

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Thérapie génique

Par

Maia MARCHAND

**Ingénierie chimique de la capsid du vecteur viral adéno-associé
par bioconjugaison et chimie click bioorthogonale**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 6 Décembre 2024

Unité de recherche : Laboratoire TaRGeT – INSERM UMR 1089

Laboratoire CEISAM – CNRS UMR 6230

Rapporteurs avant soutenance :

Fabienne BURLINA Directrice de recherche, Laboratoire des biomolécules – CNRS UMR 7203
Françoise PIGUET Directrice de recherche, Institut du cerveau – INSERM UMR 1127

Composition du Jury :

Président : *(à préciser après la soutenance)*
Examineurs : Hervé HILLAIREAU Professeur des universités, Université Paris-Saclay, IGPS – CNRS UMR 8612
Tiziana LA BELLA Chargée de recherche, Généthon – INSERM UMR 951
Dir. de thèse : Mathieu MEVEL Ingénieur de recherche, TaRGeT – INSERM UMR 1089
Co-dir. de thèse : David DENIAUD Professeur des universités, Nantes Université, CEISAM – CNRS UMR 6230

Titre : Ingénierie chimique de la capsid du vecteur viral adéno-associé par bioconjugaison et chimie click bioorthogonale

Mots clés : AAV, vecteurs viraux, bioconjugaison, chimie bioorthogonale, thérapie génique, SPAAC.

Résumé : Le virus adéno-associé (AAV) est un vecteur de choix pour la thérapie génique *in vivo* grâce à sa capacité à transduire une grande majorité de tissus avec une faible immunogénicité. Bien que huit traitements utilisant l'AAV aient obtenu une autorisation de mise sur le marché en Europe et/ou aux États-Unis, certaines limitations, comme son large tropisme, restreignent son utilisation clinique. Afin d'augmenter sa spécificité tissulaire, nous avons développé une stratégie combinant bioconjugaison et chimie click bioorthogonale. Cette approche permet une fonctionnalisation rapide et efficace de l'AAV avec diverses molécules, y compris des protéines. Tout d'abord, des fonctions azoture ou cyclooctyne ont été greffées sur la capsid de l'AAV de sérotype 2 ou 8 en utilisant les résidus lysines, tyrosines ou cystéines. Ces vecteurs ont

ensuite été post-fonctionnalisés avec de petites molécules par chimie click bioorthogonale grâce à la réaction de SPAAC. Enfin, ces travaux démontrent que des *nanobodies* ciblant les marqueurs CD62L et CD45 peuvent être conjugués à l'AAV sans altérer la structure conformationnelle de la capsid. Ces vecteurs sont capables de transduire plus efficacement des cellules exprimant ces marqueurs d'intérêt, en présence d'héparine. Cette stratégie ouvre aussi la voie à des modifications plus ambitieuses de l'AAV. En particulier, la possibilité de cliquer deux AAV entre eux a été explorée afin de proposer une voie d'optimisation de la stratégie Dual AAV qui permet le transfert de gènes dont la taille dépasse la capacité d'encapsulation du vecteur.

Title: Chemical engineering of the adeno-associated viral vector capsid using bioconjugation and bioorthogonal click chemistry.

Keywords: AAV, viral vectors, bioconjugation, bioorthogonal chemistry, gene therapy, SPAAC.

Abstract: The adeno-associated virus (AAV) is a vector of choice for *in vivo* gene therapies due to its ability to transduce a wide range of tissues with low immunogenicity. Although eight AAV-based treatments have been approved in Europe and/or the United States, limitations, such as its broad tropism, restrict its clinical use. To enhance its tissue specificity, we have developed a strategy combining bioconjugation and bioorthogonal click chemistry. This approach enables rapid and efficient functionalization of AAV with various molecules, including proteins. Azide or cyclooctyne functions were first grafted on AAV2 or AAV8 capsids using lysine, tyrosine, or cysteine residues. These vectors were then

post-functionalized with small molecules *via* the bioorthogonal SPAAC reaction. Finally, this work demonstrates that nanobodies targeting CD62L and CD45 markers can be conjugated to AAV without altering the capsid conformational structure. These vectors showed enhanced transduction of cells expressing these markers of interest in the presence of heparin. This strategy also paves the way for more ambitious AAV modifications. In particular, the possibility to click two AAV together was explored as a way to optimize the Dual AAV strategy which enables the transfer of genes exceeding the vector's encapsidation capacity.