

David Lillicrap : Bonjour, mon nom est David Lillicrap. Je suis professeur au département de pathologie et de médecine moléculaire de la Queen's University au Canada et je vais vous présenter une série de diapositives qui traite de la thérapie génique pour l'hémophilie. L'objectif académique de ces diapositives est de décrire la thérapie génique correctement, notamment les termes et les concepts de base.

C'est une histoire qui a commencé il y a plus de 65 ans. Cette diapositive présente une photo de Francis Crick à droite et de James Watson à gauche, qui pointent leur élégant modèle de la double hélice d'ADN qu'ils ont décrit à Cambridge en 1953.

Avançons maintenant rapidement au début des années 1980, lorsque le premier gène des facteurs de coagulation a été décrit. Voici un article de la catégorie « Nouvelles et opinions » publié dans la revue Nature par mon mentor, Arthur Bloom. Il décrit les bénéfices que l'on peut tirer de ces expériences de clonage, notamment une meilleure compréhension de la pathogenèse des maladies hémorragiques, des progrès en matière de diagnostic et, ultimement, la thérapie génique, le sujet de cette présentation.

Le principe de la thérapie génique est relativement simple. Il consiste à administrer un transgène thérapeutique, qui est acheminé jusqu'aux cellules, où son ADN est incorporé au noyau. À partir de cet ADN, le noyau exprime de l'ARN messager, qui est traduit pour produire la protéine thérapeutique. Cette dernière demeure dans la cellule, ou est sécrétée par la cellule et circule dans le corps à titre de bénéfice thérapeutique.

Avant de passer à la description détaillée du processus de la thérapie génique, il est important de souligner qu'à l'heure actuelle, la thérapie génique se limite aux cellules somatiques. En d'autres termes, il s'agit de délivrer un gène normal ou de réparer un gène dans les cellules d'un individu, sans offrir de bénéfice pour les générations futures. La thérapie génique des cellules somatiques se limite à un individu et nous n'avons pas l'intention de modifier ou d'altérer l'ADN des cellules germinales.

Cette diapositive montre une liste des maladies qui se sont toujours révélées de très bonnes candidates pour la thérapie génique. Ce sont des maladies monogéniques, c'est-à-dire que le phénotype clinique résulte majoritairement de défauts dans un seul gène. Vous pouvez constater que l'hémophilie est mentionnée sur cette diapositive. L'hémophilie y figure parce que nous savons que de petites augmentations dans les taux des facteurs de coagulation produisent des bénéfices cliniques significatifs. La protéine est sécrétée par la cellule et par conséquent a seulement besoin de passer dans la circulation sanguine. Un contrôle très précis de l'expression de la protéine n'est pas nécessaire. De plus, nous disposons d'excellents modèles animaux



dans lesquels nous pouvons tester ces stratégies de thérapie génique, que ce soit des souris ou des animaux de grande taille.

Vous pouvez voir sur cette diapositive quatre options possibles de thérapie génique des cellules somatiques. La première d'entre elles porte sur la réparation de la mutation. J'en parlerai un peu plus sur la diapositive suivante. Ensuite, nous avons la possibilité de délivrer des transgènes par une technique de transfert de gènes ne faisant pas appel à des virus. En théorie, ces deux options restent du domaine du possible, mais il faudra attendre encore longtemps avant d'entrevoir des applications cliniques. Ensuite, nous disposons de la thérapie génique sur cellules, que je décrirai de manière plus approfondie dans une autre diapositive. La dernière option est le transfert de gènes par vecteurs viraux, qui constitue la stratégie adoptée par toutes les études cliniques de thérapie génique actuellement en cours pour le traitement de l'hémophilie.

Cette diapositive décrit la possibilité d'altérer ou de réparer des gènes par le biais de stratégies de manipulation génétique. Le côté gauche de la diapositive présente la réparation des gènes par recombinaison homologue. Cette approche est théoriquement possible, mais très inefficace. Le côté droit de la diapositive illustre un certain nombre d'approches différentes reposant sur l'utilisation de nucléases ou ciseaux moléculaires. Ainsi, les stratégies reposant sur les ZNF (nucléases à doigts de zinc), sur les TALENs ou encore sur CRISPR/Cas9 sont présentées de gauche à droite. Ces méthodes utilisent une protéine ou un acide nucléique pour cibler une nucléase dans la région du génome qui nous intéresse afin de réaliser une cassure du double brin d'ADN. Sur la partie inférieure de la diapositive, sont représentées différentes approches pour altérer ou réparer cette cassure double brin. Ces études sont maintenant potentiellement utilisables, elles sont d'ailleurs sur le point de passer au stade des études cliniques. Mais pour l'hémophilie, bien que ces approches soient possibles in vitro et dans des modèles animaux, leur application clinique n'est pas envisageable à court terme.

Quels sont les déterminants d'une stratégie de thérapie génique ? Ils sont énumérés sur cette diapositive. Je vais vous parler du transgène thérapeutique, d'un système de délivrance et d'une cellule hôte appropriée, et finalement des mesures quantitatives permettant d'évaluer l'expression de la protéine transgénique.

À quoi ressemble la cassette du transgène ? Elle contient généralement une séquence d'ADN codante (ou séquence d'ADNc) qui ne contient pas d'introns. La taille de la majorité de ces séquences d'ADNc se situe entre 2 et 7 kilobases. Dans une autre diapositive, je vais vous décrire deux méthodes permettant d'altérer la séquence codante.



Cette diapositive présente la technique d'optimisation des codons. Il s'agit d'une modification de la séquence de nucléotides (les triplets de nucléotides qui codent pour les acides aminés) mais qui n'entraîne aucune modification de la séquence des acides aminés. Les objectifs de cette stratégie spécifique sont d'améliorer le taux de transcription de l'ARNm, d'optimiser le traitement et l'épissage de l'ARNm pour éliminer les éléments introniques restants et, finalement, d'associer le taux de traduction de l'ARNm à l'abondance des ARN de transfert qui sont présents dans la cellule hôte ciblée.

Les 2 autres groupes d'éléments qui sont requis dans la cassette du transgène sont des éléments de régulation situés à l'extrémité 5' du transgène. Premièrement, il y a les éléments du promoteur, dont la régulation dépend du type de cellule ou du stade de développement, ou qui peuvent même être induits par des médicaments. Deuxièmement, il y a les éléments amplificateurs plus distants qui sont indispensables pour renforcer l'expression du gène et qui sont généralement sélectionnés pour un type de cellule hôte en particulier.

Ensuite, à l'autre extrémité de la cassette du transgène se trouve la séquence 3', dont le rôle est habituellement de stabiliser l'ARN messager qui est codé par la séquence d'ADNc.

Les deux diapositives suivantes traitent des stratégies générales de délivrance du transgène. La première d'entre elles décrit le transfert in vivo direct des gènes, au cours duquel le transgène est habituellement délivré par perfusion intraveineuse ou, possiblement, par une méthode telle que l'injection intramusculaire. Cette stratégie présente les avantages d'être facile d'un point de vue pratique et de demander un engagement de temps minimal de la part du médecin et du patient. Un des inconvénients est l'exposition du système de délivrance des vecteurs à la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui peut être source de problèmes, comme nous en discuterons plus tard. Un deuxième inconvénient est l'efficacité variable du ciblage. Vous pourriez délivrer le transgène à certains types de cellule que vous préféreriez éviter.

La deuxième stratégie de délivrance du transgène est illustrée sur cette diapositive. Il s'agit du transfert de gènes indirect ou ex vivo, au cours duquel le transgène est délivré en dehors du corps. Vous pouvez voir sur le côté gauche de la diapositive la première étape de ce processus, qui consiste à prélever ou isoler des cellules progénitrices ou cellules souches autologues à partir du patient. Vous pouvez alors délivrer dans les cellules isolées une copie normale du gène qui présente une mutation dans le corps du patient, ou vous pouvez aussi manipuler ce gène muté. Les cellules génétiquement modifiées sont ensuite multipliées en dehors du corps, puis réintroduites dans le patient, où elles trouvent un endroit pour résider et produire la



protéine normale (dans le cas de l'hémophilie, le facteur de coagulation normal) qui est déficient dans les cellules du patient.

Ce système de délivrance comporte plusieurs avantages et plusieurs faiblesses. Les avantages concernent l'absence d'exposition des vecteurs directement dans l'organisme, ce qui est important sur le plan immunologique. De plus, le ciblage est direct, de sorte que les seules cellules exposées au vecteur et donc au transgène sont les cellules qui ont été prélevées et qui sont accessibles en dehors du corps. Parmi les désavantages, il s'agit d'une procédure qui demande beaucoup de travail et qui requiert des installations spéciales. Un autre point important à mentionner est que l'hôte doit subir une procédure de conditionnement afin de créer de l'espace pour permettre aux cellules génétiquement modifiées d'être réimplantées avec succès.

Toutes les études actuelles sur la thérapie génique pour l'hémophilie ont employé une méthode de transfert de gènes par vecteurs viraux, et trois types de virus ont été utilisés : adénovirus, rétrovirus et virus adéno-associé.

Je n'ai qu'une seule diapositive qui évoque l'adénovirus. Un patient a été traité avec ce système de vecteurs viraux. Cette méthode de transduction est extrêmement efficace pour cibler des cellules en réplication ou non et il est relativement facile de produire des grandes quantités de vecteur. L'inconvénient majeur du transfert de gènes adénoviraux porte sur l'existence d'une réponse immunitaire naturelle importante contre ces vecteurs. Cette réponse entraîne une élévation des taux de cytokines pro-inflammatoires, une toxicité du foie, une thrombopénie et, dans des cas extrêmes, vous pouvez développer un syndrome de réponse inflammatoire systémique pouvant occasionnellement être fatal. Ce système de délivrance n'est pas approprié pour les patients hémophiles dans sa forme actuelle.

Le deuxième système de délivrance viral est le transfert de gènes par un vecteur lentiviral, qui est en cours d'investigation par plusieurs groupes pour une éventuelle application clinique pour le traitement de l'hémophilie. Les vecteurs lentiviraux peuvent être utilisés pour la transduction des cellules mitotiques et non mitotiques. La capacité des vecteurs est relativement raisonnable, car ils transportent des transgènes d'une taille maximale d'environ 8 kilobases. La réponse immunitaire innée est mineure avec ce type de vecteurs. Le système lentiviral présente comme avantage une intégration génomique stable qui semble être de nature aléatoire et non oncogène, au moins selon les études approfondies qui ont été réalisées sur des modèles animaux.

Enfin, le troisième des systèmes de vecteurs viraux est le virus adéno-associé (AAV). Cette photo de microscopie électronique montre de nombreuses particules d'AAV de petite taille. Vers le centre de la diapositive,



vous pouvez voir une particule adénovirale de grande taille. Il s'agit du système de vecteurs viraux utilisé dans toutes les études actuelles sur la thérapie génique pour l'hémophilie.

L'AAV, comme je l'appellerai par la suite, est un parvovirus humain non pathogène. Il comporte un génome d'ADN à un seul brin, qui est illustré au haut de cette diapositive. Sa taille est de 4,7 kilobases. Il comporte deux régions de codage, un gène rep et un gène cap, et le génome est coiffé aux deux extrémités par des séquences répétées terminales inversées. Ce système de vecteur viral induit une immunogénicité naturelle faible. Il existe de nombreux sérotypes différents en raison des variations dans les protéines de la capsid. Une proportion infime du vecteur recombinant s'intègre dans le génome de l'hôte et la majorité du vecteur existe sous la forme de concatémères circulaires extrachromosomiques stables.

Cette diapositive vous montre essentiellement comment convertir un génome de l'AAV de type sauvage en un génome de l'AAV contenant le transgène thérapeutique. Vous supprimez les gènes rep et cap pour les remplacer par un gène thérapeutique à droite et un élément promoteur ou régulateur à gauche qui contrôle son expression dans un type d'organe ou de cellule en particulier. Comme illustré dans cette diapositive, un promoteur spécifique du foie contrôlerait l'expression de ce transgène dans les hépatocytes. À l'heure actuelle, pour l'hémophilie, tous les vecteurs ciblent le foie. Au bas de la diapositive, vous voyez que la taille des inserts du transgène varie entre environ 1,3 kilobases pour la séquence d'ADNc du facteur IX et environ 4,7 kilobases pour la séquence d'ADNc du facteur VIII après le retrait de la séquence codant pour le domaine B.

Comment produit-on une particule de vecteur AAV ? Eh bien, cette diapositive vous le décrit. En haut de la diapositive, vous voyez la séquence d'acides nucléiques transgéniques comprenant les séquences ITR aux extrémités « 5' » et « 3' » du transgène, la séquence du promoteur et du gène transgénique au centre. Cette séquence est insérée dans la capsid du vecteur AAV pour créer une particule de vecteur AAV. Ce sont ces particules qui sont injectées dans le foie du patient pour délivrer le matériel thérapeutique.

Ceci est illustré plus en détail ici. Vous voyez que la particule interagit avec la membrane d'une cellule hôte. L'interaction entre l'AAV et certains types de récepteurs est relativement bien établie, mais nos connaissances comportent encore des lacunes. La particule est intégrée dans un endosome à l'intérieur de la cellule. Éventuellement, la particule est libérée de l'endosome, les protéines de la capsid sont décomposées et exprimées à la surface de la cellule infectée, puis l'acide nucléique transgénique demeure dans le noyau



sous forme de concatémères extrachromosomiques ou, dans certains cas (moins fréquent avec l'AAV), intégré dans l'ADN de la cellule hôte.

Cette diapositive résume les composants des stratégies de transfert génique pour l'hémophilie. Premièrement, le transgène thérapeutique doit être une séquence d'ADNc du facteur IX de type sauvage ou modifiée, ou une séquence du facteur VIII dont le domaine B a été supprimé. Vous avez besoin d'une stratégie de délivrance qui actuellement est un virus adéno-associé, bien que, comme je l'ai mentionné, des études commencent à explorer les vecteurs lentiviraux. Vous devez le délivrer dans une cellule hôte réceptrice, actuellement dans le foie. Puis, vous devez déterminer si les résultats confirment la réussite des études que vous avez réalisées. Ces résultats impliquent les mesures des taux du facteur de coagulation dans le plasma, du taux annuel de saignement et de la consommation exogène du facteur VIII (ou IX) par les patients. Ensuite, bien évidemment, vous devez également faire preuve de vigilance envers les considérations relatives à l'innocuité.

Cette diapositive présente une version du cycle du hype de Gartner (courbe décrivant l'évolution de l'intérêt) pour la thérapie génique. Je vais décrire cette diapositive de gauche à droite. Ainsi, le déclencheur technologique a vu le jour dans les années 1970s. Le pic des années 1990 à 1995, correspondait à une période pendant laquelle nous estimions que la thérapie génique pourrait accomplir des choses remarquables. Et en effet, certaines formes de troubles de l'immunodéficience héréditaires, comme la déficience en adénosine désaminase (ADA), ont été guéries par la thérapie génique. Mais en 1999, un drame s'est produit, lorsqu'un patient traité par une thérapie génique adénovirale, Jesse Gelsinger, est décédé suite à une affection inflammatoire systémique. Cet événement a constitué un creux de désillusion dans le développement de stratégies de thérapie génique.

Néanmoins, au cours de la décennie suivante, entre 2000 et 2010, la recherche fondamentale sur le développement des vecteurs, et une meilleure compréhension de la réponse immunitaire consécutive à l'administration de la thérapie génique, nous ont amené à ce qui constitue actuellement un plateau de productivité. Ce plateau a réellement commencé pour l'hémophilie en 2010/2011, avec la première réussite clinique soutenue de thérapie génique pour l'hémophilie, et un engagement biopharmaceutique considérable en matière de stratégies de thérapie génique. Nous voici donc en 2019, à l'aube de plusieurs études cliniques de phase 3 en hémophilie A et hémophilie B.

Cette dernière diapositive décrit l'avenir prometteur de la thérapie génique pour l'hémophilie. Le haut de la diapositive présente les effets hémostatiques obtenus par la thérapie de substitution, avec les facteurs à demi-vie



prolongée ou thérapie non-substitutive tandis que la partie droite de la diapositive présente les possibilités offertes par la thérapie génique. Le bas de la diapositive vous montre les taux de facteurs de la coagulation qui peuvent être mesurés dans la circulation sanguine. Ainsi, si vous tournez votre attention vers les informations présentées à gauche de la diapositive, les pics et les creux intermittents des taux de facteurs correspondent à des améliorations de l'hémostase, puis à des réductions dans ces améliorations. Ce profil inégal est causé par la demi-vie des protéines dans la circulation sanguine.

Ces avantages ont été améliorés avec les facteurs à demi-vie prolongée comme vous pouvez le constater d'après le deuxième ensemble de résultats de l'hémostase et des taux des facteurs de coagulation. Encore plus à droite, vous voyez que les thérapies sans facteurs n'améliorent pas les taux des facteurs de coagulation, car elles ne sont pas basées sur l'administration de facteurs de coagulation, mais elles améliorent l'hémostase globale, ce qui est illustré dans la partie supérieure du graphique.

Finalement, la droite de la diapositive montre les résultats qui peuvent être atteints avec la thérapie génique. Ainsi, la thérapie génique offre la promesse d'une élévation des taux de facteurs de coagulation (facteur IX et facteur VIII) à des valeurs significatives sur le plan thérapeutique, et surtout d'un maintien de ces taux en raison de l'expression continue du facteur IX ou du facteur VIII par les transgènes thérapeutiques qui ont été délivrés. Ces taux devraient être largement suffisants pour maintenir une prophylaxie à long terme, avec seulement de rares exigences de substitution intermittente de facteurs de coagulation.

