



**HAL**  
open science

# Alternative à la thérapie génique additive par utilisation du système CRISPR-Cas9 pour la correction génique des maladies héréditaires du globule rouge

Julian Boutin

## ► To cite this version:

Julian Boutin. Alternative à la thérapie génique additive par utilisation du système CRISPR-Cas9 pour la correction génique des maladies héréditaires du globule rouge. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01567122

**HAL Id: dumas-01567122**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01567122>**

Submitted on 21 Jul 2017

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

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

Université de Bordeaux  
U.F.R. DES SCIENCES MÉDICALES

Année 2017

N°3062

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME D'ÉTAT DE  
DOCTEUR EN BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement

Le 20 Juin 2017

par **BOUTIN Julian**

né le 6 janvier 1988 à Bordeaux (33)

**ALTERNATIVE À LA THÉRAPIE GÉNIQUE ADDITIVE PAR  
UTILISATION DU SYSTÈME CRISPR-CAS9 POUR LA CORRECTION  
GÉNIQUE DES MALADIES HÉRÉDITAIRES DU GLOBULE ROUGE**

Directeur de thèse  
Mme le Docteur Aurélie BEDEL

Jury

M le Professeur	François MOREAU-GAUDRY	Président
M le Docteur	David CAPPELLEN	Rapporteur
M le Professeur	François-Xavier MAHON	Juge
M le Professeur	Alain TAIEB	Juge
Mme le Docteur	Stéphanie DULUCQ	Juge

## REMERCIEMENTS

À mon président de thèse,

**Monsieur le Professeur François Moreau-Gaudry,**

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide et pour m'avoir donné le goût de la recherche.

À mes juges, pour avoir accepté de juger ce travail,

**Monsieur le Professeur Taieb Alain,**

**Monsieur le Professeur Mahon François-Xavier,**

**Madame le Docteur Dulucq Stéphanie**

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

À mon rapporteur,

**Monsieur le Docteur Cappellen David,**

Je vous remercie d'avoir relu ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance.

À ma directrice de thèse,

**Madame le Docteur Aurélie Bedel,**

Je te remercie pour avoir accepté de diriger ce travail et ton soutien tout au long.

J'espère que ce n'est que le début de notre collaboration.

À ma femme Aurélia,

Merci de m'avoir aidé pour la relecture, de ton soutien sans faille dans tous mes projets et de ton amour.

À toute ma famille,

Merci à mes parents qui ont toujours cru en mes projets et spécialement à ma maman qui m'a transmis son goût pour la médecine.

Merci à ma petite sœur chérie pour sa bonne humeur à toute épreuve.

Merci à mes grands parents Georges et Marie-Claude de m'avoir transmis leur passion pour la science avec une petite pensée supplémentaire pour mon Papi qui nous a quitté il y a peu.

À tous mes amis,

Merci pour votre soutien et votre joie de vivre.

Merci tout spécialement à Pierre, même loin tu restes mon meilleur ami et à Romain, toujours présent en cas de besoin.

À mon trio arcachonnais (Valérie-PA-Fanny), Samuel (mon binôme de baby-foot), Benoit et Laurent qui sont mes plus belles rencontres pendant l'internat.

Et enfin aussi à tous les autres.

À tous mes collègues au laboratoire recherche,

Je vous remercie pour votre aide, votre disponibilité et votre gentillesse.

Et mention spéciale à Élodie, qui a lancé le projet CRISPR et m'a formé.

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	2
LISTE DES FIGURES .....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	6
PRÉAMBULE .....	8
Chapitre 1 : Thérapie génique.....	11
1.1 Introduction : .....	11
1.2 La thérapie génique utilisant les CSH.....	13
1.3 La thérapie génique dirigée au niveau du foie.....	17
1.4 L'immunothérapie des lymphocytes T dans le cancer .....	21
1.5 Les raisons du succès des essais cliniques .....	22
1.5.1 Les vecteurs lentiviraux.....	22
1.5.2 Les AAV .....	23
1.5.3 Les CARs.....	25
1.5.4 L'amélioration de la conception des études.....	26
1.6 Les défis futurs.....	27
1.7 La correction génique ciblée.....	33
Chapitre 2 : Amélioration des protocoles de thérapie génique des maladies héréditaires du globule rouge par l'utilisation du système CRISPR-Cas9 : modèle de la Porphyrie érythropoïétique congénitale.....	39
1/ Culture cellulaire.....	51
2/ Détermination de la séquence donneuse.....	52
3/ Sélection des ARN guides et clonage dans le pX462 .....	53
4) Transfection par électroporation .....	55
5) Analyse de l'HDR dans les cellules transfectées.....	57
6) Cytométrie en flux .....	57
7) Sous clonage TOPO® .....	59
8) Tests statistiques .....	59
1/ Mise au point technique de l'HDR par CRISPR-Cas9-nickase dans les cellules de la lignée .....	63
a) La concentration d'oligonucléotide .....	63
b) La concentration en plasmide .....	65
c) Analyse qualitative par séquençage .....	66
2/ Création d'une lignée PEC à partir des HEK .....	67
3/ Correction / « Rescue » de notre modèle HEK PEC .....	71
4/ Test des outils développés sur les cellules primaires .....	75
a) Les cellules souches hématopoïétiques .....	75
b) Les fibroblastes PEC.....	77
5/ Test des outils sur une autre région du génome .....	78
CONCLUSION-DISCUSSION .....	81
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	87
SERMENT D'HIPPOCRATE.....	93

## LISTE DES FIGURES

FIG.1 Nombre d'essais cliniques de thérapies géniques.....	10
FIG.2 Principe de la thérapie génique utilisant des cellules souches hématopoiétiques.....	12
FIG.3 Principe de la thérapie génique avec les AAV .....	16
FIG.4 Principe de l'immunothérapie .....	20
FIG.5 Récepteur antigénique chimérique.....	25
FIG.6 Correction génique par les technologie ZFNs, TALENs et CRISPR/Cas9 .....	32
FIG.7 CRISPR-Cas9-nucléase.....	38
FIG.8 Double système CRISPR-Cas9-nickase .....	41
FIG.9 Apport de la stratégie "tout en un" versus approche classique en CRISPR....	42
FIG.10 Plasmide pX462 modifié.....	42
FIG. 11 Correction de la mutation de l'exon 4 du gène <i>UROS</i> .....	44
FIG. 12 Schéma du blocage de la voie de la biosynthèse de l'hème dans la PEC .....	44
FIG. 13 Les 3 types cellulaires utilisés en culture .....	51
FIG. 14 Séquence de l'ADN de l'oligonucléotide "correcteur".....	53
FIG. 15 Séquence de l'ADN des 3 ARN guides.....	54
FIG. 16 Clonage des ARN guides dans le plasmide pX462 .....	54
FIG. 17 Principe de l'électroporation .....	54
FIG. 18 Principe de la cytométrie en flux et du trieur de cellules .....	55
FIG. 19 Stratégie du sous-clonage dans le vecteur TOPO®.....	9
FIG. 20 Mise au point technique de l'édition du génome dans les HEK .....	64
FIG. 21 Apport de la mutation dans l'exon 4 du gène <i>UROS</i> par l'oligonucléotide "PEC" .....	67
FIG. 22 Création d'une lignée PEC à partir des HEK .....	68
FIG. 23 Apport de la correction dans l'exon 4 du gène <i>UROS</i> par l'oligonucléotide "Rescue" .....	70
FIG. 24 "Rescue" de notre modèle HEK PEC C73R.....	72
FIG. 25 Test des outils sur des cellules souches hématopoiétiques .....	74
FIG. 26 Test des outils sur des fibroblastes primaires de patients PEC .....	76
FIG. 27 Édition génique d'HEK transfectées par l'oligonucléotide "correcteur" de l'exon 10 du gène <i>UROS</i> .....	78

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ARNg** : ARN guide permettant la reconnaissance de la séquence d'ADN à cliver. Nous appellerons par simplification ARNg la séquence d'ADN sous la dépendance du promoteur U6 qui sera transcrite en ARN guide.

**AAV** : *Adeno-Associated Virus*. Virus adéno-associé

**CAR** : *Chimeric Antigen Receptor*. Récepteur antigénique chimérique

**CD** : Cluster de Différenciation

**CSH** : Cellules Souches Hématopoïétiques

**CRISPR-Cas9** : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR ASSociated protein 9*

**crRNA** : *crispr RNA*

**DICS** : Déficit Immunitaire Combiné Sévère

**DMEM** : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, milieu de culture cellulaire

**FACS** : *Fluorescence Activated Cell Sorting*. Cytométrie en flux

**FLT3LG** : *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*

**γRV** : Gamma-Rétrovirus

**HDR** : *Homology Direct Repair*. Réparation dirigée par homologie

**HEK 293T** : *Human Embryonic Kidney*, cellules exprimant l'antigène T dérivé du virus SV40

**HEK C73R** : Clone cellulaire HEK qui possède la mutation c.217T>C (p.C73R) du gène *UROS*.

**HLA** : *Human Leukocyte Antigen*

**INDEL** : INsertion-DELétion

**KO** : Knock Out

**LAL** : Leucémie Aigüe Lymphoïde

**LTR** : *Long Terminal Repeat*. Séquence terminale longue répétée autoinactivable

**NHEJ** : *Non-Homologous End-Joining*. Jonction des extrémités non-homologues

**Oligonucléotide donneur simple brin** : Matrice de recombinaison simple brin

**p < 0,05** : p-valeur. Valeur de référence utilisée pour conclure que le résultat d'un test est statistiquement significatif.

**PAM** : *Protospacer Adjacent Motif*. Séquence NGG nécessaire à l'activité de la Cas9

**pb** : paire de bases

**PBS** : *Phosphate Buffer Saline*

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction*

**PEC** : Porphyrie Erythropoïétique Congénitale

**PECi** : cellules PEC immortalisées par Ag T sv40 + TERT

**pX462 1-2** : plasmide contenant les 2 ARN guides 1 et 2, la Cas9-D10A et le gène de résistance à la puromycine.

**pX462 1-3** : plasmide contenant les 2 ARN guides 1 et 3, la Cas9-D10A et le gène de résistance à la puromycine.

**RH** : Recombinaison Homologue

**SacI** : site de restriction reconnue par l'endonucléase du même nom  
**SCF** : *Stem Cell Factor*  
**SIN** : *Self INactivating*  
**TALEN** : *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*  
**TCR** : *T-Cell Receptor*. Récepteur des cellules T  
**TERT** : *TElomerase Reverse Transcriptase*  
**TOPO®** : Vecteur pour clonage de produit PCR  
**tracrRNA** : *trans-activating crRNA*  
**TPO**: Thrombopoïétine  
**U6** : U6 est un promoteur de pol III assurant la transcription des « petits ARN »  
**ZFN** : Zinc Finger Nuclease



## PRÉAMBULE

Entre la découverte de la structure de l'ADN en 1953 par Watson et Crick et la première tentative de thérapie génique, il se sera écoulé environ trente ans. Mais il faudra attendre 1990, pour que le premier essai clinique de thérapie génique par French Anderson et Michael Blaese soit autorisé aux Etats-Unis. Actuellement, plus de 1800 essais cliniques de thérapie génique sont en cours et concernent majoritairement les cancers.

Les premiers succès ont eu lieu en 2000 dans le cadre du traitement de 11 enfants atteints de déficits immunitaires combinés sévères. Cependant, lors du suivi, 3 patients sur 11 ont développé une leucémie ce qui a freiné l'essor de la thérapie génique. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont depuis longtemps une cible privilégiée pour faire de la thérapie génique. En effet, elles sont faciles d'accès chez l'homme et leur manipulation *in vitro* est aisée. Il y a eu également de grands progrès faits au niveau de la culture, de l'amplification et la greffe de CSH. Dans un contexte de pénurie de donneur HLA compatible, un déficit lié à une maladie héréditaire hématologique pourrait être suppléé par une greffe de CSH autologues corrigées génétiquement *ex vivo*.

J'ai donc écrit ma thèse dans ce contexte de développement et d'amélioration continue des protocoles de thérapies géniques.

L'introduction présente d'abord un état des lieux de la thérapie génique puis l'amélioration que nous nous proposons d'apporter pour augmenter l'efficacité et la sécurité des protocoles. Notre maladie modèle est la porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC) dont un rappel physiopathologique sera fait.

# **INTRODUCTION**

## Nombre d'essais cliniques entre 1989-2013

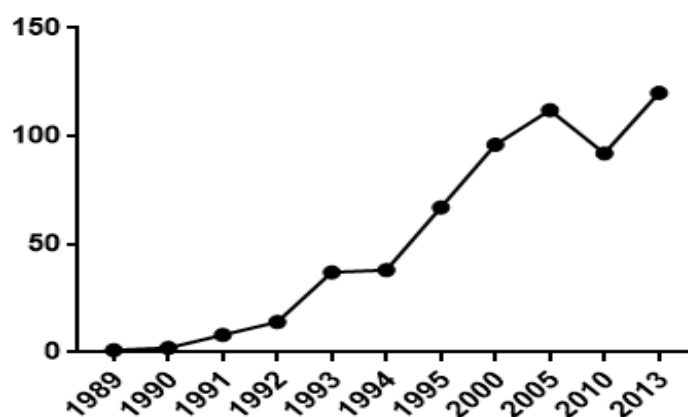


Fig. 1. Nombre d'essais cliniques de thérapies géniques approuvés dans le monde entre 1989-2014. Modifié d'après Alexandra Biffi, Dana-Farber (Boston Children's Cancer and Blood Disorders Center).

Disease	Vector and strategy	Number of patients <sup>#</sup>	Follow-up (months)	Patient status and biological and clinical outcomes <sup>*</sup>	Clinical-trial identifier
<b>HSC-based gene therapy</b>					
Wiskott-Aldrich syndrome	Lentiviral vector; ex vivo gene transfer into CD34 <sup>+</sup> cells.	7	10 to 60	All patients AAW; stable engraftment with transduced cells; persistent clinical benefit and safety.	NCT01515462
Wiskott-Aldrich syndrome	Lentiviral vector; ex vivo gene transfer into CD34 <sup>+</sup> cells.	7	9 to 42	6 patients AAW, 1 patient died of a pre-existing infection; stable engraftment with transduced cells; persistent clinical benefit and safety.	NCT01347242 NCT01347346 NCT02333760
X-linked severe combined immunodeficiency	Self-inactivating $\gamma$ -RV; ex vivo gene transfer into CD34 <sup>+</sup> cells.	9	12 to 39	8 patients AAW, 1 patient died of an infection; stable engraftment with transduced cells; persistent clinical benefit and safety in 7 patients; 1 patient failed to engraft and underwent HSC transplantation.	NCT01410019 NCT01175239 NCT01129544
$\beta$ -Thalassaemia major	Lentiviral vector; ex vivo gene transfer into CD34 <sup>+</sup> cells.	3 $\ddagger$	24 to 72	2 patients stably engrafted with transduced cells, 1 patient became transfusion independent; 1 patient failed to engraft and received rescue cells.	N/A
$\beta$ -Thalassaemia major	Lentiviral vector; ex vivo gene transfer into CD34 <sup>+</sup> cells.	2 $\ddagger$	15	Stable engraftment with transduced cells; transfusion independence and safety in both patients.	NCT02151526
$\beta$ -Thalassaemia major	Lentiviral vector; ex vivo gene transfer into CD34 <sup>+</sup> cells.	5 $\S$	1 to 6	Stable engraftment with transduced cells; safety and transfusion independence in the first 2 evaluable patients.	NCT01745120
Adrenoleukodystrophy	Lentiviral vector; ex vivo gene transfer into CD34 <sup>+</sup> cells.	4	54 to 101	Stable engraftment with transduced cells and safety in all patients; persistent clinical benefit in 3 patients.	N/A
Metachromatic leukodystrophy	Lentiviral vector; ex vivo gene transfer into CD34 <sup>+</sup> cells.	20	3 to 60	Stable engraftment with transduced cells and safety in all patients; persistent clinical benefit in all late-infantile patients who were treated when presymptomatic.	NCT01560182
<b>Liver-directed gene therapy</b>					
Haemophilia B	AAV8 vector; intravenous administration.	10	16 to 48	No inhibitors; persistent FX expression; in high-dose group, mean FX levels of $5.1 \pm 1.7\%$ seen in all 6 treated patients.	NCT00979238
Haemophilia B	AAV8 vector; intravenous administration.	7	Up to 12	No inhibitors; persistent FX expression in 1 patient.	NCT01687608
<b>T-cell immunotherapy for cancer</b>					
B-cell lymphoma or CLL	$\gamma$ -RV; ex vivo gene transfer into T cells; CAR-modified anti-CD19 cells.	15	1 to 23	8 CRs, 4 PRs; ORR 80%.	NCT00924326
B-cell ALL	$\gamma$ -RV; ex vivo gene transfer into T cells; CAR-modified anti-CD19 cells.	5	1 to 4	5 CRs; ORR 100%; 4 patients subsequently underwent allo-HSC transplantation as per clinical-study design, 1 patient was ineligible for HSC transplantation and relapsed.	NCT01044069
B-cell ALL	Lentiviral vector; ex vivo gene transfer into T cells; CAR-modified anti-CD19 cells.	30	1 to 24 $\ddagger$	27 CRs; ORR 90%; 19 patients remained in remission, 3 of these patients underwent HSC transplantation; 7 patients relapsed, 3 of these relapses occurred after loss of transduced T cells.	NCT01626495 NCT01029366
B-cell ALL or lymphoma	$\gamma$ -RV; ex vivo gene transfer into T cells; CAR-modified anti-CD19 cells.	21	Median - 10 $\#$	14 CRs (at day 28); ORR 67%; 10 patients subsequently underwent HSC transplantation.	NCT01593696

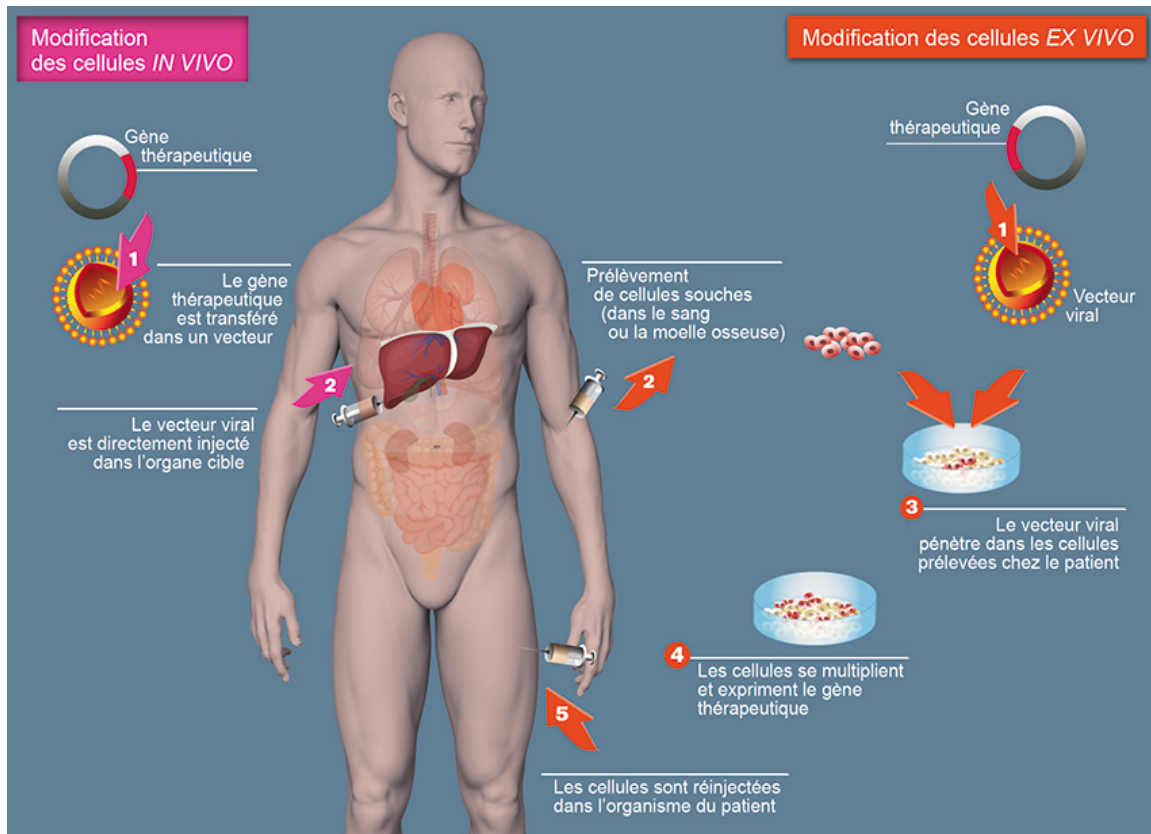
Table 1. Essais cliniques en cours, modifié d'après Naldini L et al, 2015.

# Chapitre 1 : Thérapie génique

## 1.1 Introduction :

La thérapie génique fascine les scientifiques et les cliniciens car elle représente une opportunité de guérir les maladies au niveau génétique (Figure 1). Réaliser un transfert de gène efficace et obtenir une réponse génique suffisante tout en conservant les mécanismes de régulation physiologique constitue encore à ce jour un grand défi. En effet, les cellules corrigées doivent être suffisamment nombreuses pour guérir le patient, échapper à la réponse immunitaire, proliférer et transmettre leur correction génique à leur descendance pour que les bénéfices perdurent. Depuis vingt ans, malgré l'efficacité pour le déficit immunitaire combiné sévère (DICOV), il n'y a pas eu l'essor escompté de la thérapie génique à cause d'effets indésirables graves qui ont freiné les essais cliniques.

Ceci peut expliquer le scepticisme à propos du déploiement de ces stratégies mais les mentalités sont en train de changer. Actuellement, de nombreux essais cliniques en phase I ou II rapportent une très bonne efficacité et sûreté pour de nombreuses maladies héréditaires du sang, immunologiques et nerveuses (déficits immunitaires primitifs, leucodystrophies, thalassémies, hémophilies, lymphomes B ... (Table 1). Tous ces essais utilisent des vecteurs viraux pour faire une thérapie génique additive « classique ». Elle consiste en l'insertion d'une cassette provirale contenant un promoteur constitutivement actif, non régulable et un gène. Nous allons voir quelques exemples les plus pertinents qui soulignent les progrès effectués en transfert de gènes et dans la compréhension des processus biologiques.



**Fig. 2. Principe de thérapie génique *in vivo* et *ex vivo* utilisant des cellules souches hématopoïétiques par F.Koilikoff (INSERM).**

## 1.2 La thérapie génique utilisant les CSH

Le traitement actuel pour de nombreuses maladies héréditaires hématologiques repose sur la transplantation allogénique de CSH à partir d'un donneur sain. En cas d'absence de donneur intrafamilial HLA-compatible, des greffes allogéniques de CSH partiellement HLA compatibles, haplo-identiques, sont réalisées en deuxième intention [1]. Cependant, le risque de morbi-mortalité lié à l'immuno-suppression, au risque d'infection, et de réaction du greffon contre l'hôte est très important.

Une alternative est la correction génique des CSH autologue du patient. Les CSH constituent un type cellulaire de choix pour la thérapie génique du fait de leur multipotence, de leur autorenouvellement et de la possibilité donc d'obtenir une correction génique stable dans leur descendance. Le principe actuel des protocoles de thérapie génique des maladies hématologiques héréditaires consiste en la correction *ex vivo* d'une population cellulaire enrichie en cellules souches hématopoïétiques par leur marqueur de surface CD34. Les cellules souches sont purifiées après stimulation, à partir de leucocytes issus du sang circulant ou de la moelle du patient par utilisation du marqueur de surface CD34. *Ex vivo*, elles sont cultivées 2-4 jours en présence de cytokines stimulant leur prolifération. Elles sont corrigées par transduction par un vecteur intégratif rétroviral ou lentiviral apportant de façon additive le gène correcteur et un promoteur (Figure 2). Le transfert de gènes se fait au hasard dans le génome. Les sites d'intégration proviraux sont extrêmement nombreux et différents dans chaque cellule. Une chimiothérapie de préconditionnement est administrée au patient pour dépléter la moelle osseuse en progéniteurs endogènes et cellules différenciées. Puis, les cellules autologues corrigées sont re-greffées chez le malade. Bien que les premiers essais cliniques

aient montré des bénéfices clairs pour les patients, il existe également des limites et risques. Lors de l'utilisation de vecteurs de 1ère génération qui sont basés sur les gammarétrovirus, leurs capacités à transduire les progéniteurs les plus primitifs étaient faibles, entraînant des corrections géniques basses et transitoires dans les cellules hématopoïétiques *in vivo*.

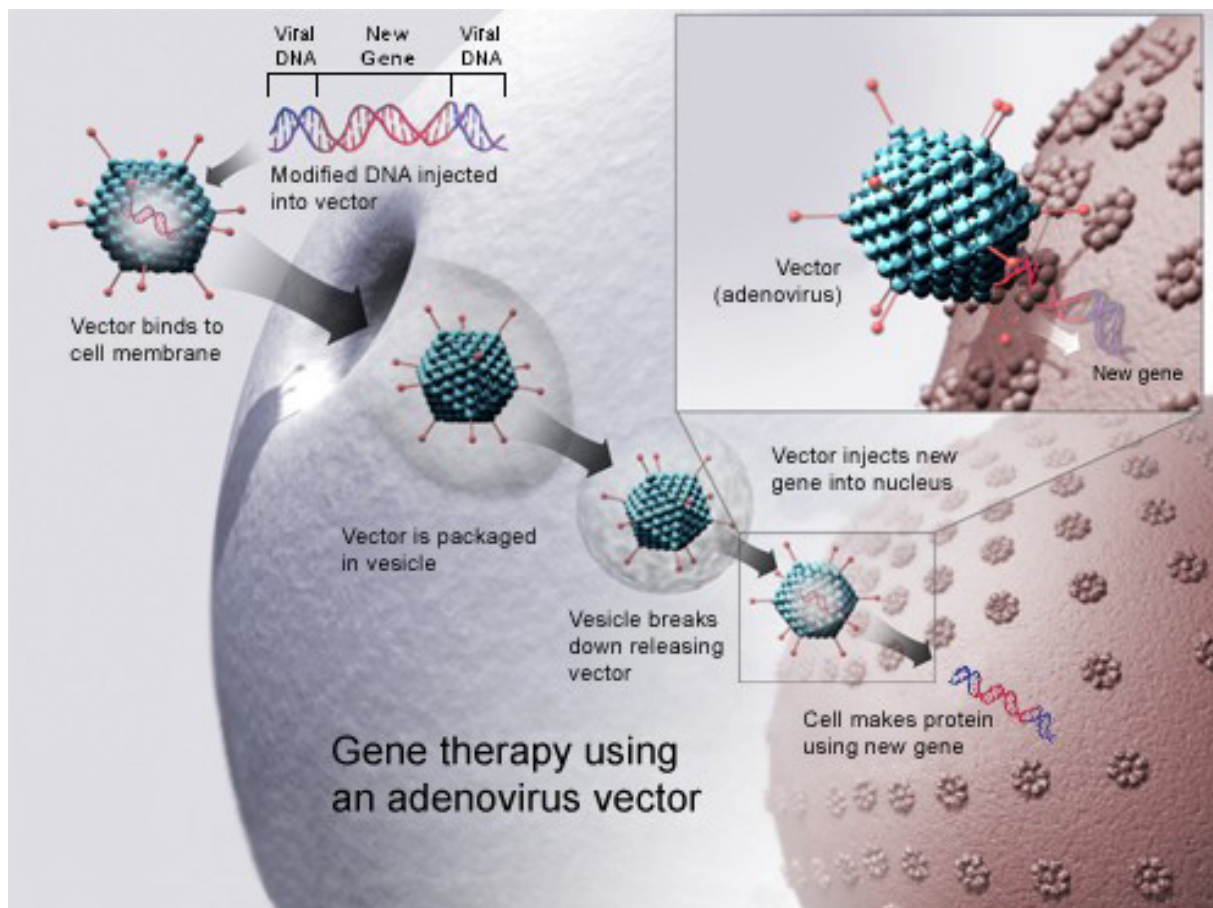
De plus, un problème limitant l'expansion des protocoles cliniques est le risque génotoxique important de mutagenèse insertionnelle. Elle se fait lors de l'intégration provirale dans le génome, *via* l'activation d'un oncogène par le promoteur du provirus thérapeutique au voisinage du site d'intégration, ou l'interruption d'un gène suppresseur de tumeur. Ce phénomène a été responsable de 4 cas de leucémies dans le premier essai clinique de thérapie génique pour le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X [2]. Dans ces conditions, la balance bénéfice/risque pour la thérapie de maladies génétiques non létales peut se discuter. Pour limiter ce risque, des progrès en vectorologie ont été accomplis (utilisation de lentivecteurs SIN encadrés par des insulateurs et choix de promoteurs tissu-spécifiques), mais un risque résiduel persiste.

Les thérapies géniques utilisant des CSH avec ces nouveaux vecteurs ont été testées dans des maladies héréditaires sévères du système immunitaire comme le syndrome de Wiskott-Aldrich ou le déficit immunitaire combiné sévère (DICS) [3-4], d'hémoglobinopathies ( $\beta$ -thalassémie majeure) [5] et dans les maladies neurodégénératives (Leucodystrophies) [6].

Tous les essais de thérapie génique réalisés sur les CSH avec des vecteurs lentiviraux rapportent une très bonne reconstitution de l'hématopoïèse (jusqu'à 90%) qui est stable avec une correction génique chez la plupart des receveurs [7-8]. Comme toutes les lignées hématopoïétiques testées contiennent des cellules

corrigées génétiquement qui se maintiennent dans le temps, il est probable que le transfert de gène a eu lieu dans les progéniteurs multipotents autorenewelables qui ont réussi à greffer les receveurs. Etonnamment, la plupart des patients ont des bénéfices plus importants après thérapie génique qu'après des greffes allogéniques réussies de CSH. Malgré une augmentation du nombre de patients traités dans ces essais de thérapie génique sur les CSH, il n'y a pas d'effets indésirables rapportés liés à l'utilisation des vecteurs lentiviraux. Si on reprend le plus ancien essai clinique sur l'Adrénoleucodystrophie qui a eu lieu il y a 7 ans, la plupart des patients greffés sont actuellement en bonne santé, alors qu'en absence de thérapie génique ils seraient probablement déjà morts de leur maladie. Aucun nouveau cas de leucémie n'est rapporté à ce jour. La balance bénéfique/risque semble donc à ce jour très importante et explique la recrudescence récente des essais cliniques de thérapie génique utilisant les CSH.





**Fig. 3. Principe de la thérapie génique avec des AAV par le National Institutes of Health.** L'ADN viral contenant le gène de remplacement est inséré dans un vecteur adénoviral. Ce vecteur a la capacité de se fixer à la membrane cellulaire d'intérêt puis d'être empaqueté dans une vésicule d'endocytose, qui va lui permettre d'arriver jusqu'au noyau où il va être libéré. Ainsi, la cellule va être capable de fabriquer la protéine grâce au nouveau gène transféré.

### 1.3 La thérapie génique dirigée au niveau du foie

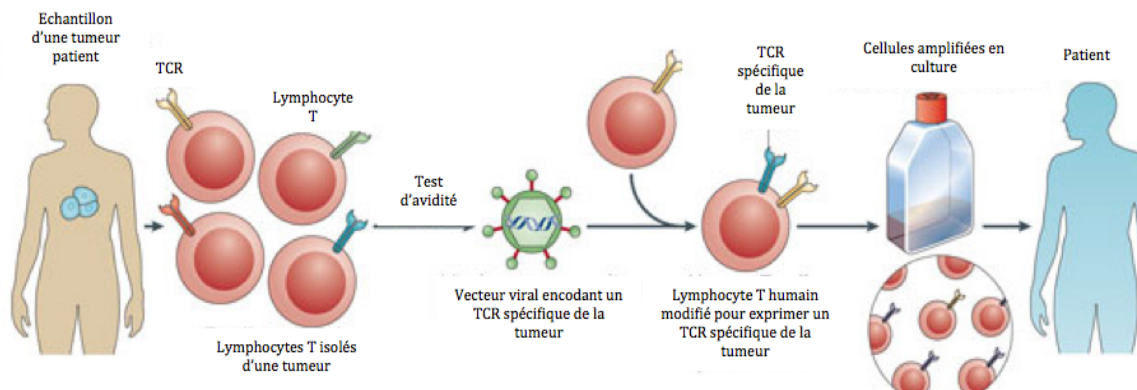
Le foie est une cible préférentielle pour la thérapie génique *in vivo* depuis longtemps. Cet organe interne majeur est une plateforme métabolique centrale qui reçoit une abondante quantité de sang à travers un important lit de sinusoides avec des parois très perméables. Cette structure facilite l'accès aux hépatocytes des particules transmises par le sang tels que les virus. Les hépatocytes ont une longue durée de vie et sont des « usines robustes à protéines » qui peuvent efficacement libérer leurs produits dans la circulation sanguine. Un transfert stable d'un transgène dans les hépatocytes pourrait donc fournir une stratégie pour traiter les maladies héréditaires du métabolisme et les déficits en protéines plasmatiques, notamment ceux en facteurs de la coagulation. Les obstacles majeurs à la thérapie génique dirigée du foie incluent la potentielle toxicité d'une réponse inflammatoire aigüe à l'administration d'un bolus de particules virales dans la circulation sanguine, l'inactivation de ces particules par des anticorps préexistants spécifiques et leur clairance par les macrophages qui tapissent les capillaires sinusoidaux du foie et de la rate. Si une réponse immunitaire humorale ou cellulaire est déclenchée contre la production du transgène, l'activité thérapeutique de la thérapie génique pourrait être inhibée dans la circulation sanguine ou les cellules corrigées pourraient être éliminées par les lymphocytes T cytotoxiques.

La thérapie génique dirigée au niveau du foie a été testée principalement dans le traitement des hémophilies sévères B en utilisant des vecteurs virus adéno-associés (AAV) (Figure 3). L'hémophilie B est une maladie de choix pour tester cette approche. En effet, la restauration d'une expression du facteur IX d'au moins 1% par rapport à la normale peut transformer une hémophilie sévère en une forme modérée de la maladie. Cette reconstitution partielle diminue le risque d'hémorragies

spontanées, qui sont délétères pour les articulations et potentiellement létales si elles surviennent au niveau du cerveau. Cela réduit aussi les besoins de prophylaxie intraveineuse en facteurs de remplacement, qui est un traitement lourd pour les patients et seulement disponible à un coût très élevé et dans des pays avec un système de soin bien développé. En injection intraveineuse, certains sérotypes de vecteurs AAV ciblent préférentiellement les hépatocytes et restent exprimés de manière stable, la plupart sous forme d'épisomes non intégratifs dans le noyau. La persistance du génome du vecteur AAV qui contient une cassette d'expression pour le facteur IX de la coagulation (protéine déficiente dans l'hémophilie B) dans des hépatocytes quiescents pourrait entraîner une source stable de facteur IX fonctionnel dans la circulation sanguine [9].

Bien que les premiers essais démontrent la sûreté de l'administration des vecteurs AAV dans la circulation sanguine humaine, ils permettent seulement une expression limitée et transitoire du facteur IX. Ceci est probablement dû à un niveau bas de transduction génique dans le foie et à une réponse immunitaire cellulaire retardée qui cible les antigènes des AAV persistants dans les hépatocytes et déclenche leur élimination. L'amélioration des sérotypes d'AAV (AAV8 au lieu de l'AAV2) a depuis conduit à de meilleurs résultats dans l'hémophilie B (voir paragraphe 1.5.2).





**Fig. 4. Principe de l'immunothérapie.** Le système immunitaire dépend principalement des anticorps et des cellules immunitaires. Ces cellules immunitaires sont prêtes pour se battre contre les cellules cancéreuses et les tuer à tout moment. Le problème dans le cancer est que les cellules immunitaires du sang sont insuffisantes pour combattre la maladie ce qui va entraîner un développement de la tumeur. L'effet de l'immunothérapie va être d'augmenter la quantité de cellules immunitaires pour restaurer et renforcer la fonction de la réponse immunitaire du corps humain contre le cancer. Par conséquent, l'immunothérapie intervient de plusieurs manières positives dans le maintien de l'efficacité thérapeutique, dans la prévention, dans le retardement et la réduction des cas de rechutes et de métastases. **D'après le site internet <http://www.moderncancerhospital.com/cancer-treatments/biological-immunotherapy>.**

## 1.4 L'immunothérapie des lymphocytes T dans le cancer

Les lymphocytes T sont aussi des cibles classiques pour la thérapie génique *ex vivo*. De telles thérapies servent surtout à optimiser la réponse immunitaire adaptative contre le cancer et les infections chroniques comme le VIH. Les lymphocytes T autologues peuvent être récoltés directement à partir du sang périphérique et amplifiés *ex vivo*.

L'utilisation de lymphocytes T pour l'immunothérapie dans le cancer est une alternative thérapeutique (Figure 4). Chez des patients à un stade avancé, les lymphocytes T cytotoxiques autologues provenant d'une tumeur peuvent être activés et amplifiés *ex vivo* puis réinjectés. Cette amplification de lymphocytes pré-existants dans la tumeur permet d'augmenter la réponse cytotoxique et de contourner partiellement les signaux immunosuppresseurs de la tumeur. Ainsi le ratio effecteur/cible peut devenir lymphocyte T favorable. Des données de la littérature rapportent que les patients préconditionnés par une déplétion de leurs lymphocytes, avant la perfusion de lymphocytes T amplifiés *ex vivo*, améliorent leur greffe et leur activité *in vivo* [10].

Pour améliorer l'efficacité de l'immunothérapie utilisant les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules peuvent être transduites par un gamma-rétrovirus ( $\gamma$ -RV) ou un vecteur lentiviral exprimant un récepteur T de l'antigène (TCR) exogène. Après ajout d'un TCR dirigé contre un antigène spécifique des cellules cancéreuses ou d'une protéine virale, les lymphocytes T sont amplifiés et re-transfusés. Les premiers essais cliniques utilisant le transfert de gène dans les lymphocytes T avec TCRs dirigés contre des antigènes associés aux tumeurs ont montré des résultats mitigés avec réponses tumorales partielles, et dans certains cas, une absence de réactivité tumorale ce qui a conduit à des dommages dans les tissus et des effets secondaires

graves [11-12]. L'amélioration du ciblage antigénique et de l'activité cytotoxique (Récepteur antigénique chimérique (CAR) des lymphocytes T) a depuis conduit à des résultats très encourageants dans les hémopathies malignes (voir paragraphe 1.5.3).

## **1.5 Les raisons du succès des essais cliniques**

Les avancées dans la fabrication et la caractérisation des vecteurs ont permis d'obtenir des lots de virus avec une grande efficacité et une meilleure pureté ce qui a permis aussi d'augmenter la transduction des cellules cibles avec moins d'effets secondaires. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et des différents types cellulaires qui étaient impliqués dans chaque succès ou échec de thérapie génique ont aussi contribué à améliorer les méthodes de manipulation des cellules *ex vivo* et ont mené à une meilleure surveillance et gestion des patients. En effet, les résultats positifs des récents essais cliniques ont été rendus possibles grâce à l'association de l'observation clinique et de la biologie moléculaire qui ont fourni les preuves de l'efficacité et de la sûreté de la thérapie génique.

### **1.5.1 Les vecteurs lentiviraux**

Dans les premiers essais qui utilisaient des séquences terminales longues répétées autoinactivables (LTRs) des  $\gamma$ RV, il y avait fréquemment et précocement des clones dominants, dont l'expansion semblait liée à une altération de l'expression des oncogènes ciblés par l'insertion du vecteur. Les reconstructions rétrospectives des multiples étapes de la leucémogénèse depuis les premiers essais ont permis de comprendre qu'elle était due à la dérégulation d'un oncogène par un promoteur viral

inséré à proximité (LM02) [13]. La progression de la maladie est facilitée par l'accumulation de mutations supplémentaires indépendantes du vecteur dans le clone amplifié. Dans les essais cliniques récents basés sur la thérapie génique sur les CSH par vecteurs lentiviraux, l'analyse des sites d'intégration proviraux dans le génome a été utilisée pour analyser la clonalité des cellules impliquées dans la reconstitution hématopoïétique « corrigée ». Elle a permis de montrer que la reconstitution par les cellules souches transduites était polyclonale, —sans l'émergence de clones dominants dont le comportement aurait pu être attribué à l'insertion du vecteur [6-8]

En parallèle, aucun événement clinique indésirable dans les récents essais chez les patients n'a été rapporté. Aujourd'hui, bien que le risque théorique persiste, la génotoxicité a donc pu être diminuée grâce à l'amélioration de l'efficacité de la transduction et de la greffe de CSH et par l'amélioration des vecteurs (utilisation de promoteurs tissus spécifiques, insulateurs).

### **1.5.2 Les AAV**

Suite à l'utilisation des AAV, il peut survenir une réponse inflammatoire innée responsable des échecs précoces. Un autre obstacle majeur pour la thérapie génique dirigée est la réponse inflammatoire provoquée par la perfusion de hautes doses de particules virales et la nécessité de court-circuiter cette immunité préexistante.

L'autre risque est la survenue d'une réponse immunitaire cellulaire retardée, dirigée contre les cellules transduites par les AAV et responsable des échecs tardifs. Dans la thérapie génique dirigée au niveau du foie par les AAV, la surveillance immunologique détaillée des épitopes spécifiques des réponses antivirales des



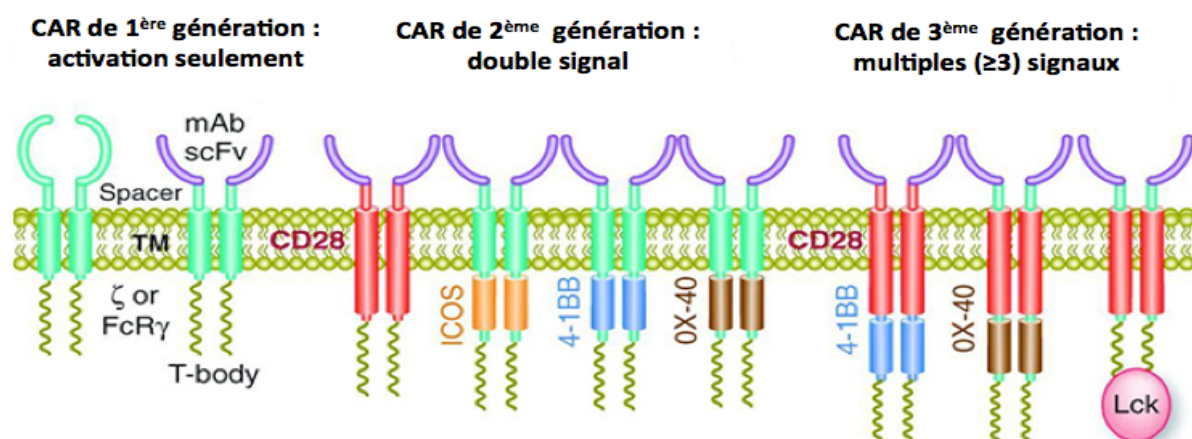
lymphocytes T est capable de prédire ces échecs. Il existe donc des stratégies pour contrôler la réponse cytotoxique adaptative retardée en réponse aux composants viraux qui persistent dans les cellules transduites. Cela induit la nécessité de donner des immunosuppresseurs au premier signe d'une telle réponse et/ou de fabriquer des capsides virales moins immunogènes pour éviter ces réponses graves.

Plus récemment, un nouvel essai utilisant un nouveau sérotype d'AAV (AAV8 versus AA2 dans les premiers protocoles) et une cassette d'expression améliorée a été capable de dépasser ces limites pour donner une expression du facteur IX allant jusqu'à 6% de la normale après seulement une perfusion intraveineuse [14]. Trois ans plus tard, l'expression du facteur IX reste stable chez la plupart des patients, bien que certains aient reçus une cure de corticoïdes immunosuppresseurs aux premiers signes de lésions hépatocytaires dans les 4-8 semaines suivant le traitement. La plupart des patients traités ont pu réduire ou arrêter leur prophylaxie de remplacement, ce qui a amélioré substantiellement leur qualité de vie.

Enfin, il pourrait être envisagé d'utiliser un sérotype d'AAV différent après un premier échec de thérapie génique car changer de capsides d'AAV réduit de manière importante le risque de réponse immunitaire (destruction par les lymphocytes T cytotoxiques). [15]

### 1.5.3 Les CARs

Plus récemment, pour augmenter l'efficacité de l'immunothérapie utilisant les lymphocytes T, le transfert de gène a été utilisé pour introduire un récepteur synthétique antigénique chimérique (CAR) dans les lymphocytes T (Figure 5). Ces chimères combinent la spécificité de la liaison d'un anticorps contre un marqueur de surface associé au cancer avec un ou plusieurs domaines de signal intracellulaire du TCR et des complexes récepteurs de costimulation. La stratégie possède un nombre d'avantages supérieur à l'utilisation des TCRs conventionnels. Les essais qui ont utilisé les chimères dirigées contre la molécule de surface CD19 des lymphocytes B ont rapporté des bénéfices spectaculaires chez les patients avec des lymphomes et des leucémies aiguës lymphoïdes B (LALB) [16-17] : réponse clinique durable incluant rémission complète avec pour la plupart une toxicité raisonnable. Ces résultats ont suscité un énorme intérêt pour le développement de cette approche dans le futur.



**Fig. 5. Récepteur antigénique chimérique (CAR) par l'Association Saint-Louis. 2016.** Les CAR T-cells (pour lymphocytes T porteurs d'un récepteur chimérique) sont des lymphocytes T prélevés au patient, puis modifiés génétiquement in vitro de manière à leur faire exprimer un récepteur artificiel, dit chimérique. Ce récepteur est conçu de telle manière que sa partie extracellulaire reconnaisse un antigène tumoral, le plus spécifiquement possible afin d'éviter les effets néfastes sur d'autres organes du patient. En ce sens, l'antigène CD19 de la LAL représente un modèle très performant. La partie intracellulaire va, elle, se charger de l'activation des lymphocytes après fixation sur les cellules leucémiques : elle se compose de plusieurs domaines d'activation et de co-activation. Ces constructions ont évolué avec le temps pour donner naissance à plusieurs « générations » de CAR T-cells.

#### **1.5.4 L'amélioration de la conception des études**

L'amélioration de l'efficacité des récents essais de thérapie génique a été rendue possible par une meilleure compréhension des interactions hôte/vecteur, et par l'application de critères de sélection plus rationnels des patients.

Améliorer la conception des essais peut augmenter l'efficacité de plusieurs manières. Par exemple, traiter des individus au stade précoce au lieu du stade avancé de la maladie donne une meilleure chance que la thérapie fonctionne avant que les dommages tissulaires soient irréversibles. La dose de vecteur donnée doit se rapprocher le plus possible de la dose thérapeutique au lieu du minimum d'activité biologique comme il est classiquement donné pour limiter les risques. En effet, cette approche prudente empêche souvent les participants des essais de saisir la chance d'obtenir des bénéfices immédiats de la thérapie, tout comme les éventuels bénéfices futurs (parce qu'ils sont devenus immunisés au vecteur). En administrant des chimiothérapies de préconditionnement plus agressives, la greffe de cellules génétiquement corrigées est « meilleure », et la correction plus efficace. Les événements indésirables liés aux vecteurs peuvent aussi être neutralisés par des traitements pharmacologiques (anti-inflammatoires ou corticoïdes) pour diminuer la réponse immunitaire innée ou adaptative. Les essais de thérapie génique s'adressent souvent à des maladies rares avec des relations génotype-phénotype mal connues. Cela permet un enrichissement du savoir qui aide à améliorer l'efficacité et permet de recruter des patients qui vont probablement, pour la plupart, en tirer des bénéfices.

## 1.6 Les défis futurs

À ce jour, pour les pathologies hématologiques héréditaires, la greffe de CSH est seulement disponible pour les patients où un donneur HLA-compatible peut être trouvé (30-35%) [1]. Les protocoles de thérapie géniques sont éventuellement utilisés en 2<sup>ème</sup> intention. Malgré des avancées dans la conception des vecteurs et la culture *ex vivo* des CSH, pour maintenir les capacités de reconstitution hématopoïétique, il reste à déterminer le risque réel de la mutagenèse insertionnelle. Plusieurs modèles expérimentaux ont été développés pour évaluer et classer la génotoxicité relative des différents vecteurs. Cependant, il subsiste des difficultés à estimer l'actuel risque oncogénique et il est encore plus difficile de l'établir en fonction d'un type de vecteur ou d'étude donnés. Ceci est dû au faible nombre de patients traités par ces vecteurs actuellement, au peu de recul sur les études et à la présence de comorbidités qui peuvent augmenter ce risque. Cependant, aussi longtemps que les vecteurs sélectionnés seront intégratifs, il persistera un risque d'activation ou d'inactivation génique au niveau des sites d'insertion. Il peut être atténué mais non supprimé. Si l'efficacité et la sûreté peuvent être prouvées sur un grand nombre de patients et sur de longues périodes de survie, la thérapie génique des CSH pourra éventuellement concurrencer les greffes allogéniques de CSH comme traitement de première ligne dans les maladies monogéniques. L'utilisation de CSH autologues rend potentiellement la thérapie génique additive disponible pour tous les patients. La thérapie génique utilisant les CSH peut aussi diminuer la morbidité de manière très importante parce qu'elle supprime le risque de réaction du greffon contre l'hôte et la nécessité d'un traitement immunosuppresseur. Des chimiothérapies de préconditionnement moins agressives peuvent être utilisées pour obtenir un chimérisme partiel car une correction partielle des cellules suffit pour

corriger le phénotype. La thérapie génique additive utilisant les CSH autologues pourrait aussi être utilisée en deuxième ligne de traitement après un échec d'allogreffe de CSH. Si ces options thérapeutiques deviennent disponibles pour des maladies incurables, le diagnostic néonatal des nouveau-nés pourrait être réalisé afin de proposer un traitement précoce de ces maladies.

Au niveau des essais basés sur les AAV, les conséquences d'une réponse immunitaire retardée qui cible les hépatocytes transduits pourraient être contrôlées. Des approches doivent être développées pour permettre aux patients avec une forte concentration d'anticorps neutralisant les AAV d'accéder à la thérapie génique par AAV possiblement en modifiant la composition de la capsid virale.

Cependant, les facteurs qui peuvent concourir à déclencher la réponse et réguler son timing ne sont pas encore complètement compris. Un autre aspect non résolu concerne la persistance de l'expression transgénique sur une longue période de temps. Bien que l'expression du facteur IX médiée par AAV reste stable durant la vie des chiens traités, il est difficile de prédire si cela sera aussi applicable aux humains, qui ont une plus longue durée de vie. Actuellement, l'essai clinique débuté en 2010 sur l'hémophilie B, réalisé sur 10 patients avec un AAV8, rapporte une amélioration clinique durable chez les 10 patients [14]. Cependant, une compréhension claire du mécanisme d'association au long terme de l'ADN des AAV avec le noyau des hépatocytes, et leur contribution relative à l'expression transgénique, fourniraient sûrement des renseignements. Dans les études précliniques, une fraction du génome des AAV a été rapportée comme s'étant intégrée à la chromatine des hépatocytes. Ceci pourrait contribuer à l'expression du gène au long terme mais poser des problèmes de génotoxicité. De plus, les travaux préliminaires réalisés sur l'hémophilie B vont permettre d'élargir la thérapie génique utilisant les AAV à des

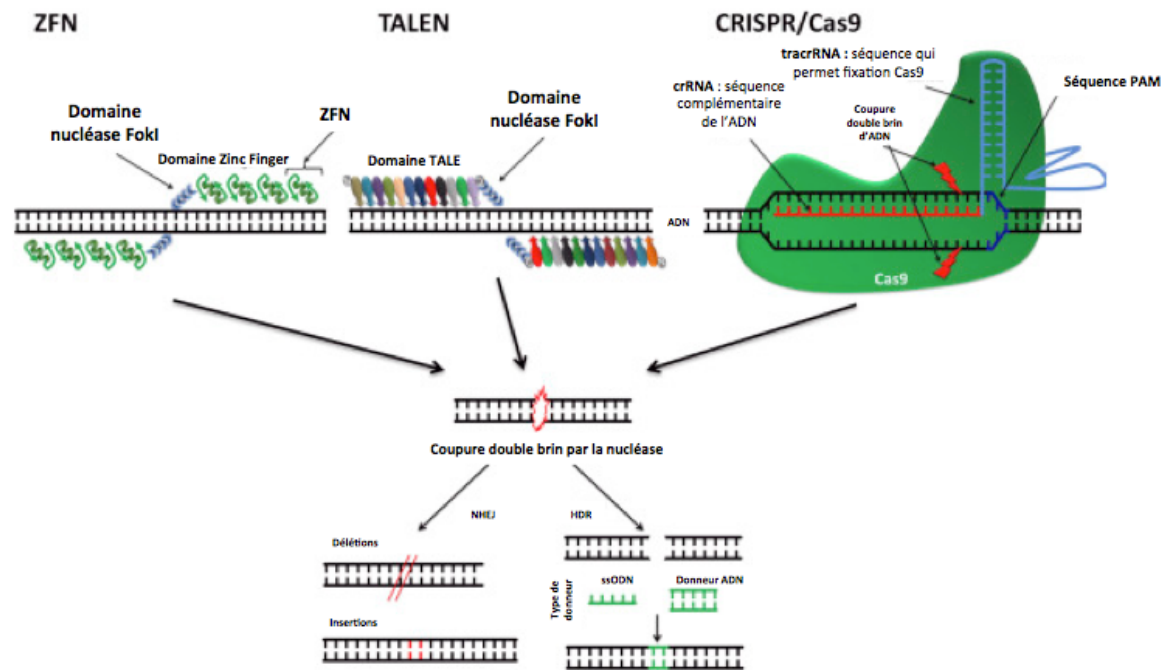
maladies plus fréquentes comme par exemple l'hémophilie A. Enfin, la thérapie génique par AAV possède plusieurs avantages, comme sa capacité à produire des bénéfices cliniques à long terme à travers une simple perfusion intraveineuse bien tolérée, ou par son mode de production qui se rapproche du médicament (au lieu d'une production de cellules personnalisées pour la thérapie génique *ex vivo*). Tout ceci pourrait rapidement ouvrir la voie à son développement commercial et à une large distribution sur le marché. La thérapie génique par AAV permettrait également de répondre aux besoins médicaux non satisfaits des pays avec des systèmes de soins peu développés parce qu'une seule intervention pourrait soulager la charge liée à une thérapie de remplacement au long cours et aux soins médicaux.

Dans l'immunothérapie des lymphocytes T pour le cancer, le nombre de CARs en tests cliniques est en train d'augmenter rapidement (40 essais cliniques en cours à ce jour). La problématique majeure reste la spécificité des cibles et les effets secondaires. Par exemple, dans l'essai sur la LALB, cette approche ne supprime pas seulement les clones malins responsables de la maladie mais aussi presque tous les lymphocytes B du patient, ce déficit peut être suppléé par des perfusions d'immunoglobulines. Cependant, cette destruction cellulaire indésirable non spécifique pourrait limiter l'utilisation des CARs. De plus, la clairance de grosses masses tumorales observées dans ces essais a été accompagnée par des syndromes de lyse souvent graves, ayant même nécessité des soins intensifs suite à la libération massive de cytokines à partir des lymphocytes T activés. Malgré tout, étant donné les remarquables bénéfices observés chez certains patients, d'autres CARs vont probablement être conçus et testés. Cependant, il reste à développer des CARs en définissant de nouvelles cibles plus spécifiques, plus efficaces et moins toxiques ; et à savoir comment la toxicité des CARs peut être gérée, et si

l'immunothérapie adoptive des lymphocytes T sera aussi efficace dans les autres cancers. Bien que la modification génique dirigée des TCRs soit un plus grand défi que transférer de façon additive des CARs, elle devrait être plus efficace au long terme et induire moins de résistance. La correction génique des TCR pourrait rediriger la spécificité des lymphocytes T vers un nouvel antigène par modification des gènes endogènes du TCR. De plus, en guidant les réponses biologiques de lymphocytes T modifiés génétiquement, on supprime le signal de transduction du TCR endogène confondant de la tumeur. Une fois combiné à l'immunothérapie T non spécifique par inhibiteurs de check-point, le résultat des essais récents de transfert de gènes de CARs aux lymphocytes T suggère que l'immunothérapie pourrait devenir un nouveau pilier de la thérapie des cancers avec comme potentiel d'éradiquer la maladie [18].







**Fig. 6. Correction génique par les technologies ZFNs, TALENs et CRISPR/Cas9. D'après Pellagatti A, Boulwood J et al, *Application of genome editing technologies to the study and treatment of hematological disease* (ScienceDirect, 2015).** ZFN : Zinc finger nucléase. TALEN : Nucléase effecteur de type activateur de transcription. ssODN : oligonucléotide simple brin donneur de correction. HDR : réparation homologue dirigée. NHEJ : jonction des extrémités non homologues. PAM : Protospacer adjacent motif. Les ZFNs consistent en un domaine de liaison à l'ADN utilisant des « doigts de zinc » et un domaine nucléase FokI. Les TALENs sont des protéines TALE de liaison à l'ADN fusionnées à un domaine nucléase FokI. Les ZFNs et les TALENs nécessitent tous les deux une dimérisation de FokI pour réaliser une coupure double brin d'ADN. Dans le système CRISPR/Cas9, la nucléase Cas9 se fixe par l'ARN guide en cas de complémentarité de la séquence du guide avec la séquence cible d'ADN et de la présence d'une séquence PAM. Le résultat dans ce cas est une coupure double brin de l'ADN cible. Cette coupure double brin d'ADN peut être réparée soit par la machinerie endogène cellulaire via du NHEJ ou par du HDR.

## 1.7 La correction génique ciblée

Les avancées des techniques de ciblage génique ont permis la renaissance de la thérapie génique. D'abord, il y a la capacité à créer des endonucléases ADN artificielles qui se fixent spécifiquement sur une séquence d'ADN choisie et induisent une coupure double brin, ce qui permet de rendre la correction génique plus efficace et facile à comprendre. Elle permet ainsi de réaliser des objectifs de longue date que sont l'interruption de gènes somatiques, le ciblage de l'intégration de transgènes et la correction génique *in situ* pour la thérapie génique. La thérapie génique ciblée présente les avantages de n'être pas intégrative, donc moins génotoxique, et de respecter le promoteur endogène des gènes et leur régulation physiologique par rapport à la thérapie génique additive.

Toutes ces stratégies impliquent un mécanisme « éclair » d'expression transitoire du complexe nucléase et, dans certains cas, un modèle de réparation pour modifier le génome de manière permanente. Comme elles ciblent une région sélectionnée du génome, ces stratégies suppriment les risques de mutagénèse insertionnelle et de mauvaises expressions transgéniques qui sont associés à la stratégie conventionnelle de thérapie génique additive. Les premiers outils développés (Figure 6) ont été les Zinc-finger nucléases (ZFN) et ont permis d'obtenir des premiers succès *in vitro* [19] et *in vivo* dans un modèle murin humanisé [20]. La correction génique est également récemment entrée en tests cliniques avec l'immunothérapie adoptive des lymphocytes T de patients infectés par le VIH. Les ZFN ont été utilisés pour inactiver le gène qui code pour le CCR5 (corécepteur cellulaire du VIH) dans les lymphocytes T de chaque patient puis ils ont été cultivés *ex vivo* avec pour objectif de rendre ces cellules résistantes à l'infection par le virus avant de les réinjecter [21]. L'inactivation génique a été réalisée par création d'une coupure double brin dans un

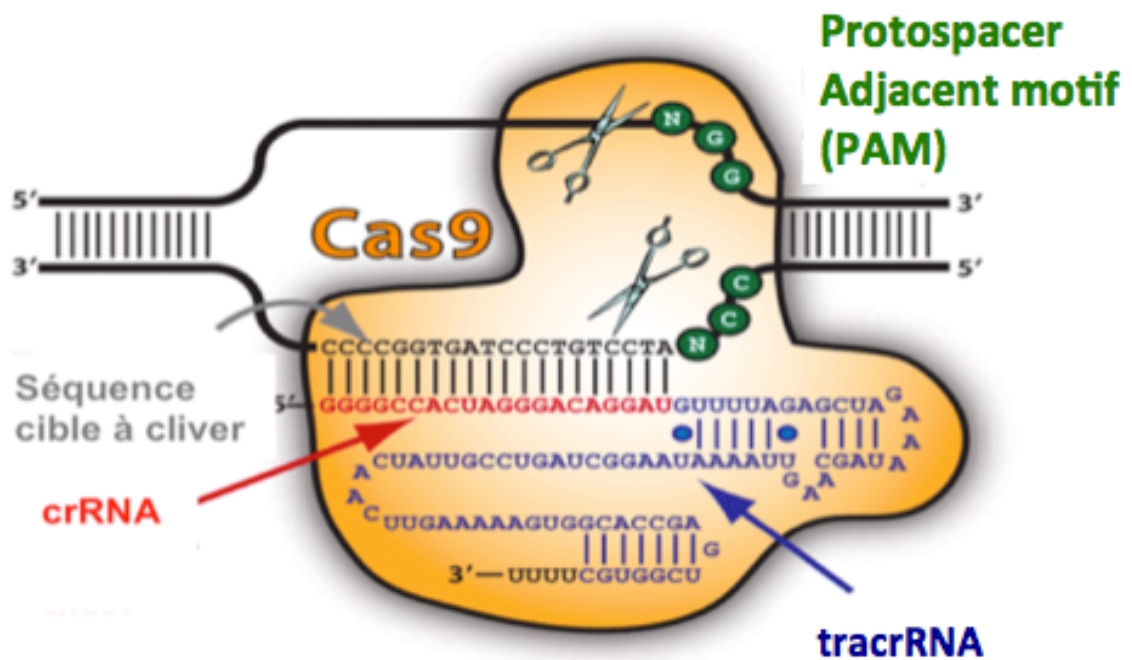
exon du gène du CCR5. La réparation d'une coupure double brin se fait majoritairement par un mécanisme non conservatif, impliquant la voie de jonction des extrémités non homologues (NHEJ). Il mène à une perte ou insertion de bases pendant la jonction des extrémités. Ces insertions-délétions (INDELs) inactivent la séquence codante dans la plupart des cas et aboutit à un knock-out (KO). L'essai a fait la preuve de la sécurité et de la persistance au long terme des cellules modifiées. Cependant, pour réaliser une clairance virale définitive, il faudrait réaliser une correction génique dans des progéniteurs autorenewelables, tels que les CSH. En effet, ces cellules offrent un meilleur potentiel pour reconstituer de manière importante et sur le long terme, le compartiment des lymphocytes T, spécialement si elles sont combinées à un préconditionnement pour supprimer les cellules endogènes non corrigées. Enfin, un essai clinique utilisant les ZFN doit démarrer en 2017 dans le cadre de la Mucopolysaccharidose [22]. Cependant, comme les ZFN sont difficiles à concevoir et manquent d'efficacité, un autre outil plus simple d'utilisation et plus efficace a été développé pour faire de la correction génique : les TALENs (Figure 6) [23].

L'inactivation de gènes ciblés peut aussi être utilisée pour inactiver un facteur de transcription répresseur et ainsi lever une inhibition. Par exemple, l'inactivation du gène répresseur transcriptionnel BCL11A dans les progéniteurs érythroïdes permet de réactiver *in vitro* l'expression des  $\gamma$ -globines fœtales pour compenser ou contrer un dysfonctionnement des chaînes de  $\beta$ -globines dans la  $\beta$ -thalassémie ou dans la drépanocytose [24]. Cependant, une plus grande efficacité d'un knockout bi-allélique est nécessaire pour remplir ces objectifs quand il n'y a pas de mécanismes par lesquels les cellules corrigées peuvent être amplifiées sélectivement.

La correction génique devient aujourd'hui plus ambitieuse quand elle essaie de remplacer une séquence ciblée par une version exogène de choix en utilisant la voie de la réparation des coupures ADN double brin dirigée par homologie (HDR). Pour réaliser ceci, une nucléase artificielle est utilisée en association avec un modèle d'ADN double brin exogène ayant des homologies avec le site ciblé, afin que la nouvelle séquence soit délivrée à la cellule au site voulu. Cette approche a un grand potentiel en thérapie génique *ex vivo* parce que l'intégration ciblée d'une cassette d'expression dans un site sûr, présélectionné du génome, et la reconstitution *in situ* d'un gène mutant, assureront une expression robuste et physiologique sans le risque de mutagenèse insertionnelle. Plusieurs obstacles doivent être surmontés avant que ces stratégies puissent être pleinement exploitées. En effet, l'efficacité de la correction génique médiée par l'HDR reste basse dans la plupart des cellules primaires d'intérêt, telles que les CSH. La manière dont les cellules choisissent entre NHEJ et HDR est mal comprise. Des mécanismes alternatifs à l'HDR qui fonctionneraient en dehors des phases G2/M du cycle cellulaire sont aussi en train d'émerger [25]. La réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN varie selon le type cellulaire et le moment du cycle cellulaire, et les voies de réparation varient entre l'état de différenciation. Du fait de la très faible efficacité de l'HDR (<5% sans sélection dans les cellules HEK 293T par exemple) [26], des systèmes de sélection sont utilisés. Malheureusement, ils nécessitent l'intégration génomique, même transitoire, d'une cassette contenant un gène de résistance à une drogue. L'utilisation d'une drogue de sélection *in vivo* ou *ex vivo* aboutit ensuite à l'amplification d'un très faible nombre de clones corrigés, et non à une reconstitution cellulaire polyclonale souhaitable. L'ensemble de ces limites fait que la transposition clinique de ces nouvelles technologies reste encore à ce jour un défi.

L'avènement des CRISPR plus faciles d'utilisation et d'un coût moindre, devrait permettre l'essor de la correction génique ciblée. Cette dernière est maintenant facilement réalisable à travers l'utilisation de CRISPR-Cas9. Ces nucléases peuvent être rapidement et facilement adaptées pour cibler n'importe quel site ADN par la conception d'un ARN guide (ARNg) au lieu de générer une protéine basée sur la reconnaissance d'une séquence motif pour chaque cible. Par conséquent, de multiples applications ont été trouvées pour la correction génique ciblée de modèles expérimentaux et précliniques. Cependant, pour exporter ces applications à la clinique, il faudra améliorer l'efficacité de ces nucléases (accroître le % HDR) et augmenter leur sureté (diminuer le risque d' « off target »). Les caractéristiques et le mode d'action des principales CRISPR-Cas9 développées à ce jour sont présentés dans le chapitre 2.





**Fig. 7. CRISPR-Cas9 nucléase.** D'après le site internet <https://www.systembio.com>. Mécanisme de défense immunitaire adaptatif des bactéries et *Archea* qui permet la dégradation de l'ADN étranger. Lorsque l'ARN guide s'hybride à la séquence cible, il va emmener avec lui la Cas9. Pour que l'endonucléase soit correctement associée à l'ADN génomique, une séquence PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), située après la séquence cible et constituée de 3 nucléotides NGG, est nécessaire. La Cas9 va induire une coupure sur chaque brin d'ADN. Cet outil est révolutionnaire car il est susceptible de cibler n'importe quel gène, chez n'importe quel être vivant. Deux mécanismes sont possibles pour la réparation de cette coupure : la voie NHEJ qui va réassembler le brin mais peut apporter des insertions ou délétions qui vont induire un changement dans la séquence ou la voie de l'HDR. Ce système de réparation va permettre d'emmener une séquence d'intérêt à l'endroit de la coupure car cette séquence est bordée par des séquences homologues à celles entourant la coupure. Donc pour notre étude d'édition du génome, c'est la voie de l'HDR qui va nous intéresser.

## Chapitre 2 : Amélioration des protocoles de thérapie génique des maladies héréditaires du globule rouge par l'utilisation du système CRISPR-Cas9 : modèle de la Porphyrie érythropoïétique congénitale

Nous proposons, dans notre étude, une alternative à la thérapie génique intégrative par une correction ponctuelle de la mutation responsable de la maladie au niveau du génome cellulaire, sans être additif et tout en conservant la régulation physiologique du gène corrigé. Comme décrit précédemment, il existe des outils qui permettent d'atteindre cet objectif tels que les ZFNs et les TALENs mais qui ont comme inconvénients d'être très coûteux et difficile d'utilisation. Cette opportunité est aujourd'hui envisageable avec le développement de l'outil CRISPR-Cas9 qui permet de couper l'ADN à des endroits précis et de le réparer par HDR si l'on apporte une matrice de correction [27]. CRISPR est un système d'origine bactérienne de plus en plus utilisé pour la correction génique ou « *genome editing* » [28]. Il se compose d'une ribonucléoprotéine composée d'un ARN guide et d'une endonucléase, la Cas9. L'ARN guide est une combinaison du crRNA (crispr RNA) qui est une séquence d'une vingtaine de nucléotides, complémentaire de la séquence du gène cible et du tracrRNA (*transactivating crRNA*) qui sert à la maturation des crRNA et à la fixation de la Cas9 (Figure 7). Lorsque l'ARN guide s'hybride à la séquence cible, il va emmener avec lui la Cas9. Pour que l'endonucléase soit correctement associée à l'ADN génomique, une séquence PAM, située après la séquence cible et constituée de 3 nucléotides NGG (pour la Cas9 *Streptococcus pyogenes*), est nécessaire. La Cas9 (nucléase) va alors induire une coupure double-brin de l'ADN via ses deux domaines RuvC et HNH. Cet outil est révolutionnaire car il est susceptible de cibler n'importe quel gène, chez n'importe quel être vivant.



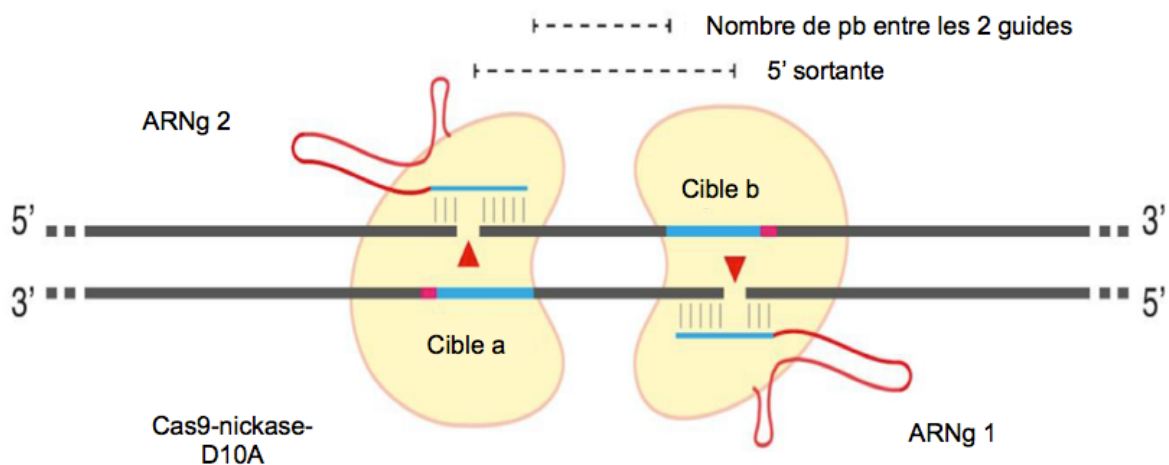
Deux mécanismes principaux sont possibles pour la réparation de cette coupure double-brin :

Le premier, majoritaire, est un mécanisme non conservatoire par NHEJ qui va réassembler les brins. Cependant, cela peut apporter des INDELS qui vont induire un changement dans la séquence et aboutir dans la plupart des cas à un KO du gène par décalage du cadre de lecture.

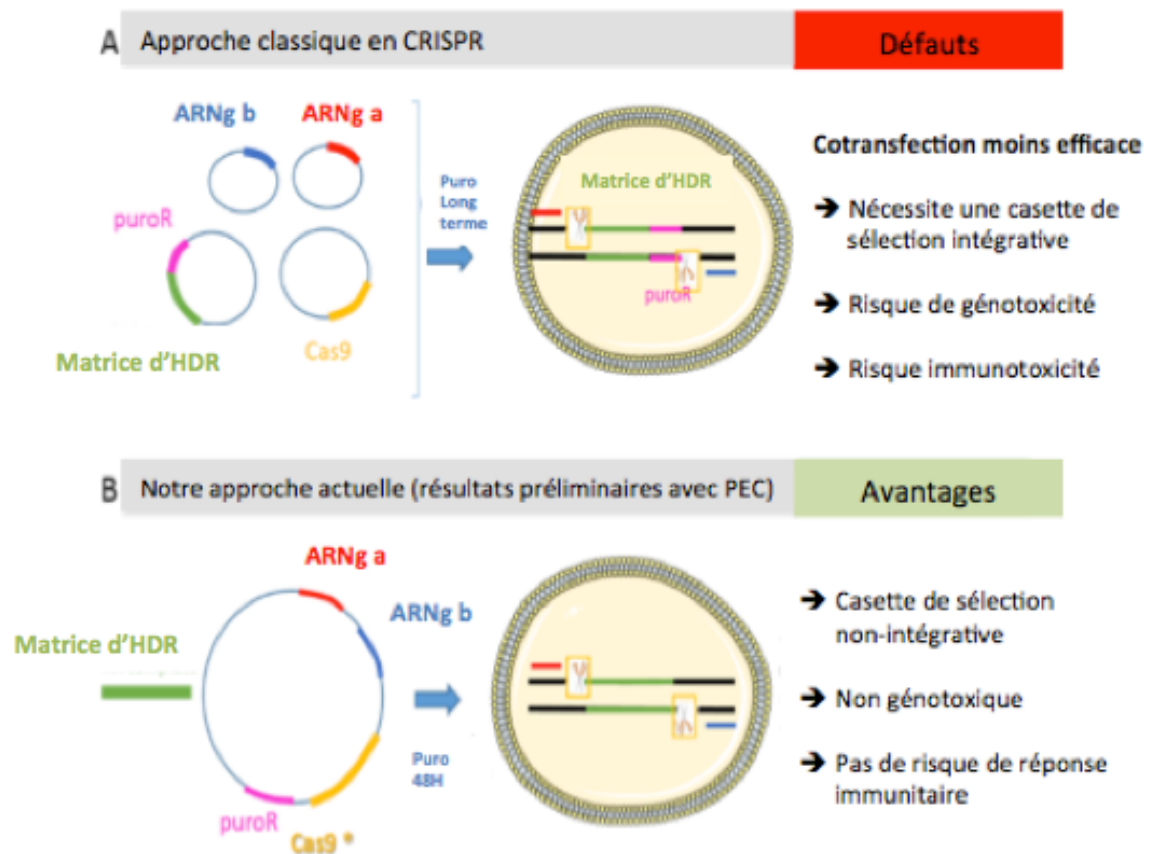
Le deuxième, est la réparation par HDR [29] qui va permettre d'emmener une séquence d'intérêt à l'endroit de la coupure car cette séquence est bordée par des séquences homologues à celles entourant la coupure.

Ainsi, dans l'étude de l'édition du génome en vue d'une thérapie génique, c'est la voie de l'HDR qui va nous intéresser pour apporter une séquence corrigée dans le génome. Malgré la très grande efficacité de la coupure par le système CRISPR-Cas9-nucléase, deux problèmes subsistent à son utilisation pour faire de l'HDR : le mécanisme NHEJ est très majoritaire et la spécificité n'est pas totale. En effet, la Cas9 tolère des mésappariements dans la séquence cible lors de sa reconnaissance, ce qui peut entraîner des mutations non souhaitées causant des effets collatéraux dits « *off target* » [30].

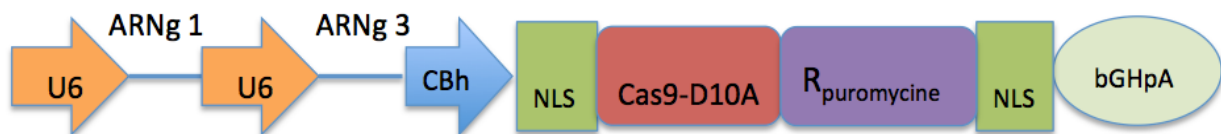
Une nouvelle stratégie CRISPR-Cas9 a donc été mise au point afin d'augmenter la spécificité de la Cas9. Dans cette méthode, la Cas9 est mutée sur un des deux domaines de clivage de l'ADN : le domaine nucléase RuvC (CRISPR-Cas9-D10A). Elle est appelée « *nickase* » (Figure 8) et va induire la coupure d'un seul brin d'ADN cible grâce à un ARNg spécifique de cette séquence cible [31]. Deux systèmes CRISPR avec « *nickase* » vont être utilisés, chaque ARNg sera spécifique d'une séquence différente encadrant la mutation à corriger. La spécificité de coupure est donc fortement augmentée.



**Fig. 8. Double système CRISPR-Cas9-nickase.** D'après Ran F *et al.*, *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity* (Cell, 2013). Pb : paire de bases. Une nouvelle stratégie CRISPR-Cas9 permet d'augmenter la spécificité de la Cas9. Dans cette méthode, la Cas9 est mutée sur un des deux domaines de clivage de l'ADN (CRISPR-Cas9-D10A-nickase). Elle est appelée « *nickase* » et elle va induire la coupure d'un seul brin d'ADN cible grâce à un ARN guide spécifique de cette séquence cible. Deux systèmes CRISPR avec « *nickase* » vont être utilisés. Chaque ARN guide sera spécifique d'une séquence différente encadrant la mutation à corriger. La spécificité de coupure est donc fortement augmentée. Une coupure est induite sur chaque brin et va donc entraîner un équivalent de cassure double brin très spécifique du fait de la proximité des 2 cibles (moins de 100 paires de bases).



**Fig. 9. Apport de la stratégie « tout en un » versus approche classique en CRISPR.** HDR : réparation par homologie dirigée.

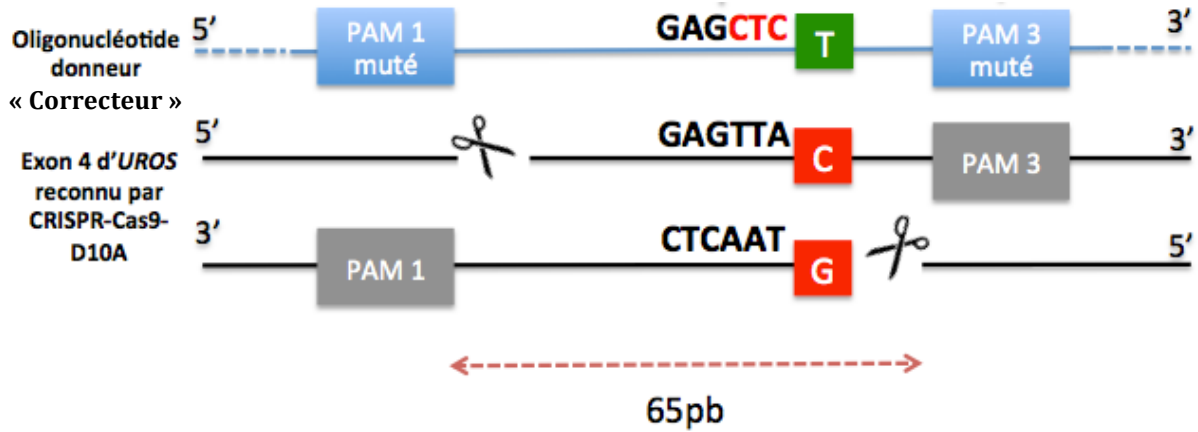


**Fig. 10. Plasmide pX462 modifié.** Plasmide pX462 modifié contenant les 2 ARNg notés arbitrairement 1 et 3 avec chacun leur promoteur U6 respectif. Il y a également le gène codant pour la Cas9 mutée (Cas9-nickase-D10A) et le gène de résistance à la puromycine avec leur promoteur CBh (*hybrid Chicken beta actin promoter*), encadrés par leurs signaux de localisation nucléaire (NLS) leur permettant d'être importés dans le noyau grâce aux importines. bGHA est le signal de polyadénylation.

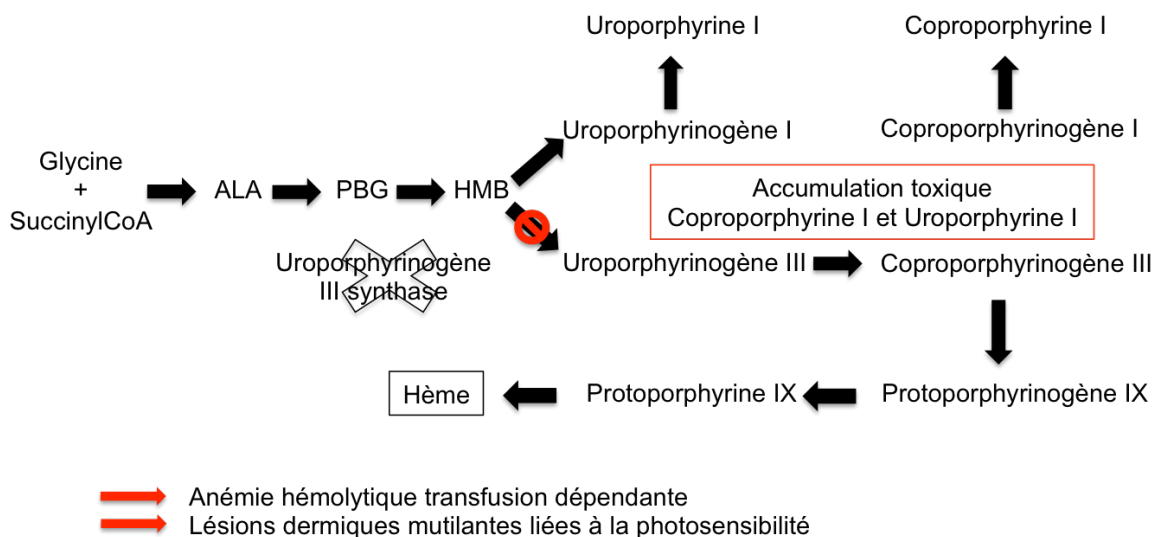
Une coupure est induite sur chaque brin et va donc entraîner un équivalent de cassure double brin très spécifique du fait de la proximité des deux cibles. Ce système permet donc d'augmenter la spécificité.

Ces outils peuvent être apportés dans la cellule par des lentivirus intégratifs ou des systèmes non intégratifs (plasmides). Nous avons choisi cette 2<sup>e</sup> option dans le but d'éviter de la génotoxicité insertionnelle.

Pour obtenir une correction génique, il faut transfecter la Cas9-nickase + 2 ARNg + la matrice de correction, contenus dans différents plasmides. Il existait donc un problème d'efficacité de la transfection car les cellules devaient incorporer plusieurs plasmides (Figure 9). Pour augmenter l'efficacité de la transfection, le plasmide pX462 a été développé. Non intégratif, il permet l'expression transitoire simultanée de CRISPR-Cas9-nickase, des 2 ARNg et d'un gène de sélection transitoire codant la résistance à la puromycine (Figure 10). Classiquement, la séquence correctrice homologue est apportée sous la forme d'une séquence double de plusieurs kilobases dans un plasmide. Récemment, la possibilité d'une correction d'une cassure double-brin d'ADN induite par CRISPR-Cas9-nickase par un oligonucléotide simple brin a été décrite [31].



**Fig. 11. Correction de la mutation dans l'exon 4 du gène *UROS* au niveau du 217<sup>ème</sup> nucléotide par l'apport d'un oligonucléotide simple brin donneur et la méthode CRISPR-Cas9-D10A-nickase.** La mutation sur le gène *UROS* est représentée par le **C** rouge qui correspond à une cytosine en place d'une thymine en temps normal sur le brin 5' 3'. L'oligonucléotide donneur simple brin de 181 paires de bases apporte la correction par un **T** vert qui représente une thymine. Il est complémentaire du brin 3' 5', a les deux PAM 1 et 3 mutés, et un site de restriction GAGCTC digéré par *SacI*. Le site de restriction silencieux incorporé dans l'oligonucléotide permettra de vérifier facilement par PCR et analyse de restriction, que le gène a été correctement édité. Les 2 PAM sont mutés pour empêcher la Cas de recouper le gène *UROS*. Les 2 coupures simples brins sont suffisamment proches pour donner un équivalent double brin et génèrent des extrémités 5' sortantes indispensables pour faire de l'HDR avec un oligonucléotide simple brin.



**Fig. 12. Schéma du blocage de la voie de biosynthèse de l'hème impliquée dans la porphyrie érythropoïétique congénitale.** L'Uroporphyrinogène III synthase permet la synthèse de l'uroporphyrinogène III à partir de l'hydroxyméthylbilane (HMB). En cas de déficience en Uroporphyrinogène III synthase, il y a une accumulation de porphyrines de type isomérique I fluorescentes (Coproporphyrine I et Uroporphyrine I en impasses métaboliques) responsables de la porphyrie érythropoïétique congénitale. La clinique se manifeste par une anémie sévère et des lésions dermiques mutilantes liées à la photosensibilité à cause de l'accumulation toxique de ces porphyrines dans la peau et le globule rouge.

Il s'agit d'un oligonucléotide simple brin d'ADN d'environ 180 paires de bases (pb) présentant des homologies avec la séquence cible sur ces 2 bras et qui va être donneur pour corriger la mutation. Les coupures doivent être 5' sortantes pour faire de la recombinaison homologe comme c'est le cas avec les matrices de correction double brin d'ADN (Figure 11). Les avantages sont multiples : efficacité équivalente, coût moindre, plus facile à transfecter et sans risque d'intégration génomique.

Dans la littérature, une correction génique utilisant les nucléases a été rapportée pour de nombreuses pathologies comme le déficit en alpha1 anti-trypsine [32], l'épidermolyse bulleuse [33] et la  $\beta$ -thalassémie [34]. A ce jour, toutes ces corrections obtenues ont été réalisées en utilisant des systèmes intégratifs excisables [35]. De plus, la recombinaison homologe dirigée dans la plupart des cas est utilisée pour l'insertion d'un transgène sous forme d'ADN complémentaire sous la dépendance d'un promoteur (exogène ou d'un autre locus) dans une région non physiologique du génome et non pour l'édition d'une mutation.

**Nous proposons donc dans cette étude d'évaluer la faisabilité d'une correction génique efficace et définitive au locus grâce à l'utilisation transitoire de la technologie CRISPR-Cas9-nickase non intégrative dans le cadre de maladies hématologiques génétiques. Le modèle utilisé est la Porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC) et le système qui sera développé dans notre projet pourrait présenter comme avantages une sélection transitoire, non génotoxique *in vitro* et le respect du promoteur endogène du gène corrigé et de sa régulation physiologique.**

La Porphyrurie érythropoïétique congénitale est une maladie autosomique récessive découverte par Schultz en 1874. Elle est due à une ou plusieurs mutations au niveau du gène *UROS* codant pour l'uroporphyrinogène III synthase (Figure 12) [36]. La mutation la plus fréquente (50% des cas) est la c.217T>C sur l'exon 4 du gène *UROS*, [37] qui correspond à une substitution d'une thymine par une cytosine en position 217. Elle aboutit à un changement d'une cystéine par une arginine au niveau du 73<sup>ème</sup> acide aminé (p.C73R) [38]. Une autre mutation importante située sur l'exon 10 (c.683C>T) du gène *UROS* est responsable d'une substitution d'une thréonine par une méthionine au niveau du 228<sup>ème</sup> acide aminé (p.T228M) [39]. Ces 2 mutations sont portées à l'état hétérozygote composite par les fibroblastes de patients déficients en *UROS* utilisés dans cette étude. Un déficit sévère en uroporphyrinogène III synthase (<1-2%) conduit à une accumulation de porphyrines isomériques de type I toxiques qui vont pouvoir être libérées au niveau des tissus, en particulier la peau. La maladie est sévère car ces porphyrines de type I sont photoréactives. Elles vont être excitées par la lumière visible (400-410 nm) et émettre une fluorescence rouge qui réagit avec l'oxygène pour libérer des radicaux libres. Ces derniers vont entraîner deux types de dommages au niveau des tissus : des lésions dermatologiques de sclérodermie, et une déstabilisation de la membrane des hématies par fragilité osmotique, à l'origine d'une anémie hémolytique grave transfusion dépendante [40].

A ce jour, seule la thérapie cellulaire par greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques constitue un traitement efficace pour la PEC [6]. Cependant, la question de la disponibilité d'un greffon hématopoïétique histocompatible avec le receveur persiste, ainsi que le risque de réaction de greffon contre l'hôte. La thérapie par greffe des cellules du patient corrigées *ex vivo* est une alternative pour pallier au

manque de donneurs. La preuve d'une correction phénotypique de cellules malades par des vecteurs lentiviraux intégratifs dans des souris PEC a été faite par thérapie génique additive « *ex vivo* » au laboratoire. Cependant, l'apport du gène *UROS* au hasard dans le génome de la cellule corrigée peut induire de la mutagenèse insertionnelle. Il serait donc préférable de corriger la mutation responsable de la PEC au niveau du gène *UROS* sans être additif et tout en conservant sa régulation physiologique. En effet, la correction d'un seul allèle doit permettre une restauration phénotypique, car 10% d'activité enzymatique *UROS* suffisent pour éviter la formation de porphyrines toxiques. L'objet de mon travail est de mettre au point les outils en vue de cette correction et de montrer sa faisabilité.

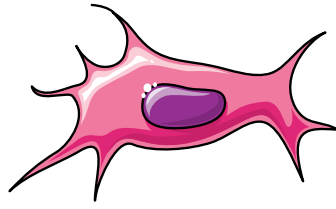




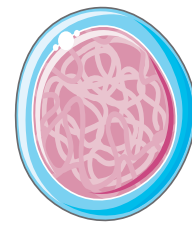
# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**



HEK 293T



Fibroblastes



Cellules souches  
hématopoïétiques

**Fig. 13. Les 3 types cellulaires utilisés en culture.**

## 1/ Culture cellulaire

Différents types cellulaires ont été utilisés pour les expériences de correction génique (Figure 13).

D'abord, une lignée cellulaire : HEK 293T (Human Embryonic Kidney immortalisées avec l'antigène T du virus Sv40) qui proviennent de l'ATCC® pour la mise au point de la technique. Les HEK 293T ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco®, Life Technologies) avec 1g/l de D-Glucose, de la L-Glutamine et du Pyruvate sans glutamax, supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10%), de l'amphotéricine (250µg/ml) et de pénicilline (100UI/ml) et de la streptomycine (10µg/ml) (Pen/Strep Gibco®).

Puis, des cellules primaires : des fibroblastes porphyriques immortalisés (PECi) et des CSH de sang de cordon CD34<sup>+</sup> pour la preuve de principe. Les fibroblastes PECi sont issus d'une biopsie cutanée d'un patient, après obtention de son consentement. Ils portent les mutations c.217T>C et c.683T>C au niveau de *UROS* (hétérozygotes composites). Ils ont été immortalisés par l'antigène T du virus SV40 et TERT [41]. Ils ont été mis en culture dans du milieu DMEM GlutaMAX (Gibco®, Life Technologies) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (20%), de l'amphotéricine (0,25µg/ml), de la pénicilline (100UI/ml) et de la streptomycine (10µg/ml) (Pen/Strep Gibco®).

Les cellules CD34<sup>+</sup> sont issues de dons de sang de cordon ombilical de l'hôpital Bagatelle. Elles ont été obtenues après un gradient de Ficoll pour récupérer les cellules mononucléées, puis purifiées avec un anticorps anti-CD34<sup>+</sup> couplé à une bille aimantée. Elles ont été mises en culture dans du milieu Stem Span (Stem Cell™) supplémenté avec du FLT3l (100ng/ml), du SCF (100ng/ml), de la TPO (100ng/ml) (PETROTECH®), de l'amphotéricine (0,25µg/ml), de la pénicilline (250µg/ml (100UI/ml) et de la streptomycine (10µg/ml) (Pen/Strep Gibco®).

## 2/ Détermination de la séquence donneuse

Pour notre projet, nous avons fait le choix d'utiliser une séquence correctrice donneuse simple brin. Il s'agit d'un oligonucléotide de 181 pb, sélectionné par homologie de séquence avec l'exon 4 du gène *UROS* humain. Il encadre le site de la mutation la plus fréquente dans la PEC (c.217T>C) pour permettre l'HDR. Des modifications silencieuses de la séquence ont été introduites sur l'oligonucléotide donneur : les 2 sites PAM ciblés par les 2 ARNg ont été mutés pour éviter le clivage secondaire de l'ADN corrigé par la « *nickase* Cas9-D10A ». De plus, cette séquence a été modifiée de manière à apporter un nouveau site de restriction (Sacl) (Figure 14).

Trois types d'oligonucléotides sont utilisés :

- un « correcteur » permettant de corriger la mutation c.217T>C, rétablissant le nucléotide T présent sur l'allèle sauvage.
- un « PEC » apportant la mutation c.217T>C dans des cellules saines
- un « Rescue » permettant de corriger la mutation c.217T>C, rétablissant le nucléotide T présent sur l'allèle sauvage sans apporter de site de restriction Sacl.

L'intérêt pour l'oligonucléotide « correcteur » sera de vérifier facilement par PCR suivie d'une analyse de restriction que le gène a été correctement édité. Ces oligonucléotides ont été synthétisés par la société IDT (Integrated DNA Technologies).

```
TTTTGGTGTGCAGCTTTCTCATCCTGAAGATTACGGGGGACTCATTTTTACTAGCC
CCAGAGCAGTGGAAGCAGCA GAGCTC T GTTTGGAGCAAACAATAAACTGAAG
GTGAGGGTGGGTCTGCTGTCGATTCCACTGGACATTATTTACTCTTATTTCTCCT
GCTGGGAGACTAAAT
```

**Fig. 14. Séquence de l'ADN de l'oligonucléotide « correcteur » pour la mutation c.217T>C sur l'exon 4 du gène *UROS*.** CTA au lieu de CCA (PAM1) et TCG au lieu de TGG (PAM3) sur l'allèle sauvage : PAMs modifiés associés aux guides avec le même chiffre. GAGCTC au lieu GAGTTA apportant un site de restriction silencieux reconnu par SacI. **T** : nucléotide correcteur pour la mutation c.217T>C.

### 3/ Sélection des ARN guides et clonage dans le pX462

Les ARNg ont été sélectionnés avec l'algorithme CHOP CHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>) sur la séquence du gène *UROS* humain (NCBI Reference Sequence : NM\_000375). Ils ont été choisis en fonction de leur position sur le génome afin qu'ils soient proches de la mutation d'intérêt et en fonction de leur classement par l'algorithme. Les ARNg les mieux classés ont un taux de GC compris entre 40 et 80% [42] et leur séquence n'est présente qu'une fois dans le génome pour éviter au maximum les clivages « off-target ». Les bases correspondantes au site de restriction de l'enzyme BbsI ont été ajoutées aux extrémités des séquences des ARNg prédits afin de permettre leur insertion dans le plasmide pX462 contenant la nickase-Cas9-D10A. Les oligonucléotides codant les ARNg ont été synthétisés par la société Eurogentec®. Ci-dessous, les séquences des 3 ARNg ciblant la mutation c.217T>C avec en noir le site BbsI pour le clonage et en rouge la séquence du guide (Figure 15).

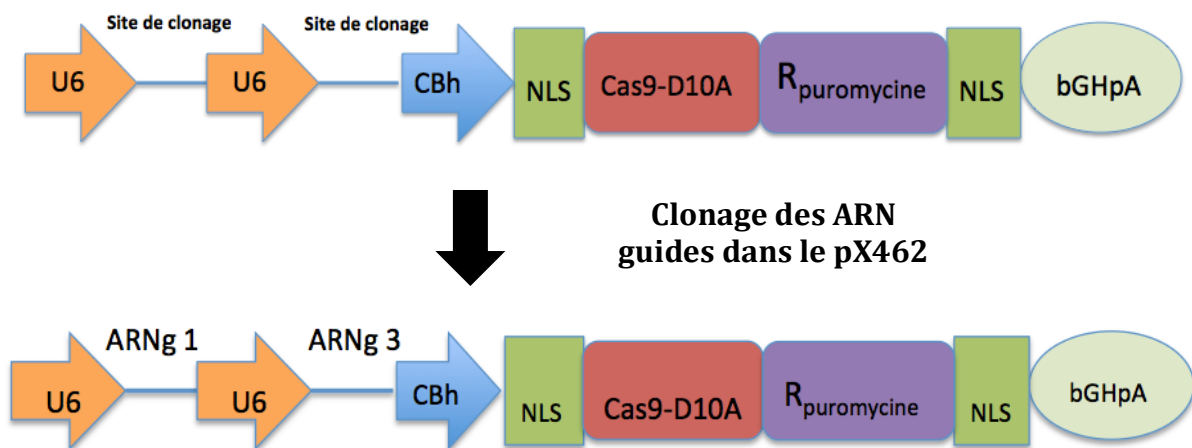
ARNg1 : CACCGTGCTTCCACTGCTCTGGGGC

ARNg2 : CACCGGAAGCAGCAGAGTTACGTT

ARNg3 : CACCGAGGTGAGGGTGGGTCTGCTG

**Fig. 15. Séquences de l'ADN codant les 3 ARN guides ciblant l'exon 4 du gène *UROS*.** Les couples de guides 1 et 3 ou 1 et 2 peuvent être associés pour faire fonctionner la CRISPR-Cas9-D10A (chaque guide d'un couple ciblant un brin différent et entraînant une coupure différente de l'ADN). Le CACCG est nécessaire au clonage de ces guides dans le plasmide pX462 et correspond à BbsI.

L'intérêt du plasmide pX462 « tout en un » est d'augmenter l'efficacité de la transfection car les cellules n'ont plus qu'un seul plasmide à incorporer (Figure 16).

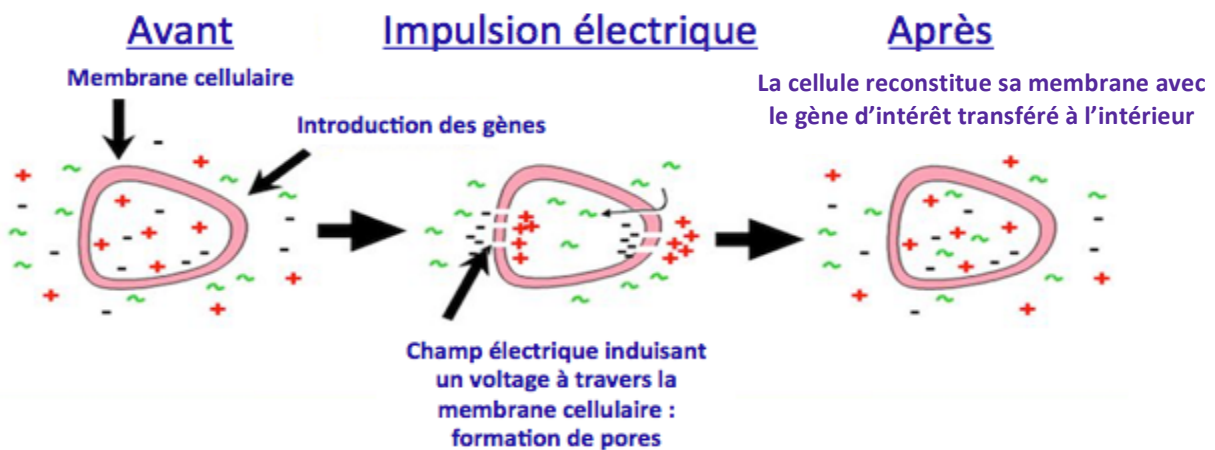


**Fig. 16. Clonage des ARN guides dans le plasmide pX462.** Plasmide pX462 avec et sans les 2 ARNg notés arbitrairement 1 et 3 avec chacun leur promoteur U6 respectif. Il y a également le gène codant pour la Cas9 mutée (Cas9-nickase-D10A) et le gène de résistance à la puromycine avec leur promoteur CBh (*hybrid Chicken* beta actin promoter), encadrés par leurs signaux de localisation nucléaire (NLS) leur permettant d'être importés dans le noyau grâce aux importines. bGHA est le signal de polyadénylation.

## 4) Transfection par électroporation

L'électroporateur Nucleofector<sup>TM</sup> 2b Device (Lonza) a été utilisé pour la transfection de nos plasmide et oligonucléotide. Le nombre de cellules transfectées a été déterminé avant chaque transfection.

L'électroporation est une méthode d'introduction d'ADN dans des cellules par application d'un champ électrique sur les membranes qui seront ainsi déstabilisées et l'ADN présent dans l'espace extracellulaire pourra rentrer dans les cellules (Figure 17).



**Fig. 17. Principe de l'électroporation. D'après et modifié par le site internet <http://slideplayer.fr/slide/4026972/>. Pendant l'électroporation, un champ électrique permet d'introduire du matériel génétique à travers les pores de la membrane cellulaire.**



Les cellules ont été centrifugées à 1000rpm pendant 5min puis lavées avec du PBS afin d'enlever le milieu de culture. Chaque culot cellulaire a été remis en suspension dans 100µl de la solution de nucléofection fournie par des kits différents selon le type cellulaire : HEK (Cell Line Nucleofector® Kit V), fibroblastes PECi (NHDF Nucleofector® Kit) et CSH CD34<sup>+</sup> (Human Stem Cell Nucleofector® Kit). Les quantités de plasmides et d'oligonucléotides donneurs sont ensuite ajoutées. Différents programmes de nucléofection ont été utilisés en fonction des recommandations du fournisseur. 24 heures après la transfection, la puromycine est ajoutée sur les cellules pendant 48h afin de sélectionner les cellules ayant reçu le plasmide contenant la Cas9 et les guides : 2µg/ml pour les cellules CD34<sup>+</sup> et HEK 293T, 1µg/ml pour les fibroblastes PECi.

## 5) Analyse de l'HDR dans les cellules transfectées

Les cellules transfectées ont été amplifiées puis leur ADN a été extrait avec le kit « *Genomic DNA from tissue, NucleoSpin Tissue* » (Macherey-Nagel®). Les cellules ont été lysées avec la solution commerciale et l'ADN a été filtré sur une colonne de silice. L'ADN a ensuite été dosé au Nanodrop®. Une PCR a été réalisée, avec une « HotStarTaq Plus DNA Polymerase » (Qiagen®), sur l'ADN extrait des cellules transfectées. L'exon 4 a été ciblé avec les amorces suivantes qui encadrent la zone d'édition ciblée par l'oligonucléotide

5' TAGTTCCAGGCACATAGTAAGCAC 3' (amorce sens)

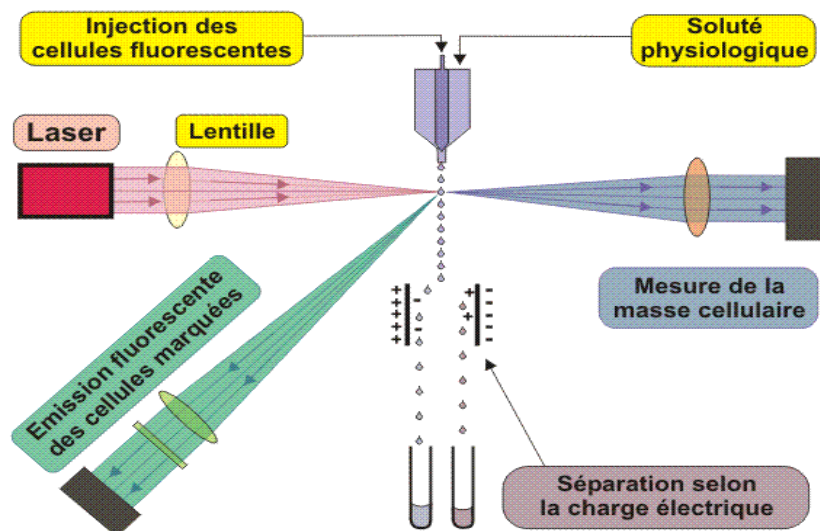
5' AGGAGGTGAACAACGAATAGACAG 3' (amorce anti-sens).

L'amplification attendue était de 490pb. Ce produit de PCR a été digéré par l'enzyme de restriction *SacI* pour vérifier l'évènement d'HDR. Le produit de digestion a été visualisé sur un gel d'agarose 2% ou électrophorèse capillaire TapeScreen 2200 (Agilent Technologies®). Les bandes attendues après digestion étaient de 230 et 260pb. Afin de vérifier les résultats observés sur gel d'agarose, les produits de PCR ont été séquencés par Sanger (GATC Biotech®) et analysés sur ApE1®.

## 6) Cytométrie en flux

Les cellules transfectées avec l'oligonucléotide « PEC » sont triées selon leur fluorescence par le BD FACSAria Trieur de la plateforme de cytométrie en flux de

l'Université de Bordeaux (Figure 18). Un laser bleu UV à 375nm est utilisé pour exciter les cellules. Un filtre à 670 LP permet de récupérer la fluorescence rouge que les cellules émettent si elles ont accumulé des porphyrines (cellules appelées fluorocytes). Puis, la cytométrie en flux a été réalisée sur le FACS BD Canto 2 du laboratoire en utilisant le programme phycoerythrine et cyanine dye (PE-Cy5) qui est équivalent au précédent. Un laser bleu à 488nm est utilisé pour exciter les cellules. Un filtre à 670nm permet de récupérer la fluorescence rouge que les cellules émettent si elles ont accumulé des porphyrines.



**Fig. 18. Principe de la cytométrie en flux et du trieur de cellules. D'après le Dr Denoux (Centre François Baclesse).**

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer, sur une suspension de cellules, leurs caractéristiques individuelles telles que la taille, la forme et la complexité et n'importe quel composant ou fonction qui puissent être détectés par un composé fluorescent.

Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceau(x) laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que :

- la taille, la forme, la structure interne et la granularité des cellules.
- les signaux de fluorescence (autofluorescence ou fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule).

Le tri peut être défini comme la séparation physique de cellules d'intérêt à partir d'une population hétérogène. Au moment de l'interception de la cellule avec le faisceau laser, la lumière déviée et la fluorescence émise génèrent un signal qui est traité par le programme de tri afin de décider si la cellule doit être isolée ou non. Si une cellule d'intérêt devant être triée a été détectée, le cytomètre va charger la goutte qui en passant entre les plaques de déflexion fortement chargées, va être déviée du côté de la plaque de polarité opposée puis collectée.

Le mode de tri peut être modifié pour choisir un maximum de précision dans le comptage pour un clonage.

## 7) Sous clonage TOPO®

En vue de quantifier l'efficacité de l'HDR de manière clonale, certains produits de PCR ont été sous-clonés dans un vecteur « TOPO TA Cloning » (Invitrogen, Life Technologies®) (Figure 19). Des bactéries électrocompétentes ont été transformées avec ce vecteur et des Mini préparations ont été réalisées à partir des colonies obtenues. Chaque Mini préparation a ensuite été séquencée pour vérifier que la séquence correctrice ait bien été apportée durant l'HDR.

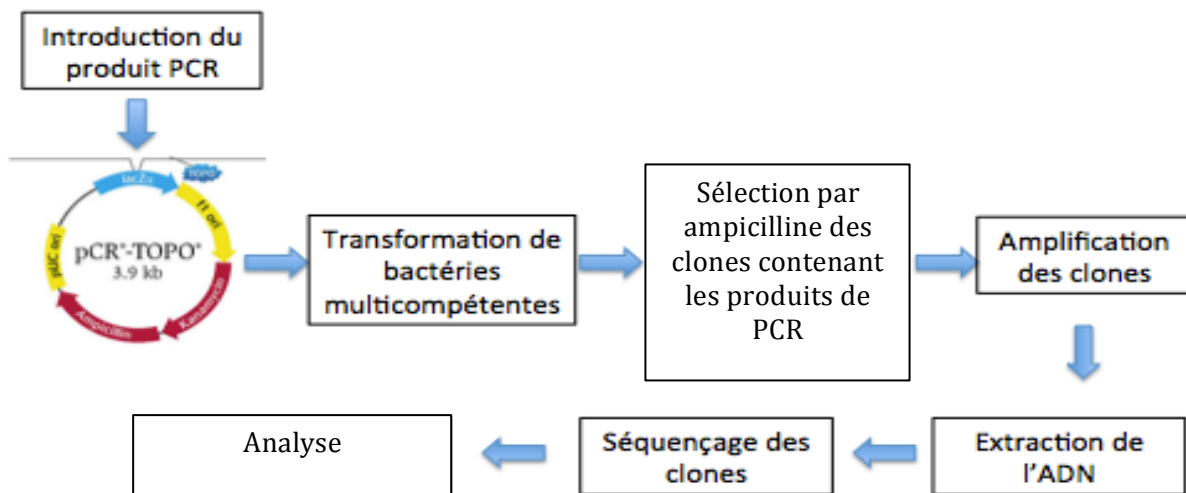


Fig. 19. Stratégie du sous clonage dans vecteur TOPO®.

## 8) Tests statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism®. Un test statistique ANOVA a été utilisé pour analyser la variance et conclure que les échantillons étaient indépendants pour pouvoir comparer 2 groupes. Puis, un test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney non paramétrique a été utilisé pour comparer 2 groupes entre eux car le nombre d'échantillons de chaque groupe était réduit. La présence d'une étoile (\*) signifie que le  $p < 0,05$  et donc qu'il existe une différence significative entre les 2 groupes comparés.



# RÉSULTATS



## 1/ Mise au point technique de l'HDR par CRISPR-Cas9-nickase dans les cellules de la lignée

D'abord, des cellules HEK ont été transfectées par nucléofection avec le plasmide pX462-1-3 (contenant la Cas-nickase-D10A + les ARNg1 et 3 + un gène de sélection à la puromycine) et l'oligonucléotide simple brin « correcteur » en tenant compte des recommandations de la littérature. Ainsi, 1 $\mu$ g de plasmide et 0,3  $\mu$ g d'oligonucléotide ont été apportés soit un ratio molaire oligonucléotide/plasmide Cas9 de 20. L'HDR devait permettre d'apporter le site de restriction SacI. Les résultats d'édition évalués par électrophorèse en gel après digestion et séquençage étaient décevants. Aucune bande de digestion n'a été détectée en gel et le séquençage ne montrait pas d'édition du génome. L'analyse de digestion par une technique plus sensible, en électrophorèse capillaire, révélera plus tard une édition du génome présente mais faible, < 10%.

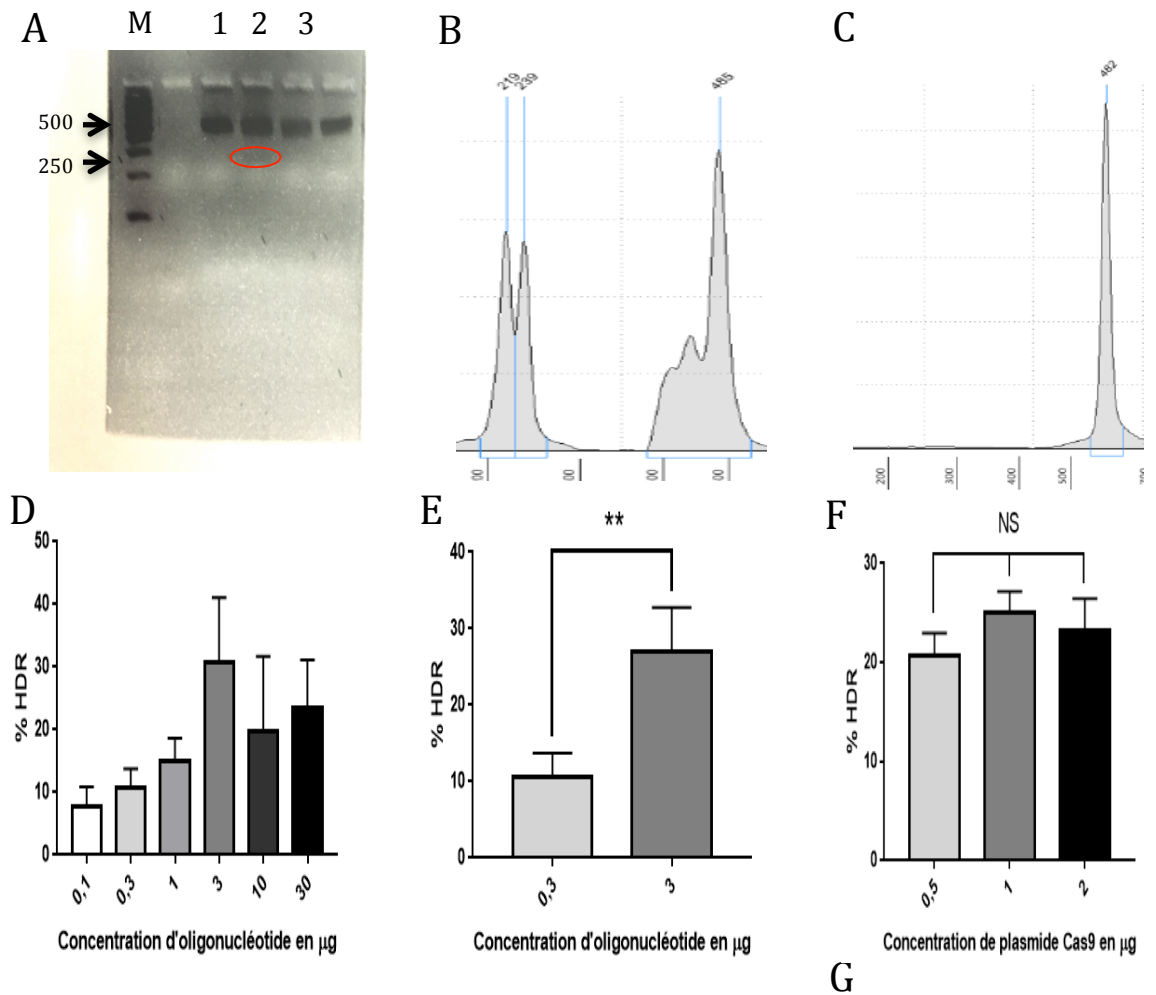
### a) La concentration d'oligonucléotide

Nous avons fait l'hypothèse qu'il s'agissait sûrement d'un manque de matrice de correction donc une gamme de concentrations d'oligonucléotide simple brin « correcteur » a été testée (Tableau 1).

Plasmide ( $\mu$ g)	1				
Oligonucleotide ( $\mu$ g)	0,1	0,3	1	3	10
Ratio molaire Oligonucléotide/Plasmide Cas9	6	20	60	180	600

**Tableau 1 : Gamme de différentes concentrations d'oligonucléotide donneur.** Seule la concentration en oligonucléotide donneur varie tout en conservant la même quantité (1 $\mu$ g) de plasmide pX462-1-3.





**Fig. 20. Mise au point technique de l'édition du génome dans les HEK.**

**A**, Gel d'agarose montrant la digestion enzymatique par *SacI* du produit PCR correspondant à l'ADN des cellules HEK transfectées par 1 µg de plasmide pX462 1-3 et 3 µg d'oligonucléotide « correcteur ». M : marqueur de taille. 1 : ADN d'HEK transfectées par pX462 1-3, non digéré (bande à environ 500pb). 2 : ADN d'HEK transfectées par pX462 1-3, digéré par *SacI*. 3 : ADN d'HEK non transfectées par pX462 1-3. Une légère bande située à environ 250pb au niveau du puits 2 témoigne de la digestion par *SacI*.

**B**, Electrophorèse capillaire montrant la digestion enzymatique par *SacI* du produit de PCR correspondant à l'ADN d' HEK transfectées par 1 µg de plasmide pX462 1-3 et 3 µg d'oligonucléotide « correcteur ». La présence des 2 pics à environ 220 et 240pb témoignent de la digestion par *SacI*.

**C**, Electrophorèse capillaire montrant la digestion enzymatique par *SacI* du produit de PCR correspondant à l'ADN d' HEK non transfecté. La présence d'un seul pic à environ 500pb témoigne de l'absence du site de restriction

**D**, Effet de la concentration en oligonucléotide « correcteur » sur l'HDR. Une quantité fixe de 1 µg de plasmide pX462-1-3 est utilisée dans cette expérience. L'HDR est évaluée indirectement par la quantité de digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction *SacI* en électrophorèse capillaire.

**E**, Comparaison de l'effet de 3 µg versus 0,3 µg d'oligonucléotide « correcteur » sur l'HDR. Une quantité fixe de 1 µg de plasmide pX462-1-3 est utilisée dans cette expérience.

**F**, Effet de la concentration en plasmide pX462-1-3 sur l'HDR. Une quantité fixe de 3 µg d'oligonucléotide « correcteur » est utilisée dans cette expérience. NS : non significatif. Il n'est pas observé de différence sur l'HDR entre la quantité 1 µg (référence) et les autres quantités de la gamme de plasmide Cas9.

**G**, Séquençage du produit PCR correspondant à l'ADN d' HEK transfectées par 1 µg de plasmide pX462 1-3 et 3 µg d'oligonucléotide « correcteur ». Les pics représentent des bases de l'ADN : guanine en noir, adénine en vert, thymine en rouge et cytosine en bleu. Il s'agit du site GAGTGA qui a été édité en site de restriction GAGCTC reconnu par *SacI*. Les 2 flèches bleues indiquent l'édition minoritaire de ce site par rapport à la séquence sauvage.

L'analyse en électrophorèse en gel après digestion permettait difficilement d'évaluer l'HDR (Figure 20A) : seule une discrète bande digérée était visible pour la condition 3 $\mu$ g d'oligonucléotide. Pour plus de sensibilité et pour avoir une approche quantitative, nous sommes passés à une technique d'analyse par électrophorèse capillaire (Figure 20B et C). Les résultats de la gamme d'oligonucléotide montrent l'importance d'utiliser une forte concentration en oligonucléotide, avec un ratio molaire oligonucléotide/plasmide Cas9 de 180 (Figure 20D). Comme il semblait y avoir un plateau à partir de 3 $\mu$ g d'oligonucléotide, nous avons retenu cette valeur pour la comparer au 0,3 $\mu$ g. Au final, le pourcentage d'édition est multiplié par 2,5 à 3 $\mu$ g d'oligonucléotide versus 0,3 $\mu$ g d'oligonucléotide recommandé dans la littérature. (Figure 20E). Cette condition de transfection optimisée sera utilisée tout au long du travail. Ensuite, nous avons évalué la concentration en plasmide nécessaire.

## **b) La concentration en plasmide**

Pour établir la concentration de plasmide pX462-1-3 nécessaire, nous avons effectué une gamme de plasmide tout en conservant la concentration efficace d'oligonucléotide de 3 $\mu$ g. Nous avons encadré la concentration recommandée par la littérature de 1 $\mu$ g de plasmide et nous avons donc testé des concentrations de part et d'autre. En effet, des quantités trop importantes de plasmides peuvent être toxiques pour les cellules alors que des quantités trop faibles peuvent conduire à une baisse de l'édition génique. Nous avons utilisé l'évaluation du %HDR par analyse de la présence du site de restriction par électrophorèse capillaire comme critère d'évaluation. Les résultats de la gamme de plasmide ne mettent pas en évidence de différence d'édition (Figure 20F). Ces résultats montrent que ce n'est

le ratio molaire oligonucléotide / plasmide Cas9 qui est important mais bien la quantité d'oligonucléotides. Nous avons donc conservé notre concentration initiale de 1 $\mu$ g de plasmide tout au long du travail.

### **c) Analyse qualitative par séquençage**

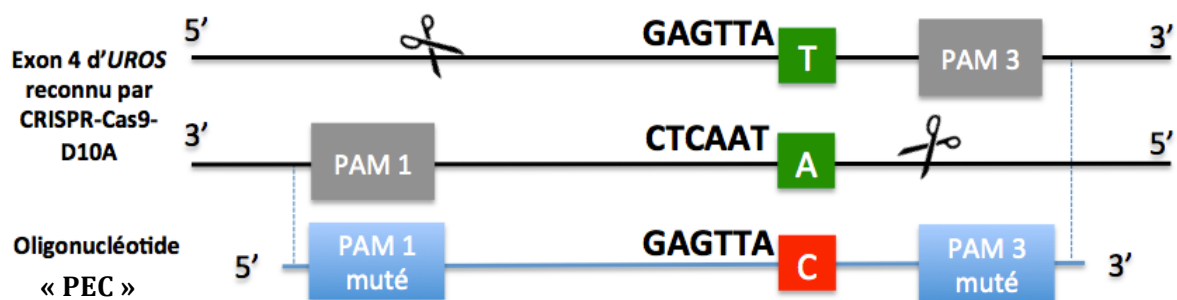
En parallèle, afin d'avoir une deuxième technique pour confirmer notre correction génique, nous avons réalisé de façon systématique un séquençage d'une zone génomique de 490pb encadrant la séquence ciblée par l'HDR. Grâce à cet outil, nous avons pu confirmer l'édition de la séquence au niveau du site de restriction (Figure 20G).

Ces deux travaux préliminaires nous ont permis d'établir des conditions de transfection robustes pour la suite de notre travail permettant d'obtenir l'édition définitive de 30% des allèles du génome au locus souhaité, grâce à un système CRISPR-Cas9-nickase sûr, non intégratif et transitoire.

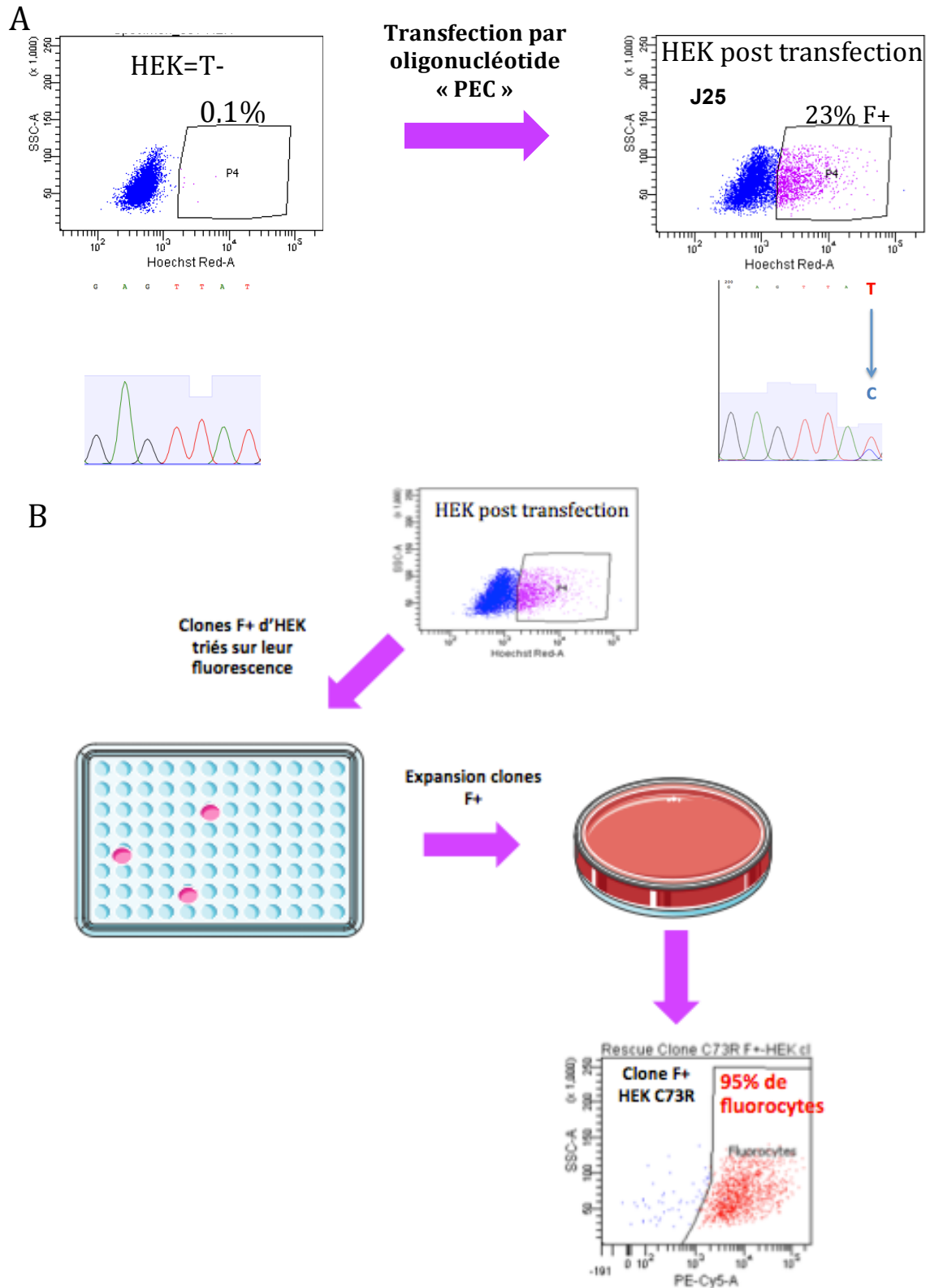
## 2/ Création d'une lignée PEC à partir des HEK

Les cellules primaires PEC de patients sont très difficiles à obtenir et très précieuses car il y a peu de patients dans le monde. Nous ne pouvions donc pas tester des conditions non optimisées sur ces cellules sans avoir amélioré le système au préalable. Nous avons donc décidé d'essayer de créer notre propre lignée cellulaire PEC à partir de la lignée HEK. L'idée était de générer un pool cellulaire PEC très important pour tester nos conditions afin de les corriger et profiter des avantages des HEK : prolifération très rapide.

Nous avons sélectionné un nouvel oligonucléotide donneur appelé « PEC » qui présente cette fois-ci comme caractéristique d'apporter la mutation c.217T>C, la plus fréquemment retrouvée dans l'exon 4 du gène *UROS*. Il ne comporte pas le site de restriction *SacI* mais conserve la mutation des PAM1 et 3 (Figure 21).



**Fig. 21. Apport de la mutation dans l'exon 4 du gène *UROS* au niveau du 217<sup>ème</sup> nucléotide par l'apport d'un oligonucléotide simple brin « PEC » muté c.217T>C (C73R) et la méthode CRISPR-Cas9-D10A-nickase.** L'allèle normal du gène *UROS* est représenté par le  vert qui correspond à une thymine sur le brin 5' 3'. L'oligonucléotide donneur simple brin « PEC » de 181 paires de bases apporte la mutation par un  rouge qui représente une cytosine. Il est complémentaire du brin 3' 5', a les deux PAM 1 et 3 mutés, et n'a pas de site de restriction digéré par *SacI*. Les 2 PAM sont mutés pour empêcher la Cas de recouper le gène *UROS* après édition. Les 2 coupures simples brins sont suffisamment proches pour donner un équivalent de coupure double brin et génèrent des extrémités 5' sortantes indispensables pour faire de l'HDR avec un oligonucléotide simple brin.



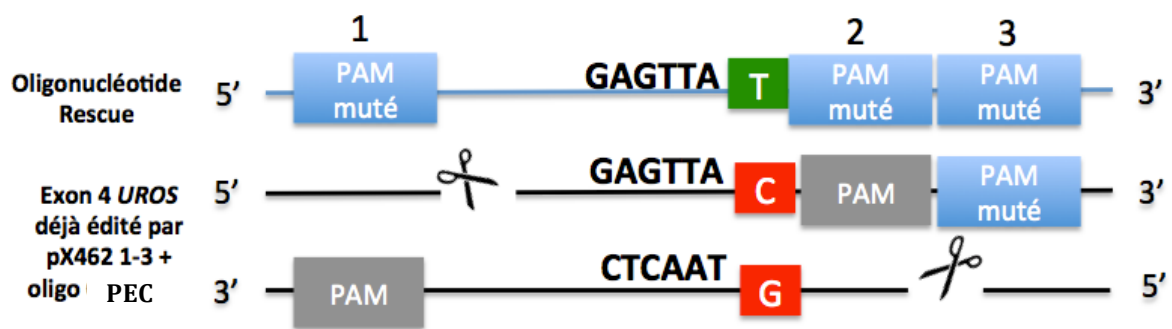
**Fig. 22. Création d'une lignée PEC à partir des HEK.**

**A**, Transfection d'HEK par l'oligonucléotide donneur « PEC ». Des cellules HEK ont été transfectées par électroporation par 1 $\mu$ g de plasmide pX462-1-3 et 3 $\mu$ g d'oligonucléotide « PEC » dans le but de créer une lignée HEK porphyrique C73R. Nous avons obtenu 23% de fluorocytes en FACS à J25. Les séquençages pré et post transfection (polyclonal) montrent qu'une partie des allèles des HEK ont été édités et sont mutés c.217C.

**B**, Création de la lignée HEK porphyrique C73R. Une partie des 23% des fluorocytes ont été triés par FACS et un sous-clonage cellulaire a été réalisé en plaque 96 puits : un clone fluorescent par puits. Après amplification des clones d'HEK, un seul a été retenu après un nouveau FACS car étant fluorescent à 95%.

Ainsi, nous avons transfecté des cellules HEK par l'oligonucléotide « PEC » et le plasmide pX462-1-3. En tenant compte des résultats précédents, nous avons utilisé 1 $\mu$ g de plasmide et 3 $\mu$ g d'oligonucléotide. Pour vérifier si les cellules HEK avaient été éditées avec succès par notre système CRISPR-nickase, nous avons analysé la fluorescence des cellules par cytométrie en flux. En effet, si celles-ci étaient éditées, suite à la modification du gène *UROS*, elles accumuleraient des porphyrines fluorescentes qui est un des stigmates de la PEC, dû à l'absence d'activité enzymatique UROS. Nous avons observé la présence de 23% de fluorocytes (Figure 22A). Cette population est appelée F+. Au niveau génétique, nous avons séquencé le produit de PCR obtenu par extraction du culot cellulaire polyclonal de ces HEK transfectées. L'analyse des séquences polyclonales confirme l'introduction de la mutation c.217T>C dans le génome des HEK (Figure 22B).

Puis, grâce à un tri cellulaire basé sur la fluorescence des cellules, nous avons séparé notre population en 2 : les HEK devenues fluorescentes (F+) ou non (F-). Grâce au FACS trieur, les HEK F+ et F- ont été sous-clonées en disposant 1 cellule par puits dans une plaque 96 puits. Nous avons sélectionné les clones qui avaient proliférés dans le but de vérifier leur fluorescence au FACS et de la comparer aux clones de la boîte non fluorescente. Nous avons obtenu de très bons résultats avec notamment 95% de cellules fluorescentes avec l'un des clones versus 0% pour les clones issus de la boîte non fluorescente. Nous avons donc ensuite amplifié ce clone dans le but d'essayer de le corriger.

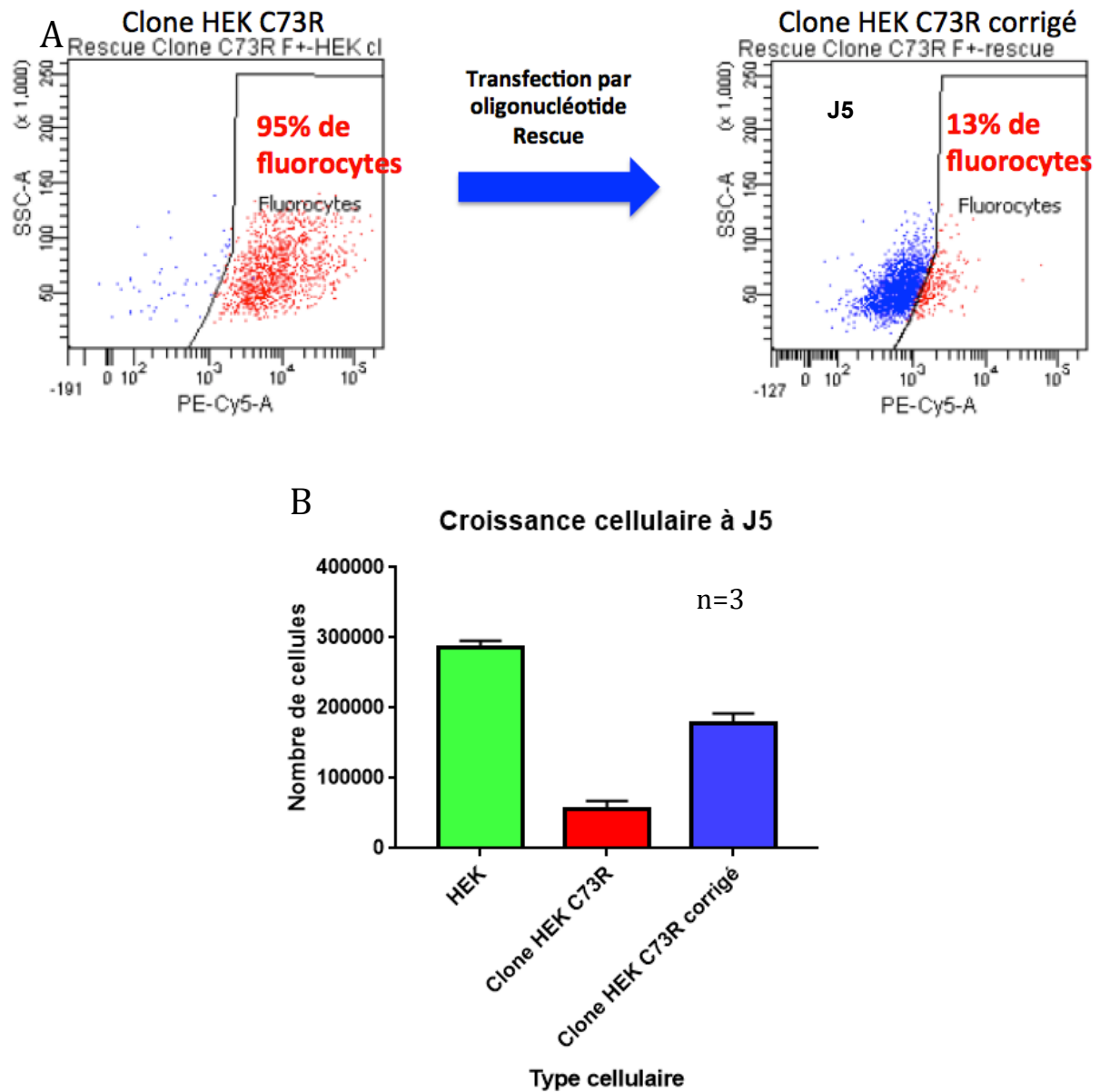


**Fig. 23. Apport de la correction de la mutation dans l'exon 4 du gène *UROS* au niveau du 217<sup>ème</sup> nucléotide par l'apport d'un oligonucléotide simple brin donneur « rescue » et la méthode CRISPR-Cas9-D10A- nickase.** L'allèle muté du gène *UROS* est représenté par le **C** rouge qui correspond à une cytosine sur le brin 5' 3'. L'oligonucléotide donneur simple brin Rescue de 181 paires de bases apporte la correction de la mutation par un **T** vert qui représente une thymine. Il est complémentaire du brin 3' 5', a les trois PAM 1, 2 et 3 mutés, et n'a pas de site de restriction digéré par *SacI*. Les 2 coupures simples brins sont suffisamment proches pour donner un équivalent double brin et génèrent des extrémités 5' sortantes indispensables pour faire de l'HDR avec un oligonucléotide

### **3/ Correction / « Rescue » de notre modèle HEK PEC**

L'intérêt de créer ce modèle HEK PEC était ensuite d'essayer de le corriger, de faire un « rescue ». Pour cela, nous avons développé un nouvel oligonucléotide donneur appelé « rescue ». Il n'a pas de site de restriction Sacl, amène la correction de la mutation c.217T>C. L'analyse de la séquence des HEK PEC montrant un site PAM 3 muté, celui-ci ne pouvait plus être utilisé par l'ARNg 3 pour induire une coupure par la Cas9. Le site PAM3 dans l'oligonucléotide « rescue » a été muté pour être en homologie avec la séquence génomique et nous avons cherché par le site internet de prédiction CHOPCHOP un autre ARNg utilisable sur le même brin pour le remplacer. Nous avons choisi l'ARNg 2 qui utilise le PAM2, juste en aval de la mutation c.217C>T. Le site PAM 1 n'est lui pas modifié dans la séquence génomique. Il sera donc utilisable pour effectuer le « rescue ». Les sites PAM1 et PAM2 qui vont donc être utilisés ici, ont aussi été mutés dans l'oligonucléotide pour éviter un second clivage après édition de la séquence. En parallèle, nous avons également été obligé de développer une version modifiée du plasmide pX462-1-3 où l'ARNg 3 a été remplacé par l'ARNg 2 muté (pX462-1-2m). Notre ARNg 2 est muté de telle sorte qu'il ne reconnaisse que les allèles mutés et corrige la séquence en cas de mutation c.217T>C (p.C73R) (Figure 23).





**Fig. 24. « Rescue » de notre modèle HEK PEC C73R.**

**A**, Transfection de notre clone HEK C73R par l'oligonucléotide donneur simple brin « Rescue ». Des cellules HEK C73R ont été transfectées par électroporation par  $1\mu\text{g}$  de plasmide pX462-1-2m et  $3\mu\text{g}$  d'oligonucléotide donneur Rescue dans le but de corriger la mutation de notre clone C73R. Nous avons obtenu une décroissance remarquable de la fluorescence de 95% à 13% au FACS.

**B**, Comparaison de la croissance cellulaire entre HEK, clone HEK C73R et clone HEK C73R corrigé. 10000 cellules de chaque lignée cellulaire ont été mises en culture puis comptées à J5 en cellule de Malassez. Une augmentation importante de la croissance cellulaire du clone HEK C73R corrigé est observée par rapport au clone HEK C73R.

Ces outils développés pour le « rescue » des HEK PEC pourront par la suite être utilisables pour la correction de cellules primaires de patients.

Ainsi, nous avons transfecté notre clone HEK PEC par l'oligonucléotide « Rescue » et le plasmide pX462-1-2m. Nous avons conservé 1 $\mu$ g de plasmide et 3 $\mu$ g d'oligonucléotide, conditions les plus favorables déterminées dans la première partie du travail. Puis nous avons évalué par FACS le pourcentage de fluorocytes : témoin indirect des cellules HEK non corrigées. En effet, les cellules éditées retrouvent une séquence « sauvage » de *UROS* et donc une activité enzymatique permettant d'éviter la formation de porphyrines fluorescentes. Après correction, nous avons obtenu un résultat de 13% de fluorocytes résiduels contre 95% initialement, ce qui correspond à une correction de 86% des cellules C73R (Figure 24A). Une restauration de la capacité de prolifération de notre clone HEK C73R corrigé comparée au clone HEK C73R est aussi en faveur d'un « rescue » de son phénotype. En effet, la mutation p.C73R génère un désavantage dans la croissance cellulaire des cellules HEK C73R liées probablement à l'accumulation toxique de porphyrines (Figure 24B).

Nous avons donc développé des outils innovants, sûrs et efficaces pour faire de la thérapie génique non additive. Ils consistent en une expression transitoire par un plasmide de la Cas9 et de ses ARNg qui permettent, en présence d'une forte concentration d'oligonucléotide simple brin homologue à la séquence cible, d'obtenir une édition du génome définitive, et sûre. Les avantages sont l'absence d'intégration génomique de la Cas9, avec un risque minimal d' « off-target » et une efficacité d'environ 30% non décrite dans la littérature.

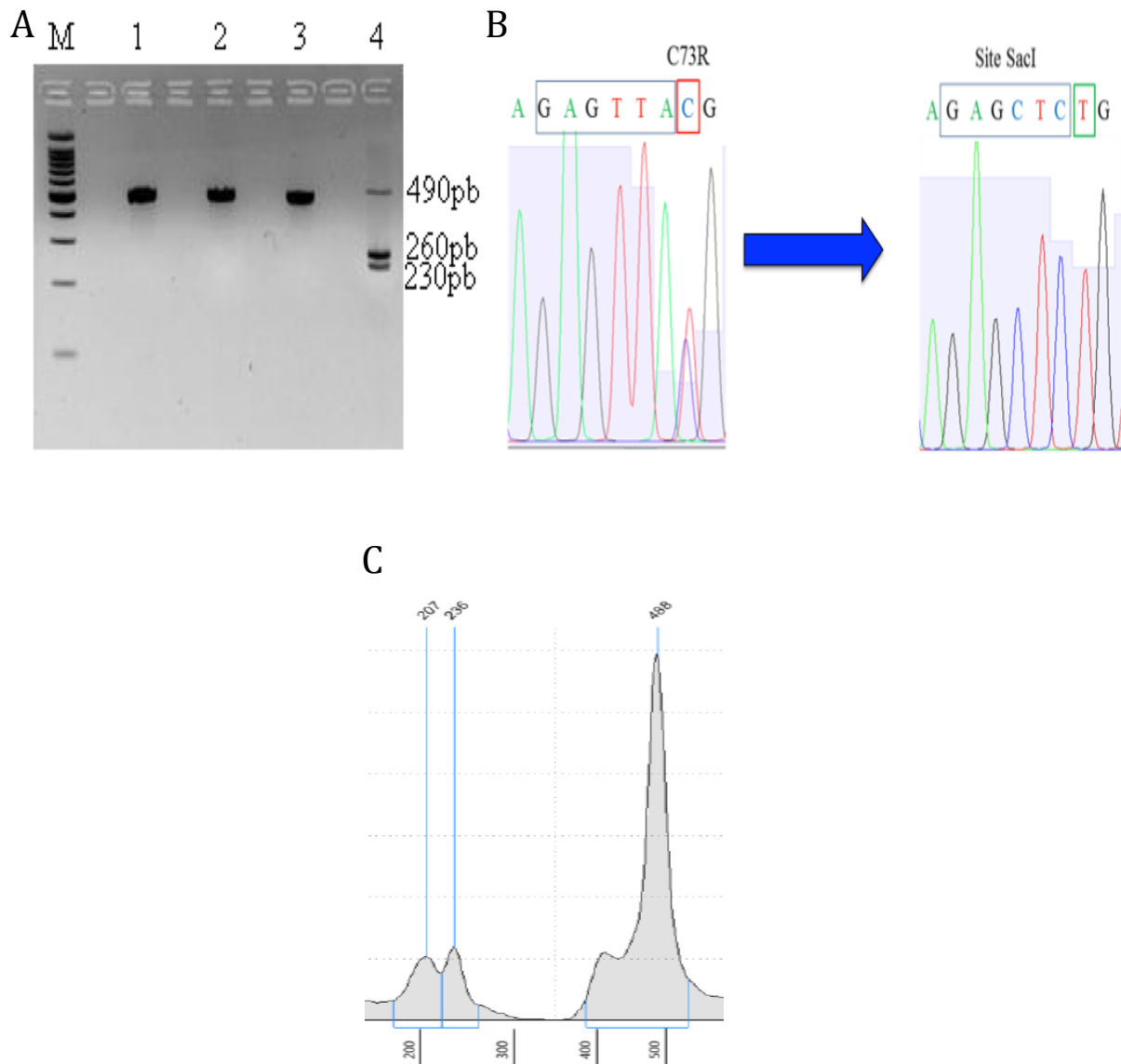


## 4/ Test des outils développés sur les cellules primaires

Ces résultats préliminaires encourageants nous ont permis de passer sur des cellules primaires. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur des cellules souches CD34<sup>+</sup> issues de sang de cordon. Celles-ci sont plus accessibles que les fibroblastes PEC issues des patients, et correspondent à notre cible cellulaire en cas de thérapie génique. En effet, il s'agit d'une maladie du globule rouge et pour guérir les patients, la thérapie génique doit pouvoir s'appliquer aux cellules souches CD34<sup>+</sup>.

### a) Les cellules souches hématopoïétiques

Des CSH ont été transfectées par électroporation avec 1µg de plasmide pX462 1-3 et 3µg d'oligonucléotide « correcteur » en tenant compte des mises au point effectuées sur les HEK. Après digestion par SmaI en gel d'agarose, nous avons obtenu une édition du gène *UROS* visualisée par les 2 bandes 230pb et 260pb qui correspondent à la digestion du produit PCR de 490pb suite à l'intégration du site de restriction SmaI (Figure 25A). Le séquençage du produit de PCR de 490pb confirme son édition avec une présence du site de restriction SmaI (GAGCTC à la place de GAGTTA) (Figure 25B). Afin de quantifier de manière précise cette édition du gène *UROS*, nous avons effectué un sous-clonage du produit PCR dans un vecteur TOPO®. L'analyse des séquences révèle l'édition de 33% des clones (Figure 25C et D).



**Fig. 26. Test des outils sur les fibroblastes primaires de patients PEC.**

**A**, Transfection de fibroblastes PECi par l'oligonucléotide simple brin « correcteur ». M : marqueur de taille. 1-2 : ADN de fibroblastes PECi transfectés par un plasmide GFP, digéré (1) ou non digéré (2) par Sacl. 3-4 : ADN de fibroblastes PECi transfectés par pX462-1-3 muté et l'oligonucléotide simple brin « correcteur », non digéré (3) et digéré (4) par Sacl. Des fibroblastes PECi ont été transfectés par électroporation par 1 $\mu$ g de plasmide pX462-1-2 muté et 3 $\mu$ g d'oligonucléotide simple brin « correcteur ». Aucune bande de digestion par Sacl n'est retrouvée dans les puits 1, 2 et 3 comme attendu, hormis la bande à 490pb, témoin de la non digestion du produit PCR. 2 bandes situées à 230pb et 260pb au niveau du puits 4 témoignent de la digestion par Sacl et du succès de l'édition des fibroblastes PECi lors de la première expérience.

**B**, Séquençage du produit PCR correspondant à l'ADN des fibroblastes PECi transfectés par l'oligonucléotide simple brin « correcteur ». Présence initiale de la mutation à l'état hétérozygote avec une correction génique totale après transfection + édition totale du site GAGTTA en GAGCTC.

**C**, Electrophorèse capillaire réalisée sur des produits PCR de fibroblastes PEC transfecteds par l'oligonucléotide simple brin « correcteur ». 2 $\mu$ g de plasmide pX462 1-2 muté et 3 $\mu$ g d'oligonucléotide simple brin correcteur ont été transfecteds dans des fibroblastes PECi. La présence des 2 pics à environ 210 et 240pb témoignent de la digestion par Sacl et du succès de l'édition génique (HDR = 24%).

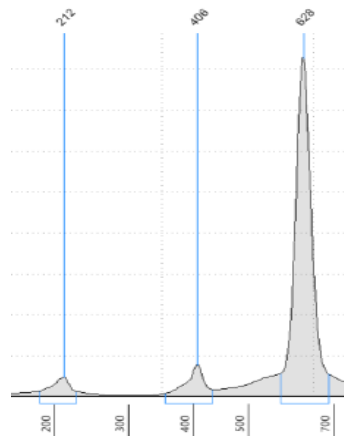
## b) Les fibroblastes PEC

Des fibroblastes de peau de patients PEC hétérozygotes composites (mutations c.217T>C et c.683T>C) ont été transfectés par 1 $\mu$ g de plasmide pX462-1-2 muté (guide 2m spécifique de la mutation c.217T>C p.C73R) et 3 $\mu$ g d'oligonucléotide donneur « correcteur » (contenant la séquence correctrice de la mutation c.217T>C et le site de restriction SacI). L'analyse en gel d'agarose des produits de digestion par SacI nous a permis de voir que le gène *UROS* a été efficacement édité car nous avons retrouvé les 2 importantes bandes issues de la digestion à 230 et 260pb (Figure 26A). De plus, l'analyse du séquençage montre une correction de la mutation c.217T>C (p.C73R) qui semble totale dans les limites de l'analyse, avec la restauration d'une séquence saine (c.217T) ainsi que l'apparition du site SacI (Figure 26B).

L'analyse en électrophorèse capillaire des produits de digestion par SacI a montré que le gène *UROS* a été édité à 24% cette fois-ci (Figure 26C). Cette deuxième expérience confirme l'efficacité des outils développés pour obtenir une correction de la mutation c.217T>C du gène *UROS*. La différence observée (100% par rapport à 24% d'HDR) est probablement due au fait que lors de la première expérience, en raison d'une importante toxicité, nous avons obtenu très peu de clones comparé à la seconde où nous avons une population polyclonale. Le chiffre de 24% se rapproche également plus des valeurs que nous avons observé dans notre mise au point sur les HEK.

## 5/ Test des outils sur une autre région du génome

Pour finir notre preuve de principe, nous avons souhaité tester nos outils pour l'édition sur une autre région génomique. Nous avons ciblé l'exon 10 du gène *UROS* où se situe la mutation c.683C>T (p.T228M). Nous avons transfecté des HEK avec le plasmide pX462-4-9 qui présente la même structure que le pX462-1-3 à la différence que les ARNg 4 et 9 ciblent l'exon 10 du gène *UROS*. Nous avons développé également un oligonucléotide simple brin « correcteur » spécifique de l'exon 10 qui amène la correction de la mutation c.683C>T, un site de restriction *XhoI* dans le but d'évaluer l'HDR, 2 PAM (4 et 9) mutés pour empêcher une recoupe après édition. Après transfection d'HEK par 1µg de pX462-4-9 et 3µg de cet oligonucléotide spécifique de l'exon 10 du gène *UROS*, nous avons obtenu 14% d'édition par analyse des fragments digérés sur électrophorèse capillaire (Figure 27).



**Fig. 27. Édition génique d'HEK transfectées par l'oligonucléotide simple brin « correcteur » de l'exon 10.** 1µg de plasmide pX462-4-9 et 3µg d'oligonucléotide simple brin « correcteur » de l'exon 10 ont été transfectés dans des HEK. La présence des 2 pics à environ 200 et 400pb témoignent de la digestion par *XhoI* et du succès de l'édition génique (HDR = 14%).

Ainsi, nous avons établi la preuve de principe de l'efficacité du système CRISPR-Cas9-double-nickase dans 3 lignées de type cellulaire différent et 2 localisations génomiques distinctes.







## CONCLUSION-DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons développé et mis au point de nouveaux outils permettant d'obtenir, grâce à une expression transitoire, non intégrative, de la Cas9-nickase-D10A, de 2 ARNg et d'une matrice d'ADN donneur simple brin, une édition du génome définitive, sûre (sans intégration génomique de la Cas9, avec un risque minimal de « off-target »), avec une efficacité d'environ 30% non décrite à ce jour dans la littérature, à la fois dans des lignées HEK mais aussi dans des cellules primaires, de patients sains et malades. L'édition des CSH est importante car c'est le type cellulaire à corriger dans la PEC en vue d'une thérapie génique, pour avoir une correction durable dans le temps par différenciation érythroïde secondaire. Quant à l'édition des fibroblastes PEC, ils proviennent d'un patient PEC et prouvent que l'on peut éditer le génome de cellules PEC. Ces résultats ont été rendus possibles par l'utilisation du plasmide « tout-en-un » pX462-1-3 ou 1-2m contenant la Cas9-D10A, les guides, le gène de résistance à la puromycine et à l'utilisation de très fortes concentrations de matrice simple brin d'HDR. Ces résultats « pilotes » prouvent la faisabilité d'une thérapie génique basée sur la technologie CRISPR-Cas9, qui permettrait une correction du gène muté au locus, sans intégration additive dans le génome, et tout en conservant la régulation du gène « réparé » par son promoteur physiologique.

Le système CRISPR-Cas9 a déjà été utilisé pour faire de la correction génique dans les maladies géniques. Classiquement, des plasmides intégratifs secondairement excisables pour apporter le gène de sélection et la matrice d'HDR sont utilisés [43, 44], ainsi qu'un second plasmide pour la Cas9 et l'ARNg. Notre système présente les avantages d'être non intégratif, de ne pas laisser de cicatrice

dans le génome et d'être « tout en un ». De plus, ces études utilisent une nucléase avec un seul guide qui présente un risque d' « off-target » comparé à notre système double-nickase non intégratif [45]. Pour pallier à ce défaut de la nucléase CRISPR-Cas9, la « enhanced Cas9 » a été développée. Cet outil permet de diminuer le risque d'off-target inhérent aux nucléases par la mutation d'un nucléotide de la Cas9 ce qui conduit à une diminution de son activité hélicase [46]. En effet, l'ARNg tolère des mésappariements à l'origine du risque d' « off-target » avec la CRISPR-Cas9-nucléase, mais cette mutation permet d'empêcher ces hybridations ARNg-cible ADN imparfaites et donc de supprimer le risque d' « off target ». Il sera intéressant d'étudier le potentiel de ce nouvel outil (enhanced Cas9) pour faire de l'édition génique et de comparer ses performances au système double-nickase. Enfin, l'originalité de notre étude est l'utilisation d'un oligonucléotide simple brin donneur alors que quasiment toutes les études utilisent des « templates » double-brin sous forme de plasmides. L'avantage de l'oligonucléotide est de pouvoir concevoir des amorces de PCR à l'extérieur de la zone corrigée pour empêcher le risque d'amplification de la matrice de correction et d'éviter tout risque d'intégration potentiel (risques avec un plasmide). Cette technique de correction a déjà été utilisée par Zhang [31] et d'autres. Nous avons obtenu de meilleurs résultats d'HDR (30% vs 5%) car nous utilisons des concentrations d'oligonucléotides plus importantes, une technique de transfection différente (électroporation vs lipofection) et un plasmide « tout en un ».

Cependant, il nous reste encore à démontrer que l'expression de notre système CRISPR-Cas9-D10A est transitoire. Pour cela, nous pourrions réaliser une PCR dirigée contre le gène de la puromycine ou celui de la Cas9 à distance de la transfection pour montrer que le système a bien disparu des cellules transfectées.

L'inconvénient de notre système est la présence concomitante de NHEJ accompagnant l'HDR, ce qui pourrait limiter son application en thérapeutique. Les conséquences du NHEJ sont une inactivation du gène ciblé par INDELS et une diminution du ratio HDR/NHEJ. Ainsi, un axe de développement possible serait de trouver un moyen de diminuer le NHEJ tout en conservant notre efficacité d'HDR (30%). Nos succès dans la correction par thérapie génique non additive de cellules souches normales et de patients atteints de Porphyrie érythropoïétique congénitale sont encourageants pour la suite. Dans les perspectives d'une thérapie génique appliquée aux maladies héréditaires hématopoïétiques récessives, il suffit le plus souvent de simplement corriger quelques CSH. En effet, la correction d'un allèle muté peut suffire à reverser le phénotype par la présence d'un peu de protéine normale par l'avantage sélectif conféré aux cellules corrigées (la présence de 10% de protéine UROS fait disparaître les porphyrines ou entraîne une drépanocytose asymptomatique chez les hétérozygotes). Mais, il faudra également s'assurer par la suite que ce sont les CSH qui sont corrigées, et non pas seulement les progéniteurs pour que la correction génique dure dans le temps. Donc, on peut facilement imaginer étendre ces résultats dans une maladie très répandue telle que la drépanocytose. Il s'agit d'une maladie autosomale récessive caractérisée par une mutation ponctuelle d'un nucléotide au niveau du 6<sup>ème</sup> codon (c.17A>T, p.E6V) qui entraîne le remplacement d'un acide glutamique en position 6 par une valine. Ainsi, comme pour la PEC, la correction d'un allèle permettrait de guérir les patients. La drépanocytose est un problème de santé publique responsable d'une très grande morbi-mortalité. Le seul traitement curatif actuellement disponible est une greffe de moelle osseuse histocompatible mais qui reste très limitée du fait du manque de donneurs et des complications. Un traitement par thérapie génique non

additive transitoire et physiologique pourrait être une alternative pour ces malades sans présenter les inconvénients de l'utilisation des systèmes intégratifs [47].

Enfin, bien que l'édition du génome par CRISPR-Cas9 pose des questions d'ordre éthique, notamment dans le cas de l'application de cet outil au génome germlinal ou à la création d'agents infectieux virulents génétiquement modifiés, ces résultats illustrent une des grandes opportunités apportées par le système CRISPR-Cas9.





## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006 Apr 27;354(17):1813–26.
2. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008 Sep;118(9):3132–42.
3. Hacein-Bey Abina S, Gaspar HB, Blondeau J, Caccavelli L, Charrier S, Buckland K, et al. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *JAMA*. 2015 Apr 21;313(15):1550–63.
4. Hacein-Bey-Abina S, Pai S-Y, Gaspar HB, Armant M, Berry CC, Blanche S, et al. A modified  $\gamma$ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2014 Oct 9;371(15):1407–17.
5. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):318–22.
6. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*. 2009 Nov 6;326(5954):818–23.
7. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*. 2013 Aug 23;341(6148):1233151.
8. Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*. 2013 Aug 23;341(6148):1233158.
9. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*. 2006 Mar;12(3):342–7.
10. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):850–4.
11. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):535–46.



12. Robbins PF, Kassim SH, Tran TLN, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res*. 2015 Mar 1;21(5):1019–27.
13. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003 Oct 17;302(5644):415–9.
14. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, Rosales C, Chowdhary P, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014 Nov 20;371(21):1994–2004.
15. Martino AT, Basner-Tschakarjan E, Markusic DM, Finn JD, Hinderer C, Zhou S, et al. Engineered AAV vector minimizes in vivo targeting of transduced hepatocytes by capsid-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2013 Mar 21;121(12):2224–33.
16. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Oct 16;371(16):1507–17.
17. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2015 Feb 7;385(9967):517–28.
18. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):56–61.
19. Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee Y-L, Kim KA, et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*. 2007 Nov;25(11):1298–306.
20. Genovese P, Schirotti G, Escobar G, Tomaso TD, Firrito C, Calabria A, et al. Targeted Genome Editing in Human Repopulating Hematopoietic Stem Cells. *Nature*. 2014 Jun 12;510(7504):235.
21. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014 Mar 6;370(10):901–10.
22. Ascending Dose Study of Genome Editing by the Zinc Finger Nuclease (ZFN) Therapeutic SB-913 in Subjects With MPS II, [Clinicaltrials.gov](http://Clinicaltrials.gov).
23. Ding Q, Lee Y-K, Schaefer EAK, Peters DT, Veres A, Kim K, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*. 2013 Feb 7;12(2):238–51.

24. Xu J, Peng C, Sankaran VG, Shao Z, Esrick EB, Chong BG, et al. Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing. *Science*. 2011 Nov 18;334(6058):993–6.
25. Yang D, Scavuzzo MA, Chmielowiec J, Sharp R, Bajic A, Borowiak M. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Scientific Reports*. 2016 Feb 18;6:21264.
26. Porteus MH, Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*. 2003 May 2;300(5620):763.
27. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816–21.
28. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 2015 Feb;21(2):121–31.
29. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. 2013 Oct 24;8(11):2281–308.
30. Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jun;42(11):7473–85.
31. Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013 Sep 12;154(6):1380–9.
32. Choi SM, Kim Y, Shim JS, Park JT, Wang R-H, Leach SD, et al. Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology*. 2013 Jun;57(6):2458–68.
33. Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, et al. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol Ther*. 2013 Jun;21(6):1151–9.
34. Ma N, Liao B, Zhang H, Wang L, Shan Y, Xue Y, et al. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free  $\beta$ -thalassemia induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem*. 2013 Nov 29;288(48):34671–9.
35. Huang X, Wang Y, Yan W, Smith C, Ye Z, Wang J, et al. Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. *Stem Cells*. 2015 May;33(5):1470–9.

36. Romeo G, Levin EY. Uroporphyrinogen 3 cosynthetase in human congenital erythropoietic porphyria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969 Jul;63(3):856–63.
37. Frank J, Wang X, Lam HM, Aita VM, Jugert FK, Goerz G, et al. C73R is a hotspot mutation in the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria. *Ann Hum Genet*. 1998 May;62(Pt 3):225–30.
38. Deybach JC, de Verneuil H, Boulechfar S, Grandchamp B, Nordmann Y. Point mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria (Günther's disease). *Blood*. 1990 May 1;75(9):1763–5.
39. Warner CA, Yoo HW, Roberts AG, Desnick RJ. Congenital erythropoietic porphyria: identification and expression of exonic mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene. *J Clin Invest*. 1992 Feb;89(2):693–700.
40. Erwin A, Balwani M, Desnick RJ, Porphyrins Consortium of the NIH-Sponsored Rare Diseases Clinical Research Network. Congenital Erythropoietic Porphyria. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2017 May 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK154652/>
41. May P, May E. Protéine p53 : de l'interaction avec les protéines virales à la pathogénie des cancers humains. *Virologie*. 1998;2:347-54.
42. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*. 2014 Jan 3;343(6166):80–4.
43. Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, et al. Seamless gene correction of  $\beta$ -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res*. 2014 Sep;24(9):1526–33.
44. Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*. 2015 Jan 13;4(1):143–54.
45. Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*. 2014 Apr;11(4):399–402.
46. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016 Jan 1;351(6268):84–8.
47. Ribeil J-A, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, et al. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017 02;376(9):848–55.





## SERMENT D'HIPPOCRATE

« Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me le demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque. »

**TITRE :** Alternative à la thérapie génique additive par utilisation du système CRISPR-Cas9 pour la correction génique des maladies héréditaires du globule rouge.

**INTRODUCTION :** La Porphyrémie érythropoïétique congénitale (PEC) est une maladie autosomique récessive sévère dont la mutation la plus fréquente est la c.217T>C sur l'exon 4 du gène *UROS* (p.C73R). Seule la thérapie cellulaire par greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue un traitement efficace pour la PEC à ce jour. La preuve d'une correction de cellules malades par des vecteurs lentiviraux intégratifs dans des souris PEC a été faite par thérapie génique additive « *ex vivo* » mais le principal risque reste la mutagenèse insertionnelle. Notre objectif est d'évaluer la faisabilité d'une correction génique dans la PEC, par réparation dirigée par homologie (HDR), efficace et définitive, grâce à la technologie CRISPR-Cas9 non intégrative et transitoire.

**MÉTHODES :** D'abord, nous avons mis au point la technique de transfection par nucléofection dans des cellules HEK, et utilisé l'électrophorèse capillaire (quantitative) et du séquençage Sanger (qualitatif) comme outils pour évaluer l'édition du gène *UROS*.

**RÉSULTATS :** Nous avons démontré l'importance de la concentration en oligonucléotide donneur simple brin et créé une lignée PEC que nous avons ensuite corrigée par réparation dirigée par homologie.

Puis, nous avons établi la preuve de principe de l'efficacité de ce système dans des cellules primaires par édition de cellules souches hématopoïétiques normales et la correction de fibroblastes déficients PEC.

**CONCLUSION :** Il nous reste à confirmer que le système est bien transitoire et que cette technique peut être utile pour une maladie hématologique héréditaire plus répandue comme la drépanocytose.

**TITLE:** Alternative to additive gene therapy by CRISPR-Cas9 driven gene editing of red blood cells inherited diseases.

**INTRODUCTION:** Congenital erythropoietic porphyria (CEP) is a severe autosomal recessive disease. The most frequent mutation is c.217T>C on exon 4 of the *UROS* gene (p. C73R). To date, allogeneic cell transplantation of hematopoietic stem cells is the only effective treatment for CEP. Proof of disease cells correction by integrative lentiviral vectors in CEP mice was performed by additive gene therapy "*ex vivo*" but insertional mutagenesis risk persists.

Our objective is to evaluate the feasibility of a directed, effective and definitive homologous recombination gene correction using the non-integrative and transient CRISPR-Cas9 technology in CEP.

**METHOD:** First, we optimized the transfection by nucleofection in HEK cells and used tools to evaluate edition of the *UROS* gene: capillary electrophoresis (quantitative) and sequencing (qualitative).

**RESULTS:** We demonstrated the importance of single strand donor oligonucleotide concentration and created a CEP cell line that we rescued by homology directed repair.

Then we demonstrated its effectiveness in primary cells by editing normal hematopoietic stem cells and correcting CEP deficient fibroblasts.

**CONCLUSION:** Finally, it remains to be confirmed that the system is transient and to extend our results in a more common hereditary hematologic disease such as sickle cell anemia.

**DISCIPLINE :** Biologie médicale

**MOTS-CLÉS :** Thérapie génique, Correction génique, Crispr-Cas9, Porphyrémie érythropoïétique

Université de Bordeaux – U.F.R. des Sciences Médicales