

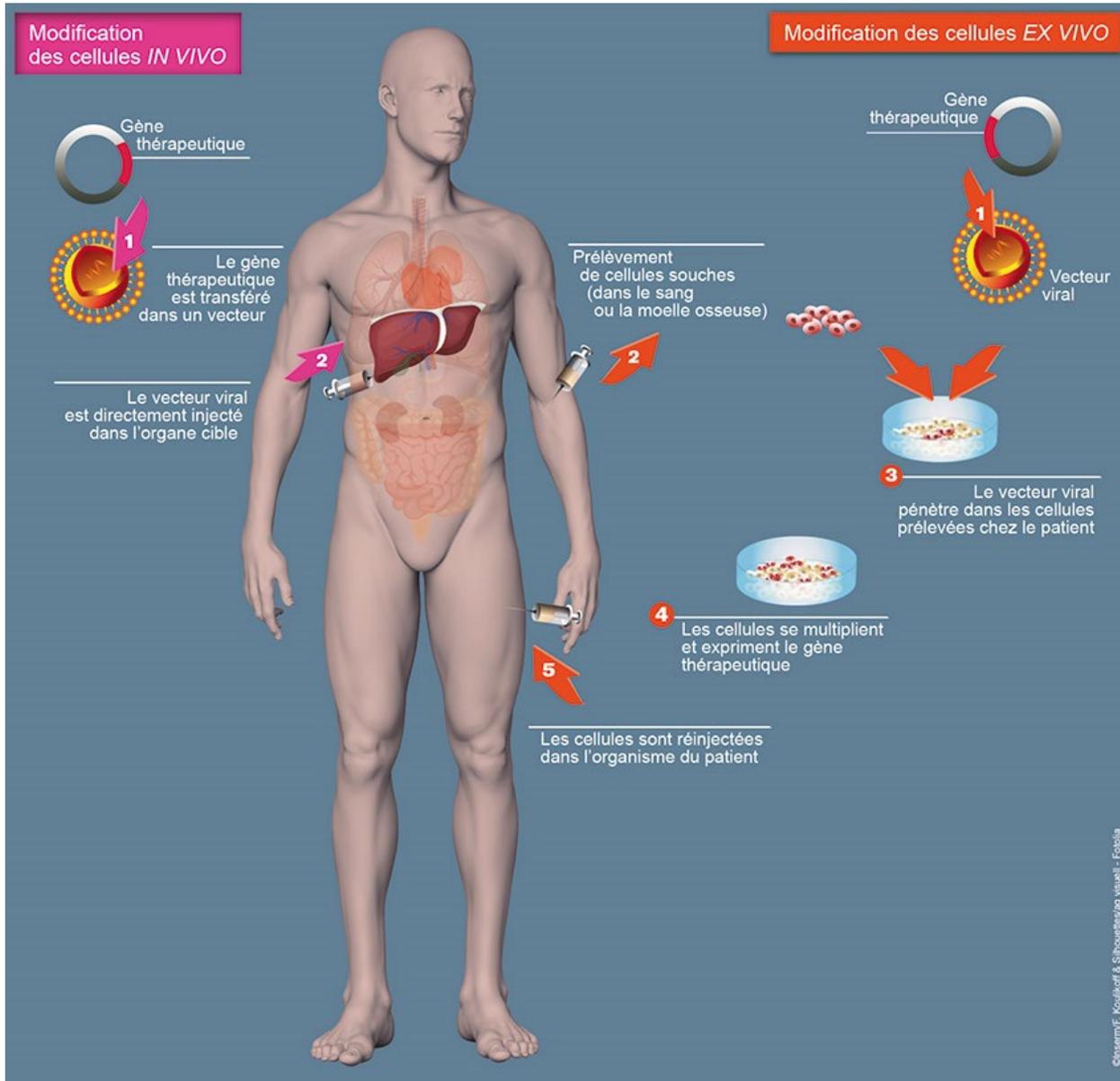
Thérapie Génique

Vecteurs viraux

Définition

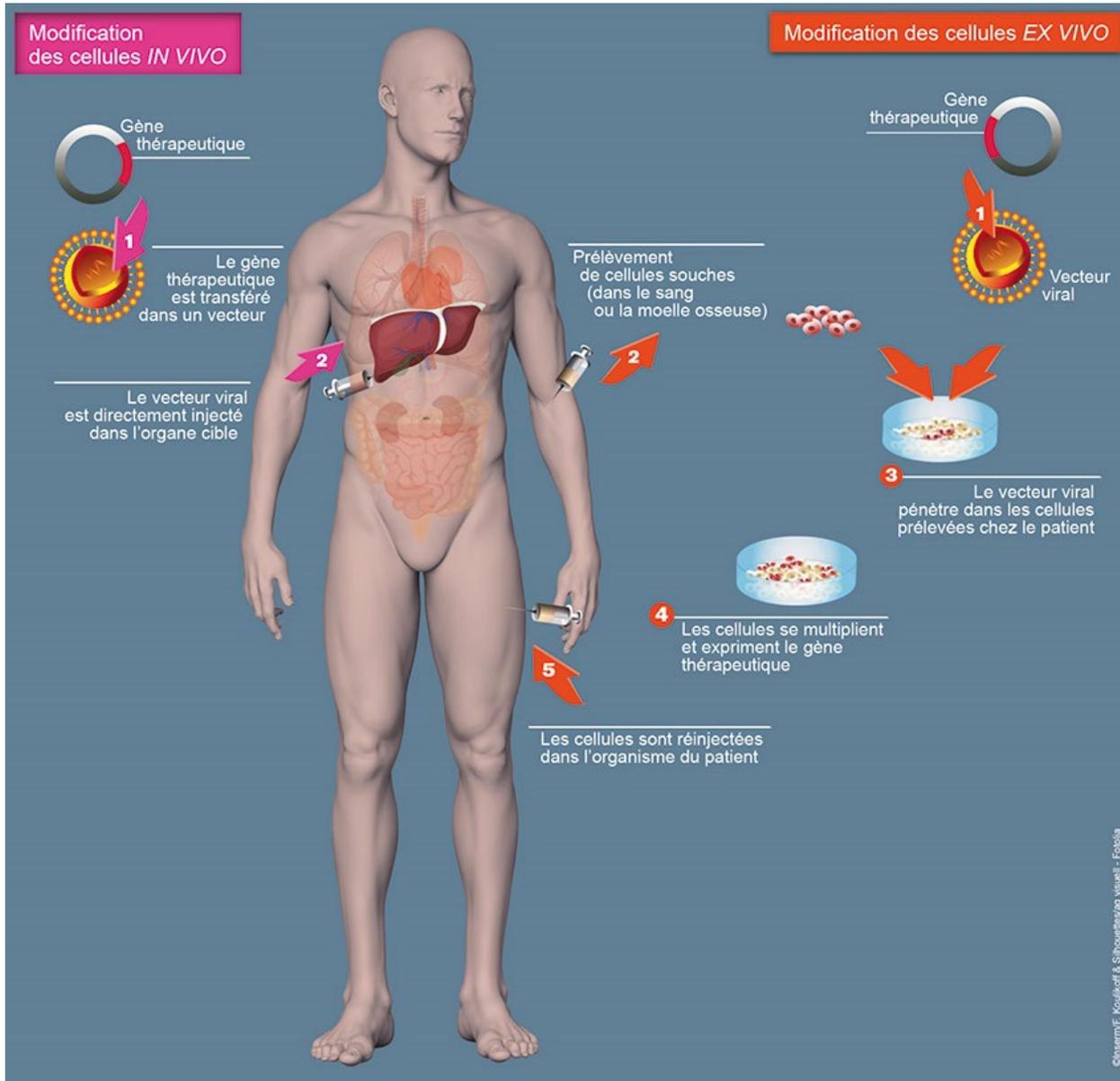
- **La thérapie génique** vise à intervenir sur un gène dans les cellules d'un patient, soit en le corrigeant, soit en le remplaçant, soit en intervenant sur son expression.
- Utilise des acides nucléiques (transportés ou non par des vecteurs viraux)
- A l'origine, concerne les maladies génétiques monogéniques

Stratégies de thérapie génique



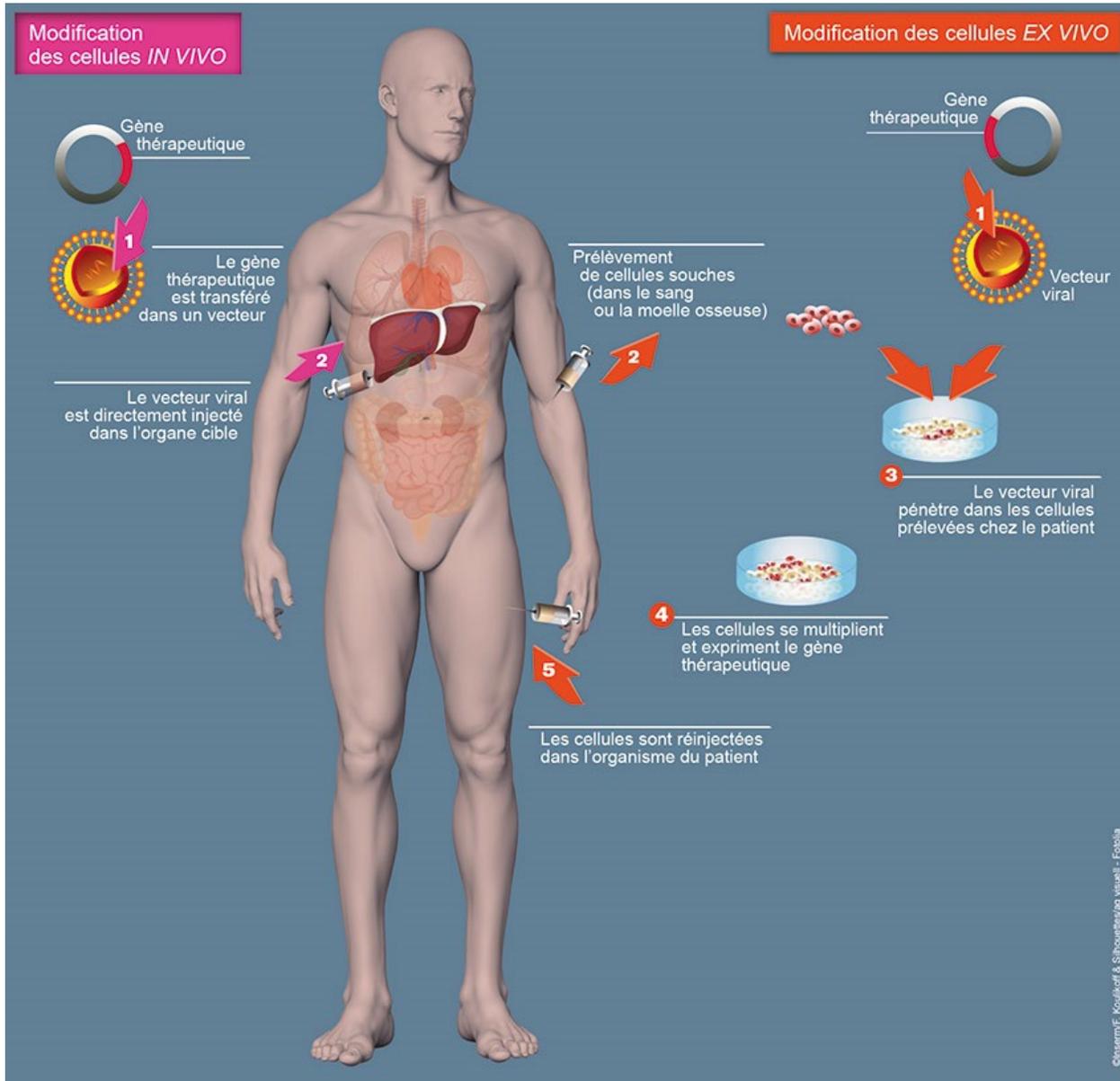
- modifier génétiquement les cellules du patients, *ex vivo in vivo* ou *in situ*, de façon pérenne ou transitoire
- *Ex vivo*
- Ex : Maladie monogénique qui affecte les cellules sanguines
- Cellules SH prélevées et mises en culture
- Cellules qui expriment le transgène sont réinjectées

Stratégies de thérapie génique



- modifier génétiquement les cellules du patients, *ex vivo in vivo* ou *in situ*, de façon pérenne ou transitoire
- *In vivo*
- injection du vecteur contenant le transgène directement dans la circulation sanguine ou le LCR
- Ex maladie de stockage lysosomal

Stratégies de thérapie génique

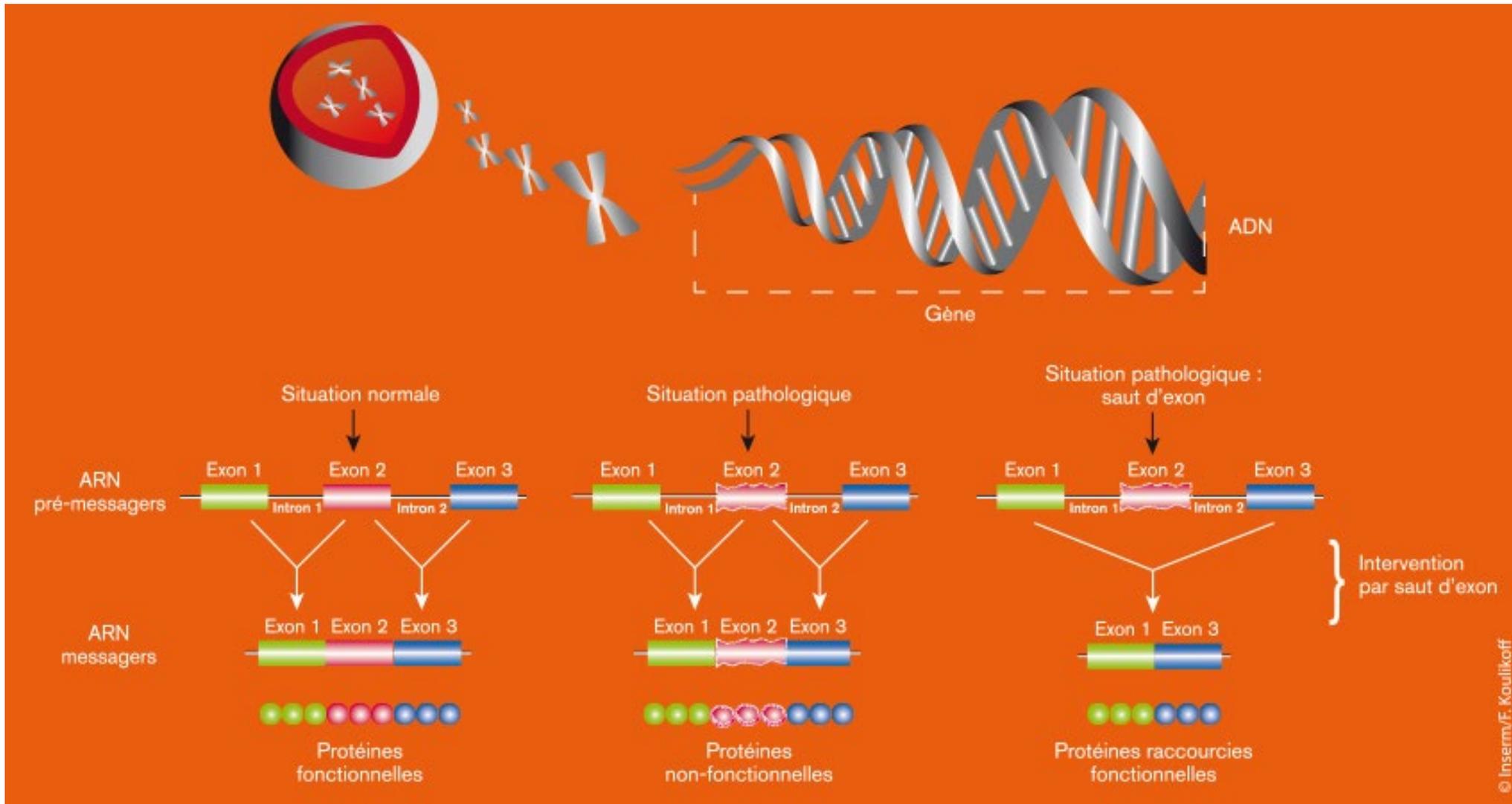


- modifier génétiquement les cellules du patients, *ex vivo in vivo* ou *in situ*, de façon pérenne ou transitoire
- *In situ*
- injection du vecteur contenant le transgène directement dans les organes cibles
- Ex de l'amaurose de Leber, une dégénérescence de la rétine
- Injection dans la rétine

Différentes stratégies

- Suppléer un gène « malade »
 - Le gène déficient est toujours présent dans le génome du malade
- Eliminer ou réparer un gène altéré directement dans la cellule
 - Lorsqu'un gène déficient produit une protéine qui peut être toxique pour l'organisme
 - (édition génomique) permet de réparer des mutations génétiques de façon ciblée
 - Nucléases à doigt de Zinc, TALEN, CRISPR /Cas9
- Modifier l'ARN pour obtenir une protéine fonctionnelle
 - injection de petits oligonucléotides anti-sens qui se fixent sur l'ARN messenger
 - Protéine plus courte que la protéine normale mais fonctionnelle

Chirurgie du gène : saut d'exon



version de la protéine déficiente chez le patient plus courte que la protéine normale mais fonctionnelle

Différentes stratégies

- Apporter un nouveau gène
 - cellules immunitaires qui ont à leur surface des récepteurs chimériques capables de reconnaître les cellules cancéreuses (CAR-T cells pour Chimeric Antigen receptor)
- Détruire une cellule malade
 - virus modifié génétiquement qui infecte et détruit spécifiquement les cellules cancéreuses

maladies monogéniques

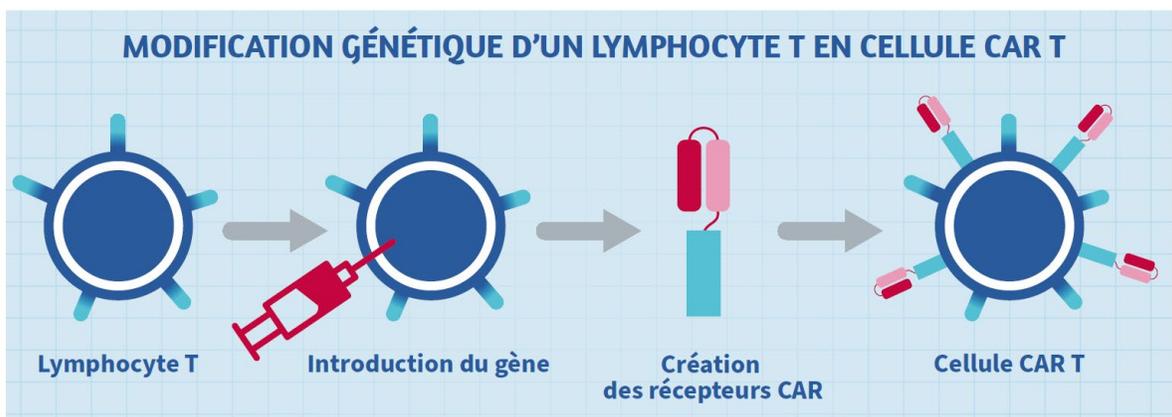
- Déficits immunitaires
 - immunodéficiences sévères combinées (SCID), immunodéficiences par déficit en adénosine désaminase (ADA-SCID), syndrome de Wiskott Aldrich ou granulomatose septique chronique
 - Maladies hématologiques
 - hémophilie B ou A, anémie de Fanconi ou bêta-thalassémie
 - pathologies rétinienne
 - Myopathies (myopathie de Duchenne)
 - maladies lysosomales
 - maladie de Sanfilippo ou maladie de Gaucher
 - maladies neuro-dégénératives
 - maladies de la peau telles que l'épidermolyse bulleuse.
- Toutes ces pathologies sont liées au défaut de fonctionnement d'un gène unique.

maladies hématologiques

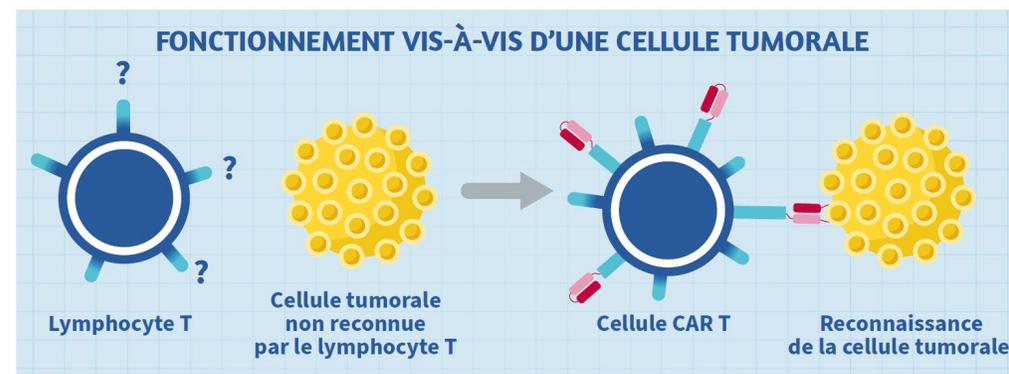
- modifier des cellules souches *ex vivo*
- Injection d'**une copie saine du gène à l'origine de la maladie**, puis les réinjecter dans le sang du patient
- Hémophilie B sévère
- Beta Thalassémie
- Anémie de Fanconi
- Drépanocytose

traitement du cancer CAR-T cells

- stimuler le système immunitaire du patient contre sa propre tumeur, de manière à faciliter la reconnaissance des cellules cancéreuses et leur élimination.
- Leucémies lymphomes myélomes
- Stratégie indirecte en combinant thérapie cellulaire et thérapie génique
- Des lymphocytes T sont prélevés chez des patients, pour y introduire un gène codant pour une protéine impliquée dans la reconnaissance des cellules tumorales (récepteur chimérique CAR) et sont réinjectés dans l'organisme des patients.



Une seule injection



traitement du cancer

- Des produits commercialisés (AAP ou AMM conditionnelle)
- 320/350 000 euros par patient



2. Aspects technico-réglementaires
a) Autorisations réglementaires

	KITE GILEAD	NOVARTIS	KITE GILEAD	BMS (Juno/Celgene)
Référence	Neelapu et al., NEJM 2017	Schuster et al., NEJM 2018	Wang et al., NEJM, 2020	Munshi et al., NEJM 2021
Étude pivot	ZUMA	JULIET	ZUMA-2	KarMMa
Transduction	Retrovirus	Lentivirus	Retrovirus	Lentivirus
Domaines de signalisation et co-stimulation	CD3 ζ 4-1BB	CD3 ζ CD28	CD3 ζ CD28	CD3 ζ 4-1BB
Cible	Anti CD19	Anti CD19	Anti CD19	Anti BCMA
Pathologie	Adultes atteints de lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) en rechute ou réfractaire	Adultes atteints de lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) en rechute ou réfractaire Enfants et jeunes adultes jusqu'à 25 ans atteints de leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) à cellules B réfractaire, en rechute	Adultes atteints de lymphome à cellules du manteau réfractaire ou en rechute	Adultes atteints d'un myélome multiple en rechute et réfractaire ayant reçu au moins trois traitements antérieurs
Nom commercial	YESCARTA®	KYMRIAH®	TECARTUS®	ABECMA®
Autorisations réglementaires	AMM européenne août 2018	AMM européenne août 2018	AMM européenne conditionnelle décembre 2020	AMM

Les vecteurs viraux

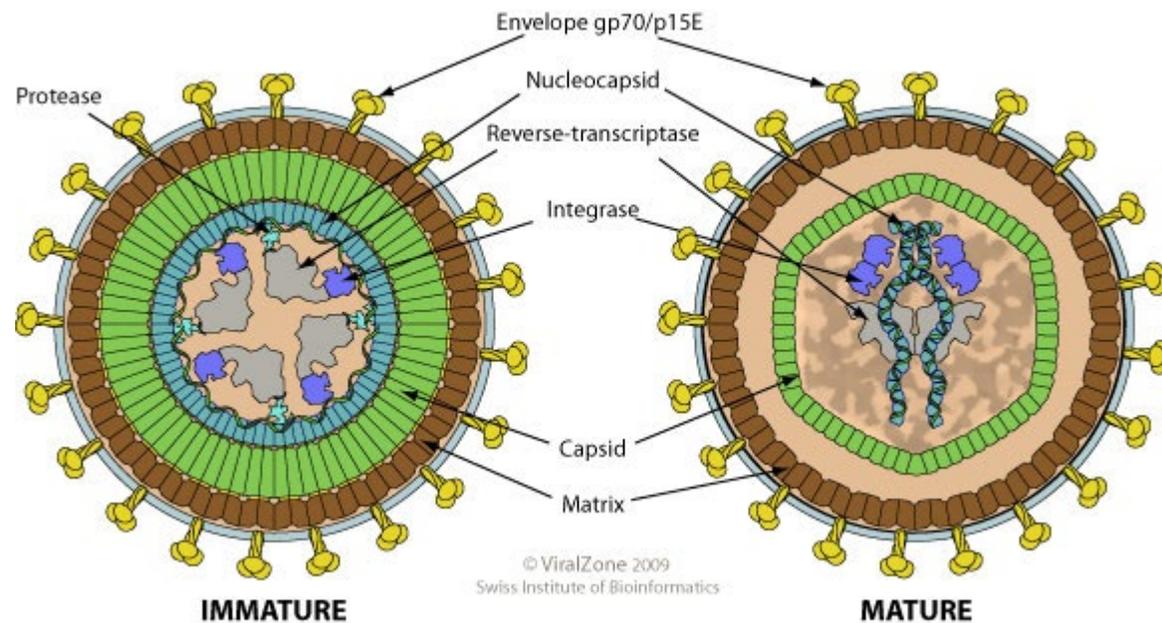
- virus modifiés (vecteurs viraux) dans 2/3 des essais
- Référence à ce jour
- vecteurs viraux non réplicatifs
- vecteurs viraux intégratifs
 - gène thérapeutique est transmis aux cellules filles en cas de divisions cellulaires
 - Idéal si on veut un effet permanent
- vecteurs viraux non intégratifs
- ingénierie importante pour annuler leur potentiel toxique
- Immunogénicité doit être limitée

Les vecteurs viraux

- Rétrovirus
- VIH et autres lentivirus
- Adénovirus
- Virus adéno-associés ou AAV

Rétrovirus

- Famille des *Retroviridae*
- Genre Gammaretrovirus et Lentivirus
- Virus enveloppé à ARN+
- Génome 7-11 kb
- intégratifs

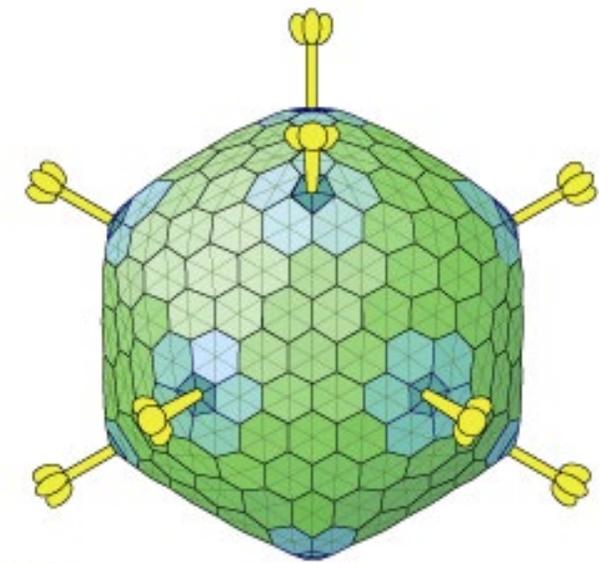
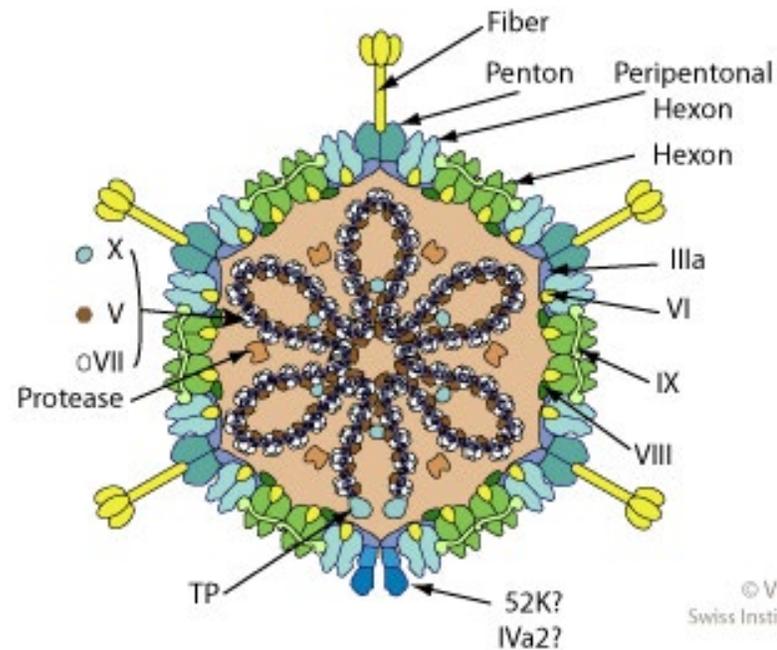


Rétrovirus

- Beaucoup utilisés dans les années 2000
- impliqués dans la survenue de leucémies
- Objectifs : réduire le risque d'insertion aléatoire dans le génome de l'hôte
- fonction d'"auto-inactivation"
 - Pour empêcher le virus de déclencher l'expression inopportune d'un gène proche du site où il s'est inséré.
- Utilisés pour les CAR-T cells

Adénovirus

- Famille des *Adenoviridae*
- Virus nu à ADNdb
- génome 35kb
- Non intégratif
- ubiquitaire



© ViralZone 2012
Swiss Institute of Bioinformatics

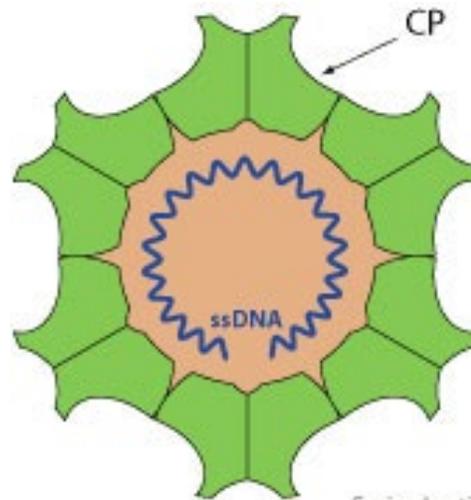
T=25

Adénovirus

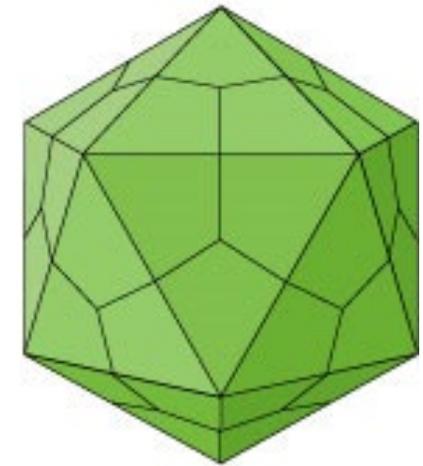
- Non intégratifs
- Le transgène s'exprime pendant la durée de vie de la cellule et disparaît avec la mort de celle-ci
- **vecteurs de choix en immunothérapie contre le cancer**
- peuvent transporter de plus grandes séquences d'ADN
- pénètre bien dans les cellules qui ne sont pas en division
- est associé à un niveau élevé d'expression du gène vectorisé
- Efficacité transitoire

Les AAV

- Virus satellite infectieux seulement si co-infection avec Adénovirus ou Herpesvirus
- Famille des *Parvoviridae*
- Virus nu à ADNsb
- Génome 5kb



© 2010
Swiss Institute of Bioinformatics



T=1

Les AAV

- Permettent le transfert de petites séquences génétiques
- Intégratifs ou pas
- peu inflammatoires, bien tolérés
- Déclenche une réaction immunitaire donc limite à une seule injection
- Un des plus utilisés
- traitement de l'amaurose de Leber, de la myopathie de Duchenne
- Glybera

Tableau II. Caractéristiques des principaux vecteurs viraux utilisés.
Traduit et adapté de Massaro et al. [113].

Vecteur	Taille (nm)	Génome	Emport (kilo bases)	Phase cellulaire pour transfection	Intégration génomique
Lentivirus	100	ARN	14	Mitose et post-mitose	Oui
Adénovirus	70–100	ADNdb	8–12 voire 36 [39]		Non
AAV	25–20	ADNsb	4,7		Non



Faites le point

Les thérapies géniques en neurologie Gene therapies in neurology

J.-B. Brunet de Courssou ^a , K. Deiva ^b

Caractéristiques recherchées pour un vecteur viral

Ciblage et expression

- Tropisme cellulaire adaptable (choix des enveloppes virales)
- Régulation de la transcription possible (choix des promoteurs)
- Stabilité d'expression (intégration ou épisome)
- Matériel génétique inséré de grande taille (de 3 à 100kb)

Sécurité

- Recombinaison faible voire absente
- Toxicité faible (immunogénicité faible, intégration dirigée)
- Réponse immunitaire faible (expression minimale de gènes viraux)

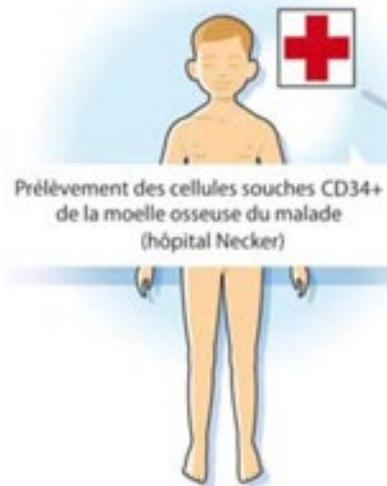
Production

- Packaging cell lines aisément cultivables
- Production de virus à hauts titres infectieux

Des “réussites historiques” ...

- En 1999
- Equipes françaises et anglaises
- Traitement par thérapie génique des "bébés bulles"
- Déficit immunitaire combiné sévère T et B par déficit en chaîne gamma
- Lié à l’X ne touche que les garçons
- 19 patients inclus
- effets thérapeutiques du traitement persistent encore
- Mais plusieurs cas de leucémies (5 sur 20)
- **Au bout de 10 ans, sur les 9 enfants traités en France, 8 étaient vivants, à domicile, et suivaient une scolarité normale.**

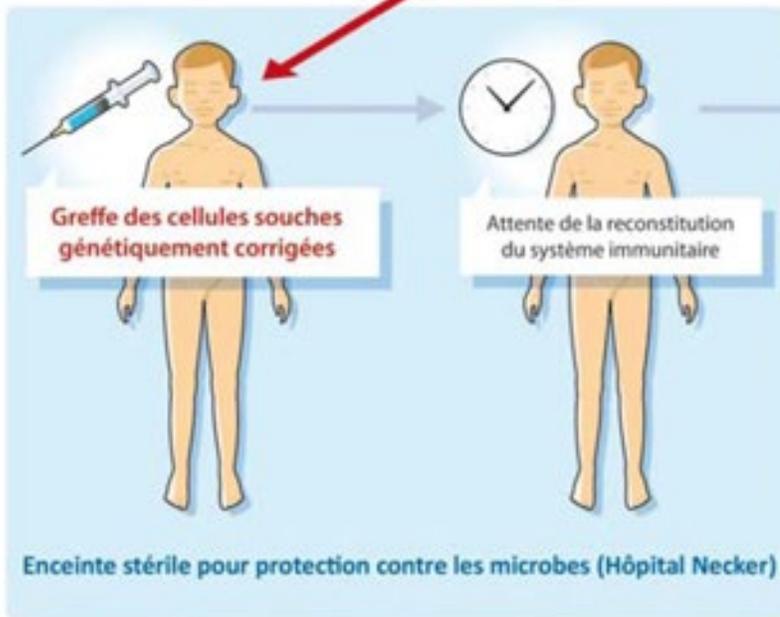




Mise en contact des cellules avec le vecteur
(laboratoire de biothérapie de l'hôpital Necker)



Obtention du "médicament",
c'est-à-dire les cellules du malade
renfermant le gène *PICS-X* normal



Visites régulières à l'hôpital pour évaluer :
- la sécurité et l'efficacité du traitement
- l'amélioration des fonctions immunitaires



Des risques...

- 8 des 9 « enfants bulles » sont vivants
 - Mais survenue de leucémies chez plusieurs enfants traités.
 - Le vecteur rétroviral a déclenché l'expression de gènes tumoraux dans leur organisme.
- Essai aux Etats-Unis
 - maladie hépatique rare (carence en ornithine transcarbamylase).
 - Thérapie à base d'un ADV5 délété des gènes viraux E1 et E4 et avec le gène de l'OTC injecté dans l'artère hépatique
 - 18 patients mais mort d'un patient
 - Décès attribué au vecteur utilisé, un adénovirus qui s'est retrouvé dans différents organes avec une activité incontrôlée.

Déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X

- Nouvel essai clinique en 2010
- 9 enfants traités et 7 allaient bien en 2014
- Moloney murine leukemia virus–based γ -retrovirus vector
- Système d'auto-inactivation (SIN)

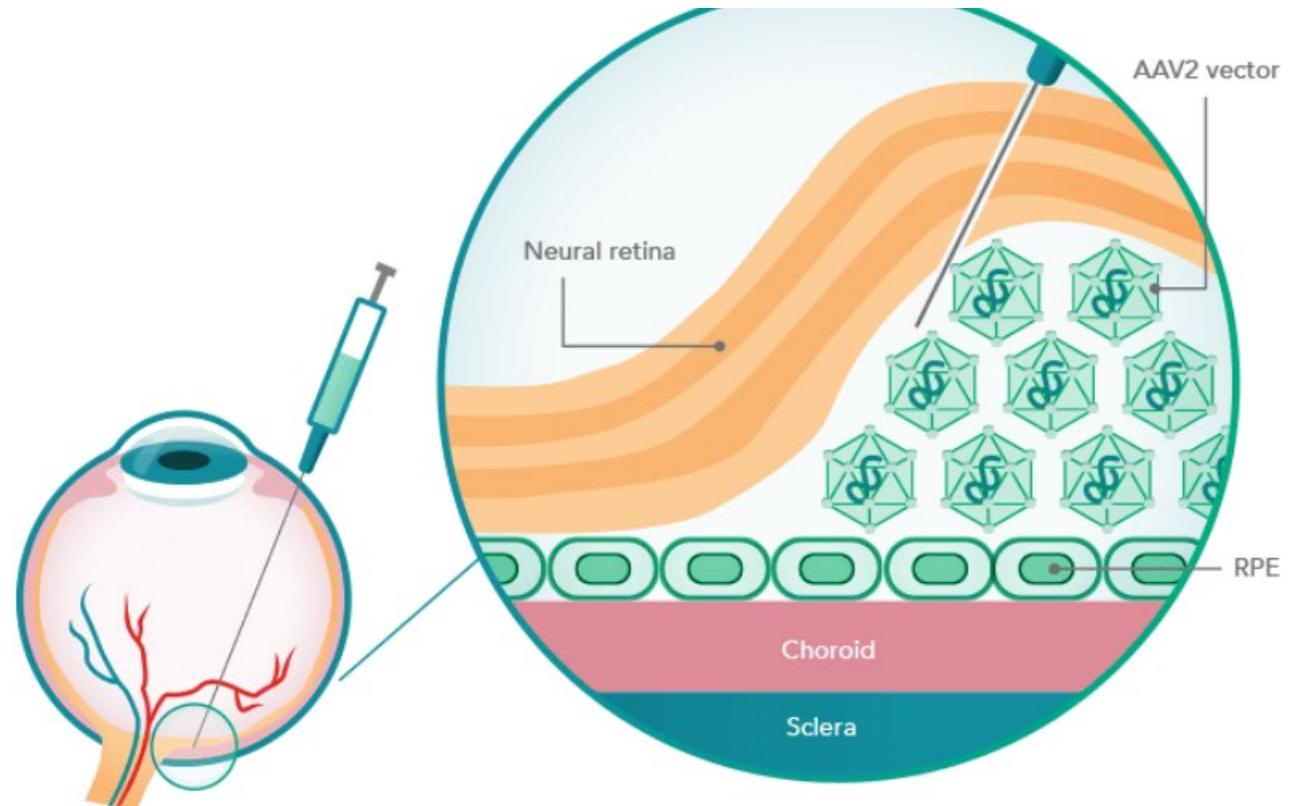
Amaurose congénitale de Leber

(LCA : *Leber Congenital Amaurosis*)

- Dégénérescence pigmentaire au niveau de la rétine pouvant conduire à la cécité
- Maladie **génétique** → dystrophie sévère de la rétine
- Transmission **autosomique récessive**
- **Incidence**: 2 à 4 enfants sur 100 000 naissances
- Différentes mutations génétiques à l'origine de la maladie (18 mutations décrites en 2013: GUCY2D, RPE65...)
→ Protéines essentielles au bon fonctionnement des cellules réceptrices de la vision
- Mutations affectant le gène RPE65

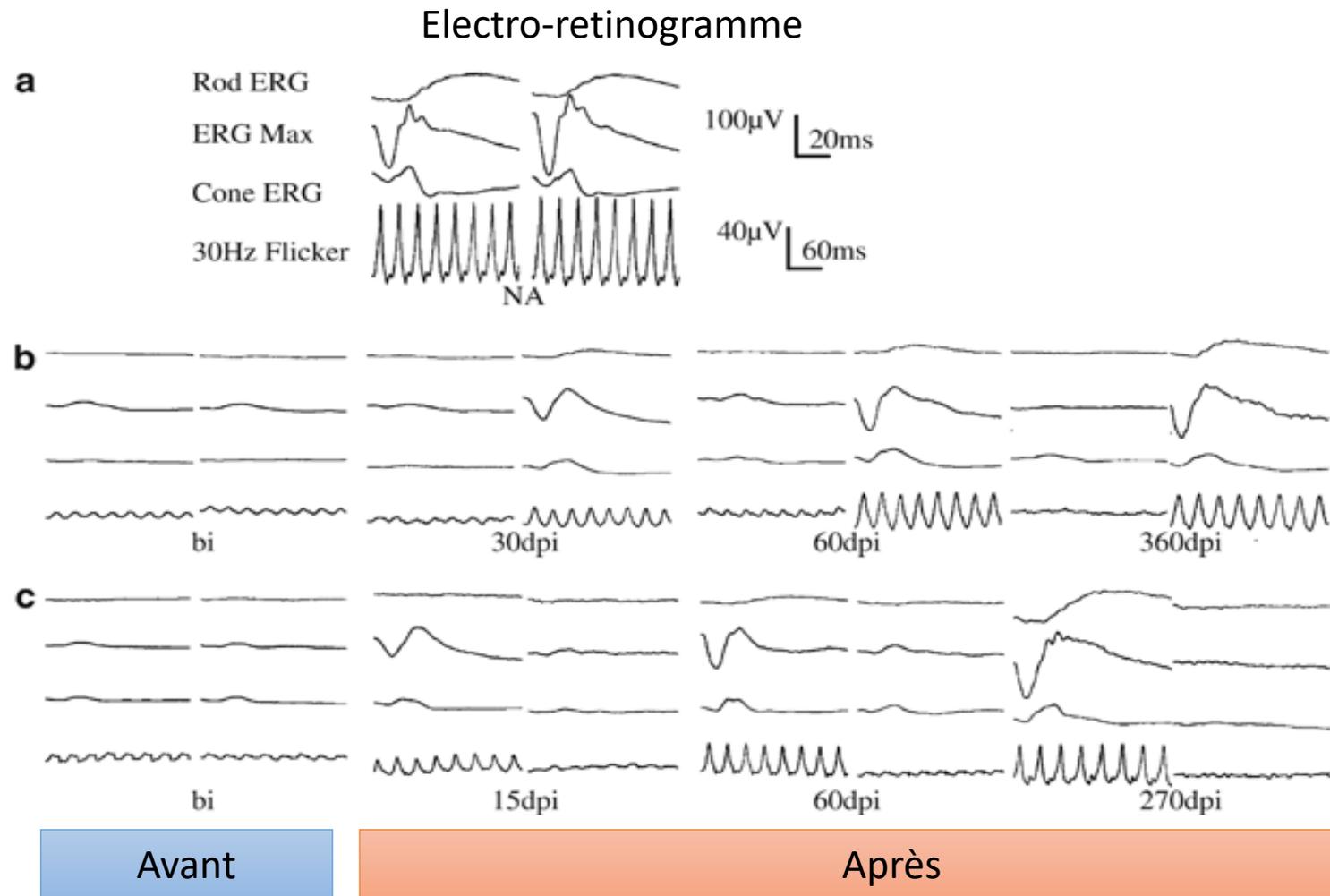
Amaurose de Leber

- vecteur de type AAV
- Injection directement dans la rétine
- stoppe l'évolution de la maladie et préserve la vision qui restait aux patients
- Premiers essais en 2007
- Un essai à Nantes chez l'homme
- Luxturna®
- Approuvé aux Etats-Unis fin 2017
- Là encore des effets secondaires importants sont rapportés



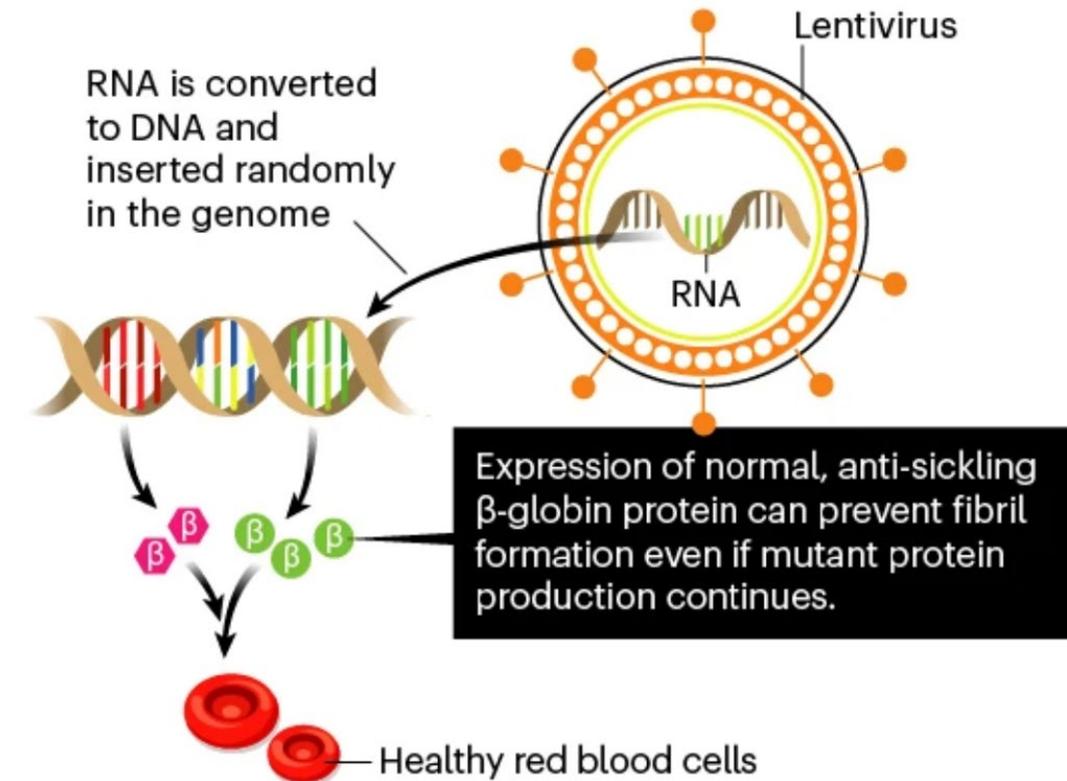
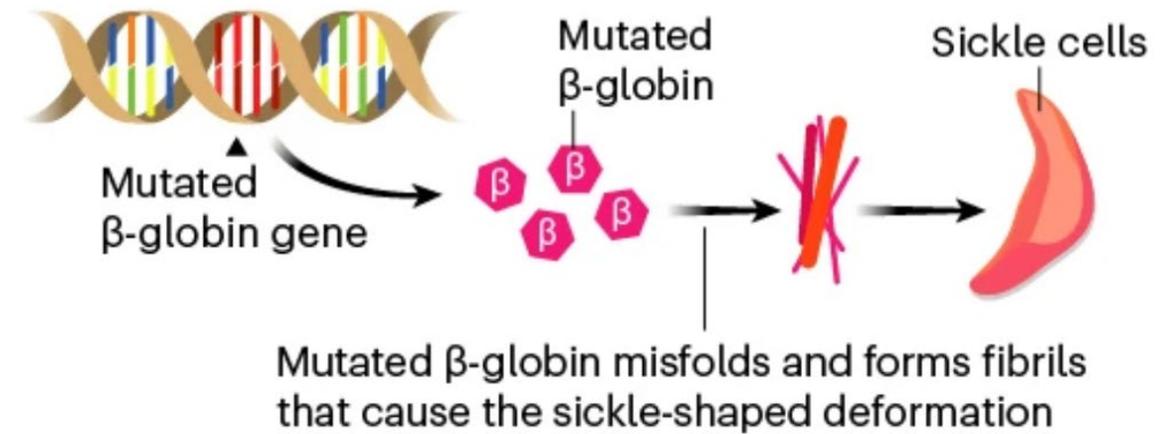
Amaurose de Leber

Des résultats probants chez des chiens Briard mutation spontanée RPE65-/-



Drepanocytose

- forme grave d'anémie chronique d'origine génétique due à une mutation dans le gène codant pour la β -globine
- Essai clinique de phase I/II (France /US)
- Patient de 13 ans atteint d'une forme sévère
- Prélève des cellules souches hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse du patient, on les modifie génétiquement à l'aide d'un **vecteur lentiviral** contenant le gène thérapeutique
- réinjecter chez le malade par voie veineuse.
- rémission complète après un suivi de 15 mois
- Autres études ont confirmé mais toujours sur un petit nombre de patients

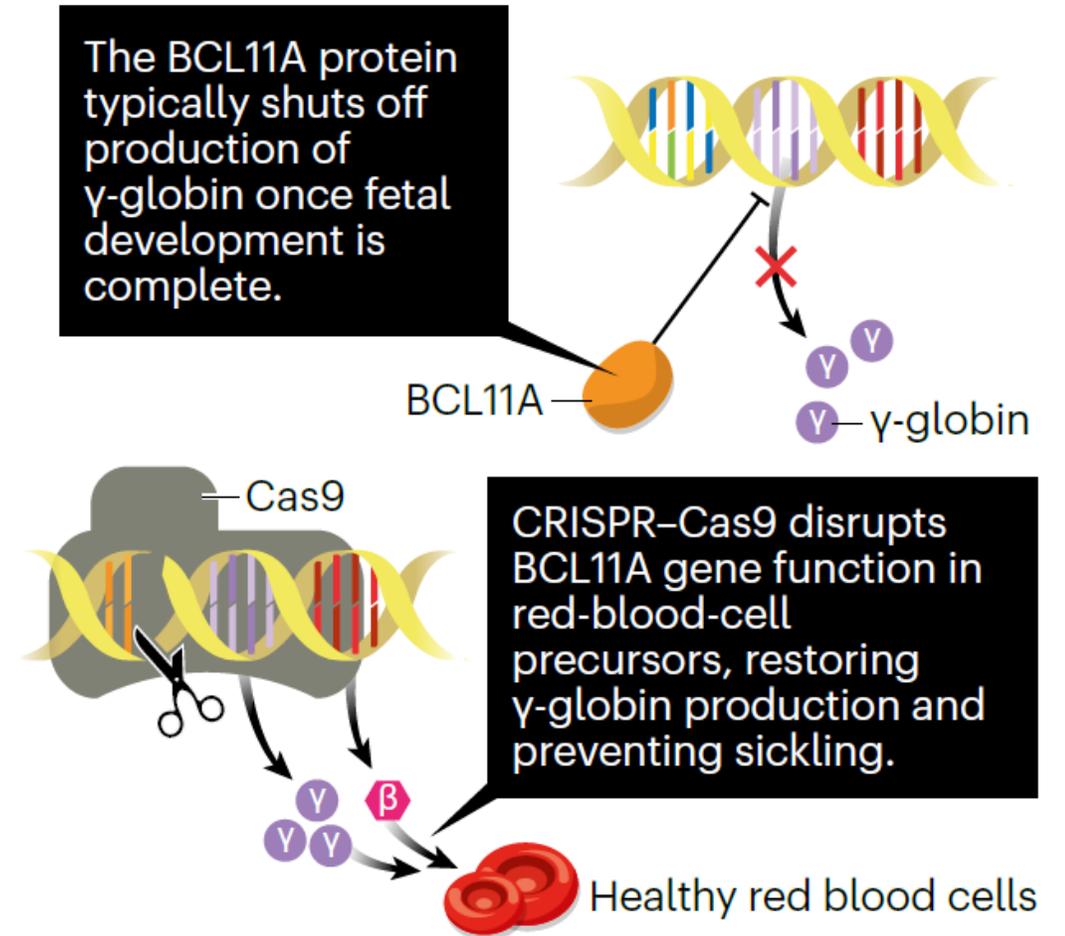


Drepanocytose

- Problème % de CSH modifiées parfois trop faible pour avoir un effet
- Autre approche : Une protéine appelée BCL11A inhibe directement la production postnatale d'hémoglobine foétale.
- Intervention génique pour bloquer le gène BCL11A (CRISPR Cas9)
- la réactivation de la protéine foétale fait baisser la production de β -globine adulte
- Trois patients ont été traités avec succès

Bypassing β -globin

In CRISPR-Cas9 genome editing, the Cas9 enzyme is directed to inactivate an inhibitor of γ -globin — a β -globin alternative that is normally expressed only during fetal development.

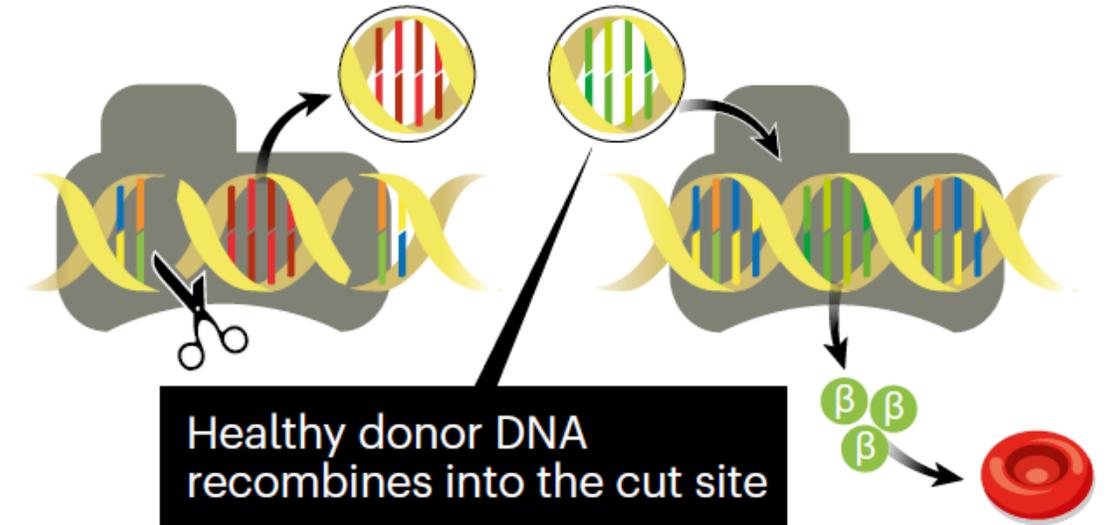


Drepanocytose

- Autres approche CRISPR Cas9
- répare le gène β -globine défectueux, en exploitant le mécanisme « réparation dirigée par homologie ».
- l'ARN guide et Cas9 sont introduits à côté d'un brin d'ADN donneur. Une fois l'ADN génomique coupé, l'ADN donneur est inséré dans le gène de la β -globine, remplaçant la mutation par une séquence saine.

As good as new

CRISPR-Cas9 can also be used to swap the mutated β -globin gene segment for a normal sequence from a donor DNA strand — fully repairing the sickle-cell mutation.



Hémophilie B sévère

- Maladie héréditaire due à l'absence d'un facteur de coagulation (facteur IX, Hémophilie B 1/25 000)
- Maladie monogénique
- Essai lancé en 2010
- Vecteur AAV8 contenant gène F IX, capable de restaurer la coagulation sanguine + tropisme hépatique
- 6 patients
- 4 ont interrompu leur traitement prophylactique contre les hémorragies spontanées
- Aug ALAT ASAT => corticothérapie

Amyotrophie spinale de type 1

- Maladie génétique liée au gène *SMN1*
- Faiblesse musculaire dès l'enfance, voire dès la naissance maladie neuromusculaire souvent mortelle
- Pop cible en France max 300 patients

- Zolgensma
Issu des recherches du Généthon... Brevet Français racheté par Novartis
accès précoce aux innovations thérapeutiques
approuvé dans 51 pays et utilisé pour traiter environ 3700 malades, mais seuls 35 pays le remboursent

- vecteur viral AAV9-SMN, capable d'administrer dans le système nerveux central le gène fonctionnel requis pour traiter cette maladie.

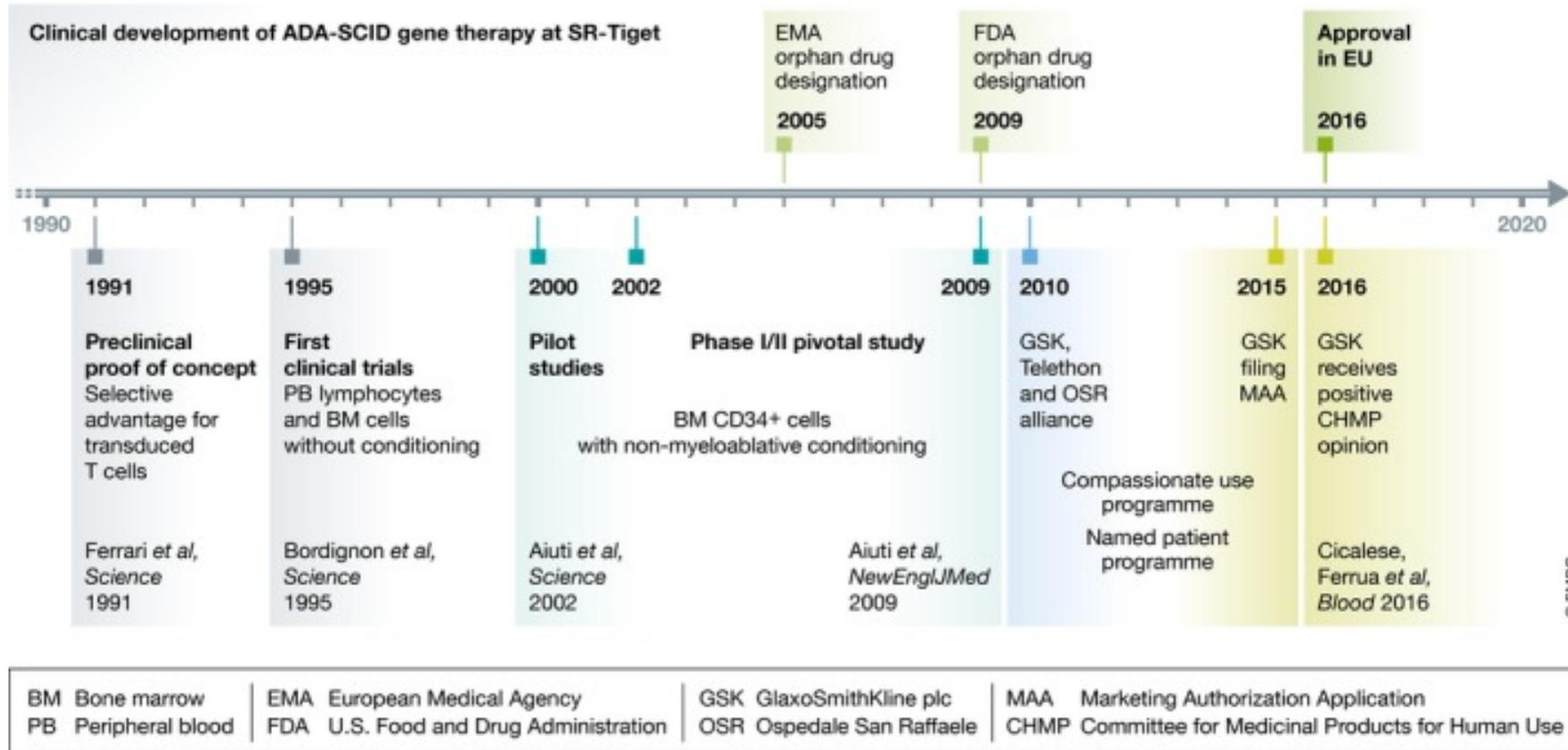
- SPINRAZA (Nusinersen), oligonucléotide antisens
- AMM en France en 2017
- Injection intrathécale pas de vecteur viral...

Glybera approuvé sur le marché européen

- Glybera

- Commercialisé en 2012 mais retiré du marché faute de demande
- Injectable par voie IM (multiples injections)
- Traitement d'une maladie rare : le déficit familial en lipoprotéine lipase (crises de pancréatite)
- AAV-1
- Associé à un traitement immunosuppresseur pour atténuer la réaction du système immunitaire

Un autre autorisé en 2016 le Strimvelis



Commercialisé par GSK en Italie

Ex vivo greffe de cellules souches modifiées par un vecteur rétroviral

Dans le déficit congénital en adénosine désaminase ADA - SCID

Sinon ERT (Enzyme replacement therapy) avec Bovine ADA