

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE: 2018

N°: 255

**UM171 EST UNE MOLECULE CAPABLE D'AUGMENTER
LE TRANSFERT DE GENE A L'INTERIEUR DES
CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES HUMAINES**

MEMOIRE

POUR OBTENIR LE MASTER D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE

PRÉSENTÉ ET SOUTENU

Le 19/11/ 2018

Par

Dr Mor NGOM

Ancien interne des hôpitaux

Né le 02 Janvier 1981 à Wakhaldiam (SENEGAL)

MEMBRES DU JURY

PRESIDENT :	M.	Niama	DIOP SALL	Professeur
MEMBRES :	M.	Saliou	DIOP	Professeur
	Mme	Awa Oumar	TOURE FALL	Professeur
	M.	Papa Madièye	GUEYE	Professeur
DIRECTEUR DE MEMOIRE :	M.	Saliou	DIOP	Professeur

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

DECANAT & DIRECTION

DOYEN

M. AMADOU DIOUF

PREMIER ASSESSEUR

M. ABDOULAYE SAMB

DEUXIEME ASSESSEUR

M. MALICK FAYE

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

M. EL HADJ BOUBACAR BALL

DAKAR, LE 13.11.2018

*Par la grace d'Allah, le Tout Puissant, le
Miséricordieux, l'Omniprésent*

*Au nom du Prophète Mouhamad
(PQS)*

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

DEDICACES

A feu mon père

Pour votre soutien et votre sacrifice pour ma réussite et surtout pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez donné. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir toujours cru en moi, en mes capacités, d'avoir pris ma défense chaque jour, chaque fois et devant qui que ce soit. Une chose est sûre sans vous je ne serais pas là, sans vous je ne ferais pas ça... Que le bon Dieu vous accorde une place de choix au paradis. Le chemin de la réussite est dur et ensemé d'embûches mais heureusement vous étiez là pour calmer nos ardeurs et apaiser nos souffrances.

A Ma mère

Grâce à toi j'ai surmonté tellement d'obstacles, j'ai pu relever tant de défis, rien qu'en pensant à vous. En ce jour solennel je vous dédie ce travail, je vous souhaite une longue vie d'or.

A Mes frères et sœurs mère

A mes frères et sœurs, sans votre soutien, sans vos conseils je ne serais pas là. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur. Vous avez toujours été présents. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours. Je vous dédie ce travail avec toute ma reconnaissance. Aux plus petits, je ne doute pas de votre bravoure, soyez persévérants et que Dieu vous accorde une longue vie et une réussite éternelle.

A mon cœur

Que ferais-je sans toi? Que serais-je sans toi? Une confiance absolue, un respect authentique, un soutien sans faille, une compréhension quotidienne un amour sincère, voilà certains de vos sentiments en vers moi. Et bien j'ai encore réalisé un de tes rêves, ce travail est pour toi rien que pour toi. IL n'y a pas de mots qui pourraient exprimer ma gratitude

mon respect et mon amour pour toi. Que Dieu nous permette de réaliser encore et encore beaucoup de rêves ensemble. Sachez une chose, je vous ai cité en dernier mais vous étiez en premier et en permanence dans mon esprit, longue vie à toi.

A mes enfants

Mouhamed Rassoul et Papa Arona Ngom vous êtes ma force. Que Dieu vous accorde une longue vie pleine de santé et de succès.

A tous mes Professeurs et formateurs

Vous tous qui m'avez transmis un savoir à toutes les étapes de mon cursus scolaire, je vous rends hommage !

Au Professeur Philippe LEBOULCH

Monsieur le Professeur Philippe LEBOULCH, mon directeur de thèse PHD mais bien plus que ça à mes yeux. Je vous remercie pour de nombreuses raisons. Merci de m'avoir accueilli à bras ouvert et de m'avoir accompagné tout au long de ma carrière. Merci de m'avoir permis de mener à bien mes projets professionnels en facilitant mon cursus et surtout votre écoute. Malgré votre charge de travail, j'ai toujours trouvé auprès de vous une oreille attentive et des conseils précieux qui m'ont aidé à surmonter des moments difficiles, pour cela merci de tout cœur et recevez, sincèrement, toute mon admiration. Votre disponibilité et votre accessibilité m'ont marqué, je n'ai pas souvent eu l'occasion de vous voir mais vous avez été présent tout au long de mon parcours. Pour cet accompagnement, pour vos remarques judicieuses, et votre gentillesse, merci, c'est un réel plaisir de partager avec vous sur ces quelques années de travail.

Au Professeur Richard Keith HUMPHRIES

Monsieur le Professeur Richard Keith HUMPHRIES, je vous remercie très sincèrement pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, Terry Fox Laboratory. Je vous remercie pour vos conseils précieux et vos suggestions sur mes travaux de recherche. J'ai particulièrement apprécié votre enthousiasme dans nos projets de recherche et vos encouragements lors de nos participations aux congrès et rencontres scientifiques.

Au Professeur James Baron LOK

Mes remerciements vont également à l'endroit du Professeur James Baron LOK DE l'Université de Pennsylvanie (U Penn) pour sa grande disponibilité, pour m'avoir enseigné son savoir et son savoir-faire. Il a été d'une aide indispensable et a toujours été là pour me donner un coup de main. Ce fut très agréable de travailler avec lui. Merci beaucoup pour tes remarques très pertinentes sur mes résultats et mon projet en général.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail.

A tous les laboratoires qui m'ont accueilli tout au long de ma formation (Du Chef de service aux agents de surfaces).

- ❖ Au laboratoire de biologie médicale de l'hôpital d'enfants Albert Royer*
- ❖ Au laboratoire de Biologie Médicale de l'hôpital Aristide le Dantec*
- ❖ Au laboratoire de Bactério-virologie de l'hôpital Aristide le Dantec*
- ❖ Au laboratoire de biologie médicale du Centre National de Transfusion Sanguine*
- ❖ Au laboratoire de biologie médicale de l'Hôpital Principal de Dakar*
- ❖ Au laboratoire de thérapie génique hématopoïétique du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) de Fontenay-Aux-Roses(France)*

- ❖ *Au laboratoire de pathobiologie de l'université de Pennsylvanie (Philadelphie, USA).*
- ❖ *Au laboratoire de thérapie génique hématopoïétique de l'université de Harvard (Saint Mary's Hospital, Boston, USA).*
- ❖ *Au laboratoire des cellules souches hématopoïétiques du Centre de Recherche sur le Cancer de la Colombie Britannique (Vancouver, BC, Canada)*

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des pères, des mères, des frères, des sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

*Je tiens aussi à adresser mes plus vifs remerciements à l'ensemble du personnel **du Centre National de Transfusion Sanguine**, ma maison d'accueil. Je vous porte dans mon cœur à jamais.*

A NOS MAITRES ET JUGES

*A notre Maître, et Président de jury,
Monsieur Le Professeur Niama Diop SALL*

Nous n'avons jamais eu le privilège de travailler avec vous mais de loin nous avons pu apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

*A notre Maître et Juge,
Monsieur le Professeur Papa Madieye GUEYE*

Nous n'avons pas eu la chance de bénéficier de votre enseignement au sein de cette Faculté mais à travers nos jeunes condisciples nous avons pu admirer vos qualités pédagogiques. Qu'il nous soit permis de vous remercier et de vous témoigner notre profonde reconnaissance. Nous sommes heureux de vous avoir comme membre du jury et vous remercions pour votre disponibilité.

*A notre Maître et juge,
Madame le Professeur Awa Oumar Touré Fall*

Vous nous avez guidés à chaque étape de notre formation. Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Nous avons toujours admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques de même que votre rigueur dans le travail. A cela s'ajoute vos qualités humaines qui nous inspire un profond respect et font de vous un professeur exemplaire et digne d'admiration.

En témoignage de notre reconnaissance infinie, veuillez recevoir très chère maître l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

*A notre maître et directeur de mémoire,
Monsieur le Professeur Saliou Diop*

Je remercie tout particulièrement le Professeur Saliou Diop pour sa contribution immense à ma carrière ; vous avez guidé mes premiers pas dans la belle spécialité qu'est l'hématologie. Vous m'avez donné la passion et l'amour de cette discipline. Je vous remercie pour votre patience, votre grande disponibilité, votre bienveillance, votre gentillesse. Je vous remercie pour m'avoir fait partager votre savoir et votre expérience. Vous m'avez appris presque tout ce que je sais dans ce domaine. Je suis reconnaissant envers vous pour votre soutien à toute épreuve et la formation d'exception dont j'ai pu profiter. Ce fut un véritable plaisir de travailler ensemble et d'échanger autour de thèmes passionnant de recherche. Un grand merci également pour ton accompagnement pour la préparation de ce mémoire.

« Par délibération, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propre à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation ».

LISTE DES ABREVIATIONS

6HB	: Six-helix bundle
AAV	: Adeno-associated virus
ADA	: Adénosine désaminase
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
ALD	: Adrénoleucodystrophie
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ARNt	: ARN de transfert
BHK	: Baby hamster kidney
BIV	: Bovine immunodeficiency virus
BLAM	: beta-lactamase
BPF	: Bonnes pratiques de fabrication
CA	: Capside
CBD	: Cell Binding Domain
CCR	: CC-chemokine receptor
CGD	: Chronic granulomatous disease
CMV	: Cytomégalovirus
CPI	: Complexe de pré-intégration
cPPT	: central polypurine tract
CS	: Connecting segment
CSH	: Cellules souches hématopoïétiques
CSM	: Cellules souches mésenchymateuses
CTE	: constitutive transport element
CXCR	: CXC-chemokine receptor

DBS	: Double Strand Break (cassure double brin)
DICS	: Déficit immunitaire combiné sévère
DiO	: 3,3-dioctadecyloxacarbocyanine
EF-C	: Enhancing factor C
EIAV	: Equine infectious anemia virus
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
env	: enveloppe
FIV	: Feline immunodeficiency virus
FRET	: Fluorescence resonance energy transfer
FV	: Foamy virus
gag	: groupe antigène
GALV	: Gibbon ape leukemia virus
GP	: Glycoprotéine
GvHD	: Graft-versus-host-disease
HCT	: Human Colorectal Carcinoma (carcinome humain colorectal)
HEK	: Human Embryonic Kidney (rein embryonnaire humain)
HS	: Héparan sulfate
HSV	: Herpes simplex virus
IEP	: Intron-Encoded Protein (protéine codée par l'intron)
IN	: Intégrase
kDa	: Kilo Dalton
LCP	: Lignée cellulaire productrice
LTR	: Long terminal repeat
LV	: Lentiviral vector (Vecteur lentiviral)
MA	: Matrice
MLV	: Murine leukemia virus
MLV-A	: MLV amphotropique
MTI	: Médicament de thérapie innovante

NADPH oxydase	: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NC	: Nucléocapside
PAP	: Phosphatase acide prostatique
PBS	: Primer binding site
PCE	: Post-transcriptional element
PCR	: Polymerase chain reaction
PEI	: Polyéthylénéimine
PIC	: Complexe de pré-intégration
pol	: polymérase
polyA	: polyadénylation
PR	: Protéase
RCL	: Replication-competent lentiviral vector
RRE	: Rev response element
RSV	: Respiratory Syncytial Virus
RT	: Reverse transcriptase
RTC	: Reverse transcription complex
RV	: Rabies virus
SEVI	: Semen-derived enhancer of viral infection
SFV	: Semliki Forest virus
SIDA	: Syndrome d'immunodéficience acquise
SIN	: Self-inactivating
SLAM	: Signaling lymphocytic activation molecule receptor
SU	: Surface glycoprotein
SV40	: simian virus
SVF	: Sérum de veau fétal
TBEV	: Tick borne encephalitis virus
TM	: Transmembrane protein
UBER	: Uracil Base Excision Repair

UNG	: Uracil DNA glycosylase
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	: Virus de l'immunodéficience simienne
VSV	: Virus de la stomatite vésiculeuse
WAS	: Wiskott-Aldrich syndrome
WPRE	: Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element
XPB	: Xeroderma Pigmentosum B
XPB	: Xeroderma Pigmentosum B
XPB	: Xeroderma Pigmentosum D
γ-RV	: Gamma-rétrovirus

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du génome du VIH.....	7
Figure 2 : Représentation schématique du cycle de réplication du VIH.....	8
Figure 3 : Schéma de la production des vecteurs lent viraux par transfection transitoire.....	13
Figure 4 : La cellule souche hématopoïétique et son devenir :.....	16
Figure 5 : Structure de la fibronectine et de ses fragments.....	20
Figure 6 : Impact de UM171 et SR1 sur la transduction des CSH primitives	29
Figure 7 : Taux de transduction en fonction de la dose de M171	30
Figure 8 : Taux de transduction en fonction de la concentration de virus	31
Figure 9 : Taux de transduction en fonction du type cellulaire.	32
Figure 10 : UM171 augmente le nombre de cellules hématopoïétiques transduites.	33
Figure 11 : Evolution de la prise de greffe après transplantation avec les CSH transduites	34
Figure 12 : Impact de UM171 sur la transduction des cellules CD45+ humaines.	35
Figure 13 : Impact d'UM171 sur la transduction des cellules lymphoïdes CD20+CD19+ (à gauche) et CD33+ myéloïdes (à droite).	36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	:	Les différentes familles de retroviridae	5
Tableau II	:	Liste des glycoprotéines d'enveloppe utilisées pour pseudotyper des LV dérivés du VIH	9
Tableau III	:	Les essais cliniques de thérapie génique : Succès et écueils.	18

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITE SUR LA THERAPIE GENIQUE .3	
CHAPITRE I : LA THERAPIE GENIQUE	4
1. RAPPEL SUR LA THERAPIE GÉNIQUE	4
2. LES VECTEURS RETROVIRAUX DE TRANSFERT DE GENE.....	5
2.1. Les vecteurs rétroviraux dérivés des γ -rétrovirus	6
2.2. Les vecteurs viraux dérivés des lentivirus : vecteurs dérivés du VIH-1	6
2.2.1. Structure du génome du VIH-1	6
2.2.2. Cycle de réplication du VIH-1	8
2.2.3. Pseudotypage des vecteurs lentiviraux avec des glycoprotéines d'enveloppe hétérologues : Les glycoprotéines d'enveloppe et leur tropisme.....	9
2.2.4. Production des vecteurs lentiviraux	11
2.2.4.1. Les lignées cellulaires utilisées pour la production des vecteurs lentiviraux	11
2.2.4.2. Production des vecteurs lentiviraux par transfection transitoire	11
2.2.4.3. Production des vecteurs lentiviraux à partir de lignées stables	13
3. LA THERAPIE GENIQUE HEMATOPOÏETIQUE	15
3.1. Les cellules souches hématopoïétiques humaines et la thérapie génique.....	15
3.2. Exemples d'essais cliniques de thérapie génique des CSH	16

CHAPITRE II : UTILISATION D'ADDITIFS DE CULTURE POUR AUGMENTER LE TAUX TRANSDUCTION DES CELLULES CSH : ...19

1. PROBLÉMATIQUE.....	19
2. LES ADDITIFS DE CULTURE	19
2.1. La protamine sulfate.....	19
2.2. Le fragment de fibronectine CH-296 (Retronectin®)	20
2.3. Le polybrene.....	21
2.4. MG132	21
2.5. La rapamycine.....	21

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL23

1. OBJECTIF DU TRAVAIL	24
1.1. Objectif global.....	24
1.2. Objectifs spécifiques	24
2. CADRE D'ETUDE.....	24
3. MATERIELS ET METHODES	25
3.1. Réactifs et produits chimiques	25
3.2. Vecteurs viraux et leur production.....	25
3.3. Les cellules hématopoïétiques	25
3.4. La culture cellulaire.....	25
3.5. Transduction des cellules CD34+	26
3.6. Les souris.....	26
3.7. Expérience de xenotransplantation	26
3.8. Cytométrie de flux.....	27
3.9. Détermination du nombre de copies du virus	27
3.10. Analyse statistique	28

4. RESULTATS	29
4.1. UM171 augmente le rendement et la transduction des cellules hématopoïétiques primitives après culture	29
4.1.1. UM171 et non SR1 augmente la transduction et l'expansion des CSH	29
4.1.2. L'impact de UM171 sur la transduction et l'expansion des CSH est dose dépendante	30
4.1.3. L'impact de UM171 sur la transduction ne dépend pas de la concentration de virus	31
4.1.4. L'impact de UM171 sur la transduction ne dépend pas du phénotype de la cellule hématopoïétique.....	32
4.1.5. UM171 Augmente l'expansion in vitro des CSH modifiées:.....	33
4.2. UM171 augmente la transduction et l'expansion des CSH fonctionnelles	34
4.2.1. UM171 augmente la prise de greffe des CSH fonctionnelles.....	34
4.2.2. UM171 augmente la transduction des CSH fonctionnelles.....	35
4.2.3. L'augmentation de la transduction et de l'expansion des CSH induite par UM171 s'étend aux compartiments lymphoïde et myéloïde.....	36
5. DISCUSSION	37
CONCLUSION.....	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	41

PREAMBULE

Les grandes avancées scientifiques enregistrées dans le domaine de la recherche biomédicale ont permis d'identifier de manière précise les gènes responsables des principales pathologies héréditaires et de développer des vecteurs capables de transférer des acides nucléiques (ADN ou ARN) à l'intérieur des cellules dans le but de corriger les aberrations génétiques qui sous-tendent ces maladies héréditaires. Ainsi est née une thérapie innovante et curative à l'endroit de ces maladies : La thérapie génique.

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique qui consiste à introduire un gène normal et fonctionnel (transgène) dans une cellule où le gène présent est altéré pour y corriger l'anomalie (la mutation) à l'origine de la pathologie. Durant cette dernière décennie, cette stratégie a été utilisée dans de nombreux essais cliniques dont les résultats ont montré son efficacité curative à long terme [1–4]. Dans le cas particulier de la thérapie génique hématopoïétique, les cellules ciblées par le transfert de gène sont les cellules souches hématopoïétiques.

Un protocole de thérapie génique hématopoïétique efficace doit permettre des taux élevés de transduction des cellules souches dans des conditions qui n'altèrent pas leurs propriétés biologiques plus particulièrement leur capacité à repeupler le système hématopoïétique de sujets ayant subi une myeloablation.

Dans un travail antérieur, nous avons identifié UM171, une molécule capable de stimuler rapidement (12 jours), l'expansion *in vitro* des cellules souches hématopoïétiques [5]. Dans ce présent travail, nous nous attelons à explorer l'impact de UM171 sur la transduction lentivirale des cellules souches hématopoïétiques.

PREMIERE PARTIE : GENERALITE SUR LA THERAPIE GENIQUE

CHAPITRE I : LA THERAPIE GENIQUE :

1. RAPPEL SUR LA THERAPIE GÉNIQUE :

La thérapie génique consiste à transférer de l'acide nucléique dans les cellules d'un patient dans le but d'obtenir un effet thérapeutique. Il existe deux types de thérapie génique selon que les cellules traitées soient somatiques ou de la lignée germinale. La différence majeure entre ces deux approches étant l'absence de transmission ou l'existence de transmission de la modification génétique à la descendance.

L'objectif le plus important et le plus difficile en thérapie génique consiste à trouver une méthode de transfert de gène sûre et efficace pour le patient. Pour cette fin une grande variété de vecteurs de thérapie génique ont été développés.

L'introduction des acides nucléiques à l'intérieur des cellules n'est pas un phénomène spontané. Les acides nucléiques, chargés négativement, sont naturellement repoussés par la charge également négative de la membrane plasmique. En plus de ces interactions, le vecteur devra surmonter les obstacles extracellulaires (les mécanismes immunitaires d'élimination des particules virales) et les barrières intracellulaires (Les différentes membranes) pour un transfert de gène efficace [6].

Il existe différentes méthodes pour transférer un médicament de thérapie génique dans les cellules :

- les approches de thérapie génique non-virales utilisant de l'ADN nu ou des complexes d'ADN
- les approches de thérapie génique virales utilisant des virus recombinants, appelés vecteurs viraux. Ces différentes approches ont été développées dans le but d'offrir une large variété de choix de vecteurs de thérapie génique.

En tout état de cause, le vecteur idéal de thérapie génique est le vecteur qui serait à la fois efficace, spécifique et d'une parfaite innocuité pour le malade et le manipulateur quel que soit le contexte d'application.

Dans ce présent travail nous nous intéresserons aux approches de thérapie génique utilisant des vecteurs dérivés de virus recombinants.

2. LES VECTEURS RETROVIRAUX DE TRANSFERT DE GENE :

Ces 20 dernières années, les vecteurs rétroviraux ont été utilisés dans de nombreux essais de thérapie génique pour traiter des maladies génétiques et aussi des cancers [7]. Les premiers vecteurs rétroviraux sont des γ -rétrovirus (γ -RV) dérivés du virus leucémogène murin (MLV). Puis d'autres vecteurs rétroviraux ont été développés à partir des lentivirus comme le VIH-1 [8]. Les vecteurs dérivés du MLV ou du VIH-1 sont les vecteurs rétroviraux de thérapie génique les plus communément utilisés. Les rétrovirus sont des virus enveloppés dont le génome est constitué de deux ARNs identiques de polarité positive. La principale particularité des vecteurs dérivés des rétrovirus est le fait que, avant de pouvoir s'intégrer stablement dans le génome de la cellule hôte, le génome viral est transcrit de façon inverse en ADN double brin par la transcriptase inverse [9]. Les 7 genres de virus qui composent la famille des retroviridae sont consignés dans le tableau ci-dessous [10] (Tableau 1).

Tableau I : Les différentes familles de retroviridae [11] :

Genre	Exemple	Vecteur de transfert de gène
Alpharetrovirus	Virus du sarcome aviaire	OUI
Betaretrovirus	Virus de la tumeur mammaire murine	NON
Gammaretrovirus	Virus de la leucémie murine (MLV)	OUI
Deltaretrovirus	Virus de la leucémie bovine	NON
Lentivirus	Virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1)	OUI
Epsilonretrovirus	Virus du sarcome dermal du doré jaune	NON
Spumavirus	Virus foamy humain	OUI

2.1. Les vecteurs rétroviraux dérivés des γ -rétrovirus :

Au début des années 80, les rétrovirus MLV ont été utilisés pour développer de nouveaux outils de transfert de gène. L'utilisation de ces vecteurs a permis de transférer avec succès et de manière stable, un gène rapporteur dans le génome des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans des modèles murins [12,13]. L'efficacité de transduction des cellules avec les vecteurs dérivés des MLV est dépendante de la division cellulaire. En effet, le complexe de pré-intégration (CPI) viral est incapable de franchir la membrane nucléaire. C'est pourquoi, le génome viral peut atteindre le noyau seulement lorsque la membrane nucléaire est dégradée au cours de la mitose [14,15]. Ainsi pour la transduction des CSH qui se divisent peu, il est nécessaire de les stimuler au préalable avec des cytokines et des facteurs de croissance. Cependant, il a été montré dans le cas particulier du transfert du gène codant pour la β -globine, que l'utilisation de vecteurs γ -rétroviraux ne permet pas de transférer une cassette d'expression contenant les grandes séquences régulatrices de la β -globine qui permettent d'obtenir une expression forte et spécifique dans les cellules érythroïdes [16,17], contrairement aux LV qui sont capables de transférer cette cassette d'expression [18,19].

2.2. Les vecteurs viraux dérivés des lentivirus : vecteurs dérivés du VIH-1 :

2.2.1. Structure du génome du VIH-1 :

Le VIH-1 est l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le VIH-1 fait partie de la famille des retroviridae et du genre lentivirus. Comme tous les rétrovirus, l'ADN proviral du VIH-1 est composé des gènes gag, pol et env encadrés des deux séquences régulatrices identiques LTR («long terminal repeat»). Le VIH-1 contient des gènes additionnels dits « accessoires ». En effet, il existe des gènes de régulation de l'expression et de l'export nucléaire

des messagers viraux qui sont tat et rev, mais aussi les gènes accessoires nef, vpu, vpr et vif qui jouent un rôle majeur dans la pathogénicité associée au VIH-1 [20]. Le gène gag code les protéines de structures : la matrice (MA), la capside (CA) et la nucléocapside (NC). Le gène pol code la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) qui convertit l'ARN en ADN et l'intégrase (IN) qui permet d'intégrer l'ADN viral dans le génome de la cellule cible. Les séquences codant gag et ga-gpol sont exprimées comme une protéine de fusion. Ces polyprotéines sont clivées spécifiquement par l'action de la protéase PR du VIH-1. De cette façon, les protéines MA, CA et NC sont générées après le clivage de gag. De la même manière, les protéines PR, RT et IN sont générés après le clivage de pol. Le gène env code pour la glycoprotéine de surface (SU) et la protéine transmembranaire TM de l'enveloppe virale [21]. Les séquences promotrices ou LTR, présentes aux deux extrémités de l'ADN proviral, sont composées de 3 régions : U3, R et U5. La région U3 contient les séquences du promoteur (« enhancer ») nécessaires pour la transcription des gènes viraux. La région U5 en 3' est un signal de terminaison de la transcription (signal de polyadénylation) [8] (Figure 1).

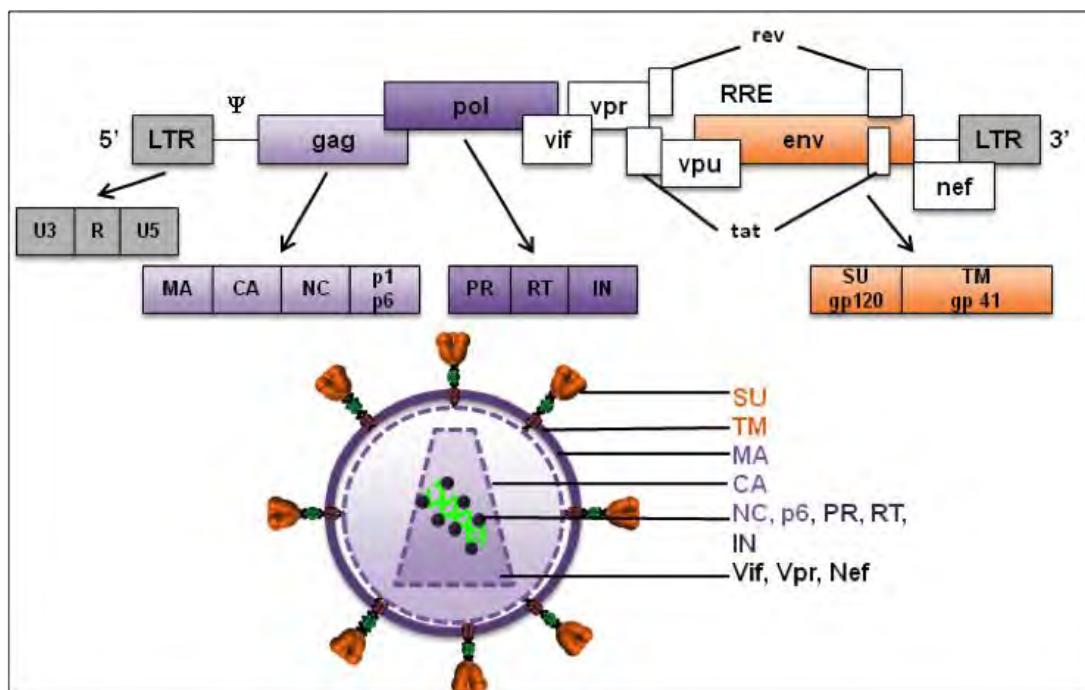


Figure 1 : Structure du génome du VIH

2.2.2. Cycle de réplication du VIH-1

La gp120 du VIH reconnaît et se fixe sur son récepteur spécifique, la molécule CD4 présent à la surface des lymphocytes. Il s'ensuit une fusion des membranes du virus et celle de la cellule. Puis, le virus pénètre à l'intérieur de la cellule et y libère son contenu (transcriptase inverse, protéase, intégrase et l'ARN). L'ARN du VIH est ensuite transformé en ADN (ADN proviral) par la transcriptase inverse. Cette ADN sera par la suite transporté au niveau du noyau où il est intégré dans le génome de la cellule grâce à l'intégrase ; à ce stade, le virus est appelé provirus. A l'intérieur du noyau, l'ADN viral est transformé en ARN. Les ARN messagers sont alors traduits en protéines virales qui sont clivées par la protéase en protéines de plus petites tailles qui formeront les différents constituants du VIH. Enfin, les protéines virales clivées sont assemblées autour de l'ARN pour former de nouveaux virus, qui sortent par bourgeonnement à l'extérieur de la cellule. Ces virus vont ensuite infecter d'autres cellules.

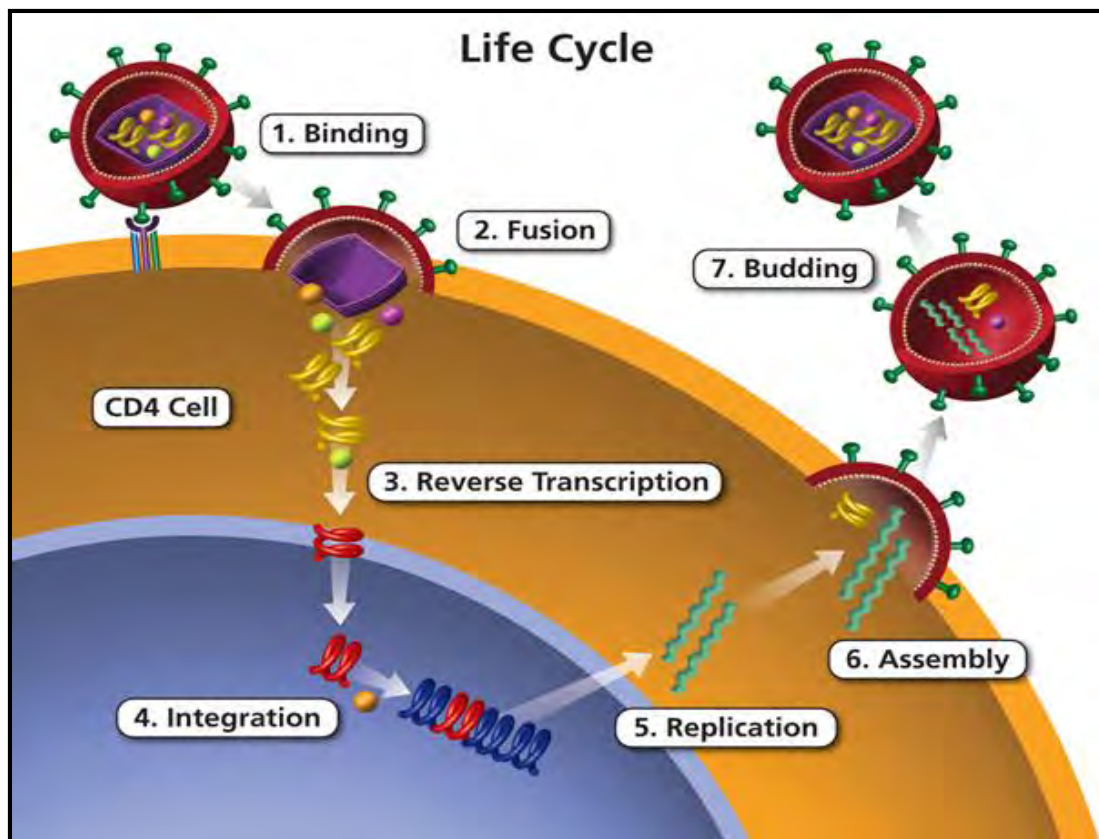


Figure 2 : Représentation schématique du cycle de réplication du VIH

2.2.3. Pseudotypage des vecteurs lentiviraux avec des glycoprotéines d'enveloppe hétérologues : Les glycoprotéines d'enveloppe et leur tropisme

Une autre modification importante apportée aux vecteurs lentiviraux est l'incorporation dans les particules virales d'une glycoprotéine d'enveloppe appartenant initialement à un autre virus. Cette modification est le « pseudotypage ». La glycoprotéine d'enveloppe choisie sera la clé pour une transduction spécifique des cellules ou du tissu d'intérêt, c'est ce qui est appelé le tropisme [22–25]. Le choix du pseudotype est donc important afin d'obtenir une adhésion et une fusion spécifique des vecteurs avec les cellules d'intérêt.

Tableau II : Liste des glycoprotéines d'enveloppe utilisées pour pseudotyper des LV dérivés du VIH [11].

Vector pseudotypes glycoproteins	Evaluated targeted cells	Ref
Rabies virus Rabies-G	Neurons	(Wong et al. 2004), (Mazarakis et al. 2001), (Azzouz et al. 2004), (Watson et al. 2002)
Mokola virus MK-G	Neurons / Retinal pigment epithelium	(Wong et al. 2004), (Watson et al. 2002)
LCMV WE, WE-HP1	Glioma/ Neuronal stem cells	(Miletic et al. 2004), (Stein et al. 2005)
Ross river virus E1, E2	Glial cells	(Kang et al. 2002)
Ebola virus EboZ	Airway epithelium/Skin	(Medina et al. 2003), (Silvertown et al. 2006), (Hachiya et al. 2007)
MuLV 4070A-env	Skin	(Hachiya et al. 2007)
Baculovirus GP64	Hepatocytes	(Kang et al. 2005)
HCV E1, E2	Hepatocytes	(Bartosch et al. 2003)
Sindai virus F protein	Hepatocytes	(Kowolik et al. 2002)

Il existe une large variété de glycoprotéines (GP) d'enveloppe virale (ex. la glycoprotéine d'enveloppe du VSV, du virus de la rage, du MLV amphotrope, du virus Ebola, du virus Mokola, du baculovirus, du virus de la rougeole, etc) et

aussi des GP d'enveloppe virale modifiées, pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux (tableau 2).

Parmi les glycoprotéines dérivées des γ -rétrovirus, il y a les GP dérivée du MLV ectopique [26,27], du 4070A MLV amphotropique [27], du 10A1 MLV [28,29], NZBMLV xénotropique et celle du mink cell focus-forming virus polytropique [29].

Les LV portant la glycoprotéine du filovirus, Ebola virus Zaire, augmente le niveau de transduction des cellules du poumon chez la souris [30] tandis que les LV portant la glycoprotéine GP64 du baculovirus ou E1 et E2 du virus de l'hépatite C cibleront préférentiellement les cellules hépatiques [31,32].

Les vecteurs lentiviraux pseudotypés avec la glycoprotéine du virus de la rage (RV) ou une glycoprotéine de fusion RV/VSV, sont capables, après injection en périphérie, de réaliser un transport rétrograde axonale et d'atteindre le système nerveux central [22–25].

Les vecteurs lentiviraux pseudotypés avec les glycoprotéines H et F du Measles virus (MV) Edmondson permettent de transduire efficacement les cellules T exprimant à leur surface les récepteurs SLAM (signaling lymphocytic activation molecule receptor) et CD46 [33–36].

D'autres glycoprotéines ont aussi été dérivées du virus leucémogène du gibbon (« gibbon ape leukemia virus » : GALV) [28,29] et la glycoprotéine RD114 du rétrovirus félin endogène [37–40]. Ces deux GP ont un ciblage hématopoïétique. La glycoprotéine d'enveloppe GALV présente un tropisme hématopoïétique fort puisque la plupart des cellules hématopoïétiques expriment la protéine Glvr1 (ou Pit-1), le récepteur cellulaire de GALV [39,41].

La glycoprotéine VSV-G est la plus largement utilisée pour pseudotyper les LV. Elle permet une transduction efficace ex vivo des CSH exprimant le marqueur CD34 et la transduction in vivo des cellules du système nerveux central, du muscle et du foie [42]. Les vecteurs VSV-G-LV sont utilisés pour la première

fois dans un essai clinique en 2002 [43]. Ils sont plus stables et donc plus faciles à purifier dans les contraintes BPF [44,45].

2.2.4. Production des vecteurs lentiviraux :

2.2.4.1. Les lignées cellulaires utilisées pour la production des vecteurs lentiviraux :

Les cellules de reins embryonnaires humains (human embryonic kidney) HEK293T(ou 293T) sont principalement utilisées pour produire des vecteurs lentiviraux et des vecteurs rétroviraux [46]. Cette lignée cellulaire devenue une référence est facilement transfectable avec une efficacité de l'ordre de 70-90%. Ces cellules ont été modifiées pour exprimer stablement l'antigène T de virus simien 40 (SV40) [47,48]. Dans les mêmes conditions de culture, les cellules 293T ont une croissance plus rapide et permettent de produire 4 fois plus de vecteurs que les cellules HEK293 n'exprimant pas l'antigène T [49]. Il a également été montré que l'utilisation des cellules 293T permet une augmentation du titre de production des LV de 10 fois en comparaison avec le titre obtenu lors de l'utilisation de la lignée productrice HEK293 [50]. De plus, les cellules 293T peuvent facilement s'adapter à la culture en suspension dans un milieu sans sérum [49,51,52] ce qui permet de les utiliser pour une production à grande échelle dans des bioréacteurs et de réduire le nombre de composants du milieu de culture, le nombre d'étapes et le coût des procédés de purification.

2.2.4.2. Production des vecteurs lentiviraux par transfection transitoire :

L'expression transitoire est la méthode la plus communément utilisée pour produire les LV. Elle consiste à la transfection transitoire de plasmides codants i) gag-pol, ii) rev, iii) un plasmide codant la glycoprotéine d'enveloppe et iv) un

plasmide de transfert codant le transgène d'intérêt avec en cis les séquences minimales qui sont requises pour la production, la prise en charge et l'encapsidation de l'ARN viral [53] (figure 3). La transfection transitoire est un procédé plus rapide et plus simple que l'établissement de lignées stables et elle permet de faire exprimer un transgène cytotoxique [54].

De grandes améliorations ont récemment été décrites pour produire des LV par transfection transitoire [52,55–59]. Certaines de ces études décrivent des systèmes de production transposables à grande échelle pouvant générer plus de 10^{11} particules lentivirales par lot, ce qui permet la mise en place d'essais cliniques. Ces améliorations sont pour la plupart une combinaison de paramètres comme le type cellulaire, le milieu de culture, les additifs de culture, la technique de culture cellulaire et l'agent transfectant d'ADN plasmidique. Par exemple, Kuroda et al. [60] ont décrit un protocole de production basé sur la culture des cellules adhérentes avec une transfection au PEI [60]. Tiscornia et al. ont décrit une méthode de production lentivirale à large échelle avec des cellules adhérentes et du sérum de veau foetal (SVF) avec une transfection classique au phosphate de calcium (CaPO_4) [61]. Segura et al. ont montré qu'il est aussi possible d'améliorer la production lentivirale dans un système de culture en suspension [56]. Leur milieu est sans sérum et complémenté en acide pluronique (Pluronic®) et la transfection est réalisée au PEI. La qualité de la préparation des plasmides et la taille de l'insert influence aussi l'efficacité de transfection. En effet, plus la taille de l'insert est grande, plus le titre de la production lentivirale diminue [62] et la préparation d'ADN plasmidique utilisé pour la production lentivirale doit être exempte d'endotoxines d'origine bactérienne et être de préférence sous forme super-enroulée [56].

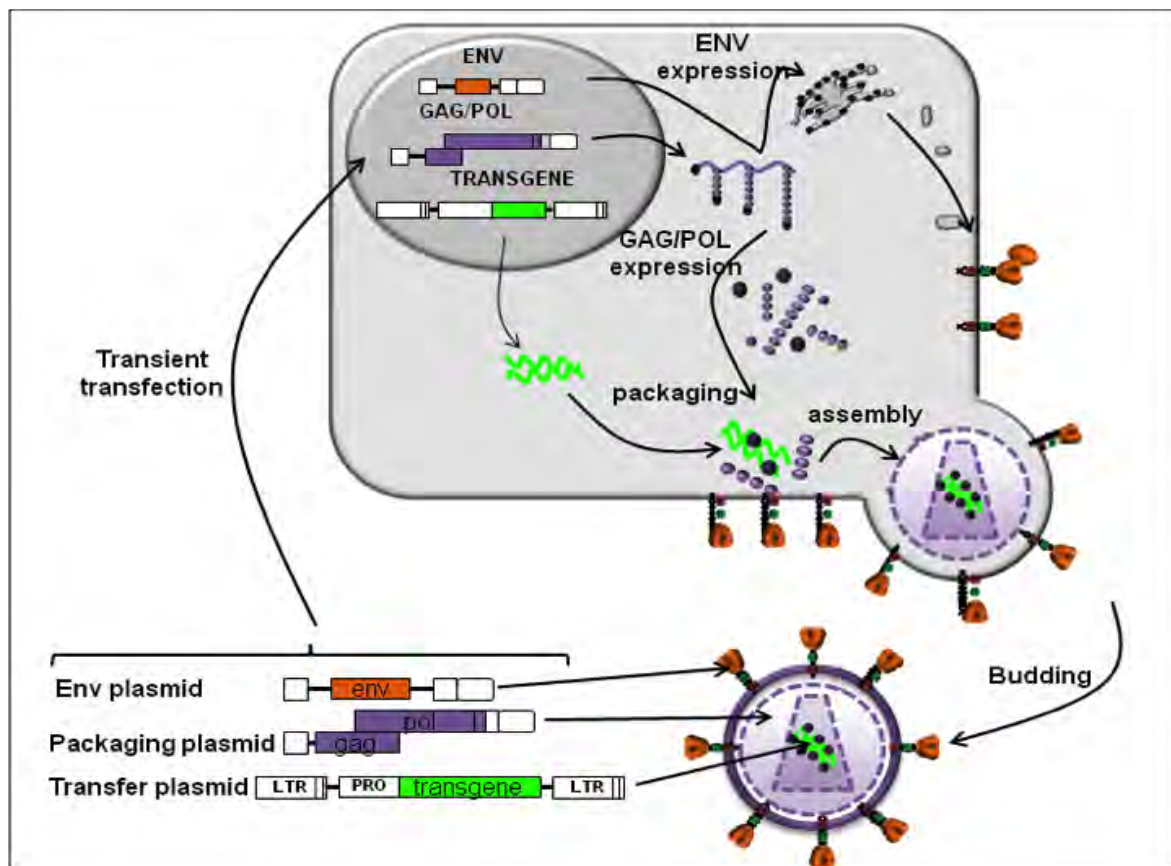


Figure 3 : Schéma de la production des vecteurs lent viraux par transfection transitoire

Pour la transfection transitoire, les principales difficultés rencontrées sont i) le risque de recombinaison entre les plasmides transfectés, ii) la contamination du milieu avec les plasmides qui complique le processus de purification et iii) la difficulté d'identifier des conditions optimales pour la transfection multiple qui conduit à de la variabilité entre les différents lots de production.

2.2.4.3. Production des vecteurs lentiviraux à partir de lignées stables :

Des lignées cellulaires d'encapsidation exprimant stablement les gènes gag-pol, env et rev ont été développées comme alternative à la transfection transitoire. Pour produire les LV, le plasmide de transfert contenant le transgène d'intérêt est transfecté dans ces cellules avec du PEI [63] ou par précipitation au Ca_2PO_4 [8,64]. Il existe également des lignées cellulaires productrices (LCPs) qui

expriment stablement tous les éléments nécessaires pour la production rétrovirale [65].

Elles peuvent être obtenues soit par transfection de tous les plasmides soit par infection par des vecteurs rétroviraux précédemment produits. Ces lignées cellulaires stables peuvent produire des particules virales pendant 5 à 6 jours [66,67].

Aussi, des constructions SIN, dans lesquelles les LTR sont régulés, ont été utilisées pour générer des LCPs stables capable de produire des LV de 3^{ème} génération avec un titre supérieur à 10^7 TU/mL [66–68]. Greene MR et al. ont décrit une lignée productrice stable de SIN-LV pour la maladie SCID-X1 capable de produire ce vecteur à large échelle (280 litres) avec un titre de l'ordre de $7,2 \times 10^8$ tu/mL après concentration [69]. Récemment, une nouvelle LCP, appelée RD2-MolPack-Chim3, a été mise au point pour la production de vecteurs RD114 TR LV.

Il a été montré que ces vecteurs ont permis de transduire des CSH avec la même efficacité que des vecteurs VSV-G-LV produits par transfection transitoire mais avec une dose de vecteur 100 fois inférieure [70].

3. LA THERAPIE GENIQUE HEMATOPOÏETIQUE :

3.1. Les cellules souches hématopoïétiques humaines et la thérapie génique :

Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules capables d'auto-renouvellement in vivo et sont à l'origine des cellules sanguines différenciées (figure 4). L'hématopoïèse est régulée par un microenvironnement hématopoïétique complexe au sein de la moelle osseuse, la niche. Cette niche hématopoïétique est composée de cellules endothéliales, de fibroblastes, de macrophages et de protéines de la matrice extracellulaire [71]. La thérapie génique avec des CSH autologues est une alternative à la greffe de CSH allogéniques [4,72–80]. L'utilisation de cellules autologues évite les problèmes relatifs à la recherche d'un donneur compatible et la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) [81]. Les CSH humaines peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse, du sang de cordon ou de sang périphérique mobilisé, et enrichies par immuno-affinité en utilisant des anticorps spécifiques du marqueur de surface CD34+ [82]. Le transfert de gènes dans les CSH est une approche attractive pour le traitement des maladies hématopoïétiques monogéniques. En effet, la correction génétique des progéniteurs hématopoïétiques permet de reconstituer, après quelques semaines, un système immunitaire complet chez le patient. Ces quinze dernières années, une série d'essais cliniques de thérapie génique pour des maladies hématopoïétiques, des cancers ou des immunodéficiences primaires a été réalisée avec succès [83–85].

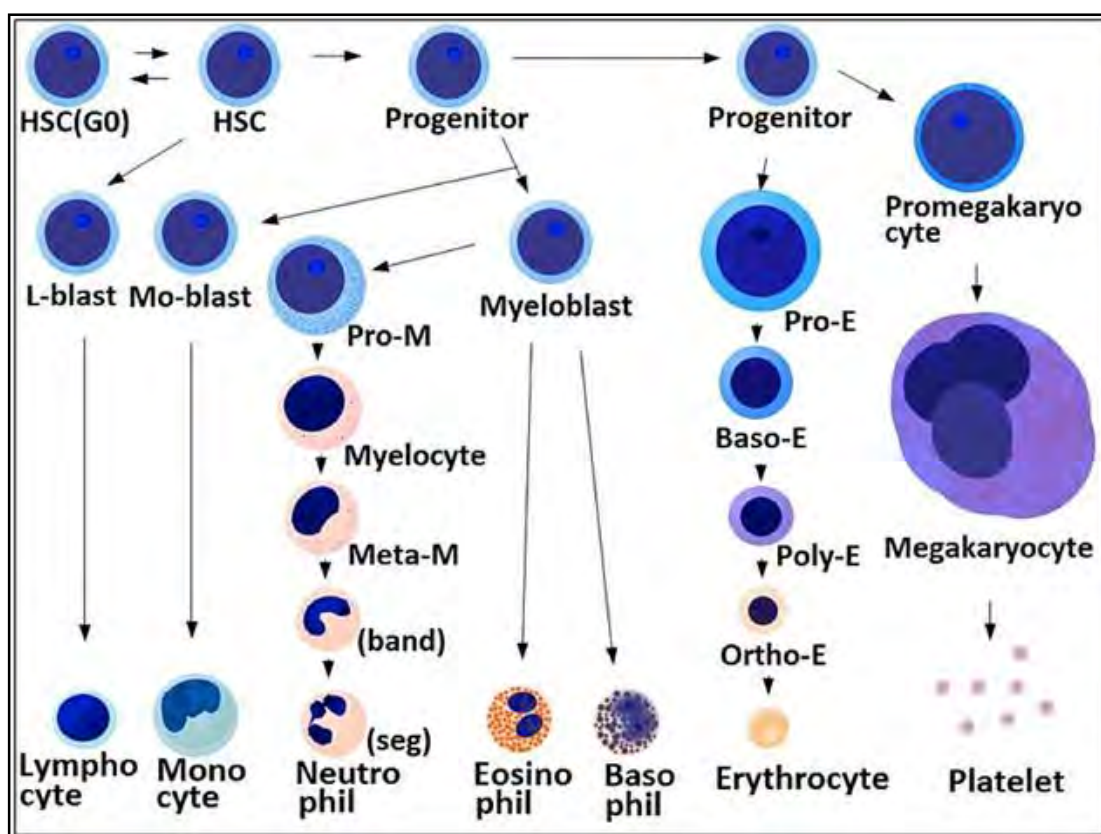


Figure 4 : La cellule souche hématopoïétique et son devenir :

3.2. Exemples d'essais cliniques de thérapie génique des CSH :

3.2.1. Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) :

Le WAS est une maladie hématopoïétique candidate pour la thérapie génique avec l'utilisation de CSH transduites avec des LV dérivés du VIH-1 [86]. Le WAS est une immunodéficience primaire rare caractérisée par une microthrombocytopénie, des infections récurrentes, de l'eczéma et il est aussi associé à des symptômes d'auto-immunité [87]. Les études précliniques ont montré l'efficacité et la sécurité du transfert de gène ex vivo dans des CSH autologues en utilisant un LV exprimant le gène WAS humain sous le contrôle du promoteur endogène WAS et pseudotypé avec la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G (WAS-LV) [88–90]. Ces résultats ont permis de poursuivre les études vers la clinique pour traiter des patients atteints de la forme sévère du syndrome

de Wiskott Aldrich et qui n'ont pas de donneur compatible pour une transplantation allogénique de la moelle osseuse [91].

3.2.2. La granulomatose septique chronique (CGD= Chronic Granulomatous Disease) :

Elle est causée, dans la majorité des cas, par des mutations dans le gène CYBB, qui code la protéine gp91 phox qui fait partie du complexe nicotinamide adénine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH-oxidase). Cette mutation a un impact sur l'activité antimicrobienne des neutrophiles et donc conduit à un défaut de destruction des bactéries et des champignons [85]. Le premier essai clinique avec des CSH a démarré aux Etats-Unis sans chimiothérapie, mais avec comme résultats une mauvaise greffe et un bénéfice clinique de courte durée pour les patients [72]. Depuis, d'autres essais avec une chimiothérapie au préalable, sont menés dans différents pays [4,77,78,80,92]. La majorité des patients ont montré des bénéfices cliniques au moins à court terme avec une disparition d'infections antérieures, qui a été associée au rétablissement transitoire de l'activité de la NADPH-oxydase dans les neutrophiles. Dans la majorité des cas, une diminution du nombre de cellules corrigées a été observée au cours du temps, avec une faible greffe des progéniteurs. Ce phénomène peut s'expliquer par le traitement insuffisant de cytoréduction des cellules immunitaires du patient. Dans quatre patients, la présence de neutrophiles fonctionnels à plus long terme était seulement attribuable à l'apparition d'une population clonale, conséquence d'une transactivation de gènes myéloprolifératifs (MDS et EVI1) causé par l'intégration du vecteur MLV avec LTR sauvage.

3.2.3. La β -thalassemie :

La β -thalassemie est une maladie hématologique caractérisée par une insuffisance ou une absence de production des chaînes β de l'hémoglobine, conduisant ainsi à une précipitation des chaînes non appariées dans les

progéniteurs érythroïdes et une perturbation de l'érythropoïèse. Ces défauts de l'érythropoïèse sont responsables de l'anémie et des signes cliniques observés chez les patients atteints de β -thalassemie.

Un essai clinique phase I/II dans lequel des cellules souches autologues dérivées de la moelle, transduites avec un vecteur SIN-LV exprimant le gène de la chaîne β de l'hémoglobine, a donné des résultats très prometteurs avec disparition des signes cliniques associés à la maladie [93, 94]. Par ailleurs, une production stable de l'hémoglobine par les cellules corrigées a été observée plusieurs années (8 ans) après la greffe. Récemment plusieurs modifications dans le but d'augmenter la sécurité, la sûreté et l'efficacité à long terme du vecteur ont été effectuées avec succès [95, 96].

Tableau III : Les essais cliniques de thérapie génique : Succès et écueils.

Maladie	vecteur	Gène	Nb	efficacité	complications	réfs
ADA-SCID	γ -rétrovirus	ADA	42	Long terme	Aucune	Aiuti, 2002; Aiuti, 2009; Gaspar, 2011; Candotti 2012
X-SCID	γ -rétrovirus	IL2R γ c	19	Long terme	5 LAL-T (LMO2, CCND2, BMI-1)	Howe, 2008; Hacein-Bey-Abina, 2010
CGD	γ -rétrovirus	gp91 ^{phox}	4	Transitoire	3 MDS (MDS1, PRDM16 SETBP1) 1 dominance clonale	Stein, 2010; Kang, 2010; Aiuti, 2012
WAS	γ -rétrovirus	WAS	10	Long terme	4 LAL-T (LMO2, TAL1...) 2 LAL-T/LAM 1 LAM (MDS1, MN1)	Boztug, 2010; Braun 2014
X-SCID	SIN γ -rétrovirus	IL2R γ c	9	Long terme	Aucune	Hacein-Bey-Abina 2014
ADA-SCID	SIN lentivirus	ADA	16	Suivi : 6 mois	Aucune (Dominances clonales occasionnelles et transitoires)	Gaspar 2015
X-SCID	SIN lentivirus	IL2R γ c	2	Long Terme	Aucune	De Ravin 2013 ; De Ravin 2015
WAS	SIN lentivirus	WAS	14	Long terme	Aucune liée au vecteur 1 décès du à une infection préexistante	Aiuti, 2013 ; Hacein-Bey-Abina 2015
β -thalassémie	SIN lentivirus	β -globine	11	Long terme (8/11)	1 Dominance clonale (HMGA2)	Cavazzana 2010; Payen 2012, Cavazzana 2015; Walters, 2015
Drépano.	SIN lentivirus	β -globine	1	Suivi : 9 mois	Aucune	Cavazzana, 2015
ALD	SIN lentivirus	ABCD1	4	Long terme (3/4)	Aucune	Cartier, 2009; Cartier, 2012
MLD	SIN lentivirus	ARSA	20	Long terme	Aucune	Biffi, 2013

CHAPITRE II : UTILISATION D'ADDITIFS DE CULTURE POUR AUGMENTER LE TAUX TRANSDUCTION DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES :

1. PROBLÉMATIQUE :

Deux éléments sont critiques dans le développement de la thérapie génique avec des cellules souches hématopoïétiques : i) la durée de manipulation *in vitro*, qui augmente les risques de différenciation cellulaire et ii) la nécessité d'utiliser de fortes doses de vecteur pour transduire efficacement ces CSH. Les CSH humaines et murines peuvent être transduites *ex vivo* pendant un temps court avec des LV, mais il est nécessaire d'utiliser une forte dose de vecteurs et de les stimuler avec des cytokines pour espérer avoir une transduction efficace [97]. Dans un premier temps, le transfert de gène et l'expression à long terme du transgène dans les cellules différenciées ont été réalisés avec succès dans des modèles murins [98,99]. Cependant, les expérimentations sur des modèles canins et simiens ont rencontré de plus grandes difficultés liées à la faible efficacité de transduction des cellules souches [100–102]. Les nouvelles approches consistent à utiliser des additifs de culture pour promouvoir l'entrée du virus dans les cellules.

2. LES ADDITIFS DE CULTURE :

2.1. La protamine sulfate :

La protamine sulfate, ou salamine, est une petite protéine cationique du saumon [101]. Elle est capable de promouvoir à la fois le transfert de gènes avec des vecteurs rétroviraux [98] mais aussi avec des AAV [99, 103]. Cornetta et al. ont montré que la protamine sulfate utilisée à une concentration de 5 à 10 µg/mL est efficace pour améliorer la transduction des cellules avec des vecteurs rétroviraux et est moins toxique que le polybrene [59]. Dans l'essai clinique concernant la

maladie ALD liée à l’X, la protamine sulfate a été utilisée à une concentration de 4µg/mL pour pouvoir transduire les CSH CD34+ [104].

2.2. Le fragment de fibronectine CH-296 (Retronectin®) :

La fibronectine est une des protéines majeures composant la matrice extracellulaire [105]. Des études ont montré que la fibronectine permet l’adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire mais aussi induit des voies de signalisation intracellulaires via son interaction avec les intégrines présentes à la surface des cellules [106]. Un système d’expression construit dans *Escherichia coli* a permis de produire un fragment de fibronectine humaine de 33 kDa, appelé C-274 [107], avec une forte activité d’adhésion cellulaire (figure 5). En thérapie génique, les fragments recombinants de la fibronectine humaines comme le fragment FNCH296 ou encore Retronectin® sont largement utilisés avec des vecteurs rétroviraux pour augmenter l’efficacité de transfert de gènes dans les cellules cibles [108].

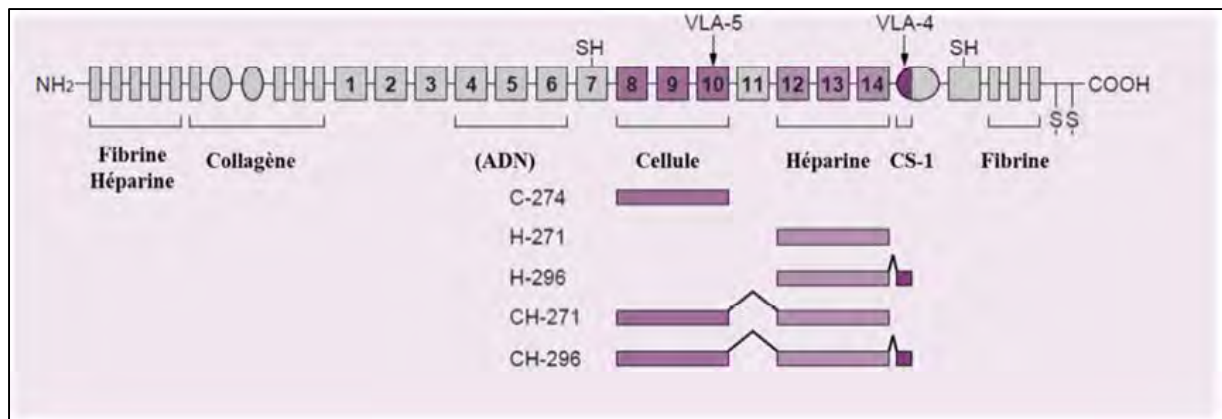


Figure 5 : Structure de la fibronectine et de ses fragments

Depuis, plusieurs études ont montré une amélioration de l’efficacité du transfert de gènes par des vecteurs rétroviraux en présence de Retronectin® dans des cellules de mammifères dont les cellules humaines CD34+, les lymphocytes T de primates humain et non humain et aussi les cellules de lignées de lymphocytes T humains (Exemples : les cellules Jurkat) [109]. L’hypothèse

d'action de la Retronectin® est sa capacité à colocaliser des particules virales et des cellules cibles [110].

2.3. Le polybrene :

Le polybrene (hexadimethrine bromide) est connu comme étant une molécule capable d'amplifier l'infection rétroviral depuis 1960 [21]. Aujourd'hui il est utilisé dans de nombreux protocoles de transduction pour augmenter le taux de transfert de gène induit par les vecteurs rétroviraux et adénoviraux [106, 111]. Malheureusement le polybrene ne peut être utilisé qu'à dose faible (5 -10 µg/mL) et durant un temps court du fait de sa toxicité par perturbation du potentiel de membrane [93].

2.4. MG132 :

Santoni de Sio et collaborateurs ont démontré que MG132 pouvait augmenter la transduction des cellules souches hématopoïétiques par inhibition du protéasome impliqué dans les mécanismes de défense de la cellule souche contre les infections virales. Par ailleurs des taux de transduction nettement plus élevés ont été observés lorsque MG132 était associé aux cytokines et aux facteurs de croissance des cellules souches [112–114]. Dueck et Guatelli [75] ont réussi à avoir des taux élevés de transfert de gène dans cellules souches hématopoïétiques prétraitées avec MG132 mais la toxicité de cette molécule limite son utilisation dans les protocoles de thérapie génique basés sur les CSH.

2.5. La rapamycine :

Plusieurs tentatives visant à augmenter le transfert de gène à l'intérieur des cellules souches hématopoïétiques ont fini par révéler que des barrières intrinsèques, appelés Facteurs de restriction, existent dans les cellules souches et que ces facteurs de restriction étaient responsables de la résistance des cellules souches à la transduction. Ces facteurs de restriction ciblaient particulièrement

les étapes précoces du cycle de la réplication virale [112]. Rapamycine, un inhibiteur de mTOR (mammalian target of rapamycin), a été décrite comme une molécule qui joue un rôle clé dans la pénétration et l'intégration des vecteurs lentiviraux à l'intérieur des cellules souches, par inhibition de ces facteurs de restriction [115]. Ainsi un traitement à la rapamycine pouvait conduire à une augmentation substantielle du transfert de gène à l'intérieur des cellules souches [115]. Par conséquent, cette molécule serait bénéfique pour les essais cliniques de thérapie génique par réduction du temps de transduction et la quantité de particules virales nécessaires pour atteindre des taux de transduction optimaux ; par conséquent une diminution du coût de la procédure.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

1. OBJECTIF DU TRAVAIL :

1.1. Objectif global :

Dans ce présent travail nous nous proposons d'explorer l'impact de UM171 sur la transduction des cellules souches hématopoïétiques.

1.2. Objectifs spécifiques :

De manière plus spécifique il s'agira de :

❖ *In vitro*

- Evaluer le taux de transfert de gène à l'intérieur des cellules souche hématopoïétiques transduites en présence de UM171,
- Evaluer les doses de UM171 pour une transduction optimale des CSH,
- Evaluer la transduction des différents phénotypes de CSH en présence de UM171.

❖ *in vivo*

- Evaluer l'impact de UM171 sur la prise de greffe,
- Evaluer l'impact de UM171 sur la transduction des cellules souches hématopoïétiques fonctionnelles,
- Evaluer l'impact de UM171 sur la transduction des cellules des différents compartiments cellulaires de l'hématopoïèse.

2. CADRE D'ETUDE :

Les travaux de ce mémoire ont été effectués dans le laboratoire de thérapie génique hématopoïétique, Terry Fox Laboratory(TFL) du Centre de Recherche sur le Cancer de la Colombie Britannique (Vancouver, Canada) et de l'Université de la Colombie Britannique (UBC, Vancouver, Canada).

3. MATERIELS ET METHODES :

3.1. Réactifs et produits chimiques :

La molécule UM171 a été synthétisée au laboratoire alors que la molécule SR1 a été achetée auprès d'Alichem (cat : 41864).

3.2. Vecteurs viraux et leur production :

Les lentivirus *pCCL-c-MNDUSpgkGFP* et *pCCL-c-MNDUSpgkYFP* utilisés pour transduire les cellules hématopoïétiques ont été décrites par Logan AC et al [116]. De hauts titres de ces virus ont été produits par transfection transitoire de cellules 293T en utilisant 10µg du vecteur, 6.5µg du gag/pol, 2.5µg RSV-Rev et 3.5µg pMD. G (VSVg). Les particules virales ont ensuite été concentrées par ultracentrifugation à 25.000rpm et à 4°C pendant 1,5 heure. Les aliquots du surnageant viral ont ensuite été conservés à -80°C après que leur titre soit déterminé sur des cellules Héra ou K562.

3.3. Les cellules hématopoïétiques :

Les cellules hématopoïétiques en l'occurrence les cellules de sang de cordon ombilical ont été obtenues à partir de donneurs consentants selon une procédure approuvée par le comité d'éthique de l'Université de la Colombie Britannique (Vancouver, Canada). Les cellules ont ensuite été triées sur la base de l'expression du marqueur CD34+, en utilisant un trieur Influx II sorter (BD Bioscience) pour atteindre des niveaux de pureté d'au moins 90% +.

3.4. La culture cellulaire :

Les cellules CD34+ sont préstimulées pendant 16 heures dans un milieu sans sérum (SFM; Iscove's medium) supplémenté avec du sérum de veau, de l'albumine, de l'insuline et de la transferrine (BIT, STEMCELL Technologies), de 10 µg/ml de low density lipoprotein (LDL, STEMCELL Technologies), 10^{-4} M de 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), de 10^{-4} M de glutamax500

(STEMCELL Technologies), de pénicilline et de streptomycine. A ce cocktail on a ajouté 100 ng/mL de FLT3-ligand (FL), 100 ng/mL Steel Factor (SF), et 20 ng/mL d'IL-3, d'IL-6 et de granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (tous de STEMCELL Technologies). La prestimulation est faite en présence ou en absence d'UM171 (35 nM), SR1 (0.75 μ M) ou DMSO (0.01%) selon le cas.

3.5. Transduction des cellules CD34+ :

A la fin de la prestimulation les cellules sont suspendues dans un milieu frais contenant les facteurs de croissance appropriés, les concentrés de virus à raison de 1×10^5 à 1×10^9 particules virales/mL et la protamine sulfate à raison de 5 μ g/mL. Ces cellules sont ensuite placées dans une plaque 96 puits dont les puits sont préalablement recouverts de fibronectine (Sigma-Aldrich) à raison de 5 μ g/cm², puis incubées à 37°C pendant 6 heures. La transduction a été réalisée en présence ou en absence de UM171 (35 nM), SR1 (0.75 μ M) ou DMSO (0.01%). A la fin de la transduction les cellules sont lavées plusieurs fois et sont utilisées pour la transplantation *in vivo* ou cultivées pendant 72 heures pour déterminer le taux de transduction *in vitro*.

3.6. Les souris :

Les souris NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} Il2r γ ^{tm1Wj1}/SzJ NOD/SCID-IL-2R γ c-null, NSG ont été produites au niveau de l'animalerie du Centre de Recherche sur le Cancer de la Colombie Britannique (British Columbia Cancer Research Centre). Toutes les procédures utilisées ont été approuvées par le "Canadian Council on Animal Care guidelines".

3.7. Expérience de xenotransplantation :

Dans les études de xenotransplantation, des souris NSG de 8-12 semaines ont été irradiées avec 315 cGy de ¹³⁷Cs pendant 24 heures avant la transplantation. Les souris ont ensuite reçu par voie intraveineuse des doses équivalentes de 20

000, 4000, 800 CD34⁺ cellules transduites en présence ou en absence de UM171. La reconstitution lympho-myeloïde de la moelle est suivie par une analyse des aspirations de moelle à 3, 12, 20 25 et 30 semaines après transplantation.

3.8. Cytométrie de flux :

Le taux de transduction dans les différentes populations de cellules CD34⁺ a été déterminé par cytométrie de flux après marquage avec les anticorps spécifiques anti-humains suivants (toutes de eBioscience à moins que ça soit signalé ailleurs) : CD34-APC (clone 8G12, STEMCELL Technologies), CD38-PECy7 (clone HIT2), Thy1-PE (clone Bio5E10), CD45RA-APC780 (clone HI100) and CD49f-EF450 (clone eBioGoH3).

Pour l'analyse phénotypique des cellules humaines dérivées de moelle osseuse des souris transplantées, la cytométrie de flux a été réalisée sur les cellules fraîchement recueillies de la moelle. Les cellules sont alors traitées avec une solution de lyse des globules rouges (StemCell Technologies), lavées et incubées avec une solution bloquante (PBS avec 2% FBS, 5% de sérum humain, un anticorps anti CD16/CD32 un anticorps (2.4G2)). Les cellules sont ensuite marquées avec les anticorps spécifiques antihumains suivants : CD45-Alexa Fluor 700 (clone HI30, Biolegend), CD33-PE-CY7 (clone WM-53, eBioscience), CD19-PE (clone, HIB19, Biolegend), CD20-PE (clone L27, StemCell Technologies). Un minimum de 200000 cellules de moelle a été analysé. Un contrôle négatif a été établi avec des cellules provenant de souris non transplantées.

3.9. Détermination du nombre de copies du virus :

Des cellules CD34⁺ dérivées de sang de cordon (20 000 cellules) étaient transduites en présence ou en absence de UM171. Après la transduction les

cellules ont ensuite été lavées et cultivées pendant 10 jours avant de procéder à l'extraction de l'ADN génomique (DNAzol Reagent (Invitrogen)).

Le nombre de copies du virus par cellule rapporté à la moyenne, a été déterminé par multiplex TaqMan qPCR sur un appareil ABI 7900HT (Applied Biosystems) comme précédemment décrite [117]. Les vecteurs intégrés ont été déterminés par amplification de leurs transgènes GFP ou YFP en utilisant soit les paires d'amorces GFP_FW (5'- GTA GCG GCT GAA GCA CTG-3') et GFP_RV (5'-CTG CAC CAC CGG CAA-3') en combinaison avec un probe GFP (/56-FAM/CC ACC CTG A/Zen/C CTA CGG CGT G/3IABkFQ/) ou la paire d'amorce GFP/YFP2_FW (5'-GAA CCG CAT CGA GCT GAA) et GFP/YFP2_RV (5'-TGC TTG TCG GCC ATG ATA TAG-3') en combinaison avec un probe GFP/YFP2 (/56-FAM/ATCGACTTC/ZEN/AAGGAGGACGGCAAC/3IABkF). Les Ct values sont normalisés à la quantité d'ADN introduite par amplification du gène de référence PTBP2 en utilisant les amorces PTBP2_FW (5'-TCT CCA TTC CCT ATG TTC ATG C-3') et PTBP2_RV (5'-GTT CCC GCA GAA TGG TGA GGT G-3') et le probe PTBP2 (/5TET/AT GTT CCT C/Zen/G GAC CAA CTT G/3IABkFQ/). L'efficacité de la PCR a été déterminée par une série de dilution du plasmide contenant les séquences cible de GFP ou PTBP2. Le calcul du nombre moyen de copies du virus par cellule a ensuite été effectué suivant la méthode décrite par Pfaffl [118].

3.10. Analyse statistique :

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (erreur standard sur la moyenne) ou SD (écart type) ou en moyenne géométrique $\pm$ SD. Les différences entre les groupes ont été analysées en utilisant le test de student (pair ou impair selon le cas). * Indique une différence statistiquement significative $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

4. RESULTATS :

4.1. UM171 augmente le rendement et la transduction des cellules hématopoïétiques primitives après culture :

4.1.1. UM171 et non SR1 augmente la transduction et l'expansion des CSH :

Nos résultats ont montré que UM171 pouvait augmenter le taux transduction des cellules hématopoïétiques de par un facteur de 2 comparé au contrôle (DMSO) ($62 \pm 4\%$ versus $37 \pm 4\%$, $p=0.001$, Figure 6). Contrairement à UM171, la molécule SR1 testée dans les mêmes conditions, n'avait aucun effet sur le transfert de gène selon qu'elle soit seule ou associée à UM171 (Figure 6).

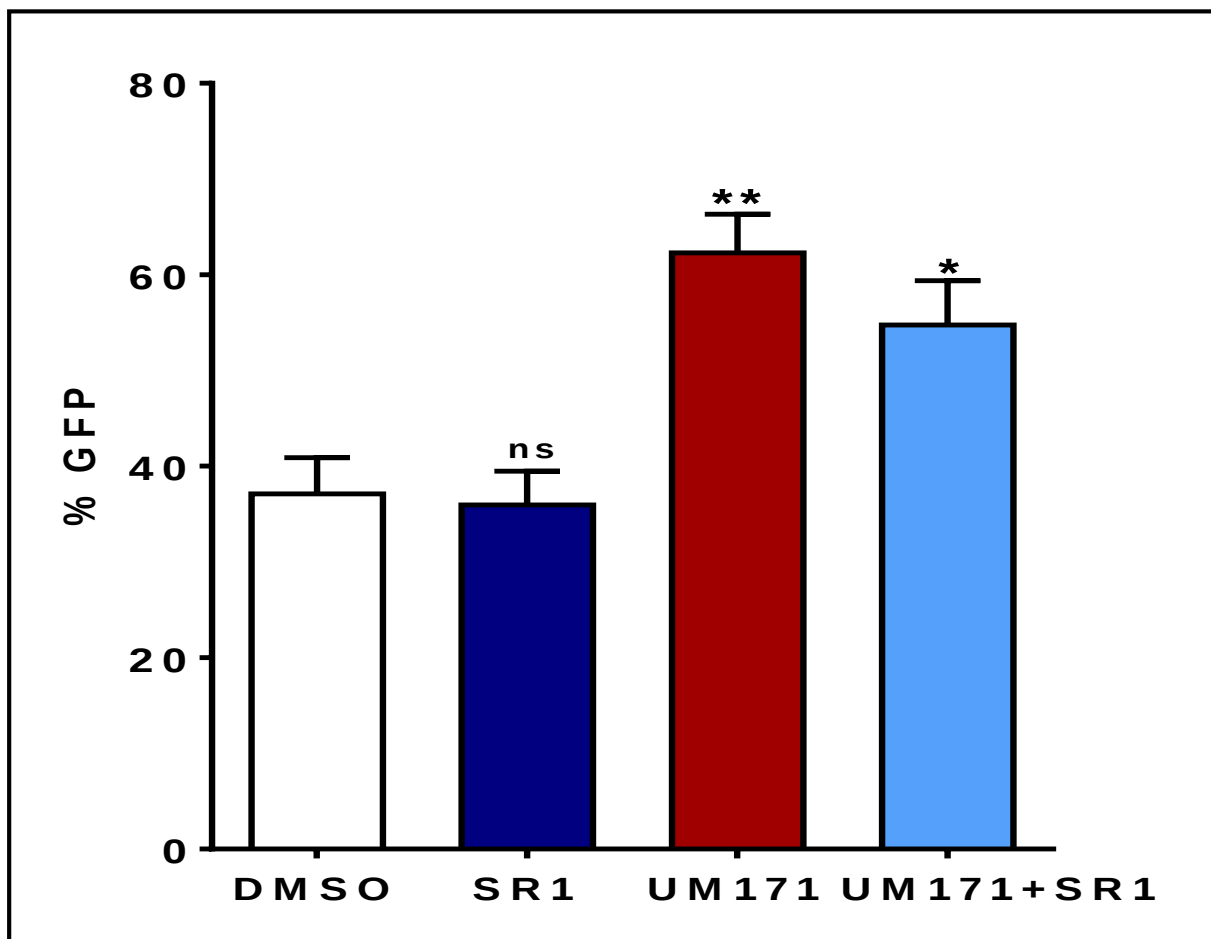


Figure 6 : Impact de UM171 et SR1 sur la transduction des CSH primitives

4.1.2. L'impact de UM171 sur la transduction et l'expansion des CSH est dose dépendante :

L'impact de UM171 sur la transduction des cellules souches hématopoïétiques était dose dépendante et atteignait un plateau lorsque le taux de transduction était multiplié par un facteur de 3 (Figure 7). Par ailleurs cette tendance se répercutait aussi sur le nombre de copies du virus par cellule qui était aussi multiplié par 2 en présence de UM171 (0.85 ± 0.1 versus 0.4 ± 0.04 , Figure 7). Il est important de noter que le plateau était atteint à une concentration de UM171 de 35nM/mL, correspondant à la concentration optimale de UM171 pour l'expansion *in vitro* des cellules souches hématopoïétiques [5].

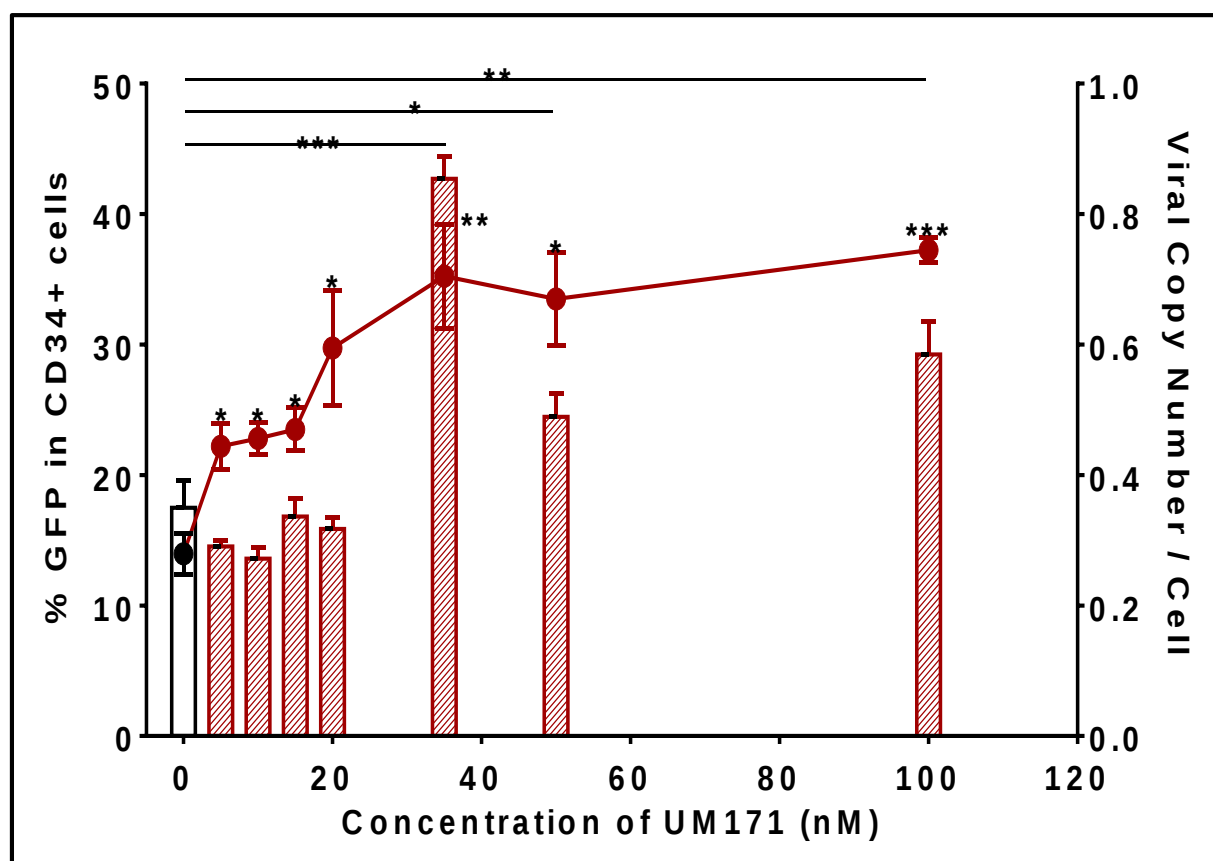


Figure 7 : Taux de transduction en fonction de la dose de M171

4.1.3. L'impact de UM171 sur la transduction ne dépend pas de la concentration de virus :

UM171 augmentait la transduction des cellules hématopoïétiques en présence de diverses concentrations de virus, allant de 10^5 à 10^9 particules virales /mL, MOI=0.5-5000) (Figure 8). Il en ressort qu'on pouvait utiliser nettement moins de particules virales en présence de UM171 pour atteindre les mêmes taux de transduction avec des doses élevées de particules virales en absence de UM171.

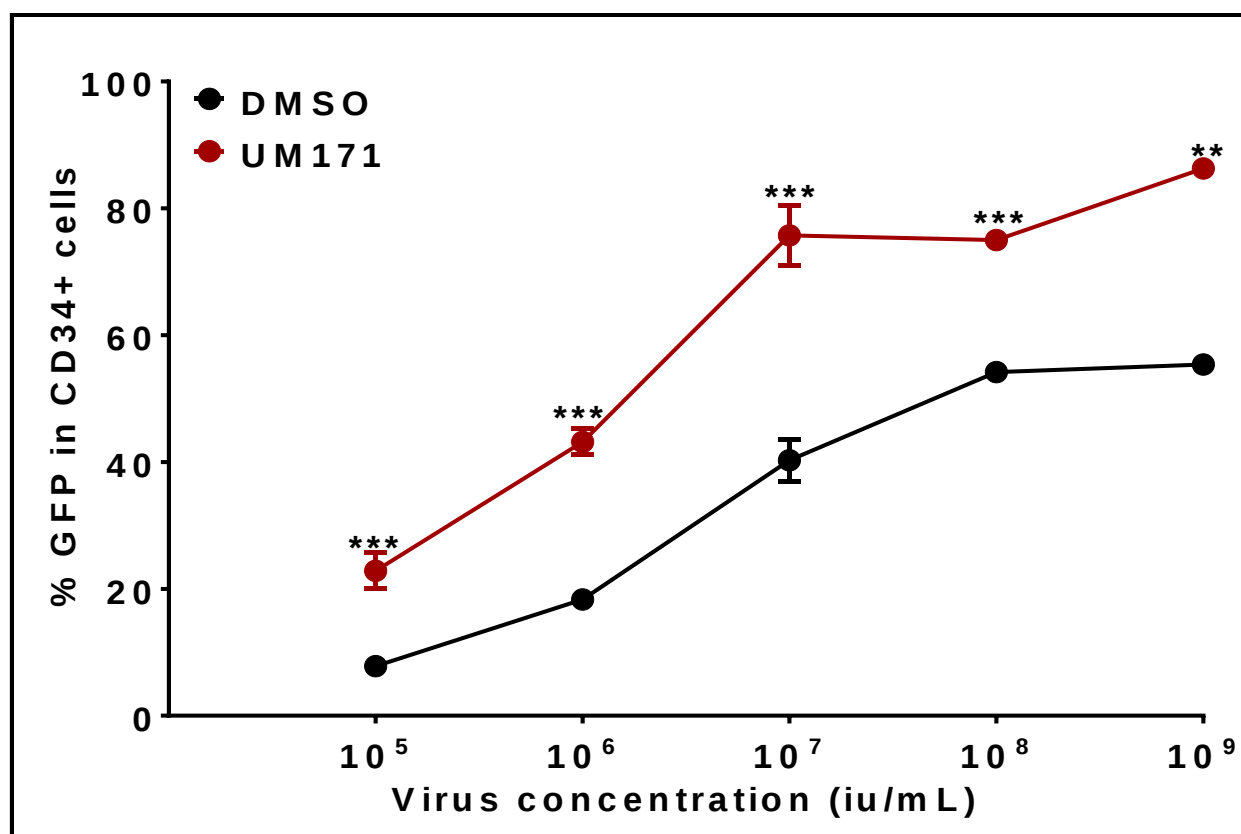


Figure 8 : Taux de transduction en fonction de la concentration de virus

4.1.4. L'impact de UM171 sur la transduction ne dépend pas du phénotype de la cellule hématopoïétique :

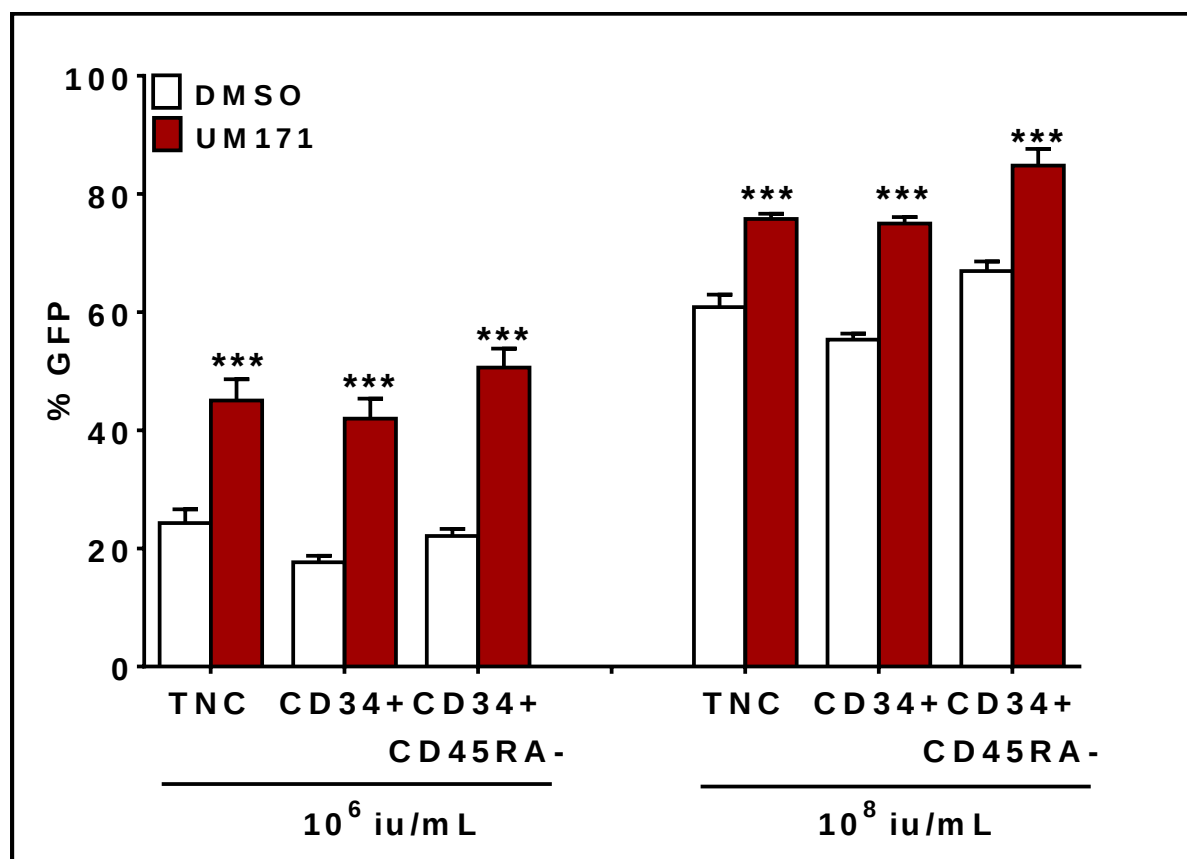


Figure 9 : Taux de transduction en fonction du type cellulaire.

L'augmentation de la transduction induite par UM171 pouvait aussi être étendue aux populations cellulaires les plus immatures notamment les cellules appartenant au phénotype CD34+CD45RA- ou encore CD34+CD38-CD45RA-CD90+CD49f+ et ceci avec différentes concentrations de virus (Figure 9).

4.1.5. UM171 Augmente l'expansion in vitro des CSH modifiées :

UM171 augmentait le nombre absolu de cellules hématopoïétiques obtenu à la fin de la culture (Figure 10). L'augmentation combinée de la transduction et du nombre de cellules recueillies à la fin de la culture, conduisait à une augmentation du nombre total de cellules transduites (Figure 10).

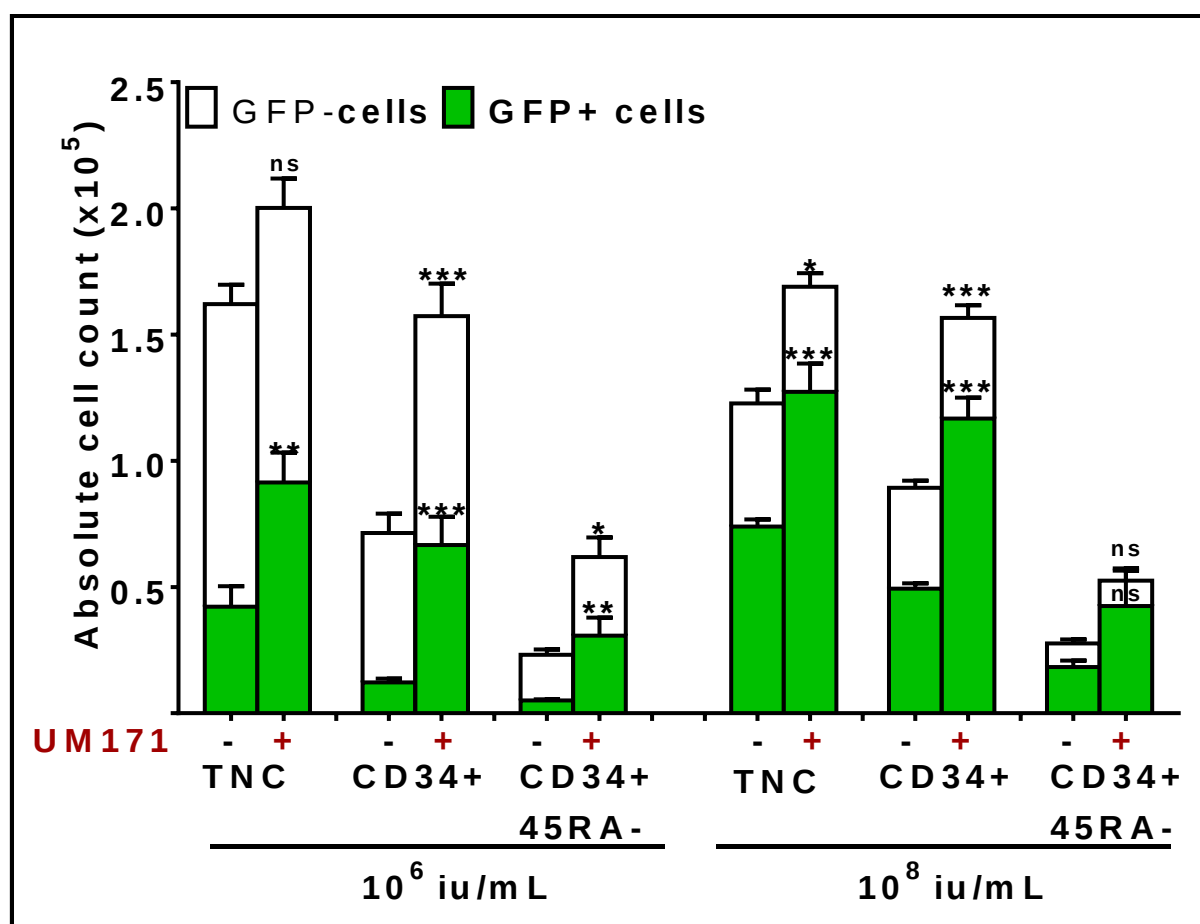


Figure 10 : UM171 augmente le nombre de cellules hématopoïétiques transduites.

4.2. UM171 augmente la transduction et l'expansion des CSH fonctionnelles :

4.2.1. UM171 augmente la prise de greffe des CSH fonctionnelles :

Trente (30) jours après la transplantation des CSH transduites en présence de UM171 ou non chez des souris ayant préalablement subi une irradiation corporelle totale, la prise de greffe était plus importante chez les souris transplantées avec les cellules transduites en présence de UM171 quel que soit la dose (UM171 ; 72.4 ± 0.2 , 39.1 ± 0.3 et $10.4 \pm 3\%$, vs DMSO ; $34.3 \pm 3\%$, $30.6 \pm 4\%$ et 2.2 ± 1 , pour les doses de 20,000, 4000 et 800 cellules par souris respectivement, Figure 11).

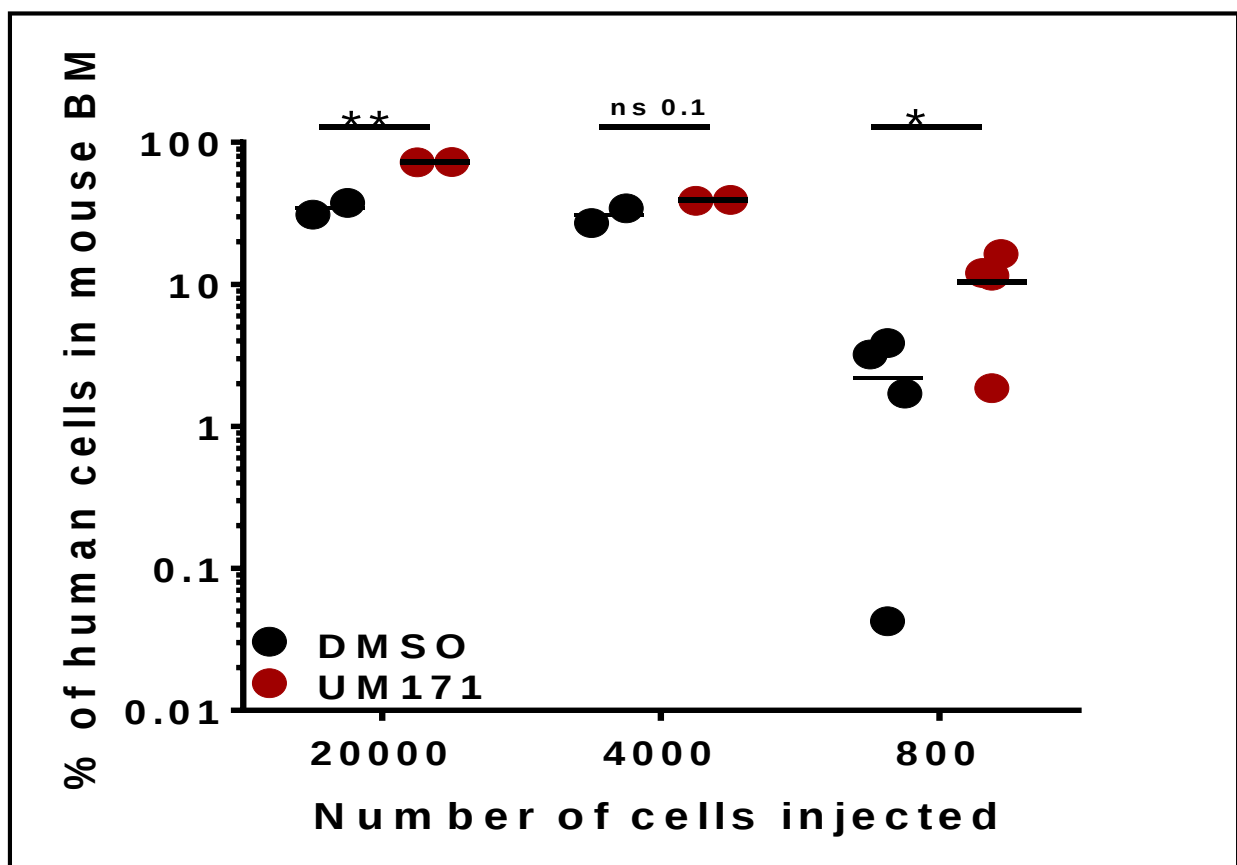


Figure 11 : Evolution de la prise de greffe après transplantation avec les CSH transduites

4.2.2. UM171 augmente la transduction des CSH fonctionnelles :

L'augmentation de la transduction notée *in vitro* sur les cellules hématopoïétiques était aussi observée *in vivo* sur les cellules souches hématopoïétiques fonctionnelles à travers une augmentation plus marquée des taux de transduction de CSH chez les souris transplantées avec des cellules préalablement traduites en présence de UM171.

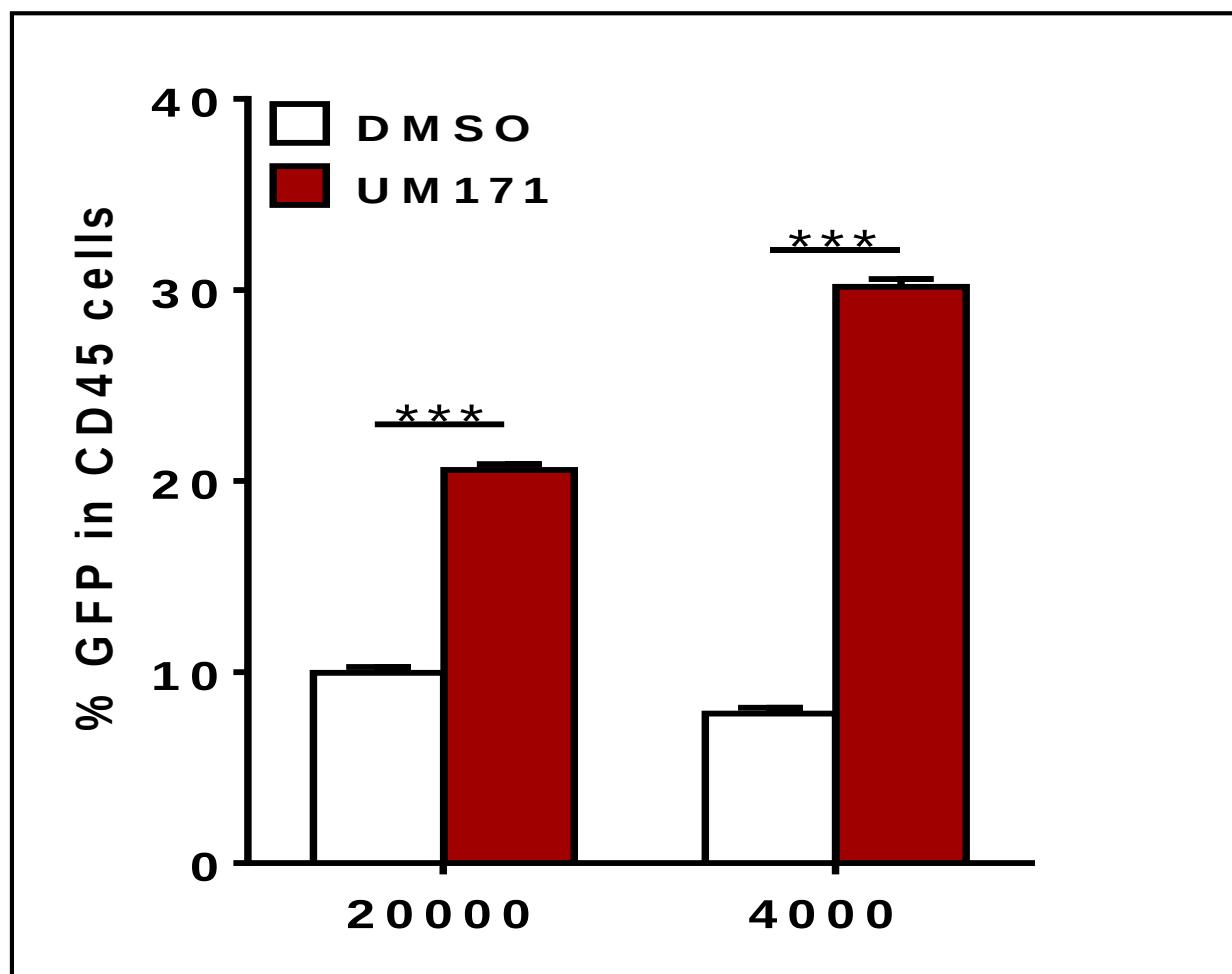


Figure 12 : Impact de UM171 sur la transduction des cellules CD45+ humaines.

4.2.3. L'augmentation de la transduction et de l'expansion des CSH induite par UM171 s'étend aux compartiments lymphoïde et myéloïde :

Cette augmentation était aussi observée sur la transduction et l'expansion des cellules des cellules lymphoïdes (Figure 13, gauche) et myéloïdes (Figure 13, droite).

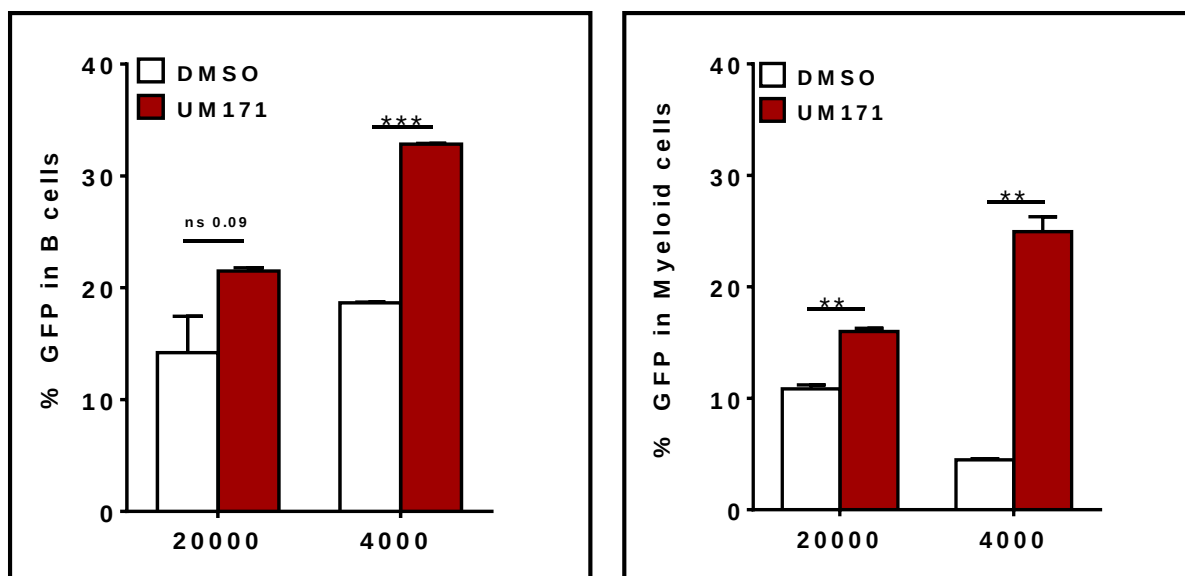


Figure 13 : Impact d'UM171 sur la transduction des cellules lymphoïdes CD20+CD19+ (à gauche) et CD33+ myéloïdes (à droite).

5. DISCUSSION :

Atteindre des taux élevés de transduction dans les cellules souches hématopoïétiques, dans des conditions de culture *in vitro* qui préservent leur intégrité demeure un défi à relever en pratique quotidienne en thérapie génique. Nous avons démontré que UM171 était capable de stimuler l'expansion *in vitro* des cellules capable de repeupler à long terme la moelle osseuse de souris irradiées [5]. Ici nous montrons qu'une brève exposition des cellules souches hématopoïétiques à UM171 augmentait de manière substantielle leur transduction lentiviral sans altérer leur potentiel souche. L'augmentation de ce transfert de gène médiée par UM171 était dose dépendante et se reflétait par ailleurs par une augmentation concomitante du nombre de copies du virus par cellule. Cette augmentation de la transduction des cellules souches était apparente sur une gamme variée de concentrations de virus. Ceci revêt un caractère particulier car ayant des répercussions financières non négligeables quant aux ressources financières engagés dans les protocoles de thérapie génique. En effet il était possible de diminuer sensiblement la quantité de virus (d'où la diminution du coût) nécessaire pour atteindre des taux de transductions efficaces en ajoutant seulement UM171 dans les milieux de cultures lors de la transduction. L'augmentation du transfert de gène était également étendue à toutes les sous populations de cellules hématopoïétiques fonctionnelles. Cette observation est d'une grande importance car les vraies cellules souches hématopoïétiques capable d'autorenouveau, de différenciation et de repeuplement à long terme des compartiments hématopoïétiques sont minoritairement comprises dans les sous-types de cellules les plus primitives [119]. UM171 ne compromettait pas l'intégrité des cellules souches *in vitro*, au contraire l'exposition à ce dernier entraînait une augmentation significative du nombre de cellules souches récupérables à la fin de la culture. De plus les expériences *in vivo* ont montré que UM171 était capable d'augmenter la prise de greffe et de maintenir des taux élevés de transduction dans les souris

transplantées. En comparant les progéniteurs et les cellules souches hématopoïétiques primitives, le taux de transduction était plus proéminent sur les cellules primitives capables de repopulation à long terme. Ceci pourrait être d'une importance capitale dans les protocoles cliniques car le taux de chimerisme est déterminant pour le succès d'une procédure de greffe de moelle [120].

CONCLUSION

Dans l'ensemble les résultats de nos différentes expériences ont des implications majeures en clinique humaine notamment en thérapie génique et en thérapie cellulaire. L'utilisation de UM171 comme additif de culture pendant la transduction lentivirale des cellules souches hématopoïétiques peut améliorer significativement la délivrance des gènes d'intérêt dans ces cellules cibles. On pourra ainsi utiliser des cultures *in vitro* de courtes durées et /ou des quantités minimales de particules virales par cellule pour atteindre des taux de transduction adéquats en accordance avec un nombre souhaité de copies du virus par cellule. Nos résultats encourageants en termes de sûreté de UM171 et la praticabilité de son utilisation pourraient ouvrir d'autres opportunités quant à son utilisation en clinique humaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deistand F. L, Fischer A. (2000).** « Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. » *Science* 288(5466): 669-72.
2. **Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncaroloand MG, Bordignon C (2002).** « Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. » *Science* 296(5577): 2410-3.
3. **Gaspar H.B, K.L. Parsley, S. Howe, D. King, K. C. Gilmour, J. Sinclair, G. Brouns, M. Schmidt, C. VonKalle, T. Barington, M. A. Jakobsen, H. O. Christensen, A. Al Ghonaïum, H. N. White, J. L.Smith, R. J. Levinsky, R. R. Ali, C. Kinnonand A. J. Thrasher (2004).** « Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. » *Lancet* 364(9452): 2181-7.
4. **Ott, M. G., M. Schmidt, K. Schwarzwaelder, S. Stein, U. Siler, U. Koehl, H. Glimm, K. Kuhlcke, A. Schilz, H. Kunkel, S. Naundorf, A. Brinkmann, A. Deichmann, M. Fischer, C. Ball, I. Pilz, C. Dunbar, Y.Du, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, U. Luthi, M. Hassan, A. J. Thrasher, D. Hoelzer, C. von Kalle, R. Segerand M. Grez (2006).** Correction of X-linked chronic granulomatous disease by genetherapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*.12: 401-9.

5. **Fares, I., J. Chagraoui, Y. Gareau, S. Gingras, R. Ruel, N. Mayotte, E. Csaszar, D. J. Knapp, P. Miller, M. Ngom, S. Imren, D. C. Roy, K. L. Watts, H. P. Kiem, R. Herrington, N. N. Iscove, R. K. Humphries, C. J. Eaves, S. Cohen, A. Marinier, P. W. Zandstra & G. Sauvageau (2014)** Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science*, 345, 1509-12.
6. **Zhang, Y., A. Satterlee and L. Huang (2012).** « *In vivo* gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? » *Mol Ther* 20(7): 1298-304.
7. **Nature, E. (2009).** « Gene therapy deserves a fresh chance. » *Nature* 461(7268): 1173.
8. **Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma and D. Trono (1996).** « *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. » *Science* 272(5259): 263-7.
9. **Dezzutti, C. S., Heneine, W., Boneva, R.S, Folks, T.M. (2007).** Retroviruses and associated human diseases. Hodder Arnold, London. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Virology.
10. **Pringle, C. R. (1999).** « Virus taxonomy-1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. » *Arch Virol* 144(2): 421-9.
11. **Girard-Gagnepain A, Amirache F, Costa C, Lévy C, Frecha C, Fusil F, Nègre D, Lavillette D, Cosset FL, Verhoeven E (2014)** Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood*. 2014 21; 124(8):1221-31.

12. **Williams, D. A., I. R. Lemischka, D. G. Nathan and R. C. Mulligan (1984).** « Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. » *Nature* 310(5977): 476-80.
13. **Dick, J. E., M. C. Magli, D. Huszar, R. A. Phillips and A. Bernstein (1985).** « Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W^v mice. » *Cell* 42(1): 71-9.
14. **Roe, T., T. C. Reynolds, G. Yu and P. O. Brown (1993).** « Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. » *Embo J* 12(5): 2099-108.
15. **Lewis, P. F. and M. Emerman (1994).** « Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. » *J Virol* 68(1): 510-6.
16. **Gelinas, R. E., M. A. Bender and A. D. Miller (1989a).** « Regulated expression of the human beta-globin gene after retroviral transfer into murine and human hematopoietic cells. » *Prog Clin Biol Res* 316B: 235-49.
17. **Gelinas, R. E., M. A. Bender, A. D. Miller and U. Novak (1989b).** « Long-term expression of the human beta-globin gene after retroviral transfer into pluripotent hematopoietic stem cells of the mouse. » *Adv Exp Med Biol* 271: 135-48.
18. **May, C., S. Rivella, J. Callegari, G. Heller, K. M. Gaensler, L. Luzzatto and M. Sadelain (2000).** "Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin." *Nature* 406(6791): 82-6.

19. **Pawliuk, R., K. A. Westerman, M. E. Fabry, E. Payen, R. Tighe, E. E. Bouhassira, S. A. Acharya, J. Ellis, I.M. London, C. J. Eaves, R. K. Humphries, Y. Beuzard, R. L. Nageland P. Leboulch (2001).** "Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy." *Science* 294 (5550): 2368-71.
20. **Malim, M. H. and M. Emerman (2008).** « HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. » *Cell Host Microbe* 3(6): 388-98.
21. **Vogt, V. M. (1997).** « Retroviral Virions and Genomes. »
22. **Wong, L. F., M. Azzouz, L. E. Walmsley, Z. Askham, F. J. Wilkes, K. A. Mitrophanous, S. M. Kingsman and N.D. Mazarakis (2004).** « Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system. » *Mol Ther* 9(1): 101-11.
23. **Azzouz, M. (2006).** « Gene Therapy for ALS: progress and prospects. » *Biochim Biophys Acta* 1762(11-12): 1122-7.
24. **Kato, S., K. Kobayashi, K. Inoue, M. Kuramochi, T. Okada, H. Yaginuma, K. Morimoto, T. Shimada, M. Takada and K. Kobayashi (2011).** « A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. » *Hum Gene Ther* 22(2): 197-206.
25. **Mazarakis, N. D., M. Azzouz, J. B. Rohll, F. M. Ellard, F. J. Wilkes, A. L. Olsen, E. E. Carter, R. D. Barber, D. F. Baban, S. M. Kingsman, A. J. Kingsman, K. O'Malley and K. A. Mitrophanous (2001).** "Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery." *Hum Mol Genet* 10 (19): 2109-21.

26. **Landau, N. R., K. A. Page and D. R. Littman (1991).** « Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. » *J Virol* 65(1): 162-9. **Langlet-Bertin, B., C. Leborgne, D. Scherman, B. Bechinger, A. J. Mason and A. Kichler (2010).** « Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. » *Pharm. Res.* 27(7):1426-36.
27. **Reiser, J., G. Harmison, S. Kluepfel-Stahl, R. O. Brady, S. Karlsson and M. Schubert (1996).** "Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26): 15266-71.
28. **Stitz, J., C. J. Buchholz, M. Engelstadter, W. Uckert, U. Bloemer, I. Schmitt and K. Cichutek (2000).** "Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1." *Virology* 273(1): 16-20.
29. **Christodoulopoulos, I. and P. M. Cannon (2001).** « Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. » *J. Virol.* 75(9): 4129-38.
30. **Medina, M. F., G. P. Kobinger, J. Rux, M. Gasmi, D. J. Looney, P. Bates and J. M. Wilson (2003).** "Lentiviral vectors pseudotyped with minimal filovirus envelopes increased gene transfer in murine lung." *Mol Ther* 8(5): 777-89.
31. **Bartosch, B., J. Dubuisson and F. L. Cosset (2003).** « Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. » *J Exp Med* 197(5): 633-42.

32. **Kang, Y., L. Xie, D. T. Tran, C. S. Stein, M. Hickey, B. L. Davidson and P. B. McCray, Jr. (2005).** "Persistent expression of factor VIII in vivo following nonprimate lentiviral gene transfer." *Blood* 106(5): 1552-8.
33. **Frecha, C., C. Costa, D. Negre, E. Gauthier, S. J. Russell, F. L. Cosset and E. Verhoeven (2008).** « Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. » *Blood* 112(13): 4843-52.
34. **Zhou, Q., I. C. Schneider, M. Gallet, S. Kneissland C. J. Buchholz (2011).** « Resting lymphocyte transduction with measles virus glycoprotein pseudotyped lentiviral vectors relies on CD46 and SLAMF7. » *Virology* 413(2): 149-52.
35. **Frecha, C., C. Levy, F. L. Cosset and E. Verhoeven (2012).** « Advances in the field of lentivector-based transduction of T and B lymphocytes for gene therapy. » *Mol Ther* 18(10): 1748-57.
36. **Kneissl, S., T. Abel, A. Rasbach, J. Brynza, J. Schneider-Schaulies and C. J. Buchholz (2012).** « Measles virus glycoprotein-based lentiviral targeting vectors that avoid neutralizing antibodies. » *PloS One* 7(10): e46667.
37. **Hanawa, H., P. F. Kelly, A. C. Nathwani, D. A. Persons, J. A. Vandergriff, P. Hargrove, E. F. Vanin and A.W. Nienhuis (2002).** « Comparison of various envelope proteins for their ability to pseudotype lentiviral vectors and transduce primitive hematopoietic cells from human blood. » *Mol Ther* 5 (3): 242-51.

38. **Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand, D. Trono and F. L. Cosset (2002).** "Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34⁺ cells derived from human and nonhuman primates." *Blood* 100(3): 823-32.

39. **Van der Loo, J. C., B. L. Liu, A. I. Goldman, S. M. Buckley and K. S. Chudimsky (2002).** « Optimization of gene transfer into primitive human hematopoietic cells of granulocyte-colony stimulating factor-mobilized peripheral blood using low-dose cytokines and comparison of a gibbon ape leukemia virus versus an RD114-pseudotyped retroviral vector. » *Hum Gene Ther* 13(11):1317-30.

40. **Zhang, X. Y., V. F. La Russa and J. Reiser (2004).** « Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. » *J Virol* 78(3): 1219-29.

41. **Kavanaugh, M. P. and D. Kabat (1996).** « Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family. » *Kidney Int* 49(4): 959-63.

42. **Matrai, J., M. K. Chuah and T. VandenDriessche (2010).** « Recent advances in lentiviral vector development and applications. » *Mol Ther* 18(3): 477-90.

43. **Sinn, P. L., S. L. Sauter and P. B. McCray, Jr. (2005).** « Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. » *Gene Ther* 12(14): 1089-98.

44. **Lu, X., L. Humeau, V. Slepushkin, G. Binder, Q. Yu, T. Slepushkina, Z. Chen, R. Merling, B. Davis, Y. N. Chang and B. Dropulic (2004).** « Safe two-plasmid production for the first clinical lentivirus vector that achieves >99% transduction in primary cells using a one-step protocol. » *J GeneMed* 6(9): 963-73.
45. **Manilla, P., T. Rebello, C. Afable, X. Lu, V. Slepushkin, L. M. Humeau, K. Schonely, Y. Ni, G. K. Binder, B. L. Levine, R. R. MacGregor, C. H. June and B. Dropulic (2005).** « Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. » *Hum. Gene Ther.* 16(1): 17-25.
46. **Kutner, R. H., X. Y. Zhang and J. Reiser (2009b).** « Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. » *Nat. Protoc.* 4(4): 495-505.
47. **Rio, D. C., S. G. Clark and R. Tjian (1985).** « A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction. » *Science* 227(4682): 23-8.
48. **DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller and M. P. Calos (1987).** « Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. » *Mol Cell Biol* 7(1): 379-87.
49. **Van Craenenbroeck, K., P. Vanhoenacker and G. Haegeman (2000).** « Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. » *Eur J Biochem* 267(18): 5665-78.

50. **Gama-Norton, L., L. Botezatu, S. Herrmann, M. Schweizer, P. M. Alves, H. Hauser and D. Wirth (2011).** "Lentivirus production is influenced by SV40 large T-antigen and chromosomal integration of the vector in HEK293 cells." *Hum Gene Ther* 22(10): 1269-79.
51. **Segura, M. M., A. Kamen and A. Garnier (2006).** « Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. » *Biotechnol Adv* 24(3): 321-37.
52. **Ansorge, S., S. Lanthier, J. Transfiguracion, Y. Durocher, O. Henry and A. Kamen (2009).** « Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. » *J Gene Med* 11(10): 868-76.
53. **Pluta, K. and M. M. Kacprzak (2009).** « Use of HIV as a gene transfer vector. » *Acta Biochim Pol* 56(4):531-95.
54. **Diaz, R. M., A. Bateman, L. Emiliusen, A. Fielding, D. Trono, S. J. Russell and R. G. Vile (2000).** « A lentiviral vector expressing a fusogenic glycoprotein for cancer gene therapy. » *Gene Ther* 7(19): 1656-63.
55. **Kutner, R. H., S. Puthli, M. P. Marino and J. Reiser (2009a).** « Simplified production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors using HYPERFlask vessels and anion exchange membrane chromatography. » *BMC Biotechnol* 9: 10.
56. **Segura, M. M., A. Garnier, Y. Durocher, S. Ansorge and A. Kamen (2010).** « New protocol for lentiviral vector mass production. » *Methods Mol. Biol.* 614: 39-52.

57. **Lesch, H. P., A. Laitinen, C. Peixoto, T. Vicente, K. E. Makkonen, L. Laitinen, J. T. Pikkarainen, H. Samaranayake, P. M. Alves, M. J. Carrondo, S. Yla-Herttuala and K. J. Airene (2011).** "Production and purification of lentiviral vectors generated in 293T suspension cells with baculoviral vectors." *Gene Ther* 18(6): 531-8.

58. **Merten, O. W., S. Charrier, N. Laroudie, S. Fauchille, C. Dugue, C. Jenny, M. Audit, M. A. Zanta-Boussif, H. Chautard, M. Radrizzani, G. Vallanti, L. Naldini, P. Noguez-Hellin and A. Galy (2011).** « Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. » *Hum. Gene Ther.* 22(3): 343-56.

59. **Witting, S. R., L. H. Li, A. Jasti, C. Allen, K. Cornetta, J. Brady, R. Shivakumar and M. V. Peshwa (2012).** "Efficient large volume lentiviral vector production using flow electroporation." *Hum Gene Ther* 23(2): 243-9.

60. **Kuroda, H., M. P. Marino, R. H. Kutner and J. Reiser (2011).** « Production of lentiviral vectors in protein-free media. » *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 26: Unit 26 8.

61. **Tiscornia, G., O. Singer and I. M. Verma (2006).** « Production and purification of lentiviral vectors. » *Nat Protoc* 1(1): 241-5.

62. **Yacoub Al, N., M. Romanowska, N. Haritonova and J. Foerster (2007).** « Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. » *J Gene Med* 9(7): 579-84.

63. **Broussau, S., N. Jabbour, G. Lachapelle, Y. Durocher, R. Tom, J. Transfiguracion, R. Gilbertand B. Massie (2008).** « Inducible packaging cells for large-scale production of lentiviral vectors inserum-free suspension culture. » *Mol. Ther.* 16(3): 500-7.
64. **Cockrell, A. S., H. Ma, K. Fu, T. J. McCownand T. Kafri (2006).** « A trans-lentiviral packaging cell line forhigh-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors. » *Mol Ther* 14(2): 276-84.
65. **Ghani, K., S. Cottin, A. Kamenand M. Caruso (2007).** « Generation of a high-titer packaging cell line forthe production of retroviral vectors in suspension and serum-free media. » *Gene Ther* 14(24):1705-11.
66. **Stewart, H. J., L. Fong-Wong, I. Strickland, D. Chipchase, M. Kelleher, L. Stevenson, V. Thoree, J.McCarthy, G. S. Ralph, K. A. Mitrophanousand P. A. Radcliffe (2011).** « A stable producer cellline for the manufacture of a lentiviral vector for gene therapy of Parkinson's disease. » *Hum.Gene Ther.* 22(3): 357-69.
67. **Stewart, H. J., M. A. Leroux-Carlucci, C. J. Sion, K. A. Mitrophanousand P. A. Radcliffe (2009).**"Development of inducible EIAV-based lentiviral vector packaging and producer cell lines."*Gene Ther* 16(6): 805-14.
68. **Lee, C. L., M. Chou, B. Dai, L. Xiaoand P. Wang (2012).** « Construction of stable producer cells to makehigh-titer lentiviral vectors for dendritic cell-based vaccination. » *Biotechnol Bioeng* 109(6):1551-60.

69. **Greene, M. R., T. Lockety, P. K. Mehta, Y. S. Kim, P. W. Eldridge, J. T. Gray and B. P. Sorrentino (2012).** "Transduction of human CD34+ repopulating cells with a self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 produced at clinical scale by a stable cell line." *Hum Gene Ther Methods* 23(5): 297-308.

70. **Stornaiuolo, A., B. Piovani, S. Bossi, E. Zucchelli, S. Corna, F. Salvatori, F. Mavilio, C. Bordignon, G. Rizzardi and C. Bovolenta (2013).** « RD2-MolPack-Chim3, a packaging cell line for stable production of lentiviral vectors for anti-HIV gene therapy. » *Hum Gene Ther Methods*.

71. **Yoder, M. C. and D. A. Williams (1995).** « Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. » *Exp Hematol* 23(9): 961-7.

72. **Malech, H. L., P. B. Maples, N. Whiting-Theobald, G. F. Linton, S. Sekhsaria, S. J. Vowells, F. Li, J. A. Miller, E. DeCarlo, S. M. Holland, S. F. Leitman, C. S. Carter, R. E. Butz, E. J. Read, T. A. Fleisher, R. D. Schneiderman, D. E. Van Epps, S. K. Spratt, C. A. Maack, J. A. Rokovich, L. K. Cohen and J. I. Gallin (1997).** « Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (22): 12133-8.

73. **Hacein-Bey-Abina, S., A. Garrigue, G. P. Wang, J. Soulier, A. Lim, E. Morillon, E. Clappier, L. Caccavelli, E. Delabesse, K. Beldjord, V. Asnafi, E. MacIntyre, L. Dal Cortivo, I. Radford, N. Brousse, F. Sigaux, D. Moshous, J. Hauer, A. Borkhardt, B. H. Belohradsky, U. Wintergerst, M. C. Velez, L. Leiva, R. Sorensen, N. Wulffraat, S. Blanche, F. D. Bushman, A. Fischer and M. Cavazzana-Calvo (2008).** « Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. » *J Clin Invest* 118(9): 3132-42.

74. **Howe, S. J., M. R. Mansour, K. Schwarzwaelder, C. Bartholomae, M. Hubank, H. Kempinski, M. H. Brugman, K. Pike-Overzet, S. J. Chatters, D. de Ridder, K. C. Gilmour, S. Adams, S. I. Thornhill, K. L. Parsley, F. J. Staal, R. E. Gale, D. C. Linch, J. Bayford, L. Brown, M. Quaye, C. Kinnon, P. Ancliff, D. K. Webb, M. Schmidt, C. von Kalle, H. B. Gasparand A. J. Thrasher (2008).**"Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients." *J Clin Invest* 118(9): 3143-50.
75. **Aiuti, A., F. Cattaneo, S. Galimberti, U. Benninghoff, B. Cassani, L. Callegaro, S. Scaramuzza, G. Andolfi, M. Mirolo, I. Brigida, A. Tabucchi, F. Carlucci, M. Eibl, M. Aker, S. Slavin, H. Al-Mousa, A. Al Ghonaium, A. Ferster, A. Duppenhaler, L. Notarangelo, U. Wintergerst, R. H. Buckley, M. Bregni, S. Markt, M. G. Valsecchi, P. Rossi, F. Ciceri, R. Miniero, C. Bordignon and M. G. Roncarolo (2009).**« Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. » *N Engl J Med* 360(5): 447-58.
76. **Hacein-Bey-Abina, S., J. Hauer, A. Lim, C. Picard, G. P. Wang, C. C. Berry, C. Martinache, F. Rieux Laucat, S. Latour, B. H. Belohradsky, L. Leiva, R. Sorensen, M. Debre, J. L. Casanova, S. Blanche, A. Durandy, F. D. Bushman, A. Fischer and M. Cavazzana-Calvo (2010).**« Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. » *N Engl J Med* 363(4): 355-64.
77. **Kang, E. M., U. Choi, N. Theobald, G. Linton, D. A. Long Priel, D. Kuhns and H. L. Malech (2010).**"Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils." *Blood* 115(4): 783-91.

78. **Stein, S., M. G. Ott, S. Schultze-Strasser, A. Jauch, B. Burwinkel, A. Kinner, M. Schmidt, A. Kramer, J. Schwable, H. Glimm, U. Koehl, C. Preiss, C. Ball, H. Martin, G. Gohring, K. Schwarzwaelder, W.K. Hofmann, K. Karakaya, S. Tchatchou, R. Yang, P. Reinecke, K. Kuhlcke, B. Schlegelberger, A.J. Thrasher, D. Hoelzer, R. Seger, C. von Kalle and M. Grez (2010).** « Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. » *Nat Med* 16(2): 198-204.

79. **Gaspar, H. B., S. Cooray, K. C. Gilmour, K. L. Parsley, F. Zhang, S. Adams, E. Bjorkegren, J. Bayford, L. Brown, E. G. Davies, P. Veys, L. Fairbanks, V. Bordon, T. Petropoulou, C. Kinnon and A. J. Thrasher (2011b).** « Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. » *Sci Transl Med* 3(97): 97ra80.

80. **Kang, H. J., C. C. Bartholomae, A. Paruzynski, A. Arens, S. Kim, S. S. Yu, Y. Hong, C. W. Joo, N. K. Yoon, J. W. Rhim, J. G. Kim, C. Von Kalle, M. Schmidt, S. Kim and H. S. Ahn (2011).** « Retroviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease: results from phase I/II trial. » *Mol Ther* 19 (11): 2092-101.

81. **Mastaglio, S., M. T. Stanghellini, C. Bordignon, A. Bondanza, F. Ciceri and C. Bonini (2010).** « Progress and prospects: graft-versus-host disease. » *Gene Ther* 17(11): 1309-17.

82. **Miyoshi, H. (2004).** « Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. » *Methods Mol Biol* 246: 429-38.

83. **Galy, A. and A. J. Thrasher (2011).** « Gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. » *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 11(6): 545-50.
84. **Aiuti, A., R. Bacchetta, R. Seger, A. Villa and M. Cavazzana-Calvo (2012).** « Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 2. » *Curr Opin Immunol* 24(5): 585-91.
85. **Rivat, C., G. Santilli, H. B. Gaspar and A. J. Thrasher (2012).** « Gene therapy for primary immunodeficiencies. » *Hum Gene Ther* 23(7): 668-75.
86. **Galy, A., M. G. Roncarolo and A. J. Thrasher (2008).** « Development of lentiviral gene therapy for Wiskott Aldrich syndrome. » *Expert Opin Biol Ther* 8(2): 181-90.
87. **Ochs, H. D. and A. J. Thrasher (2006).** « The Wiskott-Aldrich syndrome. » *J Allergy Clin Immunol* 117(4): 725-38; quiz 739.
88. **Dupre, L., F. Marangoni, S. Scaramuzza, S. Trifari, R. J. Hernandez, A. Aiuti, L. Naldini and M. G. Roncarolo (2006).** « Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. » *Hum Gene Ther* 17(3): 303-13.
89. **Charrier, S., L. Dupre, S. Scaramuzza, L. Jeanson-Leh, M. P. Blundell, O. Danos, F. Cattaneo, A. Aiuti, R. Eckenberg, A. J. Thrasher, M. G. Roncarolo and A. Galy (2007).** « Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. » *Gene Ther* 14(5): 415-28.
90. **Mantovani, J., S. Charrier, R. Eckenberg, W. Saurin, O. Danos, J. Perea and A. Galy (2009).** « Diverse genomic integration of a lentiviral vector developed for the treatment of Wiskott-Aldrich syndrome. » *J Gene Med* 11(8): 645-54.

91. **Aiuti, A., L. Biasco, S. Scaramuzza, F. Ferrua, M. P. Cicalese, C. Baricordi, F. Dionisio, A. Calabria, S. Giannelli, M. C. Castiello, M. Bosticardo, C. Evangelio, A. Assanelli, M. Casiraghi, S. Di Nunzio, L. Callegaro, C. Benati, P. Rizzardi, D. Pellin, C. Di Serio et al. (2013).** « Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. » *Science* 341(6148):
92. **Santilli, G., E. Almarza, C. Brendel, U. Choi, C. Beilin, M. P. Blundell, S. Haria, K. L. Parsley, C. Kinnon, H. L. Malech, J. A. Bueren, M. Grezand A. J. Thrasher (2011).** « Biochemical correction of XCGD by a novel chimeric promoter regulating high levels of transgene expression in myeloid cells. » *Mol Ther* 19(1): 122-32.
93. **Cavazzana-Calvo, M., E. Payen, O. Negre, G. Wang, K. Hehir, F. Fusil, J. Down, M. Denaro, T. Brady, K. Westerman, R. Cavallesco, B. Gillet-Legrand, L. Caccavelli, R. Sgarra, L. Maouche-Chretien, F. Bernaudin, R. Girot, R. Dorazio, G. J. Mulder, A. Polack, A. Bank, J. Soulier, J. Larghero, N. Kabbara, B. Dalle, B. Gourmel, G. Socie, S. Chretien, N. Cartier, P. Aubourg, A. Fischer, K. Cornetta, F. Galacteros, Y. Beuzard, E. Gluckman, F. Bushman, S. Hacein-Bey-Abina and P. Leboulch (2010).** « Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. » *Nature* 467(7313): 318-22.
94. **Payen, E. & P. Leboulch (2012)** Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the beta-hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 276-83.

95. **Negre, O., A. V. Eggimann, Y. Beuzard, J. A. Ribeil, P. Bourget, S. Borwornpinyo, S. Hongeng, S. Hacein-Bey, M. Cavazzana, P. Leboulch & E. Payen (2016)** Gene Therapy of the beta-Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the beta(A(T87Q))-Globin Gene. *Hum Gene Ther*, 27, 148-65.
96. **De Dreuzy, E., K. Bhukhai, P. Leboulch & E. Payen (2016)** Current and future alternative therapies for beta-thalassemia major. *Biomed J*, 39, 24-38.
97. **Larochelle, A. and C. E. Dunbar (2004).** « Genetic manipulation of hematopoietic stem cells. » *Semin Hematol* 41(4): 257-71.
98. **Moore, K. A., F. A. Fletcher, D. K. Villalon, A. E. Utterand J. W. Belmont (1990).** « Human adenosinedeaminase expression in mice. » *Blood* 75(10): 2085-92.
99. **Einerhand, M. P., T. A. Bakx, A. Kuklerand D. Valerio (1993).** « Factors affecting the transduction of pluripotent hematopoietic stem cells: long-term expression of a human adenosinedeaminase gene in mice. » *Blood* 81(1): 254-63.
100. **Van Beusechem, V. W., A. Kukler, P. J. Heidtand D. Valerio (1992).** « Long-term expression of human adenosine deaminase in rhesus monkeys transplanted with retrovirus-infected bone-marrow cells. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16): 7640-4.
101. **Sorgi, F. L., S. Bhattacharyaand L. Huang (1997).** « Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. » *Gene Ther* 4(9): 961-8.

102. Schuening, F. G., K. Kawahara, A. D. Miller, R. To, S. Goehle, D. Stewart, K. Mullally, L. Fisher, T. C. Graham, F. R. Appelbaum and et al. (1991). « Retrovirus-mediated gene transduction into long-term repopulating marrow cells of dogs. » *Blood* 78(10): 2568-76.
103. Lanuti, M., C. E. Kouri, S. Force, M. Chang, K. Amin, K. Xu, I. Blair, L. Kaiser and S. Albelda (1999). « Use of protamine to augment adenovirus-mediated cancer gene therapy. » *Gene Ther* 6(9): 1600-10.
104. Cartier, N., S. Hacein-Bey-Abina, C. C. Bartholomae, G. Veres, M. Schmidt, I. Kutschera, M. Vidaud, U. Abel, L. Dal-Cortivo, L. Caccavelli, N. Mahlaoui, V. Kiermer, D. Mittelstaedt, C. Bellesme, N. Lahlou, F. Lefrere, S. Blanche, M. Audit, E. Payen, P. Leboulch, B. l'Homme, P. Bougneres, C. Von Kalle, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo and P. Aubourg (2009). « Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. » *Science* 326(5954):818-23.
105. Moritz, T., P. Dutt, X. Xiao, D. Carstanjen, T. Vik, H. Hanenberg and D. A. Williams (1996). « Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. » *Blood* 88(3):855-62.
106. Moritz, T., V. P. Patel and D. A. Williams (1994). « Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. » *J. Clin. Invest.* 93(4):1451-7.
107. Kimizuka, F., Y. Taguchi, Y. Ohdate, Y. Kawase, T. Shimojo, K. Hashino, I. Kato, K. Sekiguchi and K. Titani (1991). « Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. » *J Biochem* 110(2): 284-91.

108. **Brentjens, R. J., M. L. Davila, I. Riviere, J. Park, X. Wang, L. G. Cowell, S. Bartido, J. Stefanski, C. Taylor, M. Olszewska, O. Borquez-Ojeda, J. Qu, T. Wasielewska, Q. He, Y. Bernal, I. V. Rijo, C. Hedvat, R. Kobos, K. Curran, P. Steinherz, J. Jurcic, T. Rosenblat, P. Maslak, M. Frattini and M. Sadelain (2013).** « CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adult's with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. » *Sci Transl Med* 5(177): 177ra38.

109. **Pollok, K. E. and D. A. Williams (1999).** « Facilitation of retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem and progenitor cells and peripheral blood T-lymphocytes utilizing recombinant fibronectin fragments. » *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1(5): 595-604.

110. **Hanenberg, H., K. Hashino, H. Konishi, R. A. Hock, I. Kato and D. A. Williams (1997).** « Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. » *Hum Gene Ther* 8(18): 2193-206.

111. **Miller, M. D., C. M. Farnet and F. D. Bushman (1997).** « Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. » *J Virol* 71(7): 5382-90.

112. **Podda, S., M. Ward, A. Himelstein, C. Richardson, E. de la Flor-Weiss, L. Smith, M. Gottesman, I. Pastan and A. Bank (1992).** « Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene into live mice. » *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9676-80.

113. **Santoni de Sio, F. R., P. Cascio, A. Zingale, M. Gasparini and L. Naldini (2006).** « Proteasome activity restricts lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and is down-regulated by cytokines that enhance transduction. » *Blood* 107(11): 4257-65.

114. **Santoni de Sio, F. R., A. Gritti, P. Cascio, M. Neri, M. Sampaolesi, C. Galli, J. Lubanand L. Naldini (2008).** « Lentiviral vector gene transfer is limited by the proteasome at postentry steps in various types of stem cells. » *Stem Cells* 26(8): 2142-52.
115. **Wang, C.X., et al.,** Rapamycin relieves lentiviral vector transduction resistance in human and mouse hematopoietic stem cells. *Blood*, 2014. 124(6): p. 913-23.
116. **Logan, A. C., S. J. Nightingale, D. L. Haas, G. J. Cho, K. A. Pepperand D. B. Kohn (2004).** « Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. » *Hum Gene Ther* 15(10): 976-88.
117. **Maetzig, T., et al.,** All-in-One inducible lentiviral vector systems based on drug controlled FLP recombinase. *Biomaterials*, 2014. 35(14): p. 4345-56.
118. **Pfaffl, M.W.,** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(9): p. e45.
119. **Notta, F., S. Doulatov, E. Laurenti, A. Poeppl, I. Jurisica & J. E. Dick (2011)** Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*, 333, 218-21.
120. **Naldini, L., D. Trono, and I.M. Verma,** Lentiviral vectors, two decades later. *Science*, 2016. 353(6304): p. 1101-2.

UM171 EST UNE MOLECULE CAPABLE D'AUGMENTER LE TRANSFERT DE GENE A L'INTERIEUR DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES HUMAINES

RESUME

INTRODUCTION : La thérapie génique hématopoïétique est souvent limitée par un faible taux de transduction et des pertes en cellules souches lors des manipulations *in vitro*. Nous avons identifié, par criblage à haut débit d'une bibliothèque de plus de cinq milles (5000) molécules, UM171, une petite molécule capable de stimuler l'expansion *in vitro* des cellules souches hématopoïétiques. Dans ce présent travail nous explorons l'impact de UM171 sur la transduction lentivirale des cellules souches hématopoïétiques humaines.

MATERIEL ET METHODE : Pour explorer la capacité de UM171 à augmenter l'efficacité du transfert de gène à l'intérieur des cellules souches hématopoïétiques, des cellules CD34+ dérivées de sang de cordon sont prestimulées pendant 16 heures en présence ou en absence de UM171. Immédiatement après la prestimulation, les cellules provenant des différentes conditions de culture sont exposées pendant 6 heures à un vecteur lentiviral. Après cette étape de transduction, les cellules étaient cultivées pendant 3 jours supplémentaires et le transfert de gène à l'intérieur des différentes sous-populations de cellules hématopoïétiques a été évalué par cytométrie de flux. Dans certaines expériences les cellules ont été récoltées et transplantées à des souris irradiées pour évaluer le potentiel hématopoïétique des cellules ainsi transduites.

RESULTATS : L'utilisation de UM171 (35nM) a conduit à une augmentation substantielle ($\sim 2X$, $62 \pm 4\%$ versus $37 \pm 4\%$, $p=0.001$) du transfert de gène à l'intérieur des cellules souches hématopoïétiques primitives. Mieux encore UM171 augmentait le transfert de gène à l'intérieur des cellules souches hématopoïétiques fonctionnelles capables de repeupler, à long terme, les compartiments hématopoïétiques de sujets ayant subi une myéloablation.

CONCLUSION : Nos résultats ont montré qu'en plus de la capacité de UM171 à stimuler l'expansion *in vitro* des cellules souches hématopoïétiques, cette molécule peut aussi augmenter le transfert de gène à l'intérieur de ces cellules. Ces découvertes ont des implications translationnelles majeures en clinique humaine pouvant donner espoir à une grande majorité de patients souffrant de maladies hématologiques héréditaires ou acquises.