

Glenn Pierce : Bonjour, mon nom est Glenn Pierce. Je suis le vice-président médical de la Fédération mondiale de l'hémophilie. J'ai un intérêt et un engagement de longue date dans la thérapie génique de l'hémophilie. Aujourd'hui, nous parlerons des autres stratégies et cibles de la thérapie génique pour le traitement de l'hémophilie. En fait, nos objectifs pour cette présentation seront d'examiner des approches autres que le virus adéno-associé (AAV) et de discuter de certains des avantages et des inconvénients de l'AAV.

Le concept de la thérapie génique a été présenté il y a près de 50 ans, dans un article de Ted Friedmann publié dans la revue Science, alors qu'il s'interrogeait sur le potentiel de la thérapie génique pour les maladies humaines. Ce n'était pas très longtemps après l'identification de l'ADN et l'ARN et de leurs fonctions. Dans cet article, il soulève des problèmes scientifiques et éthiques difficiles, en fait les mêmes questions que nous abordons aujourd'hui au sujet de la manipulation génétique.

50 ans plus tard, nous nous demandons pourquoi nous devrions utiliser l'approche des vecteurs AAV en thérapie génique pour l'hémophilie. Essentiellement, c'est parce qu'ils fonctionnent. Mais le chemin vers ces récents succès s'est étalé sur une période de 25 à 30 ans, avec de nombreux échecs sur son parcours. À l'heure actuelle, la thérapie génique par AAV représente l'approche la plus viable pour offrir un bénéfice thérapeutique aux personnes atteintes d'hémophilie avec un déficit soit en facteur VIII soit en facteur IX.

Dans l'ensemble, les vecteurs AAV disposent d'un bilan de sécurité favorable. Ils ont été utilisés dans différents états de la maladie et dans différents essais cliniques. Nous allons aborder plusieurs problèmes, y compris la variabilité et la durabilité des réponses, ainsi que le fait que pratiquement la moitié de la population a développé une immunité préexistante contre différents sérotypes d'AAV. Les sérotypes sont des particules d'AAV très semblables, mais qui ont évolué en se différenciant suffisamment de l'AAV primaire

pour infecter différents tissus du corps. Nous avons utilisé certains de ces sérotypes d'AAV pour la thérapie génique, et pour tous, on retrouve des preuves d'exposition antérieure chez un certain nombre de personnes. Cela se manifeste par la présence d'anticorps contre ces AAV, empêchant ainsi leur utilisation chez les patients positifs. Cette réponse immunitaire que nous constatons avant d'administrer des AAV est considérablement amplifiée après l'administration des AAV, ce qui exclut toute possibilité d'administrer d'autres doses.

L'administration de la thérapie génique par AAV provoque une très grande augmentation des titres d'anticorps. L'AAV est parmi les plus petits virus qui peuvent infecter les humains. À ce titre, même après le retrait des gènes de l'AAV, il y a peu d'espace disponible. Par exemple, le gène du facteur VIII même après retrait du domaine B arrive à peine à s'insérer dans l'AAV. Il y a



donc également des limites de taille. L'AAV peut aussi produire un peu d'intégration aléatoire, ce qui n'est pas bien défini et pas assez étudié,

et qui soulève des questions concernant la sécurité à long terme. Notre dernière préoccupation concernant l'AAV est que nous administrons des trillions de génomes viraux aux patients, mais seule une très petite fraction induit la production de protéines qui sont sécrétées et procurent un bénéfice thérapeutique. Malgré tout cela, l'AAV demeure un vecteur viral efficace capable de produire un effet thérapeutique pour les patients atteints d'hémophilie.

Quelles sont les solutions disponibles pour améliorer les vecteurs AAV ? Plusieurs solutions ont été proposées pour adresser les problèmes que j'ai mentionnés concernant l'utilisation de l'AAV, mais la plupart n'ont pas vraiment été mises à l'épreuve. Ceci est un élément important, non seulement pour les essais cliniques qui progressent vers la phase 3, mais aussi pour les nouveaux essais cliniques qui sont développés, susceptibles d'utiliser des vecteurs AAV améliorés que ce soit dans leur efficacité de transduction, ou autres aspects. L'ensemble de ces

solutions possibles sont en cours d'étude, mais pas assez rapidement pour contribuer à la première génération de thérapie génique par AAV qui pourrait être approuvée en 2020 ou 2021. Cette figure présente le mécanisme de transduction des vecteurs AAV dans les hépatocytes. Dans le cas n°1, nous constatons que si vous possédez des anticorps contre les AAV en raison d'une infection naturelle préexistante,

ces anticorps empêcheront les AAV d'atteindre la cellule cible. Ainsi, la thérapie génique n'aura aucun effet thérapeutique. Dans le cas n°2, en absence d'anticorps, les AAV peuvent se lier à des récepteurs à la surface des cellules pour être absorbés par endocytose, selon les mécanismes habituels de transcytose des récepteurs. Une fois dans la cellule, les AAV peuvent aussi éventuellement rencontrer une certaine réponse immunitaire innée, car nos cellules sont conçues pour nous défendre contre les infections virales.

C'est d'ailleurs ce qui semble arriver lors de leur utilisation en thérapie génique. Mais une fraction suffisante des AAV peut s'échapper et perdre leur capsid. A partir du cytoplasme, les AAV rentrent dans le noyau des cellules et sont décapsidés. Leur ADN ainsi libéré forme des épisomes, des boucles fermées et stables pouvant utiliser la machinerie de l'hôte pour réaliser la transcription et la traduction des protéines, qui peuvent ensuite être sécrétées. La capsid quant à elle

va dans le réticulum endoplasmique, où elle va rencontrer des antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité. Certains d'entre eux peuvent se lier spécifiquement à des peptides de la capsid, ce qui induit leur localisation à la surface de la cellule, où ils peuvent stimuler les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques dirigés contre les capsides. Cette stimulation peut entraîner la destruction de la cellule contenant le transgène. Ainsi, nous sommes aux prises avec

des problèmes d'efficacité, de variabilité et de durabilité en raison de l'ensemble de ces étapes complexes qui se produisent dans la cellule. Que pouvons-nous faire concernant l'immunité préexistante ? Certains groupes étudient l'immunoabsorption dans des modèles animaux. Ceci implique l'utilisation d'une colonne de protéines G ou de protéines A pour adsorber les immunoglobulines ou IgG d'un patient qui pourrait présenter des titres élevés

d'anticorps contre les AAV. Cet effet est transitoire mais il pourrait suffire à réduire suffisamment les titres d'anticorps pour permettre l'administration des AAV et délivrer le transgène aux cellules cibles. Des études sont en cours pour évaluer l'efficacité de cette technique d'élimination des IgG, car dans un certain nombre de patients, des quantités importantes (plusieurs incréments logarithmiques) d'IgG doivent être retirées afin de permettre

le ciblage des hépatocytes. Puis, il y a le problème de la toxicité intracellulaire après la délivrance des AAV. Nous avons observé une hausse des taux de transaminases du foie dans un certain nombre de patients. Ces hausses sont transitoires et ne sont pas très élevées, environ 1½ à 2 fois supérieures à la normale dans la plupart des cas. Mais elles représentent une source de préoccupation, car une hausse des taux de transaminases dans le foie indique la mort des hépatocytes.

Quelles sont les causes possibles d'une hausse des taux d'enzymes hépatiques ? Trois hypothèses ont été émises, non mutuellement exclusives, comme pouvant avoir un effet sur les hépatocytes des patients. Premièrement, les cellules doivent assumer la dégradation d'un très grand nombre de capsides des AAV. De nombreux capsides entrent dans les cellules en raison de la forte dose administrée par voie intraveineuse. La cellule doit digérer ces capsides en décomposant ses constituants

en acides aminés. Ce processus utilise une portion importante de l'énergie de la cellule. Deuxièmement, il y a la problématique des cellules T cytotoxiques décrite précédemment. La troisième hypothèse concerne ce qu'on appelle une réponse de la protéine dépliée. Cette hypothèse est plus spécifiquement applicable au facteur VIII. En effet, il est établi depuis quelques années qu'il est très difficile pour les cellules de produire la protéine du facteur VIII. Il s'agit d'une protéine complexe, l'un des plus volumineuses du corps humain.

Même si on utilise du facteur VIII délété du domaine B, il a été montré dans des cellules en culture qu'il est très difficile pour les cellules de produire le facteur VIII, et que la production de la protéine peut en tant que telle causer de la toxicité dans ces cellules. Cette toxicité peut entraîner la mort des cellules et, par le fait même, la perte de l'expression du facteur VIII. Tous ces secteurs doivent être explorés, mais ils n'ont pas encore été suffisamment étudiés pour nous permettre de répondre à ces questions et de développer

des solutions adéquates. Sur cette diapositive, la figure en haut à gauche présente un exemple de la hausse des taux de transaminases dans le foie. Elle montre également la hausse concomitante des taux de lymphocytes T



CD8+ cytotoxiques spécifiques pour la capsid de l'AAV, et qui induisent la mort et la destruction des cellules. La figure du bas montre les différentes réponses immunitaires qui peuvent être induites par

la transduction et l'expression du transgène. Nous voyons que les lymphocytes T CD8+ peuvent attaquer l'hépatocyte contenant le transgène. Nous voyons également que les lymphocytes T CD4+ ou cellules auxiliaires peuvent être activées. Ces dernières cellules jouent un rôle important dans la réponse immunitaire significative dirigée contre la capsid de l'AAV, et qui exclut toute possibilité d'administrer d'autres doses. En fait, pratiquement aucun effort n'est déployé pour étudier ces trois questions essentielles

impliquant la capsid, les cellules T cytotoxiques et la réponse de la protéine dépliée. De nombreuses études sont nécessaires dans ces domaines afin de mieux les définir soit au niveau individuel d'un patient mais aussi au niveau de groupes de patients. Quelles sont les alternatives à l'AAV ? Un certain nombre d'études ont été réalisées sur des alternatives virales et non virales. Les virus actuellement les plus avancés comme alternative aux AAV pour le traitement de l'hémophilie sont les lentivirus.

Les lentivirus sont dérivés du VIH. Certains gènes du VIH ont été supprimés des lentivirus pour permettre l'insertion du gène du facteur VIII ou du facteur IX exactement comme dans le cas des AAV. Des études sont en cours sur la délivrance du facteur VIII et du facteur IX par des lentivirus en utilisant des protocoles ex vivo avec des cellules souches hématopoïétiques ou des protocoles in vivo en ciblant spécifiquement les hépatocytes dans différents modèles précliniques, y compris des gros animaux.

Mais l'approche idéale serait de ne pas utiliser de virus. Les nanoparticules lipidiques sont étudiées depuis plus de 30 ans pour la délivrance d'acides nucléiques comme l'ADN. J'ai mentionné le manque d'efficacité de l'AAV. Ceux-ci sont encore moins efficaces pour l'insertion des gènes dans les cellules. Cependant, ces nanoparticules lipidiques n'induisent pas de réponse immunitaire, ce qui permet d'administrer plusieurs doses.

Si le patient ne produit pas un taux suffisamment élevé de facteur VIII ou de facteur IX, il peut donc recevoir plusieurs injections afin d'atteindre un taux thérapeutique. Une autre approche, qui représente vraiment l'avenir de la thérapie génique, est la manipulation génétique. Cette approche permet d'ajouter directement dans les chromosomes un gène qui pourrait remplacer le gène existant. Dans le cas de l'hémophilie, nous n'avons pas besoin d'accomplir cela. Il faut uniquement ajouter le gène dans les chromosomes.

Dans certains cas d'hémophilie caractérisés par une mutation spécifique, cette approche pourrait même permettre de réparer le gène existant. La modification génétique représente l'avenir de la thérapie génique parce qu'elle permet de corriger un phénotype de manière permanente. Une fois inséré dans les chromosomes, le gène continuera d'exprimer les protéines jusqu'à la mort de la cellule. Si la cellule se divise, le gène sera trouvé dans les deux cellules filles. Il s'agit donc d'une approche intéressante, mais qui n'est pas encore tout à fait au point

pour des essais cliniques. Cependant, elle est actuellement étudiée dans des modèles précliniques de l'hémophilie. La dernière approche est la thérapie cellulaire. Cette approche a été explorée dans différents types de cellules, y compris les cellules souches et les hépatocytes, pour la délivrance directe du gène du facteur VIII ou du facteur IX chez les personnes atteintes d'hémophilie. Cette diapositive montre une représentation des nanoparticules lipidiques qui délivrent des acides nucléiques.

La plupart des études ont été menées avec des petites molécules d'ARN, comme les ARN inhibiteurs. Mais il serait également possible d'incorporer des gènes dans ces nanoparticules lipidiques. Beaucoup de travail a été accompli afin de les rendre non toxiques pour les cellules et leur permettre de cibler, entre autres, les hépatocytes. Donc, nous attendons avec impatience les futurs développements dans ce domaine. Cette approche n'est pas tout à fait prête pour les essais cliniques, mais les avancées sont encourageantes.

Nous avons besoin d'identifier des moyens d'accroître l'efficacité de l'expression des gènes délivrés par les nanoparticules lipidiques. Ils offrent un certain nombre d'avantages par rapport à la délivrance par les vecteurs viraux. Quelles sont les principales différences entre les vecteurs lentiviraux et les vecteurs AAV ? Les principales différences entre les vecteurs lentiviraux et les vecteurs AAV sont indiquées dans ce tableau. Ils proviennent de familles différentes. Les lentivirus possèdent une enveloppe lipidique,

alors que les AAV ne possèdent pas d'enveloppe mais exposent des protéines qui peuvent interagir avec les récepteurs à la surface des cellules. La capacité d'emmagasinement est deux fois plus élevée pour les lentivirus que pour les AAV. Alors que les lentivirus peuvent s'intégrer dans l'ADN de l'hôte, alors que les AAV sont majoritairement non-intégratifs et demeurent extrachromosomiques. Les deux types de virus peuvent être utilisés pour la transduction des cellules mitotiques et non mitotiques.

Finalement, les lentivirus procurent une correction permanente, alors que les AAV forment des épisomes qui peuvent être perdus lors de la division cellulaire. Les mécanismes de transfert des gènes par les vecteurs lentiviraux et les vecteurs AAV sont très similaires. Dans les deux cas, le virus entre dans les cellules par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Dans les deux cas, le matériel génétique (l'ADN pour l'AAV et l'ARN pour les lentivirus) doit entrer dans le noyau

pour utiliser la machinerie de l'hôte. Les lentivirus utilisent la machinerie de l'hôte pour produire de l'ADN à partir de l'ARN, et ensuite pour incorporer cet ADN dans le chromosome. Les AAV utilisent la machinerie de l'hôte pour transformer l'ADN simple brin en ADN double brin, qui adopte la forme d'un épisome ou fragment circulaire d'ADN, dans lequel l'ARN peut être transcrit pour produire des protéines.

Ces deux méthodes fonctionnent et permettent d'atteindre des taux thérapeutiques de facteur VIII, au moins chez les animaux, et également





chez les humains dans le cas des AAV. En ce qui concerne les approches de manipulation du génome pour le traitement de l'hémophilie, il existe des stratégies in vivo ou ex vivo. Examinons plus attentivement ces approches. La manipulation génétique qui est une technique relativement nouvelle établie au cours des 5 à 8 dernières années, permet

d'insérer un nouveau gène directement dans les chromosomes à l'aide d'enzymes bactériennes spécifiques qui peuvent ouvrir notre ADN et permettre au nouveau gène de venir s'insérer au site de coupure. Cette approche permet d'obtenir une correction permanente au niveau du chromosome. Cette diapositive présente un exemple de manipulation génétique à l'aide de la technique CRISPR-Cas9, exemple qui a été présenté lors de la conférence de l'International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) en juillet 2019

par Alan Brooks. Il a démontré qu'il est possible de couper l'ADN des hépatocytes pour y insérer le gène du facteur VIII dont le domaine B a été supprimé, de produire l'ARN messager (ARNm) et d'induire la sécrétion du facteur VIII. Ceci a été réalisé dans des modèles animaux et a conduit à la production de taux thérapeutiques de facteur VIII.

Passons maintenant aux approches de la thérapie cellulaire. Quelques groupes ont utilisé des cellules souches et des hépatocytes matures pour délivrer le gène du facteur VIII ou du facteur IX. Cette figure montre que le gène du facteur VIII est inséré dans un vecteur lentiviral. Le vecteur lentiviral peut effectuer la transduction de cellules souches mésenchymateuses prélevées de l'hôte.

Ces cellules souches mésenchymateuses peuvent être incitées à se différencier en différents types de cellules, y compris les cellules de la moelle osseuse ou les hépatocytes. Ainsi, il pourrait être possible d'induire la production du facteur VIII dans ces types de cellules différenciées. Une approche autologue peut être utilisée, par laquelle des cellules souches prélevées du patient sont manipulées ex vivo pour l'insertion du gène du facteur VIII, puis réintroduites dans le même patient où elles pourront sécréter le facteur VIII.

Ceci a été réalisé dans des animaux, et même chez des sujets humains, mais avec des résultats très mitigés. Cependant, Roth et ses collègues ont publié un article il y a près de 20 ans, dans lequel ils ont démontré qu'ils pouvaient isoler des fibroblastes à partir d'une biopsie de peau, cultiver ces fibroblastes in vitro, insérer le gène du facteur VIII, puis les réimplanter dans la cavité péritonéale. Ils pensent avoir détecté une faible activité du facteur VIII

dans la circulation sanguine pendant une brève période, mais ils n'ont pas poursuivi cette démarche jusqu'à obtenir un effet thérapeutique pour les patients. L'approche suivante utilise des cellules endothéliales qui peuvent exprimer le facteur VIII. En effet, les cellules endothéliales sinusoidales du foie représentent un des sites naturels de production du facteur VIII. Nous



pouvons recueillir des cellules souches autologues, ou encore induire des cellules souches pluripotentes, à partir d'échantillons de sang du patient.

Nous pouvons ensuite introduire le gène du facteur VIII dans ces cellules en utilisant un vecteur lentiviral et finalement les faire se différencier en cellules endothéliales avant de les ré-introduire chez les patients pour corriger le phénotype hémophile. Les avantages conceptuels de cette approche sont clairs : elle est très simple. Il est toutefois bien plus difficile de la mettre en pratique. Néanmoins, des taux thérapeutiques de facteur VIII ont été atteints chez des animaux qui ont reçu ces nouvelles cellules.

Une dernière série d'études a démontré que des cellules s'apparentant aux hépatocytes peuvent être produites à partir de cellules souches pluripotentes induites. Cette approche consiste à recueillir des cellules mononucléaires du sang périphérique du patient, les reprogrammer en cellules souches pluripotentes induites en utilisant des facteurs de transcription, potentiellement des petites molécules, introduire le gène du facteur IX par manipulation génétique,

diriger leur différenciation vers des cellules s'apparentant aux hépatocytes, puis les réimplanter dans le patient où elles s'accumuleront dans le foie ou la cavité péritonéale, pour produire des quantités thérapeutiques du facteur IX. Ceci a été accompli dans les souris. Donc en résumé, nous avons obtenu des résultats encourageants pour toutes ces approches de thérapie cellulaire dans des modèles animaux. Maintenant, il s'agit de déterminer si une transition vers les études cliniques chez l'homme est possible.

Aucune étude clinique à base de thérapie cellulaire n'est actuellement prévue à court terme. D'autres études sont nécessaires. Une demande de drogue nouvelle de recherche (DNR) a été déposée concernant une nouvelle approche avec des cellules souches hématopoïétiques pour la thérapie par vecteurs lentiviraux chez les humains. Il s'agit d'exprimer le gène du facteur VIII spécifiquement dans les plaquettes. Tout d'abord, le gène du facteur VIII est introduit dans des cellules souches à l'aide d'un vecteur lentiviral. Ensuite, ces cellules se différencieront

en une variété de types cellulaires, mais un promoteur spécifique ajouté au gène du facteur VIII permettra la production de la protéine uniquement dans les plaquettes sanguines. Cette approche a prouvé son efficacité dans un certain nombre de modèles animaux, et une demande de DNR est en cours. Malheureusement, ce type d'approche nécessite la création d'un espace dans la moelle osseuse pour réimplanter les cellules modifiées et établir une niche.

Cela signifie qu'un agent cytotoxique, comme le busulfan, doit être utilisé pour éliminer une partie de la moelle osseuse. Ceci soulève des préoccupations concernant le rapport bénéfices/risques. Par conséquent, ce traitement doit être proposé et planifié très prudemment, afin de s'assurer que l'ablation de la moelle osseuse ne soit pas néfaste pour la santé des patients. Revenons maintenant à l'AAV et certaines de ses lacunes. J'ai mentionné la nécessité d'améliorer le vecteur,



notamment en termes d'efficacité, de variabilité et de durabilité de la thérapie par AAV. J'ai mentionné d'autres méthodes de délivrance des gènes, des méthodes de délivrance n'impliquant pas l'AAV incluant les nanoparticules lipidiques, et l'émergence des lentivirus. Les lentivirus devraient prochainement être étudiés dans le cadre d'essais cliniques. Finalement, la thérapie cellulaire combinée avec la thérapie génique, combinée avec la manipulation génétique,

semble pouvoir être très efficace pour la création de nouvelles usines cellulaires de production du facteur VIII ou du facteur IX, mais cette approche n'a pas encore fait la transition de la phase préclinique aux concepts cliniques. Je vous remercie de votre attention.

