

## Avis de Soutenance

Madame Clémence ALIBERT

### Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

*Utilisation de cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées en tant que système de délivrance de thérapie dans le cadre des dystrophies musculaires.*

Travaux dirigés par Monsieur Christophe MARCELLE

Soutenance prévue le **mardi 26 mai 2026** à 14h00

Lieu : Salle Hermann Lyon 1 Université Faculté de Médecine et de Pharmacie, 3ème étage 8 avenue Rockefeller, 69008 Lyon

#### Composition du jury proposé

M. Christophe MARCELLE	Professeur des universités	Lyon 1 Université	Directeur de thèse
Mme Capucine TROLLET	Directrice de recherche	INSERM Paris	Rapporteuse
M. Karl ROUGER	Directeur de recherche	INRAE Nantes	Rapporteur
Mme Kathrin GIESELER	Professeure des universités	Lyon 1 Université	Examinatrice
M. Laszlo NAGY	Professeur	Université de médecine John HOPKINS - Floride (USA)	Examineur
M. Pascal MAIRE	INSERM Paris	Invité	
Mme Jacqueline MARVEL	CNRS Lyon	Invitée	

**Mots-clés :** régénération, muscle, cellule souche hématopoïétique, dystrophie de Duchenne, thérapie cellulaire et génique

#### Résumé :

Les dystrophies musculaires sont des maladies dégénératives héréditaires caractérisées par une faiblesse musculaire progressive et une atrophie des muscles. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), la forme la plus fréquente et la plus sévère, résulte de l'absence de dystrophine fonctionnelle, entraînant une fragilité des fibres musculaires, une inflammation chronique et une dégénérescence progressive des muscles. Les thérapies géniques et cellulaires actuelles soulèvent des enjeux importants, notamment une efficacité limitée lors de l'administration systémique et des effets secondaires potentiellement délétères. Ce projet vise à développer une nouvelle stratégie thérapeutique systémique pour la DMD en utilisant les cellules sanguines comme vecteurs de délivrance. Les cellules sanguines présentent l'avantage d'une distribution systémique naturelle et sont activement recrutées au site de lésion musculaire lors de la régénération. Les muscles

dystrophiques, ainsi que les muscles lésés, sont successivement infiltrés par des vagues de cellules immunitaires, un processus physiologique pour la régénération que nous avons cherché à exploiter. Cette approche combine thérapie génique et thérapie cellulaire en modifiant génétiquement des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (CSPH) afin de produire des cellules sanguines matures capables d'agir in situ comme vecteurs systémiques de thérapie génique. Nous avons développé une approche lentivirale permettant l'induction contrôlée de la fusion hétérologue entre cellules dérivées du sang et fibres musculaires grâce à un système inductible Tet-On. Ces vecteurs délivrent 1) les gènes permettant la fusion musculaire (Myomaker et Myomixer) et/ou 2) la séquences de saut d'exon destinée à restaurer l'expression de la dystrophine. La construction fusogène a été validée in vitro sur des lignées cellulaires et des CSPH primaires murines, démontrant une fusion inductible efficace avec des myoblastes primaires. Afin d'évaluer la délivrance systémique in vivo grâce à la fusion, des CSPH modifiées ont été transplantées chez des souris sauvages conditionnées par chimiothérapie. La distribution des cellules du sang au sein des tissus musculaires dans des conditions saines et régénératives sont suivies grâce à des rapporteurs fluorescents. La preuve de concept in vivo a été obtenue par l'activation du système Tet-On lors de la régénération musculaire induite par lésion, confirmant la fusion induite des cellules dérivées du sang avec les fibres musculaires en régénération chez des souris sauvages. Toutefois, ces événements de fusion surviennent à une fréquence insuffisante pour permettre un éventuel bénéfice thérapeutique. La taille importante du transgène (8 kb) réduit l'efficacité de transduction des CSPH, conduisant à moins de 20 % de cellules sanguines circulantes exprimant la construction. Nous avons également caractérisé l'impact du conditionnement chimiothérapeutique des souris sur la capacité régénérative musculaire, un aspect jusqu'alors non décrit. Comparé à l'irradiation, le conditionnement à base de busulfan préserve la viabilité et la fonction des cellules souches musculaires. Néanmoins, un retard de régénération a été observé après lésion aiguë chez les souris conditionnées au busulfan puis greffées. Dans l'ensemble, ce travail établit une preuve de concept pour une plateforme de délivrance génique systémique basée sur des cellules, tout en mettant en évidence des limitations techniques qui devront être surmontées pour atteindre une efficacité thérapeutique dans la DMD. Une optimisation supplémentaire pourrait permettre l'évaluation de cette stratégie dans un contexte d'inflammation chronique, notamment chez la souris mdx-4cv, modèle murin de DMD. Ce travail constitue une première étape vers le développement d'une plateforme de délivrance génique systémique ciblant le muscle pour le traitement des dystrophies musculaires.

### Summary:

Muscular dystrophies are inherited degenerative diseases characterized by progressive muscle weakness and wasting. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), the most common and severe form, results from the absence of functional dystrophin, leading to muscle fragility, chronic inflammation, and progressive degeneration. Current gene and cell therapies face major limitations, including limited efficiency systemic administration and deleterious side effects. This project aims to develop a novel systemic therapeutic strategy for DMD using blood cells as delivery vehicles. Blood cell presents the advantage of natural systemic distribution and are actively recruited on site of muscle injury during regeneration. Both diseased and acutely injured muscles undergo successive waves of immune cell infiltration, a physiological process that we aim to exploit for systemic therapeutic delivery. We therefore designed an approach combining gene and cell therapy by engineering hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) to produce mature blood cells acting as systemic gene delivery vehicles in situ. We developed lentiviral constructs enabling controlled induction of heterologous fusion of blood-derived cells with muscle fibers using a Tet-On inducible system. These constructs will both deliver muscle-specific fusion-promoting gene (Myomaker and Myomixer) and the exon skipping sequence intended to restore dystrophin expression. The fusion-promoting constructs were validated in vitro in cell lines and primary HSPCs, demonstrating efficient inducible

fusion with primary myoblasts. To assess systemic delivery *in vivo*, engineered HSPCs were first transplanted into myeloablated wild-type mice. Fluorescent reporters expressed by bone marrow-derived cells enabled tracking of their distribution within muscle tissues in healthy and regenerative conditions. *In vivo* proof-of-concept was established by activating the Tet-On system during injury-induced muscle regeneration, confirming induced fusion of blood-derived cells with regenerating muscle fibers in wild-type mice. However, these fusion events occur at a frequency insufficient to achieve therapeutic benefit. The large size of the transgene (8kb) reduced HSPCs transduction efficiency and resulted in fewer than 20% of circulating blood cells expressing the construct. In addition, we characterized the impact of chemotherapeutic conditioning of the mice on the muscle regenerative capacity, that has not been previously described. Compared with irradiation, busulfan-based conditioning better preserved muscle stem cells viability and function. Nevertheless, delayed regeneration was observed in acute injury following busulfan conditioning and bone marrow transplantation. Overall, this work establishes proof-of-concept for a cell-based systemic gene delivery platform but highlights technical limitations that must be overcome to achieve therapeutic efficacy in DMD. Further optimization could allow a study in chronic inflammation context using these engineered cells as vehicles in mdx-4cv mice, a murine model of DMD. This work provides a first step toward the development of a systemic, muscle-targeted gene delivery platform for the treatment of muscular dystrophies.