



HAL
open science

Caractérisation de vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines murines et de leurs cibles cellulaires *in vitro* et *in vivo*

Youna Coquin

► **To cite this version:**

Youna Coquin. Caractérisation de vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines murines et de leurs cibles cellulaires *in vitro* et *in vivo*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLE039 . tel-04549257

HAL Id: tel-04549257

<https://theses.hal.science/tel-04549257>

Submitted on 17 Apr 2024

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.

Caractérisation de vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines murines et de leurs cibles cellulaires *in vitro* et *in vivo*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université d'Evry-Val-d'Essonne

École doctorale n°577
Structure et Dynamiques des Systèmes Vivants SDSV
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Evry, le 10 décembre 2019, par

Youna COQUIN

Composition du Jury :

Dr. Els Verhoeyen Directrice de Recherche Inserm, C3M Nice et ENS Lyon	Rapporteuse
Dr. Christophe Sirac Maître de Conférences des Universités, Université de Limoges	Rapporteur
Dr. Olivier Schwartz Professeur, Directeur Scientifique, Institut Pasteur	Président
Dr. Yves Gaudin Directeur de Recherche CNRS, I2BC, Université Paris Saclay	Examineur
Dr. Anne Dupressoir Chargée de Recherche Inserm, Institut Gustave Roussy	Examinatrice
Dr. Anne Galy Directrice de Recherche Inserm, Généthron	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de ce jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie le Dr. Els Verhoeyen et le Dr. Christophe Sirac d'avoir accepté d'être rapporteurs, pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit et à l'évaluation de ce travail. Je remercie le Pr. Olivier Schwartz d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance. Et je remercie le Dr. Yves Gaudin et le Dr. Anne Dupressoir pour avoir accepté de faire partie de ce jury au titre d'examineurs.

Je remercie le Dr. Anne Galy pour m'avoir offert l'opportunité d'intégrer le laboratoire « Immunologie Moléculaire et Biothérapies Innovantes » au sein de l'UMR_S951, pour avoir dirigé ma thèse d'exercice de pharmacie et pour m'avoir accordé sa confiance pour réaliser ce travail de thèse. Merci aussi de m'avoir donné l'opportunité de participer et présenter mes travaux lors de congrès internationaux à plusieurs reprises.

Merci à toute l'équipe IMBI, pour vos conseils et votre aide mais aussi pour votre bonne humeur et votre sympathie. Maxime alias Mr Syncytines, Khalil expert lenti, Sophie la reine de la bio mol et Guillaume le pro des stats. Merci Maguy pour toute ton aide et pour la relecture de ce manuscrit. Et aux autres IMBIens, Mirella, mes collègues de bureau Laëtitia et Gaëlle. Et aux nouvelles arrivantes, Grazie mille Valentina, Fetta et Emilie !

Comment oublier mes copines de thèse ?! Caroline, on tient le bon bout dernière ligne droite ! On sera bientôt Dr². Ariane, on ne peut pas toujours soutenir en même temps... Bon courage pour la fin de la rédaction, désolée de t'abandonner à la BnF. Camille, bon courage pour cette dernière année !

Un grand merci également aux différentes plateformes, imagerie-cytométrie, bioexpérimentation et histologie. Un merci tout particulier à Jérémie pour son aide quand je ne trouvais pas les bons réglages au confocal, et à Peggy et Simon pour les tris et les précieux conseils en cytométrie.

Et puis les autres Généthoniens : la team EPHE (Romuald, Alice et Laëtitia), Yohann, Greg, Sandrine et Céline, pour nos petites pauses méridionales. Et toutes les personnes de Généthon qui ont par un conseil, un sourire ou un bonjour contribué à faire du laboratoire un endroit où il fait bon travailler. Sans oublier (comment serait-ce possible ?) Antoine aka Tonio !

Et enfin merci les copains, ma famille et Félix.

Liste des abréviations

AAV : Adeno-associated Virus
ADN : Acide DésoxyRibonucléique
ARN : Acide RiboNucléique
SLC1A4 : Solute Carrier Family 1 Member 4 = **ASCT1**
SLC1A5 : Solute Carrier Family Member 5 = **ASCT2**
BaEV : Baboon Endogenous retroVirus
BCR : B Cell Receptor
Breg : B régulateurs
CD : Cluster de Différenciation
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
DC : Cellules Dendritiques
EBV : Epstein-Barr Virus
Env : Enveloppe
ERV : Endogenous Retrovirus
GALV : Gibbon Ape Leukemia Virus
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GP : GlycoProtéine
HLA : Human Leukocyte Antigen
IFITM : Interferon Induced TransMembrane protein
IFN : Interferon
IG : Génome Infectieux
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ISD : Immunosuppressive Domain
ISG : Interferon Stimulated Genes
KO : Knock Out
LB : Lymphocytes B
LDL-R : Low Density Lipoprotein Receptor

LT : Lymphocytes T

LTR : Long Terminal Repeat

LV : Vecteur Lentiviral

Ly6e : Lymphocyte Antigen 6 Family Member E

MFSD2a : Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2A

MV : Measles Virus

MZ : Zone Marginale

NGFR : Nerve Growth Factor Receptor

NTA : Nanoparticle Tracking Analysis

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

ORF : Origin Replication Frame

PBMC : Peripheral Blood Mononucleated Cells

(q)PCR : (quantitative) Polymerase Chain Reaction

PGE2 : Prostaglandine E2

PGK : Phosphoglycerate Kinase

RCL : Replication Competent Lentivirus

RRE : Rev Responsive Element

RSV : Rous Sarcoma Virus

SEP : Sclérose en plaques

SFFV : Spleen Focus Forming Virus

SNC : Système Nerveux Central

SU : Surface

Syn : Syncytin

TM : Transmembranaire

TNF : Tumor Necrosis Factor

TU : Unité de Transduction

VCN : Nombre de Copies de Vecteurs

VF1 : Vectofusin-1

VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1

VSVG : Vesiculo Stomatitis Virus protein G

WPRE : Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element

Liste des figures

Figure 1 : La thérapie génique in vivo et ex vivo	- 15 -
Figure 2 : Structure du VIH-1	- 21 -
Figure 3 : Cycle réplicatif du VIH-1. D'après (Sakuma et al., 2012)	- 24 -
Figure 4 : Représentation schématique des vecteurs lentiviraux	- 27 -
Figure 5 : Mécanismes de fusion cellulaire	- 31 -
Figure 6 : Structure du trimère formé par la glycoprotéine VSVG	- 33 -
Figure 7 : Représentation schématique des voies d'entrée des vecteurs lentiviraux pH-dépendants vs pH-indépendants (Frank and Buchholz, 2019).....	- 34 -
Figure 8 : Représentation schématique de la production de vecteurs lentiviraux par transfection transitoire	- 39 -
Figure 9 : Cycle non réplicatif des vecteurs lentiviraux	- 42 -
Figure 10 : La Vectofusin-1.....	- 45 -
Figure 11 : Endogénisation des syncytines,.....	- 48 -
Figure 12 : Structure des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales.....	- 49 -
Figure 13 : Arbre phylogénique représentant l'intégration des différents gènes syncytines chez les vertébrés au cours de l'évolution.....	- 51 -
Figure 14 : Structure 3D des syncytines humaines.....	- 53 -
Figure 15 : Niveaux d'expression de Ly6e et de la syncytine A au niveau de différents organes chez la souris	- 55 -
Figure 16 : Représentation schématique de l'interface materno-foetale des 4 principales structures de placenta	- 58 -
Figure 17 : Développement placentaire humain au stade vilieux	- 59 -
Figure 18 : Placentation chez la souris	- 60 -
Figure 19 : Différenciation et développement des ostéoclastes	- 65 -
Figure 20 : Représentation schématique « classique » de l'hématopoïèse.....	- 70 -
Figure 21 : Représentation schématique de la rate	- 71 -
Figure 22 : Rôles et fonctions des lymphocytes B	- 73 -
Figure 23 : Représentation schématique d'une immunoglobuline de type IgG.....	- 74 -
Figure 24 : Représentation des chaînes variables des immunoglobulines dans leur configuration germinale	- 74 -
Figure 25 : Recombinaison VDJ des chaînes lourdes variables des immunoglobulines .	- 75 -
Figure 26 : Fonctions régulatrices des Breg	- 77 -
Figure 27 : Détermination de la quantité optimale de plasmide pDNA3.1-SyncytinA pour la production de LV-SynA.....	- 90 -

Figure 28 : Caractérisation des vecteurs LV-Syn en particules physiques (taille et concentration)	- 92 -
Figure 29 : Graphiques représentatifs de l'analyse de vecteurs LV-SynA au Nanosight .	- 93 -
Figure 30 : Profil de transduction des LV-Syn sur un panel de lignées cellulaires humaines et murines	- 94 -
Figure 31 : Effet de la vectofusin-1 sur la transduction des cellules A20.IIa par les LV-SynA et LV-SynB.....	- 95 -
Figure 32 : Effet dose-réponse des LV-SynA et LV-SynB sur les cellules A20.IIa en présence de Vectofusin-1	- 95 -
Figure 33 : Bioluminescence chez des souris injectées en IV par des vecteurs LV-SynA et LV-VSVG	151
Figure 34 : Cinétique du signal de bioluminescence au niveau pulmonaire chez les souris injectées par les LV-SynA	152
Figure 35 : Evaluation de la biodistribution des vecteurs LV-SynA in vivo par voie IV chez la souris par qPCR	153
Figure 36 : Amplification d'un signal PSI-WPRE dans les poumons de souris injectées par les vecteurs LV-SynA et LV-VSVG par voie IV.....	154
Figure 37 : Immuno-histo-marquage de la luciférase sur coupe de poumon après injection IV de LV-SynA.....	155
Figure 38 : Intégration des vecteurs LV-Syn dans les cellules MRC5 à 7 jours post-transduction.....	156
Figure 39 : Intégration des vecteurs LV-Syn dans les cellules HSAEC 7 jours post-transduction	157
Figure 40 : Expression des récepteurs mLy6e et hLy6e sur différentes lignées cellulaires avec les efficacités de transduction des vecteurs LV-SynA.....	158
Figure 41 : Réduction des réponses immunes anti-transgène après injection IV de vecteurs LV-SynA par rapport aux vecteurs LV-VSVG mesurées par ELISpot et CBA	160
Figure 42 : Interactions des vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines avec les lymphocytes B humains et murins	167
Figure 43 : Représentation schématique de la biodistribution d'un vecteur LV-SynA-LucII chez la souris.....	168
Figure 44 : Applications thérapeutiques potentielles des vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines.....	174

Liste des tableaux

Tableau 1 : Médicaments de thérapie génique approuvés par les agences du médicament européenne et américaine	- 16 -
Tableau 2 : Avantages et inconvénients des rAAV et rHIV utilisés en thérapie génique des maladies génétiques	- 20 -
Tableau 3 : Les glycoprotéines d'enveloppe utilisées pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1	- 36 -
Tableau 4 : Glycoprotéines d'enveloppe modifiées par génie génétique utilisées pour le pseudotypage de vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1	- 38 -
Tableau 5 : Les gènes des syncytines chez les vertébrés	- 56 -
Tableau 6 : Différenciation des lymphocytes B et phénotypes des différentes sous-populations cellulaires B.....	- 72 -
Tableau 7 : Les glycoprotéines d'enveloppe utilisées pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 pour la transduction de lymphocytes B primaires	- 80 -
Tableau 8 : Détermination du titre infectieux en IG/mL des vecteurs pseudotypés syncytines en comparaison avec VSVG.....	- 96 -
Tableau 9 : Sondes et amorces utilisées en qPCR	148

Table des matières

Remerciements	- 2 -
Liste des abréviations.....	- 3 -
Liste des figures	- 5 -
Liste des tableaux	- 7 -
INTRODUCTION.....	- 13 -
I. Les vecteurs lentiviraux en thérapie génique	- 14 -
I.A. Principe et définitions de la thérapie génique	- 14 -
I.A.1. Définition de la thérapie génique	- 14 -
I.A.2. Evaluation pharmacocinétique des médicaments de thérapie génique.....	- 17 -
I.A.3. Les principaux vecteurs utilisés en thérapie génique.....	- 18 -
I.B. Les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1	- 20 -
I.B.1. Du virus sauvage du VIH-1 aux vecteurs lentiviraux.....	- 20 -
I.B.1.a. Génome et protéines virales du VIH-1.....	- 20 -
I.B.1.b. Les éléments cis-actifs	- 22 -
I.B.1.c. Cycle réplcatif du VIH-1	- 22 -
I.B.1.d. Génome des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1	- 24 -
I.B.1.d.3. Les éléments viraux hétérologues	- 28 -
I.B.1.e. Principe du pseudotypage	- 28 -
I.B.2. Le pseudotypage de vecteurs lentiviraux, mécanismes d'entrée et orientation du tropisme cellulaire	- 30 -
I.B.2.a. Les mécanismes de fusion membrane rétrovirale- membrane cellulaire.....	- 30 -
I.B.2.b. VSVG : le pseudotype le plus courant, avantages et limites	- 32 -
I.B.2.b.1. Structure de la protéine VSVG	- 32 -
I.B.2.b.2. La fusion médiée par la glycoprotéine VSVG	- 33 -
I.B.2.b.3. Avantages et limitations du pseudotypage de vecteurs lentiviraux par la protéine VSVG	- 34 -
I.B.2.c. Pseudotypage de vecteurs lentiviraux par des glycoprotéines d'enveloppe virales hétérologues	- 35 -

I.B.2.d. Pseudotypage de vecteurs lentiviraux par des glycoprotéines d'enveloppe ingénierées pour un ciblage cellulaire.....	- 37 -
I.B.3. Méthodes de production des vecteurs lentiviraux.....	- 38 -
I.B.3.a. Production des vecteurs lentiviraux.....	- 38 -
I.B.3.a.1. Production de vecteurs lentiviraux par transfection transitoire.....	- 38 -
I.B.3.a.2. Lignées productrices stables et inductibles.....	- 40 -
I.B.4. La transduction de cellules par des vecteurs lentiviraux.....	- 41 -
I.B.4.a. Transduction de cellules par des vecteurs lentiviraux.....	- 41 -
I.B.4.b. Les additifs de transduction.....	- 42 -
I.B.4.b.1. Les polymères.....	- 43 -
I.B.4.b.2. Les lipides.....	- 43 -
I.B.4.b.3. Les peptides cationiques.....	- 43 -
I.B.4.c. Les facteurs de restriction.....	- 46 -
I.B.5. Concentration et purification des vecteurs lentiviraux.....	- 46 -
II. Les syncytines, des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales endogènes.....	- 48 -
II.A. Origine rétrovirale et endogénéisation des syncytines.....	- 48 -
II.B. Les syncytines chez les mammifères.....	- 50 -
II.B.1. Les syncytines humaines 1 et 2.....	- 52 -
II.B.2. Les syncytines murines A et B.....	- 54 -
II.B.3. Les syncytines Ory1, Car1, Rum1, Mar1, Opo1, Ten1, et Mab1.....	- 56 -
II.C. Les syncytines, des glycoprotéines fusogéniques.....	- 57 -
II.C.1. Implication des syncytines dans des processus biologiques physiologiques.....	- 58 -
II.C.1.a. Placentation.....	- 58 -
II.C.1.a.1. Formation des syncytiotrophoblastes.....	- 58 -
II.C.1.a.2. Immunotolérance foeto-maternelle.....	- 61 -
II.C.1.b. Régénération du muscle squelettique.....	- 62 -
II.C.1.c. Différenciation des ostéoclastes.....	- 64 -
II.C.2. Implication des syncytines dans des processus biologiques pathologiques.....	- 66 -
II.C.2.a. Cancer.....	- 66 -
II.C.2.b. Pré-éclampsie.....	- 66 -
II.C.2.c. Sclérose en plaque.....	- 68 -

III. Les lymphocytes B comme cible de thérapie génique	- 70 -
III.A. Les lymphocytes B, des cellules du système immunitaire	- 70 -
III.A.1. Origine et développement des lymphocytes B.....	- 70 -
III.A.2. Rôles et fonctions des lymphocytes B	- 72 -
III.A.2.a. Immunité humorale : production d'immunoglobulines	- 73 -
III.A.2.b. Immunité cellulaire	- 76 -
III.A.2.b.1. Cellules présentatrices d'antigènes	- 76 -
III.A.2.b.2. Production de cytokines	- 76 -
III.A.2.b.3. Les lymphocytes B régulateurs.....	- 76 -
III.B. La thérapie génique des lymphocytes B.....	- 77 -
III.B.1. Les lymphocytes B : une cible de choix pour la thérapie génique.....	- 77 -
III.B.2. Les limites actuelles pour le transfert de gènes dans les lymphocytes B.....	- 78 -
III.B.2.a. Les conditions de culture.....	- 78 -
III.B.2.b. Le choix du pseudotype d'enveloppe lentiviral.....	- 79 -
III.B.2.c. L'apport de matériel génétique dans les lymphocytes B <i>in vivo</i> par voie systémique -	80 -
OBJECTIFS DE LA THESE.....	- 82 -
RESULTATS	- 84 -
Partie 1 : Production et caractérisation de vecteurs lentiviraux pseudotypés avec les syncytines	- 85 -
Contexte de l'étude	- 85 -
1.1. Introduction.....	- 85 -
1.2. Matériels et méthodes	- 86 -
1.2.1. Clonage des syncytines A et B dans des plasmides d'expression pcDNA3.1	- 86 -
1.2.2. Lignées cellulaires	- 87 -
1.2.3. Production de vecteurs lentiviraux pseudotypés syncytines.....	- 87 -
1.2.4. Titration des vecteurs LV-Syn en particules physiques	- 88 -
1.2.5. Titration des vecteurs LV-Syn en particules infectieuses	- 88 -
1.2.6. Statistiques.....	- 89 -
1.3. Résultats	- 89 -
1.3.1. Détermination des conditions optimales de production des LV pseudotypés syncytine. -	89 -
1.3.2. Pseudotypage efficace des LVs par les syncytines.....	- 91 -

1.3.3. Transduction sélective des cellules A20.IIa par les LV-Syn	- 93 -
1.4. Conclusions et discussion sur la Partie 1.....	- 96 -
Partie 2 : Les vecteurs lentiviraux pseudotypés syncytines permettent une transduction efficace des lymphocytes B primaires humains et murins.....	- 98 -
Article : Syncytins enable novel possibilities to transduce human or mouse primary B cells and to achieve well-tolerated <i>in vivo</i> gene transfer	- 98 -
Contexte de l'étude	- 99 -
Partie 3 : Etude de l'efficacité de transduction du poumon par des vecteurs lentiviraux pseudotypés par la Syncytine A après injection IV	142
Contexte de l'étude	144
3.1. Introduction.....	144
3.2. Matériels et méthodes	145
3.2.1. Lignées cellulaires	145
3.2.2. Production de vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines	146
3.2.3. Animaux	147
3.2.4. Analyse de la bioluminescence par imagerie de la luciférase <i>in vivo</i>	147
3.2.5. Isolement des cellules de poumon de souris	148
3.2.6. qPCR.....	148
3.2.7. PCR sur les poumons de souris	148
3.2.8. Immuno-marquages sur coupes histologiques de poumon	149
3.2.9. Détermination de réponses immunes par ELISpot.....	149
3.2.10. Dosage des cytokines par CBA (Cytokine Bead Array)	149
3.2.11. Statistiques.....	150
3.3. Résultats	150
3.3.1. Transduction du poumon chez la souris après une injection IV de LV-SynA.....	150
3.3.2. Transduction <i>in vitro</i> de cellules pulmonaires humaines par les LV-Syn	155
3.3.3. Expression du récepteur Ly6e	157
3.3.4. Etude des réponses immunes contre le transgène après injection IV de LV-SynA par rapport aux LV-VSVG.....	159
3.4. Conclusions/Discussion sur la Partie 3.....	161
CONCLUSIONS & DISCUSSION.....	163
1. La vectorologie des vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines	165
2. Les cellules ciblées par les LV-Syn et interactions avec leurs récepteurs.....	166
3. Applications thérapeutiques potentielles des LV-Syn.....	171
4. Les vecteurs lentiviraux pseudotypés syncytines, moins immunogènes que les LV-VSVG : une bonne alternative pour une utilisation <i>in vivo</i> ?	174

Bibliographie	176
Travaux	199
ANNEXES	201

INTRODUCTION

I. Les vecteurs lentiviraux en thérapie génique

I.A. Principe et définitions de la thérapie génique

I.A.1. Définition de la thérapie génique

La thérapie génique est définie au journal officiel du 22 septembre 2000 comme « l'opération conduisant à l'addition d'un gène dans des cellules non germinales d'un organisme ».

La directive 2009/210/EC du 14 septembre 2009 de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) définit les médicaments de thérapie génique comme : « un médicament biologique qui a les caractéristiques suivantes: (a) il contient une substance active qui contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique; (b) son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou au produit de l'expression génétique de cette séquence.

Les vaccins contre les maladies infectieuses ne sont pas compris dans les médicaments de thérapie génique. »

La thérapie génique consiste à ajouter, modifier ou inactiver un gène. C'est une stratégie thérapeutique utilisée pour de nombreuses applications, notamment dans le cadre du traitement de cancers, de maladies génétiques ou de maladies infectieuses (Ginn et al., 2018). On dénombre actuellement plus de 1000 essais cliniques de thérapie génique (source : clinicaltrial.gov en septembre 2019), avec des domaines d'applications variés, le principal étant la cancérologie qui représente 65% des essais, mais aussi pour le traitement de maladies monogéniques, de maladies infectieuses par exemple (Ginn et al., 2018).

Deux stratégies d'administration des vecteurs de thérapie génique peuvent être envisagées : ces vecteurs peuvent être administrés directement au patient par voie systémique ou locale, on parle alors de thérapie génique « *in vivo* » ; ou bien les cellules cibles sont isolées chez le patient et les vecteurs sont utilisés pour la transduction *in vitro* de ces cellules avant réimplantation des cellules corrigées, on parle alors de thérapie génique « *ex vivo* », dont une des principales applications concerne la transduction de cellules souches hématopoïétiques dans le cadre de thérapie génique d'immunodéficiences (Figure 1).

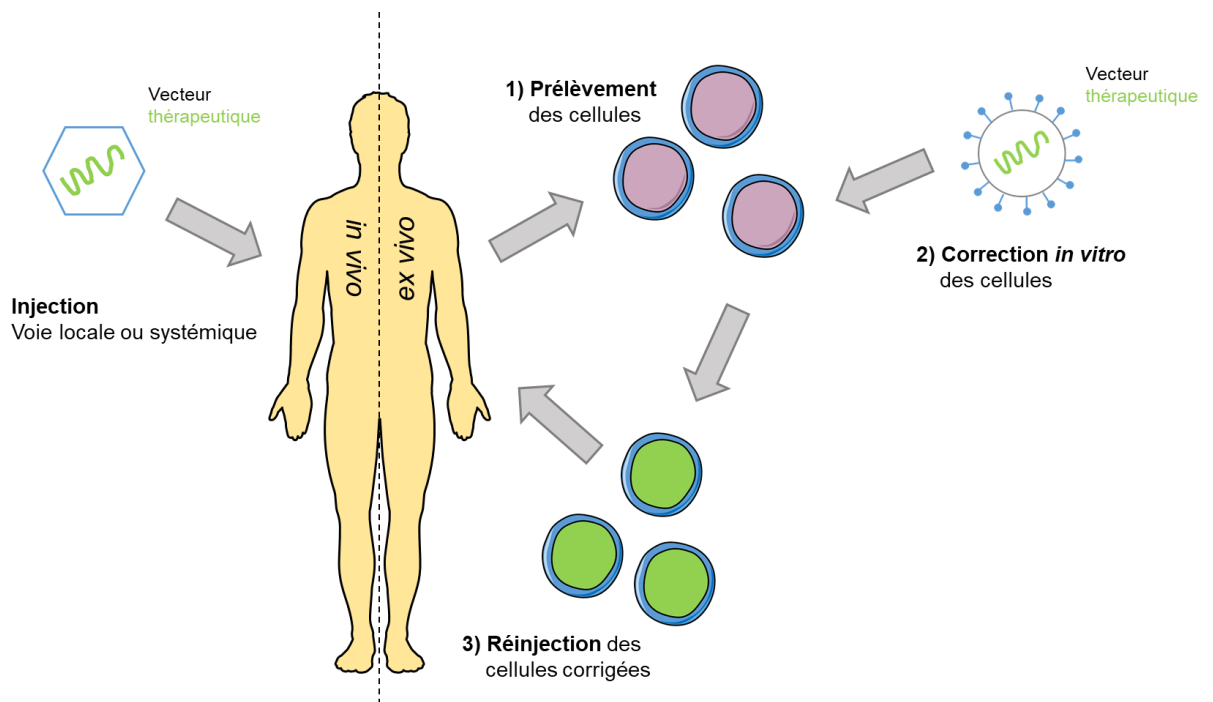


Figure 1 : La thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*

A gauche : représentation schématique de la thérapie génique *in vivo*, le vecteur est injecté directement au patient par voie systémique ou locale, les vecteurs de type rAAVs sont les plus utilisés pour ce type d'approche. A droite : représentation schématique de la thérapie génique *ex vivo*, les cellules (souches) du patient sont prélevées, corrigées *in vitro* par transduction avec le vecteur contenant thérapeutique contenant le transgène, puis les cellules corrigées sont ré-administrées au patient. Les vecteurs de type rHIVs sont les plus utilisés pour ce type d'approche.

Les succès de la thérapie génique sont de plus en plus nombreux, il existe aujourd'hui 9 médicaments de thérapie génique sur le marché, approuvés par les agences du médicament américaine ou européenne (Tableau 1). Le développement de ces médicaments est très récent. De plus ces médicaments ainsi que leur développement sont très coûteux, et les essais en termes de sécurité du médicament complexes. C'est pourquoi le nombre de médicaments autorisés est relativement faible, en comparaison du nombre d'essais cliniques dans le domaine.

Médicament (nom de spécialité)	DCI	Indication	Laboratoire	Approbation
Glybera	Alipogène tiparvovec	LPLD	UniQure	2012 (EMA) Retiré en 2018
Imlygic	Talimogène laherpaprevec	Mélanome	BioVex (filiale de Amgen)	2015 (FDA, EMA)
Strimvelis	-	ADA-SCID	GlaxoSmithKline Commercialisé par Orchard Therapeutics	2016 (EMA)
Zalmoxis	-	HSCT haploidentique	Molmed S.p.A	2016 (EMA)
Luxturna	Voretigène neparvovec-rzyl	Dystrophie rétinienne (mutation RPE65)	Sparks Therapeutics	2017 (FDA)
Kymriah	Tisagenlecleucel	LLA à cellules B ² Lymphome B à grandes cellules ³	Novartis	2017 (FDA) 2018 (EMA)
Yescarta	Axicabtagène alocleucel	LDGCB LMPGCB	Kite Pharma	2017 (FDA) 2018 (EMA)
Zynteglo	-	β-thalassémie	Bluebird Bio	2019 (EMA)
Zolgensma	Onasemnogène abeparvovec-xioi	SMA type I chez l'enfant <2ans	AveXis	2019 (FDA)

Tableau 1 : Médicaments de thérapie génique approuvés par les agences du médicament européenne et américaine

DCI = Dénomination Commune Internationale ; LPLD = Lipoprotein Lipase Deficiency ; ADA-SCID = adenosine deaminase severe combined immunodeficiency ; HSCT = Haematopoietic Stem Cell Transplantation ; LLA = Leucémie Lymphoblastique Aigüe ; SMA = Spinal Muscular Atrophy ; EMA = European Medicines Agency ; FDA = Food and Drug Administration ; LDGCB = Lymphome Diffus à Grandes Cellules B ; LMPGCB = Lymphome Médiastinal Primitif à Grandes Cellules B ; 1 : mélanome non résecable avec métastases régionales ou à distance (stade IIIB, IIIC, IVM1a) sans localisation osseuse, cérébrale, pulmonaire ou autre atteinte viscérale ; 2 : chez les patients âgés de moins de 25 ans, en rechute ou réfractaire ; 3 : chez les patients adultes en rechute ou réfractaires après au moins 2 lignes de traitement

Parmi ces médicaments, il est intéressant de noter que le Glybera, le Luxturna et le Zolgensma sont des vecteurs de type AAV (adéno associés-virus) utilisés *in vivo*. L'Imlygic est également utilisé *in vivo*, le vecteur utilisé est un virus de l'herpès atténué codant pour le GM-CSF. Le Yescarta et le Kymriah sont des médicaments de type CAR-T cells, qui sont utilisés *ex vivo*. Pour le Yescarta, un vecteur de type rétroviral est utilisé pour modifier les cellules, et pour le Kymriah il s'agit d'un vecteur lentiviral. Le Zalmoxis est un médicament de thérapie génique *ex vivo*, il s'agit de lymphocytes T corrigés par un vecteur rétroviral. Le Strimvelis et le Zynteglo sont des médicaments de thérapie génique *ex vivo*. Il s'agit de cellules souches

hématopoïétiques autologues corrigées par un vecteur rétroviral dans le cas du Strimvelis ou par un vecteur lentiviral dans le cas du Zynteglo par un vecteur lentiviral.

I.A.2. Evaluation pharmacocinétique des médicaments de thérapie génique

L'agence européenne du médicament définit la substance active d'un médicament de thérapie génique par une ou plusieurs séquences d'acides nucléiques ou un ou plusieurs microorganismes génétiquement modifiés ; ou des cellules génétiquement modifiées par une séquence d'acides nucléiques ou par un microorganisme génétiquement modifié.

L'agence Européenne a publié des recommandations pour le développement des produits de thérapie génique. Différentes études précliniques sont demandées pour établir les doses, les limites de tolérance et la biodistribution du traitement. La thérapie génique restant une approche médicale récente, une connaissance approfondie des vecteurs utilisés et de leurs effets et caractéristiques spécifiques sont nécessaires pour garantir la sécurité des médicaments de thérapie génique.

Des études pharmacodynamiques *in vitro* et *in vivo* doivent être fournies en utilisant des modèles pertinents (modèles cellulaires ou modèles animaux, en choisissant des espèces animales pertinentes pour l'étude). Ces études doivent également démontrer que l'organe ou la cellule cible est atteinte, et que le niveau d'expression permettant une activité fonctionnelle est atteint. Des études peuvent être requises afin de confirmer la spécificité et la durée de fonctionnalité et d'activité dans les cellules cibles.

Les études relatives à la pharmacocinétique doivent contenir des études de la biodistribution du médicament, afin de contrôler sa spécificité et de comprendre et éviter des effets indésirables dus à une expression ectopique du transgène ou à une dissémination trop large du vecteur. La thérapie génique est autorisée uniquement sur les cellules somatiques, et la biodistribution au niveau des cellules de la lignée germinale est nécessairement étudiée afin de s'assurer de la sécurité du médicament, et éviter une transmission à la descendance.

Des études doivent également être menées concernant la dissémination et le risque de transmission à des tiers, au même titre que l'évaluation du risque environnemental.

Concernant les études de toxicologie, différents éléments doivent être fournis dans le but d'évaluer la toxicité d'un médicament de thérapie génique : la génotoxicité, la carcinogénicité, la toxicité pour la reproduction et pour le développement, des études sur la

fécondité ainsi que sur la fonction reproductrice, des études de toxicité embryofœtale et périnatale, ainsi que des études de transmission à la lignée germinale. L'immunogénicité et l'immunotoxicité du médicament doivent être évaluées, pouvant être une cause de non fonctionnement du médicament ou pouvant engendrer des effets indésirables. Ces effets immunogéniques peuvent être liés au vecteur ou au transgène et les études doivent donc porter sur ces différents éléments. Des études d'intégration doivent également être menées.

Les études de sécurité ont pour but de surveiller l'émergence d'un vecteur compétent pour la réplication (Corre et al., 2016), l'émergence de nouvelles souches, le réarrangement de séquences génomiques ou encore la prolifération néoplasique due à la mutagenèse insertionnelle.

Une stratégie de suivi à long terme de la sécurité et de l'efficacité du médicament doit figurer dans le plan de gestion des risques. C'est pourquoi, il est nécessaire de caractériser au maximum les vecteurs de thérapie génique, leurs mécanismes d'entrée, leur caractère intégratif ou non, leur biodistribution ou leur immunogénicité.

I.A.3. Les principaux vecteurs utilisés en thérapie génique

Afin d'apporter le matériel génétique aux cellules, différents vecteurs peuvent être utilisés, qu'ils soient non viraux (utilisant l'ADN nu ou des complexes ADN) ou des vecteurs viraux recombinants. Ces derniers sont majoritairement utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique à l'heure actuelle. En effet, les vecteurs viraux sont des outils efficaces pour le transfert de gènes dans les cellules de mammifères, utilisant les propriétés intrinsèques des virus pour infecter les cellules cibles. Les principaux vecteurs utilisés en thérapie génique sont les vecteurs adénoviraux, les vecteurs virus adéno-associés (AAV) ou les vecteurs lentiviraux.

Dans le cadre des maladies génétiques, ce sont les vecteurs lentiviraux qui sont actuellement les plus utilisés pour la thérapie génique « *ex vivo* ». Ces vecteurs peuvent en effet intégrer leur matériel génétique dans le génome des cellules quiescentes. La transmission du matériel génétique par les cellules souches aux lignées dérivées après différenciation permettra la correction de l'ensemble des cellules sanguines ou immunitaires dérivées des cellules souches. De nombreux essais cliniques de thérapie génique pour des déficits immunitaires utilisent cette approche. C'est le cas de la thérapie génique du syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) (Galy and Thrasher, 2011), de la granulomatose septique chronique liée à l'X (X-CGD) (Brendel et al., 2018) ou de l'anémie de Fanconi type A (Río et al., 2019) qui sont des programmes cliniques auxquels le laboratoire, Généthon, a participé.

Actuellement, les stratégies de thérapie génique « *in vivo* » de maladies génétiques reposent majoritairement sur l'utilisation de vecteurs virus adéno-associés (AAV). Cependant ces vecteurs AAV ont une capacité d'encapsidation beaucoup plus faible (<4kb) que celle des vecteurs lentiviraux (10kb) et sont beaucoup plus immunogènes. Une grande partie de la population a déjà été infectée par des virus AAV sauvages et présente des anticorps pré-existants susceptibles de neutraliser l'entrée des vecteurs AAV de thérapie génique et de les rendre inefficaces (Tableau 2). Par ailleurs, l'administration des vecteurs AAV « *in vivo* » induit des réponses immunitaires contre les composants viraux, telle que la capsid qui empêche une 2^{ème} administration. Les vecteurs lentiviraux sont généralement utilisés « *ex vivo* » donc les réponses immunes contre les vecteurs lentiviraux ont été moins observées qu'avec l'AAV, et le risque de transmission verticale de ces vecteurs est limité. Les vecteurs lentiviraux peuvent également être utilisés « *in vivo* », dans le cas de stratégies de thérapie génique locale dans l'œil ou le cerveau (Bainbridge et al., 2001). Dans ces cas précis, les réponses immunes et risques de dissémination sont minimisés par l'environnement et par les faibles doses. Les vecteurs lentiviraux ciblés et modifiés pour réduire l'immunogénicité sont en cours d'étude pour un ciblage hépatique « *in vivo* », notamment pour le traitement de l'hémophilie B (Milani et al., 2019). Malgré leurs limitations, la grande capacité d'encapsidation des vecteurs lentiviraux en font des outils extrêmement intéressants, la taille du transgène à apporter aux cellules pour les corriger étant souvent supérieure aux 4kb auxquels sont limités les rAAVs. De plus, en modifiant la glycoprotéine d'enveloppe à la surface du vecteur, il est possible de modifier son tropisme cellulaire et de diminuer l'immunogénicité du vecteur.

	rAAV	rHIV
Taille	26nm	100-120nm
Génome	ADN double brin	ARN simple brin
Taille d'encapsidation	<4kb	8kb
Tropisme	Large Dépendant du sérotype de la capsid	Large/spécifique * Dépendent des glycoprotéines d'enveloppe
Intégration	Non <i>Cellules post-mitotiques</i>	Oui <i>Cellules en division ou post-mitotiques</i>
Expression dans le temps	Stable en l'absence de division cellulaire	Stable
Réponses immunitaires	++ Documentées chez l'homme	+/- *

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des rAAV et rHIV utilisés en thérapie génique des maladies génétiques

* en fonction du pseudotype utilisé

I.B. Les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1

I.B.1. Du virus sauvage du VIH-1 aux vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 sont étudiés depuis une trentaine d'années (Landau et al., 1991; Page et al., 1990), des améliorations ont été apportées au cours du temps afin de sécuriser le système et de le rendre plus performant. Actuellement, de nombreux essais cliniques utilisent ces vecteurs et deux médicaments de thérapie génique commercialisés utilisent les vecteurs lentiviraux.

I.B.1.a. Génome et protéines virales du VIH-1

Le virus du VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1) (Figure 2) appartient à la famille des *Retroviridae*. Il s'agit d'un virus enveloppé dont le génome est composé de 2 copies d'ARN simple brin à polarité positive d'environ 9kb qui code pour 9 protéines virales. On peut distinguer les éléments *trans*-actifs : Gag, Pol, Env, Tat, Rev, Vpr, Vpu, Nef et Vif ; et les éléments *cis*-actifs : les LTRs (Long Terminal Repeat), le RRE (Rev Responsive Element), les sites d'épissage et le signal d'encapsidation (Ψ).

Gag, pol et env sont les protéines de structure du VIH-1, tat et rev sont des protéines régulatrices, Vpr, Vpu, Nef et Vif sont des protéines accessoires (Luciw, 1996).

Dans le cas du virus sauvage du VIH-1, la protéine Env est un polypeptide sous forme trimérique également appelé gp160, qui est clivé par la furine pour donner les sous-unités de surface SU (gp120) et transmembranaire TM (gp41). Ces deux sous-unités sont liées par des liaisons non covalentes. La protéine gp120 permet la reconnaissance et l'adhésion à la cellule cible, et gp41 permet la fusion entre la membrane lentivirale et la membrane de la cellule cible.

Le polypeptide gag (p55) est impliqué dans le bourgeonnement des particules virales. P55 est clivée par la protéase pour générer les protéines de structure du VIH : la protéine de matrice (MA) p17, de capsid (CA) p24, de nucléocapside (NC) p9 et p6. La protéine de matrice permet de stabiliser la particule virale et facilite l'import nucléaire du génome viral. La protéine de capsid interagit avec la polyprotéine p55 pour favoriser la réplication virale. La protéine de nucléocapside reconnaît le signal d'emballage du VIH. La protéine p6 permet l'intégration de Vpr dans les particules virales.

Le polypeptide pol est également clivé au cours de la maturation pour donner les enzymes virales : protéase PR (p10), transcriptase inverse RT (p50) et intégrase IN (p31). La protéase permet le clivage protéolytique de la plupart des précurseurs polypeptidiques, et est nécessaire lors de la maturation du virus. La transcriptase inverse ou reverse transcriptase permet de transcrire l'ARN viral en ADN proviral. L'intégrase permet l'intégration de l'ADN du provirus dans le génome de la cellule hôte grâce à ses activités exonucléase, endonucléase et ligase.

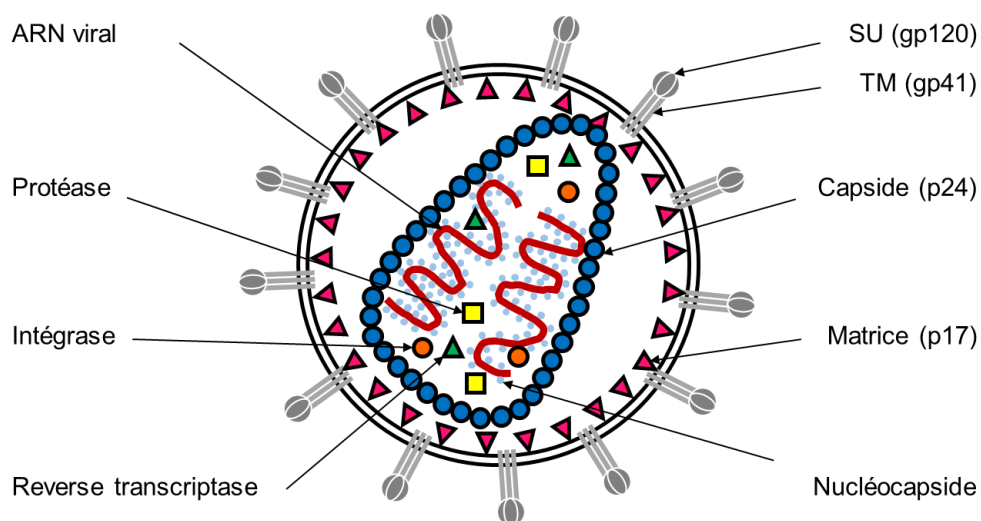


Figure 2 : Structure du VIH-1

I.B.1.b. Les éléments cis-actifs

Les deux LTRs (5' et 3') participent à la réplication du génome viral et à l'intégration du provirus. Lors de la transcription inverse, il y a une duplication du LTR 5' pour générer le provirus qui sera intégré et au cours de ce processus la région U3 du 3'LTR est copiée dans le LTR 5'. Le virus intégré utilise le promoteur dans le LTR 5' pour exprimer le génome viral alors que le LTR 3' permet de stabiliser les transcrits grâce au site de polyadénylation, et permet aussi l'expression de la protéine accessoire Nef. Les LTRs sont composés de 3 régions : U3 (unique 3), R (repeat) et U5 (unique 5). La région U3 située en 5' de chaque LTR contient le promoteur rétroviral et les enhancers avec des sites de liaison pour de nombreux facteurs de transcription cellulaires tels que NF- κ B, Sp1, TAB (TATA box binding protein) et le site de liaison de la RNA polymérase II. La région R est essentielle pour la transcription inverse et la réplication du VIH et contient le site de polyadénylation. Dans l'ARN viral R U5 qui est produit, juste en 5' se trouve l'épingle TAR qui se lie avec Tat pour permettre une élongation efficace lors de la transcription du génome viral. L'ARN R U5 contient également des séquences qui facilitent l'initiation de la transcription inverse telles que tRNA primer binding site (PBS), le site de dimérisation (DIS : Dimer Initiation Site), et le signal d'encapsidation Ψ permettant de structurer l'ARN génomique, en médiant la reconnaissance et l'encapsidation de cet ARN génomique avant assemblage (Clever and Parslow, 1997).

D'autres éléments cis-actifs sont situés en dehors des LTRs incluant les sites d'épissage donneur et accepteur (SD : Splicing Donor et SA : Splicing Acceptor), le RRE (Rev Responsive Element) qui permet l'export des ARNs non épissés depuis le noyau, et les sites PPT (central et terminal polypurine tracts) qui optimisent l'import nucléaire.

I.B.1.c. Cycle répliatif du VIH-1

La première étape du cycle du VIH-1 est la reconnaissance et la fixation de la glycoprotéine gp120 sous forme de trimère à son récepteur CD4 à la surface des lymphocytes T. Il y a ensuite liaison de cette glycoprotéine au corécepteur CXCR4 (lymphocytes T) ou CCR5 (lymphocytes T activés, monocytes, macrophages ou cellules dendritiques). La liaison au corécepteur initie l'étape de fusion des membranes virale et cellulaire. Dans un premier temps, gp120 (SU) change de conformation, ce qui entraîne un démasquage de la glycoprotéine gp41 qui s'insère dans la membrane de la cellule cible grâce au peptide de fusion. Gp41 (TM) adopte alors une structure en épingle à cheveux par interaction de ses

domaines N- et C-terminaux, ce qui permet la mise en contact des membranes virale et cellulaire et la création d'un pore de fusion.

La deuxième étape est la décapsidation du virus, le contenu viral (génomme + protéines associées) est libéré via le pore de fusion ainsi créé dans le cytoplasme de la cellule cible, au niveau du pore nucléaire (Campbell and Hope, 2015). L'ARN simple brin positif est alors rétro-transcrit par la transcriptase inverse (RT) pour former un ADN double brin qui va être importé dans le noyau. Dans le noyau, cet ADN s'intègre au génome de la cellule hôte sous l'action de l'intégrase virale. Après intégration, l'ADN proviral est transcrit et épissé en ARNm. Dans la phase précoce du cycle réplcatif, seuls les ARNm totalement épissés sont exportés du noyau vers le cytoplasme, c'est-à-dire Tat, Nef et Rev. Rev interagit avec le domaine RRE des ARNm non-épissés et permet ainsi leur export nucléaire (Vif, Vpr, Vpu, Env, Gag, Gagpol). Le génome viral et les protéines synthétisées s'assemblent à la membrane plasmique (Sundquist and Krausslich, 2012). Les virions immatures sont relargués par bourgeonnement hors de la cellule hôte, la protéase est activée et permet le clivage des précurseurs gag et gagpol pour convertir les virions immatures en virions matures capables d'infecter à leur tour les cellules cibles (Figure 3) (Freed, 2015). Cette dernière étape consistant à produire de nouveaux virions à partir du génome du VIH-1 est modifiée pour les vecteurs lentiviraux par rapport au virus sauvage. Les connaissances sur les éléments cis-actifs qui régulent la transcription et l'intégration du génome du VIH-1 a permis de modifier ce virus par ingénierie afin d'obtenir des particules non réplcatives tout en conservant ses capacités à intégrer son cargo génomique. C'est ainsi que l'on passe d'un virus réplcatif et infectieux à un vecteur de transfert de gène. Les détails des systèmes de vecteurs de transfert de gène dérivés du VIH-1 sont expliqués dans la partie suivante (I.B.1.d. Génome des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1).

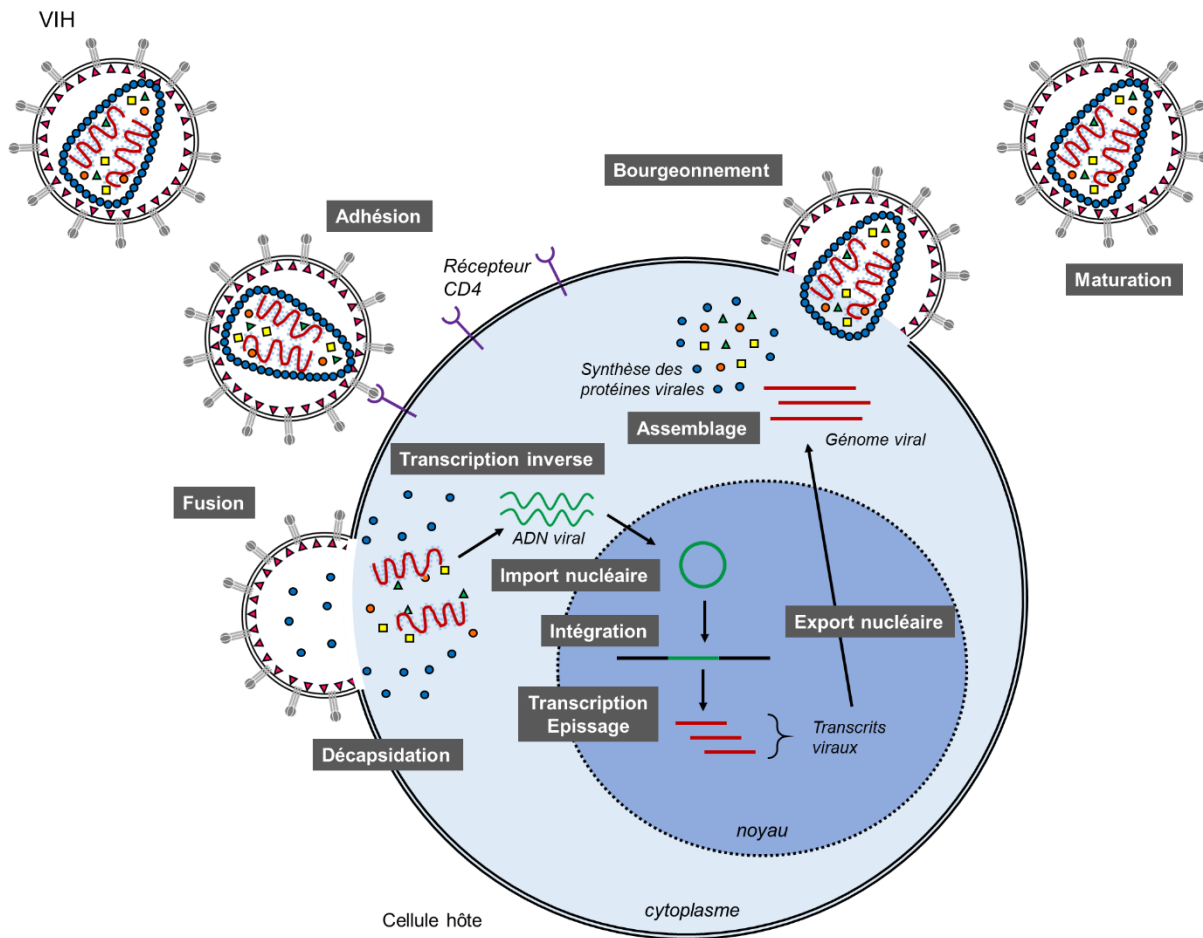


Figure 3 : Cycle réplcatif du VIH-1. D'après (Sakuma et al., 2012)

Le virus va grâce à la glycoprotéine gp120 reconnaître et se fixer à son récepteur CD4 à la surface des lymphocytes T, les membranes cellulaire et virale vont fusionner ce qui va entraîner la décapsidation du virus. Le matériel génétique viral sous forme d'ARN va subir une transcription inverse, l'ADN viral ainsi formé va être importé dans le noyau où il va s'intégrer au génome de la cellule hôte, puis après transcription et épissage les transcrits viraux vont être exportés du noyau, il y a assemblage des différents éléments viraux dans le cytoplasme et formation de provirus par bourgeoisement qui vont maturer et être capables à leur tour d'infecter les cellules voisines

I.B.1.d. Génome des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1

Les vecteurs lentiviraux de 1^{ère} génération sont très proches du virus sauvage du VIH-1. Des mutations génétiques ont été apportées pour des raisons de biosécurité et pour améliorer leur efficacité. Le matériel génétique est réparti sur 3 plasmides : un plasmide code pour gagpol, pour les protéines accessoires (vif, vpr, vpu et nef) et pour les protéines régulatrices (rev et tat). Un second plasmide code pour la glycoprotéine d'enveloppe (en général VSVG). Ces deux plasmides sont sous contrôle de promoteurs hétérologues, et non sous contrôle du promoteur LTR. Le troisième plasmide est le plasmide de transfert, il code

pour le transgène et est flanqué en 5' et en 3' de deux séquences régulatrices identiques, les LTRs (Long Terminal Repeat), ce plasmide contient également des séquences essentielles à la transcription comme le RRE, ou à l'encapsidation comme Psi (Ψ) (Figure 4) (Naldini et al., 1996). Le fait de séparer les différents éléments du vecteur sur 3 plasmides différents permet de réduire le risque de formation de lentivirus compétents pour la réplication (RCLs).

La seconde génération de vecteurs lentiviraux a été développée dans le but d'améliorer la sécurité des vecteurs, en enlevant les séquences codant pour les protéines accessoires vif, bvp, vpu et nef (Figure 4). Ces protéines sont essentielles à la virulence du VIH-1 mais leur délétion n'affecte pas l'efficacité de transfert de gène des vecteurs lentiviraux (Zufferey et al., 1997).

Les vecteurs lentiviraux de 3^{ème} génération sont les plus utilisés à l'heure actuelle, et ont été développés pour augmenter encore la biosécurité des vecteurs (Dull et al., 1998).

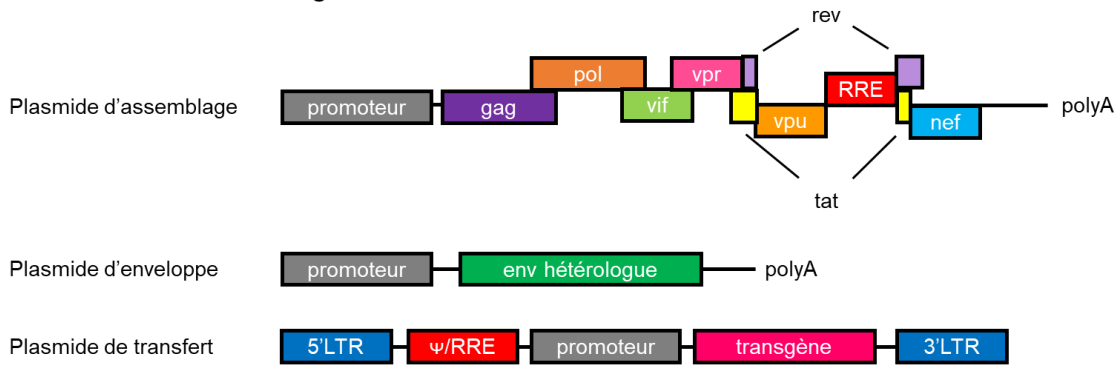
Le génome de ces vecteurs est réparti sur 4 plasmides : le plasmide d'enveloppe, le plasmide d'assemblage délété des séquences régulatrices tat et rev, le plasmide de transfert et un plasmide codant pour rev (Figure 4). Cette répartition sur 4 plasmides avec un plasmide codant pour rev permet une meilleure stabilité du transcrit, par interaction avec le RRE (Rev Responsive Element), permettant l'export nucléaire des ARNs non épissés.

Les vecteurs lentiviraux de 3^{ème} génération utilisent le système LTR_{SIN} (Self Inactivating). Le transgène qui est intégré dans le génome de la cellule hôte par le vecteur lentiviral est flanqué de deux LTRs identiques. Cependant, il existe dans le génome des vertébrés de nombreuses séquences endogènes dérivées de LTRs issus de rétrovirus ancestraux (Jern and Coffin, 2008). Il y a donc un risque de recombinaison entre les séquences du vecteur lentiviral et du génome de l'hôte, conduisant à la production de particules lentivirales compétentes pour la réplication (RCLs = Replication-Competent Lentiviruses) (Segall et al., 2003). De plus, les LTRs intégrés peuvent activer des gènes à proximité du site d'insertion du génome viral, car ils possèdent des propriétés « enhancer » et promotrices. En cas d'insertion à proximité d'un proto-oncogène, il y a donc des risques d'effets indésirables très graves avec induction de cancers, comme cela a déjà été observé par le passé (Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

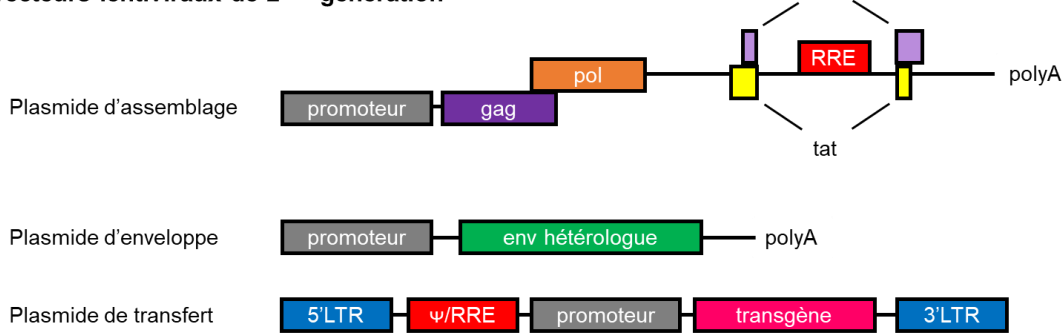
Les vecteurs auto-inactivants SIN ont été développés pour améliorer la biosécurité des vecteurs lentiviraux. Les LTRs sont constitués de 3 régions : U3, R et U5. Un promoteur fort va remplacer la région U3 du 5'LTR (RSV pour le système pRRL ou CMV pour le système pCCL par exemple). Une partie de la région U3 (promoteur) du 3'LTR est délétée au niveau du plasmide de transfert, incluant la TATA box et les sites de liaison aux facteurs de

transcription SP1, NF- κ B et NFAT ; ces séquences étant nécessaires à la transcription et à la réplication du provirus, et devient la région Δ U3 (Bukovsky et al., 1999; Miyoshi et al., 1998; Zufferey et al., 1998). Après rétro-transcription du provirus, cette délétion est transférée au 5'LTR, conduisant à l'intégration d'un provirus n'ayant pas d'activité transcriptionnelle (Figure 4). Le promoteur viral étant délété, il est nécessaire d'avoir un promoteur interne en amont du transgène dans la cassette du plasmide de transfert. Ce promoteur doit être suffisamment fort pour permettre un niveau thérapeutique d'expression du transgène sans entraîner de génotoxicité, et doit pouvoir permettre une expression la plus spécifique du tissu/organe cible pour éviter une expression ectopique du transgène.

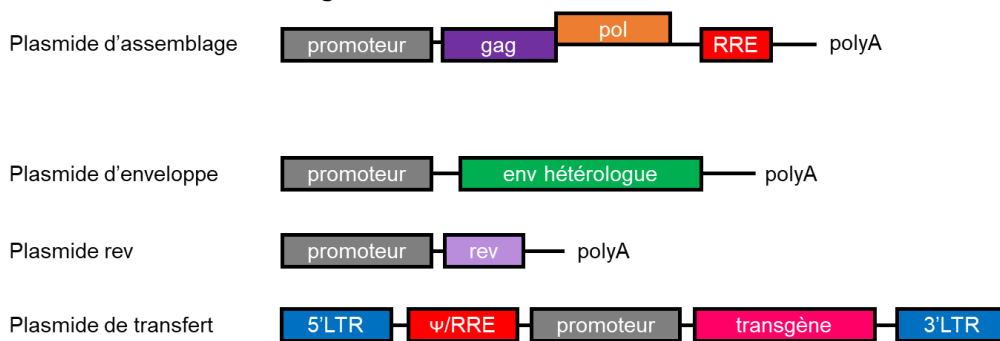
Vecteurs lentiviraux de 1^{ère} génération



Vecteurs lentiviraux de 2^{ème} génération



Vecteurs lentiviraux de 3^{ème} génération



Vecteurs SIN

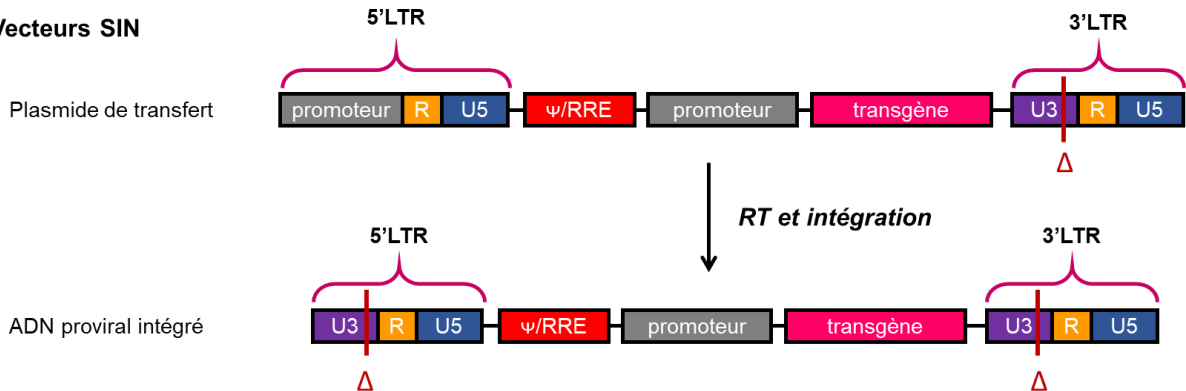


Figure 4 : Représentation schématique des vecteurs lentiviraux

I.B.1.d.3. Les éléments viraux hétérologues

Des éléments hétérologues peuvent être insérés dans les cassettes servant à la production, notamment pour une régulation de l'expression du transgène, ou du tropisme des vecteurs.

Il est courant de retrouver dans le plasmide de transfert des éléments de régulation qui vont permettre une augmentation de l'expression du transgène. La séquence du WPRE (Wood Chuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element) provenant du virus de l'hépatite de la marmotte, ou des mutants de ce WPRE sont ainsi très fréquemment retrouvés en 3' du transgène (Zufferey et al., 1999).

Afin d'obtenir l'expression souhaitée du transgène, différents promoteurs peuvent être utilisés. Certains de ces promoteurs, notamment des promoteurs forts ubiquitaires sont d'origine virale, comme le CMV (Cytomégalo virus) ou le SFFV (Spleen Focus Forming Virus). Des promoteurs cellulaires spécifiques peuvent également être utilisés afin d'obtenir des niveaux d'expression spécifiques de lignées cellulaires ou d'organes cibles, à des niveaux physiologiques.

La glycoprotéine d'enveloppe, qui permet la reconnaissance et la fusion avec son récepteur à la surface des cellules cibles, peut provenir d'autres virus de différentes familles (*cf partie I.B.2. Le pseudotypage de vecteurs lentiviraux, orientation du tropisme cellulaire*).

I.B.1.e. Principe du pseudotypage

Le VIH-1 est un virus enveloppé qui possède à sa surface une glycoprotéine d'enveloppe dérivée du clivage du précurseur gp160 : une protéine de surface gp120 et une protéine transmembranaire gp41. La glycoprotéine d'enveloppe va reconnaître et interagir avec son récepteur à la surface de la cellule hôte. Le récepteur du virus du VIH-1 est le CD4 et ses corécepteurs CXCR4 ou CCR5, ce qui limite le tropisme de ces virus aux lymphocytes T (Dalglish et al., 1984; Moore et al., 1997).

Le pseudotypage de vecteurs lentiviraux consiste à incorporer une glycoprotéine d'enveloppe hétérologue, permettant ainsi de modifier le tropisme cellulaire du vecteur. Les premières études montrant la possibilité de pseudotyper des virus dérivés du VIH-1 ont permis de mettre en évidence la possibilité de produire des vecteurs incorporant des glycoprotéines provenant des virus amphotropes ou écotropes de la leucémie murine (MLV-amphotropic ou –ecotropic env) ou du virus HTLV-1 (Human T cell Leukemia Virus type 1), et la possibilité

pour ces nouveaux pseudotypes de vecteurs lentiviraux d'infecter à la fois des cellules humaines et murines (Landau et al., 1991; Page et al., 1990).

Les glycoprotéines rétrovirales sont produites à partir d'un polypeptide clivé en 2 sous-unités comprenant d'une part une protéine SU exposée en surface pour la reconnaissance de récepteurs et d'autre part en liaison non covalente, une protéine transmembranaire (TM) comportant un peptide de fusion et une partie intracytoplasmique qui interagit avec gag pour permettre l'ancrage de la protéine avec la capsid.

On sait maintenant qu'il est possible d'utiliser non seulement d'autres glycoprotéines rétrovirales pour pseudotyper des particules dérivées du VIH-1 mais également une vaste liste d'autres glycoprotéines d'enveloppe hétérologues (voir section *1.B.2.c. Pseudotypage de vecteurs lentiviraux par des glycoprotéines d'enveloppe virales hétérologues*). Les glycoprotéines hétérologues utilisables pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux possèdent les caractéristiques essentielles qui sont les suivantes. La glycoprotéine d'enveloppe doit permettre la reconnaissance de la cellule cible, de préférence par liaison avec un récepteur défini. En effet les virus entrent dans les cellules en se liant à des facteurs d'attachement généralement peu spécifiques (ex. carbohydrates) mais aussi à des récepteurs viraux qui jouent un rôle actif dans l'entrée. Après l'attachement du vecteur à la cellule cible et après liaison au récepteur, les particules pénètrent dans la cellule à travers divers mécanismes impliquant ou non des étapes d'endocytose. La glycoprotéine de la particule virale doit permettre la fusion entre les membranes cellulaires et virales pour permettre le relargage du matériel génétique viral dans le cytoplasme, son transport intracytosolique et intranucléaire. Enfin, la glycoprotéine d'enveloppe doit permettre l'encapsidation et la production des particules lentivirales de manière efficace. De ce fait, la glycoprotéine d'enveloppe confère des propriétés physico-chimiques à la particule notamment en termes de taille ou de charge électronique, ce qui détermine sa stabilité et la résistance des particules lors de leur production, de leur concentration et de leur conservation. Ces paramètres sont importants dans le développement pharmaceutique des vecteurs de thérapie génique.

I.B.2. Le pseudotypage de vecteurs lentiviraux, mécanismes d'entrée et orientation du tropisme cellulaire

Parmi les différentes propriétés des glycoprotéines d'enveloppe utilisées pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux, l'étape de fusion entre les membranes cellulaires et virales et qui permet l'entrée dans la cellule cible, est une étape majeure qui repose sur des mécanismes biochimiques complexes.

I.B.2.a. Les mécanismes de fusion membrane rétrovirale-membrane cellulaire

Les membranes biologiques sont constituées de bicouches lipidiques au sein desquelles les molécules lipidiques sont orientées de façon parallèle. Les lipides sont des molécules amphipathiques, c'est-à-dire qu'elles contiennent une tête hydrophile, généralement chargée, ainsi qu'une queue hydrophobe composée d'hydrocarbures. L'organisation des bicouches des membranes biologiques permet l'exposition des têtes hydrophobes des lipides, tandis que les queues hydrophobes sont orientées entre elles entre les deux couches. Cette conformation est en effet la plus stable d'un point de vue thermodynamique.

Lors de la fusion des membranes, les deux bicouches lipidiques vont entrer en contact, ce qui va impliquer l'évacuation de l'eau des surfaces hydrophiles et l'opposition entre des charges électrostatiques de charges égales. Ces deux processus nécessitent beaucoup d'énergie, c'est pourquoi les processus de fusion des membranes cellulaires sont médiés par des protéines qui vont permettre de s'affranchir des forces de répulsion hydrophiles et de promouvoir des forces attractives hydrophobes (Helm et al., 1992).

La spécificité de la liaison de la glycoprotéine d'enveloppe à son récepteur est déterminante pour le tropisme des rétrovirus. Les glycoprotéines d'enveloppe sont constituées de deux sous-unités : une sous-unité de surface (SU) et une sous-unité transmembranaire (TM). La sous-unité TM qui est ancrée dans la membrane virale permet la fusion des membranes après la liaison de la sous-unité SU à son récepteur.

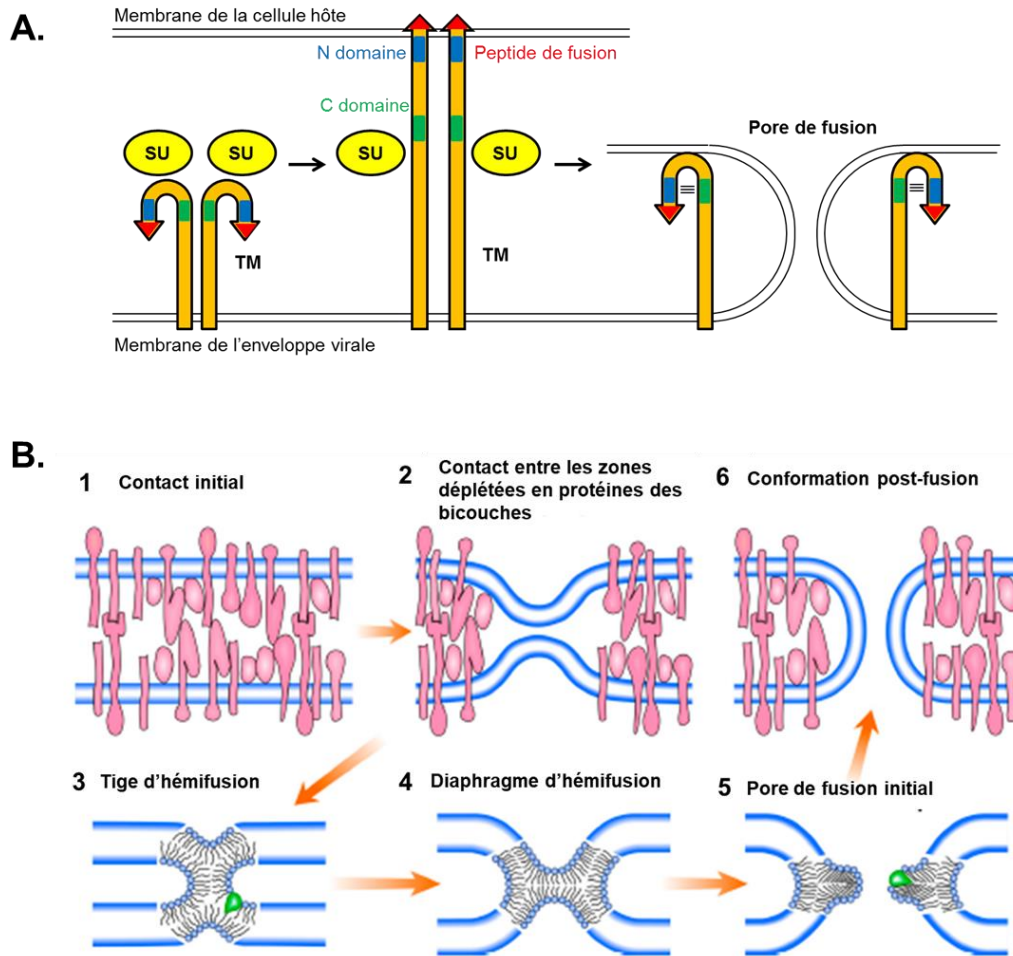


Figure 5 : Mécanismes de fusion cellulaire

A : Représentation schématique mécanismes de fusion rétrovirus-cellule et des changements de conformation de la glycoprotéine d'enveloppe rétrovirale. SU= sous-unité de surface, TM = sous-unité transmembranaire. D'après (Kubo, 2011). **B :** Représentation schématique des intermédiaires lors de l'hémifusion pour la création d'un pore de fusion, d'après (Chernomordik et al., 2006)

La liaison de la sous-unité SU à son récepteur va entraîner un changement de conformation de la sous-unité TM dont la partie N-terminale hydrophobe va se retrouver exposée et va s'insérer dans la membrane de la cellule cible grâce au peptide de fusion. La sous-unité TM va alors adopter une structure en épingle à cheveux par interaction de ses domaines N- et C-terminaux. Ces changements de conformation vont entraîner la mise en contact et l'enchevêtrement des membranes virale et cellulaire, permettant la création d'un pore de fusion (Figure 5A) (Kubo, 2011). Dans un premier temps, les bicouches lipidiques des deux membranes vont entrer en contact, les protéines associées à la membrane vont se déplacer pour permettre de créer une zone de contact entre les deux bicouches. Le rapprochement des membranes va entraîner une déshydratation des têtes polaires des lipides de la bicouche membranaire. Une continuité lipidique va s'établir entre les monocouches

externes des deux membranes, formant la « tige » d'hémifusion. Cette tige s'étend pour former le diaphragme d'hémifusion, formé par les monocouches internes des membranes. Un pore de fusion va ensuite être créé au sein de ce diaphragme, dont l'élargissement conduira à la fusion complète (Figure 5B) (Chernomordik et al., 2006).

La capacité fusogénique des glycoprotéines rétrovirales est contrôlée par plusieurs mécanismes. En particulier, un peptide R dans la partie TM inhibe la fusion dans les cellules productrices mais peut être clivé par la protéase virale pour induire la fusion avec des cellules cibles. Le peptide R de certains rétrovirus, tel que le rétrovirus amphotrope murine leukemia virus 4070A est très actif sur la fusion. Cette séquence est donc insérée dans la partie TM de plusieurs pseudotypes ingénierés tel que GALV-TR. Inversement la séquence R peut être déléetée pour augmenter l'infectivité comme dans le cas de BaEV-R-less (Bernadin et al., 2019; Drakopoulou et al., 2018).

I.B.2.b. VSVG : le pseudotype le plus courant, avantages et limites

Actuellement, la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSVG) de la souche Indiana est la glycoprotéine la plus utilisée pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 pour la thérapie génique.

I.B.2.b.1. Structure de la protéine VSVG

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) appartient à la famille des *Rhabdoviridae* et au genre *Vesiculovirus*. Ce sont des virus à ARN simple brin enveloppés. La glycoprotéine G du virus VSV, appelée VSVG, est une protéine transmembranaire qui permet la fixation du virus aux cellules cibles. La protéine VSVG utilise comme récepteur les protéines de la famille LDL-R (Low Density Lipoprotein Receptor) (Finkelshtein et al., 2013).

Cette protéine trimérique G peut adopter 3 états de configuration différents : une configuration native pré-fusion, une configuration hydrophobe activée (qui va interagir avec la membrane cellulaire lors des premières étapes de la fusion) et une configuration post-fusion (Figure 6) (Durrer et al., 1995; Roche and Gaudin, 2002; Roche et al., 2007).

A. Prefusion



B. Postfusion

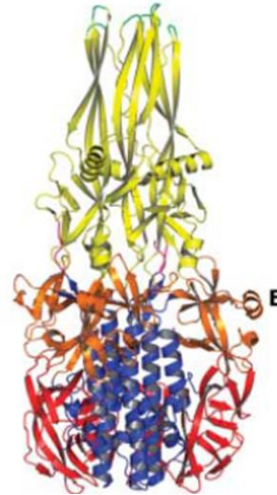


Figure 6 : Structure du trimère formé par la glycoprotéine VSVG

Dans la conformation pré-fusion (**A**) et post-fusion (**B**). En rouge = domaine D1 (domaine latéral), en bleu = domaine DII (domaine de trimérisation), en orange = domaine DIII (domaine d'homologie de la pleckstrine), en jaune = domaine DIV (domaine de fusion) (Roche et al., 2007)

1.B.2.b.2. La fusion médiée par la glycoprotéine VSVG

La glycoprotéine transmembranaire G est responsable de la reconnaissance du récepteur à la surface de la cellule cible et de la fusion des membranes. Le récepteur de la glycoprotéine VSVG appartient à la famille du LDL-R (Finkelshtein et al., 2013). Le domaine ligand du LDL-R est constitué de 7 domaines répétés riches en cystéine (CR domaines). La protéine VSVG est capable de reconnaître et de se lier aux domaines CR2 et CR3 du LDL-R (Nikolic et al., 2018).

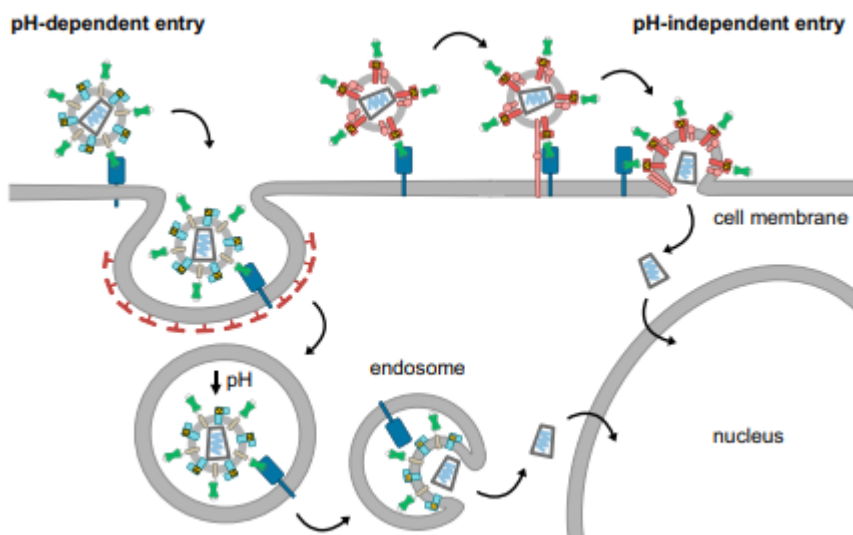


Figure 7 : Représentation schématique des voies d'entrée des vecteurs lentiviraux pH-dépendants vs pH-indépendants (Frank and Buchholz, 2019)

Le virus VSV, ainsi que les vecteurs lentiviraux pseudotypés par la glycoprotéine VSVG vont entrer dans la cellule hôte par la voie de l'endocytose de façon pH-dépendante (Figure 7). La fusion entre les membranes est rendue possible par les conditions de pH faible de l'endosome (Le Blanc et al., 2005). Le pH endosomal acide va entraîner un changement de conformation de la glycoprotéine, permettant l'exposition du domaine de fusion (Figure 6) et ainsi la fusion entre les membranes endosomale et virale, pour permettre la décapsulation du matériel viral dans le cytoplasme de la cellule hôte.

1.B.2.b.3. Avantages et limitations du pseudotypage de vecteurs lentiviraux par la protéine VSVG

La protéine VSVG permet un pseudotypage efficace de vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1, et est le pseudotype d'enveloppe lentiviral le plus fréquemment utilisé. Les vecteurs lentiviraux pseudotypés par VSVG (LV-VSVG) possèdent un tropisme de transduction très large (Akkina et al., 1996; Naldini et al., 1996; Reiser et al., 1996), et ce sont des vecteurs ayant une grande stabilité, qu'il est possible de concentrer par ultracentrifugation (Bartz et al., 1996; Burns et al., 1993). De plus, il existe des procédés de production et de purification des vecteurs LV-VSVG qui permettent une production à l'échelle industrielle et une utilisation en clinique (Merten et al., 2010). Les LV-VSVG ont un tropisme très large, ce qui s'explique par l'expression ubiquitaire de son récepteur, le LDL-R (Finkelshtein et al., 2013). Chez l'homme, les lymphocytes T non-activés, ou les lymphocytes B par exemple, n'expriment pas ou très

faiblement le LDL-R, et sont ainsi inefficacement transduits par les LV-VSVG (Amirache et al., 2014).

Cependant, il existe certaines limites à l'utilisation de vecteurs LV-VSVG. En effet, un des principaux inconvénients est l'inactivation de la VSVG par le complément du sérum humain. En raison des réponses immunes qui pourraient être induites, l'utilisation des vecteurs LV-VSVG pour des applications *in vivo* chez l'homme est compromise (DePolo et al., 2000). De plus, son large tropisme de transduction peut, *in vivo*, entraîner une expression du transgène dans des organes ou cellules non ciblées, et ainsi engendrer des effets indésirables, avec une forte affinité du vecteur pour le foie (Cire et al., 2014; Kafri et al., 1997; Pan et al., 2002). Il est démontré que l'administration par voie intraveineuse de vecteurs LV-VSVG chez la souris déclenche des réponses immunitaires T CD4 et CD8 efficaces contre le transgène (Cire et al., 2014).

I.B.2.c. Pseudotypage de vecteurs lentiviraux par des glycoprotéines d'enveloppe virales hétérologues

Bien que la protéine VSVG reste la plus fréquemment utilisée à l'heure actuelle pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1, et notamment pour des applications cliniques, la liste des glycoprotéines utilisées pour le pseudotypage de vecteurs lentiviraux ne cesse d'augmenter. Le but est d'obtenir un tropisme de transduction des vecteurs plus ciblé, mais aussi dans un souci de diminuer les réponses immunitaires, notamment pour des utilisations *in vivo* chez l'homme.

La liste des glycoprotéines virales hétérologues utilisées pour le pseudotypage de particules lentivirales est représentée dans le [Tableau 3](#) (page suivante) :

Genre	Virus (GP)	Spécificité cellulaire	Référence
Rhabdoviridae			
Vesiculovirus	Vesicular stomatitis virus (VSVG)	Large spectre	(Burns et al., 1993)
	Cocal virus	Cellules hématopoïétiques	(Trobridge et al., 2010)
Lyssavirus	Rabies virus (RabV)	Cellules neurales	(Mochizuki et al., 1998), (Carpentier et al., 2012)
	Mokola virus (MOKV)	Cellules neurales	(Mochizuki et al., 1998), (Watson et al., 2002)
Filoviridae			
Filovirus	Ebola Zaire virus (EboZ)	Cellules hématopoïétiques, cellules épithéliales pulmonaires	(Chan et al., 2000)
	Marburg virus	Cellules épithéliales pulmonaires	(Chan et al., 2000)
Arenaviridae			
Arenavirus	Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	Cellules dendritiques, cellules neurales, hépatocytes	(Christodoulopoulos and Cannon, 2001), (Beyer et al., 2002)
Retroviridae			
Betaretrovirus	Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV)	Cellules épithéliales pulmonaires	(Liu et al., 2004)
	Murine leukemia virus 10A1 (10A1-MLV)	Cellules hématopoïétiques	(Stitz et al., 2000), (Watson et al., 2002)
Gammaretrovirus	Gibbon ape leukemia virus (GALV)	Cellules hématopoïétiques	(Kiem et al., 1997)
	Feline endogenous retrovirus (RD114)	Cellules hématopoïétiques	(Sandrin et al., 2002), (Bell et al., 2010)
	Baboon endogenous retrovirus (BaeV)	Cellules hématopoïétiques	(Girard-Gagnepain et al., 2014)
	Ecotropic MLV	Large spectre	(Landau et al., 1991), (Reiser et al., 1996)
	Amphotropic 407A MLV	Large spectre	(Page et al., 1990)
	Xenotropic NZB MLV	Large spectre	(Christodoulopoulos and Cannon, 2001)
Deltaretrovirus	Human T-lymphotropic virus (HTLV-1)	Lymphocytes T	(Landau et al., 1991)
Paramyxoviridae			
Respirovirus	Sendai virus	Cellules épithéliales pulmonaires, hépatocytes	(Kowolik and Yee, 2002)
	Respiratory syncytia virus (RSV)	Cellules épithéliales pulmonaires	(Haid et al., 2016)
Henipavirus	Nipah virus (NiV)	Cellules souches embryonnaires et hématopoïétiques	(Witting et al., 2013)
Morbillivirus	Measles virus (MV)	Lymphocytes, cellules dendritiques	(Funke et al., 2009)
Togaviridae			
Alphavirus	Chikungunya virus (CHIKV)	Cellules hématopoïétiques, fibroblastes, hépatocytes	(Salvador et al., 2009)
	Ross river virus (RRV)	Fibroblastes, cellules gliales, hépatocytes, cellules de Kupffer	(Kahl et al., 2004)
	Semliki forest virus (SFV)	Fibroblastes, cellules gliales, hépatocytes, cellules de Kupffer	(Kahl et al., 2004)
	Venezualan equine encephalitis virus (VEEV)	Fibroblastes, hépatocytes	(Kolokoltssov et al., 2005)
	Western equine encephalitis virus (WEEV)	Fibroblastes, hépatocytes	(Poluri et al., 2008)
Orthomyxoviridae			
Influenzavirus	Influenza virus A	Epithélium bronchique	(Patel et al., 2013)
Baculoviridae			
Baculovirus	GP64 Baculovirus	Fibroblastes, hépatocytes, cellules épithéliales	(Kumar et al., 2003)

Tableau 3 : Les glycoprotéines d'enveloppe utilisées pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1

En fonction des glycoprotéines utilisées, le tropisme des vecteurs peut être large ou spécifique, comme par exemple les enveloppes GalV-TR, RD114-TR ou BaEV qui présentent un tropisme hématopoïétique. Un point critique pour le développement de nouveaux pseudotypes d'enveloppe concerne les réponses immunitaires associées au vecteur, afin de pouvoir utiliser ceux-ci *in vivo*. Les vecteurs lentiviraux pseudotypés avec la glycoprotéine coccal par exemple, sont résistantes au complément humain et peuvent être utilisés *in vivo*, sans interactions avec des anticorps neutralisants pré-existants (Munis et al., 2019; Trobridge et al., 2010).

I.B.2.d. Pseudotypage de vecteurs lentiviraux par des glycoprotéines d'enveloppe ingénierées pour un ciblage cellulaire

Le pseudotype lentiviral utilisé orientant le tropisme des vecteurs, des stratégies visant à cibler spécifiquement une population cellulaire d'intérêt ont été développées. Le principe repose sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux pseudotypés par la glycoprotéine de la rougeole (MV-LV).

Les protéines H (hémagglutinine) et F (fusion) du virus de la rougeole sont utilisées pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux, la glycoprotéine H permettant l'adhésion du vecteur à la cellule cible, et la glycoprotéine F permettant la fusion des membranes (Frecha et al., 2008; Funke et al., 2009). La souche sauvage du virus de la rougeole utilise comme récepteur SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule) ou CD150 (Yanagi et al., 2006). SLAM est une protéine transmembranaire exprimée par des cellules du système immunitaire dont entre autres les lymphocytes T mémoires, les lymphocytes B ou encore les cellules dendritiques. Le pseudotypage de vecteurs lentiviraux par les glycoprotéines H et F du virus de la rougeole permet la production de particules infectieuses capables de transduire des lymphocytes activés, des cellules dendritiques, des cellules épithéliales et des cellules souches hématopoïétiques (Buchholz et al., 2009; Frecha et al., 2009; Frecha et al., 2008; Funke et al., 2009; Levy et al., 2012).

Par mutations des sites de liaison au récepteur au niveau de la protéine H (hémagglutinine) de la rougeole, puis la fusion d'un fragment variable monocaténaire (single chain variable fragment, scFv) spécifique du récepteur cible au domaine C-terminal de cette protéine H, il est possible de créer des vecteurs lentiviraux spécifiques d'une population cellulaire d'intérêt (Buchholz et al., 2015; Buchholz et al., 2009; Kneissl et al., 2012).

Les glycoprotéines ingénierées ainsi développées, et notamment pour un ciblage de cellules sanguines, sont répertoriées dans le [Tableau 4](#) :

	Vecteur	Tropisme cellulaire	Référence
CD20 scFv	MV-LV	Lymphocytes B	(Funke et al., 2008) (Kneissl et al., 2013)
CD19 scFv	MV-LV	Lymphocytes B	(Kneissl et al., 2013)
CD30 scFv	MV-LV	Lymphocytes B CD30+	(Friedel et al., 2015)
CD3 scFv	MLV-LV	Lymphocytes T	(Maurice et al., 2002)
CD4 DARPINs	MV-LV	Lymphocytes T CD4+	(Zhou et al., 2015)
CD8 scFv	MV-LV	Lymphocytes T CD8+	(Zhou et al., 2012)
	NiV-LV		(Bender et al., 2016)

Tableau 4 : Glycoprotéines d'enveloppe modifiées par génie génétique utilisées pour le pseudotypage de vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1

scFv = single chain fragment variable ; MV-LV = vecteurs lentiviraux pseudotypés par la glycoprotéine de la rougeole, MLV-LV = vecteurs lentiviraux pseudotypés par la glycoprotéine du virus de la leucémie murine ; NiV-LV = vecteur lentiviral pseudotypé par la glycoprotéine du Nipah virus. D'après (Frank and Buchholz, 2019).

I.B.3. Méthodes de production des vecteurs lentiviraux

I.B.3.a. Production des vecteurs lentiviraux

I.B.3.a.1. Production de vecteurs lentiviraux par transfection transitoire

La production de vecteurs lentiviraux par transfection transitoire est la méthode la plus couramment utilisée en laboratoire, des protocoles détaillés ont été revus récemment (Kutner et al., 2009). Les cellules productrices sont les cellules embryonnaires de rein HEK293T, ou des clones dérivés de cette lignée. Ces cellules ont été obtenues par modification des cellules HEK293, pour obtenir une expression de l'antigène T du virus simien SV40 afin de les rendre plus performantes pour la production lentivirale. Les cellules sont transfectées par les plasmides d'assemblage, d'enveloppe, de transfert et codant pour rev (cf. partie I.B.1.d. *Génome des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1*) en présence d'un agent de transfection. Il existe différentes méthodes. L'utilisation de peptides ou lipides cationiques (Lipofectamine, TransIT...) est courante en recherche. La précipitation au phosphate de calcium Ca₂PO₄ est

très utilisée pour des productions à l'échelle recherche ainsi que pour la production de lots de grade clinique avec des cellules adhérentes, mais elle n'est pas utilisée pour des systèmes de production avec des cellules en suspension. A l'échelle industrielle, le polyéthylèneimine (PEI) est fréquemment utilisé (Merten et al., 2016). Une fois les plasmides entrés dans les cellules, la transcription va avoir lieu dans le noyau. L'ARN et les protéines virales sont synthétisés, s'assemblent et les particules lentivirales sont produites par bourgeonnement dans le milieu de culture (Figure 8). La transfection transitoire est la méthode de production de vecteurs lentiviraux la plus utilisée à l'échelle recherche, et est également utilisée à l'échelle industrielle pour la production de lots cliniques.

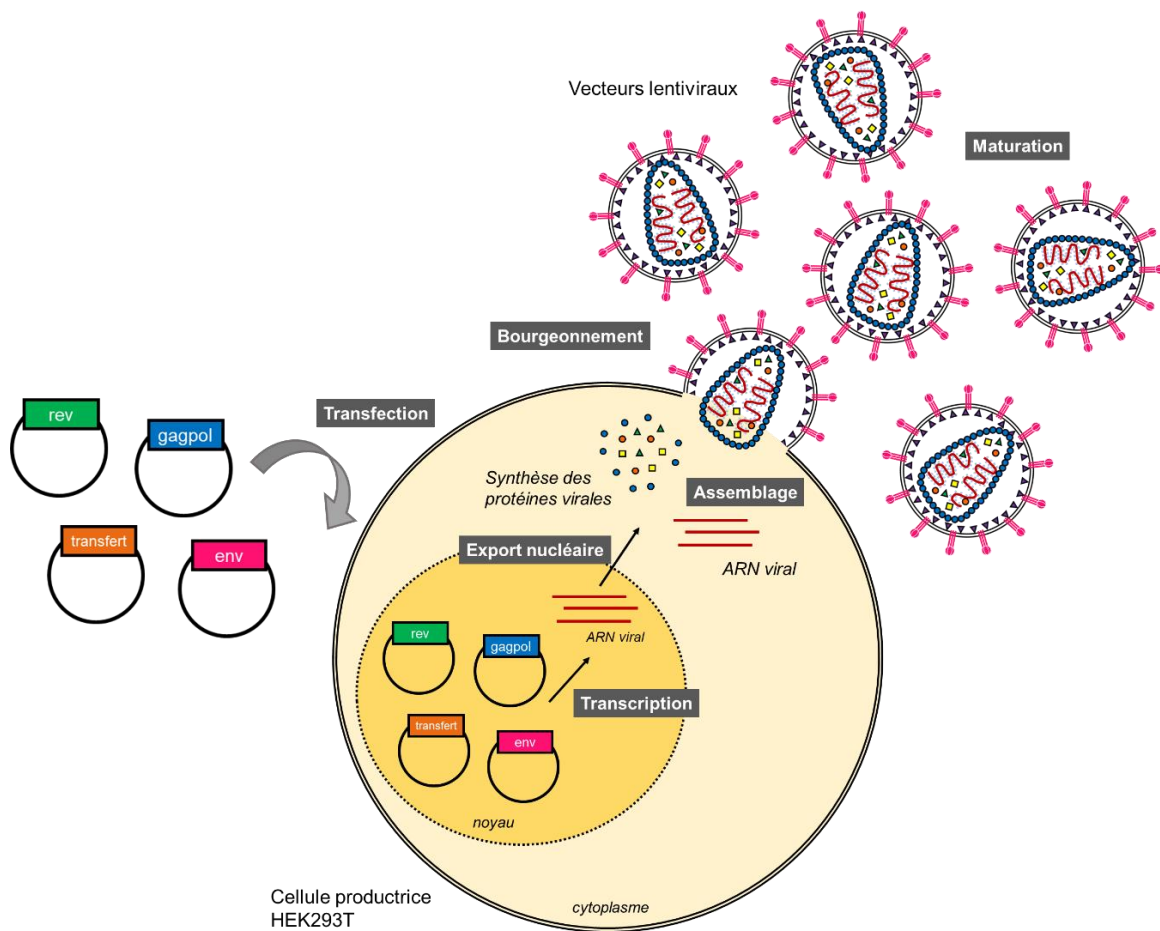


Figure 8 : Représentation schématique de la production de vecteurs lentiviraux par transfection transitoire

Pour des vecteurs lentiviraux de 3^{ème} génération, les quatre plasmides codant pour gagpol, env, rev et le plasmide de transfert sont transfectés de façon transitoire sur les cellules productrices HEK293T.

Dans le noyau, les plasmides vont être transcrits, puis l'ARN va être exporté du noyau vers le cytoplasme où les protéines virales vont être synthétisées. L'ARN viral et les protéines virales vont s'assembler et par bourgeonnement les particules lentivirales vont être libérées dans le milieu de culture où elles vont mûrir.

La production de vecteurs lentiviraux par transfection transitoire permet d'obtenir des produits de grade et d'échelle clinique, c'est une méthode robuste. Les contaminants plasmidiques peuvent être éliminés au cours du procédé de purification. Cependant des variations de titre d'un lot à un autre restent problématiques, notamment pour les procédés industriels (Merten et al., 2010; Schweizer and Merten, 2010).

1.B.3.a.2. Lignées productrices stables et inductibles

Des lignées productrices stables de particules lentivirales commencent à se développer notamment avec des pseudotypes autres que VSVG. L'intérêt des lignées productrices stables est de garantir une meilleure sécurité des productions de vecteurs lentiviraux, de réduire les variabilités de production de lot à lot, et de permettre des procédés de production industriels en continu pour obtenir de meilleurs rendements. Pour obtenir ces lignées, les différentes séquences codant pour l'assemblage, le transfert et l'enveloppe sont apportées aux cellules productrices soit par transfection soit par transduction. Cependant, ces lignées sont difficiles à développer. En effet, certaines protéines virales ont un effet cytotoxique sur les cellules productrices. Les glycoprotéines d'enveloppe peuvent également avoir un effet fusogénique au niveau des cellules productrices. Pour des productions cliniques, chaque lignée stable fait l'objet de nombreux essais concernant la reproductibilité, la stabilité des cellules et surtout la sécurité, rendant le développement de ces outils long et complexe.

Différentes lignées productrices stables ont été décrites pour différents pseudotypes d'enveloppe. Une lignée CD46null a été décrite pour la production de vecteurs lentiviraux pseudotypés par les glycoprotéines H et F de la rougeole (MV-LV), la déplétion en CD46 permettant une réduction des syncytia formés au cours de la production et une meilleure pureté du produit fini, avec une meilleure efficacité de transduction que des vecteurs produits par transfection transitoire (Ozog et al., 2019). Une lignée stable a également été développée pour la production de vecteurs pseudotypés par la protéine coccal, permettant d'obtenir des titres similaires à des vecteurs produits par transfection transitoire, avec une efficacité de transduction comparable (Humbert et al., 2016).

Afin de réduire l'immunogénicité des vecteurs LV-VSVG, *Milani et al.* ont développé une lignée productrice inductible β 2M-KO, les vecteurs ainsi produits sont dépourvus de molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), rendant les vecteurs LV-VSVG ainsi produits plus résistants à l'inactivation par le sérum et moins immunogènes (Milani et al., 2017). Cette lignée cellulaire a ensuite servi au développement d'une autre lignée

surexprimant le facteur CD47, et les vecteurs ainsi produits sont moins phagocytés par les macrophages (Milani et al., 2019).

Actuellement, seule une lignée stable a été appliquée en clinique à notre connaissance. Il s'agit d'une lignée productrice de vecteurs LV-VSVG codant pour l'IL2RG (Interleukin 2 Receptor Common γ Chain) pour le traitement de SCID-X1 qui permet la production de lots cliniques pour la transduction de cellules souches hématopoïétiques (Mamcarz et al., 2019).

I.B.4. La transduction de cellules par des vecteurs lentiviraux

L'infection de cellules par des vecteurs représente un cycle non-réplicatif des vecteurs lentiviraux et est appelée transduction. C'est un processus complexe, comprenant de nombreuses étapes dont l'entrée des vecteurs dans la cellule, le transport nucléaire, la rétro-transcription, l'intégration chromatinienne jusqu'à l'expression du transgène. Je me focaliserai plus particulièrement sur les étapes d'entrée du vecteur dans la cellule cible dans ce manuscrit.

I.B.4.a. Transduction de cellules par des vecteurs lentiviraux

L'infection de cellules avec des vecteurs viraux est appelée transduction. Le cycle des vecteurs lentiviraux connaît des étapes similaires au virus du VIH-1. Nous nous intéresserons ici au cycle de vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1. Lors de l'intégration du génome de la cellule cible, les LTR_{SIN} vont être exprimés en 5' et en 3' du transgène, empêchant la réplication (*cf partie I.B.1.d. Génome des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1*). L'ADN proviral va être transcrit en ARNm et exporté en dehors du noyau, le transgène va alors s'exprimer, et il n'y a pas de création de nouveaux virions ([Figure 9](#)).

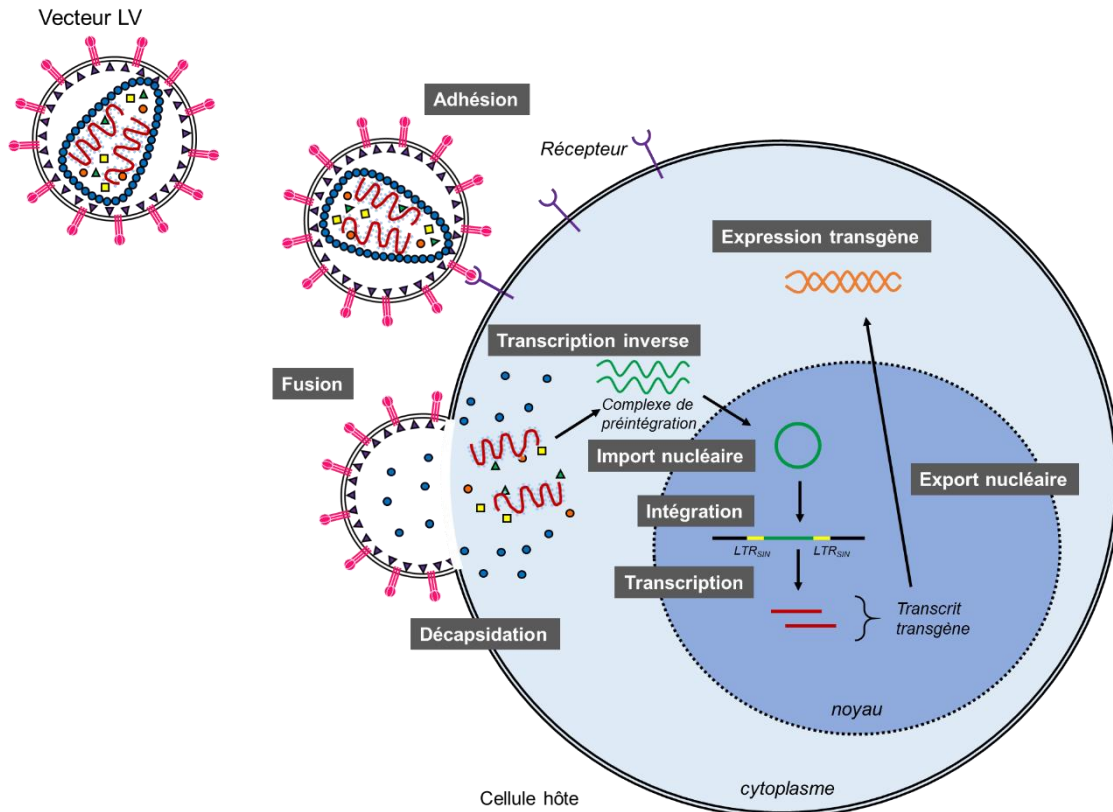


Figure 9 : Cycle non réplcatif des vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux, contrairement aux vecteurs rétroviraux, sont capables d’infecter à la fois des cellules en division et non en division (Lewis et al., 1992). Les vecteurs lentiviraux sont en effet capables de faire le transport, de façon active, du complexe de pré-intégration dans le noyau (Miller et al., 1997; Suzuki and Craigie, 2007). Des facteurs de la cellule hôte vont également interagir avec le complexe de préintégration lentiviral pour permettre son transport nucléaire. Ainsi, Nup98, qui est localisé au niveau du pore nucléaire, de façon symétrique entre les parties cytoplasmique et nucléaire (Brass et al., 2008; König et al., 2008; Zhou et al., 2008), et Nup153 localisé à la partie nucléaire du pore nucléaire, sont impliqués dans l’import nucléaire du complexe de préintégration, pour son intégration chromatinienne.

I.B.4.b. Les additifs de transduction

La transduction de cellules *ex vivo* par des vecteurs lentiviraux implique une optimisation des conditions de culture des cellules mais également des conditions de transduction, afin d’obtenir la meilleure efficacité possible sans toxicité. Afin d’augmenter

l'efficacité de transduction des vecteurs, des additifs de culture peuvent être utilisés afin de promouvoir l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les cellules cibles.

1.B.4.b.1. Les polymères

Les polymères cationiques, comme le polybrène, sont des macromolécules qui sont capables de former des complexes avec les vecteurs lentiviraux. Par agrégation virale et neutralisation des charges négatives au niveau des membranes cellulaire et virale, les complexes vont interagir avec la surface cellulaire et promouvoir l'internalisation par endocytose des vecteurs dans la cellule (Davis et al., 2004; Porter et al., 1998).

Les polymères non ioniques, aussi appelés poloxamères, peuvent également promouvoir l'entrée de vecteurs lentiviraux dans les cellules. C'est le cas du LentiBoost (poloxamer synperonic F108) qui permet une meilleure transduction et une meilleure intégration du vecteur dans les cellules, notamment hématopoïétiques, et peut être utilisé en clinique (Delville et al., 2018; Masiuk et al., 2019; Schott et al., 2019)

1.B.4.b.2. Les lipides

Les lipides cationiques, comme la lipofectamine, sont formés d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. Ils sont capables de former des complexes stables avec des vecteurs lentiviraux, augmentant ainsi l'efficacité de transduction de ces derniers (Hodgson and Solaiman, 1996; Innes et al., 1990), cependant ils ne sont pas utilisés en clinique du fait de leur cytotoxicité (Porter et al., 1998).

La prostaglandine E2 (PGE2) est un acide gras qui a récemment été mis en évidence comme additif de transduction, augmentant l'intégration du vecteur, notamment au niveau des cellules souches hématopoïétiques, sans effet toxique sur les cellules (Heffner et al., 2018; Masiuk et al., 2019).

1.B.4.b.3. Les peptides cationiques

Les peptides ou protéines cationiques sont souvent utilisés comme additifs de culture pour promouvoir l'entrée de vecteurs lentiviraux. C'est le cas de la protamine sulfate (Cornetta and Anderson, 1989), utilisée notamment lors de protocoles cliniques (Cartier et al., 2009), ou encore de peptides dérivés des glycoprotéines gp120 ou gp41 du VIH-1.

La Retronectin™

La rétronectine est un peptide recombinant d'un fragment de la fibronectine humaine qui permet d'augmenter considérablement l'efficacité de transduction de vecteurs lentiviraux ou rétroviraux (Hananberg et al., 1996). Cet adjuvant de transduction agit en permettant la colocalisation des vecteurs et des cellules. La rétronectine est composée d'un domaine héparine qui va être reconnu par le vecteur lenti/rétroviral et d'un domaine C de liaison cellulaire qui va reconnaître les intégrines VLA4 (Very Late Antigen 4) et VLA5 (Very Late Antigen 5) à la surface cellulaire (Hananberg et al., 1996; Kimizuka et al., 1991). Ces adjuvants de transduction sont très efficaces et il est possible de les utiliser en clinique. Cependant le processus de transduction des cellules avec la rétronectine est complexe, impliquant une étape d'attachement de la rétronectine sur le support de culture avant d'ensemencer les cellules.

La Vectofusin-1®

La Vectofusin-1®, ou LAH4-A4 ([Figure 10](#)), est un peptide cationique amphipathique riche en histidine dérivé de la famille de peptides LAH4 qui ont des propriétés de transfectants de l'ADN (Kichler et al., 2003; Mason et al., 2006). Des travaux réalisés au laboratoire ont permis de montrer que la Vectofusin-1 (VF1) agissait comme additif de culture pour augmenter la transduction par des vecteurs lentiviraux ou γ -rétroviraux avec différents pseudotypes d'enveloppe, en potentialisant l'étape d'entrée des vecteurs dans les cellules (Fenard et al., 2013b; Ingrao et al., 2014; Majdoul et al., 2016; Piovan et al., 2017).

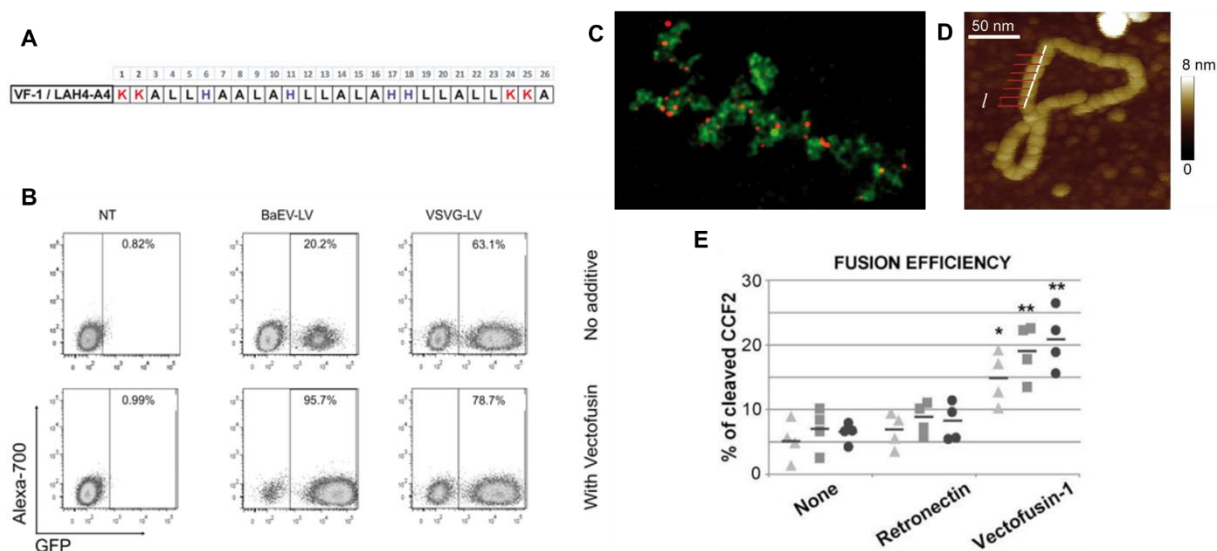


Figure 10 : La Vectofusin-1

A : séquence primaire peptidique de la VF1 (LAH4-A4) (Majdoul et al., 2016) **B** : Analyse par cytométrie en flux de l'efficacité de transduction de cellules CD34⁺ humaines de sang de cordon 7 jours post-transduction en présence ou en absence de VF1, avec des vecteurs LV-VSVG et LV-BaEV à la dose de 5^F+07 TU/mL (Radek et al., 2019) **C** : image de microscopie confocale de fibrilles de VF1 (vert) en contact avec des vecteurs LV-VSVG-mCherry (rouge) **D** : image de microscopie à force atomique de la structure en anneaux linéaire de fibrilles de VF1 qui s'auto-assemblent (Vermeer et al., 2017) ; **E** : Efficacité de fusion de la Vectofusin-1 mesurée sur des cellules CD34⁺ humaines par le test BLAM avec des vecteurs LV-VSVG, en comparaison avec la Retronectin (Ingrao et al., 2014)

La Vectofusin-1 permet notamment d'augmenter l'efficacité de transduction de cellules souches hématopoïétiques par des vecteurs lentiviraux ou γ -rétroviraux pseudotypés VSVG, GALV-TR, RD114-TR, MLV-A ou encore BaEV sans toxicité cellulaire (Fenard et al., 2013a; Majdoul et al., 2016; Piovan et al., 2017; Radek et al., 2019). La VF1 permet également d'augmenter l'efficacité de transduction de lymphocytes T par des vecteurs lentiviraux pseudotypés par RD114-TR (Piovan et al., 2017), Measles ou BaEV (Radek et al., 2019). Elle améliore également la transduction de lymphocytes B primaires par des vecteurs lentiviraux pseudotypés par BaEV ou Measles et permet la mise en place de procédés de production de cellules génétiquement modifiées dans des automates de transduction (Radek et al., 2019).

La VF1 agit en promouvant les étapes d'adhésion et de fusion des membranes cellulaire et virale (Fenard et al., 2013a), donc possède une action sur l'attachement des particules. La VF1 agit également sur les étapes de fusion membranaire (Ingrao et al., 2014). De plus, la Vectofusin-1 permet lors de tests de « pull-down », une sédimentation de 50 à 100% des particules lentivirales qui se retrouvent associées à un réseau de VF1. La VF1 forme des nanofibrilles en hélices α , contrairement à la plupart des peptides adjuvants de transduction qui forment des feuilletts β (Vermeer et al., 2017).

I.B.4.c. Les facteurs de restriction

Différentes protéines peuvent agir comme facteurs de restriction du VIH-1, pouvant ainsi avoir un impact sur le tropisme de transduction des vecteurs lentiviraux. Il existe différents facteurs de restriction connus à ce jour : les protéines TRIM (Kajaste-Rudnitski et al., 2011; Kutluay et al., 2013; Mandell et al., 2014; Pertel et al., 2011), APOBEC (Bishop et al., 2004; Harris et al., 2003; Koning et al., 2009), IFITMs (Chesarino et al., 2017; Compton et al., 2014; Yu et al., 2015), la Tetherin (Casartelli et al., 2010; Perez-Caballero et al., 2009), les SERINCs (Usami et al., 2015), MARCH8 (Tada et al., 2015) ou SAMHD1 (Ayinde et al., 2012; Descours et al., 2012; Laguette et al., 2011; Lahouassa et al., 2012; Puigdomènech et al., 2013; Ryoo et al., 2014). Il s'agit de gènes différemment exprimés en fonction du type cellulaire et du gène concerné, qui peuvent agir à différents niveaux en inhibant les étapes de fusion (Compton et al., 2014), d'entrée (Tada et al., 2015), de rétro-transcription (Lahouassa et al., 2012; Usami et al., 2015), de transcription (Kajaste-Rudnitski et al., 2011; Turrini et al., 2015), d'assemblage (Barr et al., 2008) ou de bourgeonnement (Perez-Caballero et al., 2009) du VIH-1.

Le virus du VIH-1 sauvage a développé des mécanismes de résistance à certains de ces facteurs de restriction avec les protéines Nef (Usami et al., 2015), Vif (Sheehy et al., 2003) ou Vpx (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011) par exemple. Les protéines Vpu et Nef régulent un grand nombre de protéines à la membrane plasmique des cellules (revue par Ramirez et al. Cell 2019).

Les vecteurs lentiviraux sont dépourvus de ces protéines accessoires donc restent susceptibles d'être limités par ces facteurs de restriction cellulaires. C'est pourquoi il s'agit d'un secteur de recherche très actif, afin d'optimiser l'efficacité de transduction des vecteurs.

I.B.5. Concentration et purification des vecteurs lentiviraux

Lors de la production de vecteurs lentiviraux, le surnageant de culture des cellules productrices est récolté puis clarifié et filtré afin d'éliminer les débris cellulaires avant concentration.

L'ultracentrifugation est une méthode couramment utilisée pour la concentration des suspensions de particules lentivirales dans les laboratoires de recherche, et notamment dans notre laboratoire. Cette méthode est robuste et rapide (Kutner et al., 2009). Lors de l'ultracentrifugation il est possible de rajouter un coussin de sucrose au fond du tube, qui permet d'éliminer des contaminants protéiques, diminuant ainsi la toxicité du vecteur.

L'ultracentrifugation sur coussin de sucrose permet notamment de diminuer les réponses immunes systémiques ainsi que l'inflammation au niveau cérébral lors de l'injection de vecteur LV-VSVG au niveau du cerveau (Baekelandt et al., 2003).

La concentration par ultracentrifugation est très utile pour les vecteurs pseudotypés par la glycoprotéine VSVG, mais de nombreux pseudotypes sont trop fragiles et ne supportent pas l'ultracentrifugation (Kim and Lim, 2017; Sandrin et al., 2002). Une étude récente a permis de mettre au point un procédé de purification à grande échelle de vecteurs LV-GaLV, reposant sur l'utilisation de $MgCl_2$ et de sucrose pendant les différentes étapes de concentration/purification afin de stabiliser les vecteurs. Une étape de filtration en flux tangentiel permet de concentrer et diafiltrer les vecteurs, puis une chromatographie à échange d'anions est réalisée. Cette méthode permet d'obtenir de bons rendements, une concentration des vecteurs et de réduire significativement les contaminants plasmidiques (Boudeffa et al., 2019).

La chromatographie à échange d'anions des surnageants de culture contenant les particules virales est particulièrement intéressante dans le cas de larges volumes à concentrer, et permet également d'obtenir une pureté beaucoup plus importante du produit fini, engendrant moins de toxicité (Merten et al., 2010; Ricks et al., 2008).

II. Les syncytines, des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales endogènes

II.A. Origine rétrovirale et endogénéisation des syncytines

Les syncytines sont des glycoprotéines cellulaires qui sont codées par des gènes d'enveloppe rétroviraux isolés et provenant de l'insertion de rétrovirus endogènes dans le génome. Les rétrovirus s'intègrent dans le génome de leurs cellules cibles sous la forme d'un provirus. Au cours de l'évolution, de nombreux rétrovirus ont infecté les vertébrés, et certains des provirus ont été endogénisés par infection et intégration dans la lignée germinale puis transmission verticale à la descendance de façon mendélienne (Figure 11) (Dupressoir et al., 2011; Lavialle et al., 2013).

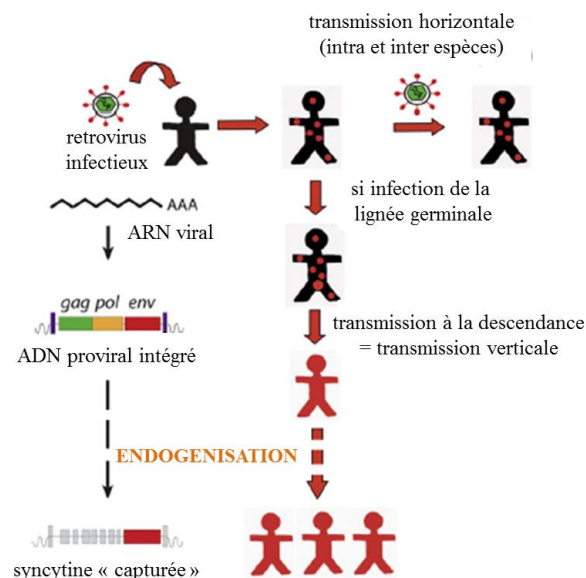


Figure 11: Endogénéisation des syncytines,

Endogénéisation des rétrovirus et capture des syncytines dans le génome des vertébrés. D'après (Dupressoir et al., 2012)

Suite à de nombreux événements d'amplification, les rétrovirus endogènes (ERVs) représentent une part non négligeable du génome des vertébrés, à savoir environ 8% du génome humain et 10% du génome murin (Gifford and Tristem, 2003; Jern and Coffin, 2008).

La très grande majorité de ces ERVs ont été rendus inactifs à la suite de multiples événements de mutations ou délétions au cours de l'évolution, car ils n'ont pas été soumis à

une pression de sélection. Certains provirus sont restés infectieux chez certaines espèces animales, ayant conservé leurs 3 gènes rétroviraux gag, pol et env fonctionnels. Pour d'autres ERVs, seule une partie de leurs gènes a été conservée et permet de coder pour des protéines fonctionnelles. C'est le cas des syncytines, qui sont des glycoprotéines placentaires codées à partir de séquences env d'ERVs.

L'endogénéisation des différentes syncytines identifiées à ce jour résulte d'évènements phylogénétiques distincts. Ces gènes sont entrés dans le génome des vertébrés il y a 25 à 80 millions d'années (Dupressoir et al., 2005; Vernochet et al., 2014). Les gènes des syncytines sont, depuis leur intégration, fortement conservés entre les espèces (Blaise et al., 2003; Blond et al., 2000). Cette conservation laisse supposer une pression de sélection positive pour un bénéfice apporté à l'hôte par ces gènes.

Des gènes rétroviraux env ont ainsi été capturés et sont restés fonctionnels (Lavaille et al., 2013). Le gène env code pour la glycoprotéine d'enveloppe rétrovirale, essentielle à la reconnaissance, l'adhésion et la fusion aux cellules cibles. Les glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales comme les syncytines sont codées à partir d'un seul gène dont l'ORF (Open Reading Frame) permet la production d'un polypeptide comprenant un site de clivage permettant la production d'une sous-unité de surface SU et d'une sous-unité transmembranaire TM (Hunter, 1997) (Figure 12).

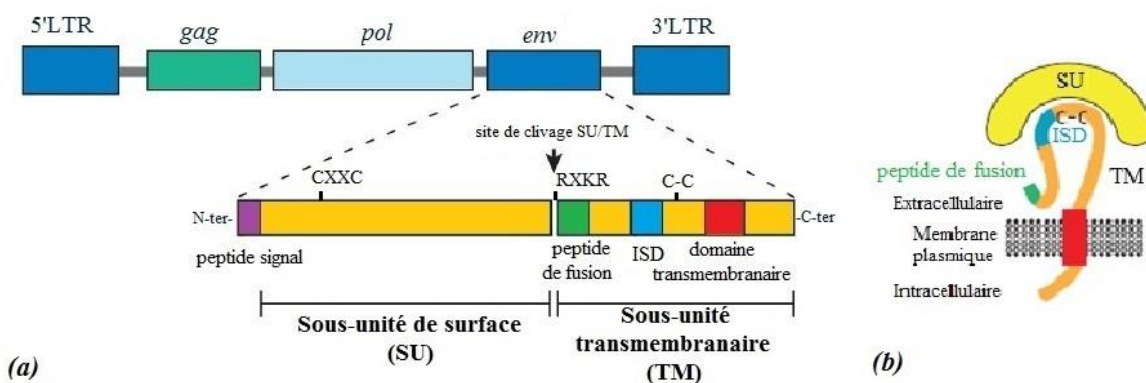


Figure 12: Structure des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales

(a) Structure du gène env des rétrovirus endogènes d'après (Rawn and Cross, 2008) (b) Structure des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirale d'après (Esnault et al., 2013) – LTR = Long Terminal Repeat ; env = enveloppe ; SU = surface ; TM = transmembranaire ; ISD = Immunosuppressive Domain

Lors de la synthèse de la glycoprotéine, les sous-unités SU et TM sont séparées au niveau du motif RXKR qui correspond à une séquence consensus de clivage de la furine. La sous-unité de surface SU contient un domaine qui permet l'interaction spécifique avec un récepteur présent à la surface des cellules cibles. La sous-unité transmembranaire TM permet la fusion, elle comprend dans sa partie N-terminale un peptide de fusion, puis un ectodomaine, une partie transmembranaire très hydrophobe, une partie d'ancrage transmembranaire et un domaine intracellulaire C-terminal (Figure 12a). Cette sous-unité TM contient également un domaine immunosuppresseur (ISD = ImmunoSuppressive Domain) d'une vingtaine d'acides aminés. Les motifs CXXC et C-C permettent la formation de ponts disulfures générant la structure secondaire en forme de boucle de la protéine (Figure 12b). Cette étape de maturation est essentielle à la fonctionnalité de la glycoprotéine (Pérot et al., 2011). Les gènes env des ERVs ont conservé certaines propriétés des rétrovirus ancestraux comme la reconnaissance et la liaison à des récepteurs spécifiques et les propriétés fusogéniques entraînant la formation de syncytia.

II.B. Les syncytines chez les mammifères

A ce jour, 11 gènes syncytines ont été mis en évidence chez les vertébrés. Les syncytines 1 & 2, A & B, Ory1, Mar1, Car1, Rum1, Ten1, Opo1 et Mab1 ont été mises en évidence respectivement chez les primates, les rongeurs du clade de la souris (*Muridae*), les lagomorphes, les rongeurs du clade de la marmotte (*Marmotini*), les carnivores, les ruminants, les tenrecidés, les marsupiaux et les lézards Mabuya (Figure 13).

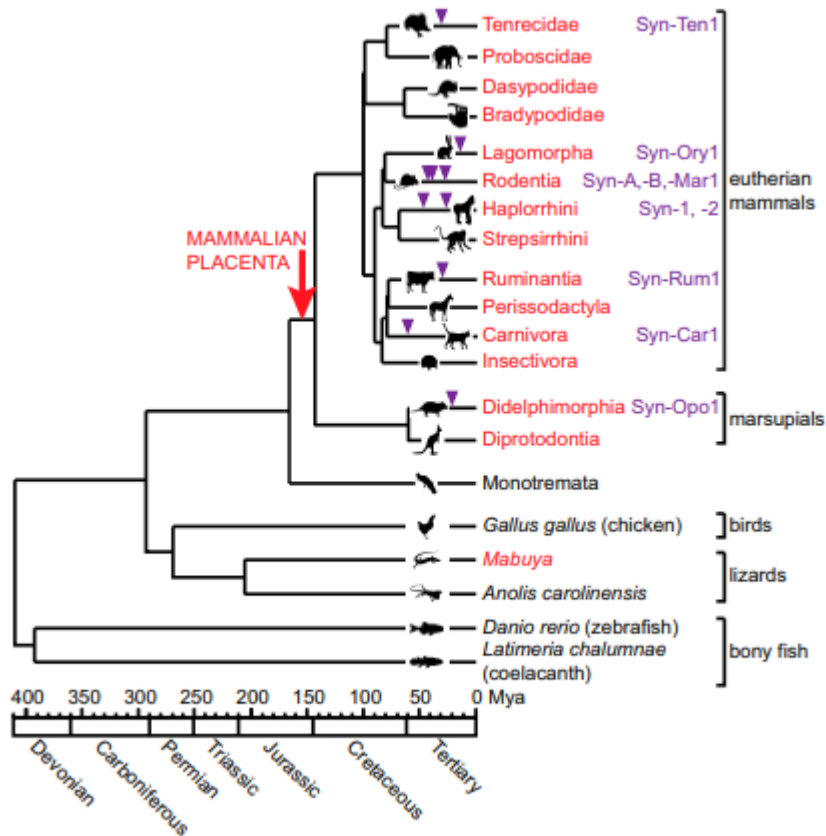


Figure 13 : Arbre phylogénique représentant l'intégration des différents gènes syncytines chez les vertébrés au cours de l'évolution

En rouge : espèces placentaires ; en violet : intégration et nom des différents gènes syncytines identifiés (Cornelis et al., 2017)

Des gènes syncytines ont ainsi été découverts chez toutes les espèces de mammifères placentaires étudiées à ce jour. Les caractéristiques des syncytines sont les suivantes : (1) expression placentaire, (2) propriétés fusogéniques et (3) conservation au cours de l'évolution des espèces.

Les différents gènes des syncytines ont été capturés et intégrés au génome de leur hôte pour un rôle bénéfique dans le développement du placenta notamment grâce à leurs propriétés de fusion. Néanmoins, l'intégration des différents gènes des syncytines résulte d'évènements phylogéniques différents, ces gènes ne sont pas orthologues et ne possèdent pas la même localisation génomique.

Par ailleurs, puisque la fusion cellulaire joue un rôle dans d'autres processus que la placentation, par exemple pour la formation du muscle squelettique ou des ostéoclastes, il est probable que les syncytines aient d'autres rôles moins bien identifiés.

II.B.1. Les syncytines humaines 1 et 2

Le criblage du génome humain a permis de mettre en évidence 19 gènes d'enveloppe rétroviraux, parmi lesquels seuls 2 induisent la formation de syncytia : ERV-W1 (Syncytine 1) et ERV-FRD1 (Syncytine 2) (Heidmann et al., 2017; Villesen et al., 2004). Le gène de la syncytine 1 est localisé sur le bras long du chromosome 7q21.2 du génome humain, et le gène de la syncytine 2 sur le chromosome 6p24.1. Ces deux gènes possèdent 2 LTRs intacts ainsi qu'une ORF permettant la transcription (Blaise et al., 2003; Mi et al., 2000).

L'ectodomaine des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales est essentiel pour la fusion. Celui de la syncytine 2 a pu être représenté en structure 3D grâce à la cristallisation ([Figure 14](#)) et possède de nombreuses similitudes avec la conformation adoptée par des rétrovirus tels que MoMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) et HTLV-1 (Human T-cell Lymphotropic Virus) (Renard et al., 2005).

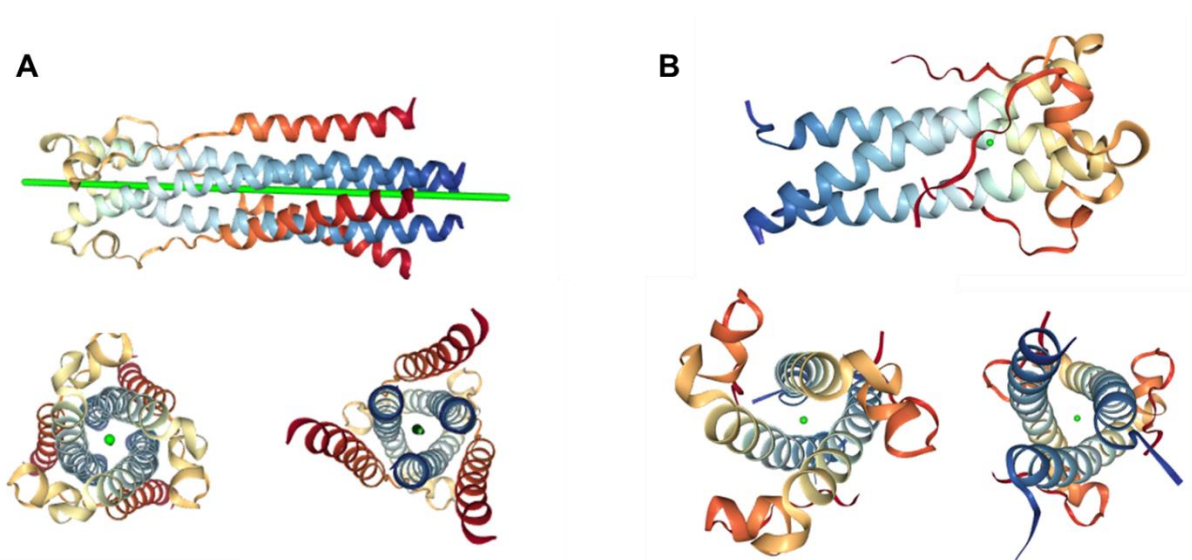


Figure 14 : Structure 3D des syncytines humaines.

Structures 3D obtenues par cristallisation, source : RCSB Protein Data Bank **A** : domaine de fusion de la Syncytine 1 (5HA4) DOI 10.2210/pdb5ha6/pdb ; **B** : domaine de fusion de la Syncytine 2 (1Y4M) DOI 10.2210/pdb1y4m/pdb

Les syncytines 1 et 2 sont exprimées au niveau du placenta (Blaise et al., 2003; Blond et al., 2000; Mi et al., 2000). Ces protéines sont essentielles à la physiologie et au développement placentaire car elles permettent de médier la fusion des cytotrophoblastes (cellules mononucléées) pour former la couche syncytiotrophoblastique (cellules polynucléées) (Holder et al., 2012; Potgens et al., 2004; Vargas et al., 2009). La glycoprotéine doit interagir avec un récepteur présent à la surface des cellules pour permettre la fusion. La syncytine 1 a pour récepteurs les transporteurs d'acides aminés neutres sodium-dépendants ASCT1 et ASCT2 (aussi appelé récepteur des rétrovirus de mammifères de type D), dont l'expression est ubiquitaire (Blond et al., 2000; Cheynet et al., 2006; Lavillette et al., 2002). La syncytine 2 utilise le récepteur MFSD2a (Major Facilitator Superfamily Domain-containing protein 2a) qui est exprimé majoritairement au niveau du placenta. MFSD2a est une protéine transmembranaire qui permettrait les échanges materno-fœtaux au niveau du syncytiotrophoblaste, mais aussi le développement du placenta par fusion des cytotrophoblastes aux syncytiotrophoblastes (Esnault et al., 2008).

Les glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales possèdent un domaine immunosuppresseur (ISD) hautement conservé. Ce domaine ISD d'une vingtaine d'acides aminés est bien présent au niveau des gènes des syncytines 1 et 2 (Mangeny et al., 2007), ce qui leur conférerait des propriétés immunosuppressives. Le domaine ISD des syncytines pourrait ainsi jouer un rôle dans le phénomène de tolérance foeto-maternelle, protégeant ainsi

le fœtus du système immunitaire maternel (Blaise et al., 2003). Pour affirmer cette hypothèse des études plus approfondies sont nécessaires.

II.B.2. Les syncytines murines A et B

Les syncytines A (617AA) et B (618AA) sont des glycoprotéines cellulaires chez la souris qui sont codées par des gènes d'enveloppe rétroviraux d'origine endogène qui ont été mis en évidence par l'analyse du génome murin. Ces gènes ont été intégrés et sont conservés chez les rongeurs depuis la spéciation *Muroidea*, il y a 40 millions d'années (Vernochet et al., 2014).

Les syncytines A et B ne sont pas orthologues des syncytines humaines 1 et 2, mais partagent cependant de nombreuses propriétés fonctionnelles et structurales avec ces dernières (Dupressoir et al., 2005). Elles sont exprimées au niveau du placenta, tout le long de la zone du labyrinthe (Dupressoir et al., 2005; Rawn and Cross, 2008). Les syncytines A et B permettent la formation des couches syncytiotrophoblastiques polynucléées ST-I et ST-II, par fusion des trophoblastes mononucléés. La syncytine A est nécessaire à la formation de la couche du syncytiotrophoblaste ST-I qui est en contact avec la lacune sanguine maternelle et la syncytine B permet la formation de la couche du syncytiotrophoblaste ST-II.

Les syncytines A et B possèdent bien des propriétés fusogéniques, notamment lors de tests de fusion cellule-cellule *ex vivo*. Cependant elles ont des profils fusogéniques différents, suggérant l'utilisation de récepteurs cellulaires distincts. De plus, les profils de fusion des syncytines murines et des syncytines humaines sont également différents, confortant cette idée de l'utilisation de récepteurs différents pour ces quatre glycoprotéines.

Le récepteur de la syncytine A a été mis en évidence récemment. Il s'agit de Ly6e (Lymphocyte antigen 6 complex, locus E), une protéine de membrane ancrée au GPI (glycosylphosphatidylinositol). Ly6e est exprimé de façon ubiquitaire chez la souris, avec une expression plus forte au niveau du poumon et de la glande salivaire. Chez le fœtus, l'expression de Ly6e est largement inférieure à celle de la souris adulte, et il est intéressant de noter que Ly6e est exprimé à des niveaux très élevés au niveau du placenta (Figure 15) (Bacquin et al., 2017). Pour l'heure, le récepteur de la syncytine B reste inconnu, mais nous savons qu'il ne s'agit pas du même récepteur que pour la syncytine A (Bacquin et al., 2017).

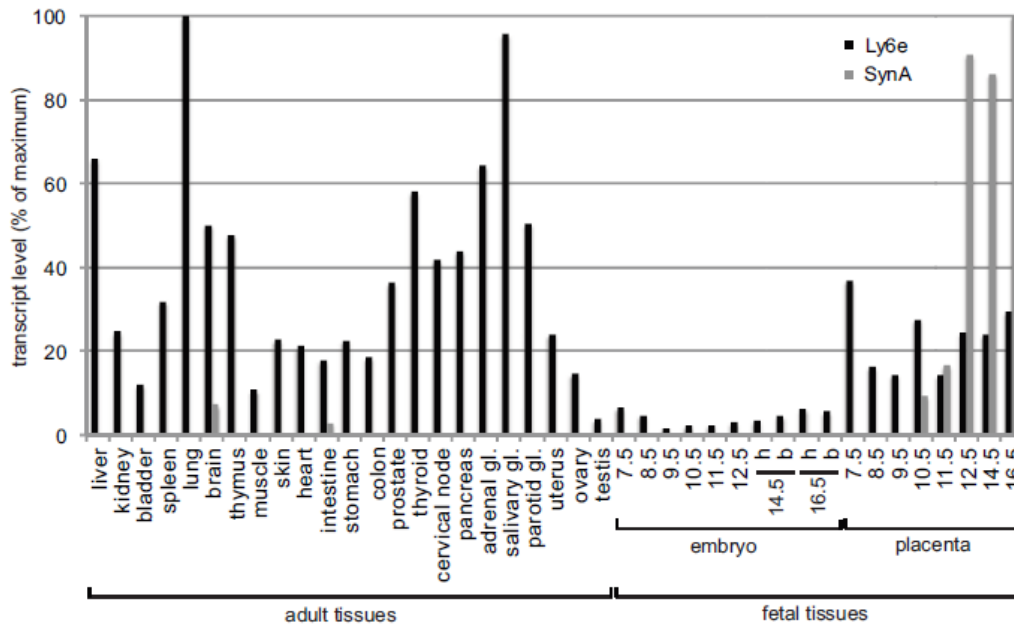


Figure 15 : Niveaux d'expression de Ly6e et de la syncytine A au niveau de différents organes chez la souris

Evaluation des niveaux d'expression des transcrits de Ly6e (noir) et de la syncytine A (gris) au niveau de différents organes murins adultes et fœtaux par RT-qPCR, résultats normalisés par rapport au niveau d'expression du gène de ménage RPLP0. Résultats exprimés par rapport au niveau d'expression maximal (i.e. poumon et placenta au jour 16.5) (Bacquin et al., 2017)

Ly6e est une protéine appartenant à la famille LY6/ μ PAR, elle est localisée au niveau de la surface cellulaire. Cette protéine régule la prolifération, la différenciation et le développement des lymphocytes T. Ly6e fait partie des ISGs (Interferon Stimulated-Gene), des protéines impliquées dans la régulation de l'infection virale. Plusieurs études ont permis de démontrer le rôle de Ly6e pour promouvoir l'entrée de virus à ARN enveloppés dans les cellules (Mar et al., 2018; Schoggins et al., 2012; Schoggins et al., 2014; Schoggins et al., 2011) en ciblant des étapes tardives de l'entrée du virus (Mar et al., 2018), et notamment l'entrée et la réplique du virus du VIH-1 (Yu et al., 2017). Ly6e est également surexprimée dans certains cas de cancers ou de maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux disséminé (Gustafson and Ginder, 1996).

II.B.3. Les syncytines Ory1, Car1, Rum1, Mar1, Opo1, Ten1, et Mab1

La découverte des gènes syncytines chez les primates et les rongeurs a mené à l'étude des génomes d'autres espèces placentaires. Actuellement, 11 gènes syncytines ont été découverts (Tableau 5). Des syncytines ont été mises en évidence chez différentes espèces placentaires : chez des mammifères euthériens, mais aussi chez des marsupiaux ou encore chez le lézard Mabuya.

Gène	Famille	Intégration	Récepteur	Référence
Syncytine 1	<i>Haplorrhini</i>	25M années	ASCT1/2	(Blond et al., 2000), (Lavillette et al., 2002)
Syncytine 2		40M années	MFSD2a	(Esnault et al., 2008)
Syncytine A	<i>Muroidae</i>	40M années	Ly6e	(Dupressoir et al., 2005), (Vernoche et al., 2014),
Syncytine B			ND	(Bacquin et al., 2017)
Syncytine Ory1	<i>Lagomorpha</i>	30M années	ASCT2	(Heidmann et al., 2009)
Syncytine Mar1	<i>Marmotini</i>	25M années	ND	(Redelsperger et al., 2014)
Syncytine Car1	<i>Carnivora</i>	80M années	ND	(Cornelis et al., 2012)
Syncytine Rum1	<i>Ruminantia</i>	30M années	ND	(Cornelis et al., 2013)
Syncytine Ten1	<i>Tenrecidae</i>	30M années	ND	(Cornelis et al., 2014)
Syncytine Opo1	<i>Didelphimorphia</i>	20M années	ND	(Cornelis et al., 2015)
Syncytine Mab1	<i>Mabuya</i>	25M années	MPZL1	(Cornelis et al., 2017)

Tableau 5 : Les gènes des syncytines chez les vertébrés

M = Millions ; ND = Non Déterminé

La syncytine Car1 a été mise en évidence chez les carnivores (*Carnivora*), son intégration remonte à 60 à 85 millions d'années, ce qui en fait le gène syncytine le plus ancien identifié à ce jour. Chez les *Hyenidae*, le gène Hyena-env2 a été intégré il y a 30 millions d'années, il s'agit d'un gène env d'origine rétrovirale retrouvé uniquement chez les *Hyenidae*

et pas chez les autres espèces de carnivores. Ce gène n'appartient pas à la famille des syncytines car il ne possède pas de propriétés fusogéniques (Funk et al., 2019).

La syncytine Ory 1 a été identifiée chez les lagomorphes (*Lagomorpha*), elle utilise comme récepteur ASCT2, comme la syncytine 1 (Heidmann et al., 2009).

Les gènes syncytines Rum1 (Bos-env1 chez la vache *Bos taurus* et Ovis-env1 chez le mouton *Ovis aries*) ont été mis en évidence chez les ruminants (*Ruminantia*). La syncytine Rum1 est conservée dans le génome depuis 30 millions d'années chez les *Bovidae*, *Moschidae*, *Cervidae*, *Giraffidae* et *Antilocapridae* (Cornelis et al., 2013).

Chez les rongeurs du clade de l'écureuil (*Marmotini*), la syncytine Mar1 a été identifiée (Redelsperger et al., 2014). Dans le clade du cochon d'Inde un gène syncytine-like env-Cav1 a été identifié mais n'appartient pas aux gènes syncytines (Vernochet et al., 2011).

La syncytine Ten1 a été mis en évidence chez les tenrecidés (*Tenrecidae*), chez les *Afrotheria* (Cornelis et al., 2014).

Un gène syncytine a également été identifié chez les marsupiaux qui sont des mammifères euthériens. Il s'agit de la syncytine Opo1, intégrée chez les *Monodelphis* il y a 20 millions d'années (Cornelis et al., 2015).

Récemment, un gène syncytine a été découvert chez le lézard du genre *Mabuya*, la syncytine Mab1. Il s'agit de la première espèce non mammifère chez laquelle des syncytines sont mises en évidence. Il s'agit de lézards placentaires, qui possèdent des structures placentaires assez proches de celles retrouvées chez les mammifères, avec une présence de syncytia au niveau de l'interface materno-fœtale (Cornelis et al., 2017).

Les différentes formes de placentation observées chez les différentes espèces animales pourraient s'expliquer par la capture des différentes syncytines.

II.C. Les syncytines, des glycoprotéines fusogéniques

Les syncytines possèdent des propriétés fusogéniques, il s'agit même d'une caractéristique qui définit cette famille de gènes. Les syncytines permettent notamment de médier la fusion cellule-cellule lors d'essais *in vitro* (Blaise et al., 2003; Chang et al., 2004; Dupressoir et al., 2005; Mi et al., 2000).

II.C.1. Implication des syncytines dans des processus biologiques physiologiques

II.C.1.a. Placentation

II.C.1.a.1. Formation des syncytiotrophoblastes

Le placenta est une annexe embryonnaire caractéristique des mammifères thériens. C'est un organe transitoire qui permet de faire l'interface entre la mère et le fœtus. Le placenta assure les échanges nutritionnels et respiratoires, il possède également des fonctions excrétrices, endocrines et immunologiques, et permet d'agir comme une barrière contre certains agents pathogènes ou toxiques.

On distingue différents types de placentation : épithéliochoriale, synépithéliochoriale, endothéliochoriale ou hémochoriale, en fonction de l'invasivité de l'implantation du placenta et de l'extension du syncytiotrophoblaste (Figure 16). Chez les primates et les rongeurs, le placenta est hémochorial, c'est-à-dire que les villosités placentaires sont en contact direct avec les vaisseaux sanguins maternels. L'hypothèse du rôle des syncytines dans le développement placentaire a été proposée d'après la localisation spécifique de ces protéines au niveau du placenta.

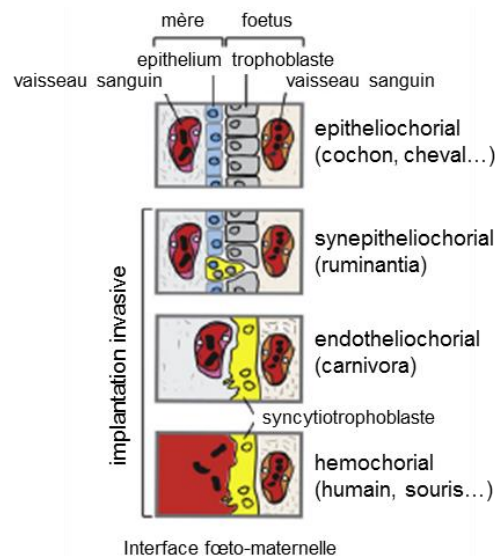


Figure 16 : Représentation schématique de l'interface materno-foetale des 4 principales structures de placenta

Les différents types de placentation sont classés de façon croissante selon les propriétés d'invasion du placenta et selon l'extension de la syncytialisation. D'après (Dupressoir et al., 2012)

Développement du placenta chez l'Homme

Au cours du développement du placenta, les cellules du trophoblaste vont se différencier en deux populations cellulaires. D'une part, les trophoblastes extravilloux vont envahir la decidua maternelle afin d'implanter le placenta au niveau de la paroi utérine. Les trophoblastes extravilloux sont constitués de cytotrophoblastes (cellules mononucléées). D'autre part, les cytotrophoblastes vilieux vont fusionner entre eux pour former une couche de grandes cellules multinucléées appelées syncytiotrophoblastes, qui vont être directement en contact avec la circulation sanguine maternelle. Le maintien de la couche syncytiotrophoblastique est assuré par la fusion de cytotrophoblastes vilieux avec les syncytiotrophoblastes (Figure 17).

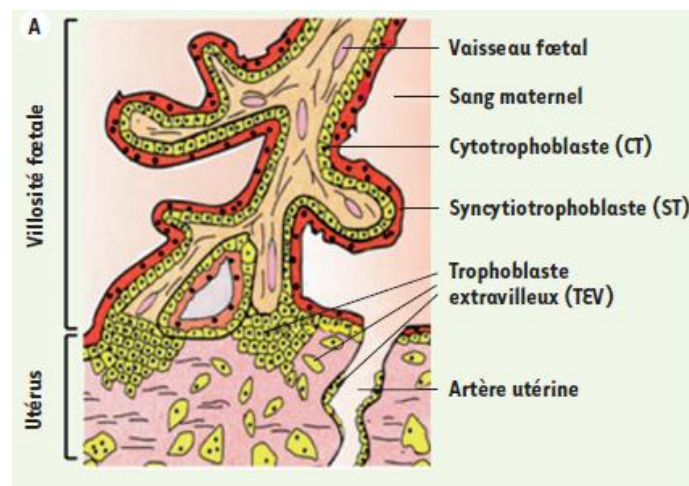


Figure 17 : Développement placentaire humain au stade vilieux

(Dupressoir and Heidmann, 2011)

Les syncytines 1 et 2 sont impliquées dans les processus de fusion des cytotrophoblastes. Lorsque celles-ci sont inhibées, une diminution de la formation de syncytia est observée, avec une diminution de la fusion cellulaire de l'ordre de 60% quand la syncytine 1 est inhibée, et pouvant atteindre 95% en cas d'inhibition de la syncytine 2 (Frendo et al., 2003; Vargas et al., 2009).

La syncytine 1, ainsi que son récepteur ASCT2, sont exprimés au niveau des trophoblastes vilieux (cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes) (Muir et al., 2006). C'est au cours du premier trimestre de grossesse que la syncytine 1 est le plus fortement exprimée, lorsque les processus de fusion pour le développement du placenta sont les plus importants (Holder et al., 2012).

La syncytine 2 est exprimée uniquement par les cytotrophoblastes villosités, et son récepteur MFSD2a est exprimé par les syncytiotrophoblastes (Esnault et al., 2008; Malassine et al., 2007). L'expression de la syncytine 2 et de son récepteur est fortement régulée, et sur des cellules différentes, afin de permettre la fusion des cytotrophoblastes avec les syncytiotrophoblastes mais d'éviter la fusion des cytotrophoblastes entre eux, ce qui permet d'assurer le renouvellement du tissu syncytiotrophoblastique tout au long de la gestation (Esnault et al., 2008).

De plus, les syncytines (1 et 2) sont exprimées à la surface des cellules, au niveau de la membrane, au plus proche des zones de fusion cellule-cellule (Frendo et al., 2003; Vargas et al., 2009). Les syncytines 1 et 2 participent à la formation et au maintien du tissu syncytiotrophoblastique qui joue un rôle fondamental dans les échanges nutritionnels, métaboliques et hormonaux entre la mère et le fœtus.

L'expression de protéines appartenant à la famille des IFITMs (Interferon Induced TransMembrane proteins), induite par l'expression d'interféron, entraîne une inhibition de la fusion des trophoblastes médiée par les syncytines (Buchrieser et al., 2019).

Développement du placenta chez la souris

Le placenta murin est composé de deux couches syncytiotrophoblastiques ST-I et ST-II, la couche ST-I étant en contact direct avec la circulation sanguine maternelle (Figure 18).

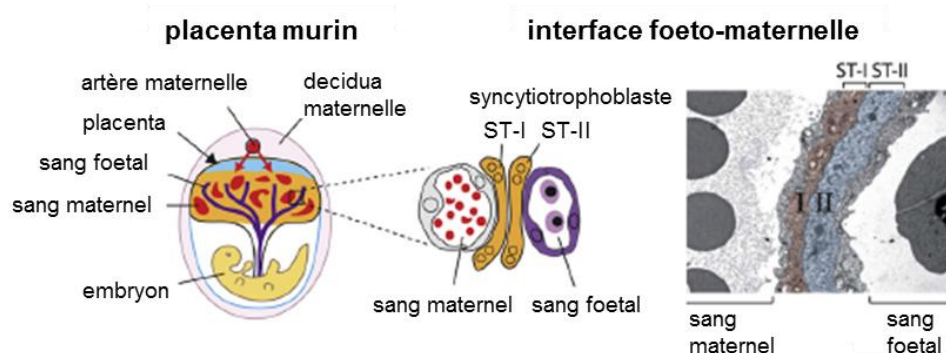


Figure 18 : Placentation chez la souris

Représentation schématique du placenta murin (gauche), de l'interface foeto-maternelle (milieu) et image obtenue par microscopie électronique de cette interface (droite) montrant les deux couches syncytiotrophoblastiques ST-I et ST-II. D'après (Dupressoir et al., 2012)

La syncytine A est exprimée au niveau de la couche ST-I du syncytiotrophoblaste, et la syncytine B au niveau de la couche ST-II. La couche ST-I étant en contact direct avec la circulation maternelle, la syncytine A est indispensable au développement du placenta. En absence d'expression de la syncytine A les embryons meurent *in utero* à mi-gestation (14,5 jours de développement embryonnaire) et une altération de l'architecture placentaire est observée avec une accumulation de cytotrophoblastes n'ayant pas fusionné entraînant un défaut de formation de la couche syncytiotrophoblastique (Dupressoir et al., 2009).

La syncytine B est également impliquée dans la fusion des cytotrophoblastes, pour la formation de la couche ST-II. Lorsque la syncytine B est inhibée, l'architecture placentaire est également altérée avec un défaut de fusion des cytotrophoblastes pour la formation de la couche ST-II. Des mécanismes de compensation semblent néanmoins être assurés par les jonctions serrées qui se trouvent à l'interface entre les couches ST-I et ST-II, permettant ainsi de maintenir les échanges materno-fœtaux nécessaires à la survie du fœtus, entraînant toutefois des retards de croissance (Dupressoir et al., 2012; Dupressoir et al., 2009).

Il est intéressant de noter que la délétion simultanée des syncytines A et B entraîne un phénotype encore plus délétère que la délétion de la syncytine A seule. En effet, tous les embryons meurent *in utero*, et de façon plus précoce (Dupressoir et al., 2009).

II.C.1.a.2. Immunotolérance foeto-maternelle

Au cours de la grossesse, une certaine dualité immunitaire se met en place : d'un côté le système immunitaire maternel reste efficace contre les agressions extérieures et, en parallèle, une tolérance immunitaire est mise en place par le placenta afin d'éviter un rejet allo-antigénique du fœtus par le système immunitaire maternel, le fœtus présentant à la fois des antigènes maternels et paternels. Les cellules du trophoblaste vont agir à différents niveaux pour la mise en place de ce phénomène de tolérance placentaire, qui va permettre la survie du fœtus.

Les cellules du syncytiotrophoblaste (trophoblaste villositaire), qui sont en contact direct avec la circulation sanguine maternelle, n'expriment pas de molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I ou II, ce qui les rend neutres d'un point de vue immunitaire. Les cellules du trophoblaste extra-villositaire n'expriment pas à leur surface les molécules du CMH de classe II ni les HLA-A et HLA-B du CMH-I, mais elles expriment des molécules du CMH-I particulières : les HLA-C, HLA-E, HLA-F et HLA-G (King et al., 2000; Kovats et al., 1990).

Le fœtus, qui exprime des antigènes du CMH de classe II d'origine paternelle, est protégé par cette absence d'expression des molécules du CMH-II par le trophoblaste. En effet, cela permet d'éviter une réaction de rejet allo-antigénique dirigée contre les antigènes HLA-II paternels ainsi qu'une présentation de peptides foetaux aux cellules T maternelles (Mesdag et al., 2014).

L'absence d'expression des antigènes HLA-A et HLA-B du CMH de classe I permettrait de protéger le fœtus de la présentation des trophoblastes aux cellules T cytotoxiques maternelles (Le Bouteiller et al., 1996). Les trophoblastes extra-villeux expriment des antigènes du CMH-I : les HLA-E, -F et -G, ce qui leur permet de ne pas être reconnus comme éléments du « non-soi » par les cellules NK (Natural Killer) (Le Bouteiller, 2000).

Les cellules du trophoblaste villeux expriment fortement les molécules HLA-G qui ont une forte affinité de liaison pour les récepteurs leucocytaires LILRs (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor) (Shiroishi et al., 2006). L'augmentation de l'expression de LILRB1 entraîne l'induction d'une population de cellules dendritiques tolérogéniques (Chang et al., 2002; Velten et al., 2004). La tolérance placentaire induite par HLA-G est due à une diminution de la présentation de molécules du CMH-II par les cellules dendritiques tolérogènes (Ristich et al., 2005).

Les cellules du trophoblaste vont jouer un rôle dans le recrutement, la prolifération et la différenciation des macrophages décidaux, au niveau de l'utérus, vers la voie M2 (Arcuri et al., 2007). Les macrophages décidaux ont des propriétés immunosuppressives, ils produisent de la PGE2, de l'IL-10 ou encore des antagonistes de l'IL-1. Ils participent également aux mécanismes de réparation tissulaire et de dégradation de débris cellulaires, notamment lors du renouvellement des cellules du trophoblaste par dégradation des cellules trophoblastiques en apoptose.

Enfin, les cellules du trophoblaste permettent le recrutement des cellules Treg au niveau de la decidua maternelle (Leber et al., 2010) ainsi que la différenciation en Treg des lymphocytes T CD4+ naïfs périphériques (Ramhorst et al., 2012).

II.C.1.b. Régénération du muscle squelettique

Le muscle squelettique est formé de syncytia. La myogenèse est obtenue par la fusion de myoblastes mononucléés en myotubes polynucléés. Les myotubes ainsi formés ne sont plus capables de division et, en cas d'atteinte du tissu musculaire, ils seront dépendants des cellules souches musculaires, les cellules satellites, pour la régénération du tissu musculaire.

En réponse à des facteurs de croissance en cas d'atteinte du tissu musculaire, les cellules satellites vont s'activer et former des myoblastes qui vont alors pouvoir se différencier et fusionner avec les myofibres préexistantes pour restaurer l'architecture du tissu musculaire (Horsley and Pavlath, 2004). Un certain nombre de facteurs tels que des facteurs de signalisation, des molécules d'adhésion ou des protéines membranaires ont été décrits comme étant nécessaires à la myogenèse squelettique. Deux molécules directement impliquées dans la fusion du muscle squelettique ont été identifiées : myomaker qui est nécessaire à l'hémi-fusion, et Myomerger/Minion/Myomixer qui est responsable de la formation du pore de fusion (Bender et al., 2016; Millay et al., 2013; Quinn et al., 2017; Zhang et al., 2017). Les syncytines ayant été conservées chez les vertébrés pour leurs propriétés fusogéniques (notamment lors du développement du placenta), leur rôle dans d'autres processus de fusion cellulaire, notamment au niveau musculaire, a été étudié.

Différentes études ont permis de mettre en évidence le rôle des syncytines lors de la myogenèse. En effet, dans un modèle de souris n'exprimant pas le gène de la syncytine B, un retard de croissance est observé par rapport aux souris de phénotype sauvage, avec une baisse de la masse musculaire due à une diminution du diamètre des fibres musculaires et non pas de leur nombre (Redelsperger et al., 2016).

Cette différence n'est observée que chez les souris mâles, laissant supposer une régulation hormonale de l'expression des syncytines. De plus, en étudiant la différenciation de myoblastes primaires murins en culture, il a été montré que les syncytines A et B sont exprimées au niveau de ces cellules, et que leurs niveaux d'expression sont augmentés au cours du processus de différenciation en myotubes.

Des expériences de répression des gènes des syncytines ont été réalisées sur des myoblastes primaires en culture chez différentes espèces, à savoir répression des syncytines A et B chez la souris, des syncytines 1 et 2 chez l'homme, de la syncytine Rum1 chez le mouton et de la syncytine Car1 chez le chien. Ces expériences mettent en évidence une réduction de l'index de fusion et du nombre de grands myotubes en absence de syncytine, et ce chez les différentes espèces étudiées. Par ailleurs, aucun effet additif n'est observé lors de l'inactivation simultanée dans les myoblastes des syncytines A et B en comparaison à l'inactivation d'un seul de ces gènes (Redelsperger et al., 2016).

Des analyses moléculaires ont également permis de mettre en évidence la présence des syncytines 1 et 2 au niveau de myoblastes humains, et leur expression est augmentée par l'induction de la fusion myoblastique. Les syncytines 1 et 2 sont exprimées tout le long des myofibres, avec une expression plus importante au niveau du sarcolemme, notamment pour la syncytine 1 (Bjerregard et al., 2014; Frese et al., 2015). Au niveau du sarcolemme, la

syncytine 1 est colocalisée avec la cavéoline 3, une protéine spécifique du muscle qui est impliquée dans la fusion des myoblastes. La co-localisation de la syncytine 1 et de la cavéoline 3 laisse donc supposer une possible interaction entre ces deux protéines dans le processus de fusion myoblastique (Bjerregard et al., 2014).

Les récepteurs des syncytines sont également exprimés par les myoblastes humains. Le récepteur à la syncytine 1, ASCT1, est exprimé tout le long des myofibres. Quant au récepteur à la syncytine 2, MFSD2a, son expression est localisée au niveau du sarcolemme (Frese et al., 2015).

Ces différentes informations démontrent *in vivo* et *ex vivo* le rôle des gènes des syncytines dans le processus de fusion myoblastique et de régénération musculaire. Il semble donc que les gènes des syncytines, qui ont été capturés pour leur rôle dans le développement du placenta grâce à leurs propriétés fusogéniques aient acquis un rôle collatéral dans la myogenèse des mammifères placentaires, apportant ainsi un avantage évolutif pour les espèces concernées.

II.C.1.c. Différenciation des ostéoclastes

Le remodelage osseux repose sur un équilibre entre la formation osseuse assurée par les ostéoblastes et la résorption osseuse, assurée par les ostéoclastes. Les ostéoclastes sont de grandes cellules multinucléées d'origine hématopoïétique dont les précurseurs appartiennent à la lignée myéloïde et dérivent des monocytes. Les précurseurs myéloïdes vont s'orienter vers la voie monocyttaire sous l'action du M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), puis en précurseur ostéoclastique grâce au RANKL (RANK Ligand), RANK étant le récepteur pour l'activation du facteur de transcription NFκB). Les pré-ostéoclastes vont quitter la moelle osseuse et migrer à la surface de l'os, puis vont ensuite fusionner pour former des ostéoclastes polynucléés qui vont ensuite être activés et polarisés pour devenir matures (Baron, 2001) ([Figure 19](#)).

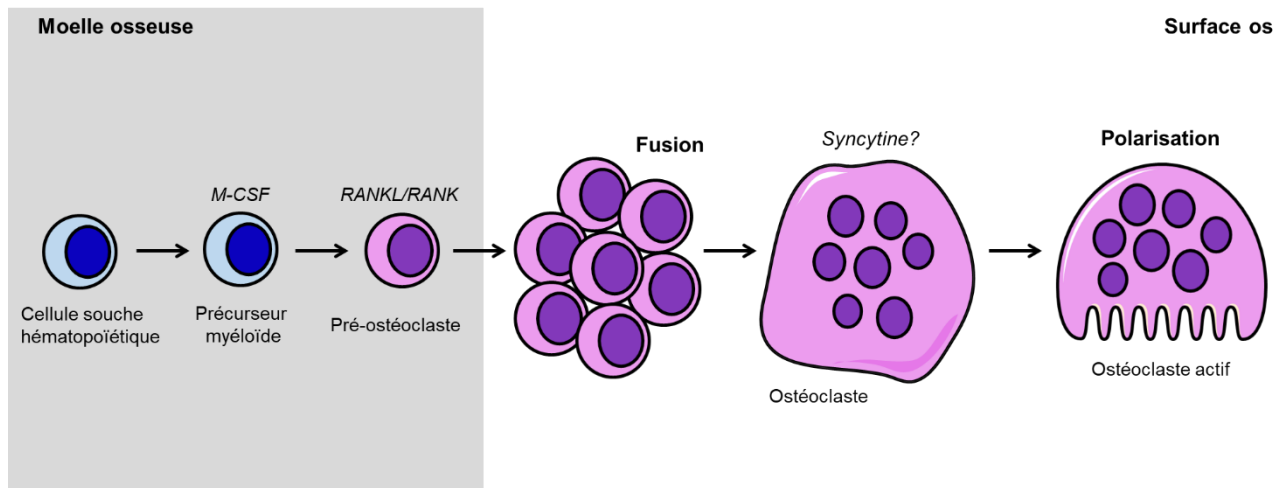


Figure 19 : Différenciation et développement des ostéoclastes

Les ostéoclastes ont une origine hématopoïétique. Leur développement débute dans la moelle osseuse, à partir des cellules souches hématopoïétiques, Sous l'action de M-CSF, ces cellules souches vont se différencier en précurseur myéloïde, puis sous l'effet de RANK et RANKL, ces cellules vont se différencier en pré-ostéoclastes qui vont migrer à la surface de l'os. Les pré-ostéoclastes vont fusionner (sous l'action de la syncytine ?) pour former des ostéoclastes polynucléés qui vont devenir actifs après polarisation. D'après (Baron, 2001)

La syncytine 1, ainsi que son récepteur ASCT2, sont exprimés à la surface des ostéoclastes. Leurs niveaux d'expression varient en fonction du degré de différenciation des ostéoclastes. La syncytine 1 est impliquée dans le processus de fusion des ostéoclastes pour aboutir à des ostéoclastes matures, mais n'a aucun effet sur la résorption osseuse (Soe et al., 2011).

L'inhibition de la syncytine 1 entraîne une diminution mais pas une inhibition totale des évènements de fusion des ostéoclastes. En effet, la syncytine 1 inhibe la fusion des ostéoclastes multinucléés mais pas la fusion des pré-ostéoclastes mononucléés (Soe et al., 2011).

La délétion de la syncytine B chez la souris, dans un modèle *SynB^{-/-}* entraîne, *ex vivo*, une diminution de la fusion et de la formation d'ostéoclastes multinucléés. *In vivo*, en revanche, aucune différence n'est observée chez ces souris par rapport aux souris de phénotype sauvage en termes de formation de grandes cellules multinucléées ni de structure de l'os (Coudert et al., 2019). Il semblerait donc que la syncytine B soit impliquée dans les mécanismes de fusion lors du développement des ostéoclastes, avec la présence de mécanismes de compensation, peut-être liés à l'expression de la syncytine A.

II.C.2. Implication des syncytines dans des processus biologiques pathologiques

II.C.2.a. Cancer

Les cellules cancéreuses ont la capacité de fusionner avec des cellules cancéreuses, ainsi qu'avec des cellules endothéliales (Miller et al., 1988; Mortensen et al., 2004).

La syncytine 1 et son récepteur ASCT2 sont exprimés par des cellules de cancer du sein, mais aussi par des cellules endothéliales. L'inhibition de la syncytine 1 entraîne une diminution de la fusion entre les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales (Larsson et al., 2007a). La syncytine 1 permettrait ainsi la fusion entre les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales dans certains cas de cancers du sein (Bjerregaard et al., 2006), ce qui pourrait permettre l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs dans la cellule hybride formée (Anderson and Stanbridge, 1993; Harris et al., 1969). En effet, l'expression de la syncytine 1 est corrélée avec l'amélioration de la survie sans récurrence chez les patients (Larsson et al., 2007b). La syncytine 2 est également exprimée par des cellules de cancer du sein (Larsson et al., 2007a).

Dans certains carcinomes de l'endomètre, la syncytine 1 est surexprimée, avec des niveaux d'expression pouvant atteindre ceux observés au niveau du placenta. De plus, le niveau d'expression de la syncytine 1 est corrélé avec la malignité de la tumeur. L'inhibition de la syncytine 1 permet une inhibition quasi-totale de la fusion des cellules de carcinome de l'endomètre (Strick et al., 2007). Les oestrogènes et l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) induiraient une augmentation de l'expression de la syncytine 1, tandis que le TGF- β induirait une diminution de la fusogénicité de celle-ci (Strick et al., 2007).

La syncytine 1 est également exprimée au niveau de carcinomes colorectaux, et en particulier au niveau des zones invasives de la tumeur. Le rôle de la syncytine 1 sur la fusion cellulaire dans ce type de cancer reste à étudier (Larsen et al., 2009).

II.C.2.b. Pré-éclampsie

La pré-éclampsie est une pathologie multifactorielle due à un défaut de développement du placenta. Cette pathologie est une des principales causes de morbidité/mortalité maternelle et de naissance prématurée (Carty et al., 2010). En clinique, la pré-éclampsie se caractérise par une hypertension artérielle gravidique (pression systolique/pression diastolique >140/90

mmHg) et une protéinurie significative (>300mg/24h) apparaissant *de novo* à partir de la 20^{ème} semaine d'aménorrhée.

Des défauts de fusion des trophoblastes sont observés sur des placentas de femmes atteintes de pré-éclampsie (Vargas et al., 2011). Une diminution de l'expression des syncytines 1 et 2 est observée au niveau de placentas de femmes atteintes de pré-éclampsie, qui est corrélée avec le développement et la sévérité de la pathologie (Frendo et al., 2003; Knerr et al., 2002; Lee et al., 2001; Vargas et al., 2011). La syncytine 2 est plus dérégulée que la syncytine 1 (Vargas et al., 2011). Ces anomalies de l'expression des syncytines pourraient être à l'origine du défaut de formation des syncytiotrophoblastes, entraînant des défauts d'échanges materno-fœtaux, à l'origine de la pathologie par défaut de perfusion du placenta. Ainsi, les syncytines 1 et 2 pourraient être utilisées comme biomarqueurs pour le dépistage précoce de la pathologie, avant l'apparition des signes cliniques.

La pré-éclampsie se caractérise par un défaut de perfusion du placenta, ce qui entraîne une hypoxie et une diminution des échanges materno-fœtaux. En condition d'hypoxie, une diminution de la fusion cellulaire des trophoblastes est observée (Alsat et al., 1996). Or, des conditions hypoxiques pourraient entraîner une diminution de l'expression de la syncytine 1 et de son récepteur ASCT2 (Kudo et al., 2003). L'hypoxie qui se développe au cours de la pathologie pourrait ainsi inhiber l'expression de la syncytine 1 et de son récepteur ASCT2 et ainsi aboutir à des défauts de formation du syncytiotrophoblaste par défaut de fusion cellulaire.

Des modifications épigénétiques de la syncytine 1 ont également été observées en conditions pré-éclamptiques. En effet, la diminution de l'expression de celle-ci pourrait être due à une hyperméthylation de l'ADN en 5'UTR du gène de la syncytine 1 au cours du développement placentaire en conditions pré-éclamptiques (Huang et al., 2014).

De plus, une localisation aberrante de la syncytine 1 est observée sur des placentas de femmes atteintes de pré-éclampsie. En conditions normales, la syncytine 1 est exprimée principalement au niveau de la membrane basale des syncytiotrophoblastes, tandis qu'en conditions pré-éclamptiques, son expression est limitée à une fine zone de la membrane apicale des syncytiotrophoblastes. Cette localisation anormale de la protéine empêche les processus de fusion cellulaire.

II.C.2.c. Sclérose en plaque

La sclérose en plaques (SEP) est une pathologie chronique auto-immune neurodégénérative progressive touchant environ 2 millions de personnes à travers le monde. La pathologie survient généralement chez l'adulte jeune, entre 20 et 40 ans, avec une prédominance féminine. La SEP se caractérise par des troubles physiques et cognitifs, avec une diminution de l'espérance de vie. Les deux caractéristiques principales de la pathologie sont la démyélinisation et l'inflammation du système nerveux central (SNC), qui génèrent des dommages au niveau des axones et des neurones (Antony et al., 2011).

Il s'agit d'une pathologie multifactorielle, et de nombreuses études tendent à montrer l'existence d'un lien entre infections virales et pathogénèse de la SEP, agissant sur un terrain génétique prédisposé.

Le virus MSR (Multiple Sclerosis-associated RetroVirus) semble être lié à la SEP, des virions ont été détectés dans le sang et le liquide cérébro-spinal de patients (Dolei, 2005). Le MSR appartient à la même famille que la syncytine 1, HERV-W, et présente 94% d'homologie de séquence avec celle-ci (Dolei, 2005). La syncytine 1 est surexprimée au niveau du tissu cérébral de patients souffrant de SEP (Antony et al., 2004; Mameli et al., 2007), et plus particulièrement par les astrocytes et la microglie au niveau des lésions démyélinisantes (Antony et al., 2004). La surexpression de la syncytine 1 au niveau des astrocytes entraîne la production de radicaux libres qui vont induire un stress du réticulum endoplasmique (RE) (Antony et al., 2004). Les cellules du SNC, notamment les oligodendrocytes qui produisent la myéline, sont particulièrement sensibles aux dommages causés par les radicaux libres (Mattson and Taub, 2004).

Le stress du RE va également entraîner la production de nitroprussiate de sodium et donc une diminution de l'expression de ASCT1 au niveau des astrocytes, ainsi qu'une induction d'Erg1 (répresseur de ASCT1) au niveau des cellules neurales (Kanai and Hediger, 2004; Tatarowicz et al., 1997). Or, ASCT1 est nécessaire à l'export de L-Sérine, sa diminution va donc déréguler le métabolisme sérine-glycine qui participe à la pathogénèse de la SEP en entraînant une démyélinisation, une inflammation et une altération de la survie cellulaire (Antony et al., 2011).

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est capable d'infecter les astrocytes. Une infection tardive par l'EBV pourrait agir comme facteur de risque de développement de la SEP (Santiago et al., 2010) mais le mécanisme par lequel ces deux éléments sont liés n'est pas encore connu.

L'infection par l'EBV d'astrocytes ou de PBMCs (Peripheral Blood Mononucleated Cells) en culture entraîne une induction de l'expression de la syncytine 1 et de MSR1 au niveau des astrocytes, des lymphocytes B et des monocytes, sans avoir d'effet au niveau des lymphocytes T ou NK (Mameli et al., 2012).

Le Natalizumab est un anticorps monoclonal humanisé utilisé pour la prise en charge de la SEP, qui va agir comme un inhibiteur sélectif des molécules d'adhésion. Il va se fixer à la sous-unité α -4 des intégrines humaines, qui est fortement exprimée au niveau des leucocytes, empêchant la transmigration de cellules inflammatoires au niveau cérébral. Ce traitement entraîne une diminution de l'expression de la syncytine 1 au bout de 6 mois (Arru et al., 2014) et une diminution du taux d'anticorps dirigés contre la syncytine 1 après 2 ans de traitement (Arru et al., 2015).

III. Les lymphocytes B comme cible de thérapie génique

III.A. Les lymphocytes B, des cellules du système immunitaire

III.A.1. Origine et développement des lymphocytes B

L'hématopoïèse correspond au processus de différenciation des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules multipotentes qui vont se différencier pour donner les cellules de la lignée myéloïde (érythrocytes, plaquettes, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, macrophages, cellules dendritiques) et les cellules de la lignée lymphoïde (cellules NK, lymphocytes T et lymphocytes B, cellules dendritiques). Au cours de leur différenciation, les différentes cellules de la lignée hématopoïétique vont perdre de leur multipotentialité (Figure 20).

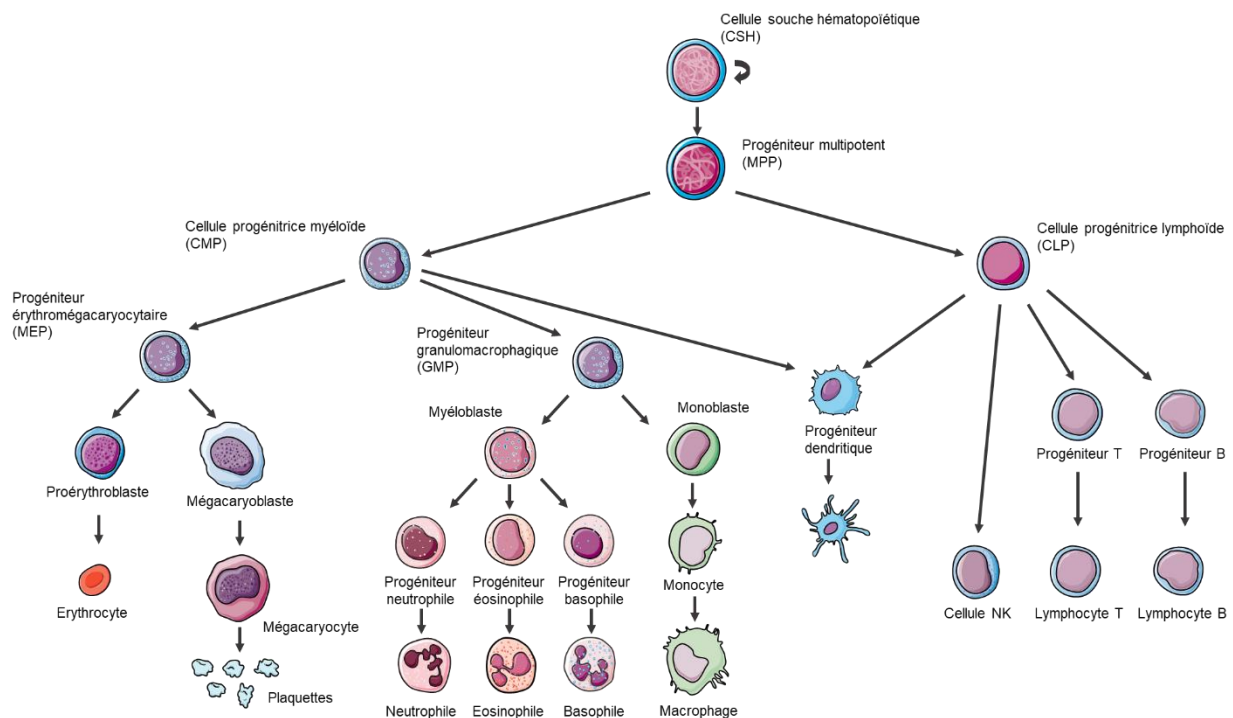


Figure 20 : Représentation schématique « classique » de l'hématopoïèse

Les lymphocytes B se développent dans la moelle osseuse et sont dérivés des cellules souches hématopoïétiques, après leur différenciation en progéniteur multipotent, puis en cellule progénitrice lymphoïde, en progéniteur B puis en lymphocyte B.

Nous nous focaliserons par la suite plus particulièrement sur les lymphocytes B, ces cellules représentant une cible d'intérêt pour les vecteurs que nous avons développé au laboratoire, comme le montrent les résultats présentés dans ce manuscrit.

Les lymphocytes B sont des cellules du système immunitaire d'origine hématopoïétique de la lignée lymphoïde. Leur développement a lieu dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques.

Les premiers stades de développement des lymphocytes B, de la cellule souche aux lymphocytes B immatures ([Tableau 6](#)) ont lieu dans la moelle osseuse, avec la mise en place progressive du BCR (B cell receptor) par différents réarrangements des gènes de la région variable des immunoglobulines (V, D et J). Les lymphocytes B immatures vont ensuite migrer vers les organes lymphoïdes secondaires.

Dans la rate, les lymphocytes transitionnels vont avoir des devenir différents. Une partie des cellules va être retrouvée au niveau de la zone marginale ou extra-folliculaire ([Figure 21](#)), on parle de lymphocytes B de la zone marginale MZ, qui vont connaître une expansion rapide et une différenciation en plasmocytes à courte durée de vie qui vont jouer un rôle dans les réponses humorales lymphocytes T-indépendantes, qui vont agir en première ligne de défense contre les pathogènes. Ces cellules sécrètent des immunoglobulines de type IgM.

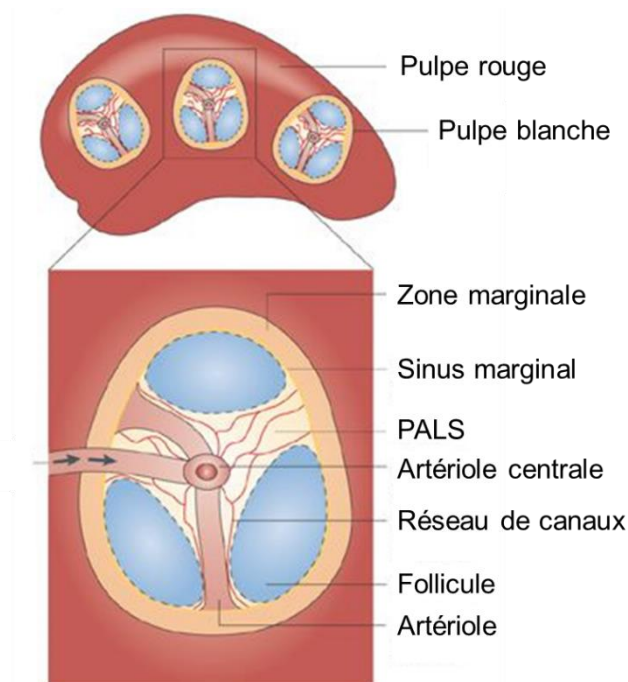


Figure 21 : Représentation schématique de la rate

PALS = Periarteriolar Lymphoid Sheath. D'après (Batista and Harwood, 2009)

L'autre partie des lymphocytes transitionnels va se différencier en cellules B folliculaires qui forment les centres germinatifs. Ces cellules jouent un rôle dans les réponses humorales lymphocytes T-dépendantes. Suite à une reconnaissance d'antigène T-dépendante, ces cellules vont subir des phénomènes d'hypermutation somatique ou de comutation de classe qui vont amplifier l'affinité du BCR. Ces cellules vont soit se différencier en lymphocytes B mémoire (CD27+) ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de haute affinité.










	CSH	MPP	CLP	Pre-pro-B	Pro-B	Pre-B	Immature	Mature	Plasmocyte
									
Homme	CD34+ CD38- CD49f+ CD90+ CD45RA- Flt3+	CD34+ CD38- CD49f- CD90- CD45RA- Flt3+	CD34+ CD38+ CD10+ CD19- CD20- IgM- IgD-	CD34+ CD38+ CD10+ CD19+ CD20- IgM- IgD-	CD34+ CD38+ CD10+ CD19+ CD20- IgM- IgD-	CD34- CD38+ CD10+ CD19+ CD20 ^{low} IgM- IgD-	CD34- CD38+ CD10+ CD19+ CD20+ IgM+ IgD ^{low}	CD19+ CD20- CD24+ CD38+ CD27- CD27+	CD19+ CD20 ^{low} CD24- CD38+ CD27+ CD138+
Souris	Lin- Sca1+ cKit ^{high} CD34- CD150+ CD48- Flt3-	Lin- Sca1+ cKit ^{high} CD34+ CD150- Flt3+	Lin- cKit ^{low} Sca1+ Flt3 ^{high} IL7Ra+	B220+ CD19- CD43 ^{low} CD24 ^{low} BP1- IL7Ra+ IgM-	B220+ CD19+ CD43+ CD24+ BP1- IL7Ra+ IgM-	B220+ CD19+ CD43 ^{low} CD24 ^{high} BP1+ IL7Ra+ IgM-	B220+ CD19+ CD43- CD24 ^{high} BP1+ IL7Ra+ IgM+	B220+ CD19+ Flt3- CD24 ^{low} CD43- IgM-/+ IgD+	

Tableau 6 : Différenciation des lymphocytes B et phénotypes des différentes sous-populations cellulaires B

CSH = cellules souches hématopoïétiques, MPP = progéniteur multipotent, LCP = précurseur commun lymphocytaire. D'après (Ichii et al., 2014) et (Nagasawa, 2006)

III.A.2. Rôles et fonctions des lymphocytes B

Les lymphocytes B sont des cellules du système immunitaire qui participent à l'immunité humorale, par la production d'anticorps. Certaines populations de lymphocytes B participent également à l'immunité cellulaire (Figure 22).

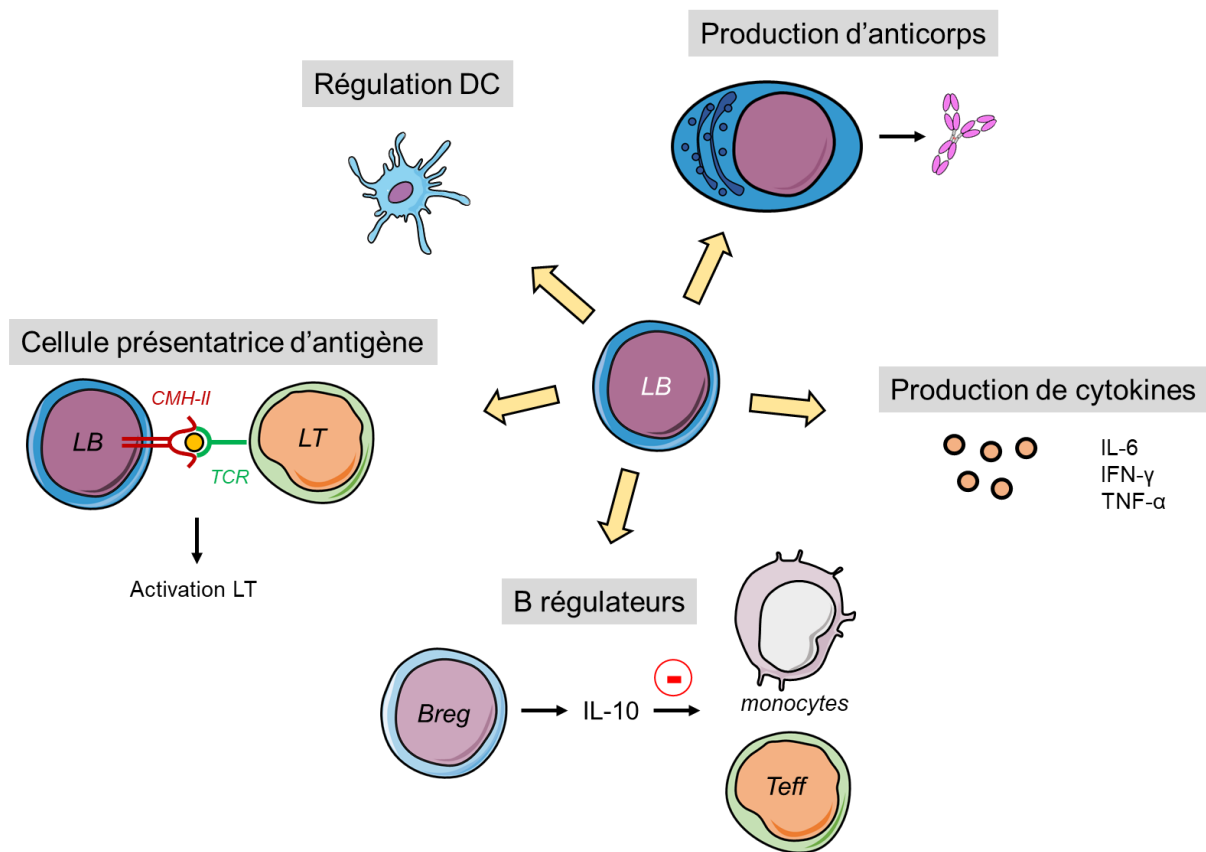


Figure 22 : Rôles et fonctions des lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont des acteurs majeurs du système immunitaire. Les LB peuvent se différencier en plasmablastes qui produisent des anticorps pour lutter contre un antigène. Ils sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Les LB peuvent réguler les cellules dendritiques (DC) qui sont des cellules présentatrices d'antigènes, afin de moduler une réponse immunitaire. Les LB peuvent également agir comme cellules présentatrices d'antigènes, en présentant des molécules du CMH-II (Complexe d'Histocompatibilité de classe II) et ainsi activer une réponse cellulaire T. Enfin, il existe une sous-population de LB appelée Breg (B régulateurs) qui, notamment par la production d'IL-10, vont permettre de moduler la réponse immunitaire en créant un environnement anti-inflammatoire.

III.A.2.a. Immunité humorale : production d'immunoglobulines

Les immunoglobulines sont produites par les lymphocytes B, sous leur forme membranaire elles forment le BCR, et sous leur forme sécrétée (par les plasmocytes) elles vont constituer les anticorps, acteurs de l'immunité humorale.

Elles sont constituées de chaînes légères : kappa (κ) et lambda (λ) et de chaînes lourdes : mu (μ), delta (δ), gamma (γ), epsilon (ϵ) et alpha (α) qui aboutissent respectivement aux IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Les chaînes légères sont constituées d'un domaine constant (C) et d'un domaine variable (V). Les chaînes lourdes sont constituées d'un domaine variable et

d'une région constante qui est formée de trois ou quatre domaines constants (CH1 à CH4) (Figure 23).

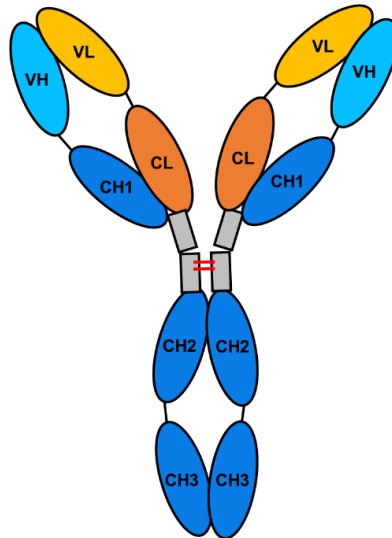


Figure 23 : Représentation schématique d'une immunoglobuline de type IgG

Les immunoglobulines sont constituées de deux chaînes lourdes (bleu) et de deux chaînes légères (orange). Les chaînes lourdes sont constituées d'un domaine variable (VH, bleu clair) et de 3 domaines constants (CH1 à CH3, bleu foncé) pour les IgG (jusqu'à 4 régions constantes en fonction du type d'immunoglobuline). Les domaines CH1 et CH2 sont reliés par la région charnière (gris) qui permet l'association des 2 chaînes lourdes par des ponts disulfure (rouge). Les chaînes légères sont constituées d'un domaine variable (VL, orange clair) et d'un domaine constant (CL, orange foncé)

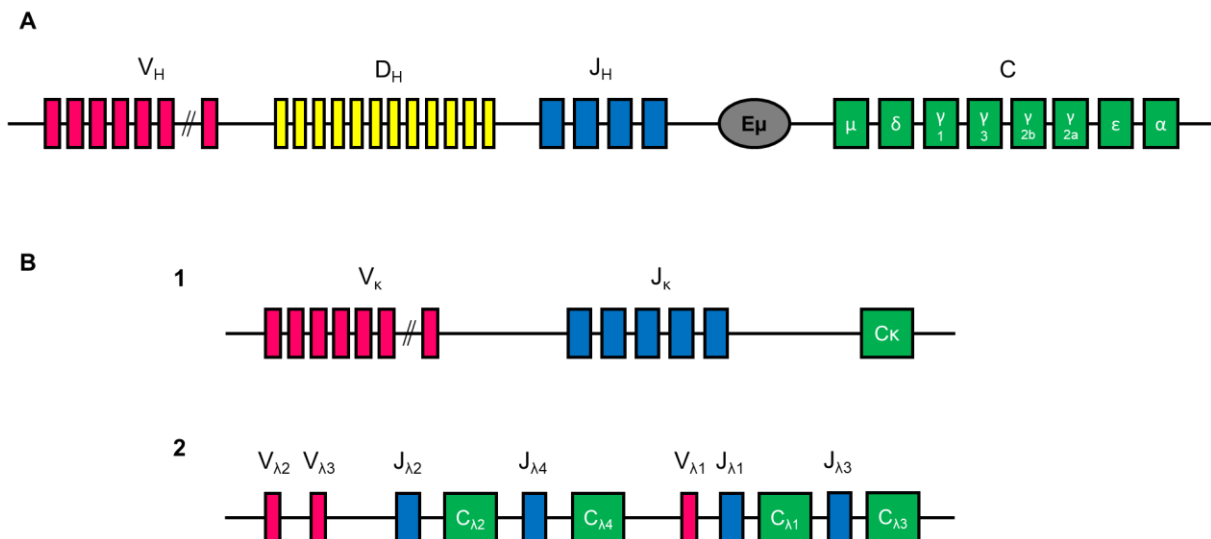


Figure 24 : Représentation des chaînes variables des immunoglobulines dans leur configuration germinale

A : représentation du locus murin des chaînes lourdes ; B.1 : représentation du locus kappa des chaînes légères, B.2 : représentation du locus lambda des chaînes légères

Au cours de la lymphopoïèse B, des réarrangements des segments V (variable), D (diversité) et J (jonction) des fragments variables des chaînes lourdes et des chaînes légères (Figure 24) des immunoglobulines ont lieu et ces réarrangements permettent la grande diversité des récepteurs d'antigènes chez les mammifères (Tonegawa, 1983). Le réarrangement est dit « ordonné », le réarrangement des chaînes lourdes a lieu avant celui des chaînes légères. Ce réarrangement est également dit « séquentiel », dans un premier temps la jonction entre les fragments D et J a lieu, puis un fragment V va être joint à ce segment DJ (Alt et al., 1984).

La recombinaison V(D)J (Figure 25) met en jeu des cassures double brin, des délétions et des réparations de l'ADN. Les cassures double brin sont assurées par la recombinase (composée de RAG1 et RAG2) (Oettinger et al., 1990; Schatz et al., 1989), qui va reconnaître des séquences hautement conservées adjacentes aux fragments V, D et J, appelées RSS (Recombination Signal Sequences). Ces cassures de l'ADN vont être réparées par jonction d'extrémités non homologues NHEJ (Non Homologous End Joining).

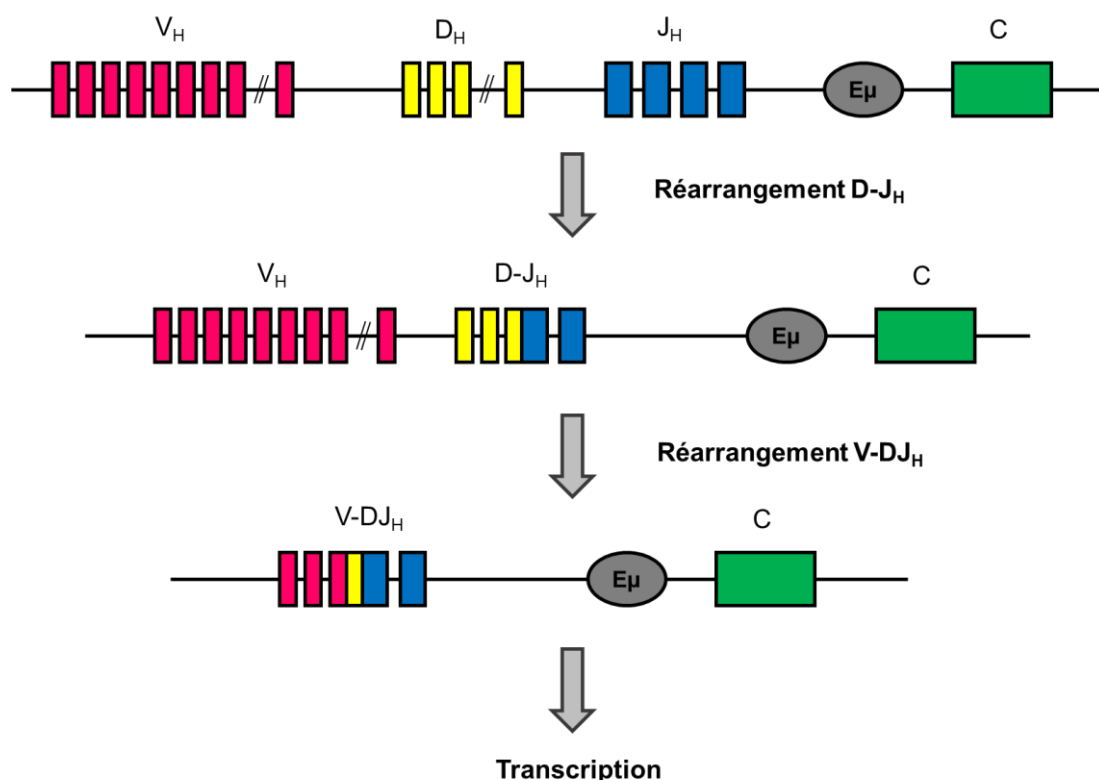


Figure 25 : Recombinaison VDJ des chaînes lourdes variables des immunoglobulines

Représentation schématique de la recombinaison V(D)J des chaînes variables des immunoglobulines, aboutissant à une grande diversité des gènes d'immunoglobulines chez les mammifères. Modèle de recombinaison ordonné et séquentiel d'après (Alt et al., 1984)

III.A.2.b. Immunité cellulaire

Les lymphocytes B contribuent également à l'immunité cellulaire, ils peuvent en effet agir comme cellules présentatrices d'antigènes qui vont induire les réponses des lymphocytes T ; elles agissent également comme effecteur de l'immunité cellulaire par la production de cytokines ; et enfin une certaine population de lymphocytes B, les Breg (B régulateurs) sécrètent de l'IL-10 et agissent comme modulateurs des réponses immunitaires.

III.A.2.b.1. Cellules présentatrices d'antigènes

Les antigènes capturés par les lymphocytes B via le BCR vont être internalisés et les peptides antigéniques en résultant vont pouvoir être retrouvés à la surface cellulaire, liés à des molécules du CMH-II et ainsi être présentés aux lymphocytes T (Schultz et al., 1990).

De plus, les lymphocytes B expriment entre autres le CD40 et les molécules de la famille B7, qui vont pouvoir se lier respectivement au CD40L (CD40 ligand) et au CD28 exprimés à la surface des lymphocytes T, permettant ainsi les interactions cellulaires nécessaires et l'activation des lymphocytes T.

III.A.2.b.2. Production de cytokines

Certains lymphocytes B sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IFN- γ ou le TNF- α et vont ainsi agir comme effecteurs de la réponse immunitaire cellulaire (Harris et al., 2000).

III.A.2.b.3. Les lymphocytes B régulateurs

Une sous-population de lymphocytes B appelée B régulateurs (Breg) est capable de sécréter de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Fillatreau et al., 2002; Katz et al., 1974). Ces Breg sont capables d'inhiber la différenciation Th1 (Blair et al., 2010; Moulin et al., 2000) et de favoriser la prolifération de lymphocytes T régulateurs (Treg) sécrétant de l'IL-10 (Lemoine et al., 2011). Les cellules Breg vont ainsi, par interaction avec différentes cellules du système immunitaire induire une immunomodulation avec instauration d'un environnement anti-inflammatoire ([Figure 26](#)).

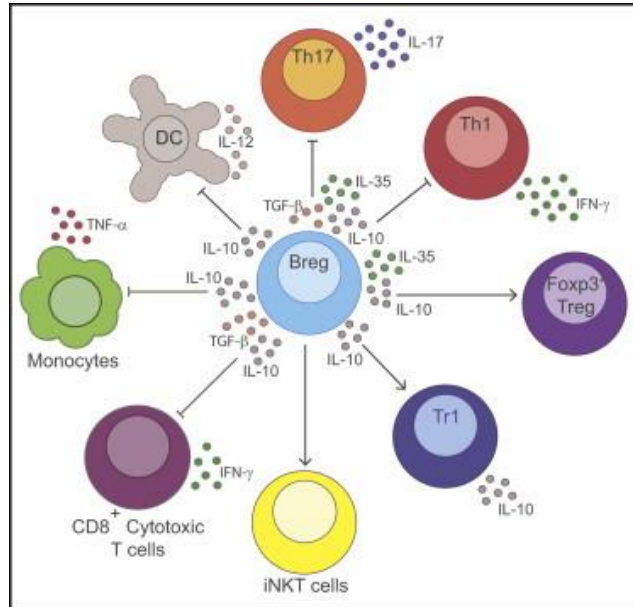


Figure 26 : Fonctions régulatrices des Breg

Les Breg produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (Interleukine 10), le TGF- β et l'IL-35. Les Breg inhibent ainsi la différenciation de cellules pro-inflammatoires comme les monocytes produisant du TNF- α , les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes Th1 et Th17. En parallèle, elles induisent la différenciation de cellules anti-inflammatoires comme les lymphocytes T régulateurs (Treg et Tr1), et maintiennent les cellules iNKT. Schéma (Rosser and Mauri, 2015)

III.B. La thérapie génique des lymphocytes B

III.B.1. Les lymphocytes B : une cible de choix pour la thérapie génique

Les lymphocytes B représentent une cible particulièrement intéressante pour le transfert de gènes, avec de nombreuses applications.

Des stratégies de thérapie génique par transfert de gènes peuvent être envisagées par exemple pour apporter un anticorps recombinant pour des immunothérapies de cancers ou de maladies auto-immunes. Dans le domaine de la cancérologie, les transgènes utilisés peuvent également cibler le cycle cellulaire ou induire l'apoptose. Un transfert de gènes pour apporter un gène fonctionnel peut également être envisagé dans le cadre de maladies génétiques comme certains cas d'immunodéficience ou de maladies monogéniques affectant les lymphocytes B. Un autre champ d'application concerne la vaccination, avec la possibilité d'apporter un transgène codant pour des séquences antigéniques spécifiques, permettant une

vaccination dans le cadre de pathologies infectieuses, ou pour l'induction d'une tolérance immunitaire.

La thérapie génique par édition du génome connaît un intérêt croissant et la découverte des outils CRISPR/Cas9 a été une révolution dans le domaine (Doudna and Charpentier, 2014). Pour les lymphocytes B, la principale limite est de trouver un vecteur capable de délivrer la Cas9 ainsi que les gRNA (ARN guide) de manière efficace, sans engendrer de toxicité. Récemment, plusieurs études ont permis de démontrer la possibilité de faire de l'édition du génome dans des cellules du système hématopoïétique, et notamment dans les lymphocytes B en utilisant des vecteurs de type AAV6 afin d'éditer les gènes des immunoglobulines (Cheong et al., 2016; Hartweger et al., 2019; Hung et al., 2018; Johnson et al., 2018; Moffett et al., 2019; Voss et al., 2019). Cependant, ces vecteurs engendrent une toxicité cellulaire, notamment par activation de la voie p53 (Schiroli et al., 2019). Il est donc nécessaire de développer de nouveaux vecteurs permettant de cibler les lymphocytes B avec moins de toxicité.

III.B.2. Les limites actuelles pour le transfert de gènes dans les lymphocytes B

III.B.2.a. Les conditions de culture

Le transfert de gènes dans les lymphocytes B primaires humains reste à l'heure actuelle très compliqué. Pour obtenir une transduction de lymphocytes dormants, il est nécessaire dans la majorité des cas de stimuler les cellules pour passer de la phase G0 à la transition entre les phases G1a et G1b du cycle cellulaire (Dardalhon et al., 2001; Ducrey-Rundquist et al., 2002; Unutmaz et al., 1999; Verhoeyen et al., 2003). Des conditions de culture bien particulières, voire complexes sont donc mises en place.

Une méthode d'activation des lymphocytes B utilisée consiste à ajouter du CD40-ligand et de l'IL-4 (Interleukine 4), qui vont induire la prolifération des cellules et l'entrée en phase S/G2/M du cycle cellulaire (Bovia et al., 2003; Janssens et al., 2003; Serafini et al., 2004), cependant cette méthode entraîne la différenciation des lymphocytes B en culture (Fecteau et al., 2009).

La co-culture de lymphocytes B primaires humains avec des cellules de thymome de souris qui vont agir en tant que cellules T « helper », avec un cocktail de cytokines est une autre méthode fréquemment utilisée (Bovia et al., 2003; Grimaitre et al., 1997; Matthes et al.,

1993; Tucci et al., 1992), mais qui conduit également à la prolifération des cellules, avec une différenciation des populations de cellules naïves et mémoires en plasmocytes (Grimaitre et al., 1997).

Il est également possible de stimuler les lymphocytes B par le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Bovia et al., 2003; Janssens et al., 2003; Lizée et al., 2004), cependant les cellules stimulées à l'EBV vont rapidement devenir infectées par le virus (Straub and Zubler, 1989).

III.B.2.b. Le choix du pseudotype d'enveloppe lentiviral

Le tropisme des vecteurs lentiviraux étant conféré par la glycoprotéine d'enveloppe utilisée pour pseudotyper celui-ci, le choix de la glycoprotéine est crucial pour obtenir un transfert de gènes dans les lymphocytes B. Il a en effet été démontré que les vecteurs LV pseudotypés par la protéine VSVG, qui sont les plus couramment utilisés notamment pour leur très large tropisme, ne permettent pas une transduction efficace des lymphocytes B primaires (Serafini et al., 2004) car ces cellules n'expriment pas le récepteur LDL-R (Amirache et al., 2014).

Il est donc nécessaire de développer de nouvelles enveloppes lentivirales afin de permettre un ciblage des cellules B primaires. Le [Tableau 7](#) ci-après représente les différentes glycoprotéines d'enveloppe, sauvages ou ingénierées, utilisées pour un ciblage des lymphocytes B.

Vecteur	Glycoprotéine d'enveloppe	Stimulation des cellules	Transduction lymphocytes B	Changement phénotypique	Référence
H/F-LV	Edmonston Measles (H et F)*	Préstimulation BCR 24h	35-50% ¹	Non	(Frecha et al., 2009)
HD4NoNE/F-LV	Measles HD4NoNE*	Non	23-40% B naïfs ² 40-56% B mémoire ²	ND	(Levy et al., 2012)
CD20-LV	CD20 scFv *	Cocktail de cytokines 48h	70% ³	Activation	(Funke et al., 2008)
		Non	20% ³	CD69 et CD71	(Kneissl et al., 2013)
CD19ds-LV	CD19 scFv *	Non	20% ⁴	Activation	(Kneissl et al., 2013)
BaEVTR-LV	BaEV TR*	Préstimulation	40% B naïfs ⁵	Non	(Girard-Gagnepain et al., 2014)
		BCR 24h	70% B mémoire ⁵		
		Non	20% B naïfs ⁵ 40% B mémoire ⁵		

Tableau 7 : Les glycoprotéines d'enveloppe utilisées pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 pour la transduction de lymphocytes B primaires

ND = Non déterminé ; * : Measles H et F = Hémagglutinine et protéine de Fusion du virus de la rougeole souche Edmonston, HD4NoNE = glycoprotéine Hémagglutinine de la rougeole mutée au niveau de l'épitope noose, CD20 scFV = glycoprotéine Hémagglutinine de la rougeole dont la queue cytoplasmique est tronquée et présente un anticorps à chaîne unique dirigé contre le CD20 (α CD20-single chain Fv), CD19 scFv = glycoprotéine Hémagglutinine de la rougeole dont la queue cytoplasmique est tronquée et présente deux anticorps à chaîne unique dirigés contre le CD19 (α CD19 ScFv), BaEVTR = Glycoprotéine d'enveloppe du babouin dont la queue cytoplasmique est tronquée. ¹ = 48h post-transduction, MOI 10 ; ² = 48h post-transduction, MOI 1 ; ³ = 72h post-transduction, MOI 2 ; ⁴ = 48h post-transduction, MOI 2 ; ⁵ = 72h post-transduction, MOI 10

III.B.2.c. L'apport de matériel génétique dans les lymphocytes B *in vivo* par voie systémique

Un autre défi pour la transduction des lymphocytes B est la possibilité d'avoir recours à une utilisation *in vivo*, par voie systémique. Les vecteurs LV-VSVG, d'une part ne permettent pas d'obtenir des niveaux de transduction suffisants des lymphocytes B quiescents *in vitro*, mais ces vecteurs sont inactivés par le complément du sérum humain, et ne peuvent donc pas être utilisés *in vivo* pour cette application (Sandrin et al., 2002).

Les vecteurs H/F-LVs pseudotypés par les glycoprotéines H et F (Hémagglutinine et Fusion) du virus de la rougeole de souche Edmonson représentent des outils très intéressants pour la transduction de lymphocytes B et T. Cependant, la très grande majorité de la population est vaccinée contre le virus de la rougeole, et présente donc des anticorps anti-rougeole pré-

existants qui, en cas d'utilisation *in vivo* par voie systémique, pourraient reconnaître les vecteurs et les neutraliser en les dégradant avant que ceux-ci aient pu atteindre leurs cellules cibles (Levy et al., 2012). Les anticorps dirigés contre le virus de la rougeole reconnaissent plus particulièrement la glycoprotéine H. Par mutation de cette glycoprotéine dans l'épitope « noose », les vecteurs HD4NoNE/F-LVs ont été développés, qui permettent d'échapper aux anticorps anti-rougeole pré-existants dans le sérum humain (Levy et al., 2012). De plus, les enveloppes ingénierées à partir du système MV-LV, utilisant la fusion de la glycoprotéine du virus de la rougeole avec des scFv ou des DARPINs permettent en plus d'un ciblage du tropisme cellulaire de ces vecteurs une plus grande capacité d'échappement de ceux-ci au système immunitaire (Buchholz et al. 2015).

OBJECTIFS DE LA THESE

Certaines caractéristiques des vecteurs lentiviraux, notamment leur tropisme ou leur immunogénicité, sont conférées par la glycoprotéine d'enveloppe utilisée pour les pseudotyper. De nombreuses glycoprotéines fusogéniques ont été étudiées pour le pseudotypage de vecteurs lentiviraux, parmi lesquelles peu de protéines endogènes, et aucune d'origine humaine. Dans le contexte de la thérapie génique, l'adressage des vecteurs et les réponses immunitaires déclenchées par les protéines virales sont des points critiques en particulier pour leur utilisation *in vivo*.

J'ai donc étudié le pseudotypage de vecteurs lentiviraux par des glycoprotéines cellulaires, les syncytines. Ce sont des glycoprotéines d'enveloppe endogènes d'origine rétrovirale présentes entre autres chez l'homme et la souris, qui possèdent de fortes propriétés fusogéniques. Les syncytines étant exprimées dans l'organisme, peuvent être reconnues comme des éléments du « soi » et ainsi être invisibles pour le système immunitaire. De plus, elles possèdent dans leurs séquences un domaine immunosuppresseur qui leur conférerait des propriétés immunosuppressives. Ces différentes caractéristiques nous ont encouragé au laboratoire à étudier leur utilisation comme nouveau pseudotype d'enveloppe de vecteurs lentiviraux. Des travaux menés avant mon arrivée ont permis d'obtenir les premiers résultats sur la possibilité de produire des vecteurs lentiviraux fonctionnels pseudotypés par les syncytines humaines 1 et 2, avec une affinité particulière pour les lymphocytes B. Toutefois, ces travaux se trouvaient limités dans les possibilités d'études *in vivo*.

Mon travail de thèse a porté sur l'étude des syncytines murines A et B comme nouveau pseudotype d'enveloppe lentiviral. L'utilisation de protéines endogènes murines nous permettrait ainsi d'avoir un modèle d'étude *in vivo* des propriétés des vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines. Plusieurs questions ont été posées au cours de ce travail : les syncytines A et B peuvent-elles permettre un pseudotypage efficace des vecteurs ? Comment se comparent-elles aux syncytines humaines ? Quel est le tropisme cellulaire de ces vecteurs et peuvent-ils être administrés *in vivo* pour un transfert de gène bien toléré ?

Pour cela, j'ai déterminé les conditions de production de vecteurs pseudotypés par la syncytine A (LV-SynA) ou par la syncytine B (LV-SynB), puis j'ai caractérisé les vecteurs LV-SynA et LV-SynB *in vitro* et *in vivo*. Mes résultats décrivent pour la première fois le pseudotypage de vecteurs lentiviraux par les syncytines murines, et leur affinité particulière pour les lymphocytes B *in vitro* et *in vivo*. Les vecteurs ainsi produits ont pu être étudiés en détail sur le plan du tropisme et des réponses immunitaires. Les résultats révèlent de nouvelles possibilités de transfert de gène dans le poumon *in vivo* après injection par voie IV de vecteurs LV-SynA et démontrent une faible immunogénicité des particules lentivirales pseudotypées par la syncytine A.

RESULTATS

Partie 1 : Production et caractérisation de vecteurs lentiviraux pseudotypés avec les syncytines

Contexte de l'étude

Le laboratoire est spécialisé dans le développement de vecteurs lentiviraux pour la thérapie génique des maladies génétiques d'origine hématopoiétique ou immunitaire. Le laboratoire s'intéresse plus particulièrement à comprendre les mécanismes d'entrée des particules dans les cellules cibles pour améliorer les procédés de transduction et pour développer de nouveaux outils tels que des adjuvants de transduction ou de nouveaux pseudotypes de vecteurs lentiviraux. Un des objectifs de l'équipe est de développer de nouvelles approches de thérapie génique *in vivo*. Des travaux menés avant mon arrivée au sein de notre équipe de recherche ont permis de démontrer la possibilité de pseudotyper des vecteurs lentiviraux avec les syncytines humaines 1 et 2. Ces travaux ont également permis de déterminer les conditions optimales de production de ces vecteurs, ainsi que leur stabilité. Mon travail a consisté à étudier la possibilité de pseudotyper des vecteurs lentiviraux avec les syncytines murines A et B, cela n'avait jamais été rapporté avec succès, et des vecteurs LV-SynA et LV-SynB nous paraissent des outils nécessaires à la compréhension des caractéristiques des vecteurs pseudotypés syncytines, comme modèle d'études chez la souris. J'ai ainsi mis en évidence la possibilité de pseudotyper des vecteurs lentiviraux avec les syncytines A et B, et les particules ainsi produites sont infectieuses et résistantes à la concentration par ultracentrifugation.

1.1. Introduction

Les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 sont de précieux outils pour le transfert de gènes. Il s'agit de virus enveloppés dont la glycoprotéine d'enveloppe à leur surface peut être modifiée et remplacée par une glycoprotéine hétérologue afin de moduler le tropisme cellulaire des vecteurs, cette technique étant appelée pseudotypage. Le nombre de glycoprotéines utilisées pour pseudotyper des vecteurs LV ne cesse de croître, pour obtenir des vecteurs possédant des tropismes cellulaires bien ciblés. L'intérêt de l'utilisation des vecteurs LV en thérapie génique *in vivo* est croissant comme alternative aux vecteurs de type AAVs qui sont immunogènes et ont une capacité d'empaquetage inférieure. Dans ce contexte, il est

nécessaire de développer de nouveaux pseudotypes de LV, afin d'obtenir des vecteurs les moins immunogènes possibles, voire même invisibles pour le système immunitaire.

Les syncytines sont des glycoprotéines d'enveloppe d'origine rétrovirale qui ont été endogénisées chez les vertébrés il y a plusieurs millions d'années. Les syncytines 1 et 2 sont retrouvées chez les primates, et les syncytines A et B chez les rongeurs. Etant d'origine rétrovirale, ces glycoprotéines ont conservé des propriétés fusogéniques très fortes, en faisant de bonnes candidates pour le pseudotypage de vecteurs lentiviraux. De plus, elles possèdent dans leur séquence un domaine immunosuppresseur, et comme elles sont endogènes elles sont théoriquement non reconnues par le système immunitaire.

Nous avons étudié la possibilité de pseudotyper des vecteurs lentiviraux recombinants avec les syncytines 1, 2, A et B et avons caractérisé les particules ainsi produites en fonction d'un vecteur de référence pseudotypé par la protéine VSVG. Nous avons ainsi quantifié le nombre de particules produites, et avons étudié l'infectivité et le tropisme de ces particules par transduction de différentes lignées cellulaires. Nous avons également testé différents additifs de culture.

Nos travaux rapportent le pseudotypage efficace de vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 par les syncytines.

1.2. Matériels et méthodes

1.2.1. Clonage des syncytines A et B dans des plasmides d'expression pcDNA3.1

Les plasmides pcDNA3.1-Syncytin1 et pcDNA3.1-Syncytin2 codant respectivement pour la syncytine 1 humaine (ERVW-1-001) et la syncytine 2 humaine (ERVFRD-1) ont été obtenus par clonage de leurs séquences d'ADN respectives synthétisées (*Genecust*) correspondant aux séquences ENST00000493463 et ENSG00000244476, dans un plasmide d'expression pcDNA3.1 (*Invitrogen*) à l'aide des sites de restriction NheI et XhoI.

La séquence de la syncytine A (*Genecust*) a été clonée dans le plasmide pcDNA3.1-Syncytin1 à la place de la syncytine 1, par digestion par les enzymes de restriction HindIII et XbaI (*Thermo scientific*) après ajout par PCR des sites de restriction pour HindIII et XbaI de part et d'autre de la séquence de la syncytine A.

La séquence de la syncytine B (*Genecust*) a été clonée dans un plasmide pcDNA3.1 (*Invitrogen*) à l'aide des sites de restriction pour NotI et XbaI après ajout par PCR des sites de restriction de ces enzymes de part et d'autre de la séquence de la syncytine B.

Les plasmides ont été produits à l'aide du kit Nucleobond PC 2000 EF (*Macherey-Nagel*).

1.2.2. Lignées cellulaires

Les lignées de cellules adhérentes humaines de rein embryonnaire HEK293T (ATCC® CRL-11268™), de carcinome colorectal HCT116 (ATCC® CCL-247™) et les lignées murines de fibroblastes NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) et de myoblastes C2C12 (ATCC® CRL-1772™) ont été cultivées dans du DMEM (*Life Technologies, Waltham, USA*) supplémenté de 10% de SVF décomplémenté (*Eurobio*), 1% de glutamine (*Life Technologies*) et 1% pénicilline/streptomycine (*Life Technologies*).

La lignée de cellules en suspension murine de lymphome B A20.IIa (*fournies généreusement par le Pr. Sylvain Fisson*) a été cultivée dans du milieu RPMI 1640 (*Life Technologies*) supplémenté de 10% de SVF décomplémenté (*Eurobio*), 1% de glutamine (*Life Technologies*), 1% de pénicilline-streptomycine (*Life Technologies*), 1mM de sodium pyruvate (*Life Technologies*) et 50µM de β-Mercaptoéthanol.

Les lignées de cellules en suspension humaines de lymphome de Burkitt RAJI (ATCC, CCL-86™) et de lymphocytes T Jurkat (ATCC, TIB-152™) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (*Life Technologies*) supplémenté de 10% de SVF décomplémenté (*Eurobio*), 1% de glutamine (*Life Technologies*) et 1% de pénicilline-streptomycine (*Life Technologies*).

Les cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂.

1.2.3. Production de vecteurs lentiviraux pseudotypés syncytines

Les vecteurs ont été produits par transfection transitoire au phosphate de calcium de cellules productrices HEK293T (ATCC). Les 4 plasmides transfectés sont pKgagpol (14.6µg par flasque T175) qui code pour les protéines virales gag et pol, pKrev (5.6µg par flasque) qui code pour la protéine virale rev, un plasmide d'enveloppe (pcDNA3.1-Syncytin1, -Syncytin2, -SyncytinA ou -SyncytinB à raison de 20µg par flasque) et un plasmide de transfert (22.5µg par flasque) qui code pour le transgène, il s'agit soit d'un PRRL-PGK-dNGFR-WPRE codant

pour une forme tronquée du NGFR (Nerve Growth Factor Receptor) sous le contrôle du promoteur fort ubiquitaire PGK (PhosphoGlycerate Kinase) ou un PRRL-SFFV-LucII-WPRE qui code pour la luciférase LucII sous le contrôle du promoteur fort ubiquitaire SFFV (Spleen Focus Forming Virus). Différentes quantités de plasmide d'enveloppe ont été testées afin de déterminer les conditions optimales de production des vecteurs pseudotypés par les syncytines. Après une transfection sur la nuit, le milieu de transfection a été aspiré et le milieu de culture a été renouvelé par ajout de milieu DMEM frais. 24h plus tard, le surnageant de culture a été récolté, clarifié par centrifugation 1500rpm 5min, filtré sur acétate de cellulose 0.45µm puis concentré par ultracentrifugation 50000G pendant 2h à 12°C. Les particules lentivirales ont été resuspendues dans du PBS stérile, aliquotées puis conservées à -80°C. Les vecteurs pseudotypés par la protéine VSVG ont été produits tel que décrit précédemment par (Merten et al., 2016).

1.2.4. Titration des vecteurs LV-Syn en particules physiques

La titration des vecteurs lentiviraux en particules physiques repose sur 2 techniques : l'ELISA et l'analyse du suivi individuel de particules (autrement appelée NTA pour Nanoparticle Tracking Analysis).

Un ELISA p24 a été réalisé à l'aide du kit Alliance HIV-1 p24 antigen ELISA test (*Perkin-Elmer*) sur les échantillons bruts ou concentrés de particules lentivirales. Ce test permet de doser la quantité de protéine de capsid p24 des vecteurs, en sachant que 1ng de p24 équivaut à $1.23 \cdot 10^7$ particules de lentivirus.

Une autre méthode de titration des particules physiques de lentivirus dans un échantillon consiste à suivre les nanoparticules à l'aide du NanoSight NS300 (*Malvern*). Les suspensions de vecteurs lentiviraux concentrés ont été diluées au 1/1000^{ème} dans du PBS pour être analysées. Le NS300 permet de déterminer la concentration de nanoparticules dans l'échantillon ainsi que le diamètre des particules. L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel NTA 3.2 (*Malvern*).

1.2.5. Titration des vecteurs LV-Syn en particules infectieuses

La titration en particules infectieuses de vecteurs LV pseudotypés par les syncytines repose sur la transduction de la lignée cellulaire A20.IIa par différents volumes de vecteur en présence de Vectofusin-1®. $1 \cdot 10^5$ cellules ont été transduites pendant 6h à 37°C, les cellules

ont ensuite été lavées et du milieu de culture RPMI frais a été ajouté. Les cellules ont été gardées en culture pendant 7 jours, à l'issue desquels une partie des cellules a été utilisée pour déterminer un titre en unités de transduction TU/mL par évaluation du pourcentage de cellules exprimant le transgène par cytométrie en flux à l'aide du LSR II (*BD Biosciences*) et l'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel FlowJo_V10 (*BD Biosciences*). Le reste des cellules a été lavé en PBS puis conservé en culots secs à -20°C, l'ADN génomique de ces cellules a ensuite été extrait à l'aide du kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (*Promega*) puis une qPCR a été réalisée afin de déterminer le nombre de copies de vecteur par cellule, qui permet d'obtenir un titre en génome infectieux IG/mL. Les amorces utilisées pour la qPCR en duplex sont les suivantes : PSI_F : 5' CAGGACTCGGCTTGCTGAAG 3', PSI_R : 5' TCCCCCGCTTAATACTGACG 3', PSI_P.FAM : 5' CGCACGGCAAGAGGCGAGG 3', TitinMex5.3_F : 5' AAAACGAGCAGTGACGTGAGC 3', TitinMex5.3_R : 5' TTCAGTCATGCTGCTAGCGC 3' et TitinMex5.3_P.VIC : 5' TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC 3'. L'appareil utilisé est le Light Cycler 480 (*Roche*) et l'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel LightCycler480 SW 1.5.1.

1.2.6. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.

1.3. Résultats

1.3.1. Détermination des conditions optimales de production des LV pseudotypés syncytine

Les vecteurs lentiviraux ont été produits par transfection transitoire sur cellules adhérentes HEK293T. Pour chaque pseudotype de vecteur lentiviral, les conditions de transfection doivent être optimisées. Les vecteurs LV pseudotypés VSVG sont par exemple produits avec une quantité de 8µg de plasmide pKG par flasque T175, alors que pour les syncytines 1 et 2, des tests ont été réalisés au laboratoire et ont montré que la dose optimale de plasmide par flasque était de 20µg, et qu'une seule récolte des surnageants de culture était nécessaire (données non montrées). Pour produire des vecteurs LV-SynA nous avons donc testé différentes quantités de plasmide pcDNA3.1-SyncytinA, à savoir 6 ; 12 ; 16 ; 20 ou 24µg par flasque T175. Les quantités des autres plasmides (pKgagpol, pKrev et le plasmide de

transfert) étant déjà optimisées et adaptées à la production en cellules HEK293T, nous ne les avons pas modifiées.

Nous avons utilisé un plasmide codant pour la GFP comme transgène (PCCL-PGK-eGFP-WPRE), car nous pouvons ainsi évaluer l'efficacité de transfection par microscopie à fluorescence. Au moment de la transfection, les cellules sont à 70-80% de confluence. Après transfection, 80% des cellules expriment la GFP (données non montrées). Nous effectuons deux récoltes des surnageants de culture : une première récolte est effectuée 24h après le renouvellement du milieu post-transfection, et une seconde 48h après renouvellement du milieu post-transfection (soit 24h après la première récolte). Un dosage des particules physiques lentivirales est effectué sur ces surnageants bruts par un ELISA p24. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont représentés dans la [Figure 27](#) ci-dessous :

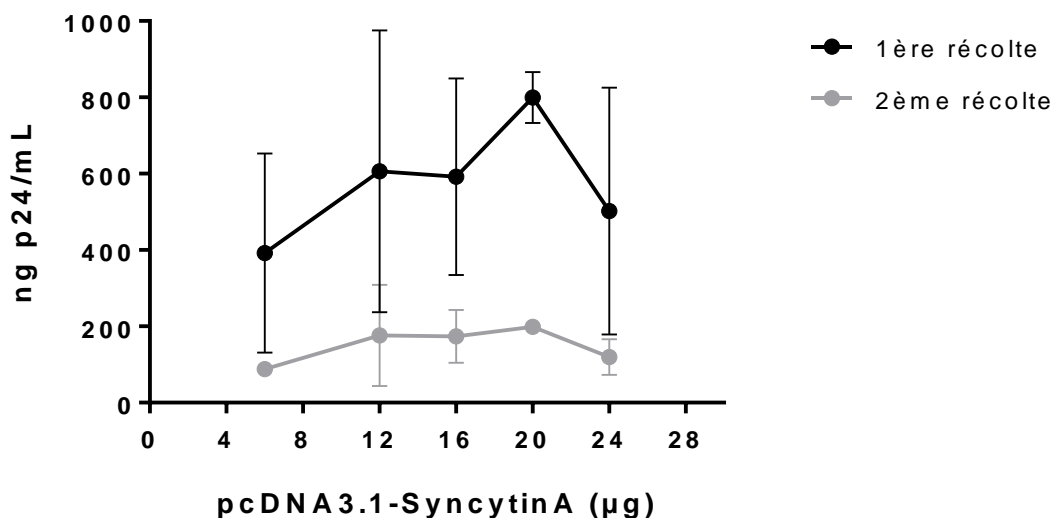


Figure 27 : Détermination de la quantité optimale de plasmide pDNA3.1-SyncytinA pour la production de LV-SynA

Titration en particules physiques par ELISA p24 (ng p24/mL) des surnageants de vecteurs lentiviraux bruts après une première récolte à 24h (noir) et une deuxième récolte à 48h (gris). Chaque point correspond à la moyenne de n=3 expériences indépendantes pour une quantité de plasmide donnée (6 ; 12 ; 16 ; 20 ou 24µg de plasmide), avec les écarts-type.

Il y a une plus forte concentration de particules lentivirales dans les surnageants issus de la première récolte (courbe noire) que dans les surnageants issus de la seconde récolte (courbe grise). En fonction des quantités de plasmide testées, les résultats obtenus lors de la

première récolte varient de 400 à 800ng de p24/mL de surnageant contre 80 à 200ng de P24/mL pour les surnageants de la deuxième récolte (Figure 27). Les quantités de particules obtenues lors de la seconde récolte étant très faibles, nous avons décidé de ne retenir que la première récolte à 24h pour la suite des expériences.

Nous observons également que la quantité de plasmide pcDNA3.1-SyncytinA permettant d'obtenir les meilleurs rendements de production et qui soient reproductibles (avec un titre de 800ng de p24/mL) est de 20µg par flasque T175. Avec une dose supérieure (24µg de plasmide), nous observons une diminution du titre en p24, probablement liée à un effet cytotoxique de la quantité d'ADN dans le milieu sur les cellules.

Pour produire les vecteurs LV-SynB, nous avons utilisé la même quantité de plasmide que pour les autres syncytines, à savoir 20µg de pcDNA3.1-SyncytinB par flasque T175.

Nous avons donc montré la possibilité de pseudotyper des vecteurs lentiviraux avec les syncytines humaines et murines. Nous avons déterminé les conditions de production de ces vecteurs, à savoir une seule récolte du surnageant de culture à 24h (contre 2 récoltes à 24 et 48h pour les vecteurs pseudotypés par VSVG) et les quantités de plasmides suivantes : 14.6µg de pKgagpol, 5.6µg de pKrev, 22.5µg de plasmide de transfert et 20µg de pcDNA3.1-Syncytin (contre 8µg pour les LV-VSVG).

1.3.2. Pseudotypage efficace des LVs par les syncytines

Nous avons voulu comparer les titres des vecteurs lentiviraux pseudotypés syncytines avec des vecteurs de référence LV-VSVG. Nous avons utilisé deux méthodes afin de déterminer la quantité de particules lentivirales produites : un ELISA p24 qui permet de doser la protéine de capsid lentivirale p24 et le suivi individuel des nanoparticules à l'aide du Nanosight qui permet d'obtenir des informations sur la taille et la concentration des vecteurs. Les titres en p24 obtenus pour les vecteurs pseudotypés par les syncytines sont similaires aux titres des vecteurs pseudotypés par VSVG, avec des titres de $1.29^E+5 \pm 1.24$ ng p24/mL pour les LV-SynA, $4.74^E+05 \pm 5.54$ ng p24/mL pour LV-SynB, $4.69^E+05 \pm 3.4$ ng p24/mL pour LV-Syn1, $3.05^E+05 \pm 2.53$ ng p24/mL pour LV-Syn2 et $4.68^E+05 \pm 4.12$ ng p24/mL pour LV-VSVG (Figure 28A). Nous n'observons pas non plus de différence de titre entre les vecteurs pseudotypés par les syncytines ou par VSVG par analyse au Nanosight (pp/mL), avec en moyenne $5.21^E+11 \pm 4.42$ pp/mL pour LV-SynA, $1.85^E+11 \pm 2.36$ pp/mL pour LV-SynB, $6.41^E+11 \pm 3.39$ pp/mL pour LV-Syn1, $3.39^E+11 \pm 2.34$ pp/mL pour LV-Syn2 et $2.87^E+11 \pm 2.47$ pp/mL pour LV-VSVG (Figure 28B). Toutefois, il est intéressant de noter une différence de la

taille des LV-Syn par rapport aux LV-VSVG. Les LV-Syn sont des particules de plus grand diamètre que les LV-VSVG : les LV-SynA ont un diamètre moyen de 127nm (± 10), 132nm (± 10) pour les LV-SynB, 133nm (± 7) pour les LV-Syn1, 125nm (± 11) pour les LV-Syn2 et 114nm (± 4) pour LV-VSVG (Figure 28C).

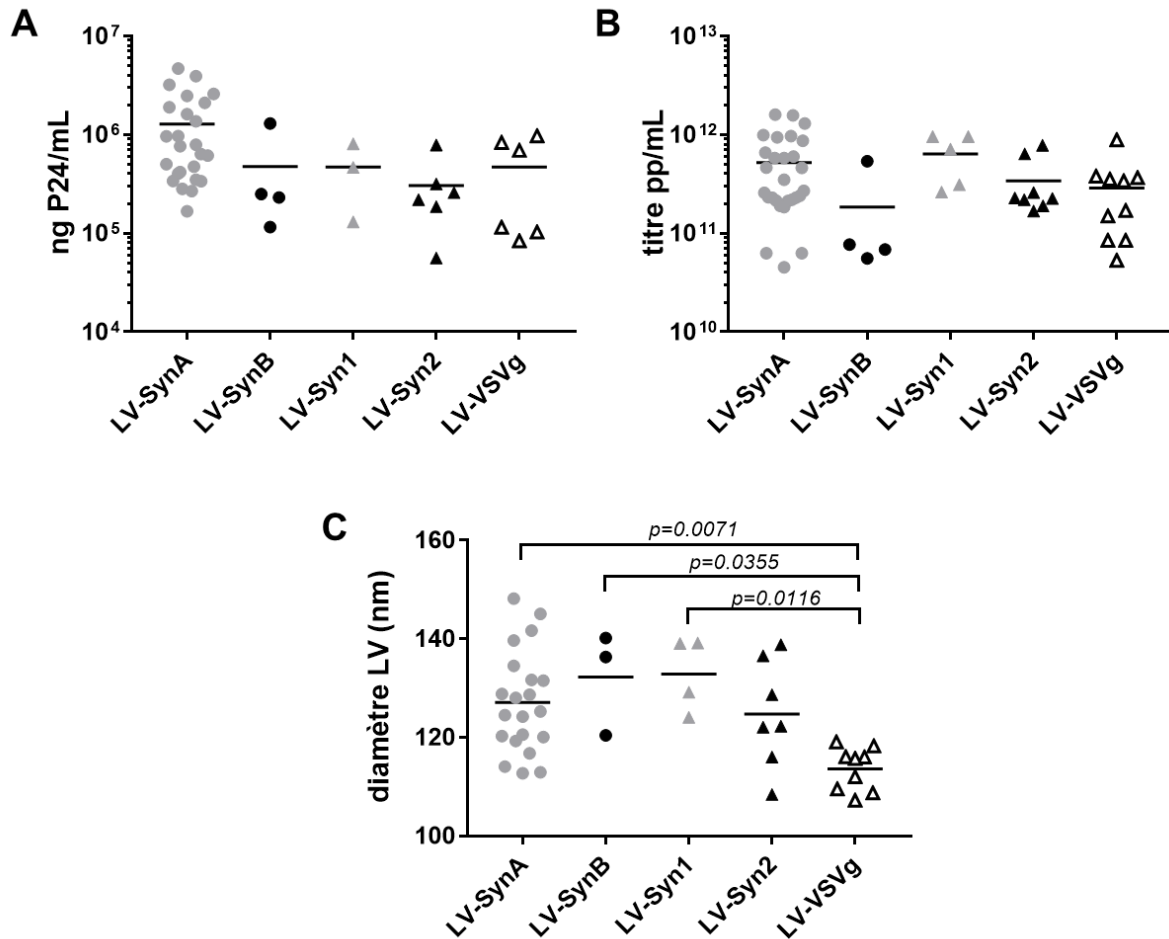


Figure 28 : Caractérisation des vecteurs LV-Syn en particules physiques (taille et concentration)

A : titration des vecteurs en ng de p24/mL déterminée par ELISA ; B : titration des vecteurs en particules physiques (pp/mL) déterminée à l'aide du Nanosight NS300 ; C : caractérisation du diamètre des particules en nm déterminé à l'aide du Nanosight NS300. Les statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Tukey.

Les analyses par suivi des nanoparticules à l'aide du Nanosight de surnageant bruts de vecteurs LV-SynA ou après concentration permettent de montrer l'efficacité de la concentration des vecteurs (1.4×10^9 particules/mL avant concentration contre 8.7×10^{11} après

concentration soit un facteur 600). Nous observons également une pureté plus importante de la suspension lentivirale après ultracentrifugation (Figure 29).

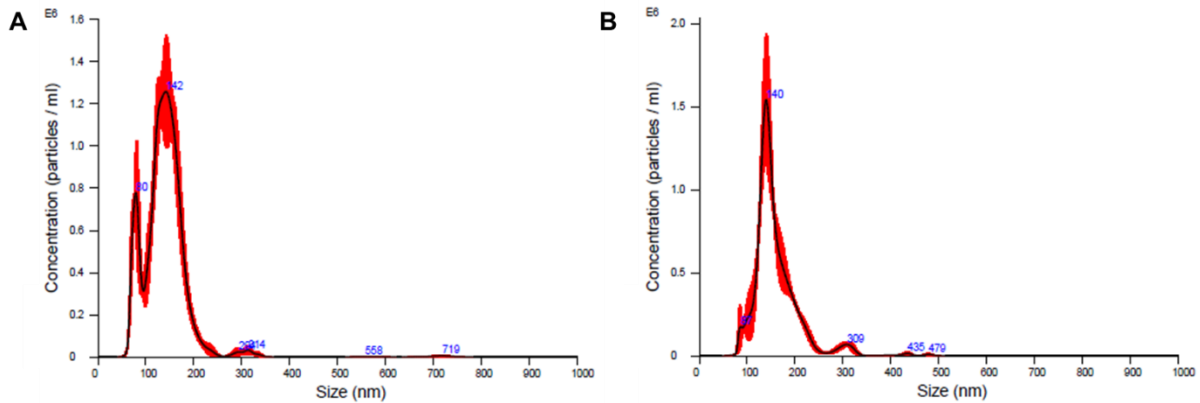


Figure 29 : Graphiques représentatifs de l'analyse de vecteurs LV-SynA au Nanosight

A : Surnageant de récolte de vecteurs LV-SynA brut, avant concentration dilué au 1/100 dans du PBS
B : Vecteur LV-SynA après concentration par ultracentrifugation dilué au 1/10000 dans du PBS. Sur l'axe des abscisses la concentration des nanoparticules (particules/mL) et sur l'axe des ordonnées la taille des particules en nm. La courbe rouge représente la moyenne de 3 captures successives.

1.3.3. Transduction sélective des cellules A20.IIa par les LV-Syn

Afin de déterminer l'infectiosité des vecteurs pseudotypés par les syncytines et de pouvoir la comparer à celle des vecteurs LV-VSVG, nous avons évalué l'efficacité des vecteurs sur différentes lignées humaines et murines, afin de trouver une lignée permissive aux vecteurs. Les différentes lignées testées sont efficacement transduites par les vecteurs LV-VSVG. Les cellules HCT116, C2C12 et NIH/3T3 ne sont pas transduites par les différents LV-Syn. L'analyse de l'expression du transgène membranaire Δ NGFR par cytométrie en flux révèle que les cellules HEK293T sont transduites par les LV-Syn1 (26%) et LV-Syn2 (28%) mais pas par les LV-SynA et -SynB. Les cellules Jurkat et RAJI sont transduites par les vecteurs LV-Syn1, -Syn2, -SynA et -SynB. Les cellules A20.IIa sont très fortement transduites par les LV-Syn : 65% de transduction avec LV-Syn1, 70% avec LV-Syn2, 69% avec LV-SynA et 69% avec LV-SynB (Figure 30). Nous avons donc choisi d'utiliser cette lignée cellulaire pour la titration en particules infectieuses des vecteurs pseudotypés par les différentes syncytines. Il est intéressant de noter que les lignées qui sont transduites à la fois par les vecteurs pseudotypés avec les syncytines humaines et murines sont d'origine hématopoïétique (les

cellules RAJI sont des cellules de lymphome B humain, les cellules Jurkat de lymphome T humain et les cellules A20.IIa de lymphome B murin).

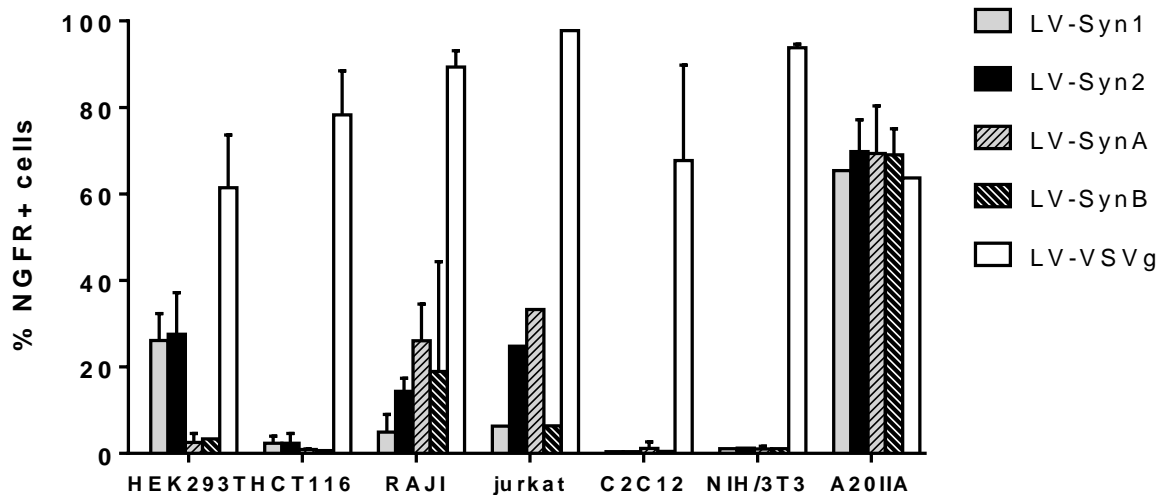


Figure 30 : Profil de transduction des LV-Syn sur un panel de lignées cellulaires humaines et murines

Les différentes lignées cellulaires HEK293T, HCT116, RAJI, Jurkat, C2C12, NIH/3T3 et A20.IIa ont été transduites à raison de 1.10^E+05 IG/mL de vecteur LV-Syn1, -Syn2, -SynA, -SynB ou -VSVG en présence de Vectofusin-1 (12 μ g/mL) pendant 6h. Les cellules sont gardées en culture et l'efficacité de transduction est évaluée 7 jours post-transduction par analyse du pourcentage de cellules exprimant le transgène Δ NGFR par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de n=3 expériences indépendantes, sauf pour les Jurkat (n=1), en moyenne avec les écarts-type.

La transduction *in vitro* des cellules par les LV-Syn est dépendante de l'ajout d'un additif de transduction, la Vectofusin-1. Il s'agit d'un peptide cationique qui va promouvoir l'entrée des vecteurs dans la cellule (Fenard et al., 2013a). Nous avons testé différents additifs de transduction (polybrène et protamine sulfate) qui ne nous permettent pas d'obtenir une meilleure efficacité de transduction (données non montrées). En revanche, l'ajout de Vectofusin-1 augmente de façon significative la transduction des cellules A20.IIa par les LV-Syn, passant d'une moyenne de 29% de cellules exprimant le transgène Δ NGFR sans additif à 84% en présence de Vectofusin-1 pour les vecteurs LV-SynA, et de 22% de cellules positives sans additif à 68% pour les LV-SynB (Figure 31).

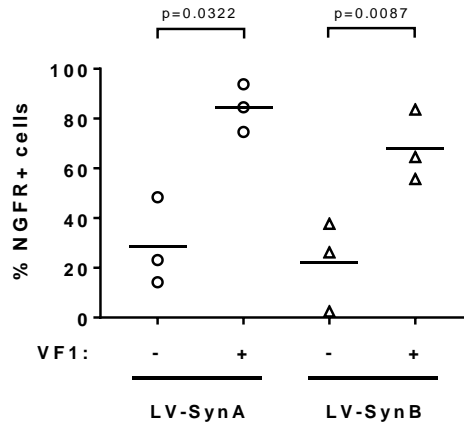


Figure 31 : Effet de la vectofusin-1 sur la transduction des cellules A20.IIa par les LV-SynA et LV-SynB

Les cellules A20.IIa ont été transduites à raison de 1.10^E+05 cellules par 1.10^E+05 IG/mL de LV-SynA ou de LV-SynB en présence ou non de Vectofusin-1 ($12\mu\text{g/mL}$) pendant 6h. Les cellules ont été gardées en culture et le pourcentage d'expression du transgène ΔNGFR a été analysé par cytométrie en flux 3 jours post-transduction. Représentation de $n=3$ expériences indépendantes. Les statistiques ont été calculées à l'aide d'un test t de Student sur données appariées.

Un effet dose-réponse des LV-SynA et LV-SynB est observé lors de la transduction des cellules A20.IIa, le nombre de cellules exprimant le transgène ΔNGFR augmentant avec la dose de vecteur, atteignant en moyenne 60% de cellules positives pour $5\mu\text{L}$ de vecteur à 7 jours post-transduction (Figure 32).

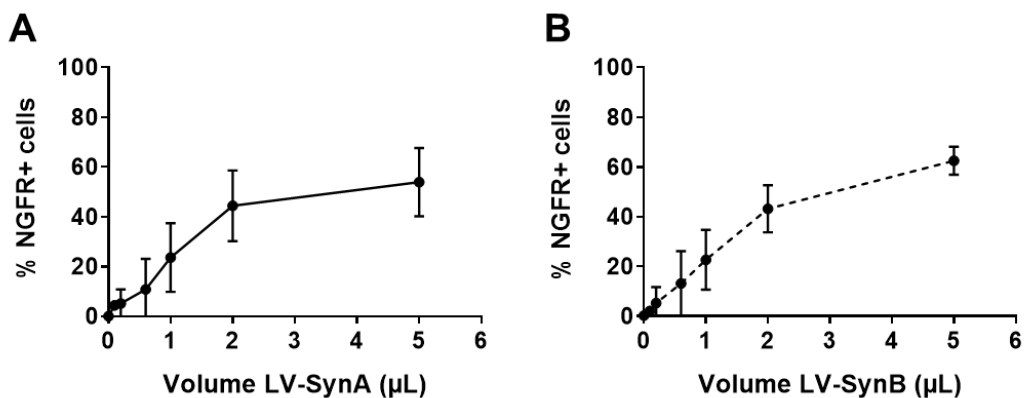


Figure 32 : Effet dose-réponse des LV-SynA et LV-SynB sur les cellules A20.IIa en présence de Vectofusin-1

Les cellules A20.IIa ont été transduites à raison de 1.10^E+05 cellules par différents volumes de (A) LV-SynA ou (B) LV-SynB à savoir, 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ou $5\mu\text{L}$ de vecteur en présence de Vectofusin-1 ($12\mu\text{g/mL}$). Le pourcentage d'expression du transgène ΔNGFR a été évalué par cytométrie en flux 7 jours post-transduction. Représentation de $n=3$ expériences indépendantes en moyenne avec les écarts-type.

Les cellules A20.IIa étant permissives aux vecteurs pseudotypés par les syncytines et un effet dose-réponse de ces vecteurs étant observé en présence de Vectofusin-1, nous avons pu déterminer le titre infectieux des LV-Syn ([Tableau 8](#)).

Vecteur	Nombre de lots	Titre IG/mL
LV-SynA	n=12	1.12 ^E +07 ±0.84
LV-SynB	n=4	1.04 ^E +07 ±0.92
LV-Syn1	n=3	4.40 ^E +06 ±1.98
LV-Syn2	n=5	4.95 ^E +06 ±2.76
LV-VSVG	n=3	2.24 ^E +07 ±2.48

Tableau 8 : Détermination du titre infectieux en IG/mL des vecteurs pseudotypés syncytines en comparaison avec VSVG

Les titres en IG/mL (Infectious Genome) ont été déterminés par qPCR à partir de celles A20.IIa transduites par différents volumes de vecteurs LV-SynA, LV-SynB, LV-Syn1, LV-Syn2 ou LV-VSVG en présence de Vectofusin-1 (12µg/mL) à 7 jours post-transduction. Les résultats sont exprimés en moyenne avec les écarts-type.

Dans un souci de comparaison, les titres rapportés dans ce tableau pour les vecteurs pseudotypés par les syncytines ou par VSVG ont été calculés sur cellules A20.IIa (en titration classique sur cellules HCT116, les titres obtenus pour les mêmes vecteurs LV-VSVG sont de 1.5^E+09, soit un facteur 100 en fonction des cellules utilisées). Le titre infectieux est dépendant du pseudotype et du type cellulaire (en fonction des récepteurs exprimés par ces cellules).

1.4. Conclusions et discussion sur la Partie 1

Nous avons démontré la possibilité de pseudotyper de manière efficace des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 par les syncytines murines A&B. Les résultats ont été comparés à la production des LV pseudotypés avec des syncytines humaines 1&2 et montrent des similarité en termes de titre mais des différences notables en termes de cible cellulaire. Nous avons montré qu'une seule récolte des vecteurs était nécessaire et nous avons établi des conditions fonctionnelles de production pour obtenir suffisamment de vecteur pour des séries d'expérience. Les vecteurs pseudotypés par les syncytines sont résistants à la concentration par ultracentrifugation, contrairement à d'autres pseudotypes plus fragiles comme GaLV ou RD114 (Kim and Lim, 2017; Sandrin et al., 2002).

Les particules ainsi produites ont des titres en particules physiques du même ordre de grandeur que pour des vecteurs de référence LV-VSVG, avec les deux méthodes de titration utilisées. Il est intéressant de noter une différence entre les vecteurs lentiviraux pseudotypés par VSVG et par les syncytines en termes de taille des particules. Les vecteurs pseudotypés par les syncytines sont en effet plus grandes que les vecteurs pseudotypés par VSVG, sans que cette différence n'ait un impact sur l'infectiosité des vecteurs.

Le tropisme de transduction des vecteurs pseudotypés syncytines est très particulier, avec un fort tropisme pour les cellules hématopoïétiques et plus particulièrement pour les lymphocytes B, d'après des tests réalisés sur différentes lignées d'origine humaine ou murine. Nous avons donc utilisé la lignée de lymphome B murin A20.IIa pour la titration des LV-Syn, les cellules utilisées classiquement dans les protocoles de titration n'étant pas permissives à ces vecteurs.

La transduction *in vitro* de cellules par les vecteurs pseudotypés par les syncytines est dépendante de l'ajout d'un additif de transduction, la Vectofusin-1 dans le milieu de culture. La Vectofusin-1 est un peptide cationique connu pour promouvoir l'entrée de vecteurs de type lentiviraux dans les cellules (Fenard et al., 2013a). Les autres additifs testés (protamine sulfate ou polybrène) ne permettent pas d'obtenir une meilleure efficacité de transduction que la condition sans additif.

Nous n'avons pas essayé d'apporter de modifications aux séquences des différentes syncytines pour pseudotyper les vecteurs. Il est assez courant de tronquer la queue cytoplasmique de la glycoprotéine pour obtenir une meilleure formation des particules lentivirales (Girard-Gagnepain et al., 2014), et ainsi obtenir de meilleurs rendements de production et une meilleure infectivité des vecteurs. Il serait donc intéressant de tester des productions de vecteurs pseudotypés par des syncytines-TR ou syncytines-Rless afin d'améliorer la production des vecteurs et leur efficacité de transduction.

Les différentes syncytines (humaines ou murines) utilisées pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux se comportent de façon similaire, à la fois en termes de titre physique ou infectieux, mais aussi quant au tropisme cellulaire des vecteurs ou à la dépendance à la Vectofusin-1 pour obtenir une transduction *in vitro*, laissant supposer des propriétés communes très proches, bien que les différents gènes ne soient pas orthologues (Dupressoir et al., 2005).

Partie 2 : Les vecteurs lentiviraux pseudotypés syncytines permettent une transduction efficace des lymphocytes B primaires humains et murins

Article : Syncytins enable novel possibilities to transduce human or mouse primary B cells and to achieve well-tolerated *in vivo* gene transfer

Y. Coquin^{1,2}, M. Ferrand^{1,2}, A. Seye¹, L. Menu¹, A. Galy^{1,*}

¹ Integrare Research Unit UMR_S951, Genethon, Inserm, Univ-Evry, Université Paris Saclay, Evry F-91000, France.

² Equal contribution

*Corresponding author: Dr. A. Galy PhD Genethon, 1 bis rue de l'Internationale, 91002 Evry, France. galy@genethon.fr

Submitted, October 2019 under review

Disponible en pre-print sur bioRxiv 816223; doi: <https://doi.org/10.1101/816223>

Contexte de l'étude

Afin de caractériser les vecteurs pseudotypés par les syncytines (LV-Syn), un panel de différentes lignées cellulaires a été testé pour déterminer une lignée cellulaire permissive à ces vecteurs. Un tropisme particulier pour des lignées d'origine hématopoïétique et plus particulièrement de lymphome B nous ont poussé à étudier la transduction de lymphocytes B primaires avec ces vecteurs. Les travaux présentés dans cette partie concernent la caractérisation du tropisme des vecteurs LV-Syn pour les lymphocytes B *in vitro* et *in vivo*. Les travaux portant sur la caractérisation des LV-Syn1 et LV-Syn2 et leur efficacité à transduire des lymphocytes B primaires ont été réalisés au laboratoire. Mon travail dans ces travaux a porté sur la caractérisation des LV-SynA et LV-SynB et sur leur capacité à transduire les lymphocytes B *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons montré pour la première fois dans cet article la possibilité de pseudotyper des vecteurs lentiviraux avec les syncytines et murines de façon fonctionnelle. Les particules produites sont résistantes à l'ultracentrifugation et sont stables. Nous avons également montré la dépendance à l'ajout d'un adjuvant de transduction, la Vectofusin-1, pour obtenir des efficacités de transduction élevées. Les résultats obtenus suggèrent une affinité particulière des LV-Syn pour les lymphocytes B, à la fois humains et murins quiescents. Les LV-Syn permettent également de faire un transfert de gène dans des cellules précurseurs des lymphocytes B dans la moelle osseuse chez la souris, aussi bien que dans des cellules matures. L'étude de la biodistribution de LV-SynA *in vivo* chez la souris par voie intra-veineuse confirment le tropisme particulier de ces vecteurs, permettant un transfert de gène dans la rate et plus particulièrement au niveau des lymphocytes B.

Title: Syncytins enable novel possibilities to transduce human or mouse primary B cells and to achieve well-tolerated *in vivo* gene transfer

Authors: Y. Coquin^{1,2}, M. Ferrand^{1,2}, A. Seye¹, L. Menu¹, A. Galy^{1,*}

Affiliations:

¹ Integrare Research Unit UMR_S951, Genethon, Inserm, Univ-Evry, Université Paris Saclay, Evry F-91000, France.

² equal contribution

* corresponding author: Dr. A. Galy PhD Genethon, 1 bis rue de l'Internationale, 91002 Evry, France. galy@genethon.fr

One Sentence Summary: Syncytins are fusogenic cellular proteins that can pseudotype lentiviral gene transfer vector particles, achieving efficient gene transfer into primary quiescent B cells and reducing the *in vivo* immunogenicity of the particles following systemic administration.

Keywords : syncytins, B cells, antibody, lentiviral, p24, gene therapy

Abstract:

Syncytins are cellular transmembrane glycoproteins with fusogenic and immunosuppressive properties that are encoded by endogenous retroviral envelope sequences in mammalian genomes. Based on their properties, syncytins may be useful to pseudotype lentiviral gene transfer vectors (LV) and to obtain well-tolerated *in vivo* gene delivery but their cellular targets are unknown in this context. We pseudotyped LV with human or murine syncytins. Such LV-Syn particles were infectious *in vitro* but required a transduction additive, as do other retroviral envelope LV pseudotypes. In these conditions, LV-Syn remarkably transduced quiescent human or murine primary B cells at high level *in vitro* including naïve blood B cells or B cell precursors from murine bone marrow. Transduced human B cells could be expanded in culture and were functional. Human or murine T cells were transduced less efficiently than B cells, in agreement with lower levels of syncytin receptors on T cells compared to B cells. Well-tolerated *in vivo* gene transfer was possible without additive, as demonstrated with murine syncytin A-mediated gene delivery in C57BL/6 mice. A single intravenous injection of LV-SynA vector to mice led to stable gene transfer into spleen germinal center B cells. LV-SynA were also intrinsically less immunogenic than LV-VSVG, leading to low antibody responses against the vector capsid. This is the first evidence of interactions between syncytins and B cells, providing novel opportunities for B cell genetic engineering and for well-tolerated gene transfer *in vivo*. The findings also suggest that some immunosuppressive properties of syncytins could be mediated by B cells.

word count : 250

Introduction

Efficient viral vectors for gene transfer have enabled the recent clinical successes of gene therapy in genetic diseases or cancer. Yet, the *in vivo* use of viral vectors can be limited by adaptive immune recognition of their components. Advanced self-inactivated HIV-1-derived lentiviral vectors (LV) are powerful vectors that stably transduce quiescent cells, integrate safely into the host cell chromatin and permit long-term engraftment of transduced cells (reviewed in (1-3)). The entry of LV into target cells is mediated by envelope glycoproteins which interact with cellular receptors on target cells and induce cell:virus membrane fusion. The most commonly-used envelope glycoprotein to pseudotype LV is the vesicular stomatitis G glycoprotein (VSVG) enabling gene delivery into a broad range of target cells with exception of certain cell types such as quiescent human T or B cells which poorly express the cognate LDL receptors (4). LV are largely employed for *ex vivo* gene therapy and *in vivo* they are used locally in the brain or eye where immune reactions are limited. However, VSVG is immunogenic and the systemic administration of LV-VSVG to C57BL6 mice leads to the transduction of macrophages in the liver and of dendritic cells in lymphoid tissues, inducing inflammation and strong CD4 and CD8 T cell immune responses against transgene products (5-7). Envelope glycoproteins of LV are key determinants of their interactions with the immune system. VSVG can be shielded with CD47 to prevent uptake by liver Kupfer cells and to reduce inflammatory signals *in vivo* (7). Alternatively, various LV pseudotypes exist, many of which have been elaborated from mutated and engineered viral envelope glycoproteins to increase cell-specific targeting in particular towards B cells or to permit *in vivo* LV delivery, as reviewed recently (8). Yet these systems which are always based on the use of viral platforms are not devoid of immunogenic potential. Possibly, replacing the exposed viral components of LV envelopes by endogenous cellular components to which the host is tolerant could reduce immunogenicity but this has not been effectively obtained or tested in immunocompetent hosts.

During evolution, endogenous retroviruses (ERV) have entered the germline of mammalian hosts. Some ERV genes have become endogenized, persisting over tens of millions of years in mammalian genomes as they confer physiological functions (9). This is the case of syncytin genes which are cellular genes corresponding to functional ERV env open reading frames found as single copies, and which promote the formation of the syncytiotrophoblast during placentation (10-13). Structurally, syncytins resemble typical retroviral env glycoproteins produced by cleavage of a precursor polypeptide into two mature proteins that associate as homotrimers. A surface subunit serves for receptor recognition and a transmembrane subunit bears a fusion peptide and an immuno-suppressive domain (14). Various syncytin genes have been identified in the genomes of all mammalian species examined, resulting from independent gene captures (13). In the human genome, two syncytin genes ERVW-1 (syncytin

1 or Syn1) and ERVFRD-1 (syncytin 2 or Syn2) have entered the primate lineage between 25-40 million years ago. They interact respectively with membrane receptors identified as the neutral amino acid transporter ASCT-2 (SLC1A5 gene) and ASCT-1 (SLC1A4 gene) for Syn1, and the phospholipid transporter/symporter MFSD-2A for Syn-2 (15, 16) (17). In mice, syncytin-A (SynA) and syncytin-B (SynB) which are phylogenetically unrelated to human Syn1 and Syn2 have entered the Muridae lineage more than 20 million years ago. Murine syncytins are also fusogenic, highly expressed in placenta (11) and required for its development, SynA being critically-required to maintain gestation (18). Recently, Ly6e, a GPI-anchored membrane protein was identified as the receptor for SynA (19) while the receptor for SynB remains unknown. Outside of the placenta, syncytins also contribute to other important membrane fusion processes as they are up-regulated in regenerating skeletal muscle after strong exercise (20) and SynB promotes myoblast fusion and muscle formation, contributing to the male muscle sexual dimorphism in mice (21). SynB also contributes to the formation of multinucleated osteoclasts without being essential for bone homeostasis (22). Some syncytins are endowed with immunosuppressive properties which are linked to immuno-suppressive domain motifs (23) but these immunosuppressive mechanisms are not well known and not as conserved as the fusogenic capacity of syncytins.

Syncytins have not yet been practically employed to pseudotype gene transfer vectors. Syn1-pseudotyped recombinant HIV-derived LV have been reported, but titers were low and further reduced by concentration, freezing and thawing rendering the preparations useless (24). A deletion of the R intracytoplasmic region increased the fusion efficiency and infectious titers but this was not practically useful (15). Syn2 could pseudotype SIV, HIV or MLV vectors but very low titers also precluded functional studies (25). Yet, syncytins remain attractive cellular genes for LV pseudotype as they may facilitate *in vivo* use. This prompted us to investigate the potential of human Syn1 and Syn2 as well as murine SynA and SynB to pseudotype LV. To optimize transduction, we used Vectofusin-1 (VF1), a peptidic transduction additive identified in our laboratory. VF1 is a short histidine-rich amphipathic peptide known to enhance the infectivity of lentiviral or gamma-retroviral vectors pseudotyped with various retroviral envelope glycoproteins, for instance Gibbon ape leukemia virus, the feline endogenous virus RD114 or baboon endogenous virus (BaEV) glycoproteins (26-28). VF1 enhances adhesion of LV to target cells, aggregates and pulls-down particules towards cells and promotes virus:cell membrane fusion. Here, the use of VF1 significantly enhanced syncytin-mediated transduction revealing the cellular tropism of syncytins for human or murine primary B lymphocytes. LV pseudotyped with SynA could also be used *in vivo* and induced less antibody immune responses than LV-VSVG.

Results

Syncytin-pseudotyped LVs are infectious in the presence of VF1 and demonstrate cell-selective infectivity.

To explore the use of human or murine syncytins as LV pseudotype, we transiently transfected the full-length native cDNAs of Syn1, Syn2, SynA or SynB in 293T cells to produce recombinant particles with each of these envelopes (LV-Syn1, 2, A, B). In parallel LV-VSVG was produced to serve as a comparative control. In the conditions defined and following optimization of plasmid amounts (data not shown), it was possible to produce stable and infectious particles pseudotyped by either of the 4 syncytins (Table 1). Such LV-Syn particles were successfully concentrated by ultracentrifugation similarly to LV-VSVG (29). While LV-VSVG batches can be generated by pooling 2 consecutive harvests from the same producing cells 24 hours apart, only 1 harvest was used to produce LV-Syn because syncytin-transfected 293 T cells started to fuse after 24 hours, reducing viral titers (data not shown). The concentrated LV-Syn vectors were cryopreserved at -80°C and the particles were stable for several months (data not shown). Regardless of the syncytin used, LV-Syn had similar physical titers ranging from 4.8 to 7.2 E+05 ng p24/mL and 3.5 to 4.7 E+11 physical particles (pp)/mL using a particle counter (Table 1). LV-Syn physical titers were similar to those of LV-VSVG indicating that syncytins enable efficient pseudotyping in the rHIV lentiviral system.

Infectious properties of LV-Syn were demonstrated with several transgenes including GFP or truncated NGFR and with the use of the VF1 transduction additive (Figure 1 A-C). Initially we tested the human BeWo choriocarcinoma cell line known to express both the ASCT2 and MFSD2a receptors of Syn1 and Syn2 (17). Little transduction was obtained by vectors used alone or in the presence of cationic agents such as protamine sulfate (PS) or polybrene (PB), two agents that are commonly used to facilitate LV cellular entry (Supplementary Figure S1A). However, BeWo cell transduction was markedly enhanced by adding VF1 (Supplementary Figure S1A), prompting a systematic testing of this peptide on various cell lines. In the presence of VF1, human 293T cells were transduced efficiently by human LV-Syn vectors (Figure 1A) resulting in vector dose-dependent transgene expression, stable expression over time well-correlated to proviral integration (Supplementary Figures S1 B-E). Murine A20.IIa lymphoma cells were transduced very efficiently by murine syncytins in the presence of VF1 (Figure 1B). However, VF1 did not have a universal effect. For instance, murine syncytin-pseudotyped LVs did not transduce 293T cells even in the presence of VF1 (Figure 1C), therefore only human syncytin-pseudotyped LVs could be titered on 293T cells. The effects of syncytins were not species-restricted (Figure 1C). Cells lines such as 293T cells or Jurkat T cells were transduced by some but not all of the LV-Syn, while others could not be transduced

by any of the human or murine LV-Syn tested. Refractory cells included human HCT116 cells which are routinely used in our laboratory for the titration of LV-VSVG (29), murine C2C12 myoblasts or NIH3T3 murine fibroblasts. On the contrary, A20.IIa murine lymphoma cells were readily transduced by all of the LV-Syn tested (Figure 1C). Raji B cells were also transduced although not as efficiently as A20.IIa cells, but FACS-sorted transgene-positive Raji cells continued to stably express the transgene and displayed vector integration for at least 49 days of continuous *in vitro* culture (data not shown). Since A20.IIa cells enabled the highest levels of infection by all LV-Syn tested and were also permissive to LV-VSVG, these cells were chosen to establish an infectious genome (IG) titration by qPCR. When compared, these titers in IG/mL on A20.a cells were similar as those done as TU/mL by FACS on 293T cells (data not shown). Human or murine syncytin-pseudotyped LV were found to have comparable infectious titers, ranging from 4.4 to 11 E+06 IG/mL (Table 1). In the conditions used for production, LV-VSVG batches titered 2 to 5 times higher than LV-Syn batches. Thus, LV can be efficiently pseudotyped with human or murine syncytins and the particles are functionally infectious in the presence of an adjuvant.

LV-Syn1 and LV-Syn2 vectors efficiently transduce human peripheral blood B cells.

Positive results on lymphoid cell lines led us to evaluate the transduction of primary blood lymphocytes by LV-Syn. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were infected by LV-Syn1 or LV-Syn2 vectors either immediately after cellular isolation, or following a short culture in the presence of IL-7 aiming to maintain the viability of naive lymphocytes overnight (schema in Supplementary Figure S2A). The total CD45+ nucleated cell population showed transgene expression when VF1 was added and IL-7 pre-activation increased these levels to about 13% and 5% respectively with LV-Syn1 or LV-Syn2 (Supplementary Table S1). However, among these cells, the small subsets of CD19+ B lymphocytes and of CD11c+ cells expressed high levels of transgene whereas only a fraction of the more abundant CD3+ T cells were marked (Figure 2-top panels, and Table 2). An average of 59% and 44% of CD19+ cells were transduced by LV-Syn1 or LV-Syn2 respectively following IL-7 pre-activation and in the presence of VF1. Such levels were at least as high or even higher than those obtained with high concentrations of LV-VSVG (Table 2). In contrast, peripheral blood T cell marking were not consistent from experiment to experiment but were low (Figure 2 and Table 2). Without prior activation, almost no transduction of T cells is observed.

Since it was possible to transduce quiescent non-activated CD19+ cells, further investigation of CD19+ cell subsets (30) was undertaken using a FACS gating strategy shown in Supplementary Figure S2B. Both naive and memory B cell subsets were effectively transduced

with the human syncytin-pseudotyped vectors in the presence of VF1, regardless of prior activation (Figure 2 – bottom panels). Naive CD19⁺ CD27⁻ IgD⁺ cells (representing 50-70% of the CD19⁺ B cell population); memory non-switched CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺ cells (15-20% of the population); memory switched CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻ IgM⁻ cells (2-5% of the population); memory switched IgM only CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻ IgM⁺ cells (2-5% of the population) and plasmablasts CD19⁺ CD27^{hi} (1-2% of the population) were transduced efficiently in the absence of prior activation and more effectively than LV-VSVG suggesting a specific tropism of the syncytins for quiescent B cells (Table 3). The transduction of CD19⁺ B cells by LV-Syn1 and LV-Syn2 were vector concentration- dependent and transgene-independent (Figure 2B). High concentrations of vector enabled the transduction of almost all peripheral blood CD19⁺ cells to express either GFP or NGFR, thereby providing an effective system to express heterologous proteins in these cells.

Transduction with syncytin-pseudotyped vectors did not appear to affect B cell division and activation. Resting human B cells transduced or not with LV-Syn1 or LV-Syn2 proliferated moderately in response to IL-21 alone and more extensively in response to IL21+CD40L as expected (31). Transgene-expressing CD19⁺ cells proliferated as much as the non-transduced cells (Figure 2C) (Table 4). Transduced cells were able to mature into plasmablasts antibody secreting cells expressing high levels of CD38, CD27 and membrane IgG (data not shown). The proportion of plasmablasts was similar in transduced and non-transduced B cells indicating that exposure to LV-Syn vectors did not prevent cellular activation towards terminal differentiation (Table 4).

Human CD19⁺ B cells could also be transduced with either of the murine syncytin-pseudotyped LV, proliferated robustly in response to IL21+CD40L for 7days and expressed the transgene (Figure 2D). Both of the murine syncytins could mediate the transduction of human B cells, but based on transgene levels and integrated vector copies, syncytin B seemed to be more efficient than syncytin A, although additional experiments are needed for confirmation.

Syncytins fail to mediate transduction of CD34⁺ cells.

Hematopoietic stem and progenitor CD34⁺ cells express ASCT2, a receptor for the RD114 feline endogenous virus or for the baboon endogenous virus BaEV, and also express ASCT1 which is an auxiliary receptor for BaEV (32)(33). Consequently, CD34⁺ cells are efficiently transduced with LV that are pseudotyped by either RD114 or BaEV envelope glycoproteins (34), particularly in the presence of VF1 (35)(36). Since syncytin 1 also uses ASCT1 and

ASCT2 receptors for cell entry (15), it was expected that CD34+ cells would be transduced by LV-Syn1 in the presence of VF1. This was not the case, even though we used conditions previously tested in our laboratory (29) (26) and had 29±15% of cells expressing the transgene (n=9 donors) after one infection cycle with a LV-VSVG coding for GFP. LV-Syn1 in the presence of VF1 only led to 3±7% cell marking (n=8 donors). Practically no marking was obtained in the absence of VF1 (not shown). LV-Syn2 also failed to transduce CD34+ cells, achieving 0.1±0 marking (n=2 donors) in the presence or absence of VF1. The concentrations of vectors tested in these experiments were the same as in Figure 2, therefore contrasting the poor transduction of CD34+ cells with the efficient transduction of B and myeloid cells.

Transduction of murine B cells in vitro and in vivo.

Murine syncytin-pseudotyped LV, like their human counterparts, also transduced murine primary B cells *in vitro*. Without prior activation, spleen cells from C57Bl/6 mice were infected with either LV-SynA or LV-SynB in the presence of VF1 and high levels of transduction were obtained in CD19+B220+ cells after 4 days of culture, whereas CD3+ T cells were only transduced at moderate levels (Figure 3A) (gating strategy in supplementary Figure S3A). Transduction was confirmed by the detection of vector copies in the cells and the 2 murine syncytins had comparable effects (Figure 3B). Murine bone marrow (BM) cells were also transduced with LV-SynA or LV-SynB in the presence of VF1. After 4 days of culture, different stages of B cell maturation (pre-pro B cells, pro-B cells, pre-B cells and mature B cells) defined by differential expression of CD19, B220, CD43, CD24 (gating strategy shown in Supplementary Figure S3B) were transduced with similar efficiency by the 2 murine syncytins (Figure 3C). Transduction of murine BM cells was confirmed by integrated vector copies per cell (Figure 3D), although in these short-term experiments, some level of pseudo-transduction cannot be excluded.

The transduction of splenic B cells by LV-Syn vectors was confirmed *in vivo* in mice and over longer periods of time than *in vitro* studies. A single intravenous injection to mice of 5E+05 IG of LV-SynA expressing luciferase achieved stable gene expression in the spleen as visualized by a bioluminescence signal 3 weeks post-infusion (Figure 4A-B). The bioluminescent signal is significantly above background 7 days post infusion of LV-SynA and remains stable over time thereafter (Figure 4B). The transgene signal obtained after LV-SynA injection was not as high as that of LV-VSVG but it was notably more selective in terms of biodistribution, as it was not found in the liver contrary to VSVG (Figure 4A-B). The *in vivo* transduction of spleen by LV-SynA was confirmed by the detection of vector copies in whole spleen cells, 3 weeks post-infusion of the vector (Figure 4C). The levels were low but similar to those obtained following

LV-VSVG injections. To ascertain that B cells were transduced, we sorted spleen CD19+ cells by FACS 3 weeks post-infusion of vector (purity > 93%). The presence of integrated vector could be observed by PCR in such purified CD19+ B cells prepared from different mice (Figure 4D), although the levels were too low to obtain reliable quantification. B cell transduction *in vivo* by LV-SynA was confirmed by immunohistological analysis of spleens indicating that follicular B220+ cells expressed the luciferase transgene (Figure 4E). It appears that cells other than B220+ cells are transduced *in vivo* as well, notably in the T cell area of the germinal centers, in coherence with *in vitro* results.

Expression of the syncytin receptors on B cells.

Possible interactions between B cells and syncytins have not yet been reported prompting us to search for the presence of syncytin receptors on human and murine B cells. ASCT2 and MFSD2a which are respectively the entry receptors for syncytin-1 and syncytin-2 (15, 17) were readily detected on CD19+ human blood B cells using indirect immunofluorescence and flow cytometry (Figure 5A). These receptors were also detected on CD11c+ dendritic/myeloid cells and at lower levels on CD3+ T cells as previously reported by others (37). Approximately 50% of blood CD19+ cells and of CD11c+ cells expressed detectable levels of ASCT2 and of MSFD2A whereas only about 10% of CD3+ T cells were positive (Figure 5B). The differential expression of these receptors in blood cell subsets was confirmed by qRT-PCR which confirmed mRNA expression in CD19+ B cells and the highest levels in CD11c+ cells (Figure 5C). Expression of ASCT2 and MFSD2a was also found on 293T cells whereas it was at a much lower level of HCT116 cells providing a likely explanation for their lack of transduction with the human LV-Syn vectors (Supplementary Figure S4). The expression of ASCT1 was not examined.

The receptor for murine syncytin A was recently reported as Ly6e (19) and the receptor for the murine syncytin B has still not been identified. In the absence of antibodies suitable for flow cytometry, we used qRT-PCR to demonstrate higher expression of Ly6e mRNA in murine spleen sorted CD19+ B cells, whereas the CD19- cell population expressed low levels of mRNA (Figure 5 D). Equivalent levels of Ly6e mRNA were found in primary CD19+B cells and in the A20.IIa cell line. These results are coherent with the ability to transduce these cells with syncytin A-pseudotyped LV.

Lower immune responses induced by syncytin-pseudotyped vectors in vivo.

The administration of viral gene transfer vectors *in vivo* can induce complex adaptive immune responses dominated by immune recognition of the viral components of vectors and in some cases, by a response against the transgene product. The intravenous administration of LV-VSVG to mice is known to immunize against the transgene (5) linked in part to the interaction of the LV-VSVG particles with professional phagocytes in the liver (7). The intrinsic immunogenicity of LV is less known. We found that a single intravenous injection of LV-VSVG to mice induced robust antibody responses against the p24 capsid in mice (Figure 6). Replacing the viral glycoproteins of the envelope by syncytin A which is an endogenous cellular protein in mice, induced much lower levels of antibodies against p24 compared to LV-VSVG for the same amount of particles injected.

Discussion

This paper shows for the first time that human and murine primary B cells functionally interact with syncytins because B cells are transduced efficiently by syncytin-pseudotyped LVs and B cells express known syncytin cellular receptors. Human B cells express high levels of ASCT2 and MFSD2a, receptors respectively for syncytin-1 and syncytin-2 (16, 17). Murine B cells express mLy6e mRNA, the recently-identified receptor for murine syncytin A (19). Previous reports in the literature showed that cultured human myeloid dendritic cells, and to a lesser extent T cells, expressed ASCT2 and MFSD2a (37) but B cells had not been examined in that study. We observed similar levels of ASCT2 and MFSD2a receptors in B cells and CD11c+ dendritic cells and accordingly, both of these cell subsets could be transduced at high levels with either of the LV-Syn1 or LV-Syn2 vectors. At this stage, we describe a functional interaction between syncytins and B cells but cannot exclude that other receptors or accessory molecules are involved in B cells:syncytin interactions. Nevertheless this offers novel possibilities for gene transfer into B cells.

These findings shed a novel light on the interactions of syncytins with the immune system and on the interactions between endogenous retroviral glycoproteins and B cells. Syncytins are involved in somatic cell fusion notably the formation of the syncytiotrophoblast layer in the placenta (13), myoblast fusion during skeletal muscle regeneration (20, 21) and the formation of multinucleated osteoclasts (22). While it is not clear how B cells relate to somatic cell:cell fusion processes, B cells may play a role in another function of syncytins which is their immunoregulatory effects. Retroviral envelopes carry an immunosuppressive peptide sequence in their transmembrane chain and this motif is also found in syncytins (23). The

mechanism of action of this peptide sequence remains unclear. It has been postulated to involve antigen-presenting cells by modulating dendritic cell-mediated T cell activation (37) or could directed reduce the activation of T cells as shown by peptide-treated T cell lines (38). Our results suggest that B cells could potentially be involved and further studies are warranted on this aspect. Physiologically, B cells have the possibility to interact with syncytin-expressing cells or with syncytin-bearing particles at least during pregnancy. Syncytins are found in the syncytiotrophoblast layer of placenta that mediates immune tolerance during pregnancy by separating the fetal and maternal blood circulation. Additionally, placental exosomes bearing syncytins are known to circulate and could mediate long-range interactions between syncytins and B cells. Whether or not syncytins modulate B cell function is not clearly obvious as proliferation and differentiation of human B cells was not affected, but more subtle mechanisms could be involved and deserve further investigation. Apart from a putative immunomodulatory effect on immune cells, syncytins could simply but very effectively render the LV particles invisible from immune recognition by endogenizing the envelope. Our results confirm that *in vivo* administration of LV-VSVG can be immunogenic and show for the first time that a robust humoral immune responses is induced against p24 a capsid component of LV following systemic administration to immunocompetent mice. Antibodies to the capsid could prevent further administration of the vector or may exacerbate immune rejection of transduced cells and could contribute to the loss of transgene expression following the use of LV-VSVG, as observed by others (7). We also confirm the strong tropism of LV-VSVG to liver already reported (5, 7) and show that in striking contrast, LV-SynA particles do not target the liver. Thus, as postulated by others, the envelope glycoproteins strongly determine tissue tropism and immune recognition of the particles and our results confirm that such glycoproteins can be engineered to change these interactions in a significant manner. Thus, further study is warranted to understand the precise mechanisms involved in syncytin-mediated tolerance to vector administration and B cell interactions. Interestingly, all syncytins studied as LV pseudotype have demonstrated an ability to transduce B cells and this is also the case for another endogenous envelope, the BaEV glycoprotein which allows high levels of gene transfer into activated or resting human B cells, at similar levels as observed with syncytins (39). The BaEV glycoprotein shares the same cellular entry receptors ASCT1 and ASCT2 as the human syncytin-1 (15) therefore our results showing ASCT2 expression on human B cells provides an explanation for the B cell tropism of BaEV. Other similarities between BaEV and syncytins include the need for a transduction additive when using these glycoproteins as LV pseudotypes (36). However, contrary to BaEV, syncytins do not mediate efficient T cell transduction or CD34+ cell transduction (40). Thus, different levels of receptors or other mechanisms such as entry or post-entry restriction steps may explain the differences between BaEV and syncytin cellular tropism.

Whereas B cells are essential players in the immune system, specific tools are required for efficient gene transfer in primary B cells either for cellular studies or to develop therapeutic approaches. The commonly-used VSVG-pseudotyped vectors are inefficient due to the lack of the LDL receptor expression on resting B cells (4). Besides natural pseudotypes such as BaEV (4), B cell-targeting LV systems have been engineered and were reviewed recently (8). Human B cells can be transduced by LV displaying Edmonston strain measles virus (MV) glycoproteins using either the native H/F capacity (41) or engineering them with mutations and a single chain Fv (ScFv) targeting hCD20 (42) or hCD19 (43). These MV-based systems enable about 20-40% transduction of activated peripheral blood human B cells, including malignant activated cells. Thus native syncytin glycoproteins are at least as efficient as MV-LV being capable of transducing almost all peripheral blood B cells with high concentrations of syncytin-LV. However, syncytins are distinct from MV as they did not efficiently mediate the transduction of established EBV-transformed B-LCL cell lines or of B cells during EBV transformation even though a few stably transduced cells could be obtained (not shown). Another unique feature of syncytins is their cross-species ability, since human syncytins can enable gene transfer into murine cells and murine syncytins enable gene transfer into human B cells, which is not the case for other non-VSVG envelopes such as GaLV, BaEV, RD114 or engineered MV-LV. Cross-species ability is advantageous in experimental systems especially for preclinical studies in mice.

Our results show an efficient transduction of B cells *in vitro* and *in vivo* but we do not claim that syncytins provide B-cell-restricted tropism. Several tissues are known to express receptors for syncytins but have not been studied yet. Placental layers express very high levels of MFSD2a (17). MFSD2a is also found and specifically localized in the microvessels of the murine blood brain barrier where it plays an essential role during brain development (44) but it is not known if these tissues would be targeted by vectors for gene delivery. Thus, the display of various human or murine syncytins on gene transfer vectors provides an interesting new tool for *in vivo* studies and possibly to envision new therapeutic developments but in-depth biodistribution studies should be conducted to determine the specificity of gene delivery with these tools. Further optimization of vector titers will also be needed for efficient gene delivery *in vivo*. Certainly these tools could offer an interesting concept to avoid immune recognition which is currently a main limitation of gene therapy.

The transduction additive VF1 revealed the infectivity of syncytin vectors which was inapparent *in vitro* without this agent, but VF1 was not required *in vivo* and this difference sheds some light on the mode of action of VF1. This peptide is a short histidine-rich, amphipathic peptide derived from the LAH4 family of DNA transfection agents (26, 28) (27). This family of peptides is able to bind to nucleic acids and to disrupt endosomal membranes when activated at low pH

enabling them to deliver their cargo efficiently and with low associated toxicity (45). Within this family, VF1 is a specific derivative with lysine residues at the N-terminal extremity containing leucine hydrophobic residues and with a specific hydrophilic angle formed by histidine residues that are important for its activity. VF1 is an efficient retroviral and lentiviral transduction enhancer with pseudotypes such as GALV, GALV-TR, RD114-TR or MLV-A as well as with VSVG which all use receptor-mediated endosomal entry. VF1 enhances LV transduction of target cells by enhancing the adhesion and fusion steps (46) and by promoting viral pull-down following formation of nanofibrils in medium (47). It is therefore interesting that VF1 also promotes the transduction of target cells mediated by syncytins considering the high fusogenic activity of these proteins, which we observed during production and which is not observed to this level with other glycoprotein LV pseudotypes. Thus, it is likely that VF1 mainly enhances transduction through the facilitation of vector-cell contact. This would explain why the addition of VF1 is not necessary *in vivo*, as contacts between syncytin-LV and target cells may occur in more restricted spatial environment as in culture dishes.

Altogether, our findings contribute to a better understanding of host:vector interactions with possible impact in immunology and gene therapy. The concept of endogenizing the surface of the gene transfer particles with cellular fusion proteins instead of viral glycoproteins could facilitate the use of LV gene transfer *in vivo*. Our findings also opens possible new applications to use syncytins to target B cells in immunotherapy of cancer, transplantation, genetic or infectious diseases and in biotechnology engineering.

Materials and Methods

Ethical and regulatory aspects

Studies in mice and with human cells were conducted following international ethical guidelines and were authorized by the French Ministry of Higher Education Research and Innovation with: approval for studies in mice APAFIS#3744-2016012210018523v2 - ethical committee 51; agreement n° 3664 for the use of GMO and declaration DC-2018-3276 for the use of human samples for research.

Animals

C57BL/6 mice and C57BL/6 albinos (B6N-Tyrc-Brd/BrdCrCl) 6 week old mice (Charles River, Italy) were housed in SPF conditions at the CERFE facility (Evry) operated by Charles River.

For injections, 100µL volume was used for intravenous (IV) (tail vein) or intraperitoneal (IP) routes and mice were anesthetized with ketamine (120mg/kg) and xylazine (6mg/kg).

Human and murine cells

Human blood of healthy volunteers was purchased from the french blood bank (EFS, Evry, France). Umbilical cord blood was obtained with consent from uncomplicated birth at the Centre Hospitalier Sud-Francilien (CHSF) in Evry. Human embryonic kidney 293T cells (Genethon), human colorectal carcinoma HCT116 cells (CCL-247; ATCC, Manassas, VA), murine embryonic fibroblast NIH/3T3 cells (CRL-1658, ATCC) and murine myoblasts C2C12 (CRL-1772, ATCC) were cultured at 37°C , 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with Glutamax and 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Life Technologies, St-Aubin, France). Human choriocarcinoma BeWO cells (CCL-98; ATCC) were cultured in Ham's F12K medium (Life technologies) supplemented with 10% of FCS. Raji cells, Jurkat cells were cultured in XVivo 20 medium (Lonza, Levallois-Perret, France). A20.IIa murine lymphoma cells (cellosaurus A20.IIa (RRID:CVCL_0J27), kindly provided by S. Fisson) were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) supplemented with 10% of heat inactivated FCS, 1% of Glutamax, 1mM of sodium pyruvate (Life Technologies) and 50µM of β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich).

Cloning of syncytin-expressing plasmids

pcDNA3.1-syncytin-1, pcDNA3.1-syncytin-2, pcDNA3.1-syncytin-A, pcDNA3.1-syncytin-B plasmids were constructed by cloning synthesized DNA sequences (Gencust, Dudelage, Luxembourg) (respectively Ensembl genome browser ENST00000493463, ENSG00000244476, ENSMUSG00000085957 and ENSMUSG00000047977 transcript sequences), into a pcDNA3.1 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, California) using standard cloning techniques. Plasmids were produced with endotoxin-free reagents using DNA/RNA purification Nucleobond kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Plasmid sequences were verified by two strand sequencing.

Production and titration of vectors

Lentiviral particles pseudotyped with either syncytin-1, syncytin-2, syncytin-A or syncytin-B were produced by transient transfection of 293T cells with 4 plasmids, using calcium phosphate. Each T175 cm² flask was transfected with 14.6 µg pKLgagpol expressing the HIV-

1 gagpol gene, 5.6 µg pKRev expressing HIV-1 rev, 20µg of either one of the syncytin envelope plasmids and 22.5 µg of the gene transfer lentiviral cassette (pCCLsincPPT-PGKeGFP-WPRE expressing enhanced green fluorescent protein (GFP) under the control of the human phosphoglycerate kinase (PGK) promoter; or pRRLsincPPT-PGKdelta-NGFR-WPRE expressing a truncated form of the nerve growth factor receptor (NGFR) under the control of the human PGK promoter; or pRRLsincPPT-SFFV-LucII-WPRE expressing luciferase II under the control of the spleen focus-forming virus (SFFV) long-terminal repeat (LTR) promoter). Medium was changed the day following transfection and replaced by DMEM 4.5g/L glucose supplemented with penicillin and streptomycin and 10% FCS. After 24 hours, medium containing viral particles was collected, clarified by low speed centrifugation and filtration through 0.45µm filter, then concentrated by ultracentrifugation at 50 000g for 2h at 12°C. The pellet was resuspended in PBS, aliquoted and stored at -80°C.

VSVG-pseudotype LV were produced by transient transfection as previously described (26). Physical particle titers of VSVG- or syncytin-pseudotyped LV were determined by p24 ELISA (Alliance© HIV-1 Elisa kit, Perkin-Elmer, Villebon/Yvette, France) and by Nanoparticle Tracking Analysis with the Nanosight NS300 (Malvern Panalytical, Orsay, France). Infectious titers were determined by testing serial dilutions of vectors on A20.IIa cells in the presence of the peptide Vectofusin-1 (VF1) prepared as described (26) and used at a final concentration of 12µg/mL. After 7 days of culture, A20.IIa cells were analyzed by qPCR to measure infectious genomes (IG)/mL using standard calculations (48). In some experiments and as indicated, infectious titers of GFP-encoding vectors were also determined as transducing units (TU)/mL in 293T cells using FACS.

Culture and transduction of human peripheral blood mononuclear cells

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained by Ficoll gradient centrifugation (Eurobio, les Ulis, France) were suspended in X-VIVO 20 serum-free medium for transduction. When indicated, IL-7 (10ng/mL) (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) was added prior to transduction. Cells were infected for 6 hours with LV in the presence of VF1 (12µg/mL), then washed and X-VIVO 20 supplemented with 10% FCS and IL-7 (10 ng/mL) was added and cells were cultured for up to 7 days. To expand B cells, CD40L (2 µg/mL) and IL-21 (50 ng/mL) were added to the culture medium and cells were cultured up to 2 weeks. For proliferation studies, PBMC were labelled with 2µM CFSE (Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester) (Molecular Probes, Cambridge, UK).

Culture and transduction of murine primary cells

Red blood cell-depleted leukocytes were prepared by shredding the spleen of C57BL/6 mice on a 70µm filter in RPMI medium or from the femurs and tibias flushed with RPMI medium, followed by red cell lysis using ACK buffer. The transduction of either spleen or bone marrow cells was done by culturing 2E+05 cells in 96 wells plates in RPMI medium supplemented with 10% FCS, 1% Glutamax and 50µM of β-mercaptoethanol and adding immediately in the wells LV-SynA or LV-SynB (1E+05 IG/mL) and 12µg/mL of VF1 in a final volume of 200µL. After 6 hours, cells were collected, centrifuged (500g), the medium was changed and cells were cultured for 4 days in the same medium.

Flow cytometry (FACS)

Antibodies used are listed in supplementary table S2. Prior to adding antibodies to cells, Fc receptors were blocked with either gammaglobulin (1mg/mL) (Sigma Aldrich) for human cells or with CD16/CD32 antibodies for murine cells, during 5 min. at 4°C. Staining was done with saturating amounts of antibodies for 30 min. at 4°C in PBS with 0.1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich), cells were washed twice and 7-amino-actinomycin D (0.3 mg/mL) (Sigma-Aldrich) was added to enable dead cell exclusion. The LSRII cytometer using Diva software (BD-Biosciences) was used and data were analysed with Kaluza (Beckman-Coulter, Villepinte, France) or FlowJo v10 (BD-Biosciences) softwares.

In vivo luciferase imaging

Bioluminescence imaging of mice was started 10 min after IP injection of D-luciferin (150µg/mL) (Interchim) using a CCD camera ISO14N4191 (IVIS Lumina, Xenogen, MA, USA). A 3 min bioluminescent image was obtained using 10 cm field-of-view, binning (resolution) factor 4, 1/f stop and open filter. Regions of interest (ROIs) were defined manually (using a standard area), signal intensities were calculated using the living image 3.2 software (Xenogen) and expressed as photons per second. Background photon flux was defined from an ROI drawn over the control mice in which no vector had been administered.

Murine B cell sorting and PCR

Immediately after sacrifice of mice, one half of each spleen was perfused with collagenase IV (1mg/mL, Invitrogen) and DNase I (50µg/mL, Roche) and then incubated at 37°C 45 min to

dislodge as many cells as possible. The reaction was stopped by the addition of EDTA (100mM), cells were isolated by mechanical shredding and stained with anti-B220, anti-CD19, anti-CD3 and anti-CD11b antibodies (antibodies listed in supplementary Table S2), washed in PBS with 0.1% BSA and sorted by FACS on the MoFlo® Astrios (Beckman Coulter).

Genomic DNA was extracted from the sorted subpopulations of B cells (CD19+B220+CD3-CD11b-) and T cells (CD19-B220-CD3+CD11b-) using Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel). Provirus was amplified by 35 cycles of PCR using the PSI_F 5' and WPRE_R primers. PCR primer sequences are listed in supplementary Table S3.

Immunohistofluorescence on murine spleen

After sacrifice, one half of the spleen of each mouse was paraffine-embedded for immunohistology. Microtome sections (4µm) were saturated with PBS-BSA 5% during 30 min. at room temperature. Sections were stained with a polyclonal antibody anti-luciferase (Novus biologicals) diluted at 1/100 and an antibody anti-CD45R/B220 (BD Pharmingen) diluted at 1/20 as primary antibodies, a donkey anti-goat AlexaFluor 594 (Invitrogen) diluted at 1/1000 and a goat anti-rat AlexaFluor 488 (Invitrogen) diluted at 1/600 as secondary antibodies. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in a humidity chamber and secondary antibodies were incubated for 90 min at room temperature.

Receptor studies

In human cells, total RNA was extracted (SV total RNA isolation, Promega, Charbonnière les bains, France) from CD19+ CD3- CD11c- cells, CD3+ CD19+CD11c- cells and CD11c+ CD3- CD19- cells sorted by FACS (> 95% purity) from PBMC. Residual DNA was removed using the free DNA kit (Ambion, Courtaboeuf, France), cDNA was synthesized using random hexamers (Superscript II first strand synthesis system, Invitrogen). Real time PCR (7900HT, AB Biosystems) was used to quantify either ASCT2 or MFSD2A relative to the housekeeping gene TFIID using primers and probes listed in supplementary Table S3. The relative abundance was calculated using the formula: *relative abundance* = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ with $\Delta Ct = Ct_{gene\ of\ interest} - Ct_{housekeeping\ gene}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{calibrator}$.

RNA was extracted from murine CD19+ and CD19- spleen B cells which were separated by magnetic bead selection (Miltenyi) using the RNeasy mini kit (Qiagen). Reverse transcription was performed with random hexamers using Verso cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Real time PCR was performed using LightCycler 480 system (Roche, Basel, Switzerland) to amplify

mLy6e with primers listed in Supplementary Table S3 and Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA). Results are expressed in relative abundance to the P0 housekeeping gene.

Detection of murine anti-p24 antibodies by ELISA

Recombinant p24 (Abcam, Cambridge, U.K.) was bound to plates using high binding 96-well Nunc MaxiSorp Immunoplate (Thermo Fisher Scientific) coated 2 hours at 37 °C with 100 ng per well of p24 recombinant protein diluted at 1 µg/mL in 0.2 M carbonate/bicarbonate buffer in pH 9.5, then wells were blocked with PBS-BSA 2% for 2 h at room temperature. A mouse anti-HIV p24-specific monoclonal antibody (clone 38/8.7.47) (Abcam, Cambridge, U.K.) was used as standard and tested in parallel with serum samples diluted in assay buffer (PBS BSA 0.5%). Samples were incubated 2 hours at room temperature. After 3 washes, HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse IgG antibodies (Jackson Immuno Research, Newmarket, U.K.) (1/1000 dilution) were added, incubated 1h at room temperature and reactions were revealed by adding 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate (TMB) (BD Biosciences) and measuring OD at 450 and 570 nm (for background subtraction) (Enspire plate reader, Perkin Elmer) after blocking the reaction with H₂SO₄.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed as specified, using GraphPad Prism software (GraphPad Inc, La Jolla, CA).

Supplementary Materials

Supplementary figures:

Fig. S1: Gene transfer with LV-Syn vectors is enhanced by VF1, stable over time and vector dose-dependent.

Fig. S2: Experimental schema and gating strategy for human PBMC analyses.

Fig. S3: Experimental schema and gating strategy for murine analyses.

Fig. S4: Receptor expression on human cell lines.

Supplementary tables:

Table S1 : Transduction of PBMC with LV-Syn1 and LV-Syn2 in the presence of VF-1.

Table S2 : FACS antibody listing.

Table S3: Primer sequences.

References :

1. Naldini L, Trono D, & Verma IM (2016) Lentiviral vectors, two decades later. *Science* 353(6304):1101-1102.
2. Galy A (2017) Major Advances in the Development of Vectors for Clinical Gene Therapy of Hematopoietic Stem Cells from European Groups over the Last 25 Years. *Hum Gene Ther* 28(11):964-971.
3. June CH & Sadelain M (2018) Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med* 379(1):64-73.
4. Amirache F, et al. (2014) Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* 123(9):1422-1424.
5. Cire S, et al. (2014) Immunization of mice with lentiviral vectors targeted to MHC class II+ cells is due to preferential transduction of dendritic cells in vivo. *PLoS One* 9(7):e101644.
6. Goyvaerts C, et al. (2017) Antigen-presenting cell-targeted lentiviral vectors do not support the development of productive T-cell effector responses: implications for in vivo targeted vaccine delivery. *Gene Ther* 24(6):370-375.
7. Milani M, et al. (2019) Phagocytosis-shielded lentiviral vectors improve liver gene therapy in nonhuman primates. *Sci Transl Med* 11(493).
8. Frank AM & Buchholz CJ (2019) Surface-Engineered Lentiviral Vectors for Selective Gene Transfer into Subtypes of Lymphocytes. *Mol Ther Methods Clin Dev* 12:19-31.
9. Dewannieux M & Heidmann T (2013) Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. *Curr Opin Virol* 3(6):646-656.
10. Dupressoir A, Lavalie C, & Heidmann T (2012) From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* 33(9):663-671.
11. Dupressoir A, et al. (2005) Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3):725-730.
12. Dupressoir A, et al. (2009) Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(29):12127-12132.

13. Lavialle C, et al. (2013) Paleovirology of 'syncytins', retroviral env genes exapted for a role in placentation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1626):20120507.
14. Cheynet V, et al. (2005) Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. *J Virol* 79(9):5585-5593.
15. Lavillette D, et al. (2002) The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J Virol* 76(13):6442-6452.
16. Blond JL, et al. (2000) An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol* 74(7):3321-3329.
17. Esnault C, et al. (2008) A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(45):17532-17537.
18. Dupressoir A, et al. (2011) A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(46):E1164-1173.
19. Bacquin A, et al. (2017) A Cell Fusion-Based Screening Method Identifies Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein Ly6e as the Receptor for Mouse Endogenous Retroviral Envelope Syncytin-A. *J Virol* 91(18).
20. Frese S, et al. (2015) Long-Term Endurance Exercise in Humans Stimulates Cell Fusion of Myoblasts along with Fusogenic Endogenous Retroviral Genes In Vivo. *PLoS One* 10(7):e0132099.
21. Redelsperger F, et al. (2016) Genetic Evidence That Captured Retroviral Envelope syncytins Contribute to Myoblast Fusion and Muscle Sexual Dimorphism in Mice. *PLoS Genet* 12(9):e1006289.
22. Coudert AE, et al. (2019) Role of the captured retroviral envelope syncytin-B gene in the fusion of osteoclast and giant cell precursors and in bone resorption, analyzed ex vivo and in vivo in syncytin-B knockout mice. *Bone Rep* 11:100214.
23. Mangeney M, et al. (2007) Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51):20534-20539.
24. An DS, Xie Y, & Chen IS (2001) Envelope gene of the human endogenous retrovirus HERV-W encodes a functional retrovirus envelope. *J Virol* 75(7):3488-3489.

25. Blaise S, Ruggieri A, Dewannieux M, Cosset FL, & Heidmann T (2004) Identification of an envelope protein from the FRD family of human endogenous retroviruses (HERV-FRD) conferring infectivity and functional conservation among simians. *J Virol* 78(2):1050-1054.
26. Fenard D, et al. (2013) Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 2:e90.
27. Majdoul S, et al. (2016) Molecular Determinants of Vectofusin-1 and Its Derivatives for the Enhancement of Lentivirally Mediated Gene Transfer into Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *J Biol Chem* 291(5):2161-2169.
28. Fenard D, et al. (2013) Infectivity enhancement of different HIV-1-based lentiviral pseudotypes in presence of the cationic amphipathic peptide LAH4-L1. *J Virol Methods* 189(2):375-378.
29. Charrier S, et al. (2011) Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. *Gene Ther* 18(5):479-487.
30. Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, & Sanz I (2012) Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol* 3:302.
31. Recher M, et al. (2011) IL-21 is the primary common gamma chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. *Blood* 118(26):6824-6835.
32. Marin M, Tailor CS, Nouri A, & Kabat D (2000) Sodium-dependent neutral amino acid transporter type 1 is an auxiliary receptor for baboon endogenous retrovirus. *J Virol* 74(17):8085-8093.
33. Oburoglu L, et al. (2014) Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. *Cell Stem Cell* 15(2):169-184.
34. Girard-Gagnepain A, et al. (2014) Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood* 124(8):1221-1231.
35. Piovan C, et al. (2017) Vectofusin-1 Promotes RD114-TR-Pseudotyped Lentiviral Vector Transduction of Human HSPCs and T Lymphocytes. *Mol Ther Methods Clin Dev* 5:22-30.
36. Radek C, et al. (2019) Vectofusin-1 improves transduction of primary human cells with diverse retroviral and lentiviral pseudotypes, enabling robust, automated closed-system manufacturing. *Hum Gene Ther*.

37. Hummel J, Kammerer U, Muller N, Avota E, & Schneider-Schaulies S (2015) Human endogenous retrovirus envelope proteins target dendritic cells to suppress T-cell activation. *Eur J Immunol* 45(6):1748-1759.
38. Lokossou AG, et al. (2019) Endogenous retrovirus-encoded Syncytin-2 contributes to exosome-mediated immunosuppression of T cells. *Biol Reprod*.
39. Levy C, et al. (2016) Baboon envelope pseudotyped lentiviral vectors efficiently transduce human B cells and allow active factor IX B cell secretion in vivo in NOD/SCIDgammac(-/-) mice. *J Thromb Haemost* 14(12):2478-2492.
40. Bernadin O, et al. (2019) Baboon envelope LVs efficiently transduced human adult, fetal, and progenitor T cells and corrected SCID-X1 T-cell deficiency. *Blood Adv* 3(3):461-475.
41. Frecha C, et al. (2009) Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood* 114(15):3173-3180.
42. Funke S, et al. (2008) Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol Ther* 16(8):1427-1436.
43. Kneissl S, et al. (2013) CD19 and CD20 targeted vectors induce minimal activation of resting B lymphocytes. *PLoS One* 8(11):e79047.
44. Nguyen LN, et al. (2014) Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509(7501):503-506.
45. Kichler A, Mason AJ, Marquette A, & Bechinger B (2013) Histidine-rich cationic amphipathic peptides for plasmid DNA and siRNA delivery. *Methods Mol Biol* 948:85-103.
46. Ingrao D, Majdoul S, Seye AK, Galy A, & Fenard D (2014) Concurrent measures of fusion and transduction efficiency of primary CD34+ cells with human immunodeficiency virus 1-based lentiviral vectors reveal different effects of transduction enhancers. *Hum Gene Ther Methods* 25(1):48-56.
47. Vermeer LS, et al. (2017) Vectofusin-1, a potent peptidic enhancer of viral gene transfer forms pH-dependent alpha-helical nanofibrils, concentrating viral particles. *Acta Biomater* 64:259-268.
48. Kutner RH, Zhang XY, & Reiser J (2009) Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc* 4(4):495-505.

Acknowledgments:

We thank Dr. S. Fisson for providing A20.IIa cells and Dr. C. Poinsignon and S. Darocha for technical help. We are grateful to mothers donating cord blood and to Dr. Rigonnot and staff at the Centre Hospitalier Sud-Francilien for umbilical cord blood samples. Funding: The work has been supported by funds from AFM/Telethon to Genethon. Author contributions: YC and MF contributed equally planned and executed experiments and wrote the manuscript, KS and LM executed experiments, AG conceived and directed the study, wrote and edited the manuscript. Competing interests: There is no conflict of interest. Results presented in the paper have been filed for a patent application WO2017182607A1. Data and materials availability: Materials are available upon request and following signature of a MTA.

Figures:

Fig. 1

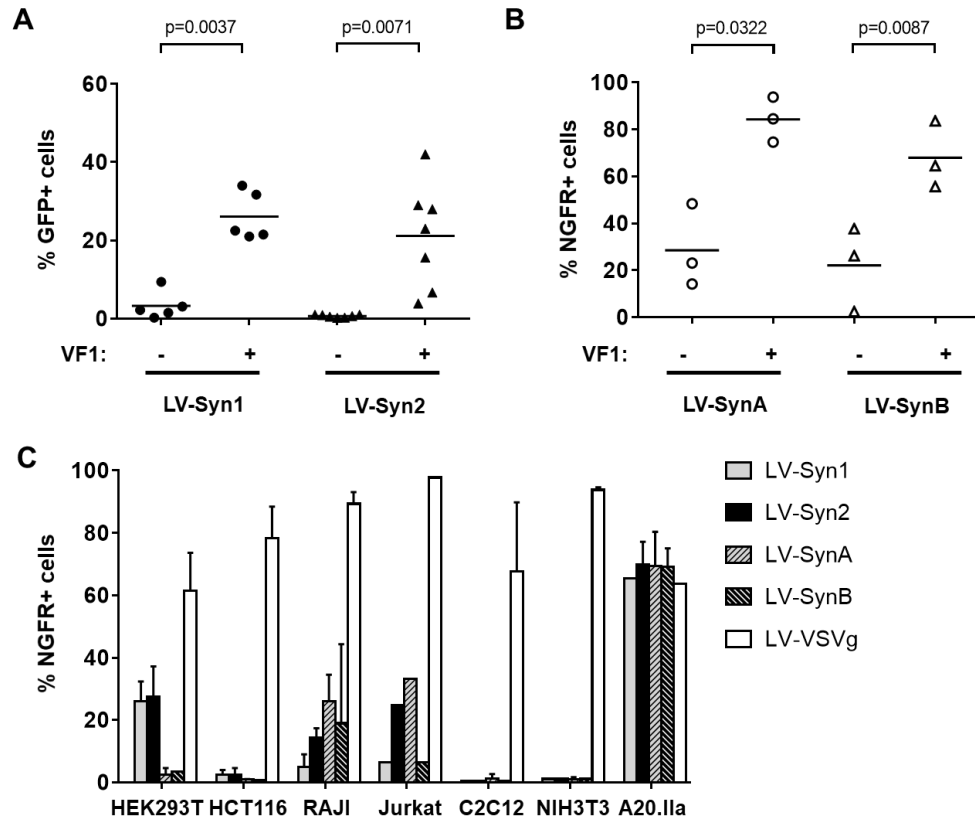


Fig. 1: Gene transfer into various cell lines with syncytin-pseudotyped vectors and VF1

(A). Human 293T cells were infected with 1E+05 TU/mL of LV-Syn1 or LV-Syn2 encoding GFP in the presence or not of VF1. GFP expression was measured after 3 days by FACS. The enhancing effect of VF1 was statistically significant as shown in 5-7 experiments using a paired t test. (B). Murine A20.IIa cells were infected with 1E+05 IG/mL LV-SynA or LV-SynB encoding a truncated NGFR, in the presence or not of VF1. NGFR expression was measured after 3 days by FACS. The enhancing effect of VF1 was statistically significant as shown in 3 experiments using a paired t test. (C). Various human (HEK293T, HCT116, RAJI, Jurkat) or murine (C2C12, NIH3T3, A20.IIa) cell lines were infected with 1E+05 IG/mL of the indicated vectors encoding NGFR in the presence of VF1. NGFR was measured after 7 days by FACS. Results are representative of 3 separate experiments.

Fig. 2

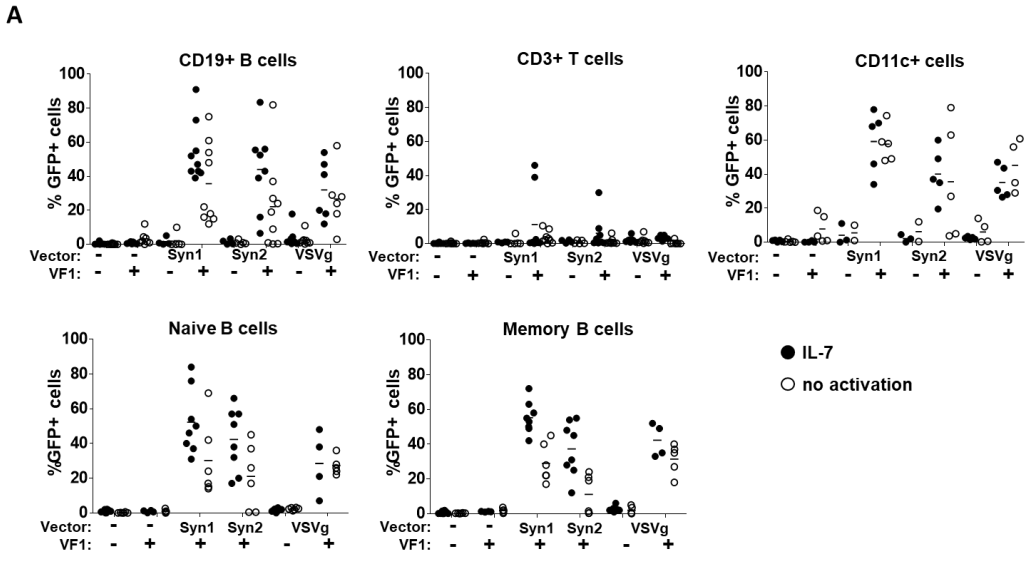


Fig. 2

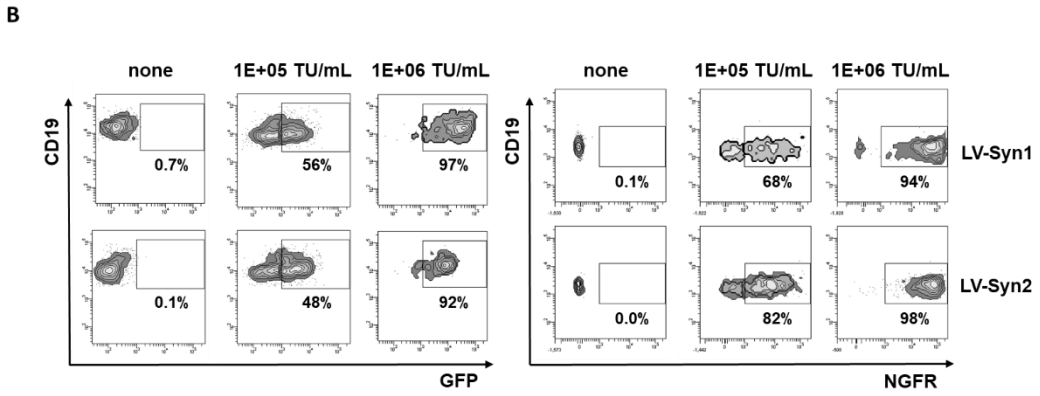


Fig. 2

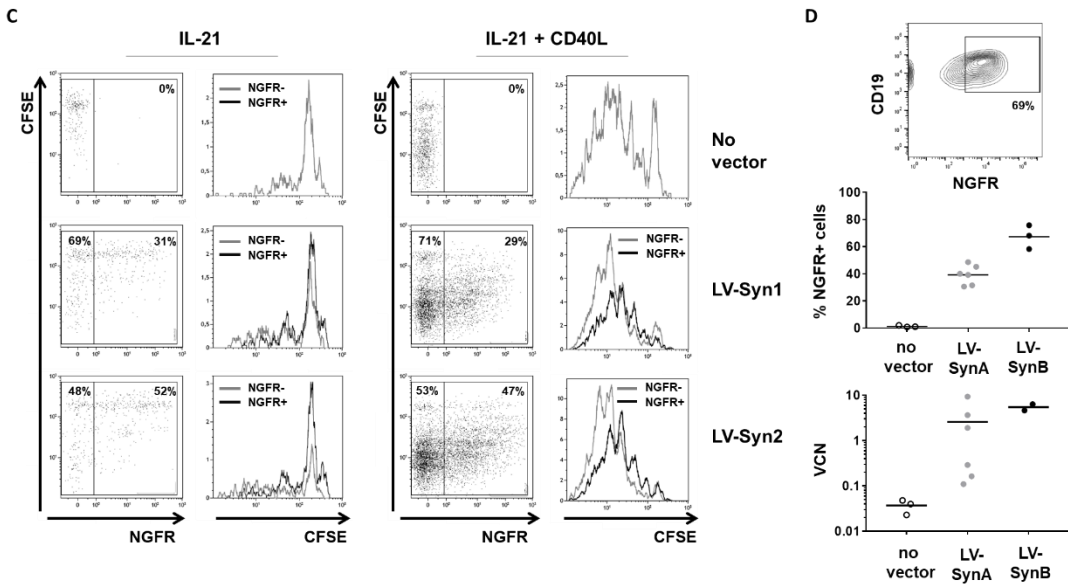


Fig. 2: Transduction of primary blood cell subsets with syncytin-pseudotyped vectors

(A). Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (4 to 9 separate blood donors) were infected with GFP-encoding LV-Syn1 or LV-Syn2 vectors ($1E+05$ TU/mL) in the absence or presence of VF1 and either immediately after isolation of the cells (no activation – open symbols) or following an overnight culture of cells with IL-7 (10 ng/mL)(closed symbols). After 3 days, GFP was measured by FACS in different subsets of live cells (CD3+ CD19- CD11c- T cells; CD3- CD19+ CD11c- B cells; CD3- CD19- CD11c+ myeloid dendritic cells), naive (CD27-) or memory (CD27+) B cell subsets. (B). Representative results of 3 PBMC donors incubated with IL-7 overnight, then transduced with NGFR-encoding LV-Syn1 or LV-Syn2 at concentrations $1E+05$ and $1E+06$ TU/mL in the presence of VF1. Transgene expression was measured by FACS after 3 days. (C). PBMCs were labeled with $2\mu\text{M}$ CFSE, transduced with LV-Syn1 or LV-Syn2 vectors encoding NGFR, and cultured in the absence or presence of CD40 Ligand (CD40L) ($2\mu\text{g/mL}$) and/or IL-21 (50ng/mL). After 3 days culture, B cell transduction (expression of NGFR on CD19+ cells) and B cell proliferation (CFSE dilution) were determined by flow cytometry. Results representative of 6 PBMC donors tested in 2 separate experiments (3 PBMC donors each). (D). CD19+ cells were sorted from PBMC (3 donors) and were transduced with LV-SynA or LV-SynB encoding NGFR ($1E+05$ IG/mL) and transgene expression was analyzed by FACS after 7 days.

Fig. 3

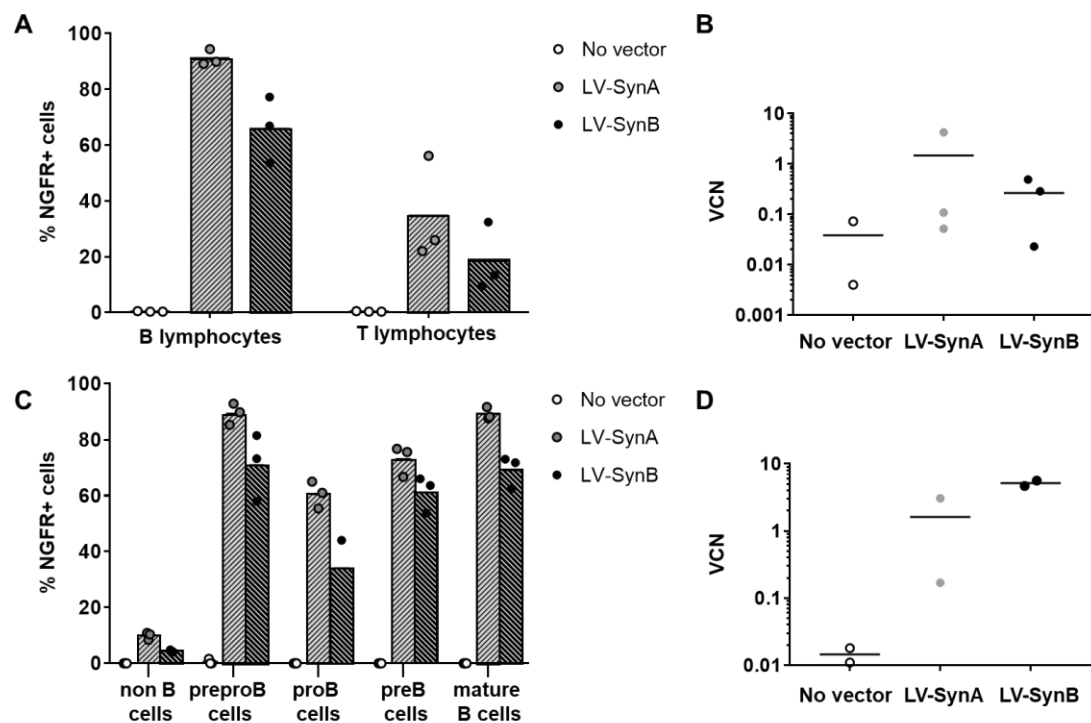
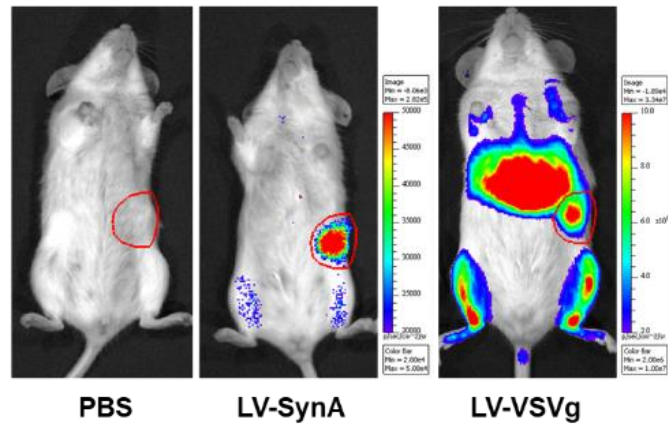


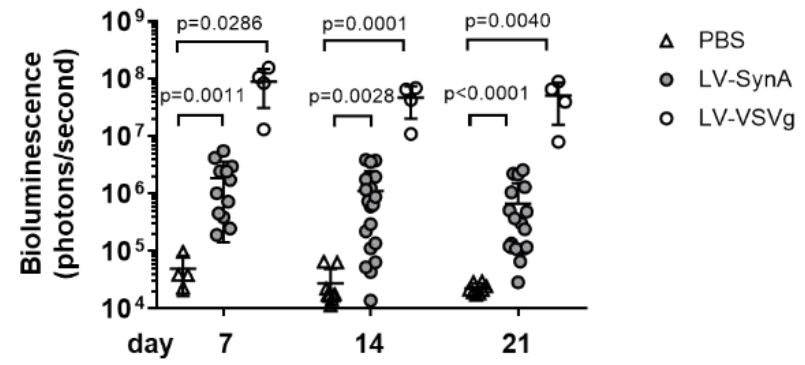
Fig. 3: Transduction of primary B cells from spleen or from bone marrow with syncytin-pseudotyped vectors in mice

(A-D). Spleen cells (A-B) or bone marrow cells (C-D) from C57Bl/6 mice (n=3 mice) were infected with 1E+05 IG/mL LV-SynA or LV-SynB encoding NGFR in the presence of VF1 without prior activation and cells were cultured for 4 days and analyzed. (A) NGFR expression was measured by FACS in live spleen B cells (7AAD-CD19+B220+) and in live spleen T cells (7AAD-CD19-B220-CD3+). (B) Vector copy number in total spleen cells was determined by qPCR (B). (C) NGFR expression was measured by FACS in different subsets of bone marrow live cells (non B cells (7AAD-CD19-B220-), pre-pro-B cells (7AAD-CD19-B220+CD43+CD24-), pro-B cells (7AAD-CD19+B220+CD43+CD24-), pre-B cells (7AAD-CD19+B220+CD43lowCD24+) and mature B cells (7AAD-CD19+B220+CD43-CD24-)). (D) Vector copy number on total bone marrow cells was determined by qPCR.

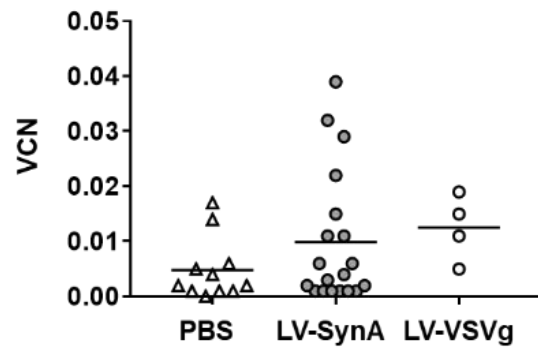
Fig. 4
A



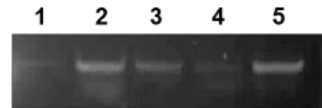
B



C



D



E

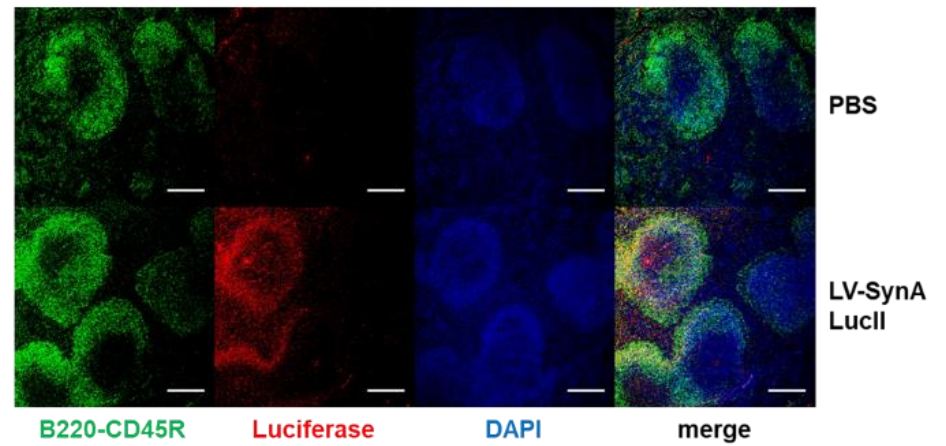


Fig. 4: *In vivo* gene transfer into the spleen and into B cells following intravenous administration of LV-SynA vector

6 week old C57Bl/6 albinos mice were injected intravenously with 5×10^5 IG per mouse of LV-SynA or LV-VSVG vectors encoding luciferase (LucII). The bioluminescent signal was measured over time and after 3 weeks, mice were sacrificed to confirm transduction and B cell gene transfer. (A) Representative results of bioluminescence in mice analyzed at 21 days. (11 mice tested in the PBS group, 18 mice injected with LV-SynA and 4 mice injected with LV-VSVG). The signals shown in the spleen of the PBS mouse is 2.3×10^4 photons/second, in LV-SynA-injected mice 6.7×10^5 photons/sec and in LV-VSVG-injected mice 5.1×10^7 photons/second. (B) Bioluminescence was quantified in photon/second in the different groups over time. Each dot corresponds to one mouse analyzed. The signal in LV-SynA group was significant from the PBS. Statistics were calculated using a Mann-Whitney test. (C) Half of the spleen was used to determine vector copy number by qPCR and results for each mouse in the different groups are represented by a dot. (D) Half of the spleen was paraffin-embedded and sectioned to perform immunological staining with anti-B220 (CD45R) anti-luciferase and DAPI. Results of representative mice injected with PBS (top panel) or LV-SynA encoding LucII observed on the confocal microscope SP8 (Leica, Wetzlar, Germany) using the 10X objective (bottom panel). The bar represents 500 μm .

Fig. 5

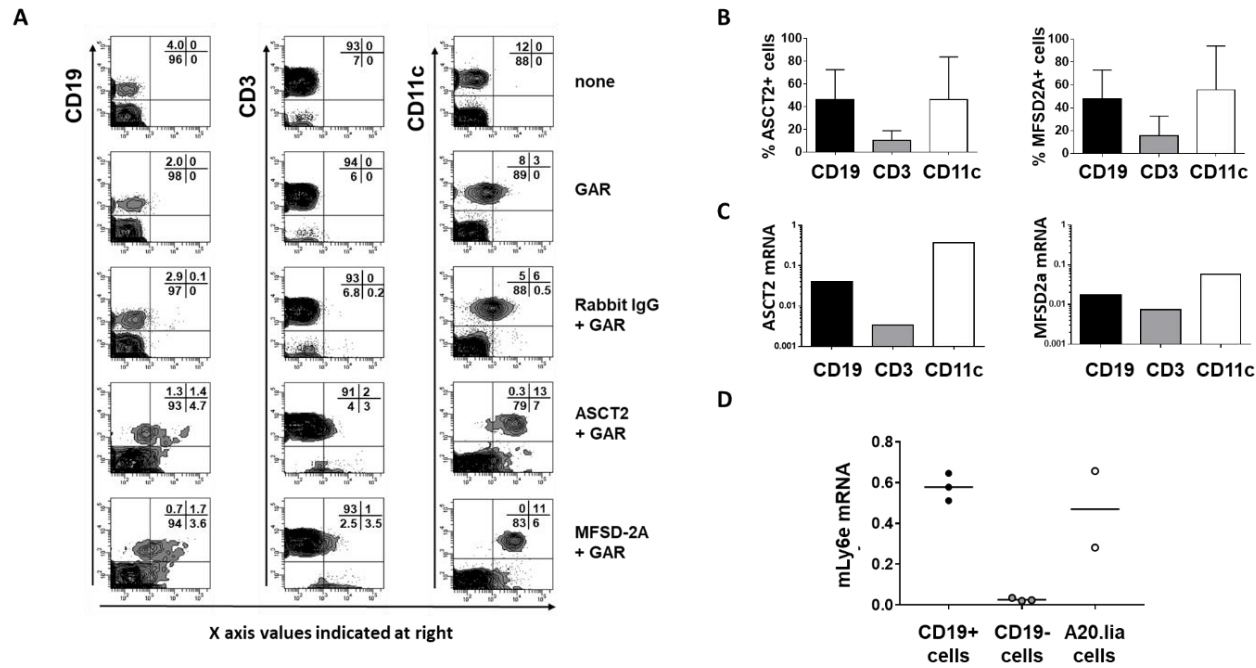


Fig. 5: Expression of syncytin receptors on human and murine primary cells

(A-C) Analysis of ASCT2 and MFSD2a expression in human PBMCs. A. Representative FACS analysis. (B) Quantification of ASCT2 or MFSD2a protein expression by FACS (average and SD) in CD19+ B cells, CD3+ T cells and CD11c+ myeloid dendritic cells (C) mRNA expression by qPCR in CD19+ B cells, CD3+ T cells and CD11c+ myeloid dendritic cells. Results from 3 experiments (1 blood donor each). (D) mRNA expression on mLy6e was measured by RT-qPCR on CD19+ or CD19- cells from mice spleens (3 different mice) and on A20.IIa cell line. Results are expressed in abundance of mLy6e mRNA.

Fig. 6

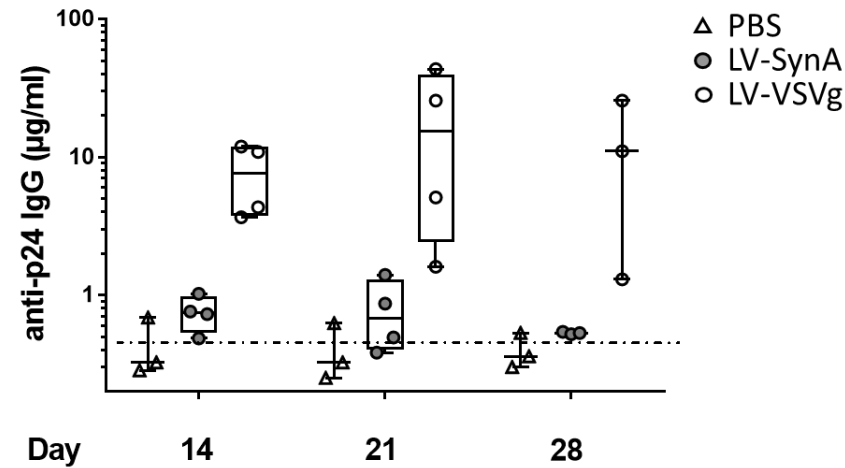


Fig. 6: Low induction of anti-P24 antibodies by Lv-SynA administration contrary to LV-VSVG.

C57BL/6 mice (n=4 in each group) were injected in the tail vein with either PBS or with the same amount of physical particles of LV-SynA or of LV-VSVG each encoding the same GFP cassette (injections of $4E+09$ pp of vector /mouse representing similar values of p24 which were 4200ng p24 for LV-VSVG and 3700ng p24 for LV-SynA). Blood was sampled at different time points following vector administration and the presence of antibodies to p24 was measured by ELISA and expressed as µg/mL against a mIgG standard. The ELISA detection threshold was 0.25 µg/mL.

Table 1. Titers of syncytin-pseudotyped LVs

vector type	number of batches titered	ng p24/mL x E+05	pp/mL x E+11	IG/mL x E+06
LV-Syn1	<i>n</i> =3	7.2 ± 2.2	4.0 ± 2.7	4.4 ± 2.0
LV-Syn2	<i>n</i> =5	5 ± 4.0	4.5 ± 2.6	5.0 ± 2.8
LV-SynA	<i>n</i> =12	10 ± 1.3	4.7 ± 4.6	11 ± 0.8
LV-SynB	<i>n</i> =4	4.8 ± 5.5	3.5 ± 3.5	10 ± 0.9
LV-VSVG	<i>n</i> =3	2.1 ± 2.0	2.1 ± 1.5	22 ± 2.5

Legend: Physical titers were measured by p24 ELISA and by direct physical particle (pp) counting using a particle counter. Infectious titers were measured on A20.IIa cells in the presence of VF1 and defined as infectious genomes (IG) /mL using qPCR.

Table 2: Transduction of human peripheral blood lymphocytes with syncytin-pseudotyped LV.

% GFP+ cells	no activation			IL-7 activation		
	CD19+ B cells	CD3+ T cells	CD11c+ Myeloid cells	CD19+ B cells	CD3+ T cells	CD11c+ Myeloid cells
PBS	0.0±0	0.1±0.1	0.2±0.3	0.3±0.4	0.5±0.4	0.8±0.6
LV-Syn1	2.3±4.3	1.3±2.6	5.5±6.3 [£]	2.1±2.6	0.8±0.3	4.1±6.0
LV-Syn2	0.6±0.4	0.4±1.0	6.2±8.2 [£]	1.8±1.5	1.5±1.0	2.2±2.2
LV-VSVg	3.6±5	2.8±2.9	6.0±6.7	2.6±1.6	1.3±0.6	2.4±0.8
VF1	3.3±4.0	0.2±0.2	7.8±8.4	0.8±0.5	0.2±0.2	0.3±0.5
LV-Syn1 + VF1	35.7±24	3.6±3.6	57.7±11	59.3±23 *	11.2±19	59.2±18
LV-Syn2 + VF1	22.2±26	1.5±1.9	35.5±34	44.0±24	6.1±10	40.1±15
LV-VSVg + VF1	27.6±17	1±0.6	45.2±16	32.1±18	3.5±1.4	35.1±9.5

Legend : Human PBMC were transduced with the indicated vectors and with or without VF1 in steady-state conditions (no activation) or following a short overnight pre-activation with IL-7, and subsequently cultured with IL-7 for 3 days. LV-Syn vectors were used at 1E+05 TU/mL after FACS titration on 293T cells and LV-VSVg were used at 1E+08IG/mL as titered by qPCR on HCT116 cells. Transduction results are expressed as the average percentage ± SD of cells positive for GFP in CD19+ (B cells), CD3+ (T cells) or CD11c+ (myeloid dendritic cells). Data represent 3 separate experiments without VF1([£] 2 experiments) and 5 to 9 separate experiments in the presence of VF1 and LV-Syn vectors.

(*) p<0.05 compared to “LV-VSVG+VF1” in a paired Student’s t test (n=6 experiments)

Table 3: Percentage of transduction of B cells subsets.

	Naive	Memory non-switch	Memory IgM only	Memory switched	Plasmablasts
PBS	0.2±0.3	0.0±0	0.3±0.5	0.5±1	0.3±0.6
VF1	0.6±0.5	1±0.1	0±0	0.3±0.5	0.3±0.6
LV-Syn1	0.4±1.1	1±0.9	0.2±0.3	0±0	0.3±0.6
LV-Syn1+VF1	62±26	23±3.3	16±13	41±11	32±13
LV-Syn2	1±0.1	4±5.2	5±6	4±5.3	1.00±1.4
LV-Syn2+VF1	52±29	29±15	27±34	26±30	29±8.5
LV-VSVG	0.1±0.1	9±8.4	4±4	10±16	2±1.1
LV-VSVG+VF1	14±14	18±16	12±11	20±11	nd

Legend: Human PBMC were transduced in steady-state conditions with LV-Syn1 or LV-Syn2 (1E+05 TU/mL) or LV-VSVG (1E+07 TU/mL). Results are the average percentage ± SD of cells positive for GFP in the indicated populations defined as naive B cells (CD3-, CD19+, CD27-, IgM+, IgD+ cells); memory non-switch B cells (CD3-, CD19+, CD27+, IgM+, IgD+ cells); memory IgM only B cells (CD3-, CD19+, CD27+, IgM+, IgD- cells); memory switched B cells (CD3-, CD19+, CD27+, IgM-, IgD-) and plasmablasts (CD3-, CD19+, CD27high), 3 days after infection. Data represent 2 to 3 separate experiments with 1 to 2 different donor per experiment. nd=not determined because too few cells to analyze in the gate.

Table 4. Functional B cells are stably transduced by syncytin-pseudotyped LV

Percentage	Day 3				Day 6			
	IL-21		IL-21 + CD40L		IL-21		IL-21 + CD40L	
	LV-Syn1	LV-Syn2	LV-Syn1	LV-Syn2	LV-Syn1	LV-Syn2	LV-Syn1	LV-Syn2
NGFR+ B cells	37.2 ± 5.3	60.2 ± 8	26.8 ± 9.4	45.8 ± 11.5	39.8 ± 9.4	45.3 ± 6.9	17.3 ± 2.7	23.3 ± 6.8
NGFR+ dividing B cells	25.2 ± 15.7	16.7 ± 6	77.5 ± 16.4	82.3 ± 10	28.8 ± 12.8	28.7 ± 14.1	93.2 ± 3.4	93.5 ± 4
NGFR-neg dividing B cells	35.3 ± 16.7	34.2 ± 17	85.8 ± 7.4	91.0 ± 4.4	40.5 ± 18.9	31.7 ± 8.6	94.8 ± 1.2	95.2 ± 1.5
plasmablasts in NGFR+ B cells	4.4 ± 2.0	5.7 ± 2.7	13.6 ± 3.7	14.1 ± 4.4	17.8 ± 7.9	18.2 ± 10.2	29.8 ± 13.1	28.9 ± 9.6
plasmablasts in NGFR-neg B cells	4.7 ± 1.2	6.0 ± 3.0	15.8 ± 5.7	14.5 ± 5.6	20.8 ± 14.1	16.3 ± 12	32.7 ± 15	30.2 ± 10.9

Legend: Data were obtained from human PBMCs of 6 different healthy donors. Cellular division was measured by CFSE labeling following transduction with LV-Syn1 or LV-Syn2 encoding delta-NGFR. Cells were cultured in the absence or presence of CD40L [2µg/mL] and/or IL-21 [50ng/mL]. After 3 and 6 days culture, B cell transduction (ie, NGFR expression), B cell proliferation (ie, CFSE dilution) and the frequency of CD19+ CD27++ CD38+ plasmablasts were determined by FACS.

Supplementary Materials:

Fig. S1

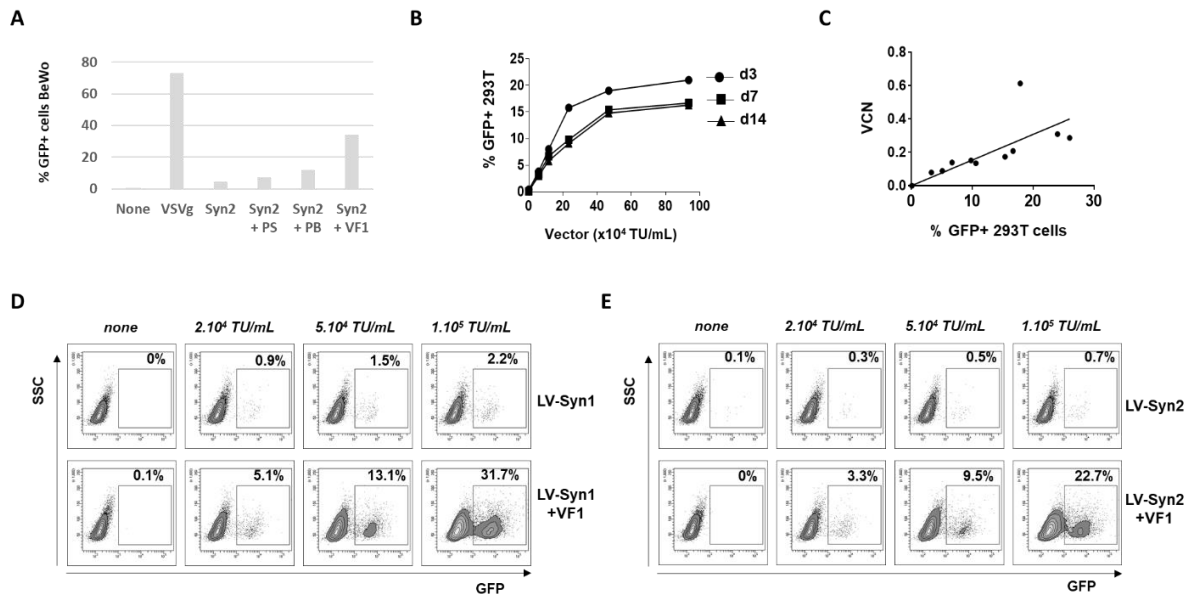


Fig. S1: Gene transfer with LV-Syn vectors is enhanced by VF1, stable over time and vector dose-dependent.

A. Transduction of BeWo cells with LV-Syn2 vector encoding GFP (1E+05 TU/mL). In these experiments, protamine sulfate (PS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and polybrene (PB) (Sigma-Aldrich) were respectively used at final concentrations of 8µg/mL and 6 µg/mL in the transduction culture medium.

B. Dose-dependent increase in transduction of 293T cells and stability of transduction over time. 293T cells were transduced with increasing concentrations of LV-Syn1 encoding GFP (concentrations based on transducing units (TU)/mL defined by FACS titration on 293T cells in the presence of VF1). Cells were cultured for the indicated times (d=days) at which GFP expression was measured by FACS. Results are expressed as percentage of GFP+ cells in the culture. Results of 1 experiment representative of 4.

C. Cells transduced as in (B) were tested at day 3 to correlate GFP expression and proviral integration with quantification of vector copy number per cell (VCN) by qPCR.

D-E. Representative FACS plot showing the dose-dependent transduction of 293T cells. Increasing concentrations of LV-Syn1 (E) or LV-Syn2 (F) expressing GFP (titered as in B) were used to transduce 293T cells in the absence or in the presence of VF1. FACS analysis was performed at day 3. Results are representative of 5 separate experiments.

Fig. S2

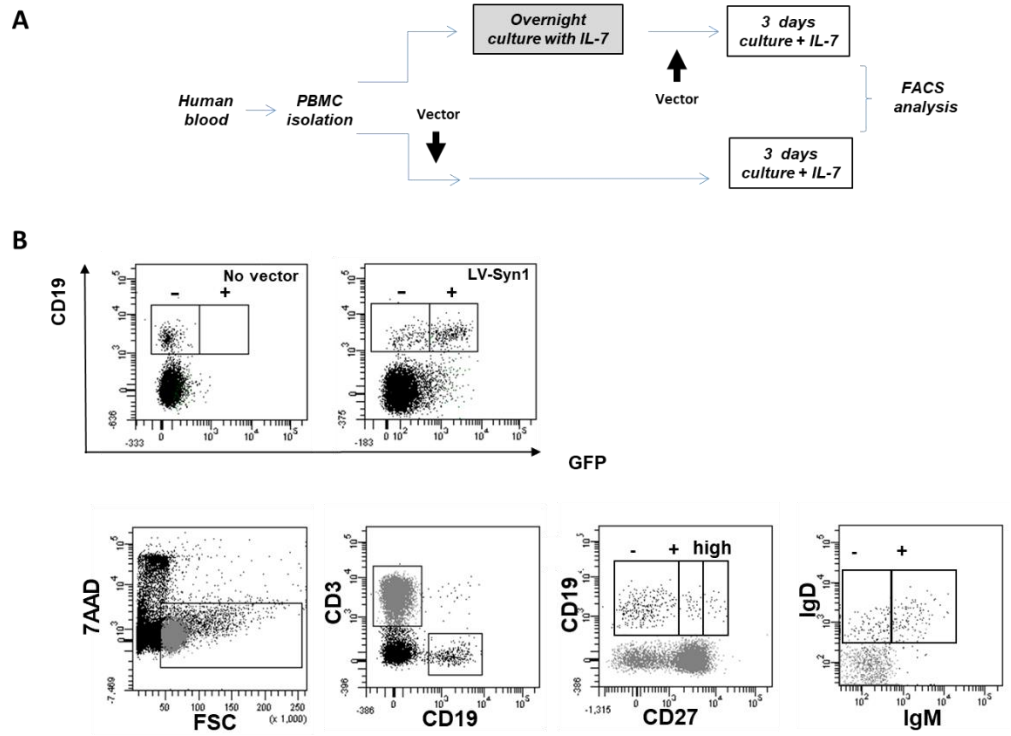


Fig. S2: Experimental schema and gating strategy for human PBMC analyses.

A. Treatment schema for infection of PBMC with LV-Syn.

B. FACS gating strategy to analyse the transduction of various B cell subpopulations

Fig. S3

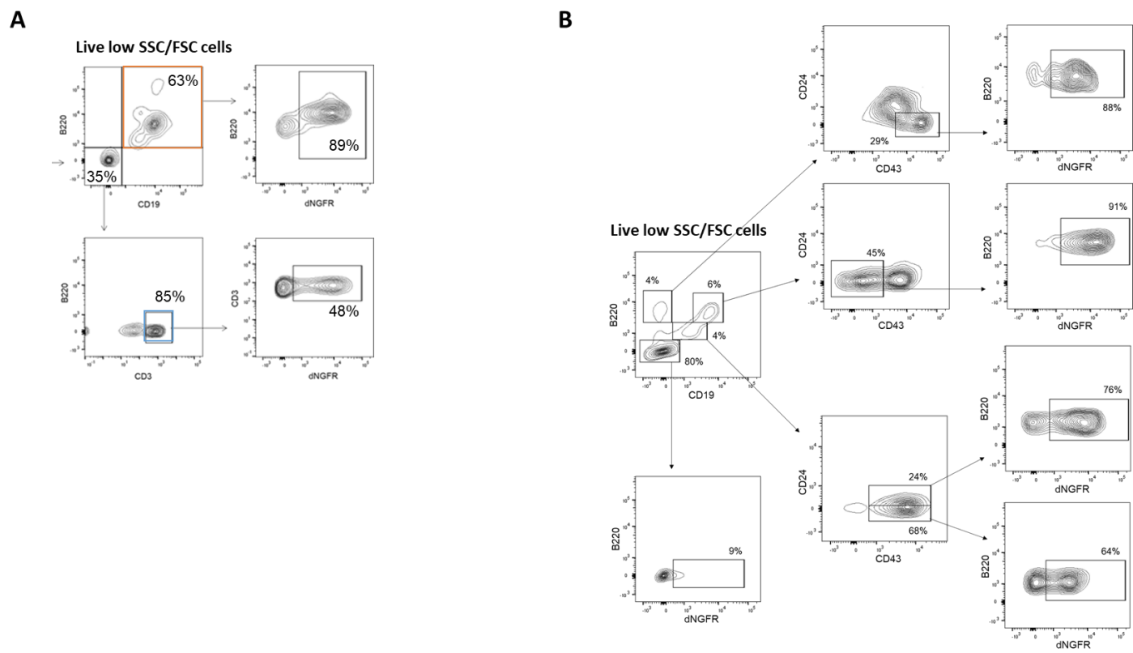


Fig. S3: Experimental schema and gating strategy for murine analyses.

A. FACS gating strategy to analyze the transduction of spleen B and T cells

B. FACS gating strategy to analyse the transduction of bone marrow cells.

Fig. S4

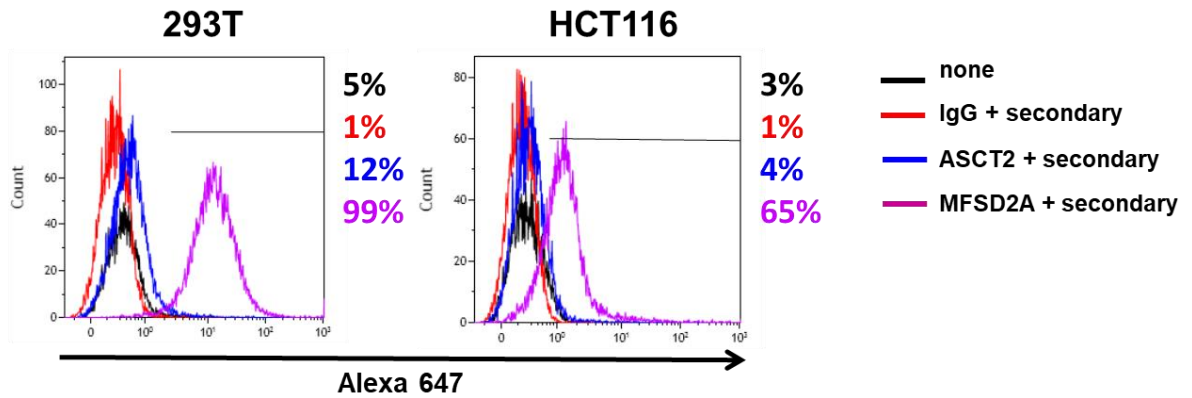


Fig. S4: Receptor expression on human cell lines.

Immunostaining for ASCT2 and MFSD2a on HEK293T cells and HCT116 cells. Histograms represent the mean fluorescence intensity (MFI) of unstained negative control cells (black), cells stained with irrelevant IgG and the Alexa 647-conjugated secondary antibody (red), cells stained with the anti-ASCT2 and secondary antibody (blue) and cells stained with anti-MFSD2a and secondary antibody (purple).

Table S1 : Transduction of PBMC with LV-Syn1 and LV-Syn2 in the presence of VF-1 .

VF1	No vector		LV-Syn1		LV-Syn2		LV-VSVG	
	-	+	-	+	-	+	-	+
Prior activation with IL-7								
Average ± SD	0.1±0.1	0.3±0.2	1.0±0.1	12.7±14.6*	1.7±1	4.5±2.7*	5.9±7.8*	5.4±1*
N	9	7	3	9	3	7	9	6
Non-activated PBMC								
Average ± SD	0.2±0.2	0.7±0.7	2.7±3.3	5.7±6.7*	1.4±1.6	0.8±0.5	4.0±2.0*	6.0±2.5*
N	6	6	2	6	2	6	6	6

Legend : Average percentage ± SD of total nucleated cells (CD45+) expressing GFP, 3 days after infection of PBMC. The cells were preactivated with IL-7 or not as indicated, and were transduced with indicated LV in the presence or absence of Vectofusin-1 (VF1). PBMC were obtained from different donors and the number of donors (n) tested is indicated. Data obtained from 3 experiments without VF1 and 7 to 9 experiments with VF1.

(*) p<0.05 compared to “no vector” in a paired Student’s t test

Table S2: FACS antibody listing.

Marker	Fluorochrome	Clone	Supplier
Human panels			
CD3	PE	HIT3 α	BD Biosciences
CD1a	PE	HI149	BD Biosciences
CD19	Alexa700	HIB19	BD Biosciences
CD45	APC-H7	2D1	BD Biosciences
IgD	APC-H7	IA6-2	BD Biosciences
IgM	PE-CF594	G20-127	BD Biosciences
CD27	PECy7	M-T271	BD Biosciences
CD11c	V450	B-ly6	BD Biosciences
CD271	APC	REA844	Miltenyi
ASCT2	Non coupled	Polyclonal	Abcam
MFSD2a	Non coupled	Polyclonal	Origene
Murine panels			
CD19	PE	553786	BD Biosciences
B220	FITC	RA3-6B2	BD Biosciences
CD3	Pacific Blue	17A2	BD Biosciences
CD24	Alexa 700	910019	R&D Systems
CD19	PE-CF594	1D3	BD Biosciences
CD43	PE-Cy7	1B11	BD Biosciences
CD11b	APC	M1/70	BD Biosciences

Table S3: Primer sequences.

Primer name	Sequence
Analysis of syncytin receptors by qPCR	
hASTC2_F	5'- GGCTTGGTAGTGTGGCCAT- 3'
hASCT2_R	5'-GGGCAAAGAGTAAACCCACA- 3'
hMFSD2a_F	5' -CTCCTGGCCATCATGCTCTC- 3'
hMFSD2a_R	5' -GGCCACCAAGATGAGAAA- 3'
hTFIID_F	5'-ACGGACAACCTGCGTTGATTTT- 3'
hTFIID_R	5' -ACTTAGCTGGGAAGCCCAAC-3'
mLy6e_F	5' CGGGCTTTGGGAATGTCAAC 3'
mLy6e_R	5' GTGGGATACTGGCACGAAGT 3'
mP0_F	5' CTCCAAGCAGATGCAGCACA 3'
mP0_R	5' ATAGCCTTGCGCATCATGGT 3'
Measure of VCN by qPCR	
PSI_F	5' CAGGACTCGGCTTGCTGAAG 3'
PSI_R	5' TCCCCGCTTAATACTGACG 3'
PSI_P.FAM	5' CGCACGGCAAGAGGCGAGG 3'
TitinMex5.3_F	5' AAAACGAGCAGTGACGTGAGC 3'
TitinMex5.3_R	5' TTCAGTCATGCTGCTAGCGC 3'
TitinMex5.3_P.VIC	5' TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC 3'
hAlb_F	5' GCTGTGATCTTTGTGGGCTGT 3'
hAlb_R	5' ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC 3'
hAlb_P.VIC	5' CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC 3'
Detection of provirus by standard PCR	
PSI_F	5' AGCCTCAATAAAGCTTGCC 3'
WPRE_R	5' TCTGATCCTGTGCTAAGGG 3'

Partie 3 : Etude de l'efficacité de transduction du poumon par des vecteurs lentiviraux pseudotypés par la Syncytine A après injection IV

Brevet PCT/EP2018/078809, publié le 25 avril 2019 par la « World Intellectual Property Organization » sous le numéro WO2019/077150A1.

Use of syncytin for targeting drug and gene delivery to lung tissue

Anne GALY, Youna COQUIN, Maxime FERRAND

Genethon, UMR_S951, Univ. Evry, Université Paris Saclay, EPHE, Evry, France

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property

Organization

International Bureau



(10) International Publication Number

WO 2019/077150 A1

(43) International Publication Date

25 April 2019 (25.04.2019)

W I P O | P C T

(51) International Patent Classification:

A61K 38/17 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(21) International Application Number:

PCT/EP20 18/078809

(22) International Filing Date:

19 October 2018 (19. 10.2018)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

17306447.8 20 October 2017 (20. 10.2017) EP

(71) Applicants: GENETHON [FR/FR]; 1 bis, rue de rinternationale, 91000 EVRY (FR). INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, 75013 PARIS (FR). UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE [FR/FR]; 23 blvd Francois Mitterrand, 91000 EVRY (FR).

(72) Inventors: GALY, Anne;

COQUIN, Youna;

FERRAND, Maxime;

(74) Agent: CABINET PLASSERAUD; 66 rue de la Chaussee d'Antin, 75440 PARIS CEDEX 09 (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): AR, PO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

(54) Title: USE OF SYNCYTIN FOR TARGETING DRUG AND GENE DELIVERY TO LUNG TISSUE

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical composition for targeting drug delivery including gene delivery to lung tissue, comprising at least a therapeutic drug or gene associated to a syncytin protein, and its use in the prevention and/or treatment of lung diseases, in particular in gene therapy of said diseases using lentiviral vector particles or lentivirus-like particles pseudotyped with syncytin protein.



WO 2019/077150 A1

Contexte de l'étude

Lors de l'étude de la biodistribution du vecteur LV-SynA après injection par voie systémique, nous avons pu remarquer, comme décrit dans la partie précédente, un tropisme pour la rate. Lorsque nous avons réalisé ces études, nous avons constaté un signal de transduction au niveau pulmonaire chez la souris. Les travaux exposés ci-après ont fait l'objet de la publication d'un brevet déposé en octobre 2017 et publié en avril 2019 auprès de la World Intellectual Property Organization, disponible en annexe à la fin de ce manuscrit. Ma contribution à ce travail a consisté en l'étude de la transduction du poumon par les LV-Syn *in vivo* et *in vitro*. Les études concernant les réponses immunitaires ont été menées en parallèle dans le laboratoire.

3.1. Introduction

Le poumon est un organe du système respiratoire responsable des échanges gazeux, pouvant être un organe cible de stratégies de thérapie génique, notamment pour le traitement de la mucoviscidose, une maladie autosomale récessive due à une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). De nombreuses approches ont été étudiées pour réaliser un transfert de gène CFTR (Marquez Loza et al. 2019).

Les premières études de thérapie génique de la mucoviscidose ont eu recours à l'utilisation de vecteurs de type adénoviraux, pour leur large capacité d'encapsulation. Cependant, ces vecteurs ne permettent pas un transfert de gènes efficace et persistant au niveau des cellules de l'épithélium alvéolaire, nécessitant des réadministrations régulières du vecteur pour avoir un maintien de l'effet (Grubb et al., 1994; Pickles et al., 1998; Walters et al., 1999). Or les vecteurs de type adénoviraux induisent des réponses immunitaires cellulaires et humorales, et ne peuvent donc pas être réadministrés (Zabner et al., 1996). Des vecteurs de type rAAVs (Moss et al., 2007; Wagner et al., 1998) et des vecteurs non viraux tels que des liposomes (Hyde et al., 2000) ont également été utilisés par voie intra-nasale ou intra-sinusoidale dans des essais de thérapie génique de la mucoviscidose. Ces approches nécessitent des administrations répétées et ne permettent pas d'obtenir un transfert de gène efficace.

Les vecteurs lentiviraux représentent des outils de transfert de gènes intéressants dans ce contexte, car ils possèdent une large capacité d'encapsulation et ont la capacité d'intégrer leur matériel génétique dans le génome de leurs cellules cibles, évitant ainsi les réadministrations répétées de vecteurs. Les vecteurs lentiviraux présentent également un

avantage en termes de réponses immunitaires en comparaison des vecteurs adénoviraux ou AAVs.

Les vecteurs lentiviraux (LVs) peuvent être pseudotypés par différentes glycoprotéines d'enveloppe, ce qui permet de moduler le tropisme des vecteurs (la glycoprotéine d'enveloppe étant responsable de la reconnaissance du récepteur à la surface de la cellule cible et de la fusion entre le vecteur et la cellule). L'immunogénicité du vecteur LV dépend également de la glycoprotéine d'enveloppe.

Différentes glycoprotéines ont ainsi été utilisées pour pseudotyper des vecteurs lentiviraux afin de leur conférer un tropisme pour les cellules épithéliales des voies aériennes, telles que les glycoprotéines du filovirus (Kobinger et al., 2001), du baculovirus (Sinn et al., 2017), du virus influenza (Patel et al., 2013) ou encore du virus de Sendai (Griesenbach et al., 2012; Kobayashi et al., 2003; Mitomo et al., 2010).

L'administration des vecteurs pour ces différentes approches reposent sur l'utilisation d'aérosols par voie intra-nasale, or chez les patients atteints de mucoviscidose, une forte sécrétion de mucus entraîne une barrière physique aux cellules de l'épithélium alvéolaire, le développement de nouveaux outils permettant une administration par voie systémique est donc d'un intérêt majeur pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les syncytines sont des glycoprotéines d'enveloppe d'origine rétrovirale qui possèdent de fortes propriétés fusogéniques. De plus, elles sont endogènes, ayant été intégrées dans le génome des vertébrés il y a plusieurs millions d'années. Nous avons précédemment montré la possibilité de pseudotyper des vecteurs lentiviraux par la syncytine A, présente chez les rongeurs. Des études de biodistribution de ce vecteur LV-SynA chez la souris ont permis de mettre en évidence un ciblage pulmonaire après injection par voie intra-veineuse de ce vecteur. Nous avons également étudié l'efficacité de transduction de cellules humaines pulmonaires en culture avec ces vecteurs. Nous avons également étudié l'immunogénicité de ce vecteur après injection IV chez la souris.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Lignées cellulaires

Les cellules de lymphome B murin A20.IIa (*fournies généreusement par le Pr. Sylvain Fisson*) ont été cultivées dans du milieu RPMI supplémenté de 10% de SVF (*Eurobio*), 1% de Glutamax (*Life Technologies*), 1% de pénicilline-streptomycine (*Life Technologies*), 1mM de

sodium pyruvate (*Life Technologies*) et 50µM de β-mercaptoéthanol (*Sigma*). Les cellules de fibroblastes pulmonaires humains MRC5 (*ATCC, CCL-171™*) ont été cultivées dans du milieu EMEM (Eagle Minimum Essential Medium) (*ATCC*) supplémenté de 10% de SVF, 1% de Glutamax et 1% de pénicilline-streptomycine et les cellules épithéliales de poumon humaines HSAEC (Human Small Airway Epithelial Cells, *ATCC, PCS-301-010™*) ont été cultivées dans du milieu Airway Epithelial Cell Basal Medium (*ATCC*) supplémenté du Bronchial Epithelial Growth Kit (*ATCC, PCS-300-040™*). Les cellules ont été transduites par des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec la syncytine-1, -2, -1 ou -B, codant pour le ΔNGFR à des doses de 1.10^E+05 et 5.10^E+05 IG/mL en présence de 12µg/mL de Vectofusin-1® (*Miltenyi Biotec*) dans un volume final de 200µL. Après 6h de transduction à 37°C, le milieu de culture est renouvelé et les cellules sont gardées en culture pendant 7 jours.

3.2.2. Production de vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines

Les cellules productrices HEK293T ont été transfectées à l'aide du phosphate de calcium pendant la nuit avec les 4 plasmides suivants (quantités par flasque) : pKlgagpol (14.6µg) ; pKRev (5.6µg) ; pcDNA3.1-SyncytinA (20µg), pcDNA3.1-SyncytinB (20µg), pcDNA3.1-Syncytin1 (20µg) ou pcDNA3.1-Syncytin2 (20µg) pour le plasmide d'enveloppe, et pour le plasmide de transfert codant pour le transgène soit PRRL-SFFV-LucII-WPRE (22.5µg) codant pour la luciférase LucII sous le contrôle du promoteur ubiquitaire SFFV (Spleen Focus Forming Virus) ou PRRL-PGK-dNGFR-WPRE (22.5µg) codant pour le ΔNGFR (forme tronquée du Nerve Growth Factor Receptor) sous le contrôle du promoteur fort ubiquitaire PGK ou le plasmide PCCL-PGK-GFP-HY (22.5µg) codant pour la protéine de fusion GFP-HY sous le contrôle du promoteur PGK. Le milieu de culture a été renouvelé le lendemain, le milieu de transfection a été aspiré et du milieu DMEM complet frais a été ajouté. 24h plus tard, le surnageant de culture a été récolté, clarifié par centrifugation 1500rpm 5min et filtré sur acétate de cellulose 0.45µm, puis concentré par ultracentrifugation à 50000G pendant 2h à 12°C. Les particules lentivirales ont été re-suspendues dans du PBS puis aliquotées et conservées à -80°C. Les vecteurs LV pseudotypés par VSVG ont également été produits par transfection transitoire comme reporté précédemment (Merten et al., 2010).

3.2.3. Animaux

Les souris C57BL/6 albinos (B6N-*Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrI*) mâles ou femelles âgées de 6 semaines (*Charles River*) ont été injectées avec 100µL de vecteur LV-SynA-LucII (équivalent à 5.10^E+05 IG_{A20} par souris) ou 100µL de PBS pour les contrôles par voie intra-veineuse au niveau de la veine de la queue. Les souris sont analysées en bioluminescence une fois par semaine pendant 3 semaines et sont sacrifiées 21 jours post-injection par élongation cervicale. Les poumons sont prélevés après sacrifice, le poumon droit est utilisé frais pour réaliser les analyses par qPCR et le poumon gauche est fixé en formaline pendant la nuit avant inclusion en paraffine pour faire des immuno-marquages sur coupes histologiques.

Pour les études concernant les réponses immunes, les souris C57BL/6 femelles âgées de 6 semaines (*Charles River*) ont été injectées avec 100µL de vecteur LV-SynA-GFP_HY (équivalent à 4.10^E+09 pp/souris) ou 100µL de vecteur LV-VSVG-GFP_HY (équivalent à 4.10^E+09 pp/souris) ou 100µL de PBS pour les contrôles par voie intra-veineuse dans la veine de la queue.

Les études chez la souris ont été réalisées en accord avec la directive européenne 2010/62/UE, après approbation par le Ministère Français de la Recherche et de l'Innovation de la demande d'étude numéro APAFIS#3744-2016012210018523 après consultation du comité d'éthique numéro 51. L'utilisation des OGMs a été approuvée par le Ministère de la Recherche et de l'Innovation sous le numéro d'agrément 3664.

3.2.4. Analyse de la bioluminescence par imagerie de la luciférase *in vivo*

Les souris ont été anesthésiées avec de la kétamine (120mg/kg) et xylazine (6mg/kg) puis ont été injectées avec 75mg/kg de D-Luciférine (*Interchim*) par voie intra-péritonéale. Les souris ont été imagées 10min après l'injection de D-Luciférine à l'aide de l'appareil Ivis Lumina III (*Perkin-Elmer*) utilisant une caméra CCD ISO14N4191. La durée d'exposition pour l'acquisition des images est de 3 minutes. Les régions d'intérêt ont été dessinées manuellement sur les images obtenues, en utilisant le même cache pour toutes les souris. Les intensités de signal ont été mesurées à l'aide du logiciel living image 3.2 et sont exprimées en photons par seconde. Le bruit de fond du signal a été déterminé sur les mêmes régions d'intérêt chez des souris contrôles n'ayant pas reçu de vecteur.

3.2.5. Isolement des cellules de poumon de souris

Les poumons ont été perfusés avec de la collagénase IV (1mg/mL) et DNase I (50µg/mL, Roche) et incubés à 37°C pendant 45 minutes. La réaction est arrêtée par ajout d'EDTA (100mM). Les cellules ont ensuite été isolées par dilacération sur un filtre de 70µm dans du milieu RPMI, puis lavées en PBS et congelées en culots secs à -20°C.

3.2.6. qPCR

L'ADN génomique a été extrait à partir des culots cellulaires des différentes lignées testées ou des cellules de poumon de souris à l'aide du kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Une qPCR en duplex a été réalisée sur les ADNg ainsi obtenus, en utilisant la séquence provirale PSI et la séquence TitinMex5 comme gène normalisateur pour les ADN d'origine murine ou Albumine comme gène normalisateur pour les ADN d'origine humaine (voir les séquences des sondes et amorces dans le [Tableau 9](#). Le mix de qPCR utilisé est ABSolute qPCR ROX mix (Thermo Scientific), et les résultats ont été obtenus sur l'appareil iCycler 7900HT (Applied Biosystems) à l'aide du logiciel SDS 2.4 ou sur le LightCycler480 (Roche) à l'aide du logiciel LightCycler® 480 SW 1.5.1.

PSI_F	5' CAGGACTCGGCTTGCTGAAG 3'
PSI_R	5' TCCCCCGCTTAATACTGACG 3'
PSI_P.FAM	5' CGCACGGCAAGAGGCGAGG 3'
TitinMex5.3_F	5' AAAACGAGCAGTGACGTGAGC 3'
TitinMex5.3_R	5' TTCAGTCATGCTGCTAGCGC 3'
TitinMex5.3_P.VIC	5' TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC 3'
hAlb_F	5' GCTGTGATCTCTTGTGGGCTGT 3'
hAlb_R	5' ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC 3'
hAlb_P.VIC	5' CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC 3'

Tableau 9 : Sondes et amorces utilisées en qPCR

3.2.7. PCR sur les poumons de souris

Une PCR a été réalisée sur les ADNg du poumon (extraction décrite dans le paragraphe ci-dessus « qPCR ») en utilisant la TaqPhusion (Thermo Scientific). Les amorces

suivantes sont utilisées à une concentration de 0.1µM : PSI_F : 5' AGCCTCAATAAAGCTTGCC 3' et RRE_R 5' TCTGATCCTGTCGTAAGGG 3'. Le programme de PCR utilisé est le suivant : 98°C 30s --> (98°C 10s, 61°C 30s, 72°C 45s) x35 --> 72°C 5min. Le produit de PCR obtenu a été déposé sur un gel d'agarose 2% pour électrophorèse, la taille de la bande attendue est de 489pb.

3.2.8. Immuno-marquages sur coupes histologiques de poumon

Les poumons inclus en paraffine ont été coupés au microtome en coupes de 4µm. Après saturation en PBS-BSA 5% pendant 30min à température ambiante, les coupes ont été incubées avec un anticorps anti-luciférase (*Novus Biologicals*) dilué au 1/100 dans du PBS-BSA 0.1% pendant la nuit à +4°C. Après lavage en PBS, l'anticorps secondaire âne anti-chèvre couplé à l'Alexa594 (*Invitrogen*) dilué au 1/1000^{ème} a été incubé pendant 1h30 à température ambiante. Les lames sont montées avec du milieu de montage Fluoromount DAPI (*Southern Biotech*).

3.2.9. Détermination de réponses immunes par ELISpot

Les ELISpots (IFN-γ enzyme-linked immunospot assay) ont été réalisés en cultivant les splénocytes à raison de 1^E+06 cellules par puits en plaque MAHAS45 (*Millipore*) coatées avec un anticorps anti-IFN-γ (*eBiosciences*) dans un milieu de stimulation contenant 2µg/mL de peptide Uty, ou 2µg/mL de peptide Dby ou 5µg/mL de Concanavalin A (*Sigma*) pendant 24h à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées et la sécrétion d'IFN-γ a été révélée avec un anticorps biotinylé anti-IFN-γ (*eBiosciences*) puis avec une Streptavidine-Phosphatase Alcaline (*Roche Diagnostics*) et enfin par le substrat BCIP/NBT (*Mabtech*). Les spots ont été comptés à l'aide du lecteur AID (*Cepheid Benelux*) et du logiciel AID ELISpot Reader v6.0. Les unités formant spot (SFU) ont été représentées après soustraction des valeurs des splénocytes non stimulés correspondant au bruit de fond.

3.2.10. Dosage des cytokines par CBA (Cytokinic Bead Array)

Les splénocytes ont été cultivés à raison de 1^E+06 cellules par puits dans du milieu de stimulation contenant 2µg/mL de peptide Uty, ou 2µg/mL de peptide Dby ou 5µg/mL de Concanavalin A pendant 36h à 37°C en plaque 96 puits. Les surnageants de culture ont

ensuite été conservés à -80°C jusqu'à titration. Les dosages des cytokines par CBA ont été réalisés à l'aide des kits BD Biosciences flex kits (IL-6, IFN- γ , TNF α et RANTES). Les billes de capture avec différentes intensités de fluorescence ont été mélangées avec les anticorps de capture spécifiques des cytokines. 25 μ L de ce mélange billes-anticorps ont été mélangés avec 25 μ L de surnageant de culture puis incubés pendant 1h à température ambiante. Les anticorps spécifiques des différentes cytokines couplés au PE ont ensuite été ajoutés puis incubés pendant 1h à température ambiante. Les billes ont ensuite été lavées et les données ont été acquises à l'aide du LSR-II (*BD Biosciences*) et l'analyse réalisée à l'aide du logiciel FCAP (*BD Biosciences*).

3.2.11. Statistiques

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.

3.3. Résultats

3.3.1. Transduction du poumon chez la souris après une injection IV de LV-SynA

Afin de déterminer la biodistribution des vecteurs LV pseudotypés par la Syncytine-A chez la souris, un vecteur LV-SynA codant pour la luciférase LucII a été injecté par voie intraveineuse chez des souris C57BL/6 albinos de 6 semaines. Une analyse du signal de bioluminescence a été réalisée à différents points temps (1, 2 et 3 semaines post-injection) afin de déterminer l'intensité et la localisation du signal. Dès 7 jours post-injection (premier point temps testé), un signal de bioluminescence est observé au niveau du poumon sur le dos des souris injectées avec le vecteur LV-SynA-LucII ([Figure 33](#)), un signal est également détecté chez ces souris au niveau de la rate. La biodistribution du vecteur est très différente de celle du vecteur LV-VSVG-LucII qui, sans surprise, cible majoritairement le foie.

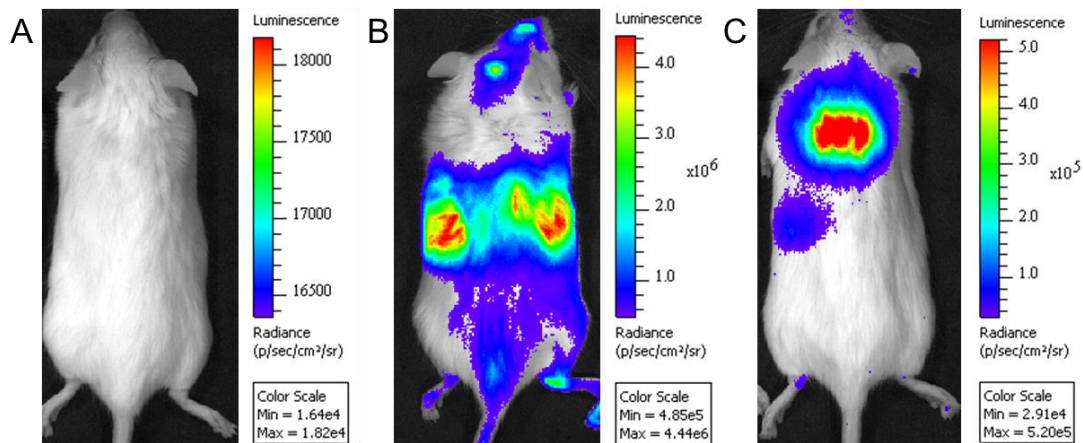


Figure 33 : Bioluminescence chez des souris injectées en IV par des vecteurs LV-SynA et LV-VSVG

Le signal de bioluminescence est mesuré à j7, j14 et j21 post-injection à l'aide de l'ivis Lumina. **A** : souris injectée par du PBS ; **B** : souris injectée par un vecteur LV-VSVG ; **C** : souris injectée par un vecteur LV-SynA. Les images sont représentatives de n=11 souris pour le groupe PBS, n=18 souris pour le groupe LV-SynA et n=4 souris pour le groupe LV-VSVG, à j21 post-injection.

Nous avons pu quantifier le signal de bioluminescence au niveau du poumon, qui est de $1.8^E+06 \pm 3.6$ photons/seconde à j7, $3.1^E+05 \pm 5.5$ photons/seconde à j14 et $1.0^E+06 \pm 1.7$ photons/seconde à j21 post-injection pour LV-SynA et $5.4^E+07 \pm 5.1$ photons/seconde à j7, $4.3^E+07 \pm 5.0$ photons/seconde à j14 et $2.4^E+07 \pm 3.9$ photons/seconde à j21 post-injection pour LV-VSVG. La cinétique du signal montre qu'il est stable sur la durée de l'étude (3 semaines) (Figure 34).

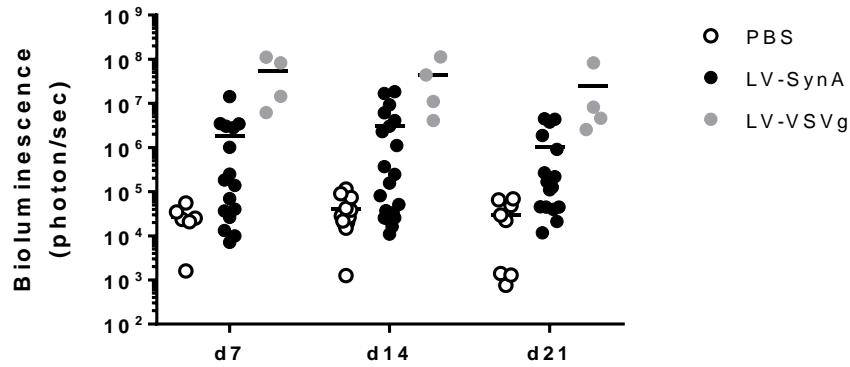


Figure 34 : Cinétique du signal de bioluminescence au niveau pulmonaire chez les souris injectées par les LV-SynA

Les analyses de bioluminescence ont été réalisées à j7, j14 ou j21 post-injection en IV du vecteur LV-SynA ou LV-VSVG. Le flux de photons par secondes a été mesuré sur le dos des souris en appliquant le même cache au niveau de la région d'intérêt au niveau pulmonaire pour tous les animaux.

Des analyses par qPCR ont été réalisées sur différents organes après sacrifice à 3 semaines post-injection, afin d'évaluer l'efficacité de transduction des vecteurs, et pour déterminer leur biodistribution (Figure 35). Aucune intégration du provirus n'est retrouvée au niveau du cerveau, du rein, du thymus, du cœur, de l'estomac ou encore du bulbe olfactif. En revanche, une intégration des vecteurs LV-SynA est détectée dans la rate et majoritairement au niveau du poumon (sur cellules pulmonaires totales) et de façon plus forte que LV-VSVG. De plus, les vecteurs LV-SynA ne sont pas intégrés dans les cellules hépatiques, contrairement aux vecteurs LV-VSVG. Les provirus ne sont pas retrouvés non plus au niveau du cœur, du pancréas, de l'intestin, de l'estomac, ni du bulbe olfactif (données non montrées).

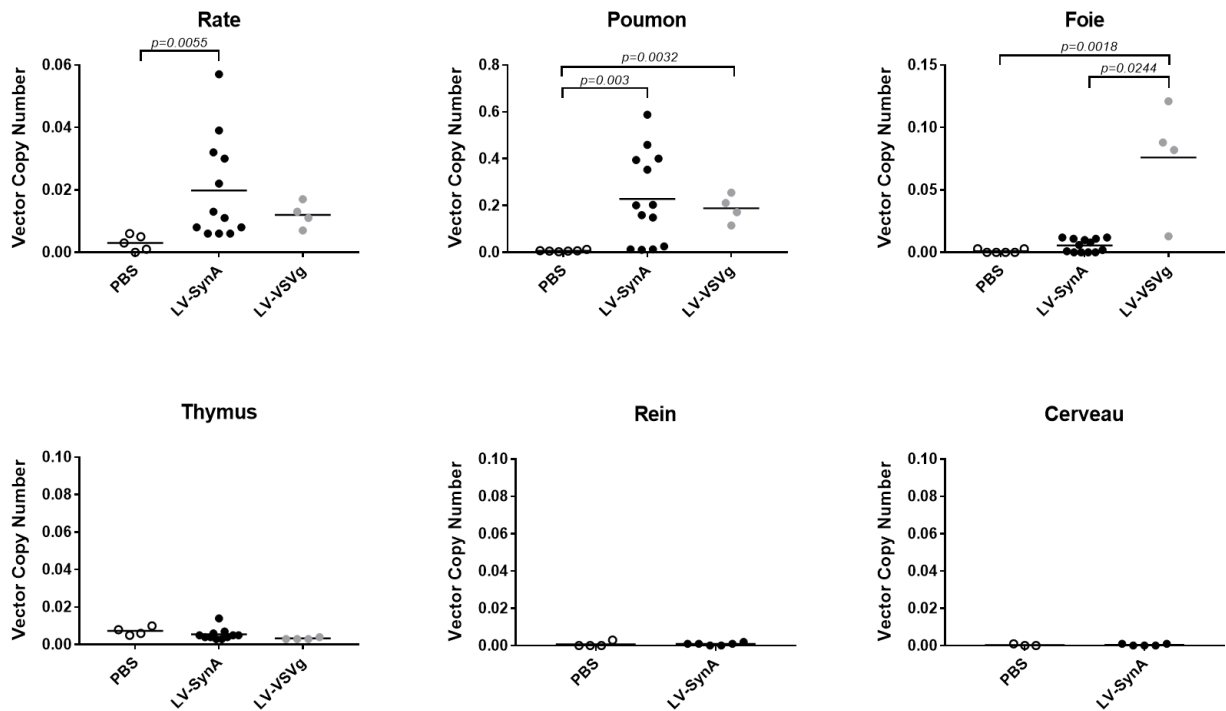


Figure 35 : Evaluation de la biodistribution des vecteurs LV-SynA *in vivo* par voie IV chez la souris par qPCR

Analyse qPCR de cellules de rate, poumon, foie, thymus, rein et cerveau isolées 3 semaines post-injection, afin de déterminer le nombre de copies de vecteur par cellule. Les statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis.

Afin de confirmer la présence du provirus du LV-SynA au niveau des cellules pulmonaires, une PCR utilisant des amorces différentes a été réalisée. La présence de la bande attendue pour la séquence provirale PSI-WPRE dans les ADNg de poumons injectés par la LV-SynA confirme bien l'efficacité de transduction de ces vecteurs, après une seule injection IV chez la souris (Figure 36).

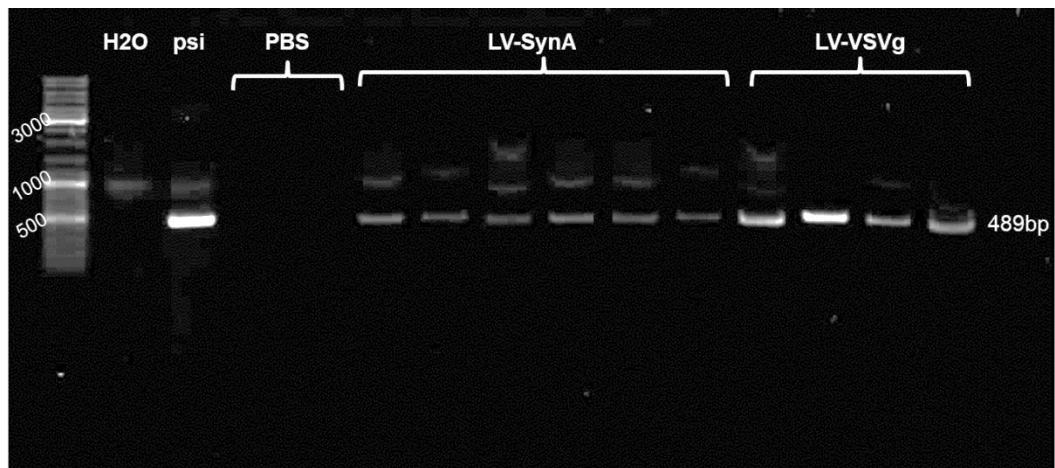


Figure 36 : Amplification d'un signal PSI-WPRE dans les poumons de souris injectées par les vecteurs LV-SynA et LV-VSVg par voie IV

Amplification par PCR et migration sur gel d'agarose d'un fragment du provirus (PSI-WPRE) de 489pb sur des ADNg de poumons isolés 3 semaines post-injection par voie intra-veineuse de vecteurs LV-SynA ou LV-VSVg. Le plasmide PRRL-SFFV-LucII-WPRE sert de contrôle positif.

Des immuno-histo-marquages du transgène, la luciférase, ont ensuite été réalisés sur coupes de poumons paraffinés. La luciférase est bien exprimée par les poumons de souris ayant reçu du LV-SynA (Figure 37). La luciférase semble être exprimée par des cellules formant l'épithélium bronchique, des études complémentaires sont nécessaires pour affirmer la localisation pulmonaire du transgène après transfert de gènes par les LV-SynA.

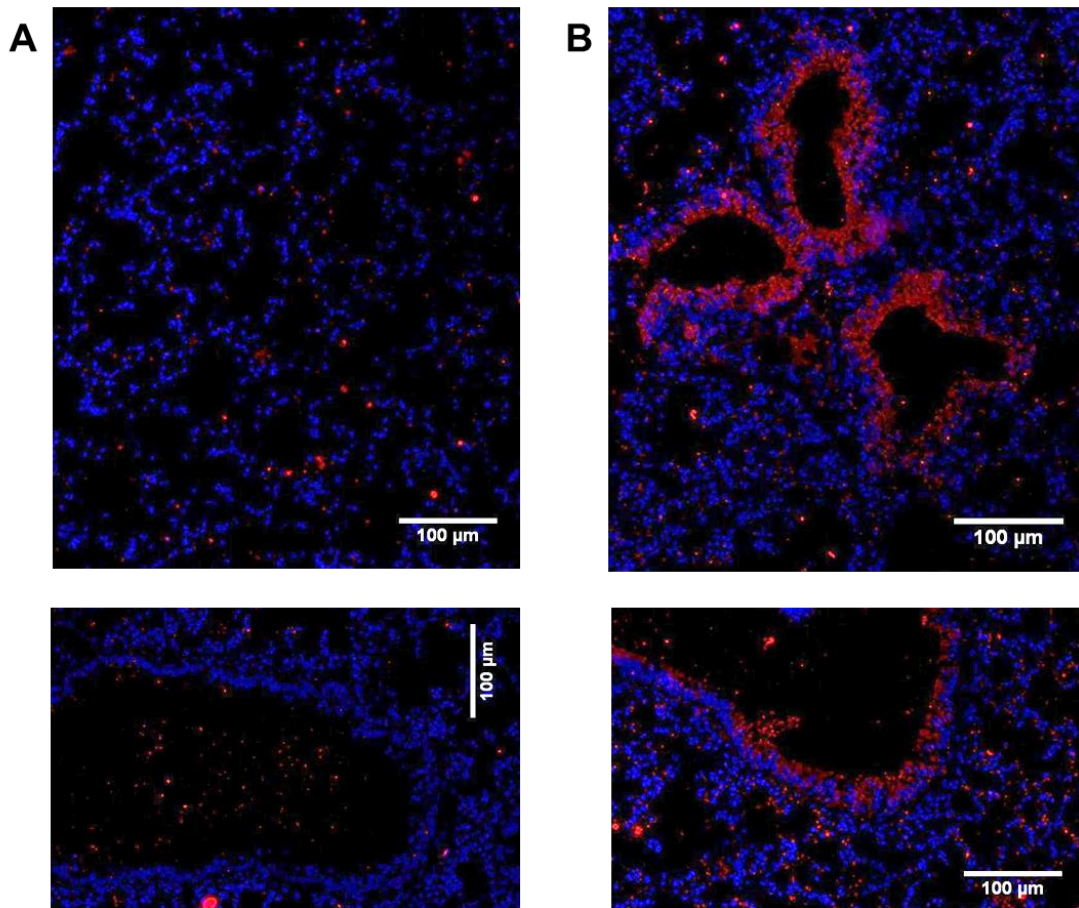


Figure 37 : Immuno-histo-marquage de la luciférase sur coupe de poumon après injection IV de LV-SynA

Les coupes de poumons de souris sont marquées avec du DAPI (bleu) et un anticorps anti-luciférase couplé à l'Alexa594 (rouge). A gauche : souris injectées par voie IV par du PBS, à droite : souris injectées par voie IV par un vecteur LV-SynA. Images représentatives de n=8 échantillons.

3.3.2. Transduction *in vitro* de cellules pulmonaires humaines par les LV-Syn

Les vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines (LV-SynA, -SynB, -Syn1 et -Syn2) permettent une transduction efficace de la lignée de fibroblastes pulmonaires humains MRC5. L'intégration des vecteurs dans ces cellules est mesurée par qPCR après 7 jours de culture. Le vecteur LV-VSVG a été rajouté dans cette expérience comme contrôle positif, à une dose 10 fois supérieure (10^6 IG/mL) à la dose testée pour les LV-Syn (10^5 IG/mL). Les vecteurs pseudotypés syncytines permettent une transduction des cellules pulmonaires MRC5, avec 0.65 ± 0.12 copie de vecteur par cellule avec les LV-SynA, 0.15 ± 0.1 copie de vecteur par cellule et de façon remarquable 2.85 ± 1.40 copies de vecteur par cellule avec les LV-Syn2 (Figure 38).

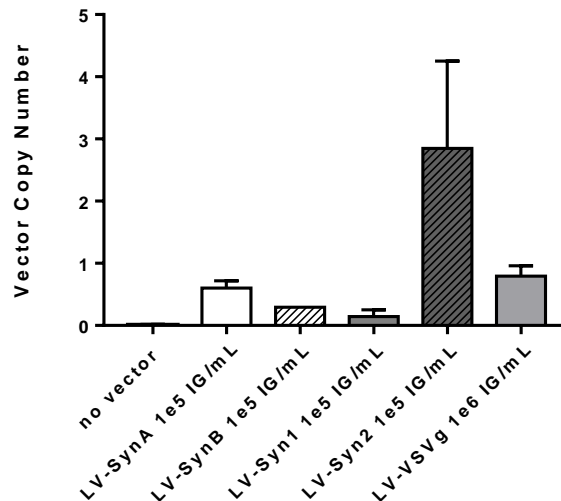


Figure 38 : Intégration des vecteurs LV-Syn dans les cellules MRC5 à 7 jours post-transduction

Détermination du nombre de copies de vecteur par cellule par qPCR, sur une lignée de fibroblastes pulmonaires humains (MRC5) 7 jours post-transduction par les LV-SynA, -SynB, -Syn1 et -Syn2 par rapport au contrôle sans vecteur et au contrôle positif LV-VSVG. Résultats représentatifs de n=3 expériences indépendantes, en moyenne avec les écarts-type.

Afin de se rapprocher au maximum des conditions *in vivo*, l'efficacité de transduction des LV-Syn a ensuite été évaluée sur des cellules HSAEC (Human Small Airway Epithelial Cells), qui sont des cellules primaires humaines d'épithélium des voies respiratoires inférieures. Les vecteurs LV pseudotypés par les syncytines permettent une transduction efficace de ces cellules après 7 jours de culture post-transduction. Les LV-Syn1 permettent en effet l'intégration de 0.11 ± 0.02 copie de vecteur par cellule, les LV-SynA 0.15 ± 0.04 copie de vecteurs par cellule et les LV pseudotypés Syncytine-2 permettent cette fois encore d'obtenir le plus fort niveau de transduction avec 0.82 ± 0.12 copie de vecteur intégré par cellule (Figure 39). La transduction observée des cellules HSAEC est stable au cours du temps avec les différents vecteurs testés, au moins jusqu'à 30 jours post-transduction (données non montrées).

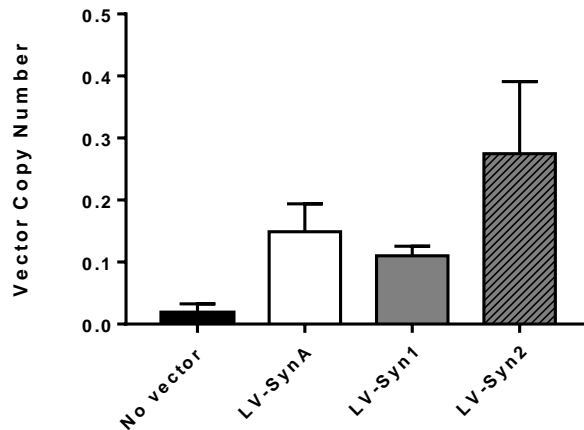


Figure 39 : Intégration des vecteurs LV-Syn dans les cellules HSAEC 7 jours post-transduction

Détermination du nombre de copies de vecteur par cellules par qPCR, 7 jours post-transduction sur des cellules primaires épithéliales des voies aériennes humaines (HSAEC) par les vecteurs LV-SynA, -Syn1 et -Syn2 par rapport au contrôle sans vecteur. Résultats représentatifs de n=5 expériences indépendantes, en moyenne avec les écarts-type.

3.3.3. Expression du récepteur Ly6e

Nous avons étudié l'expression du récepteur à la syncytine A murine sur différentes lignées cellulaires, et comparé l'expression du récepteur avec l'efficacité de transduction des LV-SynA. Concernant le récepteur Ly6e murin (mLy6e), les lignées NIH/3T3, C2C12 et A20.IIa ont été analysées. Des cellules de poumon total de souris C57BL/6 ont également été analysées comme contrôle, des études ayant montré la forte expression de mLy6e au niveau de cet organe (Bacquin et al., 2017), et nous retrouvons bien dans cette étude une forte expression du récepteur au niveau des cellules pulmonaires (Figure 40A). Les cellules A20.IIa expriment le récepteur mLy6e (Figure 40A) et sont fortement transduites par les LV-SynA (Figure 40B). Les cellules NIH/3T3 et C2C12 ne sont pas permissives aux LV-SynA (Figure 40B), pourtant les cellules C2C12 expriment le récepteur mLy6e (Figure 40A).

Nous avons également étudié l'expression de la forme humaine du Ly6e (hLy6e) sur différentes lignées cellulaires : HEK293T, HCT116, WI26VA4, Jurkat, RAJI et MRC5. Les cellules MRC5 (fibroblastes pulmonaires) sont les cellules exprimant le plus fortement (parmi le panel de lignées testées) le récepteur hLy6e (Figure 40C) et ce sont également les cellules qui sont le plus efficacement transduites par les LV-SynA (Figure 40D). Les cellules HEK293T et HCT116 expriment de façon très faible le récepteur hLy6e (Figure 40C) et ne sont pas transduites par les LV-SynA (Figure 40D). Les cellules WI26VA4 expriment hLy6e (Figure 40C) mais ne sont pas transduites par les LV-SynA (Figure 40D). Les cellules Jurkat expriment

faiblement le hLy6e et les cellules RAJI ne l'expriment pas (Figure 40C), mais ces lignées cellulaires sont transduites par les LV-SynA (Figure 40D).

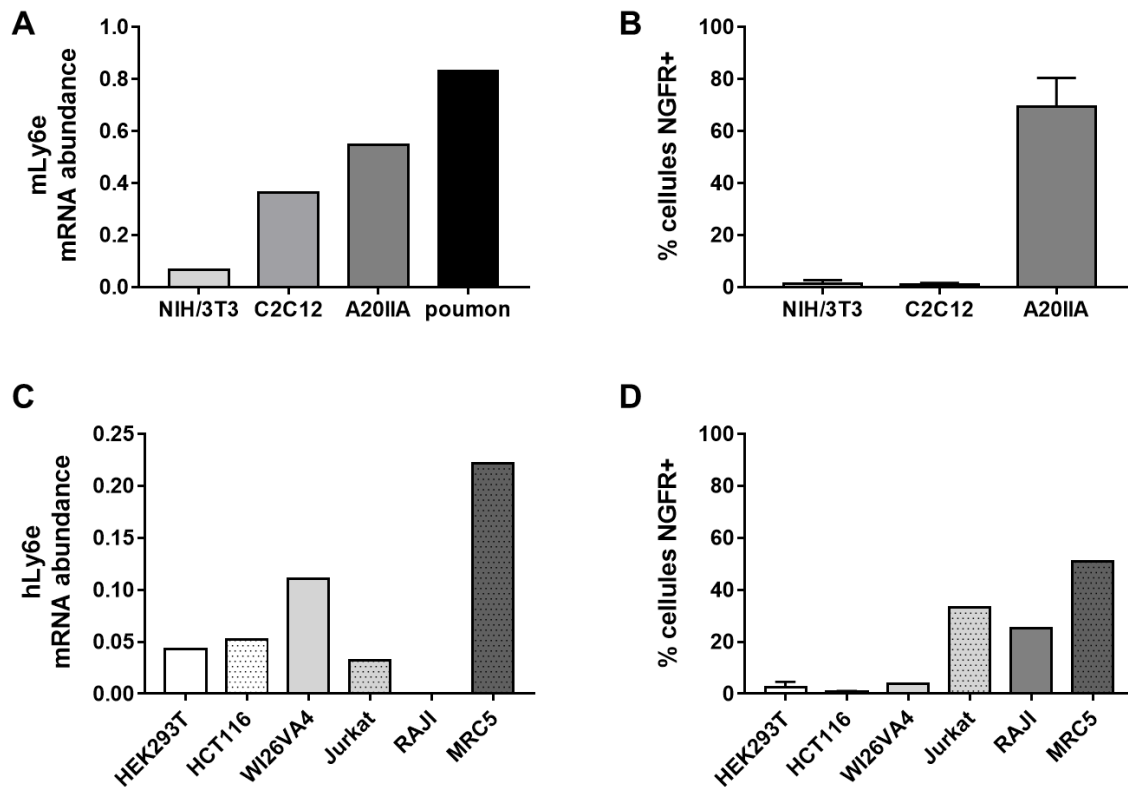


Figure 40 : Expression des récepteurs mLy6e et hLy6e sur différentes lignées cellulaires avec les efficacités de transduction des vecteurs LV-SynA

Les ARNm de différentes lignées cellulaires ont été extraits afin de les convertir en ADNc et d'évaluer l'expression du récepteur Ly6e murin (A) ou humain (C) par RT-qPCR. Les résultats de la transduction des mêmes lignées cellulaires par un vecteur LV-SynA à une dose de 10^5 IG/mL en présence de Vectofusin-1 (12 μ g/mL) ont été évalués par cytométrie en flux 7 jours post-transduction sur les mêmes lignées murines (B) à savoir NIH/3T3, C2C23, A20.IIa et humaines (D) c'est-à-dire les cellules HEK293T, HCT116, WI26VA4, Jurkat, RAJI et MRC5.

L'expression du récepteur à elle seule ne conditionne donc pas l'entrée du vecteur dans la cellule, laissant supposer l'existence d'un co-récepteur ou d'un autre récepteur.

3.3.4. Etude des réponses immunes contre le transgène après injection IV de LV-SynA par rapport aux LV-VSVG

L'étude des réponses immunes induites par les vecteurs pseudotypés par la syncytin A a été réalisée par M. Ferrand dans le laboratoire, avec des lots de vecteurs que j'ai produit.

Les réponses immunes contre le transgène induites par les vecteurs LV-SynA par rapport aux LV-VSVG ont été étudiées après injection par voie IV de ces vecteurs chez des souris C57BL/6 femelles, en utilisant le système HY développé au laboratoire (Cire et al., 2014; Sudres et al., 2012). Les vecteurs utilisés codent pour un transgène GFP-HY, la séquence HY correspondant à un gène mâle. Si le transgène est présenté par des cellules présentatrices d'antigène, les peptides Dby et Uty codés par la séquence HY vont être présentés respectivement aux lymphocytes T CD4 et CD8, et une réponse immunitaire transgène spécifique sera ainsi détectée (Cire et al., 2014).

Dans les conditions de dose injectée (soit 7.5^E+05 IG par souris), nous observons une réponse immune T-CD4 et T-CD8 induite par VSVG alors que cette réponse est inférieure après injection IV de LV-SynA en comparaison de LV-VSVG à dose égale (Figure 41A). Les niveaux de cytokines sécrétés par les lymphocytes T sont également très faibles après injection de LV-SynA, et encore largement inférieurs à ceux observés après injection IV de LV-VSVG (Figure 41B).

Les réponses immunitaires au niveau tissulaire n'ont pas été étudiées car les vecteurs LV-VSVG ne transduisent pas le poumon.

Ces résultats suggèrent que les vecteurs pseudotypés avec les syncytines induisent des réponses immunitaires plus faibles contre le transgène et contre la capsid, en comparaison avec un vecteur pseudotypé par VSVG.

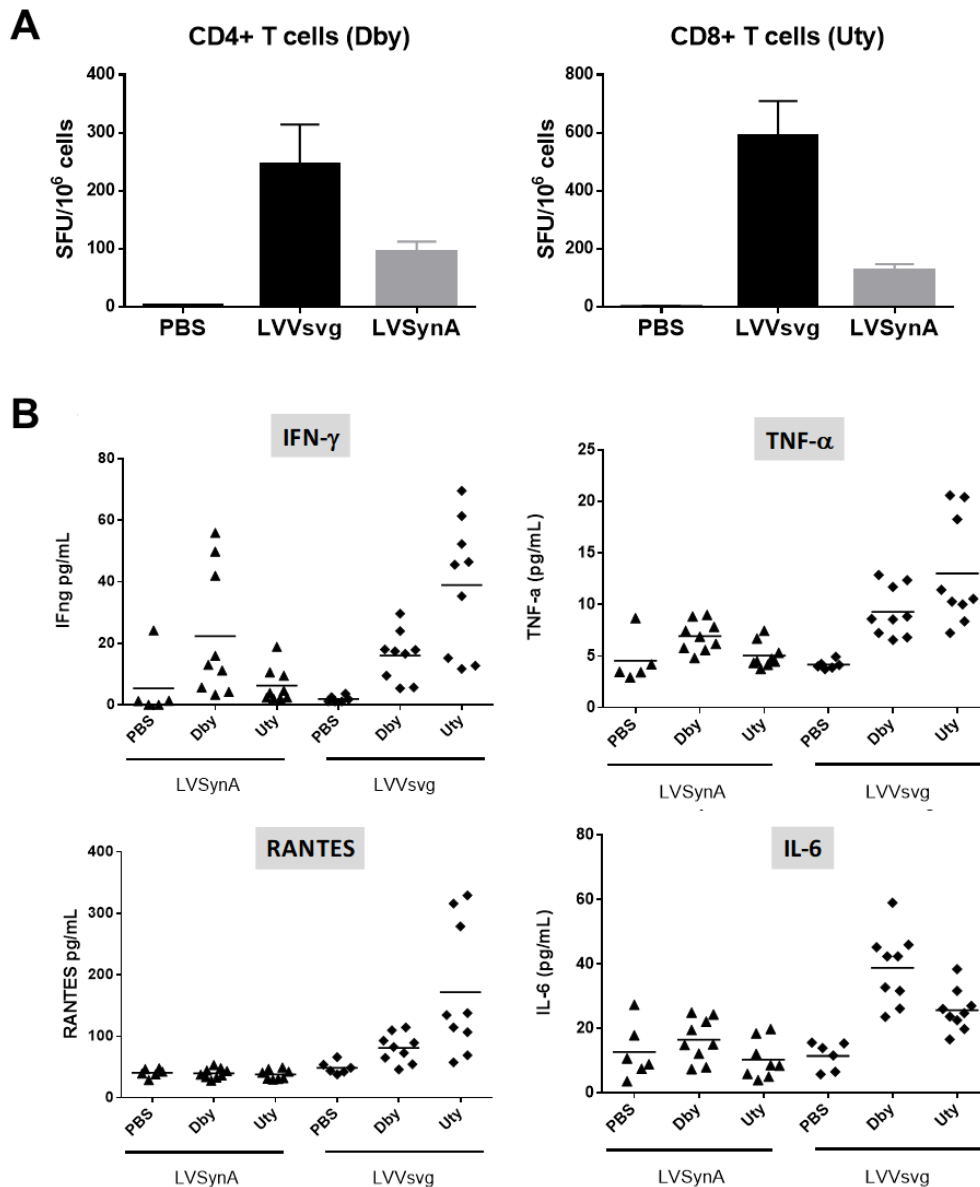


Figure 41 : Réduction des réponses immunes anti-transgène après injection IV de vecteurs LV-SynA par rapport aux vecteurs LV-VSVG mesurées par ELISpot et CBA

Des souris C57BL/6 femelles ont été injectées par voie IV dans la veine de la queue avec du PBS ou avec 7.5×10^5 IG par souris de LV-SynA-GFP_HY ou LV-VSVG-GFP_HY, et sacrifiées 21 jours post-injection. (A) Mesure des réponses Dby spécifiques des lymphocytes T CD4+ et Uty spécifiques des lymphocytes T CD8+ à partir des splénocytes de ces souris par ELISpot IFN γ après stimulation peptidique *in vitro*. Résultats exprimés en moyenne avec les écarts-type pour n=3 souris par groupe (B) Stimulation des splénocytes de ces souris par les peptides Uty, Dby ou Concanavalin A et titration par CBA après 36h de culture sur les surnageants. Résultats de 3 expériences indépendantes avec 3 souris par groupe dans chaque expérience, en moyenne avec les écarts-type.

3.4. Conclusions/Discussion sur la Partie 3

Nous avons montré dans cette étude la capacité des vecteurs lentiviraux pseudotypés par la syncytine A à transduire les cellules du poumon, à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, après une seule injection par voie systémique en IV, nous avons montré que les vecteurs LV-SynA étaient capables de cibler le poumon. Des études sont en cours pour connaître de façon plus précise les cellules transduites. D'après les premières informations que nous avons, il semblerait que les cellules ciblées appartiennent à l'épithélium bronchique. Si nous confirmons cette hypothèse, les vecteurs LV-SynA pourraient avoir un intérêt en thérapie génique de pathologies pulmonaires, et notamment pour le traitement de la mucoviscidose. De nombreuses approches de thérapie génique ont été étudiées pour cette pathologie, incluant différents types de vecteurs et différentes voies d'administration. Des essais cliniques donnent des résultats satisfaisants pour le transfert du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) avec des vecteurs de type AAV (Moss et al., 2007) ou avec des complexes ADN-liposomes (Alton et al., 2015; Hyde et al., 2000), cependant ces approches nécessitent des ré-administrations de vecteur car ils ne sont pas intégratifs. De plus, la plupart des études réalisées ont recours à la voie intra-nasale par aérosol pour l'administration des vecteurs de thérapie génique, or une couche de mucus recouvre l'épithélium respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, rendant moins accessibles les cellules cibles, les vecteurs peuvent donc être « piégés » dans le mucus et éliminés. De plus, l'utilisation d'aérosols peut poser des questions en termes de sécurité, avec un risque potentiel de dissémination du vecteur, et un risque de ne pas contrôler la dose exacte reçue par le patient.

Le tropisme pulmonaire des LV-SynA *in vivo* peut s'expliquer par la forte expression du récepteur de la syncytine A, Ly6e, au niveau du poumon chez la souris (Bacquin et al., 2017). Nous avons voulu vérifier *in vitro* les résultats attendus chez l'homme. Les vecteurs pseudotypés par la syncytine A permettent une transduction de la lignée MRC5 de fibroblastes humains mais également de cellules primaires épithéliales des voies aériennes inférieures humaines. De façon intéressante, nous avons également montré l'intérêt des vecteurs pseudotypés par la syncytine 2 sur ces mêmes cellules, qui permettent une transduction plus forte que les vecteurs LV-SynA. Les LV-Syn2 ne permettent pas, chez la souris, de cibler le poumon après administration par voie systémique (données non montrées), mais nous pensons que des études complémentaires sont nécessaires car ces vecteurs représentent une nouvelle approche prometteuse pour le transfert de gènes dans les cellules épithéliales pulmonaires.

Nous avons également montré une baisse des réponses immunes contre le transgène après administration par voie intra-veineuse de LV-SynA par rapport aux LV-VSVG. Nous

avons en effet mesuré une réponse T CD4 et CD8 inférieure pour les LV-SynA, voire même très basse, et également une production de cytokines pro-inflammatoires diminuée. Cette observation nous conforte dans notre hypothèse de départ. En effet, les syncytines étant des protéines endogènes, elles ne doivent pas être reconnues comme éléments du « non-soi » et ne vont donc pas entraîner de réponses immunitaires, permettant même une ré-administration du vecteur si besoin. De plus, ces glycoprotéines possèdent un domaine immunosuppresseur dans leur séquence, qui devrait renforcer l'aspect « invisible » des vecteurs envers le système immunitaire de l'hôte. Nous n'avons pas étudié les réponses immunes contre les autres vecteurs pseudotypés par les syncytines, des études complémentaires portant sur les LV-SynB, LV-Syn1 et LV-Syn2 seront menées par la suite. Nous avons également étudié les réponses immunes des LV-SynA toujours en comparaison avec les LV-VSVG par une autre voie d'administration que la voie IV, et connue pour être la plus immunogène, la voie intramusculaire. Après administration de vecteurs LV-SynA en IM dans le *tibialis anterior*, peu ou pas de réponses immunes sont observées, très largement inférieures aux réponses mesurées après injection de LV-VSVG (données non montrées).

CONCLUSIONS & DISCUSSION

Mon travail de thèse confirme la possibilité d'endogéniser des LV avec des protéines cellulaires autologues et mes résultats montrent pour la première fois la possibilité de pseudotyper des vecteurs LV avec les syncytines murines A et B. Les vecteurs lentiviraux sont des outils de transfert de gènes intéressants dans un contexte de thérapie génique pour des maladies génétiques ou des pathologies cancéreuses, et potentiellement pour les maladies infectieuses. Les vecteurs LV pseudotypés par la protéine VSVG sont, aujourd'hui, les plus utilisés et particulièrement en clinique mais leur utilisation est limitée *ex vivo*. Toutefois, un intérêt croissant est porté au développement de nouveaux pseudotypes d'enveloppe lentiviraux. En effet, les vecteurs LV-VSVG ont un tropisme très large, cependant certains types cellulaires restent inefficacement transduits par ces vecteurs, n'exprimant pas le récepteur à la protéine VSVG, le LDL-R (Amirache et al., 2014). Il est également intéressant de développer de nouveaux pseudotypes d'enveloppe lentiviraux, afin d'obtenir des vecteurs qui possèdent un tropisme cellulaire plus spécifique et ciblé, afin d'éviter des effets indésirables liés à la dissémination du vecteur ou à une biodistribution trop large, en fonction des applications envisagées. De plus, pour une utilisation « *in vivo* », les vecteurs LV-VSVG ne représentent pas un bon outil, étant inactivés par le complément du sérum humain (DePolo et al., 2000) et entraînant des réponses immunitaires après injection par voie intraveineuse (Cire et al., 2014). Le développement de nouveaux vecteurs peut permettre le développement de vecteurs moins immunogènes, avec un tropisme plus ciblé, plus adaptés à une utilisation *in vivo*. D'ailleurs plusieurs groupes travaillent sur cette question qui a été revue récemment par C. Buchholz (Buchholz et al., 2015).

Ce travail rapporte pour la première fois un pseudotypage fonctionnel de vecteurs lentiviraux avec les syncytines. Ces vecteurs sont infectieux en présence d'un adjuvant de transduction, la Vectofusin-1. Ces vecteurs présentent un tropisme de transduction particulier *in vitro* pour les lymphocytes B. Il est ainsi possible de transduire de façon efficace des lymphocytes B primaires quiescents humains et murins avec les LV-Syn. Nous avons montré la possibilité de transduire des cellules de moelle osseuse de souris avec les LV-SynA ou LV-SynB, à différents stades de développement (pré-pro-B, pro-B, pré-B et B matures). De façon tout à fait intéressante et surprenante, les vecteurs LV-SynA permettent un transfert de gènes dans la rate après une administration par voie intra-veineuse, et ce après une seule injection du vecteur. Plus précisément, ce sont les lymphocytes B qui expriment le transgène, confirmant *in vivo* le tropisme des vecteurs observé *in vitro*. Les études de biodistribution *in vivo* du vecteur nous ont également permis de mettre en évidence un transfert de gènes au niveau pulmonaire par les LV-SynA, et nous avons pu confirmer la transduction de cellules épithéliales pulmonaires primaires d'origine humaine lors d'essais *in vitro*.

1. La vectorologie des vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines

Ce travail a permis de démontrer la possibilité de pseudotyper des vecteurs lentiviraux par les syncytines. Les particules ainsi produites sont infectieuses en présence de Vectofusin-1 comme adjuvant de transduction. Les vecteurs sont résistants à la concentration par ultracentrifugation, contrairement à d'autres pseudotypes d'enveloppe plus fragiles comme GaLV ou RD114 (Kim and Lim, 2017; Sandrin et al., 2002), cependant une seule récolte des vecteurs est possible contrairement aux vecteurs LV-VSVG pour lesquels deux récoltes des surnageants est réalisée. Les titres infectieux obtenus pour les LV-Syn sont inférieurs à ceux obtenus pour des vecteurs LV-VSVG. Lors des études réalisées *in vivo* chez la souris, les vecteurs ont été injectés purs, et la quantité maximale a ainsi été injectée. Pour obtenir une meilleure efficacité de transduction *in vivo*, il serait intéressant d'optimiser la concentration et la purification des vecteurs.

Les séquences des syncytines utilisées pour pseudotyper les vecteurs LV dans cette étude sont les séquences natives des syncytines, sans modifications de celles-ci. Il est fréquent d'apporter des modifications au niveau de la queue cytoplasmique des glycoprotéines d'enveloppe afin d'améliorer les rendements de production ou la capacité d'encapsidation des vecteurs. La queue cytoplasmique peut ainsi être tronquée, on parle alors de TR ou Rless. Des modifications de la queue cytoplasmique ont notamment été reportées pour la glycoprotéine du gibbon GaLV (Christodouloupoulos and Cannon, 2001; Salmon et al., 2000; Stitz et al., 2000), du félin RD114 (Sandrin et al., 2002) ou du babouin BaE (Girard-Gagnepain et al., 2014) avec succès, augmentant les rendements de production des vecteurs et leur efficacité de transduction. Il serait donc intéressant de réaliser des mutants des syncytines avec une queue cytoplasmique tronquée, qui nous pourraient nous permettre d'améliorer les titres des vecteurs obtenus. Lors de la caractérisation des vecteurs LV-Syn par analyse par suivi des nanoparticules grâce au NanoSight, nous avons observé une différence de taille entre les particules pseudotypées par les différentes syncytines qui sont plus grandes que les particules pseudotypées par la protéine VSVG. En utilisant des mutants syncytine-TR ou syncytine-Rless, cette différence pourrait être réduite, favorisant ainsi l'encapsidation des vecteurs.

De plus, aucune méthode n'a pour le moment été développée pour la purification des vecteurs LV-Syn. Ces vecteurs sont résistants à l'ultracentrifugation et cette méthode a donc été utilisée pour concentrer et purifier les vecteurs dans cette étude. Cette méthode est suffisante pour produire des lots à l'échelle recherche, mais il serait intéressant de développer des méthodes pour une plus grande échelle, notamment dans un premier temps pour

améliorer la qualité des vecteurs administrés *in vivo* chez la souris. Une étude récente a permis de développer un procédé de purification pour des vecteurs lentiviraux pseudotypés par la protéine GaLV. Cette étude rapporte que l'ajout de MgCl₂ et de sucrose dans les différents tampons au cours de la concentration, de la diafiltration et de la purification permettent de garantir une meilleure stabilité des vecteurs. Le procédé décrit dans cette étude préconise une étape de filtration en flux tangentiel qui permet de concentrer les vecteurs et de les diafiltrer, puis une chromatographie échangeuse d'anions afin de purifier les vecteurs (Boudeffa et al., 2019). Il serait très intéressant d'appliquer cette méthode pour la purification des vecteurs pseudotypés par les syncytines, afin d'obtenir un produit fini plus concentré et plus propre.

2. Les cellules ciblées par les LV-Syn et interactions avec leurs récepteurs

Les vecteurs pseudotypés par les syncytines présentent un tropisme de transduction particulier pour les lymphocytes B. Ces cellules du système immunitaire sont difficiles à transduire, les vecteurs LV-VSVG ne permettant pas une transduction efficace de lymphocytes B primaires, car ces cellules n'expriment pas ou faiblement son récepteur, le LDL-R (Amirache et al., 2014). De nouveaux pseudotypes ont été développés afin d'obtenir des vecteurs permettant un transfert de gènes dans les lymphocytes B. C'est le cas par exemple de vecteurs pseudotypés par les glycoprotéines H et F de la rougeole (MV-LV) ou de mutants de cette glycoprotéine fusionnés à un scFv permettant de cibler le récepteur CD20 ou CD19 exprimé à la surface des lymphocytes B (Funke et al., 2008; Kneissl et al., 2013). Ces vecteurs permettent une efficacité de transduction de l'ordre de 20% sur cellules non activées (Kneissl et al., 2013). Les vecteurs pseudotypés par la glycoprotéine endogène du babouin (BaEV) permettent d'obtenir 40% de transduction de lymphocytes B non activés (Girard-Gagnepain et al., 2014). Les vecteurs que nous avons développés, pseudotypés par les syncytines humaines ou murines, permettent d'obtenir 65% de transduction de lymphocytes B non activés. Ce tropisme pour les lymphocytes B est très particulier, et nous avons également montré la possibilité de transduire différentes sous-populations de lymphocytes B, à des stades de développement précoces (pré-pro-B) ou avancés (lymphocytes B matures).

De façon intéressante, aucune spécificité d'espèce n'est observée, les LV-Syn1 et -Syn2 sont ainsi capables de transduire des lymphocytes B primaires humains ou murins ; et les LV-SynA ou-SynB permettent une transduction à la fois de lymphocytes B primaires murins comme humains. D'après les connaissances au sujet des récepteurs de ces glycoprotéines, cette observation est assez surprenante. En effet, la Syncytine 1 emprunte les récepteurs ASCT1 et ASCT2 (Blond et al., 2000; Lavillette et al., 2002), la Syncytine 2 a pour récepteur

MSFD2a (Esnault et al., 2008) et la Syncytine A utilise le récepteur Ly6e. Quant à la Syncytine B, son récepteur est à ce jour inconnu, mais elle n'emprunterait pas le récepteur Ly6e (Bacquin et al., 2017). Les lymphocytes B murins expriment le récepteur Ly6e, contrairement aux cellules non B (CD19-), ce qui permet d'expliquer la forte transduction de ces cellules par les LV-SynA, cependant les LV-SynB transduisent également les lymphocytes B, en empruntant un récepteur différent. De plus, les lymphocytes T sont également transduits par les LV-SynA et -SynB, à des niveaux plus modérés que les lymphocytes B (données non montrées), bien que les cellules CD19- n'expriment pas le récepteur Ly6e. Ces observations, en plus de la non spécificité d'espèces, nous laissent supposer l'existence d'un autre récepteur, qui serait commun aux syncytines, et/ou d'un co-récepteur. Ce récepteur ou co-récepteur serait particulièrement exprimé par les lymphocytes B.

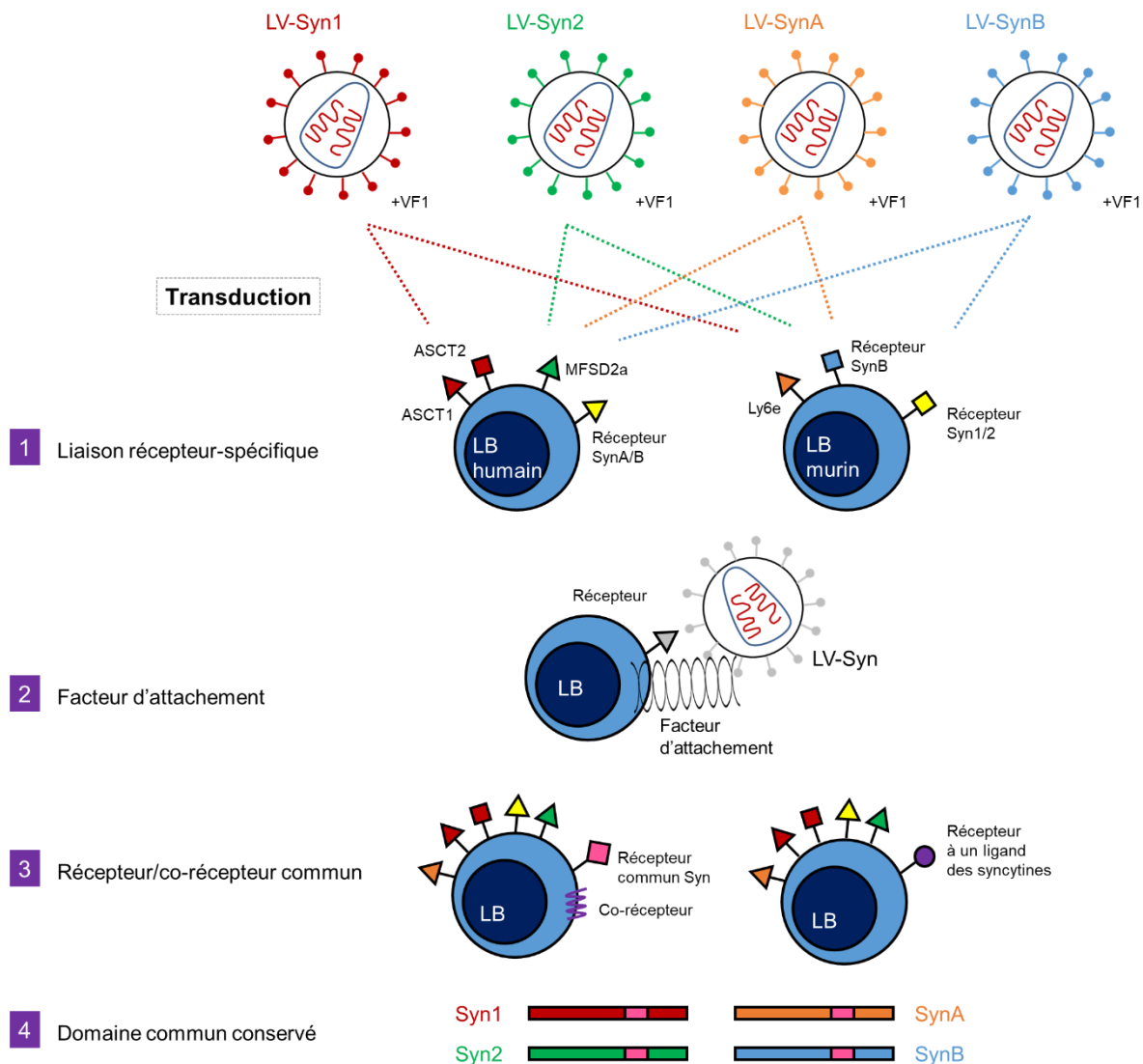


Figure 42 : Interactions des vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines avec les lymphocytes B humains et murins

Lors de l'étude de la biodistribution de vecteurs LV-SynA chez la souris, une transduction de la rate a pu être mise en évidence, et plus particulièrement des lymphocytes B. Des vecteurs pseudotypés par les syncytines humaines 1 et 2 ont également été injectés par voie IV chez la souris (données non montrées). De façon suprenante, les LV-Syn1 permettent également de cibler la rate, et uniquement cet organe, après injection IV chez des souris C57BL/6. Des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer si ce sont les lymphocytes B qui sont ciblés, et si d'autres splénocytes sont transduits. Ces résultats confortent les résultats obtenus *in vitro*. Après injection de LV-Syn2, aucun signal n'est observé chez les souris, ni dans la rate ni dans aucun autre organe. Des expériences supplémentaires sont nécessaires concernant ces vecteurs, afin de déterminer si cette absence de signal peut être due à un de lot de vecteur injecté qui ne serait pas de bonne qualité ou si un mécanisme d'entrée, lié à la taille des particules, à l'expression d'un récepteur ou à une réponse immunitaire contre le vecteur seraient à l'origine de cette différence entre les résultats observés *in vitro* et *in vivo*.

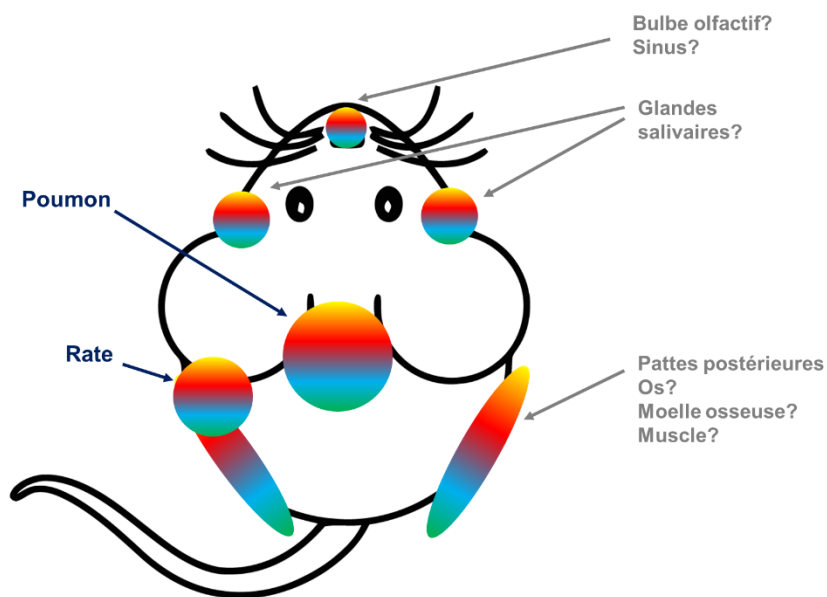


Figure 43 : Représentation schématique de la biodistribution d'un vecteur LV-SynA-LucII chez la souris

Le poumon et la rate expriment le transgène luciférase et présentent une intégration du vecteur. Certains organes expriment la luciférase, sans que nous ayons pu les identifier à l'heure actuelle : au niveau du bulbe olfactif ou des sinus, au niveau des glandes salivaires, et au niveau des pattes postérieures (l'os, la moelle osseuse ou le muscle ?)

Deux stratégies sont envisagées afin de déterminer le rôle de Ly6e sur l'entrée des LV-Syn. La première consiste à déléter Ly6e en générant une lignée A20.IIa-Ly6eKO et à transduire cette lignée par différents vecteurs LV-Syn, pour déterminer si cette délétion de Ly6e entraîne un effet : pas d'entrée du vecteur, entrée diminuée par rapport à la lignée sauvage ou pas de différence sur l'entrée du vecteur et donc l'efficacité de transduction. Cette expérience pourrait nous aider à comprendre le rôle de Ly6e, et la présence potentielle d'autres facteurs influant sur l'entrée des vecteurs LV-Syn dans les lymphocytes B. Toujours dans le but de comparer un modèle n'exprimant pas le récepteur Ly6e, il serait également intéressant d'étudier le tropisme de vecteurs LV-Syn chez des souris Ly6e^{-/-} (Langford et al., 2018), qui nous permettraient de comparer la biodistribution de vecteurs LV-Syn en comparaison de souris de phénotype sauvage, afin de mieux comprendre le ciblage observé après injection des LV-Syn chez la souris. La deuxième stratégie repose sur la surexpression de Ly6e au niveau des cellules A20.IIa par stimulation de l'Interferon, Ly6e appartenant à une famille de protéines appelées ISGs (Interferon Stimulated Genes). D'une part, Ly6e, qui appartient aux ISGs, sert de récepteur à la syncytine A et joue ainsi un rôle dans le processus de fusion entre les cytotrophoblastes lors du développement du placenta (Bacquin et al., 2017; Langford et al., 2018). D'autre part, les IFITMs (Interferon Induced Transmembrane Proteins) appartiennent également à la famille des ISGs et leur expression entraîne une inhibition de la fusion des cytotrophoblastes (Buchrieser et al., 2019). L'expression de ces différentes protéines est peut-être régulée de façon physiologique par une boucle de rétrocontrôle afin de réguler la fusion. Les IFITMs jouent également un rôle antiviral, en agissant comme facteurs de restrictions de plusieurs familles de virus, et notamment du virus du VIH-1 (Compton et al., 2014; Yu et al., 2015). Une stimulation de la voie de l'interféron peut donc soit conduire à une inhibition de la transduction par expression de protéines de la famille IFITMs, ou bien à une meilleure efficacité de la transduction par stimulation et surexpression de Ly6e.

In vitro, il est possible de transduire des cellules dendritiques humaines avec des vecteurs LV-Syn1 ou -Syn2. Cette population cellulaire n'a pas été étudiée chez la souris, il serait donc intéressant d'évaluer la possibilité de transduction de ces cellules, des cellules présentatrices d'antigène, avec les LV-SynA et -SynB sur des cellules d'origine humaine et murine, et également avec les LV-Syn1 et -Syn2 sur cellules murines, afin de compléter cette étude et mieux comprendre les interactions entre les syncytines et les cellules du système immunitaire, notamment avec les cellules présentatrices d'antigènes.

Chez la souris, l'efficacité de transduction des LV-Syn a été évaluée jusqu'aux cellules pré-pro-B, mais pas sur cellules souches. Des expériences réalisées sur des cellules souches hématopoïétiques (CSH) humaines CD34⁺ issues de sangs de cordon, n'ont pas permis de montrer une transduction de ces cellules avec les LV-Syn1 ni avec les LV-Syn2. Ces résultats

sont surprenants étant donné que les CSH expriment les récepteurs à la syncytine 1, ASCT1 et ASCT2 (Oburoglu et al., 2014). Les vecteurs lentiviraux pseudotypés par les protéines BaEV ou RD114 par exemple, qui utilisent le récepteur ASCT1 comme la syncytine 1, sont capables de transduire de façon efficace ces CSH (Girard-Gagnepain et al., 2014; Porter et al., 1996). Ces résultats laissent supposer la présence d'un facteur de restriction à ces vecteurs, ou l'absence d'expression d'un co-récepteur, ce qui conforterait notre hypothèse précédemment énoncée.

Les études de biodistribution de vecteurs LV-SynA réalisées chez la souris ont permis de mettre en évidence un tropisme pulmonaire de ces vecteurs. L'explication de ce tropisme a été apportée par la publication du récepteur à la Syncytine A, Ly6e, qui est fortement exprimé au niveau pulmonaire (Bacquin et al., 2017). Lorsque les vecteurs LV-Syn1 ou LV-Syn2 sont injectés chez la souris, le poumon n'est pas ciblé. Afin de pouvoir simuler ce qui se passe chez l'homme, des cellules d'origine pulmonaire ont été transduites avec des vecteurs LV-Syn. Les cellules en question sont une lignée de fibroblastes pulmonaires humains, les MRC5, et des cellules primaires épithéliales des voies aériennes inférieures, les cellules HSAEC (Human Small Airway Epithelial Cells). De façon tout à fait intéressante, les résultats obtenus indiquent que les vecteurs LV-Syn sont capables de transduire des cellules pulmonaires, et plus particulièrement des cellules primaires épithéliales pulmonaires. Cette transduction est stable jusqu'à au moins 30 jours post-transduction (données non montrées). Les vecteurs LV-SynA et LV-Syn2 sont particulièrement efficaces pour la transduction de cellules épithéliales pulmonaires humaines.

Les différents résultats obtenus quant au tropisme de transduction des vecteurs LV-Syn laissent supposer un lien particulier entre ces cellules du système immunitaire et les syncytines. Celles-ci possèdent un domaine immunosuppresseur d'une vingtaine d'acides aminés dans leurs séquences (Mangeney et al., 2007) qui confèreraient aux syncytines des propriétés immunosuppressives ou immunomodulatrices. Il est donc possible que les syncytines interagissent de façon si particulière avec les lymphocytes B grâce à leurs propriétés immunomodulatrices, ou par leur domaine ISD. Ces hypothèses et les mécanismes associés restent à étudier.

Les syncytines sont impliquées dans le processus de régénération du muscle squelettique (Bjerregard et al., 2014; Horsley and Pavlath, 2004; Oluwole et al., 2007; Redelsperger et al., 2016), qui mettent en jeu des mécanismes de fusion entre myoblastes et myotubes. Les vecteurs lentiviraux pseudotypés syncytines pourraient donc être de bons

candidats pour réaliser du transfert de gènes au niveau musculaire, leurs récepteurs devant être exprimés par les myotubes lors de la fusion. Dans le but de vérifier cette hypothèse, des expériences ont été menées au laboratoire chez des souris de phénotype sauvage, dont les muscles ne sont pas en régénération, et chez des modèles de souris dystrophiques : les souris mdx qui ont un phénotype dystrophique puisqu'il s'agit d'un modèle pour la myopathie de Duchenne (Sicinski et al., 1989) et les souris *Sgca*^{-/-} déficientes pour l' α -sarcoglycane qui sont un modèle de dystrophie des ceintures de type LGMD2D, dont les muscles subissent différents cycles de dégénération/régénération accompagnés de fusion cellulaire lors des phases de régénération. Des résultats très encourageants ont été obtenus, montrant la possibilité de faire du transfert de gènes dans le muscle de souris dystrophiques. Ces résultats suggèrent également que le muscle doit être en phase de régénération pour que les vecteurs puissent rentrer dans les fibres musculaires. Les vecteurs pseudotypés par les syncytines pourraient donc être de nouveaux outils de thérapie génique pour des pathologies musculaires de type dystrophies (Galy and Ferrand, 2019).

3. Applications thérapeutiques potentielles des LV-Syn

Le tropisme des LV-Syn pour les lymphocytes B nous laissent envisager de potentielles applications thérapeutiques en immunothérapie, par la création de cellules Breg ou encore pour le traitement de maladies auto-immunes.

Des vecteurs LV-SynA et LV-Syn2 codant pour de l'interleukine 10 (IL-10) humaine recombinante ont été produits, et des splénocytes murins ont été transduits avec ces vecteurs. De l'IL-10 humaine est sécrétée dans le surnageant de culture, après dosage par ELISA, après 3 jours et 7 jours de culture (données non montrées). Ces résultats préliminaires sur splénocytes totaux sont très encourageants, et nous laissent envisager la possibilité de créer des lymphocytes B régulateurs (Breg) en utilisant les vecteurs LV-Syn. Les Breg sont des cellules qui vont interagir, en particulier via la production d'IL-10, avec différentes cellules du système immunitaire, modulant ainsi les réponses immunitaires et instaurant un environnement anti-inflammatoire (Rosser and Mauri, 2015), et pourraient être utilisées en thérapie pour des stratégies d'immunomodulation.

La possibilité de faire un transfert de gènes dans les lymphocytes B permet d'envisager d'apporter un transgène codant pour un anticorps recombinant dans le cas d'immunothérapies, par exemple pour le traitement de maladies autoimmunes ou de cancers. Il est également possible, dans le cas de cancers de type lymphomes, d'apporter un transgène

codant pour un gène qui contrôle le cycle cellulaire ou qui engendre la mort cellulaire. Les lymphocytes B étant des cellules présentatrices d'antigènes, il est également envisageable d'apporter des séquences antigéniques qui seront présentées aux lymphocytes T, dans le cadre de vaccination pour des maladies infectieuses, pour le traitement de cancers ou pour l'induction d'une tolérance immunitaire.

Les syncytines peuvent également être utilisées pour pseudotyper des vecteurs de type IDLV (Intégrase Deficient Lentiviral Vector), des vecteurs lentiviraux déficients pour l'intégrase, ne permettant donc pas l'intégration dans la cellule hôte de son génome. Ces outils sont particulièrement intéressants dans le cadre de stratégies de thérapie génique par édition du génome (Wanisch and Yáñez-Muñoz, 2009). La découverte des ciseaux génétiques CRISPR/Cas9 (Doudna and Charpentier, 2014) a révolutionné le domaine, et leurs différentes applications, notamment en thérapie génique ne cesse de croître, avec des approches envisagées pour différents organes ou types cellulaires, *ex vivo* mais aussi *in vivo*. L'édition du génome de lymphocytes B primaires, dont l'une des principales limites est de trouver un outil efficace pour cibler ces cellules pour apporter le matériel génétique ainsi que la nucléase, connaît un intérêt croissant. Les principaux vecteurs utilisés *ex vivo* pour les cellules d'origine hématopoïétique sont les AAV6, qui sont efficaces sur les cellules souches hématopoïétiques (Ling et al., 2016; Schiroli et al., 2019), sur les lymphocytes T (ref) (Wang et al., 2016) ou B (Hung et al., 2018; Johnson et al., 2018), mais qui présentent toutefois une toxicité cellulaire assez forte avec activation de la voie p53 (Schiroli et al., 2019). D'autres études utilisent des particules appelées nanoblades avec à leur surface la glycoprotéine BaEV. Ces outils semblent être efficaces pour l'édition du génome de cellules d'origine hématopoïétiques, et pourraient être utilisés *in vivo* (Mangeot et al., 2019). Des vecteurs IDLV-Syn pourraient servir de nouveaux outils pour permettre de cibler efficacement les lymphocytes B, avec une capacité d'encapsulation plus grande que des vecteurs de type AAV, moins de toxicité cellulaire et qui soient moins immunogènes. Ces vecteurs pourraient, de plus, être utilisés *in vivo*. Les travaux dans ce domaine sont de plus en plus nombreux, et plusieurs études ont montré la possibilité d'éditer les chaînes des immunoglobulines (Cheong et al., 2016; Hartweiger et al., 2019; Moffett et al., 2019; Voss et al., 2019). Ces approches pourraient être utiles pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques soit dans le cadre du remplacement d'un gène dans les lymphocytes B (en oncologie ou pour le traitement de maladies auto-immunes par exemple), mais aussi pour des maladies infectieuses ou auto-immunes par modification de la spécificité antigénique ou par commutation isotypique, avec la possibilité de faire sécréter des anticorps par les cellules, évitant ainsi les administrations répétées d'anticorps monoclonaux dans le cadre de pathologies chroniques, ou de développer de nouvelles stratégies vaccinales, par la production d'anticorps neutralisants à large spectre

(bNAbs pour broad neutralizing antibodies) par exemple en vaccination anti VIH-1 (Hartweger et al., 2019).

Lors de l'étude de la biodistribution de vecteurs LV-SynA chez la souris, nous avons observé une transduction du poumon par ces vecteurs. Les marquages de la luciférase (le transgène utilisé dans notre étude) sur coupes de poumon, ainsi que les tests de transduction *in vitro* réalisés sur les cellules HSAEC nous laissent penser que les cellules épithéliales pulmonaires sont efficacement transduites par ces vecteurs. Des immuno-marquages plus précis des différentes populations cellulaires pulmonaires sont en cours et devraient nous permettre de confirmer ce tropisme. Si les cellules épithéliales du poumon sont en effet permissives aux vecteurs LV-SynA, ces outils pourraient être étudiés comme nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de la mucoviscidose, et ce après injection par voie systémique. Les vecteurs lentiviraux représentent des outils intéressants pour le transfert du gène CFTR au niveau de l'épithélium respiratoire, notamment par leur capacité d'encapsulation suffisante pour le gène CFTR (environ 4.5kb) ou encore par leur capacité à infecter des cellules quiescentes et de pouvoir intégrer leur génome dans celui de leur cellule hôte. Le premier essai clinique portant sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour le traitement de la mucoviscidose est en préparation (Alton et al., 2017), et repose sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux dérivés du virus de l'immunodéficience simien (SIV) pseudotypés par les glycoprotéines F et HN du virus de Sendai (rSIV.F/HN) qui permettent une forte transduction de l'épithélium des voies aériennes (Griesenbach et al., 2012). L'épithélium pulmonaire est efficacement transduit *in vitro* et *in vivo* avec les vecteurs rSIV.F/HN après administration par voie intra-nasale (Alton et al., 2017). L'utilisation de vecteurs lentiviraux par voie intranasale n'engendre pas de réponse immunitaire au niveau local et il est donc possible de ré-administrer les vecteurs (Sinn et al., 2008). Cependant cette voie d'administration, largement étudiée dans les stratégies de thérapie génique de la mucoviscidose, présente certaines limites. La première est liée à la physiopathologie de la mucoviscidose, avec la présence d'une importante couche de mucus à la surface des cellules de l'épithélium respiratoire, pouvant créer une barrière physique à l'entrée des vecteurs dans les cellules. De plus, des risques liés à la sécurité sont à soulever, avec un risque de dissémination dans l'environnement de vecteurs contenant du matériel génétique lié à la diffusion par aérosol. L'utilisation d'aérosol par voie nasale pose également la question du contrôle de la dose exacte reçue par le patient, pour une efficacité optimale sans toxicité. C'est pourquoi le recours à la voie intra-veineuse avec les vecteurs LV-Syn nous semble être une approche prometteuse.

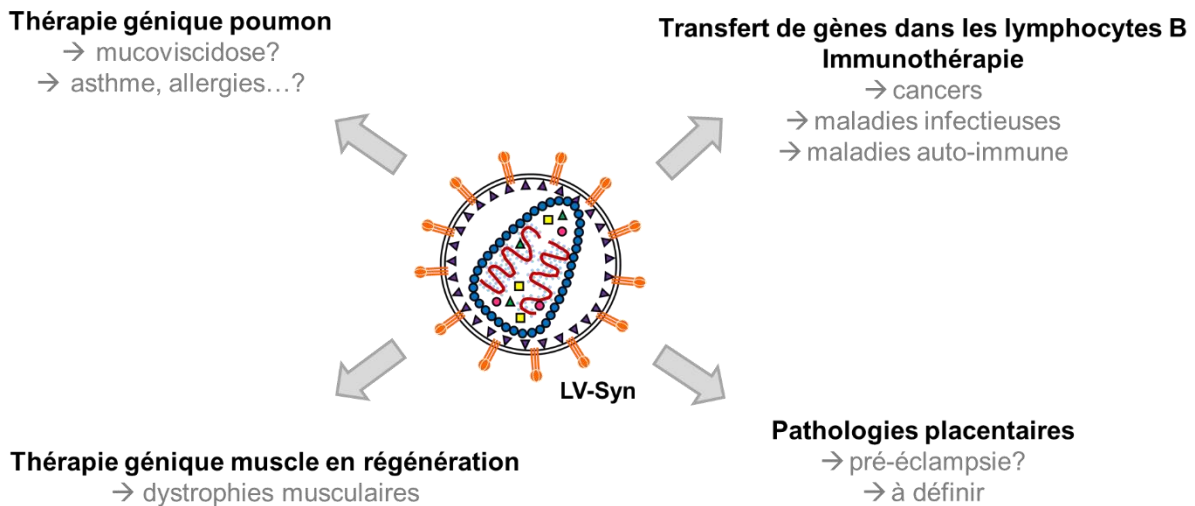


Figure 44 : Applications thérapeutiques potentielles des vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines

4. Les vecteurs lentiviraux pseudotypés syncytines, moins immunogènes que les LV-VSVG : une bonne alternative pour une utilisation *in vivo* ?

Les syncytines étant endogènes, et possédant dans leur séquence un domaine immunosuppresseur (Mangeny et al., 2007), nous avons fait l'hypothèse que des vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines pourraient apparaître « invisibles » pour le système immunitaire.

Des études réalisées au laboratoire, dont une partie est présentée dans ce manuscrit (Galy et al., 2019), ont permis de montrer que l'administration par voie intra-veineuse de vecteurs LV-SynA chez la souris sont moins immunogènes que les vecteurs LV-VSVG, connus pour leur immunogénicité *in vivo* (Cire et al., 2014). Les réponses anti-transgène T CD4 et CD8, mesurées par ELISpot grâce à l'utilisation du modèle HY, sont plus faibles avec les vecteurs LV-SynA en comparaison avec un LV-VSVG, et moins de cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées, après dosage par CBA. Les réponses anti-transgène peuvent empêcher la réadministration du vecteur, et entraîner une perte de fonctionnalité du transgène, ne permettant pas un niveau d'expression suffisant pour un effet thérapeutique, faisant des LV-SynA des vecteurs intéressants pour des stratégies de transfert de gène *in vivo*. De plus, les réponses anti-p24 détectées par ELISA sur des sérums de souris injectées avec des LV-SynA en comparaison avec des LV-VSVG, sont également plus faibles pour les vecteurs LV-SynA par rapport aux LV-VSVG, indiquant moins de production d'anticorps anti-p24 (protéine

de la capsidie lentivirale). Les LV-Syn sont donc des vecteurs intéressants pour une utilisation *in vivo*, mieux tolérés que les LV-VSVG.

Nous avons précédemment exposé la relation entre les syncytines et le système immunitaire, à travers le tropisme des LV-Syn pour les lymphocytes B. Les mécanismes mis en jeu sont pour l'heure inconnus, cette faible immunogénicité des LV-Syn pourrait être due à la présence du domaine ISD dans leur sous-unité trans-membranaire, ou à une immunosuppression liée à l'interaction des LV-Syn avec les lymphocytes B, par induction de mécanismes immunomodulateurs, par exemple suite à une interaction avec des lymphocytes Breg.

De plus, des travaux menés au laboratoire ont permis de mettre en évidence des réponses immunitaires très faibles, et bien inférieures aux vecteurs LV-VSVG suite à une injection par voie intra-musculaire, connue pour être la voie la plus immunogène (Galy and Ferrand, 2019). Les réponses anti-transgène T CD4 et CD8 sont plus faibles avec les vecteurs LV-SynA en comparaison avec un LV-VSVG, une plus faible quantité de cytokines inflammatoires est détectée. Cette observation est encourageante pour une utilisation de vecteurs pseudotypés par les syncytines pour un transfert de gène dans le muscle, avec une possibilité de réadministration du vecteur. En cela les vecteurs LV-Syn présentent un avantage par rapport aux vecteurs de type AAVs, fortement utilisés dans le cadre de transfert de gène au niveau musculaire, qui entraînent de fortes réponses immunitaires empêchant la réadministration. De plus, les réponses anti-transgènes peuvent entraîner une perte de fonctionnalité de ce transgène qui va être dégradé, faisant des vecteurs LV-Syn des outils intéressants pour un transfert de gène efficace.

Bibliographie

- Akkina, R.K., Walton, R.M., Chen, M.L., Li, Q.X., Planelles, V., and Chen, I.S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *Journal of virology* 70, 2581-2585.
- Alsat, E., Wyplosz, P., Malassiné, A., Guibourdenche, J., Porquet, D., Nessmann, C., and Evain-Brion, D. (1996). Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *Journal of cellular physiology* 168, 346-353.
- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *The EMBO journal* 3, 1209-1219.
- Alton, E., Armstrong, D.K., Ashby, D., Bayfield, K.J., Bilton, D., Bloomfield, E.V., Boyd, A.C., Brand, J., Buchan, R., Calcedo, R., *et al.* (2015). Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet Respiratory medicine* 3, 684-691.
- Alton, E.W., Beekman, J.M., Boyd, A.C., Brand, J., Carlon, M.S., Connolly, M.M., Chan, M., Conlon, S., Davidson, H.E., Davies, J.C., *et al.* (2017). Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 72, 137-147.
- Amirache, F., Levy, C., Costa, C., Mangeot, P.E., Torbett, B.E., Wang, C.X., Negre, D., Cosset, F.L., and Verhoeven, E. (2014). Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* 123, 1422-1424.
- Anderson, M.J., and Stanbridge, E.J. (1993). Tumor suppressor genes studied by cell hybridization and chromosome transfer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7, 826-833.
- Antony, J.M., Deslauriers, A.M., Bhat, R.K., Ellestad, K.K., and Power, C. (2011). Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? *Biochimica et biophysica acta* 1812, 162-176.
- Antony, J.M., van Marle, G., Opii, W., Butterfield, D.A., Mallet, F., Yong, V.W., Wallace, J.L., Deacon, R.M., Warren, K., and Power, C. (2004). Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nature neuroscience* 7, 1088-1095.
- Arcuri, F., Buchwalder, L., Toti, P., Cintonio, M., Tosi, P., Lockwood, C.J., Rybalov, B., and Schatz, F. (2007). Differential regulation of colony stimulating factor 1 and macrophage migration inhibitory factor expression by inflammatory cytokines in term human decidua: implications for macrophage trafficking at the fetal-maternal interface. *Biology of reproduction* 76, 433-439.
- Arru, G., Caggiu, E., Leoni, S., Mameli, G., Pugliatti, M., Sechi, G.P., and Sechi, L.A. (2015). Natalizumab modulates the humoral response against HERV-Wenv73-88 in a follow-up study of Multiple Sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences* 357, 106-108.

- Arru, G., Leoni, S., Pugliatti, M., Mei, A., Serra, C., Delogu, L.G., Manetti, R., Dolei, A., Sotgiu, S., and Mameli, G. (2014). Natalizumab inhibits the expression of human endogenous retroviruses of the W family in multiple sclerosis patients: a longitudinal cohort study. *Mult Scler* 20, 174-182.
- Ayinde, D., Casartelli, N., and Schwartz, O. (2012). Restricting HIV the SAMHD1 way: through nucleotide starvation. *Nature Reviews Microbiology* 10, 675-680.
- Bacquin, A., Bireau, C., Tanguy, M., Romanet, C., Vernochet, C., Dupressoir, A., and Heidmann, T. (2017). A Cell Fusion-Based Screening Method Identifies Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein Ly6e as the Receptor for Mouse Endogenous Retroviral Envelope Syncytin-A. *Journal of virology* 91.
- Baekelandt, V., Eggermont, K., Michiels, M., Nuttin, B., and Debysers, Z. (2003). Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene therapy* 10, 1933-1940.
- Bainbridge, J.W.B., Stephens, C., Parsley, K., Demaison, C., Halfyard, A., Thrasher, A.J., and Ali, R.R. (2001). In vivo gene transfer to the mouse eye using an HIV-based lentiviral vector; efficient long-term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium. *Gene therapy* 8, 1665-1668.
- Baron, R. (2001). L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Medecine sciences : M/S* 17, 1260-1269.
- Barr, S.D., Smiley, J.R., and Bushman, F.D. (2008). The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS pathogens* 4, e1000007.
- Bartz, S.R., Rogel, M.E., and Emerman, M. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *Journal of virology* 70, 2324-2331.
- Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews Immunology* 9, 15-27.
- Bell, A.J., Jr., Fegen, D., Ward, M., and Bank, A. (2010). RD114 envelope proteins provide an effective and versatile approach to pseudotype lentiviral vectors. *Exp Biol Med (Maywood)* 235, 1269-1276.
- Bender, R.R., Muth, A., Schneider, I.C., Friedel, T., Hartmann, J., Pluckthun, A., Maisner, A., and Buchholz, C.J. (2016). Receptor-Targeted Nipah Virus Glycoproteins Improve Cell-Type Selective Gene Delivery and Reveal a Preference for Membrane-Proximal Cell Attachment. *PLoS pathogens* 12, e1005641.
- Bernadin, O., Amirache, F., Girard-Gagnepain, A., Moirangthem, R.D., Levy, C., Ma, K., Costa, C., Negre, D., Reimann, C., Fenard, D., *et al.* (2019). Baboon envelope LVs efficiently transduced human adult, fetal, and progenitor T cells and corrected SCID-X1 T-cell deficiency. *Blood advances* 3, 461-475.
- Beyer, W.R., Westphal, M., Ostertag, W., and von Laer, D. (2002). Oncoretrovirus and Lentivirus Vectors Pseudotyped with Lymphocytic Choriomeningitis Virus Glycoprotein: Generation, Concentration, and Broad Host Range. *Journal of virology* 76, 1488.

- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., Davidson, N.O., Cho, S.J., and Malim, M.H. (2004). Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Current biology : CB* 14, 1392-1396.
- Bjerregaard, B., Holck, S., Christensen, I.J., and Larsson, L.I. (2006). Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 1906-1911.
- Bjerregaard, B., Ziomkiewicz, I., Schulz, A., and Larsson, L.I. (2014). Syncytin-1 in differentiating human myoblasts: relationship to caveolin-3 and myogenin. *Cell and tissue research* 357, 355-362.
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* 32, 129-140.
- Blaise, S., de Parseval, N., Benit, L., and Heidmann, T. (2003). Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13013-13018.
- Blond, J.L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F., and Cosset, F.L. (2000). An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *Journal of virology* 74, 3321-3329.
- Boudeffa, D., Bertin, B., Biek, A., Mormin, M., Leseigneur, F., Galy, A., and Merten, O.-W. (2019). Towards a scalable purification protocol of GaLV-TR pseudotyped lentiviral vectors. *Human gene therapy methods*.
- Bovia, F., Salmon, P., Matthes, T., Kvell, K., Nguyen, T.H., Werner-Favre, C., Barnet, M., Nagy, M., Leuba, F., Arrighi, J.F., *et al.* (2003). Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood* 101, 1727-1733.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., and Elledge, S.J. (2008). Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen. *Science* 319, 921.
- Brendel, C., Rothe, M., Santilli, G., Charrier, S., Stein, S., Kunkel, H., Abriss, D., Müller-Kuller, U., Gaspar, B., Modlich, U., *et al.* (2018). Non-Clinical Efficacy and Safety Studies on G1XCGD, a Lentiviral Vector for Ex Vivo Gene Therapy of X-Linked Chronic Granulomatous Disease. *Human Gene Therapy Clinical Development* 29, 69-79.
- Buchholz, C.J., Friedel, T., and Buning, H. (2015). Surface-Engineered Viral Vectors for Selective and Cell Type-Specific Gene Delivery. *Trends in biotechnology* 33, 777-790.
- Buchholz, C.J., Muhlebach, M.D., and Cichutek, K. (2009). Lentiviral vectors with measles virus glycoproteins - dream team for gene transfer? *Trends in biotechnology* 27, 259-265.
- Buchrieser, J., Degrelle, S.A., Couderc, T., Nevers, Q., Disson, O., Manet, C., Donahue, D.A., Porrot, F., Hillion, K.H., Perthame, E., *et al.* (2019). IFITM proteins inhibit placental syncytiotrophoblast formation and promote fetal demise. *Science* 365, 176-180.

- Bukovsky, A.A., Song, J.P., and Naldini, L. (1999). Interaction of human immunodeficiency virus-derived vectors with wild-type virus in transduced cells. *Journal of virology* 73, 7087-7092.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8033-8037.
- Campbell, E.M., and Hope, T.J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature reviews Microbiology* 13, 471-483.
- Carpentier, D.C.J., Vevis, K., Trabalza, A., Georgiadis, C., Ellison, S.M., Asfahani, R.I., and Mazarakis, N.D. (2012). Enhanced pseudotyping efficiency of HIV-1 lentiviral vectors by a rabies/vesicular stomatitis virus chimeric envelope glycoprotein. *Gene therapy* 19, 761-774.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., *et al.* (2009). Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818.
- Carty, D.M., Delles, C., and Dominiczak, A.F. (2010). Preeclampsia and future maternal health. *Journal of hypertension* 28, 1349-1355.
- Casartelli, N., Sourisseau, M., Feldmann, J., Guivel-Benhassine, F., Mallet, A., Marcelin, A.-G., Guatelli, J., and Schwartz, O. (2010). Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission. *PLoS pathogens* 6, e1000955-e1000955.
- Chan, S.Y., Speck, R.F., Ma, M.C., and Goldsmith, M.A. (2000). Distinct mechanisms of entry by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. *Journal of virology* 74, 4933-4937.
- Chang, C., Chen, P.T., Chang, G.D., Huang, C.J., and Chen, H. (2004). Functional characterization of the placental fusogenic membrane protein syncytin. *Biology of reproduction* 71, 1956-1962.
- Chang, C.C., Ciobotariu, R., Manavalan, J.S., Yuan, J., Colovai, A.I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., *et al.* (2002). Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nature immunology* 3, 237-243.
- Cheong, T.-C., Compagno, M., and Chiarle, R. (2016). Editing of mouse and human immunoglobulin genes by CRISPR-Cas9 system. *Nature communications* 7, 10934.
- Chernomordik, L.V., Zimmerberg, J., and Kozlov, M.M. (2006). Membranes of the world unite! *The Journal of cell biology* 175, 201-207.
- Chesarino, N.M., Compton, A.A., McMichael, T.M., Kenney, A.D., Zhang, L., Soewarna, V., Davis, M., Schwartz, O., and Yount, J.S. (2017). IFITM3 requires an amphipathic helix for antiviral activity. *EMBO Rep* 18, 1740-1751.
- Cheyne, V., Oriol, G., and Mallet, F. (2006). Identification of the hASCT2-binding domain of the Env ERVWE1/syncytin-1 fusogenic glycoprotein. *Retrovirology* 3, 41.

- Christodoulopoulos, I., and Cannon, P.M. (2001). Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *Journal of virology* 75, 4129-4138.
- Cire, S., Da Rocha, S., Yao, R., Fisson, S., Buchholz, C.J., Collins, M.K., and Galy, A. (2014). Immunization of mice with lentiviral vectors targeted to MHC class II+ cells is due to preferential transduction of dendritic cells in vivo. *PLoS one* 9, e101644.
- Clever, J.L., and Parslow, T.G. (1997). Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *Journal of virology* 71, 3407-3414.
- Compton, A.A., Bruel, T., Porrot, F., Mallet, A., Sachse, M., Euvrard, M., Liang, C., Casartelli, N., and Schwartz, O. (2014). IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. *Cell host & microbe* 16, 736-747.
- Cornelis, G., Funk, M., Vernochet, C., Leal, F., Tarazona, O.A., Meurice, G., Heidmann, O., Dupressoir, A., Miralles, A., Ramirez-Pinilla, M.P., *et al.* (2017). An endogenous retroviral envelope syncytin and its cognate receptor identified in the viviparous placental Mabuya lizard. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E10991-E11000.
- Cornelis, G., Heidmann, O., Bernard-Stoecklin, S., Reynaud, K., Veron, G., Mulot, B., Dupressoir, A., and Heidmann, T. (2012). Ancestral capture of syncytin-Car1, a fusogenic endogenous retroviral envelope gene involved in placentation and conserved in Carnivora. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E432-441.
- Cornelis, G., Heidmann, O., Degrelle, S.A., Vernochet, C., Lavialle, C., Letzelter, C., Bernard-Stoecklin, S., Hassanin, A., Mulot, B., Guillomot, M., *et al.* (2013). Captured retroviral envelope syncytin gene associated with the unique placental structure of higher ruminants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E828-837.
- Cornelis, G., Vernochet, C., Carradec, Q., Souquere, S., Mulot, B., Catzeflis, F., Nilsson, M.A., Menzies, B.R., Renfree, M.B., Pierron, G., *et al.* (2015). Retroviral envelope gene captures and syncytin exaptation for placentation in marsupials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E487-496.
- Cornelis, G., Vernochet, C., Malicorne, S., Souquere, S., Tzika, A.C., Goodman, S.M., Catzeflis, F., Robinson, T.J., Milinkovitch, M.C., Pierron, G., *et al.* (2014). Retroviral envelope syncytin capture in an ancestrally diverged mammalian clade for placentation in the primitive Afrotherian tenrecs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E4332-4341.
- Cornetta, K., and Anderson, W.F. (1989). Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *Journal of virological methods* 23, 187-194.
- Corre, G., Dessainte, M., Marteau, J.-B., Dalle, B., Fenard, D., and Galy, A. (2016). "RCL-Pooling Assay": A Simplified Method for the Detection of Replication-Competent Lentiviruses in Vector Batches Using Sequential Pooling. *Human gene therapy* 27, 202-210.

- Coudert, A.E., Redelsperger, F., Chabbi-Achengli, Y., Vernochet, C., Marty, C., Decrouy, X., Heidmann, T., de Vernejoul, M.-C., and Dupressoir, A. (2019). Role of the captured retroviral envelope syncytin-B gene in the fusion of osteoclast and giant cell precursors and in bone resorption, analyzed ex vivo and in vivo in syncytin-B knockout mice. *Bone Reports* 11, 100214.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763-767.
- Dardalhon, V., Jaleco, S., Kinet, S., Herpers, B., Steinberg, M., Ferrand, C., Froger, D., Laveau, C., Tiberghien, P., Charneau, P., *et al.* (2001). IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9277-9282.
- Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R., and Yarmush, M.L. (2004). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophysical journal* 86, 1234-1242.
- Delville, M., Soheili, T., Bellier, F., Durand, A., Denis, A., Lagresle-Peyrou, C., Cavazzana, M., Andre-Schmutz, I., and Six, E. (2018). A Nontoxic Transduction Enhancer Enables Highly Efficient Lentiviral Transduction of Primary Murine T Cells and Hematopoietic Stem Cells. *Molecular therapy Methods & clinical development* 10, 341-347.
- DePolo, N.J., Reed, J.D., Sheridan, P.L., Townsend, K., Sauter, S.L., Jolly, D.J., and Dubensky, T.W. (2000). VSV-G Pseudotyped Lentiviral Vector Particles Produced in Human Cells Are Inactivated by Human Serum. *Molecular Therapy* 2, 218-222.
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., and Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. *Retrovirology* 9, 87-87.
- Dolei, A. (2005). MSR/V/HERV-W/syncytin and its linkage to multiple sclerosis: the usability and the hazard of a human endogenous retrovirus. *Journal of neurovirology* 11, 232-235.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
- Drakopoulou, E., Georgomanoli, M., Lederer, C.W., Kleanthous, M., Costa, C., Bernadin, O., Cosset, F.-L., Voskaridou, E., Verhoeyen, E., Papanikolaou, E., *et al.* (2018). A Novel BaEV/Rless-Pseudotyped γ -Globin Lentiviral Vector Drives High and Stable Fetal Hemoglobin Expression and Improves Thalassaemic Erythropoiesis In Vitro. *Human gene therapy* 30, 601-617.
- Ducrey-Rundquist, O., Guyader, M., and Trono, D. (2002). Modalities of interleukin-7-induced human immunodeficiency virus permissiveness in quiescent T lymphocytes. *Journal of virology* 76, 9103-9111.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology* 72, 8463-8471.
- Dupressoir, A., and Heidmann, T. (2011). Les syncytines. *Medecine sciences : M/S* 27, 163-169.

Dupressoir, A., Laviaille, C., and Heidmann, T. (2012). From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* 33, 663-671.

Dupressoir, A., Marceau, G., Vernochet, C., Benit, L., Kanellopoulos, C., Sapin, V., and Heidmann, T. (2005). Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 725-730.

Dupressoir, A., Vernochet, C., Bawa, O., Harper, F., Pierron, G., Opolon, P., and Heidmann, T. (2009). Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12127-12132.

Dupressoir, A., Vernochet, C., Harper, F., Guegan, J., Dessen, P., Pierron, G., and Heidmann, T. (2011). A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, E1164-1173.

Durrer, P., Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., Graf, R., and Brunner, J. (1995). Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. *The Journal of biological chemistry* 270, 17575-17581.

Esnault, C., Cornelis, G., Heidmann, O., and Heidmann, T. (2013). Differential evolutionary fate of an ancestral primate endogenous retrovirus envelope gene, the EnvV syncytin, captured for a function in placentation. *PLoS genetics* 9, e1003400.

Esnault, C., Priet, S., Ribet, D., Vernochet, C., Bruls, T., Laviaille, C., Weissenbach, J., and Heidmann, T. (2008). A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17532-17537.

Fecteau, J.F., Roy, A., and Neron, S. (2009). Peripheral blood CD27+ IgG+ B cells rapidly proliferate and differentiate into immunoglobulin-secreting cells after exposure to low CD154 interaction. *Immunology* 128, e353-365.

Fenard, D., Genries, S., Scherman, D., Galy, A., Martin, S., and Kichler, A. (2013a). Infectivity enhancement of different HIV-1-based lentiviral pseudotypes in presence of the cationic amphipathic peptide LAH4-L1. *Journal of virological methods* 189, 375-378.

Fenard, D., Ingrao, D., Seye, A., Buisset, J., Genries, S., Martin, S., Kichler, A., and Galy, A. (2013b). Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. *Molecular therapy Nucleic acids* 2, e90.

Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature immunology* 3, 944-950.

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7306-7311.

Frank, A.M., and Buchholz, C.J. (2019). Surface-Engineered Lentiviral Vectors for Selective Gene Transfer into Subtypes of Lymphocytes. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 12, 19-31.

- Frecha, C., Costa, C., Levy, C., Negre, D., Russell, S.J., Maisner, A., Salles, G., Peng, K.W., Cosset, F.L., and Verhoeyen, E. (2009). Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood* 114, 3173-3180.
- Frecha, C., Costa, C., Negre, D., Gauthier, E., Russell, S.J., Cosset, F.L., and Verhoeyen, E. (2008). Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* 112, 4843-4852.
- Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature reviews Microbiology* 13, 484-496.
- Frendo, J.L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J.L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D., and Mallet, F. (2003). Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Molecular and cellular biology* 23, 3566-3574.
- Frese, S., Ruebner, M., Suhr, F., Konou, T.M., Tappe, K.A., Toigo, M., Jung, H.H., Henke, C., Steigleder, R., Strissel, P.L., *et al.* (2015). Long-Term Endurance Exercise in Humans Stimulates Cell Fusion of Myoblasts along with Fusogenic Endogenous Retroviral Genes In Vivo. *PLoS one* 10, e0132099.
- Friedel, T., Hanisch, L.J., Muth, A., Honegger, A., Abken, H., Pluckthun, A., Buchholz, C.J., and Schneider, I.C. (2015). Receptor-targeted lentiviral vectors are exceptionally sensitive toward the biophysical properties of the displayed single-chain Fv. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 28, 93-106.
- Funk, M., Cornelis, G., Vernochet, C., Heidmann, O., Dupressoir, A., Conley, A., Glickman, S., and Heidmann, T. (2019). Capture of a Hyena-Specific Retroviral Envelope Gene with Placental Expression Associated in Evolution with the Unique Emergence among Carnivorans of Hemochorial Placentation in Hyaenidae. *Journal of virology* 93.
- Funke, S., Maisner, A., Muhlebach, M.D., Koehl, U., Grez, M., Cattaneo, R., Cichutek, K., and Buchholz, C.J. (2008). Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 1427-1436.
- Funke, S., Schneider, I.C., Glaser, S., Mühlebach, M.D., Moritz, T., Cattaneo, R., Cichutek, K., and Buchholz, C.J. (2009). Pseudotyping lentiviral vectors with the wild-type measles virus glycoproteins improves titer and selectivity. *Gene therapy* 16, 700.
- Galy, A., Coquin, Y., and Ferrand, M. (2019). Use of syncytin for targeting drug and gene delivery to lung tissue, W.I.P. Organization, ed.
- Galy, A., and Ferrand, M. (2019). Use of syncytin for targeting drug and gene delivery to regenerating muscle tissue, W.I.P. Organization, ed.
- Galy, A., and Thrasher, A.J. (2011). Gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 11, 545-550.
- Gifford, R., and Tristem, M. (2003). The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus genes* 26, 291-315.
- Ginn, S.L., Amaya, A.K., Alexander, I.E., Edelstein, M., and Abedi, M.R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The Journal of Gene Medicine* 20, e3015.

Girard-Gagnepain, A., Amirache, F., Costa, C., Levy, C., Frecha, C., Fusil, F., Negre, D., Lavillette, D., Cosset, F.L., and Verhoeyen, E. (2014). Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood* 124, 1221-1231.

Griesenbach, U., Inoue, M., Meng, C., Farley, R., Chan, M., Newman, N.K., Brum, A., You, J., Kerton, A., Shoemark, A., *et al.* (2012). Assessment of F/HN-pseudotyped lentivirus as a clinically relevant vector for lung gene therapy. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186, 846-856.

Grimaitre, M., Werner-Favre, C., Kindler, V., and Zubler, R.H. (1997). Human naive B cells cultured with EL-4 T cells mimic a germinal center-related B cell stage before generating plasma cells. Concordant changes in Bcl-2 protein and messenger RNA levels. *European journal of immunology* 27, 199-205.

Grubb, B.R., Pickles, R.J., Ye, H., Yankaskas, J.R., Vick, R.N., Engelhardt, J.F., Wilson, J.M., Johnson, L.G., and Boucher, R.C. (1994). Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature* 371, 802-806.

Gustafson, K.S., and Ginder, G.D. (1996). Interferon-gamma induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1alpha to a distinct interferon-gamma-responsive element. *The Journal of biological chemistry* 271, 20035-20046.

Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo, M., *et al.* (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 348, 255-256.

Haid, S., Grethe, C., Bankwitz, D., Grunwald, T., and Pietschmann, T. (2016). Identification of a Human Respiratory Syncytial Virus Cell Entry Inhibitor by Using a Novel Lentiviral Pseudotype System. *Journal of virology* 90, 3065.

Hanenberg, H., Xiao, X.L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D.A. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nature medicine* 2, 876-882.

Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M., Johnson, L.L., Swain, S.L., and Lund, F.E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature immunology* 1, 475-482.

Harris, H., Miller, O.J., Klein, G., Worst, P., and Tachibana, T. (1969). Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223, 363-368.

Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., and Malim, M.H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113, 803-809.

Hartweger, H., McGuire, A.T., Horning, M., Taylor, J.J., Dosenovic, P., Yost, D., Gazumyan, A., Seaman, M.S., Stamatatos, L., Jankovic, M., *et al.* (2019). HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. *The Journal of experimental medicine* 216, 1301.

Heffner, G.C., Bonner, M., Christiansen, L., Pierciey, F.J., Campbell, D., Smurnyy, Y., Zhang, W., Hamel, A., Shaw, S., Lewis, G., *et al.* (2018). Prostaglandin E2 Increases Lentiviral Vector Transduction Efficiency of Adult Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Molecular Therapy* 26, 320-328.

- Heidmann, O., Béguin, A., Paternina, J., Berthier, R., Deloger, M., Bawa, O., and Heidmann, T. (2017). HEMO, an ancestral endogenous retroviral envelope protein shed in the blood of pregnant women and expressed in pluripotent stem cells and tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E6642-E6651.
- Heidmann, O., Vernochet, C., Dupressoir, A., and Heidmann, T. (2009). Identification of an endogenous retroviral envelope gene with fusogenic activity and placenta-specific expression in the rabbit: a new "syncytin" in a third order of mammals. *Retrovirology* 6, 107.
- Helm, C.A., Israelachvili, J.N., and McGuiggan, P.M. (1992). Role of hydrophobic forces in bilayer adhesion and fusion. *Biochemistry* 31, 1794-1805.
- Hodgson, C.P., and Solaiman, F. (1996). Virosomes: Cationic Liposomes Enhance Retroviral Transduction. *Nature biotechnology* 14, 339-342.
- Holder, B.S., Tower, C.L., Abrahams, V.M., and Aplin, J.D. (2012). Syncytin 1 in the human placenta. *Placenta* 33, 460-466.
- Horsley, V., and Pavlath, G.K. (2004). Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells, tissues, organs* 176, 67-78.
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658-661.
- Huang, Q., Chen, H., Li, J., Oliver, M., Ma, X., Byck, D., Gao, Y., and Jiang, S.W. (2014). Epigenetic and non-epigenetic regulation of syncytin-1 expression in human placenta and cancer tissues. *Cellular signalling* 26, 648-656.
- Humbert, O., Gisch, D.W., Wohlfahrt, M.E., Adams, A.B., Greenberg, P.D., Schmitt, T.M., Trobridge, G.D., and Kiem, H.P. (2016). Development of Third-generation Cocal Envelope Producer Cell Lines for Robust Lentiviral Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells and T-cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24, 1237-1246.
- Hung, K.L., Meitlis, I., Hale, M., Chen, C.Y., Singh, S., Jackson, S.W., Miao, C.H., Khan, I.F., Rawlings, D.J., and James, R.G. (2018). Engineering Protein-Secreting Plasma Cells by Homology-Directed Repair in Primary Human B Cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 26, 456-467.
- Hunter, E. (1997). Viral Entry and Receptors. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, eds. (Cold Spring Harbor (NY)).
- Hyde, S.C., Southern, K.W., Gileadi, U., Fitzjohn, E.M., Mofford, K.A., Waddell, B.E., Gooi, H.C., Goddard, C.A., Hannavy, K., Smyth, S.E., *et al.* (2000). Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene therapy* 7, 1156-1165.
- Ichii, M., Oritani, K., and Kanakura, Y. (2014). Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. *World journal of stem cells* 6, 421-431.
- Ingrao, D., Majdoul, S., Seye, A.K., Galy, A., and Fenard, D. (2014). Concurrent measures of fusion and transduction efficiency of primary CD34+ cells with human immunodeficiency virus 1-based lentiviral vectors reveal different effects of transduction enhancers. *Human gene therapy methods* 25, 48-56.

- Innes, C.L., Smith, P.B., Langenbach, R., Tindall, K.R., and Boone, L.R. (1990). Cationic liposomes (Lipofectin) mediate retroviral infection in the absence of specific receptors. *Journal of virology* 64, 957-961.
- Janssens, W., Chuah, M.K., Naldini, L., Follenzi, A., Collen, D., Saint-Remy, J.M., and VandenDriessche, T. (2003). Efficiency of onco-retroviral and lentiviral gene transfer into primary mouse and human B-lymphocytes is pseudotype dependent. *Human gene therapy* 14, 263-276.
- Jern, P., and Coffin, J.M. (2008). Effects of retroviruses on host genome function. *Annual review of genetics* 42, 709-732.
- Johnson, M.J., Laoharawee, K., Lahr, W.S., Webber, B.R., and Moriarity, B.S. (2018). Engineering of Primary Human B cells with CRISPR/Cas9 Targeted Nuclease. *Scientific reports* 8, 12144.
- Kafri, T., Blömer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature genetics* 17, 314-317.
- Kahl, C.A., Marsh, J., Fyffe, J., Sanders, D.A., and Cornetta, K. (2004). Human immunodeficiency virus type 1-derived lentivirus vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from Ross River virus and Semliki Forest virus. *Journal of virology* 78, 1421-1430.
- Kajaste-Rudnitski, A., Marelli, S.S., Pultrone, C., Pertel, T., Uchil, P.D., Mechti, N., Mothes, W., Poli, G., Luban, J., and Vicenzi, E. (2011). TRIM22 inhibits HIV-1 transcription independently of its E3 ubiquitin ligase activity, Tat, and NF-kappaB-responsive long terminal repeat elements. *Journal of virology* 85, 5183-5196.
- Kanai, Y., and Hediger, M.A. (2004). The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflügers Archiv* 447, 469-479.
- Katz, S.I., Parker, D., and Turk, J.L. (1974). B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature* 251, 550-551.
- Kichler, A., Bechinger, B., and Danos, O. (2003). Des peptides cationiques antibactériens comme vecteurs de transfert de gènes. *Medecine sciences : M/S* 19, 1046-1047.
- Kiem, H.-P., Heyward, S., Winkler, A., Potter, J., Allen, J.M., Miller, A.D., and Andrews, R.G. (1997). Gene Transfer into Marrow Repopulating Cells: Comparison Between Amphotropic and Gibbon Ape Leukemia Virus Pseudotyped Retroviral Vectors in a Competitive Repopulation Assay in Baboons. *Blood* 90, 4638.
- Kim, S.H., and Lim, K.I. (2017). Stability of Retroviral Vectors Against Ultracentrifugation Is Determined by the Viral Internal Core and Envelope Proteins Used for Pseudotyping. *Molecules and cells* 40, 339-345.
- Kimizuka, F., Taguchi, Y., Ohdate, Y., Kawase, Y., Shimojo, T., Hashino, K., Kato, I., Sekiguchi, K., and Titani, K. (1991). Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. *Journal of biochemistry* 110, 284-291.
- King, A., Burrows, T.D., Hiby, S.E., Bowen, J.M., Joseph, S., Verma, S., Lim, P.B., Gardner, L., Le Bouteiller, P., Ziegler, A., *et al.* (2000). Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* 21, 376-387.

- Kneissl, S., Abel, T., Rasbach, A., Brynza, J., Schneider-Schaulies, J., and Buchholz, C.J. (2012). Measles virus glycoprotein-based lentiviral targeting vectors that avoid neutralizing antibodies. *PloS one* 7, e46667-e46667.
- Kneissl, S., Zhou, Q., Schwenkert, M., Cosset, F.L., Verhoeyen, E., and Buchholz, C.J. (2013). CD19 and CD20 targeted vectors induce minimal activation of resting B lymphocytes. *PloS one* 8, e79047.
- Knerr, I., Beinder, E., and Rascher, W. (2002). Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology* 186, 210-213.
- Kobayashi, M., Iida, A., Ueda, Y., and Hasegawa, M. (2003). Pseudotyped lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus SIVagm with envelope glycoproteins from paramyxovirus. *Journal of virology* 77, 2607-2614.
- Kobinger, G.P., Weiner, D.J., Yu, Q.-C., and Wilson, J.M. (2001). Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nature biotechnology* 19, 225-230.
- Kolokoltsov, A.A., Weaver, S.C., and Davey, R.A. (2005). Efficient functional pseudotyping of oncoretroviral and lentiviral vectors by Venezuelan equine encephalitis virus envelope proteins. *Journal of virology* 79, 756-763.
- König, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M.C., Irelan, J.T., Chiang, C.-y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., *et al.* (2008). Global Analysis of Host-Pathogen Interactions that Regulate Early-Stage HIV-1 Replication. *Cell* 135, 49-60.
- Koning, F.A., Newman, E.N., Kim, E.Y., Kunstman, K.J., Wolinsky, S.M., and Malim, M.H. (2009). Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets. *Journal of virology* 83, 9474-9485.
- Kovats, S., Main, E.K., Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S.J., and DeMars, R. (1990). A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248, 220-223.
- Kowolik, C.M., and Yee, J.-K. (2002). Preferential Transduction of Human Hepatocytes with Lentiviral Vectors Pseudotyped by Sendai Virus F Protein. *Molecular Therapy* 5, 762-769.
- Kubo, Y. (2011). Retroviral membrane fusions : regulation by proteolytic processing and cellular factors. In *Cell Fusions*, L.-I. Larsson, ed., pp. 41-61.
- Kudo, Y., Boyd, C.A., Sargent, I.L., and Redman, C.W. (2003). Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia. *Biochimica et biophysica acta* 1638, 63-71.
- Kumar, M., Bradow, B.P., and Zimmerberg, J. (2003). Large-Scale Production of Pseudotyped Lentiviral Vectors Using Baculovirus GP64. *Human gene therapy* 14, 67-77.
- Kutluay, S.B., Perez-Caballero, D., and Bieniasz, P.D. (2013). Fates of retroviral core components during unrestricted and TRIM5-restricted infection. *PLoS pathogens* 9, e1003214.
- Kutner, R.H., Zhang, X.Y., and Reiser, J. (2009). Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nature protocols* 4, 495-505.

- Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Segeral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654-657.
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., *et al.* (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nature immunology* 13, 223-228.
- Landau, N.R., Page, K.A., and Littman, D.R. (1991). Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. *Journal of virology* 65, 162-169.
- Langford, M.B., Outhwaite, J.E., Hughes, M., Natale, D.R.C., and Simmons, D.G. (2018). Deletion of the Syncytin A receptor Ly6e impairs syncytiotrophoblast fusion and placental morphogenesis causing embryonic lethality in mice. *Scientific reports* 8, 3961.
- Larsen, J.M., Christensen, I.J., Nielsen, H.J., Hansen, U., Bjerregaard, B., Talts, J.F., and Larsson, L.-I. (2009). Syncytin immunoreactivity in colorectal cancer: Potential prognostic impact. *Cancer Letters* 280, 44-49.
- Larsson, L.I., Bjerregaard, B., Wulf-Andersen, L., and Talts, J.F. (2007a). Syncytin and cancer cell fusions. *TheScientificWorldJournal* 7, 1193-1197.
- Larsson, L.I., Holck, S., and Christensen, I.J. (2007b). Prognostic role of syncytin expression in breast cancer. *Human pathology* 38, 726-731.
- Lavialle, C., Cornelis, G., Dupressoir, A., Esnault, C., Heidmann, O., Vernochet, C., and Heidmann, T. (2013). Paleovirology of 'syncytins', retroviral env genes exapted for a role in placentation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 368, 20120507.
- Lavillette, D., Marin, M., Ruggieri, A., Mallet, F., Cosset, F.-L., and Kabat, D. (2002). The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *Journal of virology* 76, 6442-6452.
- Le Blanc, I., Luyet, P.-P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demareux, N., Fauré, J., Sadoul, R., *et al.* (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol* 7, 653-664.
- Le Bouteiller, P. (2000). HLA-G in the human placenta: expression and potential functions. *Biochemical Society transactions* 28, 208-212.
- Le Bouteiller, P., Rodriguez, A.M., Mallet, V., Girr, M., Guillaudeux, T., and Lenfant, F. (1996). Placental expression of HLA class I genes. *Am J Reprod Immunol* 35, 216-225.
- Leber, A., Teles, A., and Zenclussen, A.C. (2010). Regulatory T cells and their role in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 63, 445-459.
- Lee, X., Keith, J.C., Jr., Stumm, N., Moutsatsos, I., McCoy, J.M., Crum, C.P., Genest, D., Chin, D., Ehrenfels, C., Pijnenborg, R., *et al.* (2001). Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia. *Placenta* 22, 808-812.
- Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2011). Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *Journal of autoimmunity* 36, 228-238.

- Levy, C., Amirache, F., Costa, C., Frecha, C., Muller, C.P., Kweder, H., Buckland, R., Cosset, F.L., and Verhoeven, E. (2012). Lentiviral vectors displaying modified measles virus gp overcome pre-existing immunity in in vivo-like transduction of human T and B cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 1699-1712.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *The EMBO journal* 11, 3053-3058.
- Ling, C., Bhukhai, K., Yin, Z., Tan, M., Yoder, M.C., Leboulch, P., Payen, E., and Srivastava, A. (2016). High-Efficiency Transduction of Primary Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells by AAV6 Vectors: Strategies for Overcoming Donor-Variation and Implications in Genome Editing. *Scientific reports* 6, 35495.
- Liu, S.-L., Halbert, C.L., and Miller, A.D. (2004). Jaagsiekte sheep retrovirus envelope efficiently pseudotypes human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors. *Journal of virology* 78, 2642-2647.
- Lizée, G., Gonzales, M.I., and Topalian, S.L. (2004). Lentivirus Vector-Mediated Expression of Tumor-Associated Epitopes by Human Antigen Presenting Cells. *Human gene therapy* 15, 393-404.
- Luciw, P.A. (1996). Human immunodeficiency viruses and their replication. *Fields virology* 2, 1881-1952.
- Majdoul, S., Seye, A.K., Kichler, A., Holic, N., Galy, A., Bechinger, B., and Fenard, D. (2016). Molecular Determinants of Vectofusin-1 and Its Derivatives for the Enhancement of Lentivirally Mediated Gene Transfer into Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *The Journal of biological chemistry* 291, 2161-2169.
- Malassine, A., Blaise, S., Handschuh, K., Lalucque, H., Dupressoir, A., Evain-Brion, D., and Heidmann, T. (2007). Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. *Placenta* 28, 185-191.
- Mamcarz, E., Zhou, S., Lockey, T., Abdelsamed, H., Cross, S.J., Kang, G., Ma, Z., Condori, J., Dowdy, J., Triplett, B., *et al.* (2019). Lentiviral Gene Therapy Combined with Low-Dose Busulfan in Infants with SCID-X1. *New England Journal of Medicine* 380, 1525-1534.
- Mameli, G., Astone, V., Khalili, K., Serra, C., Sawaya, B.E., and Dolei, A. (2007). Regulation of the syncytin-1 promoter in human astrocytes by multiple sclerosis-related cytokines. *Virology* 362, 120-130.
- Mameli, G., Poddighe, L., Mei, A., Uleri, E., Sotgiu, S., Serra, C., Manetti, R., and Dolei, A. (2012). Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. *PloS one* 7, e44991.
- Mandell, M.A., Kimura, T., Jain, A., Johansen, T., and Deretic, V. (2014). TRIM proteins regulate autophagy: TRIM5 is a selective autophagy receptor mediating HIV-1 restriction. *Autophagy* 10, 2387-2388.
- Mangeney, M., Renard, M., Schlecht-Louf, G., Bouallaga, I., Heidmann, O., Letzelter, C., Richaud, A., Ducos, B., and Heidmann, T. (2007). Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20534-20539.

- Mangeot, P.E., Risson, V., Fusil, F., Marnef, A., Laurent, E., Blin, J., Mournetas, V., Massourides, E., Sohler, T.J.M., Corbin, A., *et al.* (2019). Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nature communications* 10, 45.
- Mar, K.B., Rinkenberger, N.R., Boys, I.N., Eitson, J.L., McDougal, M.B., Richardson, R.B., and Schoggins, J.W. (2018). LY6E mediates an evolutionarily conserved enhancement of virus infection by targeting a late entry step. *Nature communications* 9, 3603.
- Masiuk, K.E., Zhang, R., Osborne, K., Hollis, R.P., Campo-Fernandez, B., and Kohn, D.B. (2019). PGE2 and Poloxamer Synperonic F108 Enhance Transduction of Human HSPCs with a β -Globin Lentiviral Vector. *Molecular therapy Methods & clinical development* 13, 390-398.
- Mason, A.J., Martinez, A., Glaubitz, C., Danos, O., Kichler, A., and Bechinger, B. (2006). The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 320-322.
- Matthes, T., Werner-Favre, C., Tang, H., Zhang, X., Kindler, V., and Zubler, R.H. (1993). Cytokine mRNA expression during an in vitro response of human B lymphocytes: kinetics of B cell tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)6, IL-10, and transforming growth factor beta 1 mRNAs. *The Journal of experimental medicine* 178, 521-528.
- Mattson, M.P., and Taub, D.D. (2004). Ancient viral protein enrages astrocytes in multiple sclerosis. *Nature neuroscience* 7, 1021-1023.
- Maurice, M., Verhoeyen, E., Salmon, P., Trono, D., Russell, S.J., and Cosset, F.L. (2002). Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood* 99, 2342-2350.
- Merten, O.-W., Charrier, S., Laroudie, N., Fauchille, S., Dugué, C., Jenny, C., Audit, M., Zanta-Boussif, M.-A., Chautard, H., Radrizzani, M., *et al.* (2010). Large-Scale Manufacture and Characterization of a Lentiviral Vector Produced for Clinical Ex Vivo Gene Therapy Application. *Human gene therapy* 22, 343-356.
- Merten, O.W., Hebben, M., and Bovolenta, C. (2016). Production of lentiviral vectors. *Molecular therapy Methods & clinical development* 3, 16017.
- Mesdag, V., Salzet, M., and Vinatier, D. (2014). [Trophoblast: conductor of the maternal immune tolerance]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction* 43, 657-670.
- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G.M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.Y., Edouard, P., Howes, S., *et al.* (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403, 785-789.
- Milani, M., Annoni, A., Bartolaccini, S., Biffi, M., Russo, F., Di Tomaso, T., Raimondi, A., Lengler, J., Holmes, M.C., Scheiflinger, F., *et al.* (2017). Genome editing for scalable production of alloantigen-free lentiviral vectors for in vivo gene therapy. *EMBO molecular medicine* 9, 1558-1573.
- Milani, M., Annoni, A., Moalli, F., Liu, T., Cesana, D., Calabria, A., Bartolaccini, S., Biffi, M., Russo, F., Visigalli, I., *et al.* (2019). Phagocytosis-shielded lentiviral vectors improve liver gene therapy in nonhuman primates. *Science Translational Medicine* 11, eaav7325.

- Millay, D.P., O'Rourke, J.R., Sutherland, L.B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* 499, 301-305.
- Miller, F.R., McInerney, D., Rogers, C., and Miller, B.E. (1988). Spontaneous fusion between metastatic mammary tumor subpopulations. *Journal of cellular biochemistry* 36, 129-136.
- Miller, M.D., Farnet, C.M., and Bushman, F.D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of virology* 71, 5382.
- Mitomo, K., Griesenbach, U., Inoue, M., Somerton, L., Meng, C., Akiba, E., Tabata, T., Ueda, Y., Frankel, G.M., Farley, R., *et al.* (2010). Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 1173-1182.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of virology* 72, 8150-8157.
- Mochizuki, H., Schwartz, J.P., Tanaka, K., Brady, R.O., and Reiser, J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *Journal of virology* 72, 8873-8883.
- Moffett, H.F., Harms, C.K., Fitzpatrick, K.S., Tooley, M.R., Boonyaratanakornkit, J., and Taylor, J.J. (2019). B cells engineered to express pathogen-specific antibodies protect against infection. *Science Immunology* 4, eaax0644.
- Moore, J.P., Trkola, A., and Dragic, T. (1997). Co-receptors for HIV-1 entry. *Current Opinion in Immunology* 9, 551-562.
- Mortensen, K., Lichtenberg, J., Thomsen, P.D., and Larsson, L.-I. (2004). Spontaneous fusion between cancer cells and endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61, 2125-2131.
- Moss, R.B., Milla, C., Colombo, J., Accurso, F., Zeitlin, P.L., Clancy, J.P., Spencer, L.T., Pilewski, J., Waltz, D.A., Dorkin, H.L., *et al.* (2007). Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Human gene therapy* 18, 726-732.
- Moulin, V., Andris, F., Thielemans, K., Maliszewski, C., Urbain, J., and Moser, M. (2000). B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *The Journal of experimental medicine* 192, 475-482.
- Muir, A., Lever, A.M., and Moffett, A. (2006). Human endogenous retrovirus-W envelope (syncytin) is expressed in both villous and extravillous trophoblast populations. *The Journal of general virology* 87, 2067-2071.
- Munis, A.M., Mattiuzzo, G., Bentley, E.M., Collins, M.K., Eyles, J.E., and Takeuchi, Y. (2019). Use of Heterologous Vesiculovirus G Proteins Circumvents the Humoral Anti-envelope Immunity in Lentivector-Based In Vivo Gene Delivery. *Molecular therapy Nucleic acids* 17, 126-137.
- Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology* 6, 107-116.

Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.

Nikolic, J., Belot, L., Raux, H., Legrand, P., Gaudin, Y., and Albertini, A. (2018). Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nature communications* 9, 1029-1029.

Oburoglu, L., Tardito, S., Fritz, V., de Barros, Stéphanie C., Merida, P., Craveiro, M., Mamede, J., Cretenet, G., Mongellaz, C., An, X., *et al.* (2014). Glucose and Glutamine Metabolism Regulate Human Hematopoietic Stem Cell Lineage Specification. *Cell Stem Cell* 15, 169-184.

Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517.

Oluwole, S.O., Yao, Y., Conradi, S., Kristensson, K., and Karlsson, H. (2007). Elevated levels of transcripts encoding a human retroviral envelope protein (syncytin) in muscles from patients with motor neuron disease. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 8, 67-72.

Ozog, S., Chen, C.X., Simpson, E., Garijo, O., Timberlake, N.D., Minder, P., Verhoeyen, E., and Torbett, B.E. (2019). CD46 Null Packaging Cell Line Improves Measles Lentiviral Vector Production and Gene Delivery to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Molecular therapy Methods & clinical development* 13, 27-39.

Page, K.A., Landau, N.R., and Littman, D.R. (1990). Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *Journal of virology* 64, 5270-5276.

Pan, D., Gunther, R., Duan, W., Wendell, S., Kaemmerer, W., Kafri, T., Verma, I.M., and Whitley, C.B. (2002). Biodistribution and Toxicity Studies of VSVG-Pseudotyped Lentiviral Vector after Intravenous Administration in Mice with the Observation of in Vivo Transduction of Bone Marrow. *Molecular Therapy* 6, 19-29.

Patel, M., Giddings, A.M., Sechelski, J., and Olsen, J.C. (2013). High efficiency gene transfer to airways of mice using influenza hemagglutinin pseudotyped lentiviral vectors. *The Journal of Gene Medicine* 15, 51-62.

Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M.W., Gregory, D.A., Johnson, M.C., and Bieniasz, P.D. (2009). Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 139, 499-511.

Pérot, P., Montgiraud, C., Lavillette, D., and Mallet, F. (2011). A Comparative Portrait of Retroviral Fusogens and Syncytins. In *Cell Fusions: Regulation and Control*, L.-I. Larsson, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 63-115.

Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Zuger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F.A., Uchil, P.D., Chatel, L., *et al.* (2011). TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 472, 361-365.

Pickles, R.J., McCarty, D., Matsui, H., Hart, P.J., Randell, S.H., and Boucher, R.C. (1998). Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer. *Journal of virology* 72, 6014-6023.

- Piovan, C., Marin, V., Scavullo, C., Corna, S., Giuliani, E., Bossi, S., Galy, A., Fenard, D., Bordignon, C., Rizzardi, G.P., *et al.* (2017). Vectofusin-1 Promotes RD114-TR-Pseudotyped Lentiviral Vector Transduction of Human HSPCs and T Lymphocytes. *Molecular therapy Methods & clinical development* 5, 22-30.
- Poluri, A., Ainsworth, R., Weaver, S.C., and Sutton, R.E. (2008). Functional pseudotyping of human immunodeficiency virus type 1 vectors by Western equine encephalitis virus envelope glycoprotein. *Journal of virology* 82, 12580-12584.
- Porter, C.D., Collins, M.K.L., Taylor, C.S., Parkar, M.H., Cosset, F.-L., Weiss, R.A., and Takeuchi, Y. (1996). Comparison of Efficiency of Infection of Human Gene Therapy Target Cells via Four Different Retroviral Receptors. *Human gene therapy* 7, 913-919.
- Porter, C.D., Lukacs, K.V., Box, G., Takeuchi, Y., and Collins, M.K. (1998). Cationic liposomes enhance the rate of transduction by a recombinant retroviral vector in vitro and in vivo. *Journal of virology* 72, 4832-4840.
- Potgens, A.J., Drewlo, S., Kokozidou, M., and Kaufmann, P. (2004). Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. *Human reproduction update* 10, 487-496.
- Puigdomènech, I., Casartelli, N., Porrot, F., and Schwartz, O. (2013). SAMHD1 restricts HIV-1 cell-to-cell transmission and limits immune detection in monocyte-derived dendritic cells. *Journal of virology* 87, 2846-2856.
- Quinn, M.E., Goh, Q., Kurosaka, M., Gamage, D.G., Petrany, M.J., Prasad, V., and Millay, D.P. (2017). Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nature communications* 8, 15665-15665.
- Radek, C., Bernadin, O., Drechsel, K., Cordes, N., Pfeifer, R., Strasser, P., Mormin, M., Gutierrez-Guerrero, A., Cosset, F.L., Kaiser, A., *et al.* (2019). Vectofusin-1 improves transduction of primary human cells with diverse retroviral and lentiviral pseudotypes, enabling robust, automated closed-system manufacturing. *Human gene therapy*.
- Ramhorst, R., Fraccaroli, L., Aldo, P., Alvero, A.B., Cardenas, I., Leiros, C.P., and Mor, G. (2012). Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol* 67, 17-27.
- Rawn, S.M., and Cross, J.C. (2008). The Evolution, Regulation, and Function of Placenta-Specific Genes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24, 159-181.
- Redelsperger, F., Cornelis, G., Vernochet, C., Tennant, B.C., Catzeflis, F., Mulot, B., Heidmann, O., Heidmann, T., and Dupressoir, A. (2014). Capture of syncytin-Mar1, a fusogenic endogenous retroviral envelope gene involved in placentation in the Rodentia squirrel-related clade. *Journal of virology* 88, 7915-7928.
- Redelsperger, F., Raddi, N., Bacquin, A., Vernochet, C., Mariot, V., Gache, V., Blanchard-Gutton, N., Charrin, S., Tiret, L., Dumonceaux, J., *et al.* (2016). Genetic Evidence That Captured Retroviral Envelope syncytins Contribute to Myoblast Fusion and Muscle Sexual Dimorphism in Mice. *PLoS genetics* 12, e1006289.
- Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R.O., Karlsson, S., and Schubert, M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15266-15271.

- Renard, M., Varela, P.F., Letzelter, C., Duquerroy, S., Rey, F.A., and Heidmann, T. (2005). Crystal structure of a pivotal domain of human syncytin-2, a 40 million years old endogenous retrovirus fusogenic envelope gene captured by primates. *Journal of molecular biology* 352, 1029-1034.
- Ricks, D.M., Kutner, R., Zhang, X.Y., Welsh, D.A., and Reiser, J. (2008). Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 17, 441-450.
- Río, P., Navarro, S., Wang, W., Sánchez-Domínguez, R., Pujol, R.M., Segovia, J.C., Bogliolo, M., Merino, E., Wu, N., Salgado, R., *et al.* (2019). Successful engraftment of gene-corrected hematopoietic stem cells in non-conditioned patients with Fanconi anemia. *Nature medicine* 25, 1396-1401.
- Ristich, V., Liang, S., Zhang, W., Wu, J., and Horuzsko, A. (2005). Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *European journal of immunology* 35, 1133-1142.
- Roche, S., and Gaudin, Y. (2002). Characterization of the Equilibrium between the Native and Fusion-Inactive Conformation of Rabies Virus Glycoprotein Indicates That the Fusion Complex Is Made of Several Trimers. *Virology* 297, 128-135.
- Roche, S., Rey, F.A., Gaudin, Y., and Bressanelli, S. (2007). Structure of the Prefusion Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* 315, 843.
- Rosser, Elizabeth C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* 42, 607-612.
- Ryoo, J., Choi, J., Oh, C., Kim, S., Seo, M., Kim, S.Y., Seo, D., Kim, J., White, T.E., Brandariz-Nunez, A., *et al.* (2014). The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nature medicine* 20, 936-941.
- Sakuma, T., Barry, Michael A., and Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochemical Journal* 443, 603-618.
- Salmon, P., Nègre, D., Trono, D., and Cosset, F. (2000). A chimeric GALV-derived envelope glycoprotein harboring the cytoplasmic tail of MLV envelope efficiently pseudotypes HIV-1 vectors. *J Gen Med* 2, 23.
- Salvador, B., Zhou, Y., Michault, A., Muench, M.O., and Simmons, G. (2009). Characterization of Chikungunya pseudotyped viruses: Identification of refractory cell lines and demonstration of cellular tropism differences mediated by mutations in E1 glycoprotein. *Virology* 393, 33-41.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Negre, D., Le Grand, R., Trono, D., and Cosset, F.L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100, 823-832.
- Santiago, O., Gutierrez, J., Sorlozano, A., de Dios Luna, J., Villegas, E., and Fernandez, O. (2010). Relation between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: analytic study of scientific production. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 29, 857-866.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.

- Schiroli, G., Conti, A., Ferrari, S., della Volpe, L., Jacob, A., Albano, L., Beretta, S., Calabria, A., Vavassori, V., Gasparini, P., *et al.* (2019). Precise Gene Editing Preserves Hematopoietic Stem Cell Function following Transient p53-Mediated DNA Damage Response. *Cell Stem Cell* *24*, 551-565.e558.
- Schoggins, J.W., Dorner, M., Feulner, M., Imanaka, N., Murphy, M.Y., Ploss, A., and Rice, C.M. (2012). Dengue reporter viruses reveal viral dynamics in interferon receptor-deficient mice and sensitivity to interferon effectors in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 14610-14615.
- Schoggins, J.W., MacDuff, D.A., Imanaka, N., Gaaney, M.D., Shrestha, B., Eitson, J.L., Mar, K.B., Richardson, R.B., Ratushny, A.V., Litvak, V., *et al.* (2014). Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* *505*, 691-695.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* *472*, 481-485.
- Schott, J.W., León-Rico, D., Ferreira, C.B., Buckland, K.F., Santilli, G., Armant, M.A., Schambach, A., Cavazza, A., and Thrasher, A.J. (2019). Enhancing Lentiviral and Alpharetroviral Transduction of Human Hematopoietic Stem Cells for Clinical Application. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* *14*, 134-147.
- Schultz, K.R., Klarnet, J.P., Gieni, R.S., HayGlass, K.T., and Greenberg, P.D. (1990). The role of B cells for in vivo T cell responses to a Friend virus-induced leukemia. *Science* *249*, 921.
- Schweizer, M., and Merten, O.W. (2010). Large-Scale Production Means for the Manufacturing of Lentiviral Vectors. *Current gene therapy* *10*, 474-486.
- Segall, H.I., Yoo, E., and Sutton, R.E. (2003). Characterization and detection of artificial replication-competent lentivirus of altered host range. *Molecular Therapy* *8*, 118-129.
- Serafini, M., Naldini, L., and Introna, M. (2004). Molecular evidence of inefficient transduction of proliferating human B lymphocytes by VSV-pseudotyped HIV-1-derived lentivectors. *Virology* *325*, 413-424.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., and Malim, M.H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature medicine* *9*, 1404-1407.
- Shiroishi, M., Kuroki, K., Ose, T., Rasubala, L., Shiratori, I., Arase, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kohda, D., and Maenaka, K. (2006). Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *The Journal of biological chemistry* *281*, 10439-10447.
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E.A., Darlison, M.G., and Barnard, P.J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* *244*, 1578-1580.
- Sinn, P.L., Arias, A.C., Brogden, K.A., and McCray, P.B., Jr. (2008). Lentivirus vector can be readministered to nasal epithelia without blocking immune responses. *Journal of virology* *82*, 10684-10692.
- Sinn, P.L., Hwang, B.Y., Li, N., Ortiz, J.L.S., Shirazi, E., Parekh, K.R., Cooney, A.L., Schaffer, D.V., and McCray, P.B., Jr. (2017). Novel GP64 envelope variants for improved delivery to human airway epithelial cells. *Gene therapy* *24*, 674-679.

Soe, K., Andersen, T.L., Hobolt-Pedersen, A.S., Bjerregaard, B., Larsson, L.I., and Delaisse, J.M. (2011). Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone* 48, 837-846.

Stitz, J., Buchholz, C., Engelstädter, M., Uckert, W., Bloemer, U., Schmitt, I., and Cichutek, K. (2000). Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* 273, 16-20.

Straub, C., and Zubler, R.H. (1989). Immortalization of EBV-infected B cells is not influenced by exogenous signals acting on B cell proliferation. Effects of mutant EL-4 thymoma cells and transforming growth factor-beta. *J Immunol* 142, 87-93.

Strick, R., Ackermann, S., Langbein, M., Swiatek, J., Schubert, S.W., Hashemolhosseini, S., Koscheck, T., Fasching, P.A., Schild, R.L., Beckmann, M.W., *et al.* (2007). Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-beta. *J Mol Med (Berl)* 85, 23-38.

Sudres, M., Ciré, S., Vasseur, V., Brault, L., Da Rocha, S., Boisgérault, F., Le Bec, C., Gross, D.A., Blouin, V., Ryffel, B., *et al.* (2012). MyD88 signaling in B cells regulates the production of Th1-dependent antibodies to AAV. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 1571-1581.

Sundquist, W.I., and Krausslich, H.G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a006924.

Suzuki, Y., and Craigie, R. (2007). The road to chromatin — nuclear entry of retroviruses. *Nature Reviews Microbiology* 5, 187-196.

Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., Fujita, H., and Tokunaga, K. (2015). MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nature medicine* 21, 1502-1507.

Tatarowicz, W.A., Martin, C.E., Pekosz, A.S., Madden, S.L., Rauscher, F.J., 3rd, Chiang, S.Y., Beerman, T.A., and Fraser, N.W. (1997). Repression of the HSV-1 latency-associated transcript (LAT) promoter by the early growth response (EGR) proteins: involvement of a binding site immediately downstream of the TATA box. *Journal of neurovirology* 3, 212-224.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.

Trobridge, G.D., Wu, R.A., Hansen, M., Ironside, C., Watts, K.L., Olsen, P., Beard, B.C., and Kiem, H.P. (2010). Cocal-pseudotyped lentiviral vectors resist inactivation by human serum and efficiently transduce primate hematopoietic repopulating cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 725-733.

Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M., and Zubler, R.H. (1992). Effects of eleven cytokines and of IL-1 and tumor necrosis factor inhibitors in a human B cell assay. *J Immunol* 148, 2778-2784.

Turrini, F., Marelli, S., Kajaste-Rudnitski, A., Lusic, M., Van Lint, C., Das, A.T., Harwig, A., Berkhout, B., and Vicenzi, E. (2015). HIV-1 transcriptional silencing caused by TRIM22 inhibition of Sp1 binding to the viral promoter. *Retrovirology* 12, 104.

Unutmaz, D., KewalRamani, V.N., Marmon, S., and Littman, D.R. (1999). Cytokine Signals Are Sufficient for HIV-1 Infection of Resting Human T Lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 189, 1735-1746.

- Usami, Y., Wu, Y., and Gottlinger, H.G. (2015). SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 526, 218-223.
- Vargas, A., Moreau, J., Landry, S., LeBellego, F., Toufaily, C., Rassart, E., Lafond, J., and Barbeau, B. (2009). Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *Journal of molecular biology* 392, 301-318.
- Vargas, A., Toufaily, C., LeBellego, F., Rassart, É., Lafond, J., and Barbeau, B. (2011). Reduced Expression of Both Syncytin 1 and Syncytin 2 Correlates With Severity of Preeclampsia. *Reproductive Sciences* 18, 1085-1091.
- Velten, F.W., Duperrier, K., Bohlender, J., Metharom, P., and Goerdts, S. (2004). A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity in vitro. *European journal of immunology* 34, 2800-2811.
- Verhoeyen, E., Dardalhon, V., Ducrey-Rundquist, O., Trono, D., Taylor, N., and Cosset, F.-L.c. (2003). IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes. *Blood* 101, 2167-2174.
- Vermeer, L.S., Hamon, L., Schirer, A., Schoup, M., Cosette, J., Majdoul, S., Pastré, D., Stockholm, D., Holic, N., Hellwig, P., *et al.* (2017). Vectofusin-1, a potent peptidic enhancer of viral gene transfer forms pH-dependent α -helical nanofibrils, concentrating viral particles. *Acta Biomaterialia* 64, 259-268.
- Vernochet, C., Heidmann, O., Dupressoir, A., Cornelis, G., Dessen, P., Catzeflis, F., and Heidmann, T. (2011). A syncytin-like endogenous retrovirus envelope gene of the guinea pig specifically expressed in the placenta junctional zone and conserved in Caviomorpha. *Placenta* 32, 885-892.
- Vernochet, C., Redelsperger, F., Harper, F., Souquere, S., Catzeflis, F., Pierron, G., Nevo, E., Heidmann, T., and Dupressoir, A. (2014). The captured retroviral envelope syncytin-A and syncytin-B genes are conserved in the Spalacidae together with hemotrichorial placentation. *Biology of reproduction* 91, 148.
- Villesen, P., Aagaard, L., Wiuf, C., and Pedersen, F.S. (2004). Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology* 1, 32.
- Voss, J.E., Gonzalez-Martin, A., Andrabi, R., Fuller, R.P., Murrell, B., McCoy, L.E., Porter, K., Huang, D., Li, W., Sok, D., *et al.* (2019). Reprogramming the antigen specificity of B cells using genome-editing technologies. *Elife* 8, e42995.
- Wagner, J.A., Reynolds, T., Moran, M.L., Moss, R.B., Wine, J.J., Flotte, T.R., and Gardner, P. (1998). Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *The Lancet* 351, 1702-1703.
- Walters, R.W., Grunst, T., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Welsh, M.J., and Zabner, J. (1999). Basolateral Localization of Fiber Receptors Limits Adenovirus Infection from the Apical Surface of Airway Epithelia. *Journal of Biological Chemistry* 274, 10219-10226.
- Wang, J., DeClercq, J.J., Hayward, S.B., Li, P.W., Shivak, D.A., Gregory, P.D., Lee, G., and Holmes, M.C. (2016). Highly efficient homology-driven genome editing in human T cells by combining zinc-finger nuclease mRNA and AAV6 donor delivery. *Nucleic acids research* 44, e30.

- Wanisch, K., and Yáñez-Muñoz, R.J. (2009). Integration-deficient Lentiviral Vectors: A Slow Coming of Age. *Molecular Therapy* 17, 1316-1332.
- Watson, D.J., Kobinger, G.P., Passini, M.A., Wilson, J.M., and Wolfe, J.H. (2002). Targeted Transduction Patterns in the Mouse Brain by Lentivirus Vectors Pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV Envelope Proteins. *Molecular Therapy* 5, 528-537.
- Witting, S.R., Vallanda, P., and Gamble, A.L. (2013). Characterization of a third generation lentiviral vector pseudotyped with Nipah virus envelope proteins for endothelial cell transduction. *Gene therapy* 20, 997-1005.
- Yanagi, Y., Takeda, M., and Ohno, S. (2006). Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *Journal of General Virology* 87, 2767-2779.
- Yu, J., Li, M., Wilkins, J., Ding, S., Swartz, T.H., Esposito, A.M., Zheng, Y.M., Freed, E.O., Liang, C., Chen, B.K., *et al.* (2015). IFITM Proteins Restrict HIV-1 Infection by Antagonizing the Envelope Glycoprotein. *Cell reports* 13, 145-156.
- Yu, J., Liang, C., and Liu, S.L. (2017). Interferon-inducible LY6E Protein Promotes HIV-1 Infection. *The Journal of biological chemistry* 292, 4674-4685.
- Zabner, J., Ramsey, B.W., Meeker, D.P., Aitken, M.L., Balfour, R.P., Gibson, R.L., Launspach, J., Moscicki, R.A., Richards, S.M., and Standaert, T.A. (1996). Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 97, 1504-1511.
- Zhang, Q., Vashisht, A.A., O'Rourke, J., Corbel, S.Y., Moran, R., Romero, A., Miraglia, L., Zhang, J., Durrant, E., Schmedt, C., *et al.* (2017). The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. *Nature communications* 8, 15664-15664.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J., *et al.* (2008). Genome-Scale RNAi Screen for Host Factors Required for HIV Replication. *Cell host & microbe* 4, 495-504.
- Zhou, Q., Schneider, I.C., Edes, I., Honegger, A., Bach, P., Schonfeld, K., Schambach, A., Wels, W.S., Kneissl, S., Uckert, W., *et al.* (2012). T-cell receptor gene transfer exclusively to human CD8(+) cells enhances tumor cell killing. *Blood* 120, 4334-4342.
- Zhou, Q., Uhlig, K.M., Muth, A., Kimpel, J., Levy, C., Munch, R.C., Seifried, J., Pfeiffer, A., Trkola, A., Coulibaly, C., *et al.* (2015). Exclusive Transduction of Human CD4+ T Cells upon Systemic Delivery of CD4-Targeted Lentiviral Vectors. *J Immunol* 195, 2493-2501.
- Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D., and Hope, T.J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *Journal of virology* 73, 2886-2892.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology* 72, 9873-9880.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature biotechnology* 15, 871-875.

Travaux

Publications

- **Brevet**

Galy A, Coquin Y, Ferrand M « Use of syncytin for targeting drug and gene delivery to lung tissue », *Patent PCT/EP2018/078809*, **publié 25/04/2019** WO2019/077150A1

- **Publications dans des journaux scientifiques à comité de lecture**

Coquin Y*, Ferrand M*, Seye A, Menu L, Galy A, * equal contribution « Syncytins enable novel possibilities to transduce human or mouse primary B cells and to achieve well-tolerated in vivo gene transfer », **Soumis, Octobre 2019** et disponible en pré-print sur *BioRxiv* bioRxiv 816223; doi: <https://doi.org/10.1101/816223>

- **Manuscrit en préparation**

Ferrand M, Coquin Y, Corre G, Menu L, Seye A, Fisson S, Poupiot J, Bourg-Alibert N, Richard I, Galy A "Use of syncytins for gene therapy of regenerating skeletal muscle", **Manuscrit en préparation**

Summary :

Gene transfer in skeletal muscle is challenging. We exploited the physiological process of membrane fusion mediated by syncytins to facilitate the entry of gene transfer vectors into muscle. The murine syncytin-A glycoprotein was used to pseudotype recombinant HIV-1-derived lentiviral vectors to express the luciferase LucII (LV-SynA-LucII) in the skeletal muscle of mice. LV-SynA-LucII efficiently transduced skeletal muscle that is undergoing regeneration, such as in several genetic models of muscular dystrophies or following injury, but not skeletal muscle in post-mitotic steady-state phase. Stable gene expression in muscle could be achieved with LV-SynA vectors which was due in part to the transduction of satellite cells and to reduced immune responses in the tissue. LV-SynA coding for an immunogenic transgene demonstrated reduced CD4 and CD8 T cell immune responses to the transgene. The expression of a therapeutic protein was achieved and could be augmented by repeated administration. These properties provide novel opportunities for therapeutic gene transfer in muscular dystrophies which are distinct from vectors used previously.

Présentations orales en congrès

Coquin Y, Ferrand M, Frin S, Seye A, Galy A “Lentiviral vectors pseudotyped with murine syncytins-A and -B transduce B cells *in vitro* and *in vivo*”, **SFTCG Thematic Day on Viral Vectors 2019**, Paris

Coquin Y, Ferrand M, Seye A, Galy A “Use of syncytins to transduce murine and human B cells”, **ASGCT 22nd annual meeting 2019**, Washington DC, *MOLECULAR THERAPY Volume: 27 Issue: 4 Supplement: 1 Pages: 418-418 Meeting Abstract: 909 Published: APR 22 2019*

Posters

Coquin Y, Ferrand M, Frin S, Seye A, Galy A “Lentiviral vectors pseudotyped with murine syncytins efficiently transduce B cells *in vitro* and *in vivo*”, **ESGCT Annual Congress 2019**, Barcelone

Coquin Y, Ferrand M, Seye A, Galy A “New lentiviral pseudotypes based on murine syncytin-A or -B are efficient tools for the transduction of murine and human B cells”, **ESGCT Annual Congress 2018**, Lausanne, *HUMAN GENE THERAPY Volume: 29 Issue: 12 Pages: A155-A155 Meeting Abstract: P445 Published: DEC 1 2018*

Coquin Y, Ferrand M, Seye A, Galy A “New gene therapy technologies: Engineering lentiviral vectors for *in vivo* use”, **Colloque des jeunes chercheurs de l'AFM-Téléthon 2017**, Vincennes

ANNEXES

USE OF SYNCTYN FOR TARGETING DRUG AND GENE DELIVERY TO LUNG TISSUE

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)
 (19) World Intellectual Property Organization
 International Bureau
 (43) International Publication Date
 25 April 2019 (25.04.2019) **WIPO | PCT**

(51) International Patent Classification:
 A61K 38/17 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
 A61K 38/16 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
 C12N 15/867 (2006.01)

(21) International Application Number: PCT/EP2018/078809
 (22) International Filing Date: 19 October 2018 (19.10.2018)

(25) Filing Language: English
 (26) Publication Language: English

(30) Priority Date: 20 October 2017 (20.10.2017) EP 1730647.8

(71) Applicants: GENETHON [FR/FR]; 1 bis, rue de Internationale, 91000 EVRY (FR); INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) [FR/FR]; 901, rue de Tolbiac, 75013 PARIS (FR); UNIVERSITÉ D'EVRY VAL D'ESSONNE [FR/FR]; 23 boulevard François Mitterand, 91000 EVRY (FR).

(72) Inventors: GALLY, Anne; 16ter rue Saint Honoré, 77300 FONTAINEBLEAU (FR); COQUIN, Yvonne; 35 rue du Maréchal de Laitte de Tassignay, 91440 ALFORTVILLE MENNÉCY (FR).

(74) Agent: CABINET PLASSERAUD; 66 rue de la Chaussée d'Antin, 75440 PARIS CEDEX 09 (FR).

Published: with international search report (Art. 21(3))
 — with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SI, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LI, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

5 **FIELD OF THE INVENTION**
 The present invention relates to pharmaceutical compositions for targeting lung tissue and to their use in the prevention and/or treatment of lung diseases. More particularly, the present invention relates to the use of syncytin for targeting drug delivery including gene delivery to the lungs.

10 **BACKGROUND OF THE INVENTION**
 Targeted therapy holds promise for the treatment of lung diseases such as notably cystic fibrosis. However, the clinical relevance of targeted drug delivery including gene delivery lies in the ability to specifically target a drug or a drug carrier to minimize drug-originated systemic toxic effects, and in particular to minimize liver toxicity.

15 Plasmids, adenovirus-, adeno-associated virus-, and retrovirus-based vectors have been developed for use in targeted therapy, but these have been limited by poor efficiency of gene transfer, host immune responses directed against the viral vector, or the requirement for proliferating cells for transduction.

20 The tropism of naturally-occurring viruses is due to one or several molecular determinants that confer a specific ability to bind to cells and to enter into these cells to infect them. The molecular determinants of virus tropism may be exploited to generate new tools for gene delivery. In the case of enveloped viruses such as retroviruses this is called pseudotyping, commonly used with retroviral or lentiviral (typically HIV-1 based) vectors, by anchoring exogenous proteins into their lipid envelopes. Pseudotypes are generally capable of binding to cellular receptors and fuse the vector membrane with the target cell membrane to enable entry.

25 Lentiviral vectors (LV) which are enveloped RNA particles measuring approximately 120 nm in size are efficient drug delivery tools and more particularly gene delivery tools. The LV binds to, and enters into target cells through its envelope proteins which confer its pseudotype. Once the LV has entered into the cells, it releases its capsid components and

(54) Title: USE OF SYNCTYN FOR TARGETING DRUG AND GENE DELIVERY TO LUNG TISSUE
 (57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical composition for targeting drug delivery including gene delivery to lung tissue, comprising at least a therapeutic drug or gene associated to a syncytin protein, and its use in the prevention and/or treatment of lung diseases, in particular in gene therapy of said diseases using lentiviral vector particles or lentivirus-like particles pseudotyped with syncytin protein.

undergoes reverse transcription of the lentiviral RNA before integrating the proviral DNA into the genome of target cells. Non-integrative lentiviral vectors have been generated by modifying the properties of the vector integration machinery and can be used for transient gene expression. Virus-like particles lacking a provirus have also been generated and can be used to deliver proteins or messenger RNA. LV can be used for example, for gene addition, RNA interference, exon skipping or gene editing. All of these approaches can be facilitated by tissue or cell targeting of the LV via its pseudotype.

A common pseudotyping protein is vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSVg), which is known for conferring broad tropism, particle stability and high titer. However, *in vivo* VSVg binds complement, and when used *in vivo*, targets transgene delivery to the liver and is immunogenic (Ciré et al. Plos One, 9, e101644,2014). New pseudotypes are therefore needed for *in vivo* gene delivery.

There is thus a need for providing composition comprising at least a drug for use in the prevention and/or treatment of the lung diseases, which targets lung tissue and which has no liver toxicity (i.e. which does not target the liver).

In particular, it would be highly relevant to provide a stable virus or viral vector, for improving delivery of a drug, notably a gene, into lung tissues. Such a virus or viral vector would have to be fully-tolerated, specific for lung tissue, and adequate for systemic administration.

Syncytin, are endogenous retroviral virus (ERV syncytins) envelope glycoproteins which have fusogenic properties (Dupressoir et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102, 725-730; Lavialle et al., Phil. Trans. R. Soc. B., 2013, 368:20120507). Human endogenous retroviral envelope glycoprotein encoded by the ERVW-1 gene (ENSG00000242950; also known as syncytin-1 or HERV-W) has been described for its fusogenic properties in patent application EP2385058. Said application describes its use in cancer treatment, by the formation of syncytia. Murine syncytins encompass murine syncytin-A (i.e.: *mus musculus syncytin-A, synA*) and murine syncytin-B (i.e.: *mus musculus syncytin-B, synB*).

However, Ly6e the candidate receptor for Syncytin A has been shown to be rather ubiquitously expressed in mouse adult tissues (Bacquin et al., J. Virol. Doi:10.1128/JVI.00832-17, published only 5 July 2017). More particularly, transcript levels of Ly6e in the mouse liver were found to be at more than 60 % of maximum levels reached in adult lungs. In addition, several organs such as brain, thyroid, and salivary glands express at least 50% of the maximum levels observed in lung. Based on these results it would be predicted that gene delivery using a system targeting the Ly6e receptor would be rather ubiquitous and in particular would target almost as efficiently lung and liver as well as many other organs. This lack of specificity could present potential difficulties in clinical situation, wherein liver targeting should be avoided.

Moreover, it was reported that Syncytin does not generate functional pseudotypes, probably due to improper incorporation into viral particles (Bacquin et al., J. Virol. Doi:10.1128/JVI.00832-17, published only 5 July 2017).

SUMMARY OF THE INVENTION

Surprisingly, and contrary to what would be expected from the prior art, the authors have found that syncytin may be used to pseudotype LV and as such may be used for targeting gene delivery in lung tissue without risk of liver toxicity. Indeed the murine syncytin-A glycoprotein was used to pseudotype a HIV-1-derived lentiviral vector encoding the luciferase LucII. The pseudotyped LV was injected intravenously to mice and transgene expression to high levels was reproducibly obtained in lung parenchymal cells for long periods of time, at least 3 weeks, with little expression in the liver. Detection of the transgene cassette in the lung of mice, 3 weeks after a single intravenous injection of LV-SynA vector, suggested that stable integrative gene transfer can be achieved, particularly in the lung alveolar cells. Intravenous administration of LV-SynA vector to mice leads to less and very low anti-transgene immune responses compared to LV pseudotyped with VSVg. In addition to murine syncytin A, human syncytin 2 can be used to pseudotype lentiviral vectors to efficiently transduce human lung cells including human primary pulmonary epithelial cells. Cell line expression of mLy6e, reported as the receptor for murine Syncytin A, does not allow to predict the ability to transduce cells by LV pseudotyped with SynA. In addition, there is no correlation between human Ly6e receptor expression mRNA levels and transduction with LV-SynA.

5 These results provide the proof-of-concept that syncytin can be reliably used for targeted delivery of a therapeutic drug to the lungs including a therapeutic gene or a gene encoding a therapeutic drug. Syncytin, in particular LV pseudotyped with syncytin, can be used to deliver drugs including transgenes in lung alveolar cells following systemic administration. This opens new ways for the treatment of pulmonary diseases such as for example cystic fibrosis, wherein airway blocking mucus prevents access of drugs including gene delivery vectors to lung epithelial cells, in particular alveolar cells.

10 Thus the present invention relates to a pharmaceutical composition for targeting lung tissue, comprising at least a drug associated to a syncytin protein, for use in the prevention and/or treatment of lung diseases.

15 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Syncytins (also named ERV syncytins) according to the invention refer to highly fusogenic envelope glycoproteins from eutherian mammals, which belong to the family of Endogenous Retroviruses (ERVs). These proteins are encoded by genes, which display a preferential expression in placenta and induce syncytium formation when introduced into cultured cells (Lavialle et al., Phil. Trans. R. Soc. B., 2013, 368:20120507).

20 Syncytins according to the invention can be selected from human syncytins (e.g.: HERV-W and HERV-FRD), murine syncytins (e.g.: syncytin-A and syncytin-B), syncytin-Ory1, syncytin-Carl, syncytin-Rum1 or their functional orthologs (Dupressoir et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102, 725-730; Lavialle et al., Phil. Trans. R. Soc. B., 2013, 368:20120507), and functional fragments thereof comprising at least the receptor binding domain (corresponding to residues 117-144 of Syncytin-1).

30 By functional orthologs it is intended ortholog proteins encoded by ortholog genes and that exhibit fusogenic properties. Fusogenic properties may be assessed in fusion assays as described in Dupressoir et al. (PNAS 2005). Briefly, cells are transfected for example by using Lipofectamine (Invitrogen) and about 1-2 μg of DNA for 5×10^5 cells or calcium phosphate precipitation (Invitrogen, 5-20 μg of DNA for 5×10^5 cells). Plates are generally

inspected for cell fusion 24-48 h after transfection. Syncytia can be visualized by using May-Grünwald and Giemsa staining (Sigma) and the fusion index calculated as $[(N - S)/T] \times 100$, where N is the number of nuclei in the syncytia, S is the number of syncytia, and T is the total number of nuclei counted.

Human syncytins encompasses HERV-W and HERV-FRD. Functional orthologs of these proteins can be found in Homnidae. HERV-W refers to a highly fusogenic membrane glycoprotein belonging to the family of Human Endogenous Retroviruses (HERVs). HERV-W is an envelope glycoprotein; it is also called Syncytin-1. It has the sequence indicated in Ensembl database, corresponding to Transcript ERVW-1-001, ENST00000493463. The highly fusogenic membrane glycoprotein belonging to the family of Human Endogenous Retroviruses (HERVs). HERV-FRD is an envelope glycoprotein, also called Syncytin-2. It has the sequence indicated in Ensembl database, corresponding to Transcript ERVFRD-1, ENSG00000244476. The corresponding cDNA has the sequence listed in SEQ ID NO:2.

15 Murine syncytins encompasses murine syncytin-A (i.e.: mus musculus syncytin-A, synA) and murine syncytin-B (i.e.: mus musculus syncytin-B, synB). Functional orthologs of these proteins can be found in the Muridae family. Murine syncytin-A is encoded by the syncytin-A gene. Syncytin-A has the sequence indicated in Ensembl database. SynA ENSMUSG00000085957. The corresponding cDNA has the sequence listed in SEQ ID NO:3. Murine syncytin-B is encoded by the syncytin-B gene. Syncytin-B has the sequence indicated in Ensembl database. SynB ENSMUSG00000047977. The corresponding cDNA has the sequence listed in SEQ ID NO:4.

25 The syncytin-Ory1 is encoded by the syncytin-Ory1 gene. Functional orthologs of syncytin-Ory1 can be found in the Leporidae family (typically rabbit and hare).

The syncytin-Carl1 is encoded by the syncytin-Carl1 gene. Functional orthologs of syncytin-Carl1 can be found in carnivores mammals from the Laurasiatheria superorder (Cornelis et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110, E828-E837; Lavialle et al., Phil. Trans. R. Soc. B., 2013, 368:20120507).

The syncytin-Rum1 is encoded by the syncytin-Rum1 gene. Functional orthologs of syncytin-Rum1 can be found in ruminant mammals.

In the various embodiments of the present invention, the syncytin according to the invention can be typically selected from the group consisting of HERV-W (Syncytin-1), HERV-FRD (Syncytin-2), syncytin-A, syncytin-B, syncytin-Ory1, syncytin-Carl and syncytin-Rum1 and their functional orthologs; preferably the syncytin is selected from the group consisting of HERV-W, HERV-FRD, murine syncytin-A, murine syncytin-B and their functional orthologs, more preferably the syncytin is selected from the group consisting of HERV-W, HERV-FRD murine syncytin-A and murine syncytin-B.

In the various embodiments of the present invention, the therapeutic drug is associated to a syncytin protein, directly or indirectly, via covalent or not covalent coupling or bonding using standard coupling methods that are known in the art.

In some embodiments, the drug is covalently coupled to the syncytin protein. For example, the drug can be conjugated to syncytin. Covalent coupling of the drug to syncytin may be achieved by incorporating a reactive group in syncytin protein, and then using the group to link the drug covalently. Alternatively a drug which is a protein can be fused to syncytin to form a fusion protein wherein the syncytin and drug amino acid sequences are linked directly or via a peptide spacer or linker.

In some other embodiments, the drug and syncytin protein are incorporated into a drug delivery vehicle, such as for example a polymer-based or particle-based delivery vehicle including with no limitations micelle, liposome, exosome, dendrimer, microparticle, nanoparticle, virus particle, virus-like particle and others.

As used herein, the term "viral vector" refers to a non-replicating, non-pathogenic virus engineered for the delivery of genetic material into cells. In viral vectors, viral genes essential for replication and virulence have been replaced with heterogenous gene of interest.

As used herein, the term "recombinant virus" refers to a virus, in particular a viral vector, produced by recombinant DNA technology.

As used herein, the term "virus particle" or "viral particle" is intended to mean the extracellular form of a non-pathogenic virus, in particular a viral vector, composed of genetic material made from either DNA or RNA surrounded by a protein coat, called the capsid, and

in some cases an envelope derived from portions of host cell membranes and including viral glycoproteins.

As used herein, the term "Virus Like Particle" or "VLP" refers to self-assembling, non-replicating, non-pathogenic, genomeless particle, similar in size and conformation to intact infectious virus particle.

In some preferred embodiments, the drug and syncytin protein are incorporated into particles such as for example liposomes, exosomes, microparticles, nanoparticles, virus particles and virus-like particles. The particles are advantageously selected from the group consisting of liposomes, exosomes, virus particles and virus-like particles. Virus particles and virus-like particles include viral capsids and enveloped virus or virus-like particles. Enveloped virus or virus-like particles include pseudotyped virus or virus-like particles. The virus or virus-like particles are preferably from a retrovirus, more preferably a lentivirus. The virus particles are advantageously from a viral vector, preferably a lentiviral vector.

Retrovirus includes in particular gammaretrovirus, spumavirus, and lentivirus. Lentivirus includes in particular human immunodeficiency virus such as HIV type 1 (HIV1) and HIV type 2 (HIV2) and equine infectious anemia virus (EIAV).

Lentivirus-like particles are described for example in Muratori *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 2010, 614, 111-24; Burney *et al.*, *Curr. HIV Res.*, 2006, 4, 475-484; Kaczmarezyk *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2011, 108, 16998-17003; Aoki *et al.*, *Gene Therapy*, 2011, 18, 936-941. Examples of lentivirus-like particles are VLPs generated by co-expressing in producer cells, a syncytin protein with a gag fusion protein (Gag fused with the gene of interest).

The drug and/or syncytin may be, either displayed on the surface of the particles, or enclosed (packaged) into the particles. The syncytin protein is advantageously displayed on the surface of the particles, such as coupled to the particles or incorporated into the envelope of (enveloped) virus particles or virus-like particles to form pseudotyped enveloped virus particles or virus-like particles. The drug is coupled to the particles or packaged into the particles. For example, the drug is coupled to viral capsids or packaged into viral capsids, wherein said viral capsids may further comprise an envelope, preferably pseudotyped with syncytin. In some preferred embodiments, the drug is packaged into the particles pseudotyped with syncytin protein. The drug which is packaged into particles is advantageously a

heterologous gene of interest which is packaged into viral vector particles, preferably retroviral vector particles, more preferably lentiviral vector particles.

In some more preferred embodiments, the particles are enveloped virus particles or virus-like particles, preferably enveloped virus particles or virus-like particles pseudotyped with syncytin protein, even more preferably lentivirus vector particles pseudotyped with syncytin protein or lentivirus-like particles pseudotyped with syncytin protein. The enveloped virus particles pseudotyped with syncytin protein, preferably lentivirus vector particles pseudotyped with syncytin protein are advantageously packaging a (heterologous) gene of interest.

In the various embodiments of the present invention the drug is any drug of interest for treating lung diseases by targeted delivery to the cells of the lung tissue, in particular lung parenchymal cells such as lung epithelial cells. Such drugs include with no limitations: anti-infectious drugs such as anti-bacterial, viral, fungal or parasitic drugs; anti-inflammatory drugs, anti-cancer drugs; immunotherapeutic drugs including immunomodulatory, immunosuppressive, anti-histaminic, anti-allergic or immunostimulating drugs; therapeutic proteins including therapeutic antibodies or antibody fragments and genome-editing enzymes, therapeutic peptides, therapeutic RNAs and genes of interest for therapy including therapeutic genes and genes encoding therapeutic proteins, therapeutic peptides, and/or therapeutic RNAs as listed above. In some embodiments, the drug excludes anti-cancer drugs. The drug may be a natural, synthetic or recombinant molecule or agent, such as a nucleic acid, peptide nucleic acid (PNA), protein including antibody and antibody fragment, peptide, lipid including phospholipid, lipoprotein and phospholiprotein, sugar, small molecule, other molecule or agent, or a mixture thereof. Immunosuppressive drugs include for example interleukin 10 (IL10), CTLA4-Ig and other immunosuppressive proteins or peptides. Lipoprotein complex includes in particular pulmonary surfactant. Proteins include surfactant-specific proteins such as protein A (SP-A), SP-B, SP-C and SP-D, in particular SP-B and SP-C. Therapeutic nucleic acids such as therapeutic RNAs include antisense RNAs capable of exon skipping such as modified small nuclear RNAs (snRNAs), guide RNAs or templates for genome editing, and interfering RNAs such as shRNAs and microRNAs.

By "gene of interest for therapy", "gene of therapeutic interest", "gene of interest" or "heterologous gene of interest", it is meant a therapeutic gene or a gene encoding a therapeutic protein, peptide or RNA for treating lung diseases.

The therapeutic gene may be a functional version of a gene or a fragment thereof. The functional version means the wild-type version of said gene, a variant gene belonging to the same family, or a truncated version, which preserves the functionality of the encoded protein.

A functional version of a gene is useful for replacement or additive gene therapy to replace a gene, which is deficient or non-functional in a patient. A fragment of a functional version of a gene is useful as recombination template for use in combination with a genome editing enzyme.

Alternatively, the gene of interest may encode a therapeutic protein including a therapeutic antibody or antibody fragment, a genome-editing enzyme or a therapeutic RNA. The gene of interest is a functional gene able to produce the encoded protein, peptide or RNA in cells of the lung tissue, in particular lung parenchymal cells such as lung epithelial cells. The therapeutic protein may be any drug as defined above, such as anti-infectious, anti-inflammatory, anti-cancer and immunotherapeutic drug.

The therapeutic RNA is advantageously complementary to a target DNA or RNA sequence. For example, the therapeutic RNA is an interfering RNA such as a shRNA, a microRNA, a guide RNA (gRNA) for use in combination with a Cas enzyme or similar enzyme for genome editing, or an antisense RNA capable of exon skipping such as a modified small nuclear RNA (snRNA). The interfering RNA or microRNA may be used to regulate the expression of a target gene involved in lung disease. The guide RNA in complex with a Cas enzyme or similar enzyme for genome editing may be used to modify the sequence of a target gene, in particular to correct the sequence of a mutated/deficient gene, or to modify the expression of a target gene involved in lung disease. The antisense RNA capable of exon skipping is used in particular to correct a reading frame and restore expression of a deficient gene having a disrupted reading frame.

The genome-editing enzyme according to the invention is an enzyme or enzyme complex that induces a genetic modification at a target genomic locus. The genome-editing enzyme is advantageously an engineered nuclease which generates a double-strand break (DSB) in the target genomic locus, such as with no limitations, a meganuclease, zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector-based nuclease (TALENs), Cas enzyme from clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)-Cas system and similar enzymes. The genome-editing enzyme, in particular an engineered nuclease, is usually but not

necessarily used in combination with a homologous recombination (HR) matrix or template (also named DNA donor template) which modifies the target genomic locus by double-strand break (DSB)-induced homologous recombination. In particular, the HR template may introduce a transgene of interest into the target genomic locus or repair a mutation in the target genomic locus, preferably in an abnormal or deficient gene causing a lung disease.

The gene of interest is advantageously packaged into an enveloped viral vector particle pseudotyped with syncytin protein, preferably a lentivirus vector particle pseudotyped with syncytin protein. The viral vector comprises the gene of interest in a form expressible in lung cells. In particular, the gene of interest is operatively linked to a ubiquitous, tissue-specific or inducible promoter which is functional in lung cells, in particular a strong promoter such as human CMV enhancer combined with human EF1- α promoter.

In some preferred embodiments of the present invention, the drug of interest including a gene of interest for treating lung diseases is specific for lung diseases in that it targets a gene or gene product (protein/peptide) involved in lung disease(s) that is specifically expressed in lung cells. In particular, the target gene or gene product is highly expressed in lung cells compared to other cell types. The target genes or gene products include also genes and gene products from lung pathogens such as for example *Mycobacterium tuberculosis*, Respiratory Syncytial Virus (RSV) and others.

The invention encompasses a pharmaceutical composition comprising two or more drugs associated to a syncytin protein, and/or a composition wherein at least two different syncytin proteins are associated to one or more drugs.

In the various embodiments of the present invention, the pharmaceutical composition, in particular the composition comprising particles as defined previously with syncytin displayed on its surface, and even more preferably lentiviral particles pseudotyped with syncytin packaging a drug of interest including a gene of interest, is used in any targeted therapy of lung diseases by transducing cells of the lung tissue such as in particular lung parenchymal cells such as lung epithelial cells.

The lungs contain the respiratory tract and its lining, which terminate in alveoli, the lung tissue (lung parenchyma) in between, and veins, arteries, nerves and lymphatic vessels.

The lower respiratory tract begins with the trachea and bronchi. These structures are lined with columnar epithelial cells that possess cilia, small frond-like projections. Interspersed with the epithelial cells are epithelial goblet cells which produce mucus, and club cells with actions similar to macrophages. Surrounding these in the trachea and bronchi are cartilage rings, which help to maintain stability. Bronchioles possess the same columnar epithelial lining, but are not surrounded by cartilage rings. Instead, they are encircled by a layer of smooth muscle. The respiratory tract ends in lobules. These consist of a respiratory bronchiole, which branches into alveolar ducts and alveolar sacs, which in turn divide into alveoli.

The epithelial cells throughout the respiratory tract secrete epithelial lining fluid (ELF), the composition of which is tightly regulated and determines how well mucociliary clearance works, which in turn is coated with a layer of surfactant.

Alveoli consist of two types of alveolar cells and alveolar macrophages. The two types of cells are known as type I and type II alveolar cells (also known as pneumocytes). Types I and II make up the walls and alveolar septa. Type I cells provide 95% of the surface area of each alveoli and Type II cells generally cluster in the corners of the alveoli. Type I are squamous epithelial cells that make up the alveolar wall structure. They have extremely thin walls that enable an easy gas exchange. These type I cells also make up the alveolar septa which separate each alveolus. The septa consist of an epithelial lining and associated basement membranes. Type I cells are not able to divide, and consequently rely on differentiation from Type II cells. Type II epithelial cells are larger and they line the alveoli and produce and secrete epithelial lining fluid, and lung surfactant. Type II cells are able to divide and differentiate to Type I cells. The composition of the invention allows targeted delivery to the cells of the lung tissue. Typically the composition allows targeted delivery to the lung parenchymal cells such as lung epithelial cells.

In some embodiments of the invention, the pharmaceutical composition of the invention, in particular the composition comprising particles as defined previously with syncytin displayed on its surface, and even more preferably lentiviral vector particles pseudotyped with syncytin packaging a drug or gene of interest, preferably a gene of interest, is used for (targeted) gene therapy of lung diseases.

Gene therapy can be performed by gene transfer, gene editing, exon skipping, RNA-interference, trans-splicing or any other genetic modification of any coding or regulatory

sequences in the cell, including those included in the nucleus, mitochondria or as commensal nucleic acid such as with no limitation viral sequences contained in cells.

The two main types of gene therapy are the following:

- 5 - a therapy aiming to provide a functional replacement gene for a deficient/abnormal gene; this is replacement or additive gene therapy;
- a therapy aiming at gene or genome editing: in such a case, the purpose is to provide to a cell the necessary tools to correct the sequence or modify the expression or regulation of a deficient/abnormal gene so that a functional gene is expressed; this is
- 10 gene editing therapy.

In additive gene therapy, the gene of interest may be a functional version of a gene which is deficient or mutated in a patient, as is the case for example in a genetic disease. In such a case, the gene of interest will restore the expression of a functional gene. More preferably in

- 15 such embodiment, the composition of the invention preferably comprises a viral vector coding for the gene of interest. Even more preferably, the viral vector is an integrative viral vector such as a retrovirus, notably a lentivirus as previously described.
- Gene or genome editing uses one or more gene(s) of interest, such as: (i) a gene encoding a therapeutic RNA as defined above such as an interfering RNA like a shRNA or a microRNA, a guide RNA (gRNA) for use in combination with a Cas enzyme or similar enzyme, or an
- 20 antisense RNA capable of exon skipping such as a modified small nuclear RNA (snRNA); (ii) a gene encoding a genome-editing enzyme as defined above such as an engineered nuclease like a meganuclease, zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector-based nuclease (TALENs), Cas enzyme or similar enzymes; or a combination of such genes, and eventually also a fragment of a functional version of a gene for use as recombination template, as defined above. Gene editing may be performed using non-integrative viral
- 25 vectors such as non-integrative lentiviral vectors.

- 30 Of particular interest are deficient or mutated genes in patients exhibiting a lung disease which, once corrected in cells from the lung tissue, improve the patient's disease or symptoms. The cells from the lung tissue are preferably lung parenchymal cells such as epithelial cells from the respiratory tract or alveolar cells. Examples of mutated genes in genetic disease affecting the lung are the following:

- Genes involved in the familial form of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) such as (see Seifant C, Plagens A. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2007;2(4):541-550):

- 5 - the gene SERPINA1 coding for alpha1-antitrypsin (A1AT), which deficiency is the one proven genetic risk factor for COPD. A1AT is secreted and is a serine protease inhibitor whose targets include elastase, plasmin, thrombin, trypsin, chymotrypsin, and plasminogen activator. A1AT is an acute phase protein that provides the major defense against neutrophil elastase. Defects in this gene can cause emphysema or liver disease. Several transcript
- 10 variants encoding the same protein have been found for this gene
 - the gene SERPINA3 coding for α 1-antichymotrypsin (SERPINA3) is capable of inhibiting cathepsin G and mast cell chymase in a reversible fashion. In the SERPINA3 gene two functional SNPs have been associated with low α 1-antichymotrypsin levels and COPD;
 - the gene coding for the Matrix Metalloproteinases (MMP), such as MMP9, MMP1 and MMP2.
- 15 - CFTR gene which codes for a chloride transporter found on the surface of the epithelial cells that line the lungs and other organs. CFTR gene defect leads to Cystic fibrosis (CF) one of the most common fatal genetic disease characterized by bronchiectasis. It causes the body to produce thick, sticky mucus that clogs the lungs, leading to infection, and blocks the pancreas, stopping digestive enzymes from reaching the intestines where they are required to digest
- 20 food. Several hundred mutations have been found in this gene, all of which result in defective transport of chloride, and secondarily sodium, by epithelial cells. As a result, the amount of sodium chloride (salt) is increased in bodily secretions. The severity of the disease symptoms of CF is directly related to the characteristic effects of the particular mutation(s) that have
- 25 been inherited by the patient.

- Defective genes involved in disorders with primary lung pathology, such as the lung
- Interstitial lung diseases (ILDs) and diffuse parenchymal lung diseases (DLPDs) a
- heterogeneous collection of over hundred different pulmonary disorders that affect the tissue
- 30 and spaces surrounding the alveoli. Several mutations are related to disorders with primary lung pathology or with multiple organ pathologies including the lung (see Devine MS, Garcia CK. Genetic Interstitial Lung Disease. Clinics in Chest Medicine. 2012 ;33(1):95-110, or Steele MP, Brown KK. Genetic Predisposition to Respiratory Diseases: Infiltrative Lung Diseases. Respiration; international review of thoracic diseases. 2007;74(6):601-608, as well

- NFI gene, which mutations have been associated with loss of function of tumor suppressor in patients with neurofibromatosis of type I;
 - TSC1 gene (which mutations have been associated with proliferation of LAM cells) and TSC2 which mutations have been found in patients with Tuberous Sclerosis/LAM;
 5 - FLCN gene, which mutations have been associated with Loss of folliculin have been found in patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome;
 - HPS1 gene, which mutations have been associated with defect in cytoplasmic organelles) and HSP4 gene which mutations have been found in patient with Hermansky-Pudlak syndrome;
 10 - GBA gene, which mutations have been associated with Deficiency of acid β -glucosidase have been found in patients with Gaucher disease, type I;
 - SMPD1 gene, which mutations have been associated with Deficiency of acid sphingomyelinase, and found in patients with Niemann-Pick disease, type B;
 - SLC7A7 gene, which mutation have been associated with Defect of cationic amino acid transport and found in patients with Lysinuric protein intolerance;
 15 - Defective genes involved in primary pulmonary hypertension, causing high pulmonary arterial pressure, vascular remodeling and premature death, such as:
 - SMAD9 gene, coding for a member of the SMAD family, which transduces signals from TGF-beta family members. The encoded protein is activated by bone morphogenetic proteins and interacts with SMAD4. A heterozygous truncating mutation in the SMAD9 gene (R294X) has been identified in patient with primary pulmonary hypertension -2 (PPH2).
 20 - KCNK3 gene encoding a pH-sensitive potassium channel in the 4-transmembrane/2-pore domain superfamily. Several substitutions at highly conserved residues, including E182K, V221L, G97R and G203D, were identified in patients with primary pulmonary hypertension -4 (PPH4).
 25 CAV1 gene which mutations have been associated with primary pulmonary hypertension -3 (PPH3).
 Such genes may be targeted in the lung tissue in replacement gene therapy, wherein the gene of interest is a functional version of the deficient or mutated gene.

Alternatively, these genes could be used as target for gene editing. A specific example of gene editing would be the treatment of cystic fibrosis: in such a disease, point deletion (F508Del) or point mutations such as G551D, G542X (L265P) of the CFTR gene has been observed in

as Selman M, et al. Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. Hum Genet. 2003;113:542-550 or Noguee LM, et al. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:973-981), such as:
 5 Gene associates with surfactant dysfunctions:
 - SFTPB gene, which mutations in have been associated with absent SP-B and found in patients with Surfactant Metabolism Dysfunction 1, a severe respiratory distress in neonates and infants;
 - SFTPC gene, which mutations have been associated with Lack of SP-C and ER stress and found in patients with Surfactant Metabolism Dysfunction 2, a severe respiratory distress in neonates and infants;
 10 - SFTPA2 gene, which mutations have been associated with ER stress of alveolar epithelium and found in patients with Familial Pulmonary Fibrosis;
 - SFTPD gene, which mutations have been associated with COPD and atopy in asthma (Fakh *et al.*, Respirology, 2017 Sep 28;doi/10.1111/resp.13193);
 15 - ABCA3 gene, which mutations have been associated with Defective transport of phospholipid into lamellar bodies and found in patients with Surfactant Metabolism Dysfunction 3, a severe respiratory distress in neonates and infants;
 - CSF2RA gene (which mutations have been associated with Defective GM-CSF signaling), CSF2RB have been found in patients with Surfactant Metabolism Dysfunction 4, a severe respiratory distress in neonates and infants;
 20 - SLC34A2 gene, which mutations have been associated with Reduced phosphate clearance from alveolar space and found in patients with pulmonary Alveolar Microolithiasis. Although this protein can be found in several organs and tissues in the body, it is located mainly in the millions of small air sacs (alveoli) in the lungs, specifically in alveolar type II cells which produce surfactant.
 Other genes of interest:
 - TERT gene, which mutations have been associated with Telomere shortening and found in patients with Familial Pulmonary Fibrosis;
 30 - TERC gene, which mutations has been found in patients with Familial Pulmonary Fibrosis;
 - DKC1, TERC, TERT, TINF2 genes, which mutations have been associated with telomere shortening and related to dyskeratosis congenita;

the tumor cells, or induce tumor cell death. For instance, inducible caspase-9 could be expressed in epithelial cells of the lung tissue to trigger cell death, preferably in combination therapy to elicit durable anti-tumor immune responses.

5 In gene therapy, it might be possible to use the composition of the invention as previously described and more particularly, the stable lentiviral particles pseudotyped with syncytin as per the invention in therapy for lung tissue engineering, preferably endogenous pulmonary stem cells engineering, by transducing said cells (Nichols JE, Niles JA, Cortiella J. Design and development of tissue engineered lung: Progress and challenges. *Organogenesis*. 2009, 5, 57-61).

10 It could also be possible to insert sequences favoring gene splicing, expression or regulation or gene editing. Tools such as CRISPR/Cas9 may be used for this purpose. This could be used to modify gene expression in lung parenchymal cells such as lung epithelial cells, in the case of auto-immunity or cancer, or to perturb the cycle of viruses in such cells. In such cases, preferably, the heterologous gene of interest is chosen from those encoding guide RNA (gRNA), site-specific endonucleases (TALEN, meganucleases, zinc finger nucleases, Cas nuclease), DNA templates and RNAi components, such as siRNA and microRNA.

15 To treat infectious diseases of the lung, the gene of interest may also target essential components of the lung pathogen life cycle. For example, the gene of interest can encode an antibody or antibody-like molecule capable of recognizing specifically a lung pathogen and blocking its life cycle or its effects.

20 By "infectious diseases", it is meant diseases which are caused by pathogenic microorganisms, such as bacteria, viruses, parasites or fungi; the diseases can be spread, directly or indirectly, from one person to another.

25 The pharmaceutical composition comprising stable pseudotyped lentiviral particles according to the invention could be used together or sequentially to target the same cells. This could be an advantage in strategies such as gene editing, in which multiple components of the gene editing platform need to be added to the cells.

30 In some other embodiments of the invention, the pharmaceutical composition of the invention comprising a drug associated to a syncytin protein, in particular the composition comprising

some patient populations. Thus, by gene editing a correct version of this gene in afflicted patients, this may contribute to effective therapies against this disease. Other genetic diseases of the lung as listed above could be treated by gene editing using the same principle.

5 Examples of mutated genes in genetic diseases with primary lung pathology or with multiple organ pathologies including severe lung pathology in particular those expressed in lung epithelial cells which lead to the production of non-functional epithelial lining fluid or lung surfactant which could be treated by expressing or correcting the causal gene in epithelial cells, are the following: SERPINA3, SERPINA1, MMP (notably MMP1, MMP2 and MMP9), CFTR, SFTPB, SFTPC, ABCA3, CSF2RA, TERT, TERC, SFTPA2, SLC34A2, DKC1, TERC, TERT, TINF2, NF1, TSCI, FLCN, STAT3, HPS1, GBA, SMPD1, SLC7A7, SMAD9, KCNK3 and CAV1.

10 More preferably a gene of interest can be selected from the group comprising SERPINA3, SERPINA1, MMP, CFTR, SFTPB, SFTPC, ABCA3, CSF2RA, TERT, TERC, SFTPA2, SLC34A2, SMAD9, KCNK3 and CAV1 which are specifically associated with diseases affecting the lung including cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), various Interstitial lung diseases (ILDs) or diffuse parenchymal lung diseases and primary pulmonary hypertension.

15 Gene selected from the group comprising DKC1, TERC, TERT, TINF2, NF1, TSCI, FLCN, STAT3, HPS1, GBA, SMPD1 and SLC7A7 are associated with genetic disorders affecting multiple organs, including the lung.

20 In one embodiment, a gene of interest can also be selected from genes which are specifically expressed in the lung, such as more particularly the group comprising SERPINA3, SERPINA1, CFTR, SFTPB, SFTPC, SFTPA2, and ABCA3.

25 Gene therapy could also be used for treating asthma, by correcting surfactant protein D gene mutations causing COPD and atopy in asthma (Fakih *et al.*, *Respirology* 2017) or by expressing molecules, such as antibodies or antibody fragments, blocking IL4, IL-13 or IL-23 in lungs or molecules regulating eosinophils, mast cells, or Th2 inflammation in lung.

30 Replacement or additive gene therapy could also be used to treat cancer, notably lung cancer. Genes of interest in cancer could regulate the cell cycle or the metabolism and migration of

5 particles as defined previously with syncytin displayed on its surface, and even more preferably lentiviral particles pseudotyped with syncytin packaging a drug or gene of interest, preferably a gene of interest, is used for immunomodulation or to modulate lung transplant tolerance. In particular, the composition is administered to a lung transplant donor for the prevention of lung transplant rejection. For these uses, the drug is in particular an immunosuppressive drug such as IL-10, CTLA4-Ig or other immunosuppressive peptides, or VEGF mutants that improve lymphangiogenesis (Cui et al. J. Clin. Invest. 2015, Nov 2;125(11):4255-68.) and the gene of interest is a gene encoding said immunosuppressive drugs or VEGF mutants.

10

In some other embodiments of the invention, the pharmaceutical composition of the invention comprising a drug associated to a syncytin protein, in particular the composition comprising particles as defined previously with syncytin displayed on its surface, and even more preferably lentiviral particles pseudotyped with syncytin packaging a drug or gene of interest, preferably a gene of interest is used for treating fibrosis or amyloidosis with competing proteins.

15

In some other embodiments, the pharmaceutical composition of the invention comprising pulmonary surfactant or surfactant complexes delivered by syncytin-containing virus-like particles are administered to newborns or premature babies in surfactant replacement therapy for the prevention of lung problems or diseases (see for example Poullain FR, Clements JA, Pulmonary surfactant therapy. Western Journal of Medicine. 1995;162, 43-50). In particular, the pharmaceutical composition comprises surfactant protein(s) or RNA(s) encoding surfactant protein(s) packaged into enveloped lentivirus-like particles displaying syncytin on their surface.

25

In the various embodiments of the present invention, the pharmaceutical composition comprises a therapeutically effective amount of drug associated to syncytin protein.

30 In the context of the invention, the term "treating" or "treatment", as used herein, means reversing, alleviating or inhibiting the progress of the disorder or condition to which such term applies, or reversing, alleviating or inhibiting the progress of one or more symptoms of the disorder or condition to which such term applies.

Likewise, a therapeutically effective amount refers to a dose sufficient for reversing, alleviating or inhibiting the progress of the disorder or condition to which such term applies, or reversing, alleviating or inhibiting the progress of one or more symptoms of the disorder or condition to which such term applies.

5

The effective dose is determined and adjusted depending on factors such as the composition used, the route of administration, the physical characteristics of the individual under consideration such as sex, age and weight, concurrent medication, and other factors, that those skilled in the medical arts will recognize.

10

In the various embodiments of the present invention, the pharmaceutical composition comprises a pharmaceutically acceptable carrier and/or vehicle.

A "pharmaceutically acceptable carrier" refers to a vehicle that does not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. Preferably, the pharmaceutical composition contains vehicles, which are pharmaceutically acceptable for a formulation capable of being injected. These may be in particular isotonic, sterile, saline solutions (monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or dry, especially freeze-dried compositions which upon addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permit the constitution of injectable solutions.

15

20

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or suspensions. The solution or suspension may comprise additives which are compatible with enveloped viruses and do not prevent virus entry into target cells. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. An example of an appropriate solution is a buffer, such as phosphate buffered saline (PBS).

30

The invention provides also a method for treating a lung disease, comprising: administering to a patient a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition as described above. The lower immunogenicity of LV pseudotyped with syncytin is expected to allow

long-term gene expression in cells from lung tissue by repeated administration of the pharmaceutical composition.

5 As used herein, the term "patient" or "individual" denotes a mammal. Preferably, a patient or individual according to the invention is a human.

The pharmaceutical composition of the present invention, in particular, the composition comprising particles as defined previously with syncytin displayed on its surface, and even more preferably lentiviral particles pseudotyped with syncytin packaging a drug of interest including a gene of interest, is generally administered according to known procedures, at dosages and for periods of time effective to induce a therapeutic effect in the patient.

The administration may be by injection, oral or local (respiratory) administration. The injection may be subcutaneous (SC), intramuscular (IM), intravenous (IV), intraperitoneal (IP), intradermal (ID) or else. Preferably, the administration is by injection, inhalation or broncho-alveolar lavage. Preferably the injection is intravenous. The inhalation is advantageously done by nebulisation.

20 In the various embodiments of the present invention, the lung diseases may be advantageously selected from the group consisting of: genetic diseases affecting the lung such as typically cystic fibrosis and alpha-1 antitrypsin deficiency; infectious diseases affecting the lung such as tuberculosis, Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection or other pneumonia (such as interstitial pneumonia); somatic and inflammatory diseases of the lung such as cancer (more particularly lung cancer and lung metastasis), asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), pulmonary fibrosis, edema, emphysema or hypertension, acute respiratory distress syndrome (ARDS), pneumoconiosis such as from asbestos exposure, auto-immune diseases of the lung such as nonspecific interstitial pneumonitis, any other interstitial lung diseases (ILDs), or diffuse parenchymal lung diseases (DLPDs), prevention of lung transplant rejection and prevention of lung problems or diseases in newborns and premature babies. In some embodiments, the lung diseases exclude cancer. In some embodiments, Syncytin A, preferably lentiviral vector particles pseudotyped with syncytin A packaging a drug or gene of interest, preferably a gene of interest, are used for treating lung cancers. In some preferred embodiment, the lung diseases are selected from the group consisting of: genetic diseases

affecting the lungs; infectious diseases affecting the lungs; inflammatory or auto-immune diseases of the lungs, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary fibrosis, oedema, emphysema or hypertension, acute respiratory distress syndrome, pneumoconiosis, interstitial lung diseases or diffuse parenchymal lung diseases, prevention of lung transplant rejection and prevention of lung problems or diseases in newborns and premature babies.

The present invention relates also to the use of a composition of the invention comprising a drug associated to a syncytin protein, in particular the composition comprising particles as defined previously with syncytin displayed on its surface, and even more preferably lentiviral particles pseudotyped with syncytin packaging a drug or gene of interest, preferably a gene of interest, for non-therapeutic purposes. Non-therapeutic purposes include increasing the lung capacity of a healthy subject, in particular to breathe underwater.

The present invention relates also to the use of a composition of the invention for the preparation of lung transplant or post-mortem conservation of lung tissue. In such embodiment the drug may be for example selected from antioxidants.

The invention also relates to an in vivo or ex vivo method of imaging lung tissue, comprising the administration of a syncytin protein associated to an imaging agent to an individual.

20 Advantageously, said syncytin protein associated to an imaging agent is a lentiviral particle pseudotyped with syncytin, which incorporates an imaging agent. More preferably said imaging agent is coupled to the viral capsid or enclosed into said viral capsid.

The invention relates also to a pharmaceutical composition for targeting lung disease, as defined above, comprising a drug of interest specific for lung disease associated to syncytin protein, wherein the drug of interest including gene of interest, targets a gene or gene product (protein/peptide) involved in lung disease(s) that is specifically expressed in lung cells, as defined above.

30 In some preferred embodiments, the pharmaceutical composition comprises a gene of interest for gene therapy of lung diseases. Preferably, the gene of interest targets a gene responsible for a genetic disease affecting the lungs, such as in particular selected from the group comprising cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), Interstitial lung diseases (ILDs), diffuse parenchymal lung diseases and primary pulmonary hypertension.

The target gene responsible for a genetic disease can be selected from the group comprising SERPINA3, SERPINA1, MMP, CFTR, SFTPB, SFTPC, ABCA3, CSF2RA, TERT, TERC, SFTPA2, SLC34A2, SMAD9, KCNK3 and CAV1 which are specifically associated with diseases affecting the lung notably selected from the group comprising SERPINA3, SERPINA1, CFTR, SFTPB, SFTPC, SFTPA2, and ABCA3 which are specifically expressed in the lung. The gene of interest is suitable for gene therapy of said genetic disease by gene replacement or gene editing, as defined above.

In some other preferred embodiments, the pharmaceutical composition comprises a gene of interest targeting an essential gene of a lung pathogen. The pathogen can be selected from the group comprising *Mycobacterium tuberculosis*, Respiratory Syncytial Virus (RSV) and others.

In the various embodiments, the pharmaceutical composition preferably comprises particles with syncytin displayed on their surface, and even more preferably lentiviral particles pseudotyped with syncytin packaging a gene of interest for gene therapy of lung diseases by targeting specifically a gene expressed in the lungs.

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature.

In the various embodiments, viral particles, in particular viral vector particles, and virus-like particles may be produced using standard recombinant DNA technology techniques.

In particular, stable pseudotyped lentiviral particles including a heterologous gene of interest for use in the invention may be obtained by a method comprising the following steps:

- a) transfecting at least one plasmid in appropriate cell lines, wherein said at least one plasmid comprises the heterologous gene of interest, the retroviral *rev*, *gag* and *pol* genes, and a nucleic acid coding for an ERV syncytin;
- b) incubating the transfected cells obtained in a), so that they produce the stable lentiviral particles pseudotyped with an ERV syncytin, respectively, and packaging the heterologous gene of interest; and
- c) harvesting and concentrating the stable lentiviral particles obtained in b).

The method allows obtaining high physical titers, as well as high infectious titers, of stable pseudotyped lentiviral particles including a heterologous gene of interest. Preferably, step c) of the method comprises harvesting, concentrating and/or purifying the stable lentiviral particles produced in step b), from the supernatant. Thus, preferably, the concentration of step c) comprises centrifugating and/or purifying the harvested stable lentiviral particles obtained in b). Said harvest may be performed according to well-known methods in the art. Preferably, the lentiviral vectors are harvested before fusion of the transfected cells, more preferably between 20 hours and 72 hours post-transfection, preferably after 24 hours. Preferably, the harvesting step consists of a single lentivirus harvest, preferably implemented between 20 and 72 hours post-transfection, preferably between 20 and 30 hours post-transfection, more preferably after 24 hours.

In step a), appropriate cell lines are transfected with at least one plasmid. Preferably, the transfection is a transient transfection. Preferably, appropriate cell lines are transfected with at least one, two, three or four plasmids. These cell types include any eukaryotic cell which support the lentivirus life cycle. Preferably, the appropriate cell lines are stable cell lines or cell lines refractory to the catastrophic consequences of the fusogenic effects of syncytins, so as to continue growing while producing the particles. Said appropriate cell lines are mammalian cell lines, preferably human cell lines. Representative examples of such cells include Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells and derivatives thereof, HEK293 T cells, as well as subsets of cells selected for their ability to grow as adherent cells, or adapted to grow in suspension under serum-free conditions. Such cells are highly transfectable.

The appropriate cell lines may already be expressing at least one, and at most four of the five sequences which are the heterologous gene of interest, the retroviral *rev*, *gag* and *pol* genes, and the nucleic acid coding for an ERV syncytin such as HERV-W, HERV-FRD or murine syncytinA, preferably in inducible form. In such a case, step a) comprises transfecting said cell line with at least one plasmid comprising at least one sequence which is not already expressed in said cell line. The plasmid mixture, or the single plasmid (if only one plasmid is used) is chosen such that, when transfected into said cell lines in step a), said cell lines express all five above sequences. For example, if the appropriate cell line expresses the retroviral *rev*, *gag* and *pol* genes, then the plasmid or mixture of plasmids to be transfected comprises the remaining sequences to be expressed, i.e. the heterologous gene of interest and

more preferably at least 95%, more preferably at least 99% identity with such SEQ ID NO:1, 2, or 3 respectively. Preferably, step a) comprises the transfection of at least the plasmid comprising, preferably consisting of, the cDNA sequence listed in SEQ ID NO:5 or 6.

The term "identity" refers to the sequence similarity between two polypeptide molecules or between two nucleic acid molecule. When a position in both compared sequences is occupied by the same base or same amino acid residue, then the respective molecules are identical at that position. The percentage of identity between two sequences corresponds to the number of matching positions shared by the two sequences divided by the number of positions compared and multiplied by 100. Generally, a comparison is made when two sequences are aligned to give maximum identity. The identity may be calculated by alignment using, for example, the GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) pileup program, or any of sequence comparison algorithms such as BLAST, FASTA or CLUSTALW.

The plasmids encoding the envelope glycoproteins which may be used are known to those skilled in the art such as the commercially available pCDNA3, backbone or any other plasmid cassette using a similar expression system, for instance using the CMV promoter such as the pKG plasmid described in Merten et al. (Human gene therapy, 2011, 22, 343-350).

According to step a), various techniques known in the art may be employed for introducing nucleic acid molecules into cells. Such techniques include chemical-facilitated transfection using compounds such as calcium phosphate, cationic lipids, cationic polymers, liposome-mediated transfection, such as cationic liposome like Lipofectamine (Lipofectamine 2000 or 3000), polyethylenimine (PEI), non-chemical methods such as electroporation, particle bombardment or microinjection. The transfection of step a) is preferably carried out using calcium phosphate.

Typically, step a) may be performed by transient transfection of 293T cells with 4 plasmids (quadransfection), in the presence of calcium phosphate. The 4 plasmids are preferably: a pKL plasmid expressing the HIV-1 *gag* and *pol* genes, a pK plasmid expressing HIV-1 *rev* gene, a pCCL plasmid expressing the heterologous gene of interest under control of a cellular promoter such as the human phosphoglycerate kinase (PGK) promoter and a pCDNA3 plasmid expressing an ERV syncytin, such as an ERV syncytin as previously defined and

the nucleic acid coding for an ERV syncytin such as HERV-W, HERV-FRD or murine syncytinA.

When one single plasmid is used, it comprises all the 5 sequences of interest, i.e.:

- the heterologous gene of interest,
- the *rev*, *gag* and *pol* genes, and
- a nucleic acid coding for an ERV syncytin as previously described and notably coding for HERV-W, HERV-FRD or the murine syncytinA.

When two or three plasmids are used (plasmid mixture), each of them comprises some of the sequences of interest listed in the previous paragraph, so that the plasmid mixture comprises all the above cited sequences of interest.

Preferably four plasmids are used, and the quadransfection comprises the following:

- the first plasmid comprises the gene of interest,
- the second plasmid comprises the *rev* gene,
- the third plasmid comprises the *gag* and *pol* genes, and
- the fourth plasmid comprises a nucleic acid coding for an ERV syncytin as previously described and notably coding for HERV-W, HERV-FRD or the murine syncytin-A.

Said quadransfection is preferably performed with specific ratios between the four plasmids. The molar ratio between the different plasmids can be adapted for optimizing the scale-up of the production. The person skilled in the art is able to adapt this parameter to the specific plasmids he uses for producing the lentivirus of interest. In particular, the weight ratios of the first, second, third, fourth plasmids are preferably (0.8-1.2); (0.1-0.4); (0.5-0.8); (0.8-1.2), more preferably around 1: 0.25; 0.65; 0.9.

The *rev*, *gag* and *pol* genes are retroviral, preferably lentiviral. Preferably, they are HIV genes, preferably HIV-1 genes, but could be also EIAV (Equine Infectious Anemia Virus), SIV (Simian immunodeficiency Virus), Foamy Virus, or MLV (Murine Leukemia Virus) virus genes.

The nucleic acid coding for the ERV syncytin, such as an ERV syncytin as previously defined and more preferentially coding for HERV-W, HERV-FRD or the murine syncytin-A is a DNA or cDNA sequence. Preferably, it corresponds to the cDNA sequence respectively listed in SEQ ID NO:1, 2 or 3, or to a sequence presenting at least 80%, preferably at least 90%,

more preferentially expressing HERV-W (Syncytin-1), HERV-FRD (Syncytin-2) or the murine syncytin-A (Syncytin-A) glycoproteins from a CMV promoter.

Then, after step a), the method comprises a step b) of incubating the transfected cells obtained in a), so that they produce, preferably in the supernatant, the lentiviral particles pseudotyped with an ERV syncytin, such as an ERV syncytin as previously defined and more preferentially pseudotyped with HERV-W, HERV-FRD or the murine syncytin-A including the heterologous gene of interest. Indeed, once step a) is performed, incubation of the obtained cells is performed. This leads to the production in the supernatant of the stable lentiviral particles, which are pseudotyped with an ERV syncytin, such as an ERV syncytin as previously defined and more preferentially pseudotyped with HERV-W, HERV-FRD or the murine syncytin-A and which include the heterologous gene of interest.

After transfection, the transfected cells are thus allowed to grow for a time which may be comprised between 20 and 72 hours post-transfection, in particular after 24 hours.

The medium used for culturing the cells may be a classical medium, such as DMEM, comprising a sugar, such as glucose. Preferably, the medium is a serum-free medium. Culture may be carried out in a number of culture devices such as multistack systems or bioreactors adapted to the culture of cells in suspension. The bioreactor may be a single-use (disposable) or reusable bioreactor. The bioreactor may for example be selected from culture vessels or bags and tank reactors. Non-limiting representative bioreactors include a glass bioreactor (e.g. B-DCU@ 2L- 10L, Sartorius), a single-use bioreactor utilizing rocking motion agitation such as wave bioreactor (e.g. Cultibag RM@ 10L-25L, Sartorius), single use stirrer tank bioreactor (Cultibag STR@ 50L, Sartorius), or stainless steel tank bioreactor.

After incubation, the obtained stable lentiviral particles are harvested and concentrated; this is step c). Preferably, the stable lentiviral particles obtained in b) are harvested before fusion of the transfected cells, more preferably 24h post-transfection. Preferably, the stable lentiviral particles present in the supernatant obtained in b) are centrifuged and/or purified. Said concentration step c) may be performed by any known method in the art, such as by centrifugation, ultrafiltration/diafiltration and/or chromatography.

The supernatant may be centrifuged at a speed comprised between 40000 and 60000 g, during 1h to 3h, at a temperature comprised between 1°C and 5°C, so as to obtain a centrifugate of stable pseudotyped viral particles. Preferably, the centrifugation is performed

at a speed of 45000 to 55000 g, during 1h30 to 2h30, at a temperature of 2°C to 5°C, preferably around 4°C. At the end of this step, the particles are concentrated in the form of a centrifugate, which may be used.

Step c) may be chromatography, such as an anion exchange chromatography, or an affinity chromatography. The anion exchange chromatography may be preceded or followed by a step of ultrafiltration, in particular an ultrafiltration/diafiltration, including tangential flow filtration. The anion exchange chromatography is for example a weak anion exchange chromatography (including DEAE (D) - diethylaminoethyl, PI - polyethylenimine).

The invention will now be exemplified with the following examples, which are not limitative, with reference to the attached drawings in which:

FIGURE LEGENDS

15 **Figure 1: Bioluminescence analysis following SynA-LV Luc2 delivery.**

Bioluminescence of mice injected with LucII-expressing vectors comparing vectors pseudotyped with Syncytin A (SyA) or VSVg versus control PBS. Two representative mice per group. Mice 1 & 2 were injected with PBS, mice 10 & 11 were injected with LV-SyA-LucII and mice 12 & 15 were injected with LV-VSVg-LucII. Bioluminescence analyses were performed at day 16 post IV injection with the IVIS Lumina apparatus. The whole body luminescence is measured in photon/sec. Bioluminescence is measured on the front and on the back of the mice using a contour mask of the animal.

- PBS group: The signal of mouse 1 (S1) from the back is $3,531.10^5$ photons/second, and from the front $1,446.10^4$ photons/second. For mouse 2 (S2), the signal from the back is $3,351.10^5$ photons/second and from the front $1,163.10^4$ photons/second.

- LV-SyA-LucII group: For the mouse 10 (S10), the signal from the back is $3,952.10^7$ photons/second and from the front $1,019.10^7$ photons/second. For mouse 11 (S11) the signal from the back is $4,344.10^7$ photons/second and from the front $3,573.10^7$ photons/second.

- LV-VSVg-LucII group: For mouse 12 (S12), the signal from the back is $3,052.10^8$ photons/second and from the front $6,636.10^8$ photons/second. For mouse 15 (S15), the signal from the front is $5,478.10^8$ photons/second and from the front $8,311.10^8$ photons/second.

Figure 2: Quantification of the bioluminescence signal in the lungs following Syncytin A-LV-LucII systemic delivery.

LV-Syncytin A or -VSVg encoding LucII transgene (LV-SynA (n=20) or LV-VSVg (n=4)) was injected intravenously into albinos C57Bl/6 mice at a dose of 5×10^5 ig (infectious genome)/mouse, PBS is injected as a control (n=11). Bioluminescence signal is measured in the lungs (photons/sec) in individual mice over time, at day 7, 14 and 21 post-injection (upon exposure of the back). Each dot represents a mouse.

Figure 3. Biodistribution of gene transfer following syncytinA-mediated gene delivery.

LV-Syncytin A encoding LucII transgene (LV-SA-LucII; n = 6) were injected intravenously into albinos C57Bl/6 mice (3×10^5 ng p24/mouse). As control a LV-VSVg encoding the same transgene was used (LV-VSVg-LucII; n = 4), as well as PBS (n = 3). The Vector Copy Number per diploid cell (VCN) was measured by qPCR in the different organs recovered at the time of sacrifice of the mice at week 3. The grey zone indicated the limit of quantification of the technique.

Figure 4 : PCR around the PSI sequence of the integrated provirus in lungs of mice injected with a single dose of LV-SynA vector

LV-Syncytin A or -VSVg encoding LucII transgene (LV-SynA (n=6) or LV-VSVg(n=4)) was injected intravenously into albinos C57Bl/6 mice at a dose of 5×10^5 ig (infectious genome)/mouse, PBS is injected as a control (n=2). Genomic DNA is extracted from total lung cells at 3 weeks post-injection. A PCR is performed on these gDNA, amplifying the PSI sequence of the integrated provirus, the expected fragment of PSI is at 489bp.

Figure 5: Representative immunohistostaining of luciferase in the lung following syncytinA-mediated gene delivery.

A- LV-Syncytin A encoding LucII transgene (LV-SA-LucII; n = 6) were injected intravenously into albinos C57Bl/6 mice (3×10^5 ng p24/mouse). As control PBS (n = 3) was used. Sections of frozen lung (representative of 3 mice tested in such way) were stained with an anti-luciferase antibody and revealed with a secondary antibody coupled with AlexaFluor 594. Nuclei were counterstained by DAPI. Sections were visualized with the confocal microscope Leica SP8. The top panels of Figure 5A correspond to a lung section from a PBS-treated control animal and the bottom panel corresponds to a lung section from a LV-SynA-Luc2-treated mouse. The left panels of Figure5A show the luciferase immunostaining and

the right panel shows the same section with the DAPI stain which shows all cell nuclei on the section.

B-C LV-Syncytin A encoding LucII transgene (LV-SA-LucII) was injected intravenously into albinos C57Bl/6 mice (5×10^5 IG/mouse). Three weeks after injection, mice were sacrificed, lungs were fixed, paraffin-embedded and sectioned for immunostaining. Images in (B) and (C) are representative of 8 mice tested in such way. Lung sections were stained with DAPI (B) to detect all cell nuclei defining the presence of alveoli; and with an anti-luciferase antibody revealed with a secondary antibody coupled with AlexaFluor 594 to detect the luciferase-expressing cells and in particular the epithelial cells lining the lung alveoli (C). Controls included mice injected with PBS in the same conditions (n = 11 mice). Immunostaining of lungs in PBS-injected mice showed DAPI+ cells without detectable luciferase (data not shown).

Figure 6: Reduced immune response against transgene following systemic delivery using LV-SynA, compared to LV-VSVg, as measured using Elispot anti-IFN γ and CBA .

Six-week-old C57Bl/6 mice were injected intravenously (IV) into the tail vein with PBS, $7.5 \cdot 10^5$ ig (infectious genome)/mouse of LV-SynA_GFP-HY or LV-VSVg_GFP-HY vectors. (A) Twenty-one days later, spleen cells were harvested to measure Dby-specific CD4+T cell and Uty-specific CD8+ T cell response by 125 I-FEN-ELISPOT following peptide *in vitro* stimulation. Data represent one experiment including 3 mice per group.

(B) For the titration of cytokines secreted by T cells. Three weeks after the immunization, total splenocytes were re-stimulated *in vitro* by Dby, Uty peptides, or Concanavalin A (conA) as positive control. After 36 h of culture, supernatants were removed and titrated for the indicated cytokines (3 mice/group/experiment). Each point represent an individual measurement with at least 2 measurement per mice.

Figure 7: Human lung MRC5 and W126VA4 cells transduction with LV-SynA (n=2 experiments).

Vector copy number per cell were determined by qPCR following transduction of two cell lines with increasing concentrations (10^5 , 5×10^5 infectious genome (ig)/mL) of a LV pseudotyped with Syncytin-A. As a positive control, cells were transduced with 10^6 infectious units/mL of a LV pseudotyped with VSVg. The negative control consisted of non-transduced cells. Results of two experiments.

Figure 8 : Human lung MRC5 cells transduction with LV-Syncytins (-A, -B, -1 or -2) 7 days post-transduction (n=3 experiments).

Vector copy number per cell was determined at 7 days post-transduction by qPCR following transduction of MRC5 cells with a concentration of 10^5 IG/mL of LV pseudotyped with Syncytins (-1, -2, -A or -B), in presence of Vectofusin-1[®] (12µg/mL). As a positive control, cells were transduced with 10^6 IG/mL of a LV pseudotyped with VSVg. The negative control consisted of non-transduced cells. Results of two experiments for LV-SynB, LV-Syn1 and LV-Syn2, or three experiments for LV-SynA and LV-VSVg.

Figure 9 : Human Small Airway Epithelial Cells transduction with LV-Syncytins (-A, -1 or -2) 7 days post-transduction (n=5 experiments).

Vector copy number per cell was determined at 7 days post-transduction by qPCR following transduction of Human Small Airway Epithelial Cells (Primary Small Airway Epithelial Cells; Normal, Human (ATCC® PCS3010101™)) with a concentration of 10^5 ig/mL of LV pseudotyped with Syncytins (-A, -1 or -2) in presence of Vectofusin-1[®] (12µg/mL). As a positive control, cells were transduced with 10^6 IG/mL of a LV pseudotyped with VSVg and confirmed the ability to transduce these cells (0.75 vector copy per cell was found) and to detect the transgene in these cells (data not shown). The negative control consisted of un-transduced cells (no vector). Results are averages of five experiments for LV-SynA, and three experiments for LV-Syn1, LV-Syn2 (and LV-VSVg).

Figure 10 : Comparison between the level of expression of mLy6c mRNA and the level of transduction on different cell lines.

(A) mRNA were extracted from different cell lines (A2011A, C2C12, NIH3T3) and converted into cDNA to perform a qRT-PCR on mLy6c, using PO as a housekeeping gene. Relative levels were calculated with the formula $abundance=2^{-\Delta Ct}$. The qRT-PCR was validated by testing total cells from the lung, spleen or bone marrow of C57BL/6 mice which confirmed that the mLy6c expression level was the highest in lung cells, as published by Bacquin et al 2017 (data not shown).

(B) The same cell lines as in Figure 10 (A) were transduced with LV-Syncytin A vectors encoding ΔNGFR at a dose of 10^5 IG/mL. The level of transduction was analysed by flow cytometry at 7 days post-transduction.

Figure 11 : Comparison between the level of expression of hLy6c mRNA and the level of transduction on different cell lines.

(A) mRNA were extracted from different cell lines (HEK293T, HCT116, HT1080, WIZ6VA4, Jurkat, RAIJ and MRC5) and converted into cDNA to perform a qRT-PCR on hLy6c, using PO as a housekeeping gene. Relative levels were calculated with the formula $abundance=2^{-\Delta Ct}$. The numbers indicated on the bar graph are the actual values of mRNA expression.

(B) The same cell lines as in Figure 10 (A) were transduced with LV-Syncytin A vectors encoding ΔNGFR at a dose of 10^5 IG/mL. The level of transduction was analysed by flow cytometry at 7 days post-transduction.

EXAMPLE 1: Production of stable and infectious LV-SynA particles

Materials and Methods

Cell lines

Human embryonic kidney 293T cells were cultured at 37°C, 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM + glutamax) (Life Technologies, St-Aubin, France) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Life Technologies).

Cloning of Syncytin A and production of LV-Syn A.

- a. Generation of a plasmid expressing murine-Syncytin-A.
Murine syncytin-A cDNA was cloned into a pCDNA3 plasmid using standard techniques.
- b. Production of Syn-A-pseudotyped lentiviral vectors.
HEK293T cells were co-transfected with the following 4 plasmids (quantities per flask), using calcium phosphate: pKLgagpol expressing the HIV-1 gagpol gene (14.6µg), pKRev expressing HIV-1 rev sequences (5.6µg), pCDNA3.1SynA (20µg), and gene transfer plasmid, either PRRL-SFFV LucII expressing Luciferase 2 transgene under control of the Spleen Focus Forming Virus (SFFV) promoter or pRRL-SFFV-LucII-2A-ΔNGFR-WPRE expressing Luciferase 2 transgene and a truncated form of the nerve growth receptor (NGFR) transgene in a bicistronic cassette under control of the Spleen Focus Forming Virus (SFFV) (22.5µg). After 24 hours, the cells are washed and fresh medium is added. The following day, medium is harvested, clarified by centrifugation 1500 rpm for 5 min and filtered 0.45µm, then concentrated by ultracentrifugation 50000g for 2h at 12°C and stored at -80°C until used.

VSV-g-pseudotype particles were produced also by transient transfection as reported (Merten et al, Human gene therapy, 2011, 22, 343-356).

c. Titration of Syncytin-A-pseudotyped LV

Physical titer was determined by p24 ELISA (Alliance© HIV-1 Elisa kit, Perkin-Elmer, Villebon/Yvette, France) followed by a calculation of the titer as physical particles (pp) assuming that 1 fg of p24 corresponds to 12 pp of LV (Farson et al, Hum Gene Ther, 2001, 20, 981-97), as previously reported for other types of LV (Charrier et al, Gene therapy, 2011, 18, 479-487). Infectious titer was determined as infectious genome titer (IG/mL) using the murine lymphoma cell line A20. Serial dilutions of vector are added to A20 cells in the presence of Vectofusin-1® (12µg/µL) for 6 hours. Medium is renewed and cells are incubated for 7 days and genomic DNA is obtained to measure vector copy number per cells using duplex qPCR on iCycler 7900HT (Applied Biosystems) with the primers: PSI forward 5'CAGGACTCGGGTTGCTGAAG3' (SEQ ID NO:7), PSI reverse 5'TCCCCGCTTAATACTGACG3' (SEQ ID NO:8), and a PSI probe labeled with FAM (6-carboxyfluoresceine) 5'CGCAGCGCAAGAGCGGAGG3' (SEQ ID NO:9), Titin forward 5'AAAAGCAGCAGTGACGTGAGC3' (SEQ ID NO:10), Titin reverse 5'TTCAGTCATGCTGCTAGGCC3' (SEQ ID NO:11) and a Titin probe labeled with VIC 5'TGCACGGAAAGCGTCTCGTTCAGTC3' (SEQ ID NO:12).

Results

Murine Syncytins were explored as possible new pseudotype for HIV-1-derived LV for *in vivo* applications. Syncytin A is non-orthologue but functionally similar murine counterpart to human Syncytins-1 and -2 (Dupressoir et al, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102, 725-730).

The murine SynA was cloned into an expression plasmid and used to produce lentiviral vector particles in 293T cells. It was found that SyncytinA can successfully pseudotype rHIV-derived LV. An optimization of the amount of SyncytinA plasmid for the transfection step increased the production of LV particles based on p24 levels in medium. In the conditions defined (20 µg DNA per plate, one harvest only; see Materials and Methods), it was possible to produce stable and infectious particles pseudotyped with murine syncytin. Lentiviral particles pseudotyped with this envelope could be successfully concentrated by ultracentrifugation using the same conditions as used for VSV-g-pseudotyped particles (Charrier et al, Gene therapy, 2011, 18, 479-487). The concentrated stocks were

cryopreserved at -80°C and were stable for several months. LV-Syn A was very efficient at transducing the murine A20 B lymphoma cell line in the presence of Vectofusin-1 (VFI). The A20 cell line is used to generate the infectious titer for Syncytin-A-pseudotyped LV.

EXAMPLE 2: In vivo gene delivery to the lung using LV-SynA particles

Materials and Methods

Animals

Male or female 6 week old C57/Bl6 albinos mice were injected with 100µL of LV-SynA (equivalent to 3.10⁵ ng p24) or 100µL of PBS for the control mice in the tail vein. Mice are analyzed by bioluminescence at different time points and are sacrificed by cervical elongation at day 21 post-injection. Lungs are removed after sacrifice. The right lung is used fresh to sort the cells and realize qPCR. The left lung is frozen in isopentane and conserved at -80°C to perform cryostat slices and immunohistostaining.

In vivo luciferase imaging

C57BL/6 mice were anesthetized with ketamine (120mg/kg) and xylazine (6mg/kg) and 100µL (150µg/mL) of D-luciferin (*Interchim, ref. FP-M1224D*) was administered intraperitoneally and imaged 10min later with a CCD camera ISO14N4191 (*IVIS Lumina, Xenogen, MA, USA*). A 3 min bioluminescent image was obtained using 10 cm field-of-view, binning (resolution) factor 4, 1/f stop and open filter. Region of interest (ROIs) were defined manually (using a standard area in each case), signal intensities were calculated using the living image 3.2 software (*Xenogen*) and expressed as photons per second. Background photon flux was defined from an ROI drawn over the control mice in which no vector had been administered.

Lung cell sorting

Lung are perfused with collagenase IV (1mg/mL, *Invitrogen*) and DNase I (50µg/mL, *Roche*) and then incubated at 37°C 45min. The reaction is stopped by the addition of EDTA (100mM). The cells are then isolated by dilaceration. Lung cells are stained with an anti-CD45-FITC antibody (*BD Pharmingen, ref. 553080*) and an anti-CD31-BV510 antibody (*BD Horizon, ref. 563089*). Cells are then sorted on the MoFlo® Astrios (*Beckman Coulter*).

qPCR

Genomic DNA is extracted from the cells using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (*Promega, ref. A1125*). The multiplex qPCR is performed either on the PSI proviral sequence or on the WPRE proviral sequence, with the TiimMex5 as a normalization gene. The following primers and probes are used at a concentration of 0.1µM:

PSIF	5' CAGGACTCGGCTTGCTGAAG 3' (SEQ ID NO:7)
PSIR	5' TCCCCCTTAATACTGACG 5' (SEQ ID NO: 8)
PSI probe (FAM)	5' CGCACGGCAAGAGGGGAGG 3'(SEQ ID NO:9)
WPRE F	5' GGCACGTGACAAATTCGTTGGT 3'(SEQ ID NO: 13)
WPRE R	5' AGGGACGTACGAGAAGGAGG 3'(SEQ ID NO: 14)
WPRE probe (FAM)	5' ACGTCTTTCCATGGCTGCTCCG 3'(SEQ ID NO:15)
TiimMex5 F	5' AAAACGAGCAGTACGTGAGC 3'(SEQ ID NO: 10)
TiimMex5 R	5' TTCAGTCAATGCTGCTAGCGC 3'(SEQ ID NO: 11)
TiimMex5 probe (VIC)	5' TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC 3'(SEQ ID NO:12)

The qPCR mix used is Absolute qPCR ROX mix (*Thermo Scientific, ref. CM-205/A*). The analysis is performed on the iCycler 7900HT (*Applied Biosystems*) with the SDS 2.4 software.

PCR

A PCR using the Taq Phusion (*Thermo Scientific, ref.F-549S*) is performed on gDNA from the lungs. The following primers are used at a concentration of 0.1µM:

15 Psi-F: 5' AGCCTCAATAAAAGCTTGCC 3' (SEQ ID NO: 19)

RRE-R: 5' TCTGATCCTCTGTTAAGGG 3' (SEQ ID NO: 20)

The PCR program is 98°C 30s --> (98°C 10s, 61°C 30s, 72°C 45s) x35 --> 72°C 5min. The PCR product is placed on a 2% agarose gel for electrophoresis and the expected band is at 489bp.

20

Immunohistostaining on lung sections

Cryostat sections of mice lung (12µm) are fixed in 4% paraformaldehyde solution during 10 min and then washed 3 times in PBS 1X. Sections are then stained with a polyclonal antibody

anti-luciferase (*Promega, ref. G7451*) diluted at 1/100 as a primary antibody and a donkey anti-goat AlexaFluor 594 (*Invitrogen, ref. A11058*) diluted at 1/1000 as a secondary antibody. The primary antibody is incubated overnight at 4°C in a humidity chamber and the secondary antibody is incubated for 2h in a humidity chamber.

5

Results

The objective was to determine the biodistribution of syncytin-A-pseudotyped LV following intravenous systemic delivery. The transgene luciferase was used because it is bioluminescent and enables dynamic detection over time. Two different LVs coding for Luc2 were tested in four different mouse *in vivo* protocols. One LV was encoding only Luc2 transgene (LV-SA-LucII), the other was encoding Luc2 and dNGFR in a bicistronic cassette (LV-SA-LucII2AdNGFR). The bicistronic vector is much less potent to express Luc2. The bicistronic vector is therefore useful to confirm the transduction of organs by qPCR but the expression of transgene by bioluminescence was not optimal and therefore not quantified. As control, a LV-VSYG Luc2 was used. Four different *in vivo* protocols in mice were done to inject the vectors and measure transduction over time. The dose of vector is the maximal dose that can be used in a 100µL volume of injection and corresponds to about 3x10⁵ ng p24 or 5x10⁵ IG per mouse. Transgene expression was measured in the mice at different time points (1, 2 and 3 weeks post injection) by *in vivo* bioluminescence detection and to confirm transgene expression with a different technique, luciferase immuno-histochemistry detection was performed on some mice 3 weeks after injection. Transduction was measured by qPCR 3 weeks post injection.

Figure 1 shows the bioluminescence analysis in representative mice at week 2. A clear signal is observed in spleen and in the lungs following syncytin A LV delivery. Contrary to VSYG, syncytin A does not transduce liver.

The quantification of the lung signal was done in individual mice over time (upon exposure of the back). The signal obtained with LV-SA is strong and persisted over time as shown in **Figure 2B**. These results show that a single intravenous administration of a LV-SynA vector to mice provides a significant, stable and long-lasting gene transfer in the lung, as detected with a bioluminescent transgene.

The amount of vector was measured by qPCR in the different organs recovered at the time of sacrifice of the mice at week 3. Results showed that vector copies were found preferentially in

lung and spleen when administered by syncytin A-LV and in lung and liver when administered by VSVG-LV (Figure 3). PCR around the PSI sequence of the integrated provirus confirms the detection of the transgene cassette in the lung of mice, 3 weeks after a single intravenous injection of LV-SynA vector, suggesting that stable integrative gene transfer can be achieved (Figure 4).

Overall, by measuring transduction and transgene expression in lung, spleen and liver, it is clear that Syncytin-A-LV has a unique transduction profile. Based on qPCR, Syncytin-A-LV can transduce the lung and spleen very efficiently but not the liver. The bioluminescent signal confirms the transduction of lung and spleen by Syncytin-A. While an average signal is obtained in the liver area, probably partially due to the adjacent signal in spleen, the levels are much weaker compared to that obtained with VSVG (Table D). VSVG-pseudotyped LV transduce liver very efficiently as shown by qPCR and bioluminescence.

Table I. Different tropism of syncytin-A- and VSVG-pseudotyped LV

Group	Average Vector Copy Number per Cell in organ \pm SD (n)		
	Lung	Spleen	Liver
PBS	0.00 \pm 0.00 (n=7)	0.00 \pm 0.00 (n=8)	0.00 \pm 0.00 (n=6)
LV-SA LucII	0.17 \pm 0.17 (n=8)	0.01 \pm 0.01 (n=8)	0.00 \pm 0.00 (n=5)
LV-SA			
LucII Δ NGFR	0.32 \pm 0.19 (n=5)	0.03 \pm 0.02 (n=9)	0.00 \pm 0.01 (n=9)
LV-VSVG LucII	0.19 \pm 0.06 (n=4)	0.02 \pm 0.01 (n=4)	0.08 \pm 0.05 (n=4)
Group	Average Bioluminescence of organ (photons/sec) \times E-04 \pm SD (n)		
	Lung	Spleen	Liver
PBS	2 \pm 1 (n=8)	2 \pm 0 (n=8)	7 \pm 2 (n=8)
LV-SA LucII	647 \pm 1010 (n=9)	214 \pm 229 (n=9)	233 \pm 219 (n=9)
LV-VSVG LucII	6160 \pm 7310 (n=4)	4680 \pm 2840 (n=4)	42500 \pm 28700 (n=4)

Table I (A-B) legend: Transduction levels and expression of the bioluminescent transgene luciferase were quantified in lung, spleen and liver. Average values, SD and number of mice tested (n) were obtained in 4 different protocols (ranging from 1 to 4 depending on vector tested). A. Transduction was measured by qPCR 3 weeks after injection of vector. B. Bioluminescence was measured 2 weeks after injection of vector. Quantification was done by drawing a mask to define the organ area based on the largest area detected by the highest signal. The same mask was applied to all mice from a same protocol. The signal for lung was measured on the back of the mice. The signals for spleen and liver were measured on the front

15

of the mice. The bioluminescent signal obtained with the bicistronic LV-SA LucII- Δ NGFR vector being much weaker than LV-SA LucII was not indicated.

The transduction of lung cells was examined in greater detail. Lung is a complex tissue containing alveoli composed of a single layer of squamous epithelial cells. Alveoli are separated from one another by connective tissue, interlaced with numerous capillaries and with infiltrating cells such as macrophages. The presence of the transgene Luc2 (LucII) was demonstrated to be in lung epithelial cells by 2 techniques. First, lungs were digested with a mixture of collagenase DNase and the cells were stained with CD45 antibodies to recognize and sort CD45+ cells of hematopoietic origin and CD45- cells of non-hematopoietic origin i.e. lung parenchyma or stroma. The sorted cell DNA was extracted and analyzed by qPCR. Results show the presence of vector copies only in CD45- lung cells and not in the hematopoietic fraction (Table II). The level of transduction is coherent with the broad and clear bioluminescence signal observed.

Table II: Transduction of lung stromal cells

	mouse	cells		VCN
		Total	CD45-	
PBS	1			0
LV-SA-LucII	2		CD45+	0
	3		CD45-	0.45
			total	0.01

Immunohistochemistry staining of Luc2 was performed on frozen lung sections. Results suggest that Luc2 was expressed in epithelial cells of the lung throughout the organ (Figure 5). A staining done on paraffin-embedded lung showed that the epithelial cells lining the alveoles are expressing the transgene (Figure 5B). In some experiments, a double staining of F4/80 macrophages was done and did not show any Luc2 in macrophages, thus confirming the qPCR results. In addition, a staining of CD31+ lung endothelium was done and did not correspond to the marking obtained with Luc2.

The results show that the biodistribution of syncytin-A-LV is very different from that of VSVG-LV. Contrary to VSVG, syncytin A does not transduce liver and instead, transduced at high levels the mouse spleen and lungs. Thus, syncytin A LV could be useful as drug and gene delivery tools for lung epithelium including for lung gene therapy.

15

EXAMPLE 3: Reduced immune response against transgene following systemic delivery using LV-SynA, compared to LV-VSVg

Materials and Methods

Determination of the immune response by ELISPOT

5 IFN- γ enzyme-linked immunospot assays (ELISPOT) were performed by culturing 10^6 spleen cells per well with or without $1\mu\text{M}$ of Dby or Uty peptide in IFN- γ Enzyme-Linked Immunospot plates (MAHAS45, Millipore, Molsheim, France). As a positive control, cells were stimulated with Concanavalin A (Sigma, Lyon, France) ($5\mu\text{g/ml}$). After 24 h of culture at $+37^\circ\text{C}$, plates were washed and the secretion of IFN γ was revealed with a biotinylated anti-IFN γ anti-body (eBiosciences), Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and BCIP/NBT (Mabtech, Les Ulis, France). Spots were counted using an AID reader (Cepheid Benelux, Louven, Belgium) and the AID ELISpot Reader v6.0 software. Spot forming units (SFU) are represented after subtraction of background values obtained with non-pulsed splenocytes.

15

Cytokine Titration by cytometric Bead array

Stimulation media [medium, Uty ($2\mu\text{g/ml}$), Dby ($2\mu\text{g/ml}$), or Concanavalin A ($5\mu\text{g/ml}$)] were plated and 10^6 splenocytes/well were added. After 36 h of culture at $+37^\circ\text{C}$, supernatants were frozen at -80°C until the titration. Cytometric bead arrays were performed with BD Biosciences flex kits (IL-6, IFN- γ , TNF α , and RANTES). Briefly, capture bead populations with distinct fluorescence intensities and coated with cytokine-specific capture antibodies were mixed together. Next, $25\mu\text{L}$ of the bead mix of beads was distributed and $25\mu\text{L}$ of each sample (supernatants) was added. After 1 h of incubation at room temperature, cytokine-specific PE-antibodies were mixed together and $25\mu\text{L}$ of this mix was added. After 1 h of incubation at room temperature, beads were washed with 1 mL of Wash buffer and data were acquired with an LSRII flow cytometer (BD Biosciences). FCAP software (BD Biosciences) was used for the analysis.

Results

20 The reduced immunogenicity of LV-SynA after systemic administration was tested in comparative assays with LV pseudotyped with VSVg (LV-VSVg). In these studies the transgene used was GFP-HY which encodes a fusion protein consisting of GFP tagged with the male HY gene sequences. When the transgene is presented by antigen-presenting cells, the

Dby and Uty peptides are presented to CD4 and CD8 T cells which enable the detection of transgene-specific immune responses. The results show that systemic, intravenous (IV) administration of LV-SynA vector encoding GFP-HY to mice leads to less and very low levels of anti-transgene CD4 and CD8 T cell immune responses (**Figure 6A**) and lower levels of cytokines (**Figure 6B**) compared to LV-VSVg. These results are coherent with the possibility to achieve long-term expression of a transgene in lung following gene delivery with syncytin-pseudotyped vectors. The results also suggest that repeated administrations of transgene can be achieved with these vectors. The results also suggest that syncytin-pseudotyped vectors can be used safely in inflammatory conditions, without inducing high levels of additional immune responses or inflammation.

10

EXAMPLE 4: Transduction of human and murine lung cell lines with LV-Syncytins

A first objective of this study was to evaluate if human lung cells could be transduced with a lentiviral vector pseudotyped with human or murine Syncytins (Syncytin-A, -B, -1 or -2). A second objective of this study was to determine whether or not the transduction of different human and murine cell lines and murine primary cells with a lentiviral vector pseudotyped with Syncytin A is correlated with Ly6e expression on the target cells.

15

Materials and methods

20 **Human primary small airway epithelial cells and human lung cell lines transduction with LV-Syn**

Lentiviral vectors coding for Luc2 or ΔNGFR and pseudotyped with Syn-A, -B, -1 or -2 were used for these experiments. The vectors were tested by culturing at 37°C 1×10^5 MRC5 cells (human lung fetal cells, ECACC, ref. 84101801), W126VA4 cells (SV40-transformed human lung cells, ATCC, ref. CCL-95.1) or Human Small Airway Epithelial Cells (Primary Small Airway Epithelial Cells; Normal, Human (ATCC® PCS301010™) with one concentration or two concentrations of LV-SynA lentiviral particles (1×10^6 or 1×10^7 and 5×10^7 infectious genome (IG)/mL (infectious genome units defined on A20 cells)) in the presence of $12\mu\text{g/mL}$ of Vectofusin-1® (Milenyi Biotech, ref. 130-111-163). As a positive control, cells were also cultured in parallel with 1×10^6 IG (infectious genome units defined on HCT116 cells/mL) of LV-VSVg in the presence of Vectofusin-1. After 6h of transduction at 37°C , the infection was stopped by changing the culture medium and adding fresh medium (DMEM + 10% fetal calf serum + 1% penicillin-streptomycin + 1% glutamine) to the cells.

30

Three or seven days post-transduction, genomic DNA of the cells was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (*Promega, ref. A1125*). Multiplex qPCR was performed to determine the vector copy number per cell using amplification of the PSI proviral sequence and albumin as a normalization gene. The following primers and probes were used at a concentration of 0.1µM :

PSI F	5' CAGGACTCGGCTTGCTGAAG 3' (SEQ ID NO : 7)
PSI R	5' TCCCCCGCTTAATACTGACG 3' (SEQ ID NO : 8)
PSI probe (FAM)	5' CGCACGGCAAGAGGCGAGG 3' (SEQ ID NO : 9)
Albumin F	5' GCTGTCATCTCTGTGGGCTGT 3' (SEQ ID NO : 16)
Albumin R	5' ACTCATGGAGCTGCTGGTTC 3' (SEQ ID NO : 17)
Albumin probe (VIC)	5' CCTGTCATGCCACACAAAATCTCTCC 3' (SEQ ID NO : 18)

The qPCR mix used was Absolute qPCR ROX mix (*Thermo Scientific, ref. CM-205(A)*). The analysis was performed on the iCycler 7900HT (*Applied Biosystems*) with the SDS 2.4 software or on the LightCycler480 (Roche) with the LightCycler® 480 SW 1.5.1 software.

Ly6e mRNA expression on different human and murine cell lines and murine primary cells.

mRNA from different human cell lines (HEK293T, HCT116, HT1080, W126VA4, Jurkat and RAJI), murine cell lines (A20IIA, C2C12, NIH/3T3) and from total cells from the lung, spleen and bone marrow of C57BL/6 mice were extracted using the RNeasy® mini kit from Qiagen. The reverse transcription of the mRNA was performed using Verso cDNA synthesis kit from Thermofischer. A qPCR was performed on the cDNA using the following primers : mLye forward primer 5' CGGGCTTTGGGAATGTCAAC 3' (SEQ ID NO: 21), mLye reverse primer 5' GTGGGATACCTGGCAGCAAGT 3' (SEQ ID NO: 22), hLy6e forward primer 5' AGACCTGTTCCC CGGCC 3' (SEQ ID NO: 23), hLy6e reverse primer 5' CAGCTGATGCCCATGGAAG 3' (SEQ ID NO: 24), PO reverse primer 5' CTCCAAGCAGATGCAGCAGA 3' (SEQ ID NO: 25) and PO forward primer 5' ACCATGATGCCCAAGGCCAT 3' (SEQ ID NO: 26). PO was used as a warehouse gene. The abundance is calculated with the formula $abundance=2^{-\Delta Ct}$.

25

Results

Human primary small airway epithelial cells and human lung cell lines transduction with LV-Syn(-A, -B, -1, -2)

The level of transduction of MRC5 and W126VA4 cells following infection with a lentiviral vector pseudotyped with the murine syncytin A (LV-SynA) was measured in two independent transduction experiments. The level of transduction of MRC5 cells following infection with a lentiviral vector pseudotyped with the murine syncytin A (LV-SynA), the murine syncytin B (LV-SynB), the human syncytin 1 (LV-Syn1) or the human syncytin 2 (LV-Syn2) was also measured in two or three independent transduction experiments. A control lentiviral vector pseudotyped with VSVg (LV-VSVg) and used at a high concentration confirmed that the cells could be transduced in the experimental conditions used.

In addition, the level of transduction of Human Small Airway Epithelial cells following infection with a lentiviral vector pseudotyped with the murine syncytin A (LV-SynA), the human syncytin 1 (LV-Syn1) or the human syncytin 2 (LV-Syn2) was measured in five (SynA) or three (Syn1, Syn2) independent transduction experiments.

In all experiments, the integration of the provirus in the cells was confirmed with a qPCR using specific primers. The results are presented in Figures 7 to 9.

Figure 7 represents the average levels of transduction of the MRC5 and W126VA4 cells with a lentiviral vector pseudotyped with the murine syncytin A (LV-SynA) in 2 experiments. Two concentrations of vector were used (1 E+05 and 5E+05 ig/mL) showing a dose-dependent effect. Clearly, the transduction of MRC5 cells with the LV-SynA vector was more efficient than the transduction of W126VA4 cells, but both cell types were permissive. Vectors pseudotyped with VSVg were used at a higher concentration, as positive controls. In conclusion, the syncytin A pseudotype can be used to transduce human lung cells.

Figure 8 shows that in addition to murine SynA, the human Syn2 can also transduce human lung cells, thereby supporting the use of Syncytin2-pseudotyped lentiviral vectors for therapeutic applications in lung. The Syncytin-2 pseudotype is very effective as it reaches levels at least as high as those of the positive VSVg control which was used at 10X higher concentration.

Figure 9 shows that the murine syncytin A and the human syncytin 2 can be used to pseudotype lentiviral vectors to efficiently transduce human primary pulmonary epithelial cells. These results further demonstrate that syncytin-pseudotyped particles can be used to treat pulmonary diseases and in particular, diseases involving the lung epithelium and that human syncytin-pseudotyped vectors would be expected to deliver transgenes in lung following systemic administration.

Comparison between the level of expression of Ly6e mRNA and the level of transduction in different cell lines.

The level of expression of mLy6e and hLy6e mRNA and the level of transduction with LV-Syncytin A vectors encoding Δ NGFR were compared in different cell lines.

The results show that the expression of mLy6e, reported as the receptor for murine Syncytin A, on cell lines does not allow to predict the ability to transduce cells by LV pseudotyped with SynA (**Figure 10**). C2C12 cells express relatively abundant levels of Ly6e but are not transduced. A201HA cells which express the highest levels of Ly6emRNA are transduced, which may indicate that a threshold exists.

The receptor for mouse SynA is mouse Ly6e. It is not known if the human Ly6e is a receptor for any of the syncytins. The results show that there is no correlation between human Ly6e receptor expression mRNA levels and transduction with LV-SynA (**Figure 11**). HCT116 which are colon carcinoma cells express hLy6e mRNA but are not transduced. Raji cells do not express the human Ly6e- mRNA but can be transduced.

CLAIMS

1. A pharmaceutical composition for targeting lung tissue, comprising at least a therapeutic drug associated to a syncytin protein, for use in the prevention and/or treatment of lung diseases.

2. The pharmaceutical composition for the use according to claim 1, wherein the syncytin protein is human or murine syncytin, preferably the syncytin is selected from the group consisting of human Syncytin-1, human Syncytin-2, murine syncytin-A and murine syncytin-B.

3. The pharmaceutical composition for the use according to claim 1 or 2, wherein the therapeutic drug and the syncytin protein are incorporated into particles, preferably selected from the group consisting of liposomes, exosomes, viral particles and virus-like particles.

4. The pharmaceutical composition for the use according to claim 3, wherein the syncytin protein is displayed on the surface of the particles.

5. The pharmaceutical composition for the use according to claim 4, wherein the particles are lentiviral or lentiviral-like particles pseudotyped with syncytin protein.

6. The pharmaceutical composition for the use according to any one of claims 1 to 5, wherein the drug is selected from the group consisting of genes of interest for therapy, including therapeutic genes and genes encoding therapeutic proteins or peptides such as therapeutic antibodies or antibody fragments and genome editing enzymes, and therapeutic RNAs such as interfering RNAs, guide RNAs for genome editing and antisense RNAs capable of exon skipping; anti-infectious drugs such as anti-bacterial, viral, fungal or parasitic drugs; anti-inflammatory drugs; and immunotherapeutic drugs such as immunomodulatory, immunosuppressive, anti-allergic, anti-histaminic and immunostimulating drugs.

7. The pharmaceutical composition for the use according to any one of claims 3 to 6, wherein the drug is a gene of interest packaged into viral vector particles.

8. The pharmaceutical composition for the use according to claim 7, wherein the gene of interest is packaged into lentiviral vector particles pseudotyped with syncytin protein.

9. The pharmaceutical composition for the use according to any one of claims 1 to 8, wherein the lung diseases are selected from the group consisting of: genetic diseases affecting the lungs; infectious diseases affecting the lungs; inflammatory or auto-immune diseases of the lungs, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary fibrosis, oedema, emphysema or hypertension, acute respiratory distress syndrome, pneumoconiosis, interstitial lung diseases or diffuse parenchymal lung diseases, prevention of lung transplant rejection and prevention of lung problems or diseases in newborns and premature babies.

10. The pharmaceutical composition for the use according to any one of claims 1 to 9, which is for use in gene therapy of the lung diseases.

11. The pharmaceutical composition for the use according to any one of claims 6 to 10, wherein the gene of interest is selected from the group consisting of: *SERPINA3*, *SERPINA1*, *MMP*, in particular *MMP1*, *MMP2* and *MMP9*, *CFTR*, *SFTPB*, *SFTPC*, *ABCA3*, *CSF2RA*, *TERT*, *TERC*, *SFTPA2*, *SLC34A2*, *DKC1*, *TERC*, *TINF2*, *NF1*, *TSCI*, *FLCN*, *STAT3*, *HPS1*, *GBA*, *SMPDI*, *SLC7A7*, *SMAD9*, *KCNK3* and *CAVI* genes, and functional variants thereof.

12. The pharmaceutical composition for the use according to any one of claims 1 to 11, which is for administration by injection, inhalation or broncho-alveolar lavage.

13. A pharmaceutical composition for targeting lung tissue, comprising virus particles pseudotyped with syncytin protein, packaging a gene of interest selected from the group comprising: the genes *SERPINA3*, *SERPINA1*, *MMP*, in particular *MMP1*, *MMP2* and *MMP9*, *CFTR*, *SFTPB*, *SFTPC*, *ABCA3*, *CSF2RA*, *TERT*, *TERC*, *SFTPA2*, *SLC34A2*, *DKC1*, *TERC*, *TINF2*, *NF1*, *TSCI*, *FLCN*, *STAT3*, *HPS1*, *GBA*, *SMPDI*, *SLC7A7*, *SMAD9*, *KCNK3*, *CAVI* and functional variants thereof, and the genes encoding therapeutic RNAs such as interfering RNAs, guide RNAs for genome editing and antisense RNAs capable of exon skipping, wherein the therapeutic RNAs target the preceding list of genes

14. The pharmaceutical composition according to claim 13, wherein the virus particles are lentiviral vector particles.

15. A pharmaceutical composition for targeting lung tissue, comprising virus-like particles, preferably lentivirus-like particles, pseudotyped with syncytin protein, packaging a therapeutic RNA such as interfering RNA, guide RNA for genome editing and antisense RNA

capable of exon skipping, said therapeutic RNA targeting a gene of interest selected from the group of genes comprising: *SERPINA3*, *SERPINA1*, *MMP*, in particular *MMP1*, *MMP2* and *MMP9*, *CFTR*, *SFTPB*, *SFTPC*, *ABCA3*, *CSF2RA*, *TERT*, *TERC*, *SFTPA2*, *SLC34A2*, *DKC1*, *TERC*, *TINF2*, *NF1*, *TSCI*, *FLCN*, *STAT3*, *HPS1*, *GBA*, *SMPDI*, *SLC7A7*, *SMAD9*, *KCNK3* and *CAVI*.

10

15

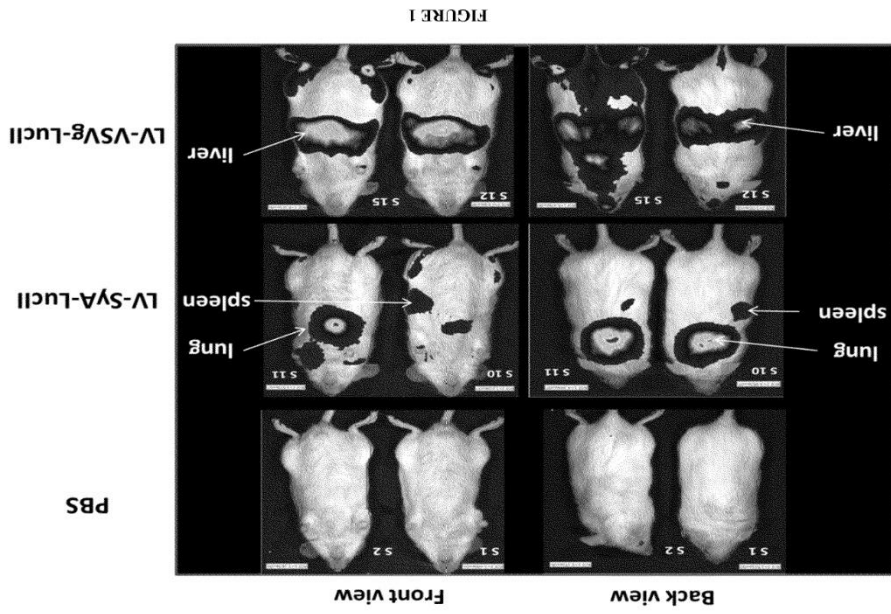
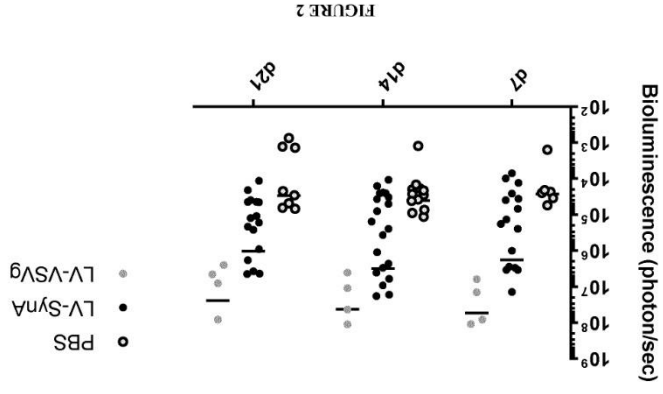


FIGURE 4

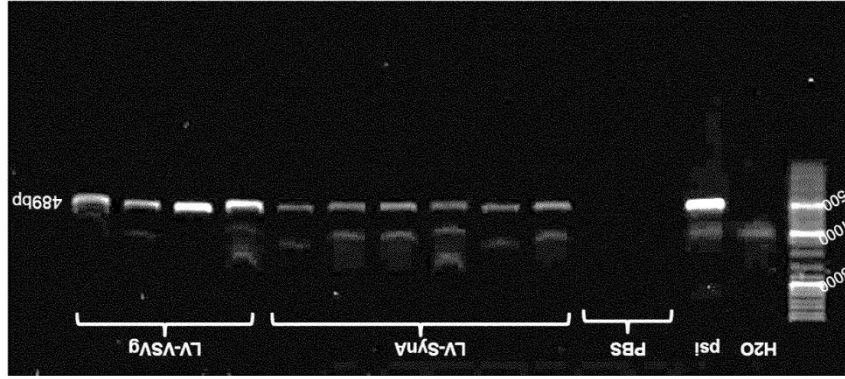
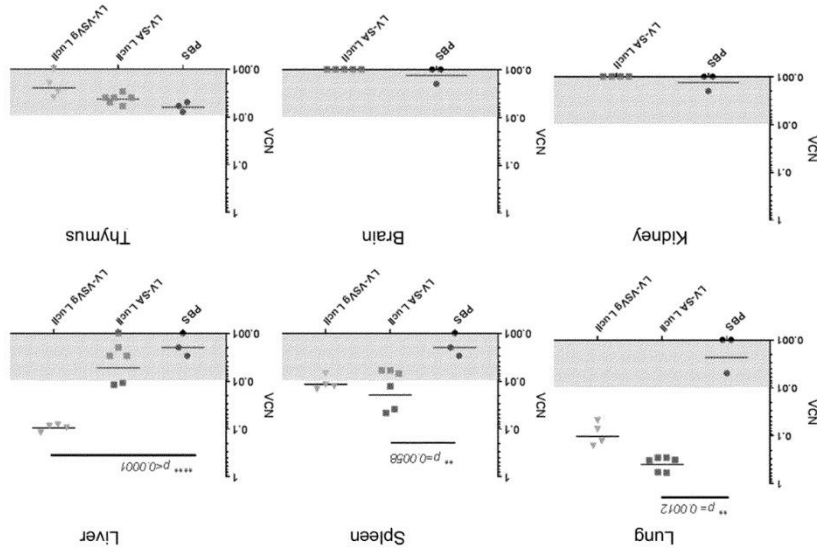


FIGURE 3



A

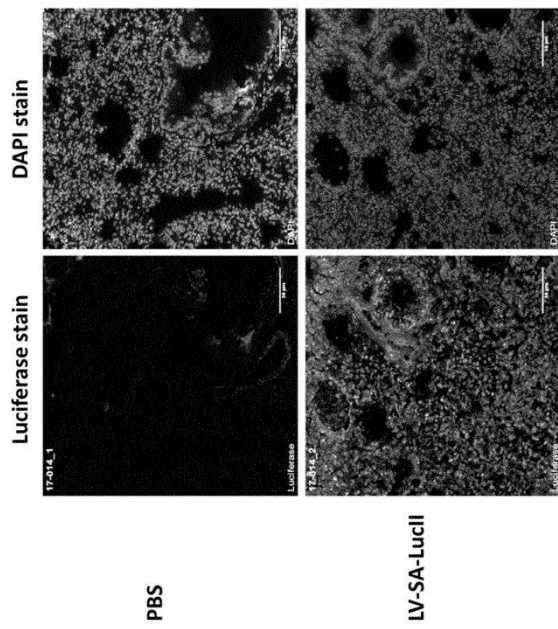


FIGURE 5A

FIGURE 5B & 5C

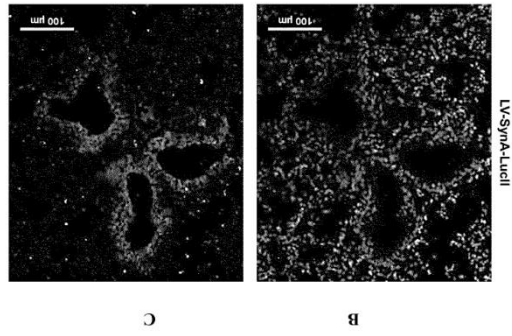


FIGURE 6B

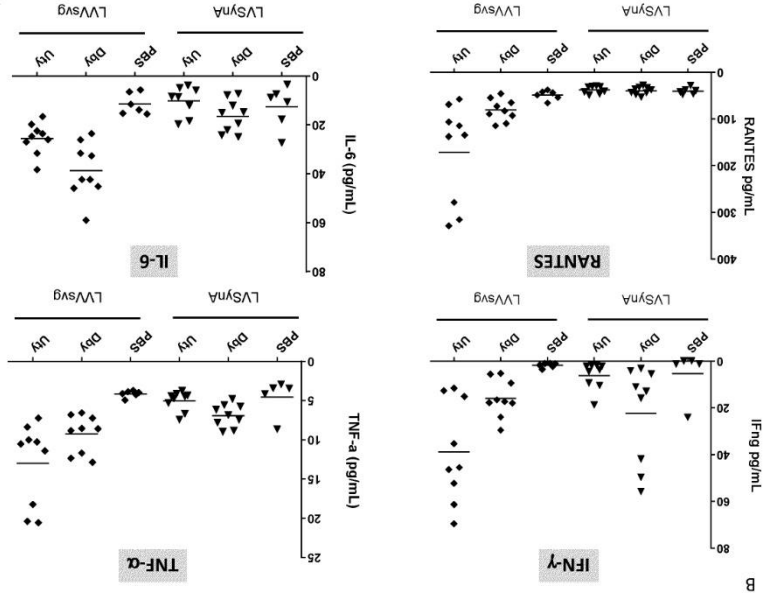
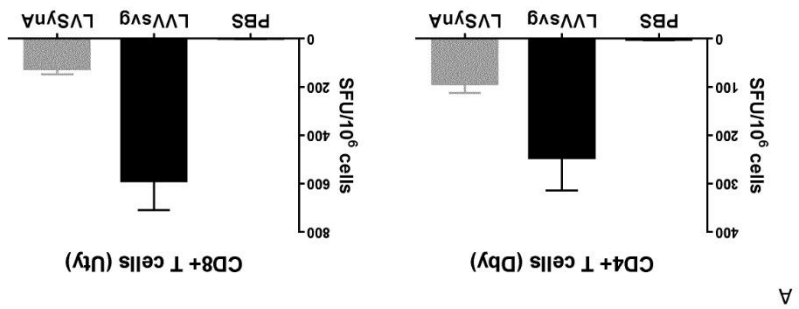


FIGURE 6A



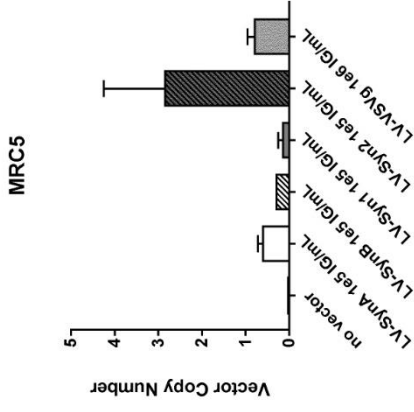


FIGURE 8

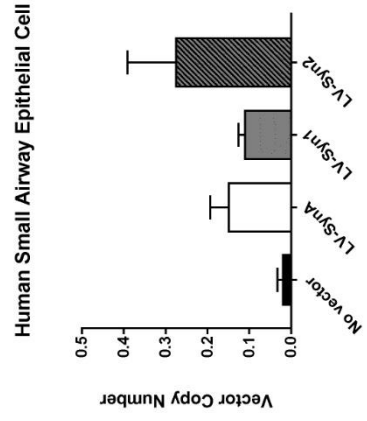


FIGURE 9

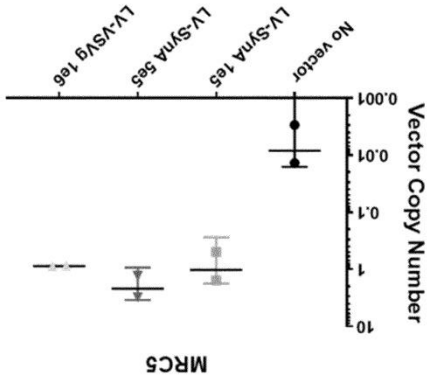


FIGURE 7

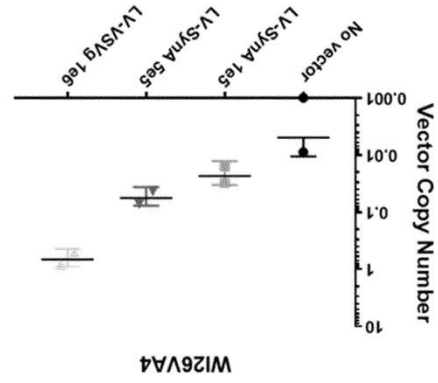


FIGURE 11

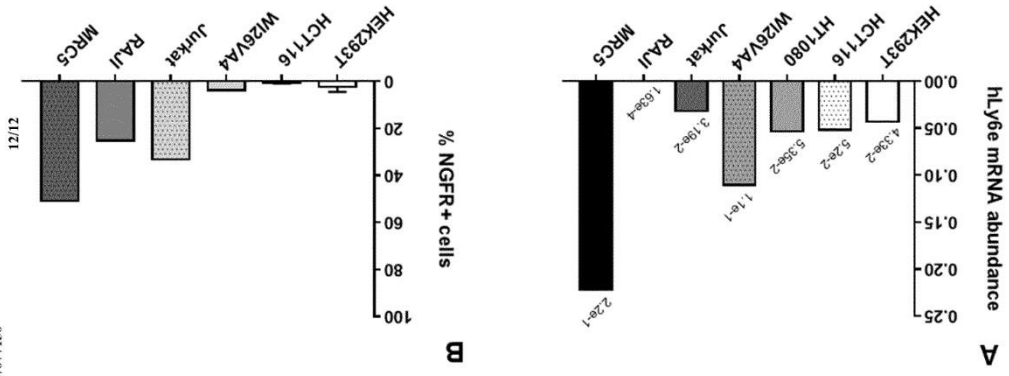
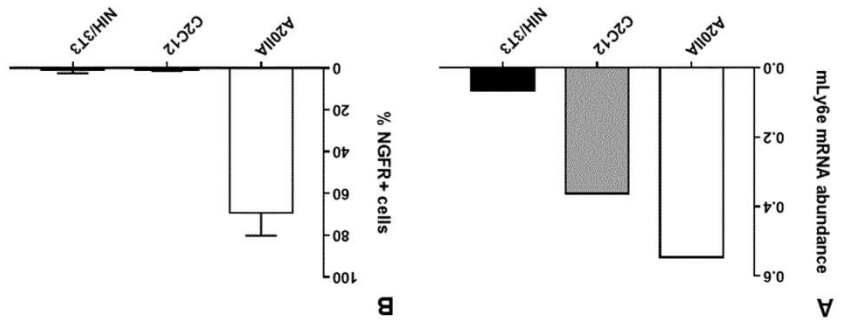


FIGURE 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/078809

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int. Cl. A61K38/17 A61K38/16 C12H15/867 A61P11/00
 Add. A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC
 Fields searched
 C07K A61K C12H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, MPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
X	D. S. AN ET AL: "Envelope Gene of the Human Endogenous Retrovirus HERV-W Encodes a Functional Retrovirus Envelope", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 75, no. 7, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 3488-3489, XP055434463, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.75.7.3488-3489.2001 the whole document	13,14
Y	----- ASUNDI J ET AL: "An Antibody-Drug Conjugate Directed against Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus E (LY6E) Provides Robust Tumor Killing in a Wide Range of Solid Tumor Malignancies", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 21, no. 14, 15 July 2015 (2015-07-15), pages 3252-3262, XP002747794, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0156 [retrieved on 2015-04-10] the whole document	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family areas.

* Special categories of cited documents:
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search: 29 November 2018
 Date of mailing of the international search report: 12/12/2018

Name and mailing address of the ISA/
 European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 LV Rijswijk
 The Netherlands
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer: **Madruqa, Jaime**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/078809

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC
 Fields searched
 C07K A61K C12H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, MPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
X	M. DEHANNIEUX ET AL: "Identification of a Functional Envelope Protein from the HERV-K Family of Human Endogenous Retroviruses", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 79, no. 24, 15 December 2005 (2005-12-15), pages 15573-15577, XP055434379, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.79.24.15573-15577.2005 abstract, results; page 15576; table 1 the whole document	13,14
Y	----- ASUNDI J ET AL: "An Antibody-Drug Conjugate Directed against Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus E (LY6E) Provides Robust Tumor Killing in a Wide Range of Solid Tumor Malignancies", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 21, no. 14, 15 July 2015 (2015-07-15), pages 3252-3262, XP002747794, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0156 [retrieved on 2015-04-10] the whole document	1-15
Y	----- ASUNDI J ET AL: "An Antibody-Drug Conjugate Directed against Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus E (LY6E) Provides Robust Tumor Killing in a Wide Range of Solid Tumor Malignancies", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 21, no. 14, 15 July 2015 (2015-07-15), pages 3252-3262, XP002747794, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0156 [retrieved on 2015-04-10] the whole document	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family areas.

* Special categories of cited documents:
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search: 28 November 2013 (2013-11-28)
 Date of mailing of the international search report: 28 November 2013 (2013-11-28)

Name and mailing address of the ISA/
 European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 LV Rijswijk
 The Netherlands
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer: **Madruqa, Jaime**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/078809

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2018/078809
C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AGATHE BACQUIN ET AL: "A Cell Fusion-Based Screening Method Identifies Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein Ly6e as the Receptor for Mouse Endogenous Retroviral Envelope Syncytin-A", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 91, no. 18, 5 July 2017 (2017-07-05), pages e00832-17, XP055434526, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00832-17 the whole document	1-15
Y	"Ly6E", Wikipedia 2 September 2017 (2017-09-02), 2 September 2017 (2017-09-02), XP002776684, Retrieved from the Internet: URL:https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Ly6E&oldid=798576764 [retrieved on 2017-12-12] the whole document Link to reference expression data (enlargement annexed)	1-15
Y	CLAIRE COLAS ET AL: "Ligand Discovery for the Alanine-Serine-Cysteine Transporter (ASCT2, SLC1A5) from Homology Modeling and Virtual Screening", PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY, vol. 11, no. 10, 7 October 2015 (2015-10-07), page e1004477, XP055434745, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004477 the whole document	1-15
Y	CORINNA PFEIFER ET AL: "Efficient, specific and targeted delivery of genes to the lung", THERAPEUTIC DELIVERY, vol. 1, no. 1, 25 June 2010 (2010-06-25), - 1 July 2010 (2010-07-01), pages 133-148, XP055434939, GB ISSN: 2041-5990, DOI: 10.4155/tde.10.11 the whole document	1-15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/078809

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2018/078809
C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. M. WILSON: "Adeno-associated Virus and Lentivirus Pseudotypes for Lung-directed Gene Therapy", AMERICAN THORACIC SOCIETY. PROCEEDINGS, vol. 1, no. 4, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 309-314, XP055434964, US ISSN: 1546-3222, DOI: 10.1513/pats.200409-041MS the whole document	1-15
X, P	EP 3 235 828 A1 (GENETHON [FR]; INSERM [FR]; UNIV D'EVRY VAL D'ESSONNE [FR]) 25 October 2017 (2017-10-25) the whole document paragraphs [[0055]], [[0060]]; claims	1-15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/078809

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013177055 A2	28-11-2013	AR 091098 A1 AU 2013266604 A1 AU 2016259286 A1 BR 112014028366 A2 CA 2872327 A1 CL 2014003140 A1 CN 104540519 A CO 7151531 A2 CR 20140529 A EA 201491947 A1 EP 2852404 A2 HK 1208167 A1 HK 1209373 A1 JP 6192022 B2 JP 2015528692 A JP 2017169572 A KR 20150013318 A MX 37538 A2 MX 352581 B NZ 702195 A PE 00252015 A1 PH 12014502601 A1 SG 11201407561U A TW 201406780 A UA 114814 C2 US 2016199508 A1 US 2018015177 A1 WO 2013177055 A2 ZA 201408236 B	14-01-2015 15-01-2015 01-12-2016 27-06-2017 28-11-2013 27-02-2015 22-04-2015 29-12-2014 12-02-2015 29-05-2015 01-04-2015 26-02-2016 01-04-2016 06-09-2017 01-10-2015 28-09-2017 04-02-2015 30-11-2016 29-11-2017 30-09-2016 09-02-2015 02-02-2015 30-12-2014 16-02-2014 10-08-2017 14-07-2016 18-01-2018 28-11-2013 27-01-2016
EP 3235828 A1	25-10-2017	EP 3235828 A1 WO 2017182607 A1	25-10-2017 26-10-2017

Titre : Caractérisation de vecteurs lentiviraux pseudotypés par les syncytines murines et de leurs cibles cellulaires in vitro et in vivo

Mots clés : syncytine, vecteur lentiviral, pseudotypage, rétrovirus endogènes, lymphocytes B, thérapie génique

Résumé : Les vecteurs lentiviraux (LV) de thérapie génique sont des particules recombinantes qu'il est possible de pseudotyper avec diverses glycoprotéines d'enveloppe afin de modifier l'adressage cellulaire ou leurs propriétés immunogéniques. Mon travail de thèse a exploré l'hypothèse que la VSVG, la glycoprotéine d'enveloppe la plus utilisée pour pseudotyper les LV, puisse être remplacée par des protéines cellulaires afin d'obtenir des particules bien tolérées et administrables in vivo. J'ai utilisé les syncytines murines, qui sont des glycoprotéines d'origine rétrovirale endogène et qui ont des propriétés fusogéniques et un potentiel immunosuppresseur. Mes résultats ont montré la possibilité de produire des LV pseudotypés par les syncytines murines A et B. Les particules ainsi produites (LV-SynA et LV-SynB) sont infectieuses en présence d'un adjuvant de transduction et présentent une forte capacité à transduire les lymphocytes B murins in vitro. Les vecteurs LV-Syn sont capables de transduire des lymphocytes B quiescents, ainsi que des cellules précurseurs des lymphocytes B issus de moelle osseuse de souris. L'administration de LV-SynA in vivo chez la souris par voie intraveineuse permet d'observer un transfert de gène stable. Un signal est observé dans la rate et plus particulièrement dans les lymphocytes B au niveau des centres germinatifs, en accord avec les résultats obtenus in vitro. Mes travaux confirment donc, et étendent, les observations préalables du laboratoire sur la transduction de lymphocytes B naïfs humains avec les syncytines humaines, et suggèrent un fort tropisme des syncytines en général pour les lymphocytes B. Par ailleurs, mes résultats montrent qu'in vivo, le poumon est également ciblé par les LV-SynA, en accord avec l'expression récemment identifiée du récepteur à la syncytine A, Ly6e, dans cet organe. Il semble que le transfert de gène puisse être obtenu dans l'épithélium alvéolaire et il est possible de transduire des cellules primaires épithéliales pulmonaires humaines avec les LV-Syn in vitro. Globalement, mes résultats montrent une nouvelle perspective d'interaction entre les syncytines et le système immunitaire à travers la transduction des lymphocytes B. Mes résultats permettent également d'envisager de nouvelles perspectives pour le transfert de gène dans le poumon in vivo et pour développer de nouvelles approches de thérapie génique par voie systémique.

Title : Characterization of lentiviral vectors pseudotyped with murine syncytins and their cellular targets in vitro and in vivo

Keywords : syncytins, lentiviral vector, pseudotyping, endogenous retrovirus, B cells, gene therapy

Abstract : Lentiviral gene transfer vectors (LV) used in gene therapy are recombinant virus-like particles that can be pseudotyped with diverse envelope glycoproteins in order to modify their cellular targeting or their immunogenic properties. My thesis work explored the hypothesis that VSVG, the most commonly-used viral envelope glycoproteins of LV, could be replaced by cellular glycoproteins to obtain well-tolerated particles that can be administered in vivo. I used murine syncytins which are glycoproteins of endogenous retroviral origin and which have fusogenic properties and immunosuppressive potential. My results showed the possibility of producing LV pseudotyped with murine syncytins A or B. The LV-SynA or LV-SynB particles produced were infectious in the presence of a transduction adjuvant and efficiently transduced murine B cells in vitro, including quiescent B cells and bone marrow B precursor cells. In vivo LV-SynA intravenous administration in mice enabled stable gene transfer. A positive signal was observed in the spleen, and especially in B cells at the level of the germinal centers, confirming in vitro observations. These results confirm and extend previous observations from the laboratory showing that human naive B cells can be transduced by LV pseudotyped with human syncytins, and emphasize the marked interactions between syncytins and B cells. Moreover, my results showed that in vivo in mice LV-SynA targets the lungs, possibly epithelial alveolar cells, in line with the recent findings of Syncytin A receptor expression in the lung. Gene transfer was also obtained in human primary pulmonary epithelial cells in vitro with LV-Syn. Overall, my results reveal new interactions between syncytins and the immune system through the transduction of B cells. My results also provide novel perspectives for gene delivery in vivo in the lung and for designing new systemic gene therapy approaches.

