épisodes douloureux aigus et autres complications, il n'y a à ce jour pas assez de preuves sur la prévention des complications chroniques et l'augmentation de l'espérance de vie ²⁶.

Un autre traitement est la L-Glutamine, qui a montré chez les patients une diminution des crises douloureuses et des syndromes thoraciques aigus, en diminuant l'adhésion endothéliale des globules rouges déformés. Mais, tout comme les options précédentes, ce n'est pas un traitement curatif de la maladie ²⁷.

1.4.3. Les traitements curatifs

Jusqu'à récemment, le seul moyen de traiter les patients atteints de drépanocytose était la transplantation allogénique de CSH ²⁸. Les CSH proviennent d'un donneur compatible, et sont prélevées à partir de la moelle osseuse, de sang périphérique mobilisé (c'est-à-dire après traitement pour stimuler le passage des CSH de la moelle osseuse vers le sang périphérique) ou de sang de cordon. Mais seulement 25 à 30% des patients drépanocytaires ont un donneur compatible disponible, et la procédure n'est pas sans risque ²⁹. La survie à 5 ans des patients drépanocytaires transplantés avec un donneur compatible est de 92% ³⁰. La mortalité et morbidité associés à la transplantation sont principalement dues aux risques réaction du greffon contre l'hôte, qui augmente à des taux inacceptables avec l'utilisation de donneurs non-apparentés ²⁸.

Une nouvelle thérapie a émergé ces dernières années : la thérapie génique. Cela consiste au prélèvement des CSH du patient, la modification *ex-vivo*, et leurs transplantations dans le même patient après un conditionnement myéloablatif. Cette méthode permet une alternative prometteuse aux patients qui n'ont pas de donneurs compatibles, et permet d'éviter les risques de réaction du greffon contre l'hôte et de rejet de greffe.

1.5. La thérapie génique

1.5.1. Généralités sur la thérapie génique

La thérapie génique est une technique permettant l'insertion de matériel génétique étranger (ou transgène) dans les cellules du patient dans un but thérapeutique. Un transporteur, appelé vecteur, est développé pour délivrer et permettre une expression transitoire ou permanente du transgène. Le transgène peut être délivré *ex-vivo*, avec une modification génétique des cellules du patient hors du corps, en culture, ou *in-vivo*, avec une administration directe du vecteur avec le transgène thérapeutique dans le patient, généralement quand les cellules d'intérêts ne peuvent pas être prélevées. Dans le cadre de la drépanocytose, la **thérapie *ex-vivo*** est utilisée car les CSH peuvent être prélevées facilement chez l'Homme. Ensuite, les CSH sont modifiées par des vecteurs viraux et non-viraux. Dans ce projet, nous nous focaliserons sur les **vecteurs viraux**. Les virus sont souvent utilisés en thérapie génique car ils permettent une délivrance rapide et efficace du transgène. Trois types de virus peuvent être utilisés : les adénovirus, les virus adéno-associés (AAV pour *Adeno Associated Virus*) et les lentivirus. Les adénovirus représentent la majorité des vecteurs viraux utilisés dans les essais cliniques, principalement pour la modification de cellules post-mitotiques (**Figure 8A et B**)³¹. Contrairement aux lentivirus, les adénovirus et les AAV ne sont pas intégratifs, bien que certaines études ont pu montrer une intégration spécifique dans le chromosome 19 humain pour les AAV sauvages³².

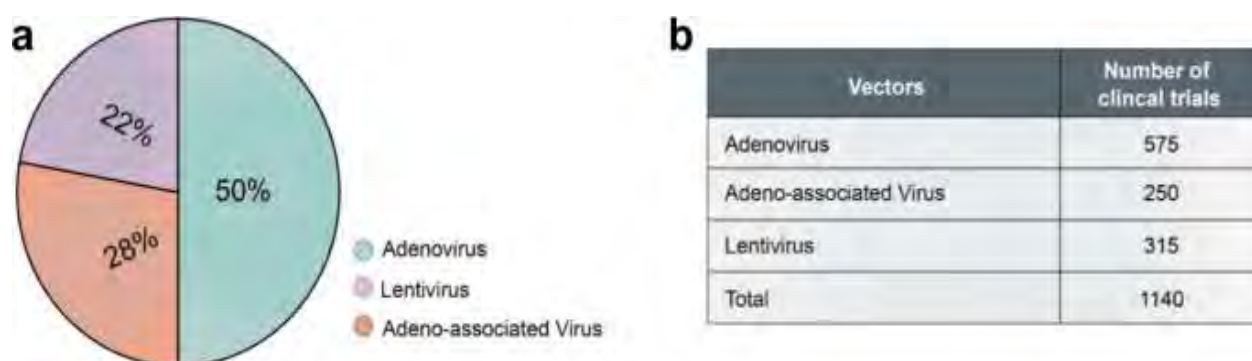


Figure 8. Utilisation des adénovirus, virus adéno-associés et lentivirus dans des essais cliniques.

A) Diagramme circulaire sur le pourcentage d'utilisation en essais cliniques selon le type de vecteur viral. **B)** Nombre d'essais cliniques utilisant les trois différents vecteurs viraux. (J.T. Bulcha et al. 2021)

1.5.2. Le choix du vecteur

Dans le cadre de la thérapie génique pour la drépanocytose, une transmission permanente du gène thérapeutique des CSH à la progénie est nécessaire, pour avoir une expression pérenne du gène thérapeutique dans les globules rouges. Pour cela, on utilise des virus de la famille des retroviridae, communément appelés les rétrovirus (dont font partie les lentivirus), qui permettent une intégration dans le génome et une expression stable à travers le temps. Dans les rétrovirus, on distingue plusieurs sous-familles. La recherche s'est intéressée aux **γ-rétrovirus** (considérés comme un rétrovirus simple) et aux **lentivirus** (considérés comme un rétrovirus complexe comme par exemple le Virus de l'Immunodéficience Humaine/VIH) pour construire des vecteurs dans le but de traiter des maladies génétiques ³¹.

De nos jours, les **vecteurs lentiviraux** construits à partir des lentivirus (**LVV** pour *lentiviral vector*) sont utilisés préférentiellement par rapport aux vecteurs γ-rétroviraux car ils permettent de transduire des cellules quiescentes, comme les CSH.

De plus, les LVV s'intègrent aléatoirement dans le génome, ce qui diminue le risque de mutagenèse insertionnelle, contrairement aux vecteurs γ-rétroviraux qui s'intègrent préférentiellement près des sites d'initiation de la transcription et peuvent déréguler l'expression de proto-oncogène ³³. Cette conclusion a été malheureusement tirée avec l'utilisation de vecteurs γ-rétroviraux dans l'immunodéficience sévère combinée liée à l'X (*X-linked Severe Combined Immunodeficiency*) lors des débuts de la thérapie génique dans les années 2000. C'est une maladie génétique du système immunitaire causée par la mutation du gène IL2RG. Ce gène code pour la sous-unité γC présente dans plusieurs récepteurs aux interleukines (IL). Deux études ont été menées, une en France avec dix enfants, et une Britannique avec également dix enfants ³⁴. L'utilisation de vecteurs γ-rétroviraux a provoqué cinq cas de leucémie : quatre cas dans l'essai clinique Français et un cas dans l'essai clinique Britannique, et un des enfants en est décédé. Tous les cas de leucémie ont été imputés à la mutagenèse insertionnelle. Les vecteurs γ-rétroviraux se sont intégrés près d'un site d'initiation de la transcription de proto-oncogènes (principalement LMO2), et le proto-oncogène a été activé par la séquence terminale longue répétée du virus (LTR pour *long terminal repeat sequence*) ³⁵⁻³⁷.

Depuis les premiers essais cliniques dans les années 2009/2010 utilisant des LVV, aucun cas de cancer hématologique n'a été rapporté. Seulement une prolifération d'un clone, temporaire et bénigne, a été reporté chez un patient atteint de β -thalassémie traité par thérapie génique ³⁸.

1.6. Thérapie génique chez les patients drépanocytaires

Basé sur l'observation que **diluer les chaînes de β^S -globine** (en augmentant les autres chaînes de globines) améliore les symptômes et l'évolution de la maladie ³⁹, deux principales approches de thérapie génique ciblant les CSH se sont développées pour soigner la drépanocytose : **l'addition de gène à l'aide de LVV** et **l'édition génomique à l'aide de nucléase**. Différents essais cliniques ont été/sont initiés pour tester ces stratégies (**Figure 9**) :

- l'utilisation de LVV exprimant des variants de la β -globine (AT87Q ou AS3), la γ -globine ou un shARN contre BCL11A.
- la réactivation de la γ -globine endogène grâce à l'aide des nucléases ZFN ou CRISPR/CAS9.

Ces différentes stratégies sont détaillées ci-après.

Lentiviral gene therapy	Gene editing
<p data-bbox="373 277 580 309">Gene addition</p> <p data-bbox="197 336 533 367">β-globin variant AT87Q</p> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="197 376 804 465">- NCT02151526, Jun 2013 by BlueBird Bio Completed Phase 1/2 ; 7 participants (including thalassemia patients) <li data-bbox="197 474 676 564">- NCT02140554, Aug 2014 by BlueBird Bio Active, not recruiting Phase 1/2 ; 50 participants <li data-bbox="197 573 692 663">- NCT02633943, Sep 2013 by BlueBird Bio Enrolling by invitation ; Longterm follow-up 94 participants (including thalassemia patients) <li data-bbox="197 667 676 757">- NCT04293185, Feb 2020 by BlueBird Bio Active, not recruiting Phase 3 ; 35 participants <p data-bbox="197 748 501 779">β-globin variant AS3</p> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="197 788 788 846">- NCT02247843, Dec 2014 by D.Kohn, UCLA ; Active Phase 1/2 ; 6 participants <li data-bbox="197 855 692 913">- NCT03964792, Nov 2019 by APHP ; Active Phase 1/2 ; 10 participants <p data-bbox="197 913 325 945">γ-globin</p> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="197 954 804 1012">- NCT02186418, Jul 2014 by Aruvant Sciences GmbH Active ; Phase 1/2 ; 10 participants 	<p data-bbox="1091 277 1187 309">NHEJ</p> <p data-bbox="852 336 1267 367">ZFN for γ-globin reactivation</p> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="852 376 1331 434">- NCT03653247, March 2019 by Bioverativ Recruiting ; Phase 1/2 ; 8 participants <p data-bbox="852 443 1410 474">CRISPR/Cas9 for γ-globin reactivation</p> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="852 483 1426 542">- NCT03745287, Nov 2018 by CRISPR Therapeutics Recruiting ; Phase 1/2 ; 45 participants <li data-bbox="852 551 1426 640">- NCT04208529, Jan 2021 by CRISPR Therapeutics Enrolling by invitation Longterm follow-up ; 90 participants
<p data-bbox="351 1046 603 1077">RNA interference</p>	
<p data-bbox="197 1128 564 1160">shRNA targeting BCL11A</p> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="197 1169 660 1227">- NCT03282656, Feb 2018, David Williams Suspended ; Phase 1 ; 15 participants 	

Figure 9. Essais cliniques utilisant la thérapie génique pour la drépanocytose en 2020.

Identifiant clinicaltrials.gov ; date de début de l'essai ; statut actuel ; type d'étude ; recrutement (adapté de K. Sii Felice et al., 2020)

NHEJ : Non-homologous end joining

1.6.1. Edition génomique à l'aide de nucléase

La stratégie la plus récente est l'édition génomique, grâce à l'aide de nucléases (ZFN au début du développement des nucléases et maintenant majoritairement CRISPR/Cas9). Le but est d'inactiver un gène en provoquant une cassure dans l'ADN qui sera ensuite réparée par le système de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ pour *non-homologous end joining*). C'est un système non-conservatif, cela ne va pas restaurer la séquence initiale mais cela va introduire des erreurs qui vont permettre l'inactivation du gène. Une des approches dans le traitement par thérapie génique des hémoglobinopathies est de réexprimer l'HbF endogène. L'HbF est connu

pour son pouvoir inhibiteur sur la polymérisation de l'HbS drépanocytaire ²⁴. Cet effet est dû en partie à la glutamine présente en position 87 du gène de la γ -globine, et qui confère un effet anti-polymérisation et donc anti-déformation des globules rouges malades ⁴⁰. Pour y arriver, une des stratégies est la diminution de l'expression de BCL11A, impliqué dans l'extinction du gène de la γ -globine au cours du développement ⁴¹⁻⁴³.

Cependant, BCL11A joue un rôle important dans plusieurs lignées cellulaires, et en particulier dans le développement des lymphocytes B ^{44,45}. Pour éviter une toxicité, une baisse de l'expression dans la lignée érythroïde uniquement est nécessaire ⁴⁶. Pour se faire, des essais cliniques se sont mis en place pour inactiver l'amplificateur érythroïde-spécifique du gène BCL11A et ainsi permettre la réexpression de l'HbF : l'essai clinique NCT03653247 utilisant la technologie ZFN, et l'essai clinique NCT03745284 utilisant la technologie CRISPR/CAS9.

Pour cette dernière technologie utilisant CRISPR/CAS9 pour cibler l'amplificateur érythroïde-spécifique de BCL11A, l'équipe de Selim Corbacioglu ⁴¹ a d'abord mené des essais précliniques sur des CSH avec le cluster de différenciation (CD) CD34+ issues de patients sains, et a montré une efficacité d'édition de 80%. Dans cette étude, aucun signe d'édition indésirable à distance (*off-target*) de la cible n'a été démontré. Deux patients ont été traités avec cette thérapie : un patient drépanocytaire ayant aussi une délétion simple dans un des gènes de l' α -globine, et un patient β -thalassémique ayant un génotype β^0/β^+ . La greffe a été un succès, avec une prise de greffe des cellules génétiquement modifiées durable, et une augmentation de l'HbF stable dans le temps. Ces patients n'ont progressivement plus eu besoin des transfusions sanguines, et le patient drépanocytaire n'a rapporté aucun épisode de crises vaso-occlusives depuis.

À ce jour, l'utilisation de CRISPR/Cas9 ciblant le gène BCL11A n'a montré aucune preuve d'édition indésirable à distance du gène cible ⁴¹, mais un risque théorique est toujours présent : la génération de cassure double brin de l'ADN par cette technique peut générer des insertions, délétions ou translocations, sur le gène cible ou à distance. Cela peut induire une perte de fonctions de gènes, pouvant provoquer une prolifération cellulaire anarchique ou autres effets indésirables graves ⁴⁷.

1.6.2. Addition de gène à l'aide de LVV

La deuxième stratégie, avec laquelle nous avons beaucoup plus de recul, est basée sur l'addition de gène grâce à l'utilisation des LVV. À ce jour, différents essais cliniques ont vu le jour dans le cadre du traitement de la drépanocytose et plusieurs gènes thérapeutiques peuvent être utilisés :

- 1) un gène modifié de la β -globine ayant des propriétés pour empêcher la déformation des globules rouges : un variant ayant une seule mutation anti-polymérisante β^{AT87Q} détaillé ci-après (essais cliniques NCT02151526, NCT02140554, NCT02633943 et NCT04293185) ou un variant avec trois mutations⁴⁸ anti-polymérisante nommées β^{AS3} (essais cliniques NCT02247843 et NCT03964792).
- 2) le gène de la γ -globine pour permettre l'expression de l'HbF et ainsi inhiber la formation d'HbS (essai clinique NCT02186418).
- 3) un petit ARN en épingle à cheveux (shARN pour *Short hairpin ARN*) ayant une expression spécifique dans les cellules érythroïde pour diminuer l'expression de BCL11A et ainsi réexprimer l'HbF endogène⁴⁹ (essai clinique NCT03282656).

Le variant β^{AT87Q} utilisé en thérapie génique^{38,50-52} est muté sur le codon 87 (Thr87Gln) du gène de la β -globine pour promouvoir un effet anti-polymérisation, comme retrouvé avec l'HbF endogène. Son association avec les chaînes d' α -globine forment l'HbA^{T87Q}. L'utilisation de ce variant en thérapie génique a été intégré dans différents LVV. Le premier vecteur utilisant ce variant s'appelait HPV569³⁸, et il a ensuite été optimisé en un vecteur appelé **BB305**⁵⁰ (**Figure 10A**) qui est maintenant la référence utilisée en clinique. Ces vecteurs ont été développés par les membres de mon équipe, à l'hôpital Saint-Louis et au CEA de Fontenay-aux-roses, et en collaboration avec Bluebird bio Inc. (auparavant Genetix Pharmaceuticals), une entreprise de biotechnologie Américaine basée à Cambridge dans le Massachusetts. Pour le vecteur de référence BB305 utilisé dans les essais cliniques, le produit médicamenteux LentiGLOBIN BB305 (correspondant aux CSH du patient transduites avec BB305) a reçu une approbation conditionnelle en 2019 par l'European Medicine Agency (EMA) pour l'utilisation chez les patients β -thalassémiques transfusion-dépendant. La β -thalassémie est caractérisée par une réduction ou une absence des chaînes de la β -globine. La thérapie génique avec BB305 permet d'y remédier et d'augmenter les chaînes de β -globine dans les globules rouges du patient. Les résultats sont très prometteurs et BB305 a permis à plusieurs

patients ayant un génotype non- β^0/β^0 de devenir transfusion-indépendant. Pour les formes les plus sévères de β -thalassémie (avec un génotype β^0/β^0), BB305 a permis de réduire significativement le nombre de transfusion annuelle, sans pour autant atteindre l'indépendance transfusionnelle ⁵³⁻⁵⁵.

Pour la drépanocytose, les premiers résultats de l'essai clinique de phase 1/2 NCT02140554 (l'étude HGB-206) ont été publiés en 2017 et sont la preuve de concept que la transplantation de CSH transduites avec BB305 peut soigner la drépanocytose ⁵⁶. Il s'agit du traitement d'un enfant de treize ans ayant un génotype β^S/β^S . Avant la transplantation, il a souffert de nombreuses crises vaso-occlusives, de deux syndromes thoraciques aigus, une ostéonécrose de la tête fémorale, et a subi une cholécystectomie et une splénectomie. Il a été traité avec de l'hydroxycarbamide (Hydréa) pendant sept ans (de ses deux à neuf ans) sans aucune amélioration significative de ses symptômes. Il a reçu des transfusions de globules rouges accompagnées de traitements chélateurs du fer. À treize ans, le patient a reçu $5,1 \times 10^6$ CSH transduites avec BB305, avec une moyenne du nombre de copie du vecteur lentiviral par cellule (appelé **VCN** pour *vector copy number*) de 1,1. Les effets secondaires observés à la suite de la transplantation sont une neutropénie, une anémie, une thrombocytopénie et une infection : ces effets sont imputables à l'utilisation de Busulfan pour le conditionnement myéloablatif, et ont été résolus à l'aide de mesures standards peu de temps après la transplantation. Les niveaux d'HbA^{T87Q} sont montés à 5.5 g/dL neuf mois après la transplantation, et à 5.7 g/dL quinze mois après. Aucune manifestation clinique de la drépanocytose n'a été observée, quinze mois après la transplantation ⁵⁶.

À ce jour, plus de 40 patients atteints de drépanocytose ont été inclus dans des essais cliniques de thérapie génique utilisant BB305 dans le traitement de la drépanocytose : deux essais cliniques de phase 1/2 (NCT02151526 et NCT02140554, respectivement nommé étude HGB-205 et étude HGB-206) et un essai clinique de phase 3 (NCT04293185, l'étude HGB-210). Des données préliminaires de l'étude HGB-206 ont évalué le VCN médian à 3,8 (de 2,8 à 5,6) dans le produit médicamenteux LentiGlobin BB305 avec de très bons résultats cliniques ⁵⁷. L'étude HGB-2010 a commencé quant-à-elle en Février 2020 et va recruter un total de trente-cinq patients.

1.7. Suspensions d'effets indésirables liés à l'utilisation de BB305

Le transfert de gène utilisant des LVV peut entraîner de la mutagenèse insertionnelle ⁵⁸ et, selon le site de l'intégration du vecteur, peut activer des proto-oncogènes ou inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs. Ce risque oncogène est proportionnel au VCN, car une augmentation du nombre de copie du vecteur inséré dans le génome augmente la probabilité d'une insertion dans un locus à risque.

1.7.1. 2020 : Syndrome myélodysplasique

En mai 2020, un syndrome myélodysplasique (SMD) a été développé chez un patient drépanocytaire avec un génotype β^S/β^S qui avait été inclus dans l'essai clinique HGB-206 et traité en utilisant le vecteur BB305. Le VCN moyen dans le produit médicamenteux LentiGLOBIN BB305 est de 1,3 avec 29% des CSH contenant le vecteur. Le patient a reçu par voie intra-veineuse du Busulfan à 3,3 mg/kg/jours pendant quatre jours avant la transplantation, comme agent conditionnant. Durant une visite de routine trois ans après la transplantation, le patient avait un taux d'Hb à 7,3 g/dL mais aussi 6% de blastes dans le sang de ce dernier. Une biopsie de moelle osseuse a révélé 10% de myéloblastes chez ce patient, avec une monosomie 7, également appelé del(7a), et des mutations dans les gènes RUNX1, KRAS et PTPN11, alors que les tests effectués avant le conditionnement et la transplantation avaient montré une absence de monosomie 7 et des 54 mutations associées au SMD.

Différentes études indépendantes ont démontré que les blastes ne contiennent pas BB305, et donc que le SMD n'est pas imputable à l'utilisation de LVV ⁵⁹. La monosomie 7 est connue comme pouvant être une anomalie clonale dû à l'utilisation d'agents alkylants, comme le Busulfan utilisé ici ⁶⁰. L'hypothèse la plus probable est que le SMD aurait été déclenché à la suite de l'utilisation du conditionnement par le Busulfan, et non par l'utilisation de BB305.

1.7.2. En 2021 : Suspicion de syndrome myélodysplasique et leucémie aigüe myéloïde

En Février 2021, à la suite de deux suspicions d'effets indésirables graves inattendus (SUSAR pour *Suspected Unexpected Serious Adverse Reactions*), Bluebird bio a arrêté la commercialisation du Zynteglo en Europe, qui correspond au nom de la thérapie génique utilisant BB305 dans le traitement de la β -thalassémie. La U.S. Food and Drug Administration (FDA) a mis en arrêt les essais cliniques utilisant le vecteur lentiviral BB305 dans la drépanocytose. Les deux SUSAR font partie de l'étude HGB-206 : un patient a développé une leucémie myéloïde aigüe et un patient a eu une suspicion de SMD.

Chez le patient ayant développé la leucémie myéloïde aigüe, les blastes contenaient le vecteur, mais ce dernier était intégré dans le gène VAMP4, un gène qui n'est pas connu dans le développement de phénomène oncogénique. De plus, aucune preuve n'a montré que l'intégration dans VAMP4 pouvait déréguler les gènes adjacents. Il a été conclu que l'insertion de BB305 n'est pas liée au développement de la leucémie myéloïde aigüe.

Par ailleurs, aucun blaste ou cellule dysplasique n'ont été retrouvés chez le patient ayant une suspicion de SMD. Une trisomie 8 a été observé dans une partie des cellules de la moelle osseuse du patient, mais même s'il est connu que la trisomie 8 est associée au développement de cancers hématologiques, ce résultat n'était pas suffisant pour conclure à un diagnostic de SMD. Ce cas a été reclassifié en anémie transfusion-dépendante ⁶¹. Le 7 Juin 2021, après que le Bluebird bio ait rendu public ces résultats, la FDA a levé l'arrêt sur les essais cliniques, et ces derniers ont tous repris.

1.7.3. Aucun cas d'oncogenèse rapporté

Depuis la première utilisation de CSH modifiées par LVV dans le cadre de la thérapie génique pour les hémoglobinopathies, aucun cas d'oncogenèse lié à de la mutagenèse insertionnelle n'a été reporté ⁶².

Néanmoins, des questions sur la sécurité d'utilisation des LVV subsistent, surtout vis-à-vis des VCN élevés utilisés mais malheureusement nécessaires dans la thérapie génique pour les patients drépanocytaires. Il y a une nécessité d'optimiser les LVV mais également les protocoles de thérapie génique actuels.

1.8. Futurs défis dans la thérapie génique pour le traitement de la drépanocytose

Pour le traitement de la drépanocytose, le défi majeur est donc d'augmenter la balance bénéfice/risque : on veut améliorer l'efficacité de la thérapie génique sans augmenter le risque de mutagénèse insertionnelle.

L'efficacité de la thérapie génique est limitée par le niveau d'expression des chaînes de β^{AT87Q} -globine. Augmenter le VCN en augmentant la concentration de vecteur fonctionnel ajoutée lors de la transduction (également appelé **titre du vecteur**) peut sembler intéressant pour augmenter la probabilité que les chaînes de β^{AT87Q} -globine soient exprimées en plus grande quantité. Néanmoins, toutes les CSH ne sont pas transduites, et certaines CSH sont plus transductibles que d'autres. Vouloir augmenter le VCN moyen aboutirait à augmenter seulement le VCN dans les CSH transductibles (ce qui augmentera le risque de mutagénèse insertionnelle dans ces cellules), sans pour autant augmenter la proportion de CSH transduites au total, ce qui ne serait pas bénéfique pour le patient ⁶³.

Deux approches peuvent donc être envisagées, d'une part la sélection des cellules transduites, et d'autre part une optimisation du vecteur thérapeutique pour avoir une meilleure efficacité à expression équivalente.

1.8.1. Sélection des cellules transduites

Une des approches pour augmenter l'efficacité de la thérapie génique, sans augmenter le risque de mutagénèse insertionnelle, serait de transduire les CSH modérément pour obtenir seulement une ou deux copies du vecteur par cellule, mais par la suite de sélectionner seulement les cellules transduites avant de les réimplanter dans le patient.

Pour cet objectif, mon équipe a développé un nouveau LVV, LTGCPU7, qui est un dérivé du LVV BB305 ayant en plus l'expression supplémentaire d'un gène exprimant la puromycine N-acétyltransférase (**Figure 10B**). Cette expression permet la sélection des cellules transduites après une exposition à la puromycine et à un inhibiteur de MDR1. MDR1 (pour *multidrug resistance-related protein*) permet la résistance des cellules à certains médicaments, dont la puromycine.

Après des études chez des souris immunodéficientes, la sélection de CSH humaines transduites et le taux de reconstitution hématopoïétique étaient très satisfaisants ⁶³, et des études précliniques sont maintenant nécessaires pour évaluer la balance bénéfique/risque de l'utilisation de ce nouveau LVV, avant de passer chez l'Homme.

1.8.2. Optimisation thérapeutique du vecteur

Une deuxième approche, qui fait l'objet de ce projet, est d'optimiser l'actuel vecteur thérapeutique BB305 utilisé dans les essais cliniques dans le but d'**obtenir la même efficacité thérapeutique, mais avec un VCN moyen plus faible** (ce qui revient à avoir une meilleure efficacité thérapeutique à VCN égal).

Pour ces raisons, nous avons voulu tester l'efficacité d'un nouveau LVV, ayant la séquence la β^{AT87Q} -globine thérapeutique, et permettant l'expression supplémentaire d'une nouvelle séquence codant pour un shARN-miR30 qui cible l'ARN messager de l' $\alpha 2$ -globine. L'hypothèse ayant mené à ce choix est détaillée ci-dessous. Ce nouveau LVV est appelé **LV β -sha2 (Figure 10C)** ⁶⁴.

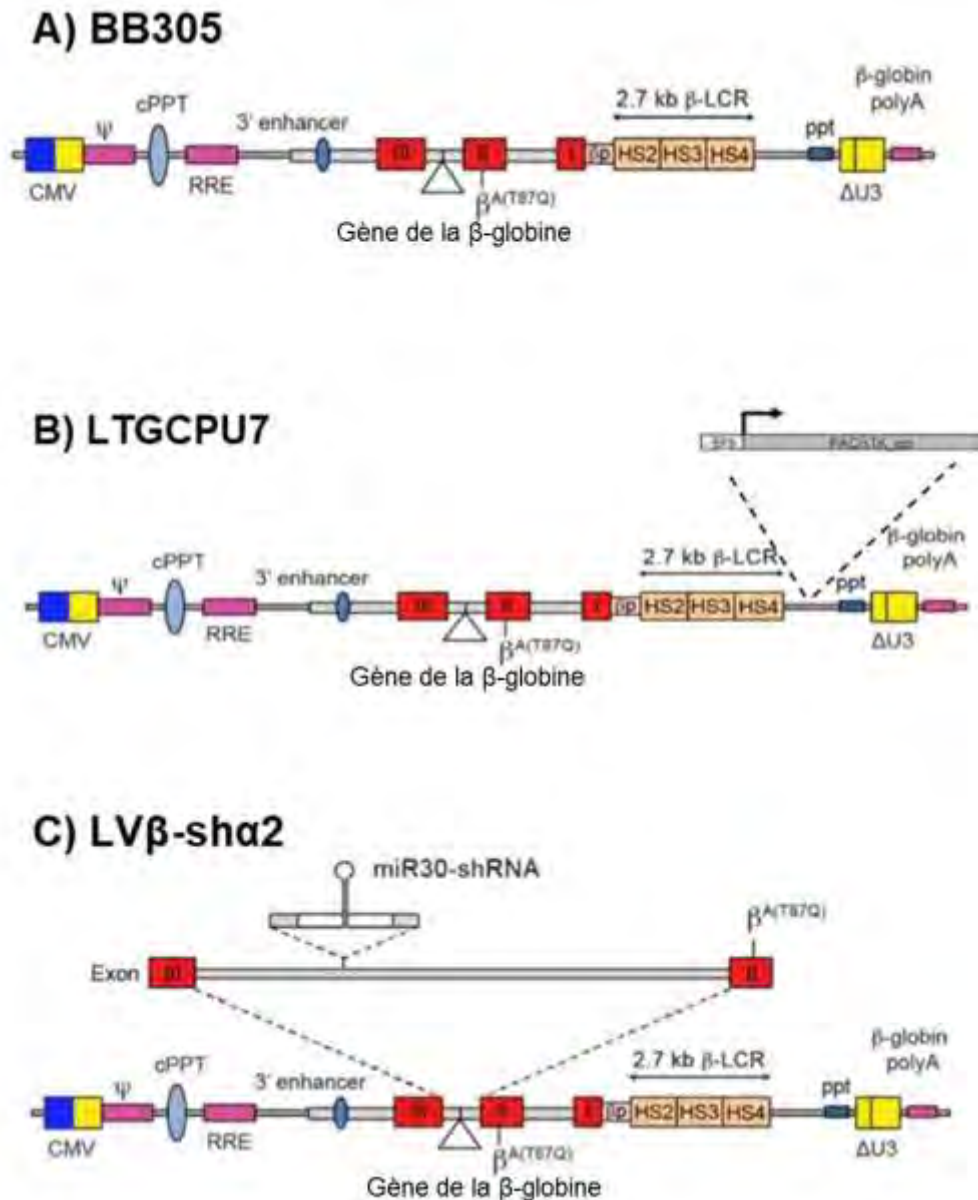


Figure 10. Représentation des LVV.

A) BB305, B) LTGCPU7 et C) LVβ-shα2 (adapté de T.Nualkaew et al., 2021 and K. Bhukhai et al., 2018).

Éléments communs aux 3 vecteurs : CMV ; Promoteur et amplificateur du Cytomegalovirus ; Ψ^+ : signal d'encapsidation du génome ARN ; cPPT : polypurine tract centrale ; RRE : Élément de réponse REV ; 3' enhancer : Amplificateur 3' de la β -globine ; Gène de la β -globine humaine (3 exons) avec la mutation β^{AT87Q} ; βp : promoteur de la β -globine ; HS : sites hypersensibles au niveau de la région du contrôle du locus (LCR) ; ppt : polypurine tract en 3' ; $\Delta U3$: région tronquée du LTR du HIV ; β -globine polyA : queue poly(A) de la β -globine de lapin.

Éléments spécifiques : **LTGCPU7** : EFS : version tronquée du promoteur du facteur d'élongation 1-alpha pour le contrôle de PAC/ Δ TK_opt ; PAC/ Δ TK_opt : séquence optimisée de l'expression du gène de la pyromycine N-acétyltransférase (PAC) fusionné avec une version tronquée du gène de la thymidine kinase de l'herpès simplex virus type 1 (Δ TK). **LVβ-shα2** : miR30-shRNA : cassette pour l'expression du shARN contre l' $\alpha 2$ -globine dans un intron du gène de la β^{AT87Q} -globine.

2. CONTEXTE SCIENTIFIQUE DU PROJET

2.1. Hypothèse

L'hypothèse de ce projet est la suivante : la réduction des chaînes d' α -globine va améliorer l'efficacité de la thérapie génique actuelle utilisant le vecteur BB305. Cette hypothèse est fondée sur les observations suivantes, qui mettent en lien :

- 1) la diminution du taux de chaînes d' α -globine avec l'amélioration clinique des patients drépanocytaires.
- 2) les taux d'HbS et d'HbA chez les patients ayant le trait drépanocytaire et des délétions dans le gène de l' α -globine.
- 3) les différences d'affinités entre les chaînes d' α -globine et de β -globine ou de β^S -globine.

2.1.1. α -thalassémie, drépanocytose et amélioration clinique

Chez l'Homme, quatre gènes de l' α -globine sont présents : deux gènes pour l' $\alpha 1$ -globine et deux gènes pour l' $\alpha 2$ -globine. L' α -thalassémie est caractérisée par l'absence d'un, deux ou trois gènes de l' α -globine. De nos jours, il est bien établi que les patients drépanocytaires ayant en parallèle une α -thalassémie ont une meilleure qualité de vie que les patients seulement drépanocytaires ^{65,66}. Cliniquement, l' α -thalassémie est un modulateur majeur de la vasculopathie dans la drépanocytose. Elle améliore les symptômes cliniques en diminuant le risque d'AVC, les vasculopathies pulmonaires, et les ulcères au niveau des jambes. La réduction des chaînes d' α -globine conduit à une diminution de la quantité d'hémoglobine dans les globules rouges (aussi appelé CCMH pour Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine), ce qui permet une diminution de la probabilité de polymérisation de l'HbS, et donc une réduction de l'hémolyse.

Il faut également souligner que les patients ayant une α -thalassémie silencieuse ($-\alpha/\alpha\alpha$) sont toujours asymptomatiques et sans répercussion biologique et/ou clinique. Les patients avec le trait α -thalassémique ($-\alpha/-\alpha$ ou $--/\alpha\alpha$) montrent une production quasi-normale de globules rouges avec une très légère anémie microcytaire hypochrome ⁶⁷. La majorité de ces patients n'ont aucun symptôme, même si certains rapportent une légère fatigue ou intolérance à l'exercice.

2.1.2. α -thalassémie, trait-drépanocytaire et chaînes de globines

Les globules rouges de patients ayant le trait drépanocytaire HbAS (c'est-à-dire les patients hétérozygotes, $\beta^S\beta^A$) et ayant des gènes normaux d' α -globine (quatre gènes fonctionnels $\alpha\alpha/\alpha\alpha$) ont environ 40% d'HbS et 60% d'HbA. Il est important de souligner que les globules rouges synthétisent les chaînes de β -globine et de β^S -globine à la même quantité. Chez les patients HbAS ayant une simple délétion dans les gènes d' α -globine (trois gènes fonctionnels $-\alpha/\alpha\alpha$), le taux d'HbS chute à 35%. Les patients HbAS ayant aussi le trait α -thalassémique (deux gènes fonctionnels, homozygotes $-\alpha/-\alpha$ ou hétérozygotes $--/\alpha\alpha$) ont un taux d'HbS autour de 30%. Enfin, le peu de patients HbAS avec une hémoglobinose H (c'est-à-dire un seul gène fonctionnel, $--/-\alpha$) ont seulement 20 à 25% d'HbS ^{67,68}.

Un déficit en chaîne d' α -globine engendre la diminution du taux d'HbS au profil de l'HbA : les chaînes de β^S -globine rivalisent moins efficacement que les chaînes normales de β -globine pour se lier aux chaînes d' α -globine libres.

2.1.3. Importance de l'affinité entre les chaînes de globines

Pour expliquer l'amélioration clinique et ces différences dans les proportions d'HbS chez les patients α -thalassémiques et drépanocytaires, la différence d'affinité entre les chaînes de β -globine et β^S -globine pour l' α -globine a été mise en cause. Le déficit en chaînes d' α -globine causé par l' α -thalassémie modifie l'assemblage du tétramère d'Hb. Plus la charge de la chaîne de la β -globine est négative, meilleure est l'affinité avec la chaîne d' α -globine ⁶⁹. Si un variant de la chaîne de β -globine est chargé plus négativement que l'original, alors l'Hb formée est trouvée en plus grande proportion que l'HbA. Inversement, si le variant de la chaîne de β -globine est chargé plus positivement, l'Hb formée est trouvée en plus faible proportion que l'HbA.

Dans le cas de la drépanocytose, la mutation remplace un acide glutamique (avec un point isoélectrique pKi : 3,22) avec une valine (pKi : 5,97) en position 6 : la chaîne de β^S -globine est plus positive que la chaîne normale. Les chaînes de β^S -globine malade vont former des dimères avec les chaînes d' α -globine plus difficilement, en comparaison avec la chaîne de β -globine saine.

Pour conclure, chez les patients avec un trait drépanocytaire HbAS, les tétramères d'hémoglobine HbA sont formés préférentiellement par rapport aux tétramères d'hémoglobine HbS⁶⁹.

2.1.4. Hypothèse de recherche

La finalité de ce projet est d'étudier l'extinction du gène de l' $\alpha 2$ -globine (sans toucher à l'expression de l' $\alpha 1$ -globine) en parallèle de l'expression de la β^{AT87Q} -globine thérapeutique, dans le traitement de la drépanocytose par thérapie génique.

Comme expliqué par les observations précédentes, la réduction de l' $\alpha 2$ -globine uniquement (qui peut potentiellement réduire de 50% au maximum la production de chaîne d' α -globine totale) aurait différentes conséquences :

- 1) la réduction de la proportion d'HbS dans les globules rouges diminuera l'hémolyse et les conséquences cliniques.
- 2) les chaînes d' α -globine restantes vont préférentiellement se lier et former des tétramères avec les chaînes de la β^{AT87Q} -globine thérapeutique plutôt que les chaînes de β^S -globine drépanocytaire car les charges de la chaîne de la β -globine normale et de la β^{AT87Q} -globine sont similaires. Pour rappel, la mutation dans la β^{AT87Q} -globine thérapeutique substitue une thréonine (pKi : 5,60) avec une glutamine (pKi : 5,65) en position 87.
- 3) aucun effet indésirable pour le patient n'est attendu avec une réduction modérée des chaînes d' α -globine.

Ajouter un shARN dirigé contre le gène de l' $\alpha 2$ -globine dans le vecteur actuellement utilisé en clinique pourrait augmenter l'efficacité de la thérapie génique dans le cadre de la drépanocytose.

2.2. Historique de LV β -sh α 2

LV β -sh α 2 est un LVV exprimant la séquence de la β^{AT87Q} -globine thérapeutique et un shARN-miR30 qui cible l'ARN messager de l' α 2-globine. Il a été développé par mon équipe en collaboration avec le Dr. Jim Vadolas (Hudson Institute of Medical Research, Melbourne, Australie) dans le but de soigner les patients β -thalassémiques les plus sévères (ayant un génotype β^0/β^0), pour lesquels l'efficacité de BB305 n'est pas suffisante pour atteindre une indépendance transfusionnelle.

Pourquoi ce vecteur est-il aussi intéressant dans le cadre de la thérapie génique pour le traitement de la β -thalassémie ? Dans la β -thalassémie, la diminution ou l'absence de chaîne de β -globine provoque un excès de chaînes d' α -globine non-appariées très instables. Ces dernières s'accumulent dans le cytoplasme et précipitent, menant à la production d'agrégats toxiques et à l'apoptose des globules rouges immatures. Les patients les plus sévères (β^0/β^0) sont beaucoup plus compliqués à soigner car ils sont le plus touché par ce phénomène de toxicité. LV β -sh α 2 permettrait de soigner ces patients en diminuant le taux de chaînes d' α -globine non-appariées et du coup en diminuant les complications cliniques que provoquent ces dernières.

Ce nouveau LVV a déjà été testé *in-vitro* dans des lignées cellulaires érythroïdes et dans des CSH CD34+ de donneurs sains et de patients β -thalassémiques, et il a démontré son efficacité au niveau moléculaire. Dans les cellules transduites par LV β -sh α 2, l'expression de l'ARNm de l' α 2-globine (HBA2) est diminuée sans changer les niveaux d'expression de l'ARNm de l' α 1-globine (HBA1) ni de la chaîne de β^{AT87Q} -globine thérapeutique. *In-vitro*, la diminution du ratio des ARNm α -globine/ β -globine est 1,7 fois plus importante en utilisant ce nouveau LVV en comparaison au vecteur BB305, à VCN équivalent. Chez les patients β -thalassémiques les plus sévères, cela permettrait d'avoir une meilleure efficacité thérapeutique sans augmenter le risque de mutagenèse insertionnelle⁶⁴. Des données *in-vivo* sont maintenant nécessaires pour évaluer l'efficacité de ce vecteur dans la réduction des chaînes d' α -globine chez l'animal.

2.3. Objectif de ces travaux

L'ensemble de ces précédents résultats indique que LV β -sh α 2 semble être un très bon candidat LVV pour évaluer l'impact de la réduction des chaînes d' α -globines dans la physiopathologie de la drépanocytose. En effet, diminuer le VCN seuil pour atteindre l'efficacité thérapeutique dans la thérapie génique de la drépanocytose permettrait de 1) réduire le risque de mutagenèse insertionnelle, 2) améliorer l'efficacité de la thérapie pour le patient et 3) augmenter le rapport bénéfice/risque.

L'objectif de ce projet est d'étudier le potentiel thérapeutique du vecteur LV β -sh α 2 (contenant un shARN contre l' α 2-globine) en comparaison au vecteur de référence BB305 (utilisé actuellement dans les essais cliniques), *in-vivo* dans un modèle de drépanocytose murin.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Souris

Le modèle murin utilisé dans ce projet est la souris SAD ⁷⁰. C'est un modèle de souris transgénique reproduisant certaines caractéristiques de la drépanocytose, développé en 1991 par l'équipe de Frank Constantini. Elle exprime le gène de la β^{SAD} -globine et aussi de l' α_2 -globine humaine, ce qui en fait un modèle d'analyse pertinent pour mesurer le potentiel de LV β -sh α_2 dans la drépanocytose.

Le nom β^{SAD} -globine est la contraction de $\beta^{\text{S-Antilles-Dpunjab}}$: ce sont trois mutations de la β -globine retrouvées chez l'Homme. La mutation β^{S} (Glu6Val) est celle responsable de la drépanocytose chez l'Homme. Les deux autres mutations sont connues pour augmenter le taux de polymérisation de l'HbS et pour augmenter la sévérité des symptômes lorsqu'elles sont retrouvées chez l'Homme : la mutation β^{Antilles} (Val23Ileu) qui diminue l'affinité avec l'oxygène ⁷¹ et la mutation β^{Dpunjab} (Glu121Gln) qui crée de nouveaux sites de contact pour initier la polymérisation de l'HbS ⁷². Les souris SAD produisent 19% d'Hb humaine SAD ($\alpha_2^{\text{h}}\beta_2^{\text{SAD}}$), qui est l'Hb d'intérêt pour ce projet. Elles produisent également 39,5% d'Hb murine ($\alpha_2^{\text{m}}\beta_2^{\text{m}}$) et 45,5% d'Hb hybride (39,5% de $\alpha_2^{\text{h}}\beta_2^{\text{m}}$ et 2% de $\alpha_2^{\text{m}}\beta_2^{\text{SAD}}$).

Ce modèle a été utilisé dans les études précliniques utilisant le vecteur BB305 avec de très bons résultats ⁵². Même si de façon physiologique, ces souris ne montrent aucun symptôme de la maladie, ce modèle permet de mimer des caractéristiques de la drépanocytose *in-vitro* comme la déformation des globules rouges et la polymérisation de l'HbSAD en condition hypoxique.

Les souris ont été initialement obtenues par rétrocroisement avec la souche C57BL/6J, et ont été maintenues par croisement entre les souris transgéniques hémizygotés mâles et des femelles sauvages. Les souris sauvages (WT pour *Wild Type*) issues de mêmes portées que les souris SAD sont utilisés en tant que **contrôle négatif** pour la conception des expériences du projet et de la validation de l'expérience de déformation des globules rouges en condition hypoxique. Les souris syngéniques C57BL/6J CD45.1 saines sont utilisées en tant que **receveuses** pour l'expérience de transplantation, pour permettre une analyse du chimérisme (correspondant à une analyse du pourcentage de cellules CD45.2 et de cellules CD45.1).

En effet, les souris donneuses et receveuses ont différents allèles pour CD45 présent à la surface des leucocytes : les souris transgéniques SAD ou les souris sauvages de même portée sont CD45.2 et les souris receveuses pour la transplantation C57BL/6J sont CD45.1. Cette différence a permis l'analyse de l'efficacité de greffe par calcul du pourcentage de cellules du donneur dans le sang de la souris receveuse (chimérisme= $CD45.2 * 100 / (CD45.1 + CD45.2)$).

Toutes les expériences ont été approuvées par le comité éthique CETEA-CEA (Comité d'éthique de la Direction de la Recherche Fondamentale du CEA) sous le numéro A1804.

3.2. Isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation (IEF pour *isoelectric focusing*) permet de distinguer les dimères de chaînes de globines : murine ($\alpha^m\beta^m$), humaine ($\alpha^h\beta^{SAD}$) ou hybride ($\alpha^h\beta^m$ et $\alpha^m\beta^{SAD}$). Cela a permis d'analyser et confirmer le génotype des souris SAD, dont le sang a été utilisé pour les expériences de déformation des globules rouges, et les cellules de la moelle osseuse pour les expériences de transplantation.

10 μ L du sang de chaque souris ont été collectés par prélèvement rétro-orbitaire en utilisant un tube capillaire hépariné (Hirschmann Laborgeräte) et ont ensuite été lavés dans 1mL de NaCl (Sigma) à 0,9% (w/v). Les hémolysats ont été préparés avec 2 μ L de sang lavés et 8 μ L de KCN (Helena Biosciences Europe) à 0,1% (w/v). Les IEF ont été réalisées en utilisant un gel préfabriqué de polyacrylamide (Phastgel IEF 5-8 ; GE Healthcare). 2 μ L des hémolysats ont été déposés près de la cathode. Les conditions de migration sont les suivantes : 1040 Volts pendant 30 minutes en utilisant PhastSystem (Pharmacia). Les gels d'IEF sont ensuite fixés avec de l'acide trichloracétique (préparé avec 6,1mL de TCA pure et 93,9 mL d'H₂O) à 10% (w/v) pendant 1 minute, puis rincés à l'eau courante et séchés à température ambiante.

3.3. Production des LVV et titration

Les LVV (BB305 et LV β -sh α 2 pour les expériences *in-vivo*, et un LVV exprimant la GFP pour des tests de mise au point effectués en amont de la transplantation) utilisés pour ce projet ont été produits et titrés par mon équipe en juillet 2020. La production est faite en co-transfectant des cellules HEK293T avec le vecteur d'intérêt et un système d'encapsulation utilisant les plasmides suivants : p633 (exprimant rev, un régulateur post-transcriptionnel), Ψ N15 (exprimant vsvG, une protéine d'enveloppe) et HPV275 (exprimant gag-pol, des protéines de structures et des enzymes virales). Pour des raisons de sécurité, tous les gènes accessoires impliqués dans la propagation virale sont exclus. Le surnageant, contenant les LVV, est récupéré, purifié et concentré comme décrit dans l'article de Karine Sii-Felice ⁷³. Les titres des LVV, représentant une concentration de vecteur fonctionnel (et donc pouvant transduire une cellule) sont déterminés en transduisant des cellules murines NIH3T3 avec plusieurs volumes de LVV, puis en réalisant une réaction de polymérisation en chaine quantitative (qPCR) et en calculant le VCN, comme décrit ci-après.

3.4. Enrichissement en CSH

3.4.1. En utilisant du 5-fluorouracile

Des souris femelles de deux à quatre mois sont traitées par injection intrapéritonéale de 5-Fluorouracile (5-FU) (F6627, Sigma-Aldrich) à une concentration de 150 mg/kg. Le mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la thymidylate synthase, qui cible et tue les cellules en division. Cela permet la sélection des cellules quiescentes, qui ne se divisent pas, comme les cellules d'intérêt qui sont les CSH. Quatre jours après, les cellules de la moelle osseuse sont récupérées des tibias et fémurs des souris en injectant dans la cavité médullaire de l' α -MEM (GE-Healthcare). Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS (Sigma-Aldrich), et sont nommées cellules **5-FU** pour la suite.

3.4.2. En utilisant la déplétion en cellules hématopoïétiques différenciées

Les cellules de la moelle osseuse de souris femelles âgées de deux à quatre mois sont récupérées des tibias et fémurs par injection d' α -MEM dans la cavité médullaire comme précédemment, puis lavées dans du PBS. Elles sont ensuite enrichies en CSH grâce à l'utilisation du kit « *Lineage cell depletion kit* » (Miltenyi Biotec), qui permet d'enlever les cellules différenciées comme les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes/macrophages, les granulocytes, les globules rouges et tous leurs précurseurs. Cette déplétion se fait grâce à des marqueurs de différenciation exprimés par ces lignées cellulaires, comme CD5, CD45R, CD11b, Anti-Gr-1, 7/4, Ter-119 selon les instructions du fabricant. Les cellules sont nommées **Lin^{-low}** pour la suite. Le pourcentage de cellules Lin^{-low} est analysé par cytométrie comme décrit ci-dessous.

3.5. Culture et transduction des CSH

Les cellules 5-FU et Lin^{-low} sont comptées en utilisant une lame KOVA (Kova international) et du bleu de Trypan (Sigma-Aldrich) pour exclure les cellules mortes. Le nombre de cellules vivantes par souris donneuse est d'environ de 0,5 à 1 million pour les cellules 5-Fu, et de 1 à 2 millions pour les cellules Lin^{-low}. Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture à une concentration cellulaire comprise entre 500 000 et 1 000 000 cellules/mL. Deux milieux de culture sont utilisés : l' α -MEM supplémenté avec 15% de sérum de veau foetal (SVF) (GE-Healthcare) ou le StemSpan SFEM II (Stem Cell Technologies). Dans les deux cas, le milieu de culture est supplémenté avec des cytokines murines de Miltenyi Biotec : de l'interleukine 3 (IL3) à 6,25 ng/mL, de l'interleukine 6 (IL6) à 10 ng/mL et du SCF à 100 ng/mL, mais aussi de la glutamine à 1% (GE Healthcare), et un mélange de pénicilline et streptomycine à 1% (GE Healthcare) pendant 24 heures.

Un jour plus tard, les cellules sont comptées et transduites dans le même milieu avec un LVV (BB305, LV β -sh α 2 et un LVV exprimant la GFP pour des tests de mise au point effectués en amont de la transplantation) selon une multiplicité d'infection choisie (MOI pour *multiplicity of infection*). La MOI est une notion importante, cela représente le nombre de LVV ajoutés en culture pour l'infection d'une cellule. Par

exemple, à une MOI de 3, il est mis en co-culture 3 LVV pour une cellule. Ce calcul est réalisé grâce au titre du vecteur et au nombre de cellules en culture. Du sulfate de protamine (Sigma-Aldrich) est ajouté à 8 µg/mL pour optimiser la transduction.

Deux jours après la transduction, les cellules sont comptées, et 10 000 cellules sontensemencées dans un milieu de culture semi-solide à base de méthylcellulose Methocult GF M3434 (Stemcell Technologies), comprenant du SCF, IL3, IL6 et de l'EPO pour permettre le développement des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes et érythroïdes. Six jours après l'ensemencement, les cellules progénitrices capable de former une colonie (CFC pour *colony forming cells*) sont comptées à l'aide d'un microscope DM IL LED (11524257, Leica Microsystems). Les résultats sont normalisés en fonction du nombre de cellules présentes en culture liquide avant ensemencement.

Finalement, les cellules sont récoltées à partir du milieu semi-solide à base de méthylcellulose et lavées dans du PBS. L'efficacité de transduction est analysée par cytométrie pour les expériences utilisant le vecteur GFP, et en RT-qPCR pour les expériences utilisant les vecteurs de thérapie génique.

3.6. Transplantation

Les CSH ont été enrichies en cellules Lin^{-low}, puis mises en culture et transduites dans du milieu StemSpan SFEM II. Un jour après la transduction, les cellules sont lavées dans du α-MEM et 500 000 cellules Lin^{-low} sont transplantées par injection rétro-orbitaire dans des souris receveuses CD45.1 anesthésiées, qui ont été irradiées la veille par 11Gy (2 doses de 5,5Gy à 3 heures d'intervalle) en utilisant des radiations de type gamma (GSRD1 γ irradiation CS137, GSM). L'irradiation permet le conditionnement myéloablatif des souris pour assurer une bonne prise de greffe. Après transplantation, les souris sont traitées par antibiothérapie en ajoutant de la néomycine (Sigma) à 2 g/L dans l'eau de boisson, pendant 1mois, pour prévenir des infections bactériennes.

Des cellules transduites sont aussiensemencées dans un milieu semi-solide de méthylcellulose comme décrits au-dessus. Les cellules sont récoltées après huit jours de culture, et lavées dans du PBS avant congélation à -20° pour des analyses de VCN par RT-qPCR pour la détermination de l'efficacité de transduction dans le

produit médicamenteux injecté (les LVV n'exprimant pas la GFP, une analyse par cytométrie n'est pas possible dans ce cas-là).

3.7. Extraction d'ADN et qPCR pour la détermination du VCN moyen

L'ADN génomique est préparé en utilisant le NucleoSpin DNA Rapid Lyse (Macherey-Nagel, ref 740100) : il provient soit des cellules récoltées des cultures *in-vitro* et resuspendues dans 200 µL de PBS, soit de 100 µL de sang périphérique dilué avec 100 µL de PBS. Une autre méthode est la préparation d'ADN génomique à l'aide de NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, ref 740951) après une étape de dilution et d'extraction avec du phénol-chloroform-isoamylalcool (Sigma-Aldrich).

La quantification de l'ADN est effectuée en utilisant le kit DNA quantification (Biorad, kit#1702480), qui consiste en une coloration avec du Hoechst et une quantification à l'aide d'un fluoromètre (Versa Fluor™ Fluorometer, Biorad).

40ng d'ADN génomique (5µL, 8ng/µL) sont mélangés avec 20µL d'un mix pour qPCR contenant des sondes et amorces pour la β-actine murine et pour GAG (**Table 1**), dont la séquence est présente dans les LVV, et du 2X qPCR MasterMix (RT-SP2X-03+WOUN, Eurogentec). Après une étape d'activation enzymatique et de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 minutes, 40 cycles sont effectués en utilisant le 7300 ABI Prism Detection System. Un cycle correspond à 95°C pendant 10 secondes (étapes de dénaturation) et 60°C pendant 60 secondes (étape d'élongation).

Les résultats obtenus sont comparés avec des courbes d'étalonnage effectuées avec des mélanges d'ADN de cellules 2C12A2 transduites contenant une moyenne de 1/0.1/0.01/0.001 copie de vecteur lentiviral par génome haploïde. Une courbe de régression est tracée, avec l'équation $y=ae^{-bx}$: a correspond à l'intersection de y et b à la pente de la courbe. Les VCN sont déterminés avec la méthode de comparaison des CT ($\Delta\Delta CT$) en utilisant le logiciel 7300 System Software, dans lequel le $VCN=a^{-b\Delta\Delta CT}$.

3.8. Extraction d'ARN, transcription inverse et qPCR

Les ARN totaux sont extraits à partir de 50 μ L de sang périphérique en utilisant le kit Purelink RNA mini (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Puis un traitement à la DNase1 (Biolabs, ref M0303L) est effectué, à une concentration finale de 0,2 U/ μ L à 25°C pendant 15 minutes pour éviter des contaminations d'ADN. L'inactivation de la DNase1 est effectuée avec une incubation de 10 minutes à 65°C.

Le premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé à l'aide d'une reverse transcription (RT) à 25°C pendant 15 minutes puis 48°C pendant 30 minutes, en utilisant le kit de transcription inverse de Eurogentec (ref RT-RTCK-05). L'enzyme est inactivée à 95°C pendant 5 minutes. Un traitement RNaseH (Biolabs, ref M0297S) est effectué, à une concentration finale de 0,1 U/ μ L, à 37°C pendant 20 minutes, pour prévenir de la présence d'hybride ARN/ADN et augmenter la sensibilité de la qPCR.

Les ADNc sont amplifiés par qPCR en utilisant un mix contenant les sondes et amorces de l' α -globine humaine, de la β -globine humaine (toutes les amorces et sondes viennent de ThermoFisher Scientific) et du 2X qPCR MasterMix (Eurogentec). Bien que les amorces de l' α -globine ciblent une séquence commune pour les gènes d' α 1-globine humaine (HBA1) et d' α 2-globine humaine (HBA2), seul le gène de l' α 2-globine humaine est exprimé dans les souris SAD. Après une étape d'activation/dénaturation à 95° pendant 10 minutes, les 40 cycles suivants sont effectués en utilisant le système 7300 ABI Prism Detection : 94°C pendant 10 secondes (étape de dénaturation) et 60°C pendant 60 secondes (étape d'élongation). Les résultats sont déterminés par la méthode du Δ CT en utilisant le logiciel 7300 System Software, dans lequel le ratio des ARNm α -globine/ β -globine = $2^{-\Delta$ CT}. Les sondes et amorces utilisées sont détaillées dans la **Table 1**.

Assay (TagMan)	Name	Primer and Probe	Sequence (5'-3')	Modification	Concentration
Vector Copy Number	Lentiviral vector	GAG F	GGAGCTAGAACGATTCGCAGTAA *	-	720nM
		GAG R	GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC *	-	720nM
		GAG P1	ACAGCCTTCTGATGTCTCTAAAAGGCCAGG *	5' FAM 3' TAMRA	140nM
	Mouse β -actin	m β -actin F1	ACGGCCAGGTCATCACTATTG *	-	900nM
		m β -actin R1	CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA *	-	900nM
		m β -actin P1	CAACGAGCGGTTCCGATGCCCT *	5' FAM 3' TAMRA	250nM
RT-qPCR	Human β -globin	HBB	Hs00747223_g1#	5' FAM 3' NFQ-MGB	1X
	Human α -globin	HBA (HBA1 and HBA2)	Hs00361191_g1#	5' FAM 3' NFQ-MGB	1X

* Eurogentec ; #Applied Biosystems (Thermofisher Scientific)

Tableau 1. Sondes et amorces utilisées pour le calcul des VCN et des analyses RT-qPCR.

3.9. Analyse de la déformation des globules rouges

5 μ L de sang sont lavés dans du PBS et centrifugés à 280 g pendant 5 minutes. Le sang est ensuite dilué à un ratio de 1:1500 dans du DMEM (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF et 1% de pénicilline/streptomycine. 200 μ L de sang dilué sont placés dans des chambres de culture 8 puits (IBIDI). Ces chambres sont préalablement traitées avec 200 μ L par puits d'un mélange de 0,1% de poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) et 0.2% de gélatine (Sigma-Aldrich) dans du PBS pendant 20 minutes, puis lavées dans du PBS et séchées à température ambiante.

Le pourcentage de cellules déformées est analysé en utilisant un microscope confocal (Nikon A1+) couplé à une chambre à hypoxie (Okolab), à différent temps et pression partielle d'oxygène (de 21% à 1%).

3.10. Hématologie

Les mesures de numération formule sanguine (NFS) sont effectuées en utilisant 7 μ L de sang total, grâce à l'analyseur scil Vet abc system (Scil).

3.11. Cytométrie

3.11.1. CFC exprimant la GFP

L'efficacité de transduction dans les CFC est effectuée en analysant le pourcentage de cellules exprimant la GFP après récupération des cellules du milieu semi-solide à base de méthylcellulose et lavage dans du PBS.

3.11.2. Cellules Lin^{-/low}

La détermination du pourcentage de pureté en cellules Lin^{-/low} est effectuée après lavage dans du PBS de 50 000 cellules obtenues dans la fraction Lin^{-/low}. Ces cellules sont marquées dans du PBE (PBS, EDTA 2mM (Sigma-Aldrich), BSA 5% (PAA Laboratories)) avec un mélange d'anticorps couplés à de la biotine (de eBioscience) : anti-mB220 à 1/400, anti-mCD11b à 1/1000, anti-mGr1 à 1/100, anti mTer119 à 1/300, anti-mCD8 à 1/100, anti-mCD4 à 1/200 et anti-mCD5 à 1/400. Après une étape de lavage dans du PBS, de la streptavidine (couplé à AlexaFluor488, Life Technologies) diluée au 1/100 est ajoutée pour révéler la présence de cellules contaminantes Lin⁺ dans la fraction Lin^{-/low}. La proportion de cellules Lin^{-/low} est ensuite déterminée.

3.11.3. Prise de greffe

L'efficacité de la greffe des cellules transduites dans les souris SAD est déterminée en utilisant 15 µL de sang périphérique. Les globules rouges sont lysés grâce à 1 mL de solution comprenant du chlorure d'ammonium à 155 mM et du bicarbonate de potassium à 10 mM (Sigma-Aldrich). Après une étape de lavage dans 500 µL de PBE, les globules blancs sont couplés avec les anticorps suivants dilués dans du PBE : anti-mCD45.1 à 1/100 couplé à APC (clone A20, eBioscience) pour les souris receveuses et anti-mCD45.2 à 1/100 couplé à PE (clone 104, eBioscience) pour les souris donneuses.

Après chaque étape de couplage avec les anticorps ci-dessus, les cellules sont à chaque fois lavées et resuspendues dans du PBS avec du SYTOX Blue (Thermofisher Scientific) à une concentration finale de 0,2 μM pour permettre une exclusion des cellules mortes lors de l'analyse. Toutes les données de FACS sont obtenues en utilisant MACSQuant Analyser (Miltenyi Biotec) et analysées en utilisant le logiciel Flowjo (LLC).

3.12. Analyses statistiques

3.12.1. t-test de Student

Pour la comparaison des 2 groupes, une p-value inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

3.12.2. Modèle mathématique de corrélation entre le ratio des ARNm α -globine/ β -globine et le VCN

Le ratio des ARNm α -globine/ β -globine mesuré dans les cellules du sang des souris recevant les cellules transduites est normalisé vis-à-vis de la valeur déterminée dans les souris recevant les cellules non-transduites (NT) (souris contrôles).

Le ratio des ARNm α -globine/ β -globine normalisé est corrélé en fonction du VCN de chaque souris, et une courbe de régression de type exponentielle est tracée suivant l'équation $Y=e^{-kx}$. Y représente le ratio des ARNm α -globine/ β -globine normalisé, k est la constante de décroissance et X le VCN. La diminution de l' α -globine pour une copie du vecteur numéro 1 par rapport à une copie du vecteur numéro 2 est calculé avec l'équation Y_2/Y_1 , où $Y_1=e^{-k_1x_1}$ et $Y_2=e^{-k_2x_2}$, avec $x_1=x_2=1$.

En d'autres termes, la diminution de l'expression du gène d' α -globine par copie de vecteur en comparaison à l'autre est égale à $e^{(k_1-k_2)}$.

Ce résultat est basé sur la supposition que les taux d'ARNm de β -globine thérapeutique est égale entre les 2 vecteurs à VCN équivalent, ce qui a déjà été démontré auparavant ⁶⁴.

4. RESULTATS

Ce projet a pour but d'étudier l'effet d'un nouveau LVV LV β -sh α 2 contenant un shARN anti α 2-globine humaine et la séquence codante pour la β -globine thérapeutique β^{AT87Q} dans un modèle murin de drépanocytose exprimant l' α 2-globine humaine. Des CSH provenant de souris SAD sont transduites soit avec le vecteur de référence BB305 (exprimant la β -globine thérapeutique β^{AT87Q} et actuellement utilisé dans plusieurs essais cliniques) soit avec un nouveau vecteur LV β -sh α 2, incluant en plus un shARN dirigé contre l' α 2-globine.

Nous avons d'abord effectué des **expériences d'optimisation des conditions d'enrichissement et de culture des CSH**.

Lorsque les meilleures conditions ont été définies, **la transduction des CSH avec LV β -sh α 2 et BB305** à différentes MOI a été réalisée.

Nous avons effectué des **expériences de transplantation** avec des CSH génétiquement modifiées dans des souris receveuses saines.

L'efficacité de transduction et de transplantation sont évaluées par qPCR et cytométrie, respectivement.

Les études moléculaires au niveau des ARN des chaînes de globines murines et humaines dans les cellules sanguines sont effectuées par RT-qPCR.

Le phénotype des globules rouges est également étudié en analysant leur rigidité cellulaire et leur capacité de déformation grâce à de l'imagerie sur cellules vivantes.

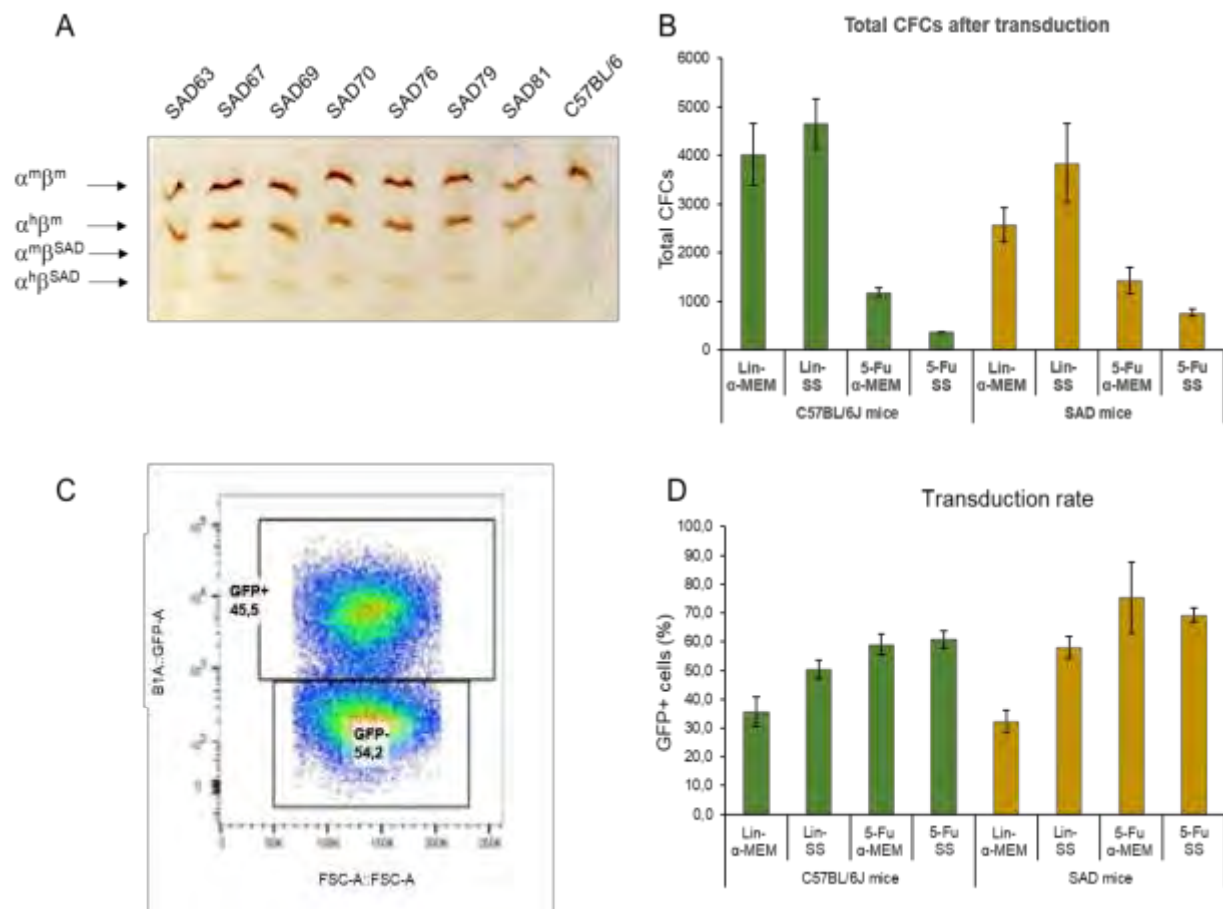


Figure 11. Choix du milieu de culture et d'enrichissement en CSH.

A) IEF pour sept souris SAD, et une souris WT en contrôle (C57BL/6). **B)** Nombre total de CFC obtenues à la suite de la déplétion en cellules Lin⁺ (Lin^{-/low}) ou traitement par 5-FU, puis cultivées en milieu α -MEM ou en StemSpan sans sérum (SS), à partir d'une souris SAD et d'une souris WT. Les données représentent la moyenne \pm écart-type de trois réplicas techniques. **C)** Exemple de détection des cellules GFP⁺ par cytométrie en utilisant le logiciel FlowJo. **D)** Le taux de transduction, déterminé par le pourcentage de cellules GFP⁺ six jours après l'ensemencement dans le milieu semi-solide, pour chaque condition. Les données représentent la moyenne \pm écart-type de trois réplicas techniques.

4.1. Mise en place et choix de la méthode d'enrichissement en CSH et du milieu de culture des cellules transduites avant transplantation

La présence de l'Hb anormale de toutes les souris SAD utilisées dans ce projet est confirmée par IEF (**Figure 11A**). Avant de lancer l'expérience de transplantation *in-vivo*, nous avons voulu déterminer quelle méthode d'enrichissement en CSH et quel milieu de culture étaient les plus adaptés pour la transduction de CSH de souris SAD et ensuite pour la transplantation. Dans ce but, deux méthodes d'enrichissement ont été testées sur des cellules de moelle osseuse extraites d'une souris SAD et d'une souris WT : la première est le traitement par **5-fluorouracile ou 5-FU**, qui permet la sélection des cellules en quiescence, et la deuxième est la déplétion des cellules Lin⁺, pour enrichir en cellules hématopoïétiques Lin^{-low}. Après avoir récupéré les cellules par l'une ou l'autre méthode, les cellules sont cultivées soit dans du **milieu StemSpan** (sans sérum) soit dans du **milieu α -MEM** (supplémenté avec 15% de SVF). Le même cocktail de cytokines est ajouté dans les 2 milieux permettant le maintien des CSH. Le jour suivant, l'efficacité de transduction est analysée par transduction des cellules avec un LVV contrôle exprimant la GFP, à une MOI de 1, pendant 24 heures. Les cellules sont ensemencées dans un milieu semi-solide permettant le développement des progéniteurs myéloïdes et érythroïdes.

Le nombre de progéniteurs/CFC est plus important quand les CSH sont enrichies en utilisant la déplétion en cellules Lin⁺ en comparaison avec le traitement par 5-FU. De plus, les cellules Lin^{-low} sont plus nombreuses quand elles sont stimulées dans le StemSpan que dans l' α -MEM (**Figure 11B**). Le taux de transduction, quantifié par cytométrie (**Figure 11C**), est légèrement plus haut après traitement par 5-FU quand dans les cellules Lin^{-low}. Dans les cellules Lin^{-low}, la transduction est plus efficace quand les cellules sont cultivées dans du StemSpan sans sérum (**Figure 11D**).

En prenant en compte ces résultats, pour les expériences de transplantation qui vont suivre, nous avons décidé de transduire des cellules Lin^{-low} et de les cultiver dans du milieu StemSpan.

4.2. Mise en place de l'expérience d'analyse de déformation des globules rouges

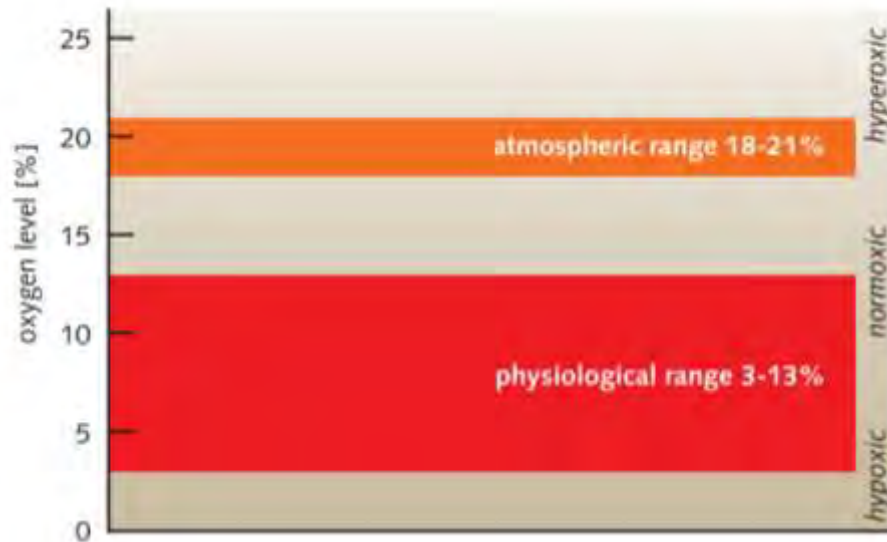


Figure 12. Environnement et taux d'oxygène auxquels sont confrontés les cellules dans les vaisseaux sanguins chez l'Homme.

Ce schéma prend en exemple les cellules endothéliales bordant les vaisseaux et leurs expositions en oxygène dans l'environnement via le sang, et ces résultats sont transposables aux globules rouges circulant en contact également avec le sang. Le taux varie de 13% (sang artériel) à 3% (sang capillaires / sang veineux). (PromoCell, Vascular cell culture under physiological oxygen tensions, 2017)

Un moyen de déterminer si le LVV LV β -sh α 2 améliore l'efficacité thérapeutique de la thérapie génique pour la drépanocytose est de comparer le taux de déformation des globules rouges à de faibles taux d'oxygène des souris transplantées avec des CSH transduites avec LV β -sh α 2 ou avec BB305, pour mimer les conditions physiologiques dans lesquelles les cellules se déforment chez l'Homme.

Avant de commencer cette analyse, nous avons décidé d'optimiser le protocole de déformation en observant des globules rouges provenant de souris SAD et de souris WT en condition hypoxique grâce à de l'imagerie sur cellules vivantes dans différentes conditions d'oxygène.

L'air est composé de 21% d'O $_2$. La pression atmosphérique est de 100 kPa au niveau de la mer, soit 760 mmHg (équivalent à 1 atmosphère). La pression partielle en l'oxygène (PO $_2$) dans l'air inspiré sec est de 0,21 x 100 = 21 kPa. En réalité, il est

légèrement plus faible car dans tous les climats, l'air est humidifié et il faut soustraire la pression partielle de la vapeur d'eau. On estime environ à 19,6 kPa la PO_2 dans l'air inspiré au niveau de la mer ⁷⁴.

Au niveau du corps humain, la PO_2 au niveau artériel est d'environ 13 kPa. Elle est d'environ 7 kPa dans les artérioles, et tombe environ à 3 à 4 kPa au niveau des capillaires ⁷⁵.

En prenant ces données en compte, et en gardant à l'esprit que nous sommes dans un système artificiel, nos globules rouges de souris drépanocytaires *in-vitro* seraient dans un environnement considéré comme physiologique à partir de 13% d'oxygène environ, et la limite physiologique basse comme retrouvée dans le corps humain serait aux alentours de 3% (**Figure 12**). Pour se faire, nous utiliserons un microscope confocal couplé à une chambre à hypoxie (**Figure 13A**). Sachant que ces souris ne développent pas de symptôme de la drépanocytose à l'état physiologique, nous descendrons à des degrés d'hypoxie plus faible pour aggraver la sévérité de la déformation cellulaire, jusqu'à 1% d'oxygène (limite à laquelle nos matériels nous permettent d'aller).

Pour chaque expérience, les globules rouges de souris WT ont été utilisés en tant que contrôle négatif : aucun changement dans la forme des globules rouges contrôles n'a été observé, à n'importe quel temps ou n'importe quel taux d'oxygène (**Figure 14A**).

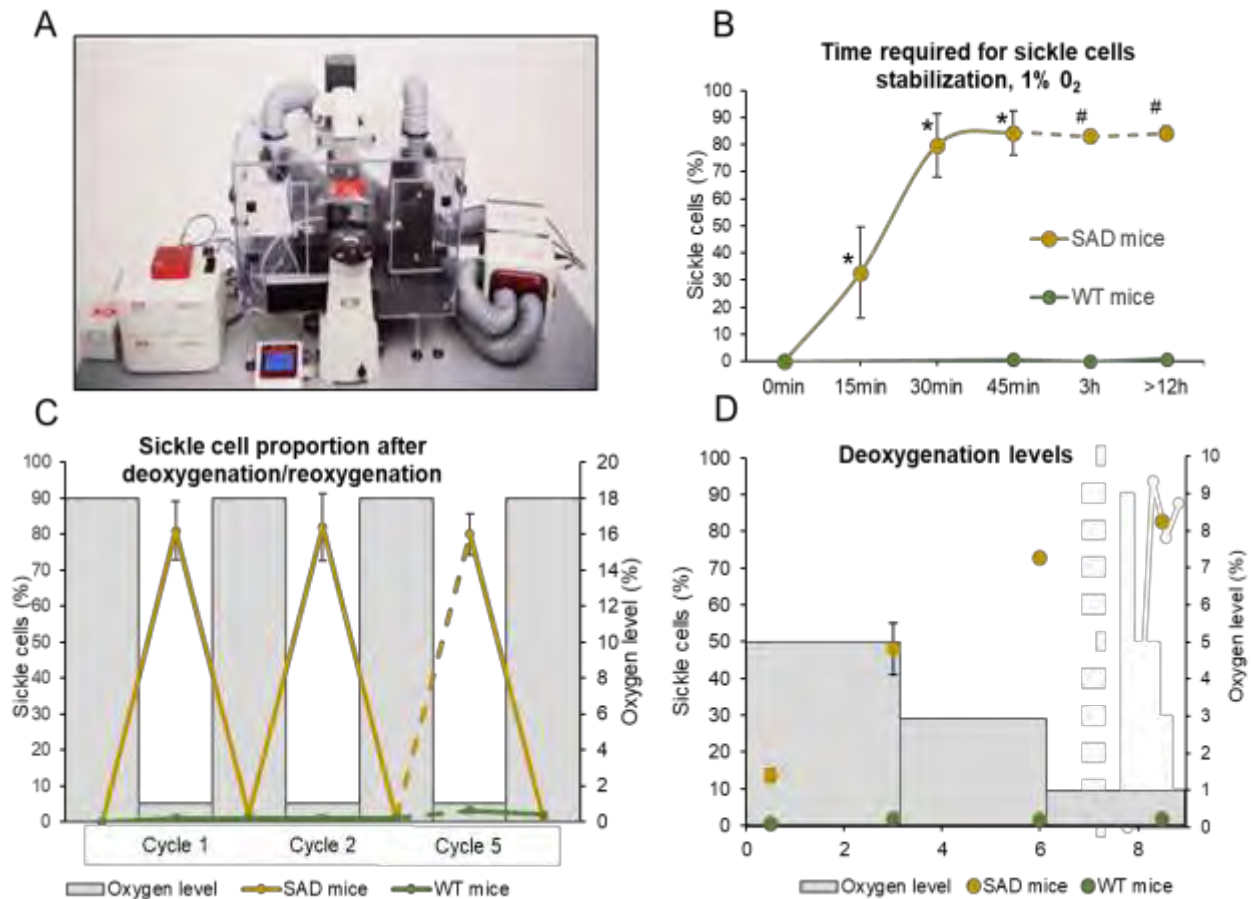


Figure 13. Analyse de la proportion de globules rouges déformés en condition hypoxique.

Les globules rouges déformés sont nommés « Sickle cells » sur les différents graphes. **A)** Microscope confocal (Nikon A1 +) couplé à une chambre à hypoxie (Okolab). **B)** Proportion de globules rouges déformés en fonction du temps, avec un changement d'environnement normoxique à 1% d'O₂ effectué à 0 minute. Les données représentent la moyenne ± écart-type de * n = 3 ou 4 souris ; # n = 1 souris. **C)** Impact de cycles de désoxygénation/réoxygénation sur la déformation des globules rouges issus de deux souris SAD et deux souris WT. Un cycle correspond à 80 minutes à 1% d'O₂ suivi de 80 minutes à 18% d'O₂. Les photos sont prises à 40 minutes après chaque changement du taux d'oxygène. Les données représentent le pourcentage moyen de globules rouges déformés ± écart-type. **D)** Impact de paliers de désoxygénation successifs sur la proportion de globules rouges déformés dans le sang de deux souris SAD et une souris WT : 3 heures à 5% d'O₂, puis 3 heures à 3% d'O₂, 3 heures à 1% d'O₂. Les photos ont été prises à 0,5 et à 3 heures après le début à 5% d'O₂, puis après 3 heures à 3% d'O₂ et enfin 2,5 heures à 1% d'O₂. Les données représentent la moyenne ± écart-type.

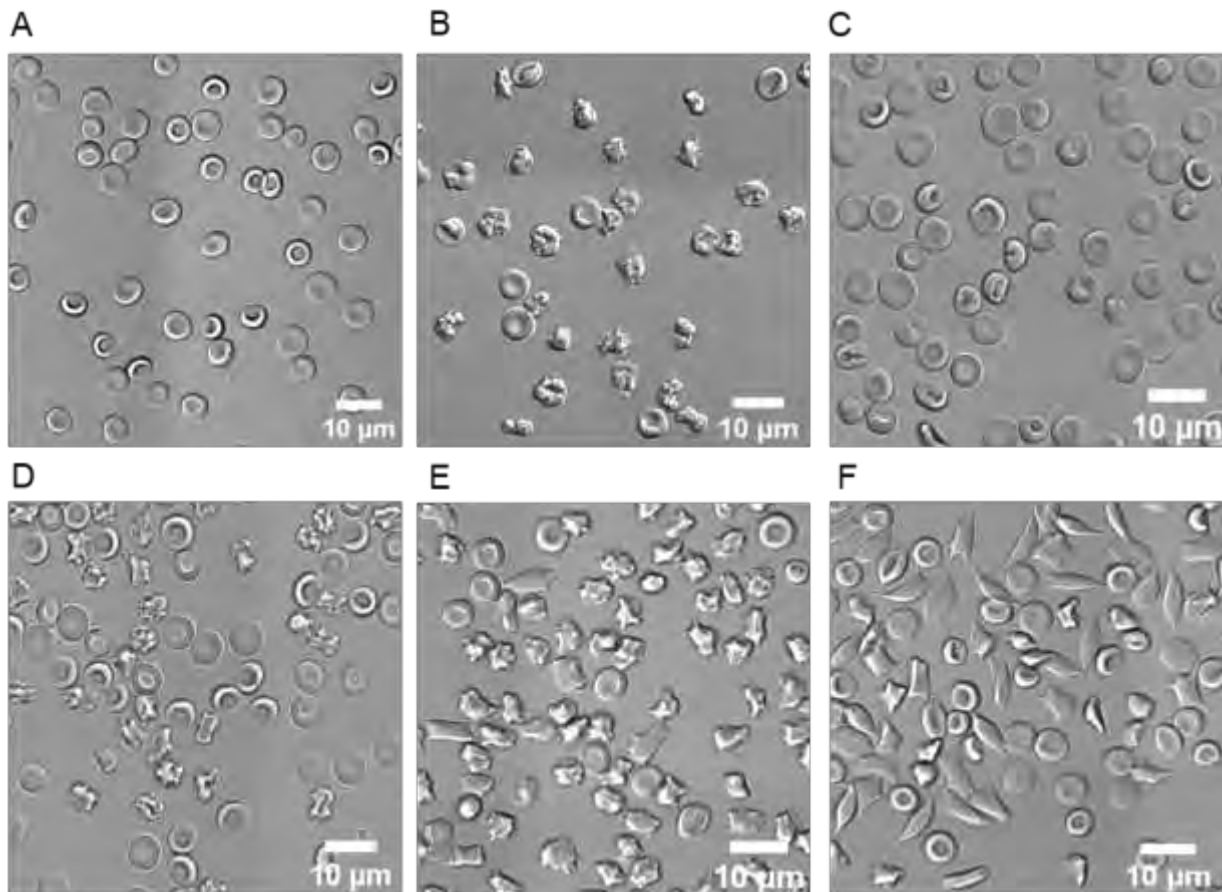


Figure 14. Photos de globules rouges en condition hypoxique.

A) Globules rouges de souris WT après 2 heures à 1% d'O₂ (la même forme biconcave est observée à tous les temps et à toutes les concentrations d'oxygène utilisées dans les expériences). **B)** Globules rouges de souris SAD après 40 minutes à 1% d'O₂. **C)** Globules rouges de souris SAD à 18% d'O₂ depuis 40 minutes après 3 cycles de désoxygénation/réoxygénation (1% / 18% O₂). **D)** Globules rouges de souris SAD après 3 heures à 5% d'O₂. **E)** Globules rouges de souris SAD après 3 heures à 5% d'O₂, puis 3 heures à 3% d'O₂ et enfin 2,5 heures à 1% d'O₂. **F)** Même échantillon que D, en y ajoutant une petite étape de réoxygénation (<10 minutes à 18% d'O₂) suivi de 2,5 heures à 5% d'O₂.

4.2.1. Déformation à 1% d'oxygène

Nous avons montré qu'après 30-45 minutes d'incubation dans une atmosphère à 1% d'oxygène, environ 75-85% des globules rouges de souris SAD sont déformés alors que les globules rouges issus de souris WT sont normaux ; cette proportion de cellules déformées est stable dans le temps (>12 heures) (**Figure 13B**). Dans ces conditions, la forme des globules rouges de souris SAD ont de multiples protrusions caractéristiques des cellules déformées observées chez l'Homme, même si elles n'ont pas la forme typique allongée en faucille (**Figure 14B**). Ces différences dans la forme peuvent être dû à différents paramètres, comme la température, le temps de désoxygénation, le volume corpusculaire moyen, la concentration en hémoglobine, la longueur des fibres d'HbSAD et la configuration du domaine des fibres ⁷⁶. Néanmoins, les changements de forme impliquent forcément la polymérisation des fibres d'HbSAD qui déforment le cytosquelette et la membrane. Pour faciliter notre analyse et nos résultats, n'importe quel globule rouge dont la forme a été modifiée sera considéré comme anormal ⁷⁷.

4.2.2. Cellules déformées permanentes circulantes et cycles de désoxygénation/réoxygénation

La présence de cellules déformées permanentes circulantes, présentes en conditions normoxiques, est caractéristique des patients drépanocytaires, et est corrélée à la sévérité de la maladie. Ces cellules contribuent à la physiopathologie des crises vaso-occlusives. Elles représentent 7 à 38% des globules rouges totaux du patient, ce taux variant selon la méthode de prélèvement et les conditions de stockage ⁷⁸. Aucune cellule déformée permanente n'a été trouvée dans le sang des souris SAD dans des conditions normoxiques, même après 5 cycles de désoxygénation à 1% d'O₂ pendant 80 minutes suivi par 80 minutes à 18% d'O₂ (**Figure 14C**).

La récupération de la forme de disque biconcave survient après le retour en normoxie en 10 minutes, et les cycles de désoxygénation/réoxygénation n'ont aucun impact sur le pourcentage de cellules déformées (**Figure 13C**).

4.2.3. Paliers de désoxygénation

Pour évaluer différemment la déformabilité des globules rouges, nous avons effectué des expériences à différents taux d'oxygène.

À 8% d'O₂ et au-dessus, après une heure, aucune cellule déformée n'est observée. À 7% et 6% d'O₂, seulement quelques cellules ont une forme anormale.

Dans une autre expérience, les globules rouges ont été mis en chambre en hypoxie à 5% d'oxygène, et la quantification des cellules déformées a été effectuée après 0,5 heure et 3 heures à 5% d'oxygène, puis après 3 heures à 3% d'O₂ et enfin après 2,5 heures à 1% d'O₂ (**Figure 13D**) :

- À 5% d'oxygène, nous observons 13% de cellules déformées après 0,5 heure et 48% après 3 heures (**Figure 14D**), montrant que le changement de 21% à 5% d'O₂ pendant 30 minutes n'est pas assez long pour atteindre le maximum de déformation à ce taux d'oxygène. Le temps de latence nécessaire pour la formation de polymères d'HbSAD est inversement proportionnelle à la concentration d'HbSAD désoxygénées (concentration plus faible à 5% qu'à 1%)⁷⁹. Donc, pour atteindre une stabilisation de la proportion de cellules déformées, il faudra plus de temps à des concentrations d'oxygène plus élevé (et donc, dans notre expérience, un temps plus long à 5% qu'à 1% d'O₂).
- Lorsque ces mêmes globules rouges passent ensuite dans un environnement à 3% d'O₂ pendant 3 heures, la proportion de cellules déformées passe à 72%.
- Enfin, après un dernier changement à 1% de concentration d'oxygène dans la chambre pendant 3 heures, on atteint 82% de cellules déformées, ce qui est similaire à ce qui avait été observé lorsque les globules rouges passaient directement de 21% à 1% d'O₂ en 30-45min (**comparaison Figure 13B et Figure 13D**).

4.2.4. Déformation à 3% d'oxygène

Dans une nouvelle expérience, les cellules venant des souris SAD sont observées après 3 heures et après 17 heures à 3% d'O₂. Nous observons que le pourcentage de cellules déformées est stable dans le temps (52% à 3 heures vs 59% à 17 heures). Les cellules sont ensuite mises à 1% d'O₂. En moins d'une heure, on observe 75% de cellules déformées, résultats similaires à ceux avec une désoxygénation directe de 21% à 1% d'O₂.

4.2.5. Déformation en faucille

Alors que les différentes procédures de désoxygénation précédentes (que ce soit directement à 1% d'O₂, par des plateaux de désoxygénation successifs ou après des cycles de désoxygénation/réoxygénation) n'ont pas d'impact sur le taux final de cellules déformées à 1% d'O₂, nous avons remarqué que le choix de la procédure influe sur la forme des globules rouges.

En effet, certains globules rouges provenant de souris SAD ont une forme plus allongée quand ils subissent la procédure des différents plateaux de désoxygénation (**comparaison Figure 14B et Figure 14E**). De façon intéressante, quand ces cellules sont ensuite réoxygénées (à 18% d'O₂) pendant une courte période (entre 5 et 10 minutes), et sont ensuite soumis de nouveau à des concentrations faibles d'oxygène, tous les globules rouges déformés acquièrent une forme typique de faucille, comme retrouvé chez l'Homme (**comparaison Figure 14B et figure 14F**). Etrangement, si la réoxygénation (à 18% d'O₂) dure plus de 10 minutes, ou si les cellules ne sont pas soumises précédemment à la procédure des différents plateaux de désoxygénation, ce phénomène n'apparaît pas et la forme reste la même (avec de multiples protrusions).

Attention, il est important de souligner que cette procédure (visant à ce que les cellules acquièrent une forme de faucille) ne change pas le pourcentage de cellules déformées à chaque niveau d'O₂, mais change uniquement leurs formes.

Aucune cellule déformée permanente n'a été trouvée après que les cellules aient obtenu cette forme de faucille, mais la récupération de leur forme de disque biconcave est légèrement plus longue (environ 30 minutes) que dans les autres conditions.

4.2.6. Conclusion et protocole final

Pour conclure, la déformation des globules rouges se fait progressivement, et le maximum de cellules déformées est différent à chaque palier d'oxygène : la déformation est donc dépendante de chaque cellule, certaines étant plus sensibles que d'autres, ce qui est consistant avec l'existence d'autres paramètres différents pour chaque cellule influant sur la déformation, comme sa concentration corpusculaire en hémoglobine ⁶⁹.

L'ensemble de ces informations indiquent que le maximum de déformation, dans nos conditions et avec nos équipements, peut être atteint en 30-45 minutes avec un passage de 21% à 1% d'oxygène. Tout au long de ces expériences, nous avons observé différentes formes et apparences des globules rouges, selon la procédure de désoxygénation choisie. Ces résultats nous ont permis de définir le protocole final, qui sera utilisé pour l'analyse et la comparaison des globules rouges provenant de souris transplantées avec des CSH transduites par BB305 et celles transplantées avec des CSH transduites par LV β -sh α 2.

Les globules rouges de souris transplantées avec des cellules modifiées par l'un ou l'autre vecteur vont être soumis à une concentration d'oxygène de 5% pendant 3 heures, puis 3% pendant 3 heures et enfin 1% pendant 2 heures. Une courte étape de réoxygénation sera faite à 18% pendant 7 minutes, avant de les incuber toute la nuit à 1% d'oxygène. Des photos seront prises après 1,5 et 3 heures à 5% d'O₂, 1,5 et 3 heures à 3% d'O₂, 2 heures à 1% d'O₂ et le matin du jour suivant (approximativement 14 heures à 1% d'O₂ après l'étape de réoxygénation) (**Figure 15**).

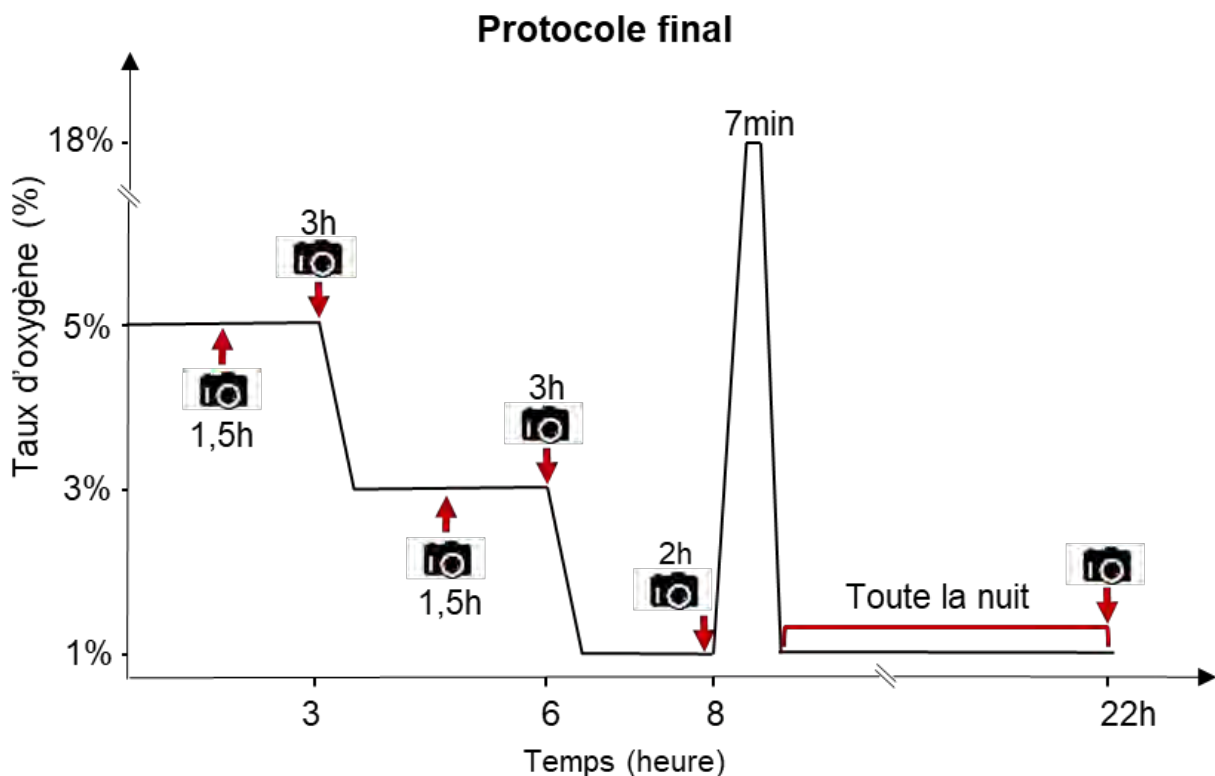


Figure 15. Schéma récapitulatif du protocole final choisi pour l'analyse de déformation future chez les souris transplantées.

4.3. Evaluation de LV β -sha2 *in-vivo*

4.3.1. Analyse de la transduction des CSH

Dans le but d'évaluer l'influence d'un shARN dirigé contre l' α 2-globine dans les CSH des souris SAD, les cellules Lin^{-low} provenant de sept souris SAD sont prélevées. Le pourcentage de cellules Lin^{-low} obtenu est d'environ 50%. Les cellules sont ensuite cultivées dans du milieu StemSpan, et transduites avec les LVV BB305 ou LV β -sha2 (respectivement le vecteur parent de référence et le nouveau vecteur) à 2 différentes MOI : une MOI de 1 et une MOI de 3. Les cellules sont ensuite transplantées dans six à sept souris receveuses irradiées (souris CD45.1), pour chaque condition. En tant que contrôle dans cette expérience, deux souris sont transplantées avec des cellules non-transduites (NT) (**Figure 16**).

Une petite proportion des cellules transduites sontensemencée dans du milieu semi-solide à base de méthylcellulose, en trois répliques techniques, pour quantifier le taux de transduction des cellules transplantées. Le VCN dans les cellules progénitrices, quantifié par qPCR, est de 0,4 à 1,0, et est corrélé avec la MOI utilisée (**Figure 17A**).

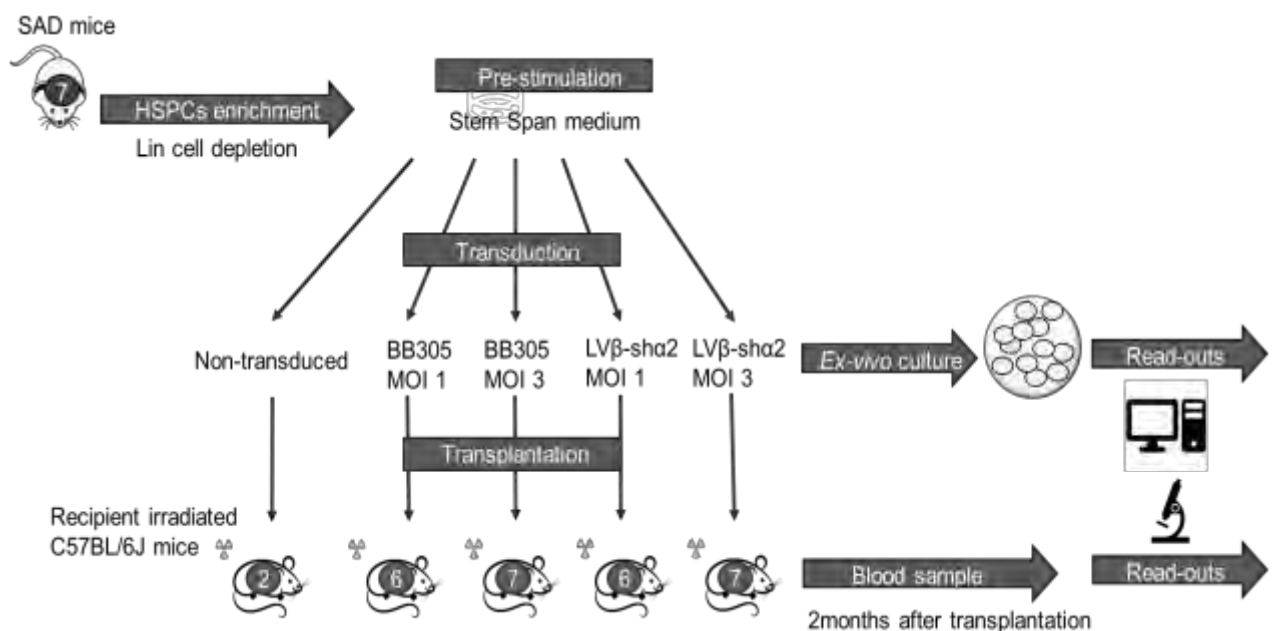


Figure 16. Protocole expérimental des expériences de transplantations de CSH transduites.

Les nombres dans les cercles représentent le nombre de souris incluses dans chaque groupe.

4.3.2. Analyse de la NFS

Les NFS (leucocytes, globules rouges, hémoglobine, hématocrite, plaquette) sont similaires entre les souris des 4 groupes de transplantation (BB305 MOI 1 et 3, LV β -sh α 2 MOI 1 et 3), et il n'y a pas de différence significative avec les 2 souris du groupe contrôle recevant les cellules NT (**Table 2**). Cela nous permet d'exclure le risque infectieux qui aurait pu induire un biais dans notre analyse.

En comparaison, dans la littérature, mon équipe avait démontré une légère diminution du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite dans les souris SAD en comparaison avec les souris WT ⁵². L'équipe de Frank Constantini a observé une légère diminution du volume globulaire moyen et une augmentation du CCMH chez les souris SAD dues à de la déshydratation cellulaire ⁷⁰. Ces résultats ne se retrouvent pas dans notre analyse de nos souris SAD.

Paramètres (Unité)	NT (n=2)	BB305 / MOI 1 (n=5)	BB305 / MOI 3 (n=6)	LV β -sh α 2 / MOI 1 (n=4)	LV β -sh α 2 / MOI 3 (n=7)
Leucocytes ($\times 10^3$ cellules/ μ L)	8,3 \pm 0,1	8,0 \pm 2,3	6,8 \pm 1,0	7,2 \pm 1,0	6,8 \pm 1,7
Lymphocytes ($\times 10^3$ cellules/ μ L)	5,6 \pm 0,0	5,3 \pm 1,5	4,4 \pm 0,8	5,0 \pm 0,8	4,5 \pm 1,1
Lymphocytes (%)	67,6 \pm 0,1	67,0 \pm 1,3	65,8 \pm 3,3	69,9 \pm 5,3	68,3 \pm 4,9
Monocytes ($\times 10^3$ cellules/ μ L)	0,6 \pm 0,0	0,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2	0,4 \pm 0,1
Monocytes (%)	7,7 \pm 0,3	7,7 \pm 0,4	7,4 \pm 0,5	7,0 \pm 1,2	7,3 \pm 1,0
Granulocytes ($\times 10^3$ cellules/ μ L)	2,1 \pm 0,1	2,1 \pm 0,7	1,9 \pm 0,3	1,8 \pm 0,4	1,8 \pm 0,6
Granulocytes (%)	24,6 \pm 0,4	25,3 \pm 1,7	26,8 \pm 3,3	23,1 \pm 4,2	24,4 \pm 4,2
Eosinophiles (%)	0,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,5	0,6 \pm 0,3	1,1 \pm 0,6	0,8 \pm 0,2
Globules rouges ($\times 10^6$ cells/ μ L)	10,5 \pm 0,1	11,1 \pm 0,8	10,2 \pm 0,8	12,1 \pm 1,5	10,1 \pm 0,6
Hémoglobine (g/dL)	16,0 \pm 0,2	16,4 \pm 1,0	15,2 \pm 0,9	18,0 \pm 2,5	15,0 \pm 0,9
Hématocrite (%)	46,8 \pm 0,1	49,1 \pm 4,8	45,5 \pm 4,5	53,6 \pm 6,3	44,3 \pm 3,2
Volume globulaire moyen (μ m ³)	44,5 \pm 0,7	44,3 \pm 1,3	44,7 \pm 1,5	44,0 \pm 0,8	43,9 \pm 1,1
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (pg)	15,3 \pm 0,4	14,8 \pm 0,2	15,1 \pm 0,3	14,8 \pm 0,6	14,9 \pm 0,5
Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (g/dL)	34,5 \pm 0,5	33,5 \pm 1,3	33,7 \pm 1,6	33,5 \pm 0,9	33,8 \pm 1,1
Indice de distribution des globules rouges (%)	15,4 \pm 0,3	15,8 \pm 0,6	15,6 \pm 0,5	15,4 \pm 0,2	16,3 \pm 0,9
Plaquettes ($\times 10^3$ cells/ μ L)	5,6 \pm 0,1	6,0 \pm 0,5	5,8 \pm 0,4	6,1 \pm 0,4	5,9 \pm 0,3
Volume plaquettaire moyen (μ m ³)	519,0 \pm 72,1	458,5 \pm 89,0	447,2 \pm 149,8	500,8 \pm 58,4	585,0 \pm 118,2

Tableau 2. NFS.

Analyse effectuée sur 7 μ L de sang frais pour chaque souris. Les données montrent la moyenne \pm l'écart-type pour chaque groupe.

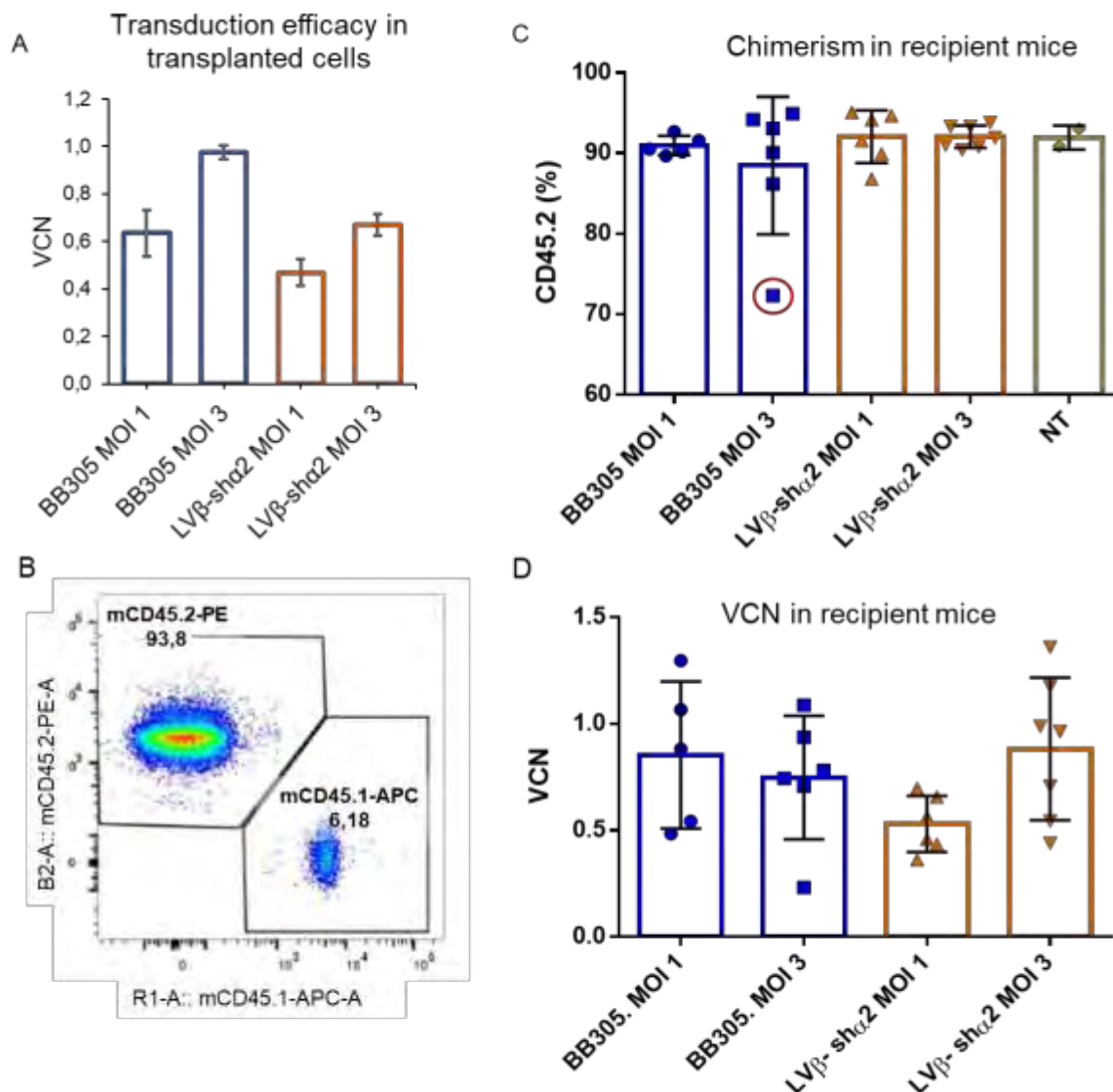


Figure 17. Transplantation de cellules transduites provenant de souris SAD dans des souris syngéniques C57BL/6J CD45.1.

A) VCN dans les CSH transduites à une MOI de 1 et de 3 avec BB305 et LVβ-shα2, et transplantées aux souris. Les données représentent la moyenne ± l'écart type de trois répliques techniques. **B)** Exemple de détection des cellules CD45.1 et CD45.2 par cytométrie en utilisant le logiciel FlowJo. **C)** Chimérisme des souris receveuses 2 mois après transplantation. Le pourcentage des cellules CD45.2 dans le sang des souris receveuses CD45.1. Les données représentent la moyenne ± l'écart type pour chaque groupe. **D)** VCN dans le sang périphérique des souris receveuses 2 mois après la transplantation, pour chaque groupe. Les données représentent la moyenne ± l'écart type pour chaque groupe.

4.3.3. Analyse de la prise de greffe

Le sang des souris receveuses est collecté et analysé deux mois après la transplantation. Le chimérisme est analysé par cytométrie (**Figure 17B**) pour vérifier la reconstitution hématopoïétique chez les souris irradiées receveuses. La proportion de cellules du donneur CD45.2 est de 90% à 93% dans toutes les souris syngéniques saines receveuses transplantées (pour rappel, ces dernières sont avec l'allèle CD45.1. Seulement une souris a un chimérisme faible de 72% (**Figure 17C**).

4.3.4. Analyse du VCN

Le VCN moyen est quantifié dans le VCN des leucocytes (les globules rouges étant énucléés) par qPCR pour chaque souris transplantée. Il est hétérogène entre les souris dans chaque groupe, et s'étend de 0,23 à 1,36 copies par cellule (**Figure 17D**). La moyenne du VCN est plus importante dans les souris transplantées avec LV β -sh α 2 à une MOI de 3 que dans les souris transplantées avec les cellules modifiées LV β -sh α 2 à une MOI de 1 (0.88 ± 0.33 Vs. 0.53 ± 0.13 ; $p = 0.03$). Il n'y a pas de différence significative observée entre les souris transplantées avec les cellules modifiées BB305 (0.85 ± 0.34 at MOI 1 Vs. 0.75 ± 0.29 at MOI 3 ; $p = 0.59$). Ces résultats permettent donc la comparaison des différents groupes pour les analyses ci-après.

4.3.5. Analyse des ARNm humain

Pour évaluer l'impact du shARN ciblant l' α 2-globine humaine au niveau moléculaire, les expressions des ARNm humains de l' α -globine et de la β -globine sont évalués par RT-qPCR à partir des ARNm collectés du sang des souris transplantées.

Il est important de souligner que les sondes et amorces sont spécifiques de l'ADNc humain, et qu'il n'y a pas/peu de cross-réactivité avec les ADNc murins des souris C57BL/6J (**Figure 18A et 18B**). La sonde et les amorces de la β -globine humaine permettent la détection des ADNc de la β^{SAD} -globine et de la β^{AT87Q} -globine thérapeutique. Le ratio des ARNm α -globine/ β -globine pour chaque souris receveuse est calculé grâce à la méthode des ΔCT entre le signal obtenu pour l' α -globine et la β -globine, normalisé avec la valeur obtenue dans les échantillons provenant des souris contrôles (souris receveuses transplantées avec des cellules NT). Un graphe est tracé en mettant les ratios des ARNm α -globine/ β -globine en fonction du VCN mesuré dans les leucocytes pour chaque souris correspondante (**Figure 18C**). Des courbes de régression linéaires exponentielles montrent que les ratios des ARNm α -globine/ β -globine sont inversement proportionnelles au VCN, ce qui était attendu grâce à l'expression du gène de la β^{AT87Q} -globine thérapeutique.

Les résultats montrent que les ratios des ARNm α -globine/ β -globine diminuent de façon plus importante dans les cellules modifiées avec LV β -sh α 2 en comparaison avec les cellules modifiées avec BB305, à VCN équivalent.

Quand les cellules sont transduites avec une copie de vecteur par cellule, **la diminution du ratio des ARNm α -globine/ β -globine est 1,7 fois plus importante en utilisant LV β -sh α 2 qu'en utilisant BB305 (Figure 18C).**

Nous avons montré pour la première fois dans une procédure *in-vivo* que l'utilisation d'une séquence codant pour un shARN ciblant l' α 2-globine humaine présente dans LV β -sh α 2 diminue le ratio des ARNm α -globine/ β -globine, en comparaison à l'utilisation seule de la β^{AT87Q} -globine thérapeutique dans BB305. Ces résultats démontrent l'efficacité *in-vivo*, à une échelle moléculaire, de ce nouveau vecteur thérapeutique pour moduler les expressions des ARNm d' α -globine et de β -globine, et appuient les résultats obtenus précédemment *in-vitro* dans les cellules de patients β -thalassémiques ⁶⁴.

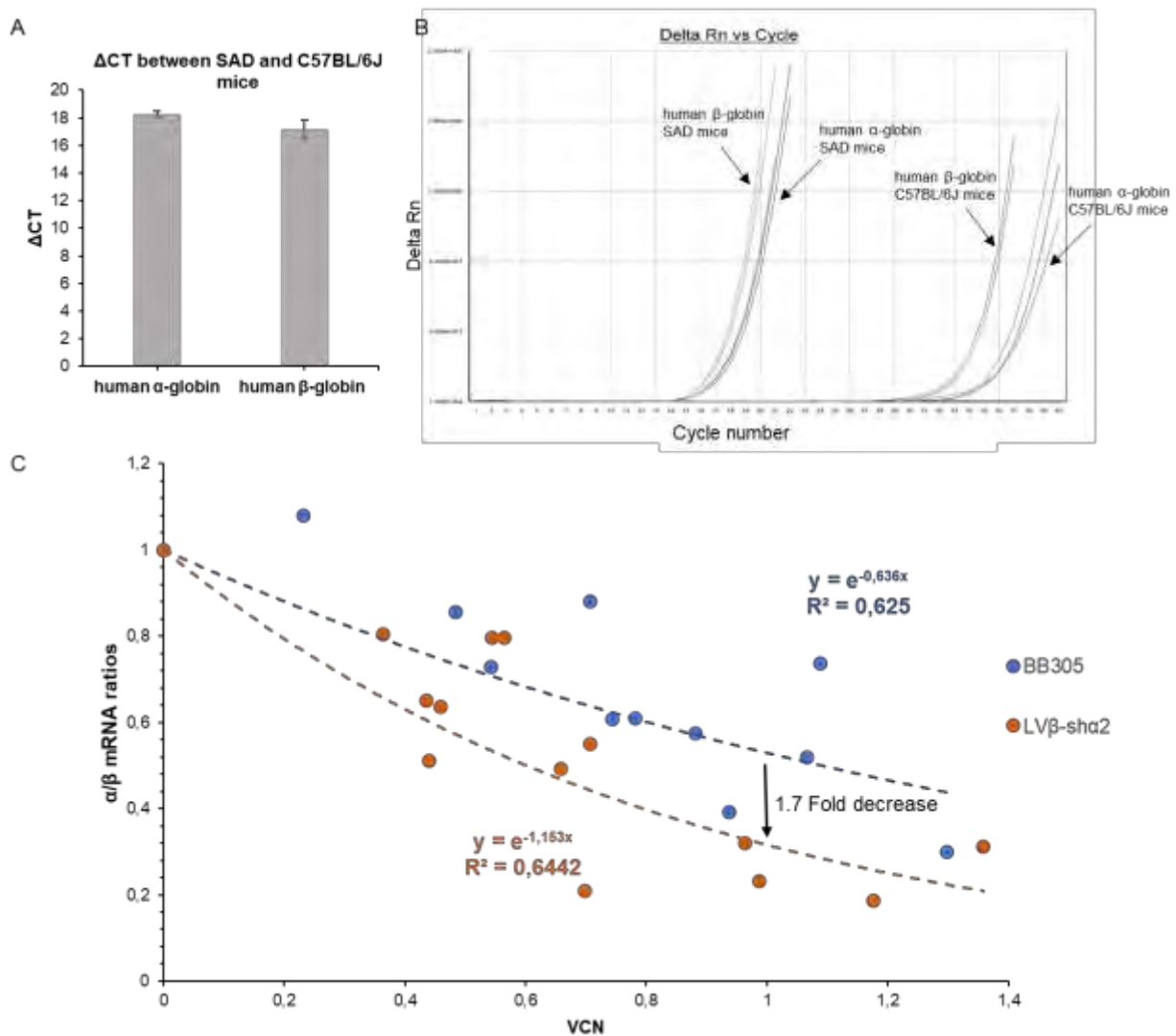


Figure 18. Analyse des ARNm humains dans les souris transplantées.

A) Δ CT entre les ARNm humains et murins après RT-qPCR sur les ADNc provenant de souris SAD et C57BL/6J, en utilisant les sondes et amorces pour l' α -globine et la β -globine humaine. Les données représentent la moyenne \pm écart-type de trois mesures indépendantes. **B)** Courbe d'amplification des ADNc provenant de souris SAD et C57BL/6J en utilisant les sondes et amorces pour amplifier les gènes de l' α -globine et de la β -globine humaine. **C)** Ratio des ARNm α -globine/ β -globine, normalisé avec la valeur moyenne provenant des souris receveuses de cellules NT (contrôle), en fonction du VCN. Les courbes de régression linéaire exponentielle (en pointillé) sont tracées pour chaque groupe.

4.3.6. Expression relative des chaînes de globines

Au niveau protéique, nous avons voulu étudier l'impact du shARN contre l' α 2-globine humaine par chromatographie en phase inverse (RP-HPLC pour *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic method*) sur des échantillons de sang venant de souris transplantées. La RP-HPLC permet de distinguer les différents monomères de globines humaines et murines, incluant les chaînes de globines d'intérêt : la β^{SAD} -globine endogène mutée responsable de la maladie chez la souris, l' α 2-globine endogène humaine, et β^{AT87Q} -globine thérapeutique exprimée grâce aux vecteurs. À cause de problèmes techniques, cette expérience n'a pu aboutir durant mon temps passé au laboratoire mais sera réalisée par la suite.

4.3.7. Déformation des globules rouges

La déformation des globules rouges est analysée et quantifiée par imagerie sur cellules vivantes en utilisant le protocole mis au point précédemment (cf **Figure 15**).

L'analyse se fait sur les échantillons de sang de chaque souris : entre 400 et 1300 cellules (selon la densité cellulaire sur les photos prises) sont comptés manuellement à chaque temps, dans deux à quatre champs différents. Pour rappel, les différents temps d'analyse sont : après 1,5 et 3 heures à 5% d'O₂, puis 1,5 et 3 heures à 3% d'O₂ et 2 heures à 1% d'O₂.

Pour chacun des temps d'analyse, le pourcentage de cellules déformées est corrélé au VCN de la souris correspondante. Une ligne de régression linéaire exponentielle est tracée pour chaque groupe, avec comme ordonnée à l'origine la moyenne des valeurs obtenues avec les souris contrôle (receveuses de cellules NT, donc 0 copie de vecteur par cellule).

Comme attendu, la proportion de cellules déformées **dans les souris WT contrôles recevant des cellules NT de souris SAD** est légèrement plus basse que la valeur obtenue dans les souris SAD directement : cela est dû au chimérisme qui n'atteint pas 100% mais environ 90% dans les souris receveuses. Dans le groupe contrôle, après 3 heures à 5% d'O₂, 37% de cellules déformées sont observées (contre 48% dans les souris SAD). Après 3 heures à 3% d'O₂, 61% des cellules sont déformées (contre 72% dans les souris SAD) et enfin, après 2 heures à 1% d'O₂, il y en a 69% (contre 82% dans les souris SAD) (**Figure 19A,B,C,D,E**). Après l'étape de

réoxygénation et la nuit à 1% d'O₂, et les cellules montrent une forme allongée typique (**comparaison Figure 20A et Figure 20B**), avec un pourcentage de cellules déformées équivalent à celui observé après 2 heures à 1% d'O₂ (données non montrées).

Lorsqu'on regarde **les résultats pour les souris recevant des cellules modifiées par BB305 ou LVβ-shα2**, la proportion de globules rouges déformés diminue à mesure que le VCN augmente, pour les 2 LVV utilisés. Cette diminution est dû à l'expression de la β^{AT87Q}-globine thérapeutique (**comparaison Figure 20B et Figure 20C**). Toutefois, nous n'observons pas de différence significative dans les proportions de globules rouges déformées pour les cellules qui sont modifiées par LVβ-shα2 par rapport à celles modifiées par BB305 à ce temps d'analyse (2 mois post-transplantation) (**Figure 19A,B,C,D,E**).

Nous pouvons donc conclure que le nouveau vecteur **LVβ-shα2 a une efficacité équivalente dans la prévention de la déformation des globules rouges dans le modèle de souris drépanocytaire SAD par rapport au vecteur de référence BB305** utilisé actuellement dans des études cliniques : tous deux améliorent le phénotype des globules rouges drépanocytaire, en prévenant la polymérisation de l'HbSAD dans des conditions hypoxiques.

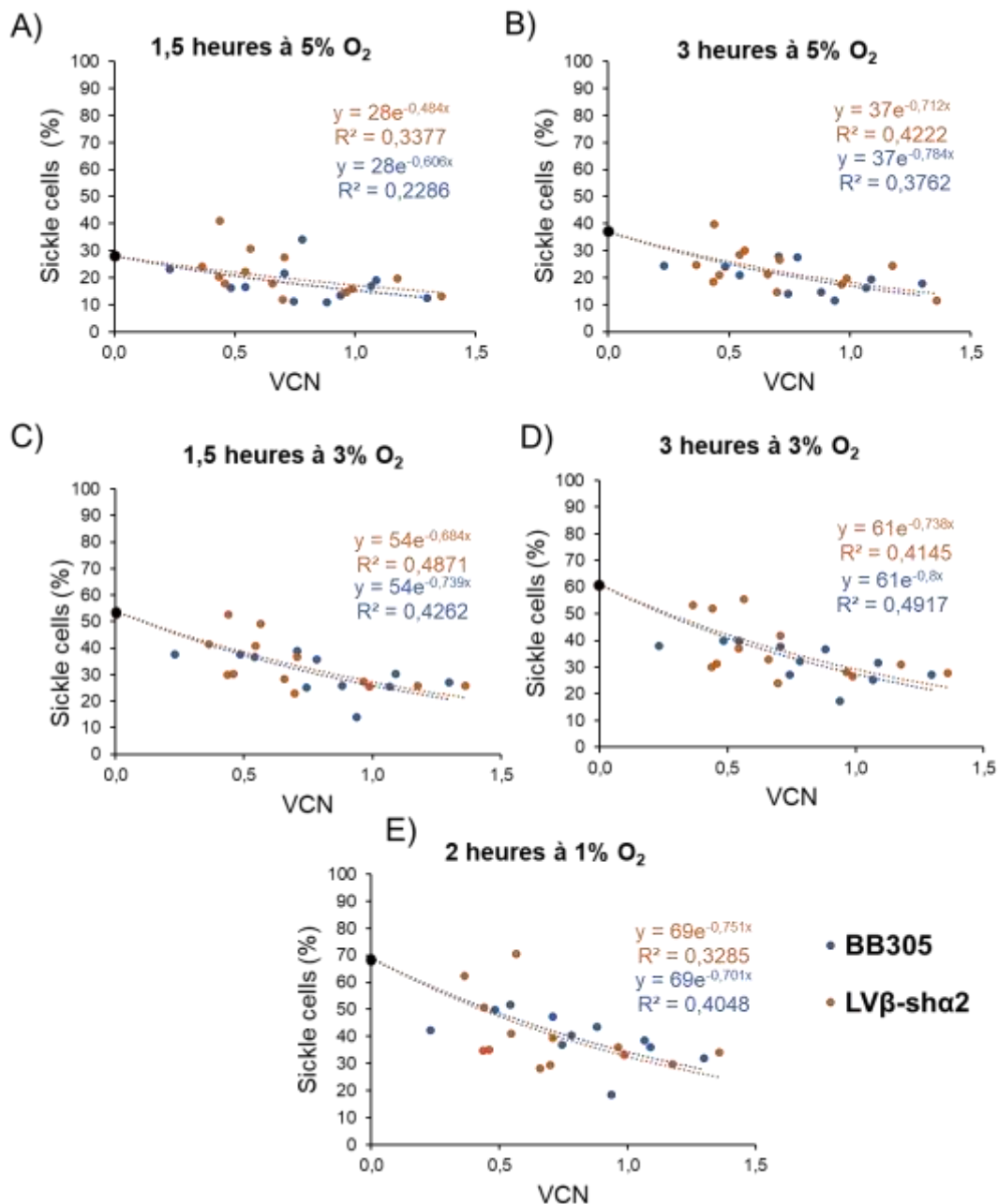


Figure 19. Pourcentage de globules rouges déformés chez les souris transplantées selon le groupe BB305 ou LVβ-sha₂ en fonction du VCN 2 mois post-transplantation.

Les globules rouges déformés sont nommés « Sickie cells » sur les différents graphes.

La proportion de cellules déformées est déterminée après **A)** 1,5 heure à 5% d'O₂ **B)** 3 heures à 5% d'O₂ **C)** 1,5 heure à 3% d'O₂ **D)** 3 heures à 3% d'O₂ et **E)** 2 heures à 1% d'O₂. La courbe orange et la courbe bleu sont les courbes de régression linéaire exponentielle dans les groupes des souris receveuses de cellules LVβ-sha₂ et BB305, respectivement. Le point d'intersection (point noir) est défini par la moyenne des souris recevant les cellules NT (contrôle). Pour chaque point, le pourcentage de cellules déformées correspond à la moyenne de plusieurs comptages : pour C) et E) approximativement 500cellules sur deux champs ; pour D) F) et G) approximativement 1000 cellules sur quatre champs.

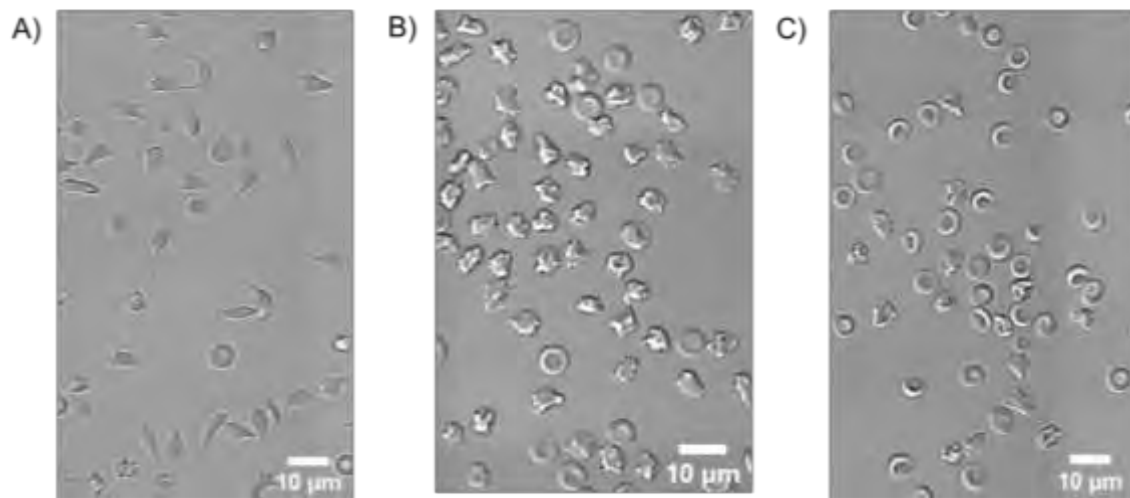


Figure 20. Photo de globules rouges des souris transplantées avec les cellules transduites au microscope confocal.

Photos des globules rouges provenant de **A)** une souris transplantée avec des cellules NT (souris contrôle), après le protocole complet (incluant l'étape de réoxygénation/désoxygénation) **B)** une souris transplantée avec des cellules NT (contrôle) après le protocole incomplet (à la fin du palier à 1% d'O₂, le premier jour, sans l'étape de réoxygénation/désoxygénation) **C)** une souris recevant des cellules transduites avec LVβ-shα2 ayant un VCN de 1,36 après le même protocole que B).

5. DISCUSSION

5.1. Conclusions des résultats du projet

Dans ce projet, nous rapportons la première étude *in-vivo* d'un nouveau vecteur thérapeutique, appelé LV β -sh α 2, dans le cadre de la thérapie génique de la drépanocytose. Ce nouveau vecteur a pour but d'améliorer la balance bénéfique/risque en comparaison avec le vecteur actuel de référence, BB305, qui permet l'expression chez le patient d'une β^{AT87Q} -globine thérapeutique ayant des propriétés anti-polymérisation de l'HbS. Alors que BB305 a démontré une efficacité thérapeutique chez les patients drépanocytaires^{56,57}, l'utilisation de VCN élevé dans le cadre de la thérapie génique augmente le risque de mutagénèse insertionnelle et donc le risque de développement de cancers hématologiques et d'effets indésirables graves⁵⁸.

Basé sur des évidences cliniques obtenues chez des patients drépanocytaires ayant aussi une α -thalassémie^{65,66}, et basé sur les propriétés d'affinité des chaînes d' α -globines pour celles de β -globine⁶⁹, LV β -sh α 2 est le candidat parfait pour améliorer cette balance bénéfique/risque grâce à l'expression de la β^{AT87Q} -globine thérapeutique, et de la réduction en même temps la synthèse des chaînes d' α 2-globine grâce au shRNA ajouté dans le vecteur.

L'efficacité de BB305 et LV β -sh α 2 a été évalué dans le modèle de souris SAD, un modèle transgénique de drépanocytose, exprimant le gène de la β^{S} -globine modifiée (β^{SAD}) et également le gène de l' α 2-globine humaine, nécessaire à l'évaluation de l'efficacité de ce nouveau vecteur. Nous avons transduit des CSH provenant des souris SAD avec les vecteurs BB305 et LV β -sh α 2 (avec des VCN équivalents). Les différentes transplantations ont été réalisées avec succès, avec un chimérisme donneur/receveur élevé, similaire et reproductible. Deux mois après la transplantation, LV β -sh α 2 permet une diminution des ratios des ARNm de l' α -globine/ β -globine 1,7fois plus importante par rapport à l'utilisation de BB305. Il a été démontré que l'expression des chaînes de β^{AT87Q} -globine thérapeutique étant équivalente entre LV β -sh α 2 et BB305 à VCN équivalent⁶⁴. Nous pouvons donc conclure que **nos résultats ont montré une diminution des ARNm de l' α -globine 1,7 fois plus importante en utilisant le nouveau vecteur LV β -sh α 2 en comparaison avec le vecteur de référence BB305 *in-vivo*.**

Ces résultats, qui montrent l'efficacité pour la première fois du nouveau vecteur dans la réduction du ratio des ARNm α -globine/ β -globine *in-vivo*, sont cohérents avec ceux obtenus *in-vitro* chez des patients β -thalassémiques⁶⁴. **Ce projet soutient également l'utilisation de ce nouveau vecteur chez les patients β -thalassémiques sévères β^0/β^0 , pour qui l'utilisation de BB305 n'est pas suffisant pour atteindre une indépendance transfusionnelle⁵⁴.**

À l'échelle phénotypique, **LV β -sha2 a montré une efficacité équivalente à BB305 dans la prévention de la déformation des globules rouges dans ce modèle de souris drépanocytaires.** Malheureusement, nous n'avons pas observé d'amélioration phénotypique dans ce modèle murin de drépanocytose avec l'utilisation de notre nouveau LVV à ce temps d'analyse.

5.2. Hypothèses pour expliquer l'absence d'amélioration phénotypique malgré l'effet moléculaire

De nos jours, il est bien établi dans la communauté scientifique et médicale que la réduction de l'expression du gène de l' α -globine chez les patients drépanocytaires a un effet positif et bénéfique. Des évidences cliniques ont montré qu'une diminution des niveaux d' α -globine, chez les patients drépanocytaires ayant également une α -thalassémie, réduit la sévérité des complications de la drépanocytose, tels que le risque d'AVC, les vasculopathies pulmonaires, et les ulcères au niveau des jambes. La CCMH y joue un rôle important, en entraînant une réduction de la probabilité de formation du tétramère d'HbS et donc une diminution de la déformation des globules rouges^{65,66}.

De plus, selon les règles des interactions électrostatiques en fonction des affinités entre les chaînes d' α -globine et de β -globine, l'hémoglobine HbA^{T87Q} ($\alpha_2\beta^{AT87Q}_2$) devrait se former préférentiellement, au détriment de l'hémoglobine HbS ($\alpha_2\beta^{S_2}$). En effet, dans des conditions où le nombre de chaînes d' α -globine est limité, on s'attend à ce que la différence d'affinité des différentes chaînes de β -globines pour l' α -globine soit un paramètre déterminant, et permette l'augmentation de l'HbA^{T87Q} et la diminution de l'HbS.

Pour toutes ces raisons, nous espérons voir une différence dans la capacité de l'hémoglobine à polymériser et des cellules à se déformer, avec l'utilisation du nouveau vecteur thérapeutique LV β -sh α 2.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'absence d'amélioration phénotypique dans la prévention de la déformation des globules rouges, malgré une amélioration à l'échelle moléculaire des ratios des ARNm α -globine/ β -globine.

5.2.1. Hypothèse 1 : Conditions d'expérimentation

Nous n'étions pas dans les conditions optimales durant nos expérimentations pour reproduire l'environnement retrouvé chez l'Homme, dans lequel une diminution des chaînes d' α -globine est connue pour être bénéfique chez les patients drépanocytaires.

Nous avons essayé de couvrir le plus de conditions possibles en termes de niveau d'oxygène et de temps passé en hypoxie. Notre système ne permet pas de descendre en dessous de 1% d'oxygène. Nous ne savons donc pas si les 80/90% de cellules déformées que nous observons dans nos souris SAD représentent toutes les cellules capables de déformées, ou s'il y a une réserve de cellules moins sensibles à l'oxygène que notre système et notre protocole ne nous permettent pas de faire déformer. Néanmoins, si des cellules requièrent des niveaux plus bas d'oxygène pour se déformer, cela signifie que ces cellules sont les moins sensibles à la polymérisation en condition hypoxique, et donc les moins malades. Il est alors évident que ces cellules seront guéries si elles sont modifiées par BB305. Par conséquent, elles ne seront pas soignées davantage en utilisant LV β -sh α 2.

De plus, sachant que *in-vivo* le taux d'oxygène chute à 3% environ, descendre en dessous de 1% d'oxygène dans notre système *in-vitro* n'aurait pas été transposable à ce qui est retrouvé chez l'Homme physiologiquement.

Donc, même si notre protocole ne nous permet pas d'être dans des conditions sévères d'hypoxie, nous pensons que le résultat aurait été le même : cette hypothèse est la moins probable pour expliquer notre absence d'amélioration phénotypique.

5.2.2. Hypothèse 2 : Analyse trop précoce

Une autre hypothèse est l'analyse trop précoce des rats post-transplantation. Un des facteurs limitant étant ma date de fin de projet, l'analyse à 2 mois post-transplantation était nécessaire pour me permettre d'obtenir et d'analyser des résultats.

La prise de greffe, analysé grâce au chimérisme de l'allèle CD45.1 et CD45.2, était d'environ 90 à 93% chez nos souris transplantées. Cette valeur peut augmenter à des niveaux beaucoup plus élevés avec le temps, et sera évaluée par mon laboratoire après mon départ ⁵².

De plus, l'érythropoïèse est un processus long : *in-vitro*, la formation de globules rouges à partir de CSH durent environ 21 jours dans des conditions optimales ^{80,81}.

Enfin, des études précliniques similaires, analysant des vecteurs LVVs dans le modèle SAD, ont été réalisées au moins trois mois post-transplantations ⁵². La reconstitution hématopoïétique n'était peut-être pas suffisamment avancée pour observer une différence dans l'analyse de nos 2 LVV.

5.2.3. Hypothèse 3 : Modèle inadapté

Le modèle murin SAD n'est sûrement pas adapté pour évaluer le potentiel thérapeutique de LV β -sh α 2 en comparaison à BB305.

Dans ce modèle transgénique de souris, seulement 19% de l'hémoglobine est capable de polymérisation (l'Hb SAD formée par le tétramère $\alpha^h_2\beta^{SAD}_2$), ce qui explique le peu de symptôme de la maladie observée dans ce modèle. Cette concentration d'Hb capable de polymérisation est faible, et doit être l'élément limitant nous empêchant de voir une différence dans nos vecteurs. Dans chaque cellule recevant une seule copie du vecteur parent BB305, la quantité de globine β^{AT87Q} produite doit être suffisante pour diluer l'Hb SAD jusqu'au seuil empêchant la déformation en condition hypoxique. Ajouter un shARN contre l' α 2-globine ne changerait donc rien à la capacité d'une cellule de se déformer.

Cette hypothèse est la plus probable. Mathématiquement, faisons ensemble un calcul rapide chez nos cellules à 5% d'oxygène, concentration à partir de laquelle les cellules commencent à se déformer chez nos souris contrôle recevant des cellules

malades NT. Cette concentration est également celle à laquelle les cellules capables de déformation sont le plus sensibles à la baisse d'oxygène, car nous n'avons pas/très peu de déformation à 6% d'O₂, mais pourtant nous avons 38% de déformation à 5% d'O₂. C'est donc naturellement à cette concentration que LVβ-shα2 pourrait apporter la meilleure correction phénotypique en comparaison avec le vecteur BB305. Chez les souris recevant les cellules transduites, lorsque nous avons un VCN moyen de 1, nous avons au mieux 67% des cellules qui sont transduites (selon la loi mathématique de Poisson). Donc, si nous ramenons cela chez les 38% des cellules sensibles à la baisse d'oxygène à 5% d'O₂, 25% au mieux sont transduites et 13% ne le sont pas. En sachant cela, si nous émettons l'hypothèse que toutes les cellules transduites sont corrigées, nous devrions observer ≥13% de cellules déformées restantes. C'est approximativement ce que nous observons dans le sang des animaux traités par les cellules transduites par BB305. Il n'est donc pas possible d'observer une amélioration avec LVβ-shα2 si toutes les cellules potentiellement curables sont déjà guéries avec l'utilisation de BB305.

6. PERSPECTIVES

Des expérimentations dans d'autres modèles de drépanocytose plus proches de l'Homme, avec des taux d'HbS plus élevés, sont donc nécessaires pour conclure au potentiel thérapeutique et à l'amélioration de la balance bénéfice/risque de LV β -sh α 2 par rapport à BB305 pour la thérapie génique de la drépanocytose.

6.1. Transduction et différenciation de CSH de patients drépanocytaires *in-vitro*

Une des alternatives serait la transduction de CSH CD34+ de patients drépanocytaires par les deux LVV (LV β -sh α 2 et BB305) et leurs différenciations *in-vitro* en globules rouges matures. Ce protocole a été développé par l'équipe de Naoya Uchida ⁸² sur des CSH provenant de patient drépanocytaire, qui ont été transduites avec un LVV permettant l'expression de la β^{AT87Q} -globine thérapeutique. Il a été montré que ce protocole permet une différenciation érythroïde suffisante et la production d'Hb dans les globules rouges différenciés (production à la fois d'HbS et d'HbA^{T87Q} thérapeutique). L'analyse du phénotype de ces cellules érythroïdes différenciées transduites par LV β -sh α 2 ou BB305 en condition hypoxique serait pertinente et permettrait de montrer une amélioration avec l'utilisation de notre vecteur thérapeutique LV β -sh α 2.

6.2. Utilisation de lignée érythroïde *in-vitro*

Une autre approche serait d'utiliser une lignée cellulaire érythroïde humaine immortalisée ayant la mutation homozygote de la drépanocytose induite par CRISPR-Cas9 : la lignée sHUDEP-2. Cette lignée a été développée par l'équipe de Naoya Uchida ⁷⁷, et permet l'expression uniquement d'HbS (sans expression d'HbA). Initialement, la lignée cellulaire érythroïde humaine immortalisée (HUDEP-2) utilisée a été développée par Kurita et al. ⁸³, et permet une différenciation complète des cellules érythroïdes avec la génération finale de cellules énuclées. Grâce à la mutation de la drépanocytose dans les cellules sHUDEP-2, approximativement 45% des cellules se déforment à 5% d'O₂ avec leur protocole et leur matériel. La transduction de ces cellules avec un vecteur lentiviral exprimant la β^{AT87Q} -globine thérapeutique permet

une réduction de la proportion de cellules déformées ⁷⁷. Cette lignée cellulaire serait un bon modèle pour évaluer notre vecteur candidat dans la thérapie génique de la drépanocytose.

6.3. Transplantation de CSH de patients drépanocytaires dans un modèle murin humanisé

Une dernière option alternative serait la transplantation de CSH modifiées provenant de patients drépanocytaires dans un modèle murin humanisé. Jusqu'à peu, aucun modèle de souris ne permettait une érythropoïèse humaine complète, et la production finale de globules rouges humain dans le sang périphérique de souris transplantées. En mars 2021, l'équipe de Richard Flavell a développé un modèle de souris immunodéficientes avec une humanisation du foie et de certaines cytokines. Après greffe de CSH provenant de patients drépanocytaires, des globules rouges matures et persistants sont détectés dans la circulation sanguine. Des changements physiopathologiques liés à l'installation de la drépanocytose sont observés : la présence de globules rouges déformés dans les petits vaisseaux induisant par exemple des congestions dans le rein, des occlusions vasculaires, une augmentation des macrophages alvéolaires dans les poumons, une augmentation des progéniteurs érythroïdes dans la rate ⁸⁴.

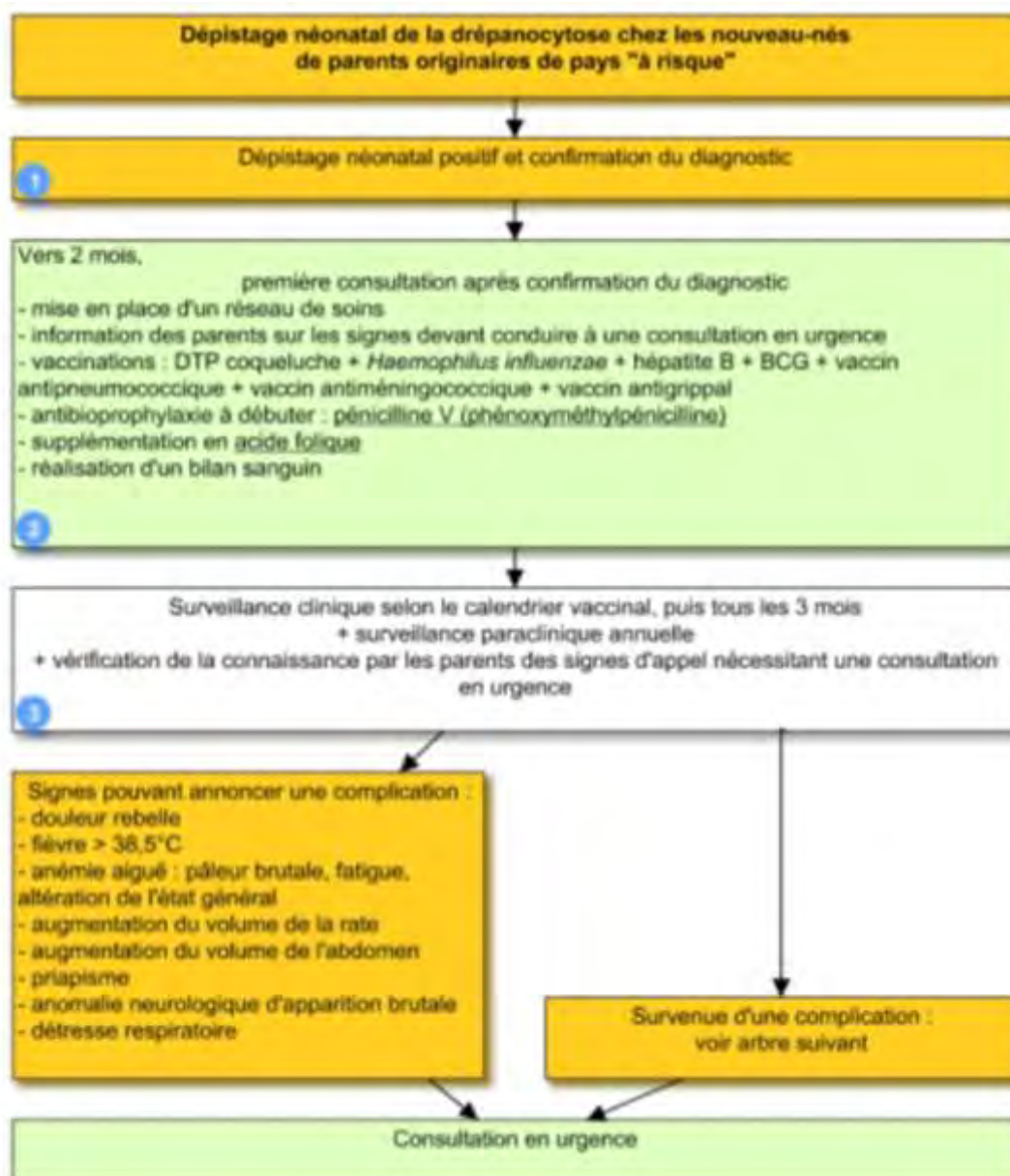
Ce modèle *in-vivo* a un très fort potentiel pour l'étude des maladies hématologiques comme la drépanocytose, et dans notre cas, nous permettrait l'étude phénotypique de globules rouges humains matures génétiquement modifiées.

Néanmoins, la présence de globules rouges murins résiduels peut rendre l'interprétation des résultats difficiles. À l'heure actuelle, il est difficile de les identifier et/ou de les enlever, ce qui rendrait compliqué le comptage des globules rouges déformés, et pourrait biaiser l'étude du nouveau vecteur.

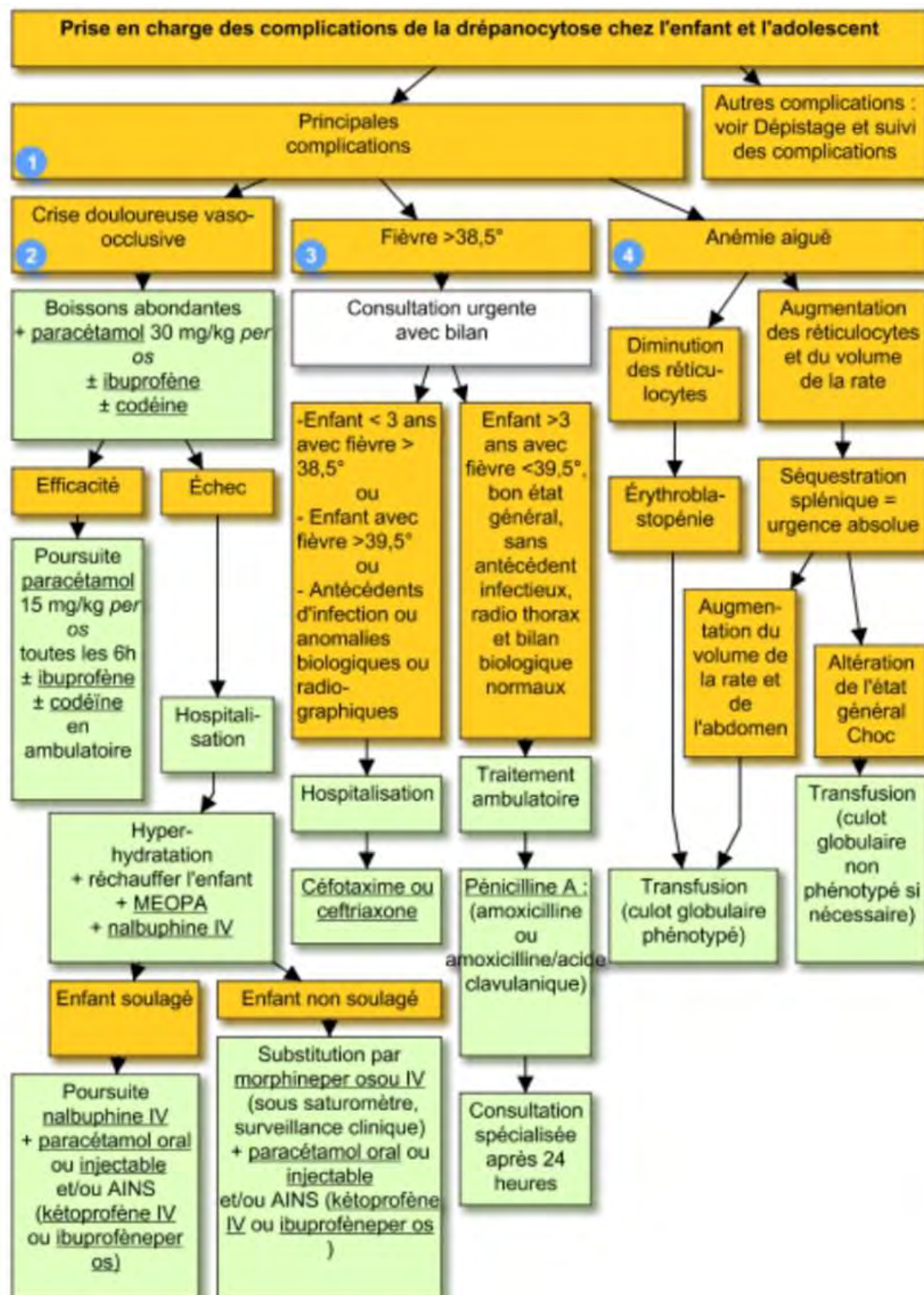
Ce sujet est continué par mon équipe depuis mon départ. En prenant les résultats obtenus à l'échelle moléculaire ainsi que la littérature scientifique chez les patients drépanocytaires et α -thalassémiques, cela justifie complètement de continuer à persévérer dans cette voie.

ANNEXES

Annexe 1. Protocole de dépistage néonatal de la drépanocytose chez les enfants à risque (VIDAL Recos, 2022).



Annexe 2. Prise en charge des complications de la drépanocytose chez l'enfant et l'adolescent (VIDAL Recos, 2022).



BIBLIOGRAPHIE

1. D'Alessandro, A., Dzieciatkowska, M., Nemkov, T. & Hansen, K. C. Red blood cell proteomics update: is there more to discover? *Blood Transfusion* (2017) doi:10.2450/2017.0293-16.
2. Dzierzak, E. & Philipsen, S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**, a011601–a011601 (2013).
3. Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C. & Sankaran, V. G. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br J Haematol* **173**, 206–218 (2016).
4. Yamamoto, R. *et al.* Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells. *Cell* **154**, 1112–1126 (2013).
5. Psaila, B. & Mead, A. J. Single-cell approaches reveal novel cellular pathways for megakaryocyte and erythroid differentiation. *Blood* **133**, 1427–1435 (2019).
6. Ahmed, M. H., Ghatge, M. S. & Safo, M. K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. in *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* (eds. Hoeger, U. & Harris, J. R.) vol. 94 345–382 (Springer International Publishing, 2020).
7. Sankaran, V. G. & Orkin, S. H. The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**, a011643–a011643 (2013).
8. Manning, L. R. *et al.* Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. *Protein Sci* **16**, 1641–1658 (2007).
9. Hua-bing, Z., De-Pei, L. & Chih-Chuan, L. The Control of Expression of the α -Globin Gene Cluster. *Int J Hematol* **76**, 420–426 (2002).
10. Palstra, R., de Laat, W. & Grosveld, F. Chapter 4 β -Globin Regulation and Long-Range Interactions. in *Advances in Genetics* vol. 61 107–142 (Elsevier, 2008).
11. Weatherall, D. The inherited disorders of haemoglobin: an increasingly neglected global health burden. *Indian J Med Res* **134**, 493–497 (2011).

12. Taylor, S. M., Cerami, C. & Fairhurst, R. M. Hemoglobinopathies: Slicing the Gordian Knot of Plasmodium falciparum Malaria Pathogenesis. *PLoS Pathog* **9**, e1003327 (2013).
13. Cao, H. & Vickers, M. A. Oxidative stress, malaria, sickle cell disease, and innate immunity. *Trends in Immunology* **42**, 849–851 (2021).
14. Piel, F. B. *et al.* Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *The Lancet Global Health* **2**, e80–e89 (2014).
15. Leleu, H. *et al.* Epidemiology and disease burden of sickle cell disease in France: A descriptive study based on a French nationwide claim database. *PLoS ONE* **16**, e0253986 (2021).
16. Stuart, M. J. & Nagel, R. L. Sickle-cell disease. *The Lancet* **364**, 1343–1360 (2004).
17. Bunn, H. F. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* **337**, 762–769 (1997).
18. Chirico, E. N. & Pialoux, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life* **64**, 72–80 (2012).
19. Galactéros, F. Numéro thématique. La drépanocytose en France : des données épidémiologiques pour améliorer la prise en charge. *BEH* 311–330 (2012).
20. Haute Autorité de Santé. Syndrome drépanocytaires majeurs de l'enfant et de l'adolescent. *Guide ALD n°10* (2010).
21. Haute Autorité de Santé. Prise en charge de la drépanocytose chez l'enfant et l'adolescent. *Recommandations pour la pratique clinique* (2005).
22. Cokic, V. P. *et al.* Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide–dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J. Clin. Invest.* **111**, 231–239 (2003).
23. Lebensburger, J. D., Pestina, T. I., Ware, R. E., Boyd, K. L. & Persons, D. A. Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model. *Haematologica* **95**, 1599–1603 (2010).
24. Bookchin, R. M. & Nagel, R. L. Interactions between human hemoglobins: sickling and related phenomena. *Semin Hematol* **11**, 577–595 (1974).

25. Bridges, K. R. *et al.* A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. *Blood* **88**, 4701–4710 (1996).
26. Nevitt, S. J., Jones, A. P. & Howard, J. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2017) doi:10.1002/14651858.CD002202.pub2.
27. Niihara, Y. *et al.* L-Glutamine therapy reduces endothelial adhesion of sickle red blood cells to human umbilical vein endothelial cells. *BMC Hematol* **5**, 4 (2005).
28. Kanter, J. *et al.* American Society of Hematology 2021 guidelines for sickle cell disease: stem cell transplantation. *Blood Advances* **5**, 3668–3689 (2021).
29. Arnold, S. D., Bhatia, M., Horan, J. & Krishnamurti, L. Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease - current practice and new approaches. *Br J Haematol* **174**, 515–525 (2016).
30. Gluckman, E. *et al.* Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **129**, 1548–1556 (2017).
31. Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L. & Gao, G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Sig Transduct Target Ther* **6**, 53 (2021).
32. Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 11288–11294 (1996).
33. Wu, X. Transcription Start Regions in the Human Genome Are Favored Targets for MLV Integration. *Science* **300**, 1749–1751 (2003).
34. Cavazzana, M., Six, E., Lagresle-Peyrou, C., André-Schmutz, I. & Hacein-Bey-Abina, S. Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency: Where Do We Stand? *Human Gene Therapy* **27**, 108–116 (2016).
35. Howe, S. J. *et al.* Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J. Clin. Invest.* **118**, 3143–3150 (2008).
36. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* **118**, 3132–3142 (2008).

37. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* LMO2 -Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415–419 (2003).
38. Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* **467**, 318–322 (2010).
39. Sii-Felice, K. *et al.* Innovative Therapies for Hemoglobin Disorders. *BioDrugs* **34**, 625–647 (2020).
40. Nagel, R. L. *et al.* Structural bases of the inhibitory effects of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 670–672 (1979).
41. Frangoul, H. *et al.* CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med* **384**, 252–260 (2021).
42. Wu, Y. *et al.* Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med* **25**, 776–783 (2019).
43. Canver, M. C. *et al.* BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature* **527**, 192–197 (2015).
44. Liu, P. *et al.* Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol* **4**, 525–532 (2003).
45. Yu, Y. *et al.* Bcl11a is essential for lymphoid development and negatively regulates p53. *Journal of Experimental Medicine* **209**, 2467–2483 (2012).
46. Brendel, C. *et al.* Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype. *Journal of Clinical Investigation* **126**, 3868–3878 (2016).
47. Rodgers, K. & McVey, M. Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks: ERROR-PRONE REPAIR OF DNA DSBs. *J. Cell. Physiol.* **231**, 15–24 (2016).
48. Levasseur, D. N. *et al.* A recombinant human hemoglobin with anti-sickling properties greater than fetal hemoglobin. *J Biol Chem* **279**, 27518–27524 (2004).
49. Esrick, E. B. *et al.* Flipping the Switch: Initial Results of Genetic Targeting of the Fetal to Adult Globin Switch in Sickle Cell Patients. *Blood* **132**, 1023–1023 (2018).

50. Negre, O. *et al.* Preclinical Evaluation of Efficacy and Safety of an Improved Lentiviral Vector for the Treatment of β -Thalassemia and Sickle Cell Disease. *CGT* **15**, 64–81 (2014).
51. Ronen, K. *et al.* Distribution of Lentiviral Vector Integration Sites in Mice Following Therapeutic Gene Transfer to Treat β -thalassemia. *Molecular Therapy* **19**, 1273–1286 (2011).
52. Pawliuk, R. Correction of Sickle Cell Disease in Transgenic Mouse Models by Gene Therapy. *Science* **294**, 2368–2371 (2001).
53. Locatelli, F. *et al.* Betibeglogene Autotemcel Gene Therapy for Non- β^0/β^0 Genotype β -Thalassemia. *N Engl J Med* **386**, 415–427 (2022).
54. Thompson, A. A. *et al.* Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *N Engl J Med* **378**, 1479–1493 (2018).
55. Magrin, E. *et al.* Long-term outcomes of lentiviral gene therapy for the β -hemoglobinopathies: the HGB-205 trial. *Nat Med* **28**, 81–88 (2022).
56. Ribeil, J.-A. *et al.* Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* **376**, 848–855 (2017).
57. Bonner, M. *et al.* The Relationships between Target Gene Transduction, Engraftment of HSCs and RBC Physiology in Sickle Cell Disease Gene Therapy. *Blood* **134**, 206–206 (2019).
58. Moiani, A. *et al.* Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts. *J. Clin. Invest.* **122**, 1653–1666 (2012).
59. Hsieh, M. M. *et al.* Myelodysplastic syndrome unrelated to lentiviral vector in a patient treated with gene therapy for sickle cell disease. *Blood Advances* **4**, 2058–2063 (2020).
60. McNerney, M. E., Godley, L. A. & Le Beau, M. M. Therapy-related myeloid neoplasms: when genetics and environment collide. *Nat Rev Cancer* **17**, 513–527 (2017).
61. BlueBirdBio. Press release: bluebird bio Provides Updated Findings from Reported Case of Acute Myeloid Leukemia (AML) in LentiGlobin for Sickle Cell Disease (SCD) Gene Therapy Program. (2021).

62. Cavazzana, M., Bushman, F. D., Miccio, A., André-Schmutz, I. & Six, E. Gene therapy targeting haematopoietic stem cells for inherited diseases: progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 447–462 (2019).
63. Bhukhai, K. *et al.* Ex Vivo Selection of Transduced Hematopoietic Stem Cells for Gene Therapy of β -Hemoglobinopathies. *Molecular Therapy* **26**, 480–495 (2018).
64. Nualkaew, T. *et al.* Coordinated β -globin expression and $\alpha 2$ -globin reduction in a multiplex lentiviral gene therapy vector for β -thalassemia. *Molecular Therapy* S1525001621002513 (2021) doi:10.1016/j.ymthe.2021.04.037.
65. Rumaney, M. B. *et al.* The Co-Inheritance of Alpha-Thalassemia and Sickle Cell Anemia Is Associated with Better Hematological Indices and Lower Consultations Rate in Cameroonian Patients and Could Improve Their Survival. *PLoS ONE* **9**, e100516 (2014).
66. Santos, B. *et al.* Co-Inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell disease in a cohort of Angolan pediatric patients. *Mol Biol Rep* **47**, 5397–5402 (2020).
67. Gupta, A. K. *et al.* Effects of alpha-thalassemia and sickle polymerization tendency on the urine-concentrating defect of individuals with sickle cell trait. *J. Clin. Invest.* **88**, 1963–1968 (1991).
68. Steinberg, M. H. & Embury, S. H. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood* **68**, 985–990 (1986).
69. Bunn, H. F. Subunit assembly of hemoglobin: an important determinant of hematologic phenotype. *Blood* **69**, 1–6 (1987).
70. Trudel, M. *et al.* Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: hemoglobin SAD. *EMBO J* **10**, 3157–3165 (1991).
71. Monplaisir, N. *et al.* Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 9363–9367 (1986).
72. Uriarte, A., Perez Atencio, R. & Colombo, B. Haemoglobin D Punjab in a Cuban Family and its Interaction with Haemoglobin S. *Acta Haematol* **50**, 315–320 (1973).

73. Sii-Felice, K. *et al.* Enhanced Transduction of *Macaca fascicularis* Hematopoietic Cells with Chimeric Lentiviral Vectors. *Human Gene Therapy* **30**, 1306–1323 (2019).
74. Peacock, A. J. ABC of oxygen: Oxygen at high altitude. *BMJ* **317**, 1063–1066 (1998).
75. Ward, J. P. T. Oxygen sensors in context. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1777**, 1–14 (2008).
76. Lu, L. *et al.* Quantitative prediction of erythrocyte sickling for the development of advanced sickle cell therapies. *Sci. Adv.* **5**, eaax3905 (2019).
77. Demirci, S. *et al.* β T87Q-Globin Gene Therapy Reduces Sickle Hemoglobin Production, Allowing for Ex Vivo Anti-sickling Activity in Human Erythroid Cells. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **17**, 912–921 (2020).
78. Asakura, T., Hirota, T., Nelson, A. T., Reilly, M. P. & Ohene-Frempong, K. Percentage of Reversibly and Irreversibly Sickled Cells Are Altered by the Method of Blood Drawing and Storage Conditions. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **22**, 297–306 (1996).
79. Ferrone, F. A., Hofrichter, J. & Eaton, W. A. Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. *Journal of Molecular Biology* **183**, 591–610 (1985).
80. Giarratana, M.-C. *et al.* Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature Biotechnology* **23**, 69–74 (2005).
81. Miharada, K., Hiroyama, T., Sudo, K., Nagasawa, T. & Nakamura, Y. Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol* **24**, 1255–1256 (2006).
82. Uchida, N. *et al.* Serum-free Erythroid Differentiation for Efficient Genetic Modification and High-Level Adult Hemoglobin Production. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **9**, 247–256 (2018).
83. Kurita, R. *et al.* Establishment of Immortalized Human Erythroid Progenitor Cell Lines Able to Produce Enucleated Red Blood Cells. *PLoS ONE* **8**, e59890 (2013).
84. Song, Y. *et al.* Combined liver–cytokine humanization comes to the rescue of circulating human red blood cells. *Science* **371**, 1019–1025 (2021).

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

SUMMARY in English

Sickle cell disease (SCD) affects millions of persons worldwide and is the most prevalent inherited disorder in France. It is characterized by a single mutation of adenine to thymine in the β -globin gene, leading to the formation of an abnormal β -globin, called β^S . The resulting hemoglobin (HbS) polymerizes at low pressure of oxygen and deforms the shape of red blood cells into sickle cells, leading to the clinical manifestation of the disease such as hemolytic anemia and vaso-occlusive events. Many patients are chronically transfused, and the only curative treatment to date is allogenic hematopoietic stem cells transplantation. Gene therapy by the use of lentiviral vector is a promising strategy to cure SCD patients, through the addition of therapeutic gene into the patients' cells. A clinical trial using a lentiviral vector expressing the anti-sickling β -globin variant β^{AT87Q} (BB305) demonstrated great therapeutic efficiency, by diluting the abnormal β^S -globin chain and inhibiting HbS polymerization at elevated vector copy number. One challenge in lentiviral gene therapy is to maintain therapeutic efficacy at low vector copy numbers to avoid insertional mutagenesis and the risk of cancer development. Decreasing α -globin chain could achieve this challenge in SCD. Indeed, clinical evidences have shown that a decrease of α -globin via the co-inheritance of α -thalassaemia decreases the severity of SCD phenotype, by a reduced mean corpuscular hemoglobin concentration, reduced HbS polymerization and thus reduced hemolysis. Furthermore, in the setting of gene therapy and expression of transgenic β^{AT87Q} , thanks to the relative affinities of the α -globin chains, the limited α -globin chains may preferentially associate with the therapeutic β^{AT87Q} -globin chain rather than with β^S -globin chain. In this project, we developed *in-vivo* experiments to determine the efficiency of a new therapeutic lentiviral vector, LV β -sh α 2. This vector allows the expression of a shRNA against α 2-globin, in addition to the therapeutic β^{AT87Q} -globin. The SAD mouse model, expressing the human α 2-globin and β^S -globin chains, and showing sickle cells at low oxygen pressure, is an interesting model to study the expression of the human sickle genes and to look at the effect of a decreased human α -globin gene expression on HbS polymerization. After transplantation of transduced cells in this mouse model, we showed that LV β -sh α 2 decreased the α/β human globin mRNA ratio by 1.7 fold compared to BB305. Phenotypically, however, we did not observe a decrease in the percentage of sickle cells when red blood cells were put in hypoxic conditions. These results are encouraging, but further experiments in a more severe model of SCD are needed to validate the therapeutic value of this new lentiviral vector.

KEY-WORDS : **Gene therapy ; Lentiviral vector ; *In-vitro* study ;
Sickle Cell Disease ; Hematopoietic Stem Cells**

RESUME en Français

La drépanocytose est caractérisée par la présence d'une β -globine anormale déformant les globules rouges. Lors d'essais cliniques de thérapie génique, un vecteur lentiviral BB305 exprimant la β^{AT87Q} -globine thérapeutique empêche ce phénomène, mais la nécessité d'utiliser un grand nombre d'insertion du vecteur par cellule remet en cause la sécurité du patient. Plusieurs observations suggèrent de diminuer les chaînes d' α -globine pour améliorer la balance bénéfique/risque. Dans ce projet, nous avons réalisé des expériences *in-vivo* pour déterminer l'efficacité d'un nouveau vecteur thérapeutique, LV β -sh α 2, permettant l'expression d'un shARN contre l' α 2-globine et de la β^{AT87Q} -globine. En comparaison avec BB305, nous avons montré une réduction de l'ARNm de l' α -globine 1,7 fois plus importante avec LV β -sh α 2, et une efficacité similaire dans la prévention de la déformation des globules rouges. Ces résultats sont très encourageants et prometteurs pour le futur de la thérapie génique.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : Thérapie génique ; Vecteur lentiviral ; Drépanocytose ;
 Cellules souches hématopoïétiques ; Etude *In-vivo*

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Equipe Cellules Souches et Applications Thérapeutiques
Laboratoire des Thérapies Innovantes
Centre de Recherche en Immunologie des Infections Virales, Maladies Auto-Immunes,
Hématologique et Bactériennes
UMR 1184 - CEA Paris Saclay - Fontenay aux Roses – France

Co-directrices de thèse :

Dr. Karine SII-FELICE et Dr. Isabelle LAJOIE-MAZENC