

# Nouvelles approches thérapeutiques: quelle place pour le « gene-editing » dans la mucoviscidose?



Centre de Ressources et de Compétences  
de la Mucoviscidose  
Hôpital Necker-Enfants Malades

Michaela Semeraro MD-PhD  
Center d'Investigation Clinique  
Unité de Recherche Clinique  
Hôpital Necker Enfants malades  
Paris-France

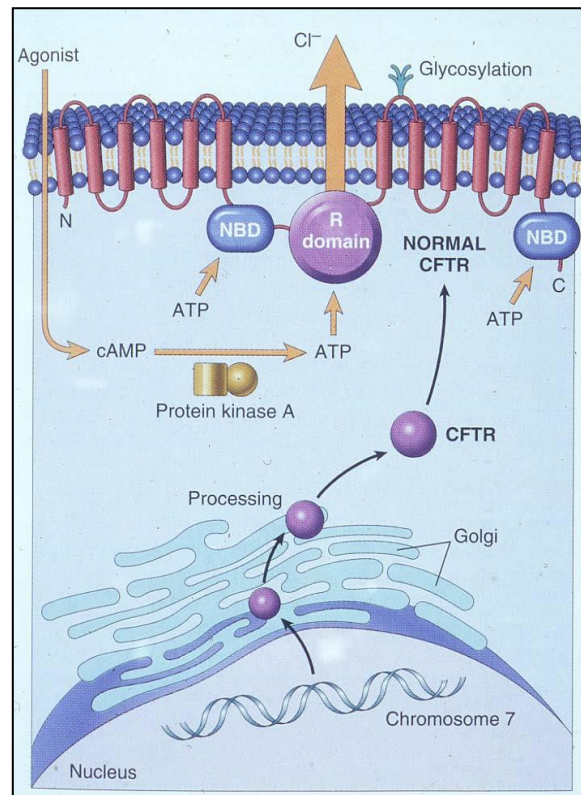
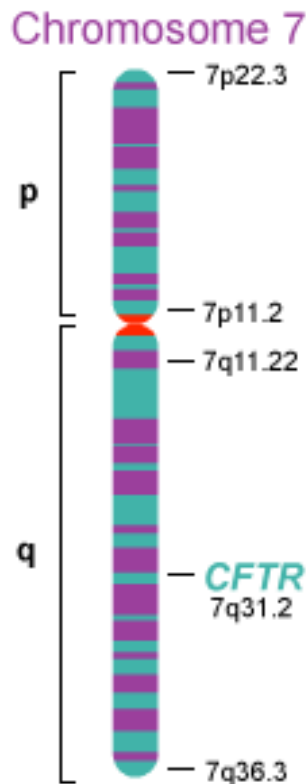


**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

# Génétique

La mucoviscidose est causée par des mutations au niveau du gène CFTR (locus: 7q31.2) qui code une protéine exprimée dans la membrane apicale des cellules épithéliales exocrines.



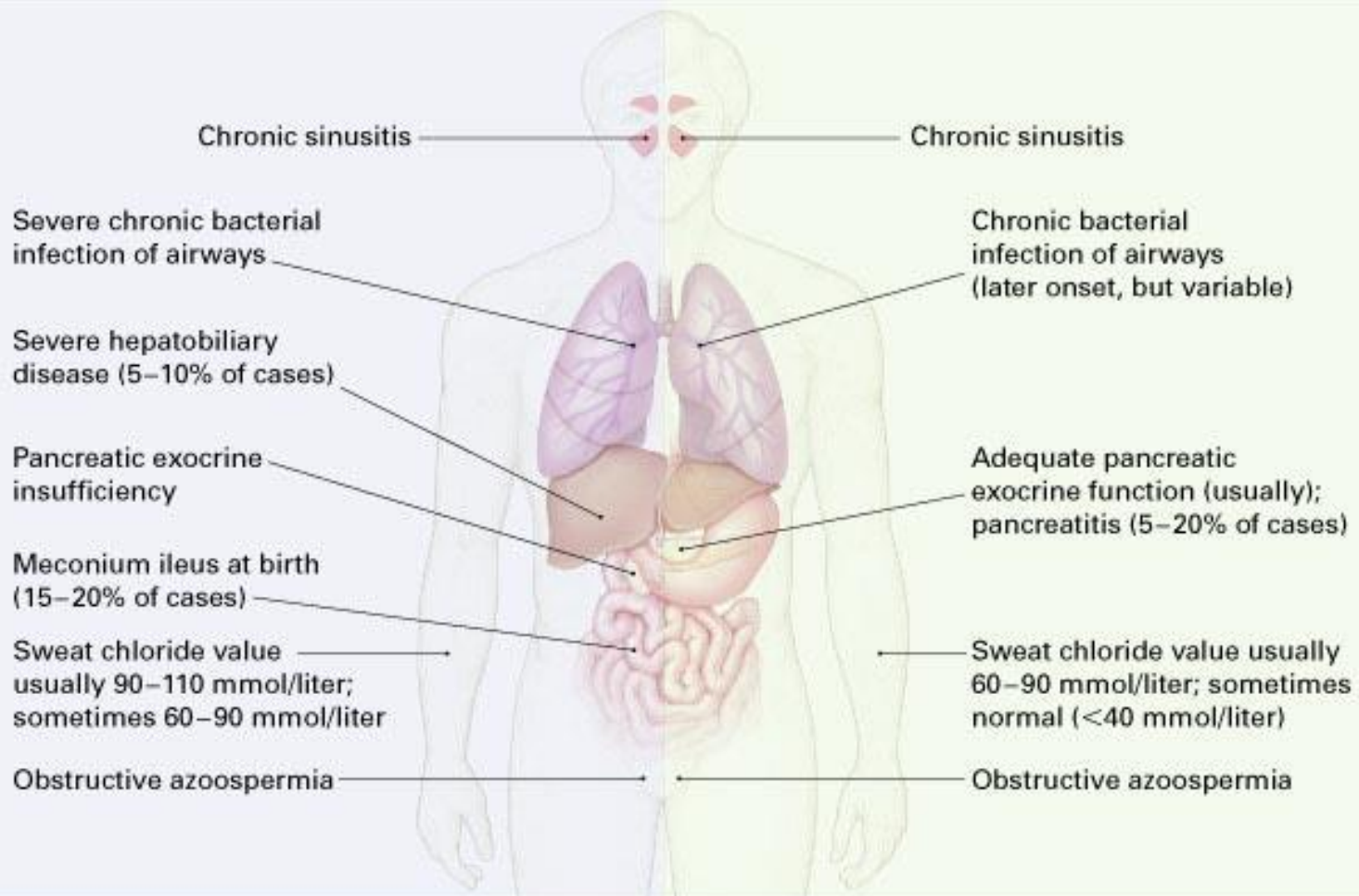
**La protéine CFTR contrôle le mouvement des ions chlorures à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule.**

# Caractéristiques clinique

## Classic and Nonclassic Cystic Fibrosis

Classic cystic fibrosis  
(no functional CFTR protein)

Nonclassic cystic fibrosis  
(some functional CFTR protein,  
providing survival advantage)

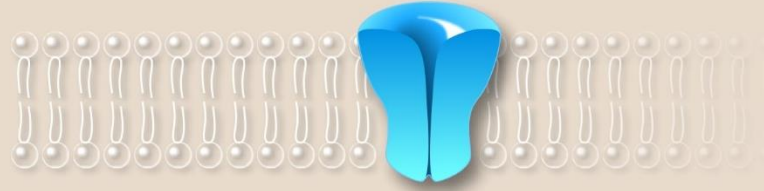


# Genotype et Phenotype: les variations cliniques

Normal	I	II	III	IV	V	VI
<p>Mature functional CFTR</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Absent functional CFTR</p> <p>Absent nascent CFTR</p> <p>Unstable truncated RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Absent functional CFTR</p> <p>Protease destruction of misfolded CFTR</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Defective channel regulation</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Defective CFTR channel</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Scarce functional CFTR</p> <p>Scarce nascent CFTR</p> <p>Correct RNA Incorrect RNA</p> <p>CFTR DNA</p>	<p>Decreased CFTR membrane stability</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>CFTR DNA</p>
CFTR defect	No functional CFTR protein	CFTR trafficking defect	Defective channel regulation	Decreased channel conductance	Reduced synthesis of CFTR	Decreased CFTR stability
Type of mutations	Nonsense; frameshift; canonical splice	Missense; aminoacid deletion	Missense; aminoacid change	Missense; aminoacid change	Splicing defect; missense	Missense; aminoacid change
Specific mutation examples <sup>11</sup>	Gly542X Trp1282X Arg553X 621+1G→T	Phe508del Asn1303Lys Ile507del Arg560Thr	Gly551Asp Gly178Arg Gly551Ser Ser549Asn	Arg117His Arg347Pro Arg117Cys Arg334Trp	3849+10kbc→T 2789+5G→A 3120+1G→A 5T	4326delTC Gln1412X 4279insA

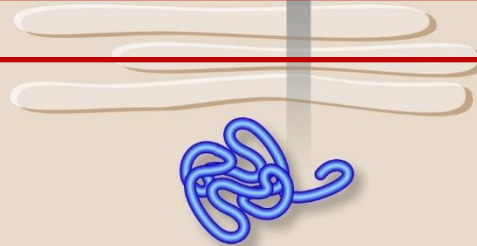
# Mutations de CFTR et stratégies thérapeutiques

Défaut fonctionnel



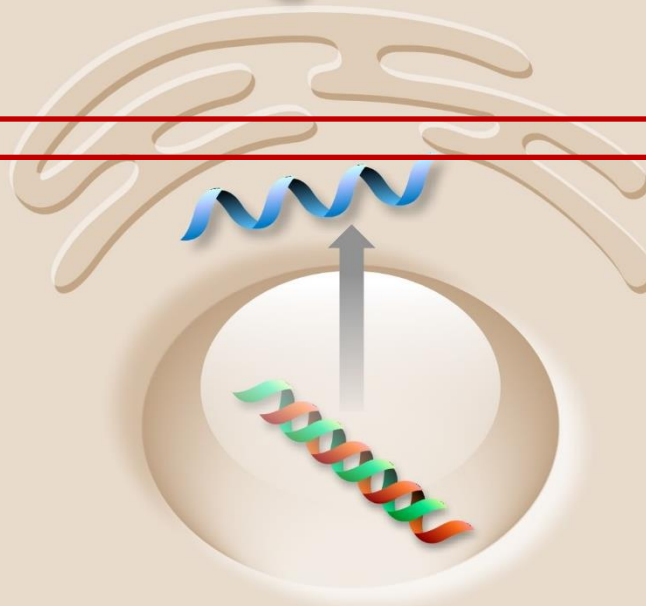
Potentiation

Défaut de « routage »



Correction

Défaut de synthèse



Translecture

Edition d'ARN

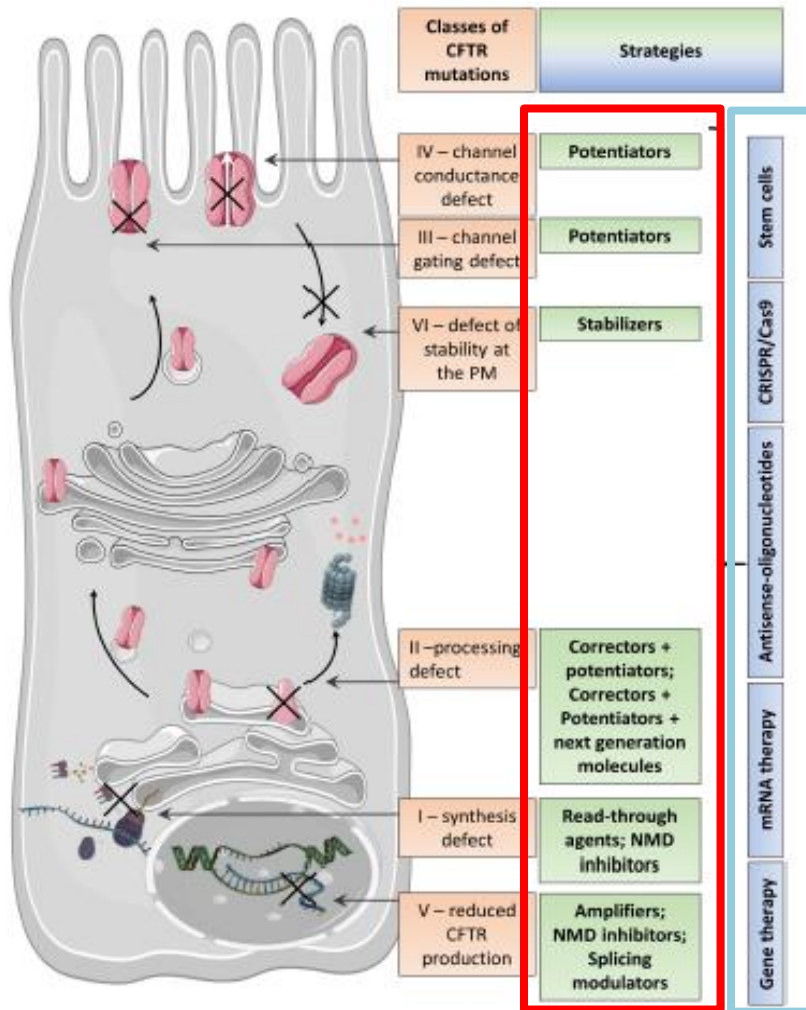
Edition de Gène



# Les options thérapeutiques actuelles

- **Modulateurs de CFTR:** traitement modulateurs (correcteurs, potentiateurs) qui visent à restaurer la fonctionnalité de la protéine CFTR
- **Edition d'ARN:** corriger l'ARNm CFTR codant la protéine par l'utilisation d'oligonucléotides (inhalation)
- **Agents de translecture:** molécules permettant de poursuivre la traduction au delà du codon-stop pour obtenir une protéine fonctionnelle (ELX-02)

# Les options thérapeutiques actuelles: le contraintes



- Effets secondaires (10% avec ORKAMBI)
- Sujets non répondeurs
- Dégradation clinique ralentie mais pas arrêtée

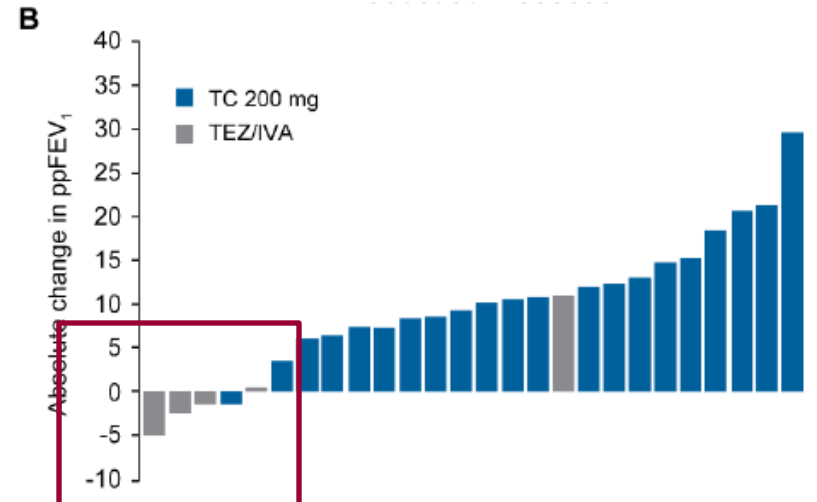
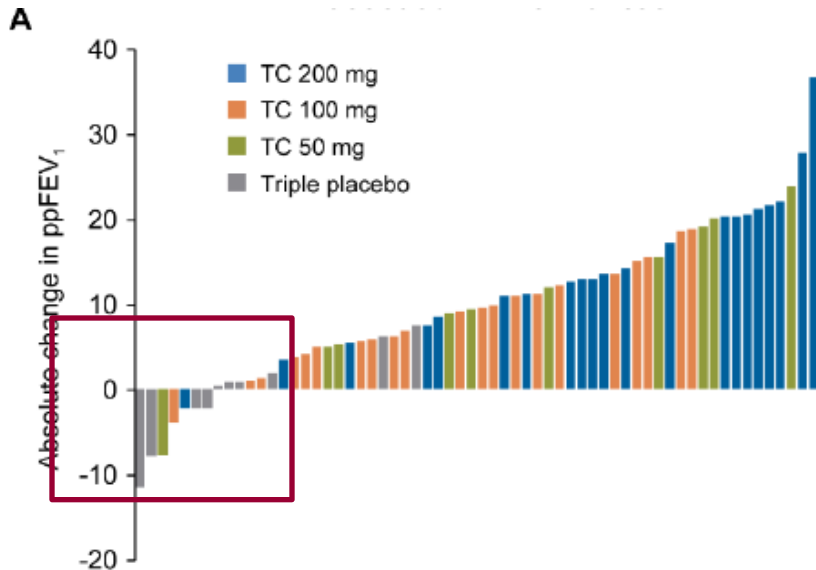
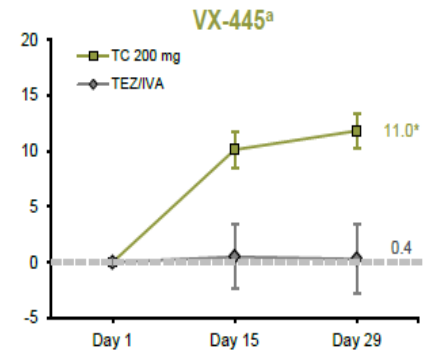
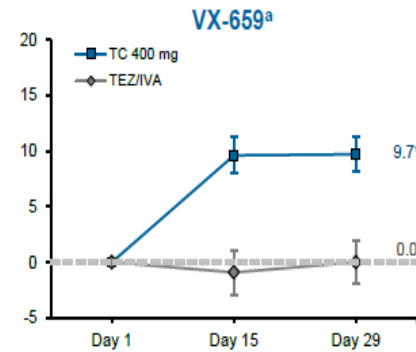
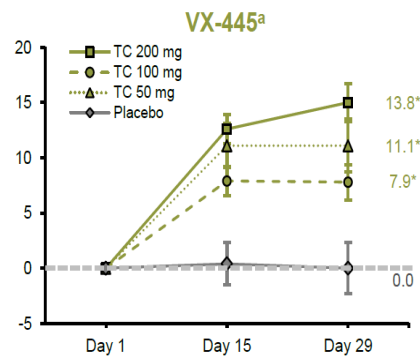
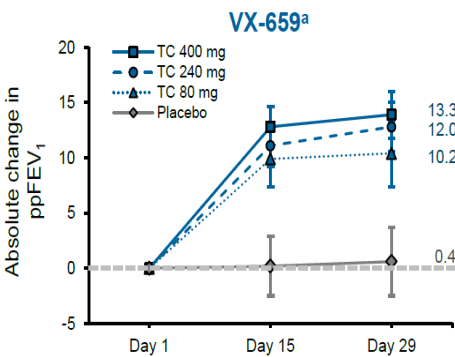


Modifier le génome?

# Essais avec les triples combinaisons: une efficacité accrue mais qui plafonne à 15% d'augmentation du VEMS et encore des non répondeurs

F508del/Minimal Function

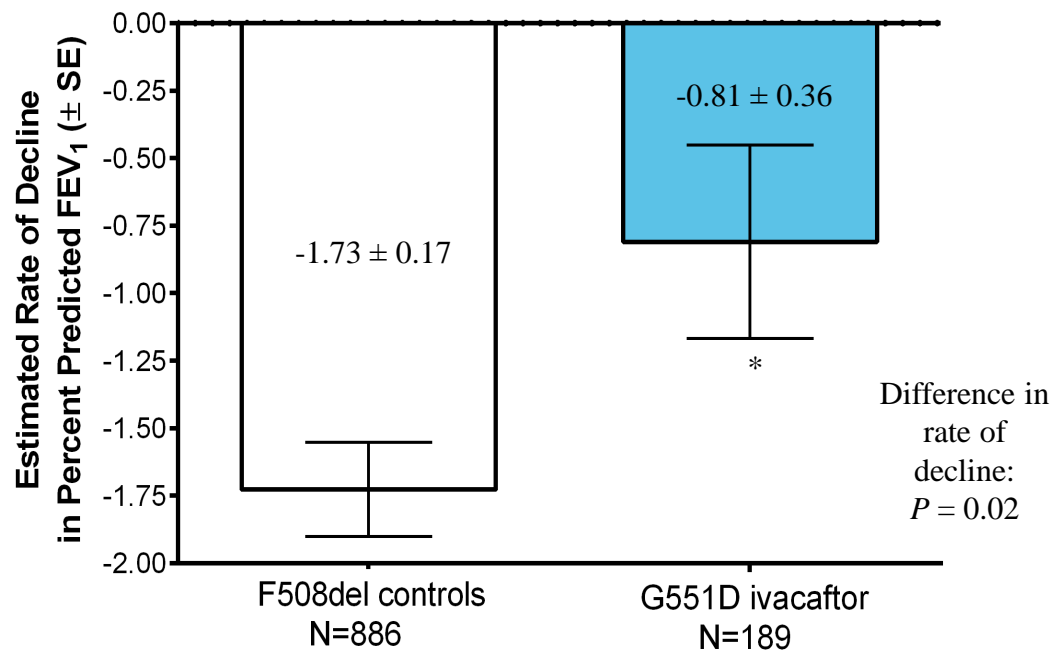
F508del/F508del





# Ralentissement de la dégradation respiratoire sans la stopper

Déclin annuel du VEMS des patients sous kalydeko

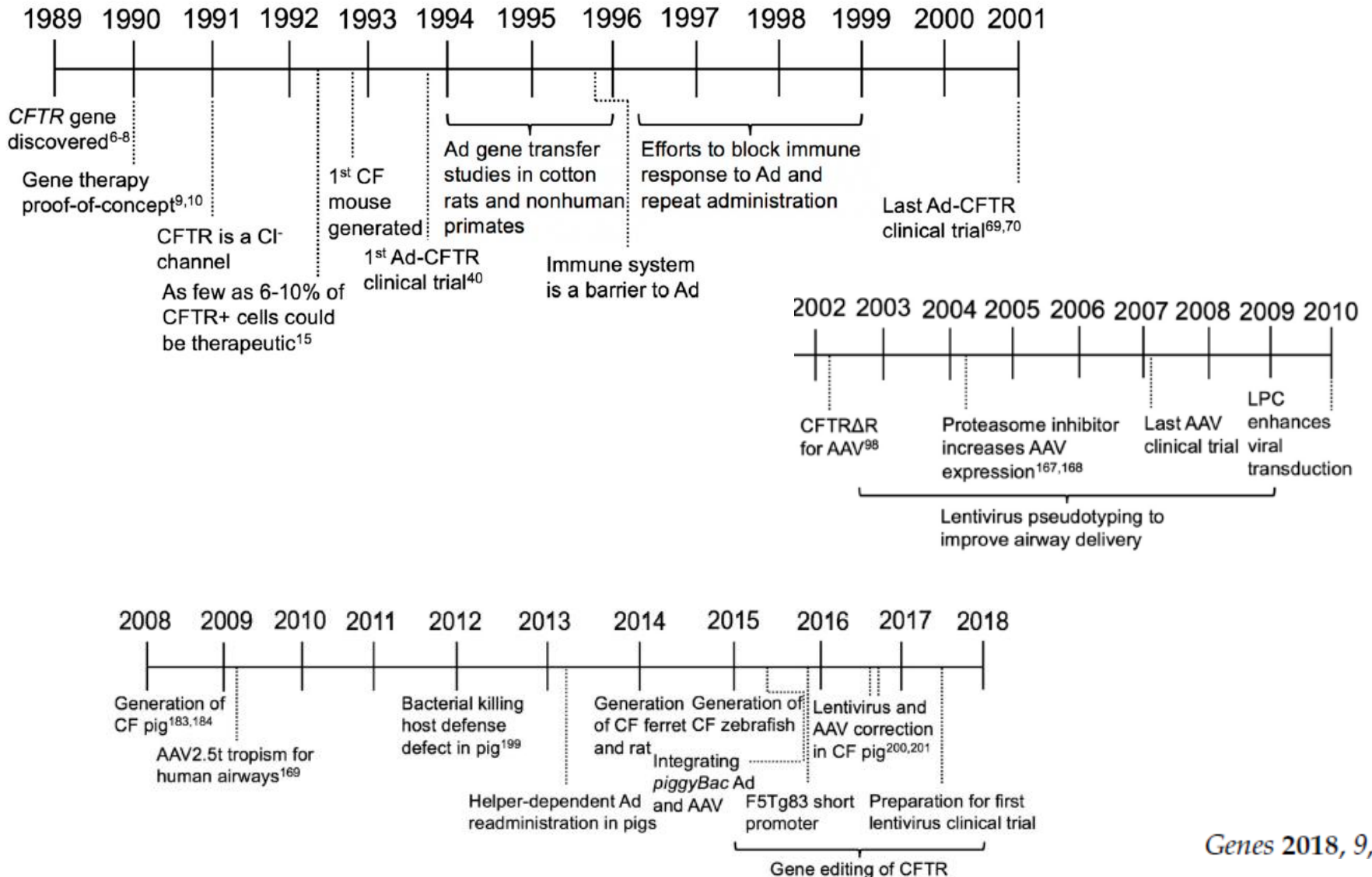


*Sawicki et al. AJRCCM 2015*  
*Kiwan et al. Annals ATS 2018*

# Intérêt de la thérapie génique dans la CF?

- La mucoviscidose est considérée comme un candidat de choix pour le développement de la thérapie génique, car il s'agit d'un **défaut monogénique**.
- La réparation par thérapie génique a été démontrée très tôt par une restauration de la fonction de la protéine CFTR *in vitro* (ref Egan M, et al. Nature. 1992)
- La thérapie génique dans la MV consiste à administrer des acides nucléiques d'ADN codant pour la protéine CFTR ou à réparer le gène CFTR (genome editing).

# Les étapes de la thérapie génique dans la CF

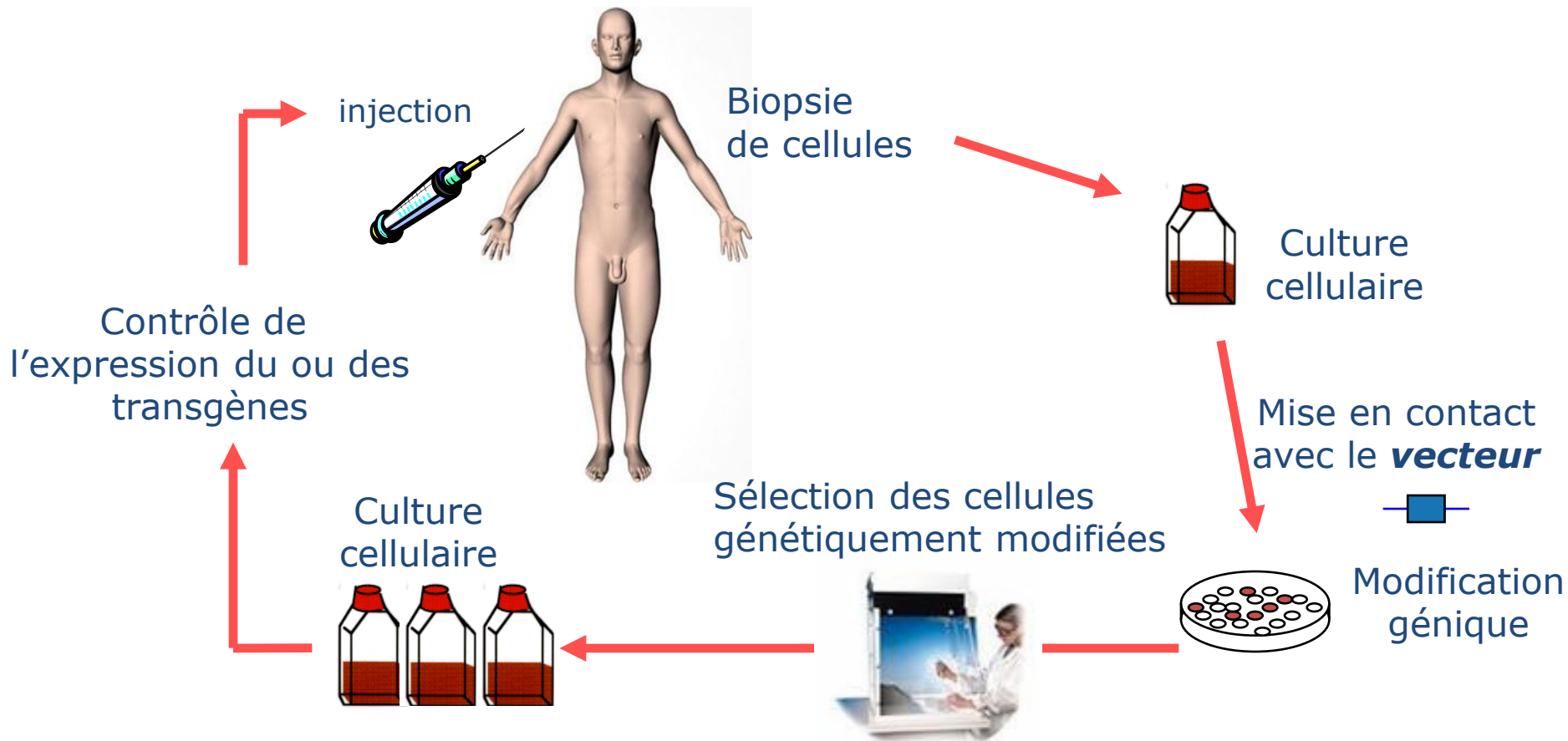


# La thérapie génique dans la CF

- 27 essais cliniques portant sur environ 600 patients
- LIMITE: le transfert de gènes dans les poumons est difficile en raison des barrières extracellulaires (mucus, clairance mucociliaire, réponses immunitaires) et des barrières intracellulaires (membrane nucléaire).
- Le plus grand obstacle à la TG est l'efficacité de la livraison du gène

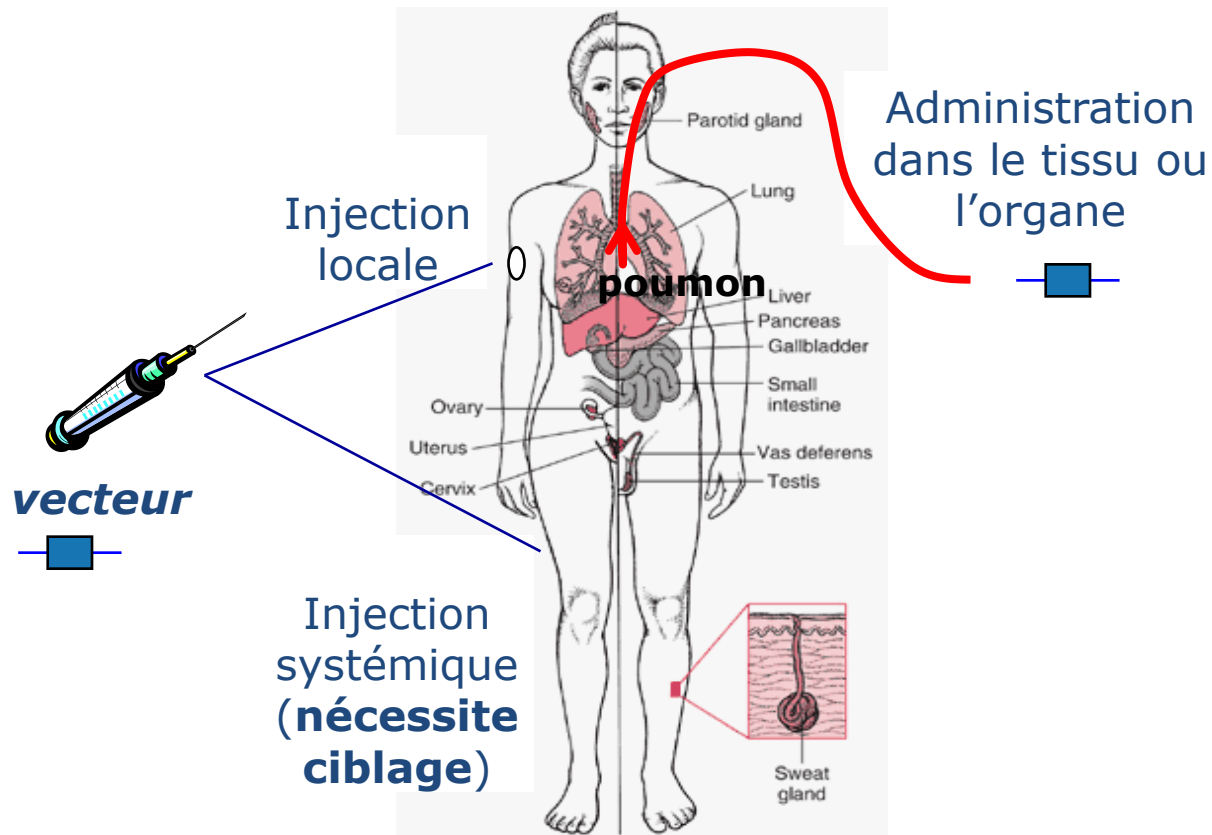
# Principes de thérapie génique

- La **thérapie génique** peut être réalisée **ex vivo**.
  - ✓ Les cellules à modifier sont transformées en dehors de l'organisme puis réintroduite (*foie, cellules sanguines*).



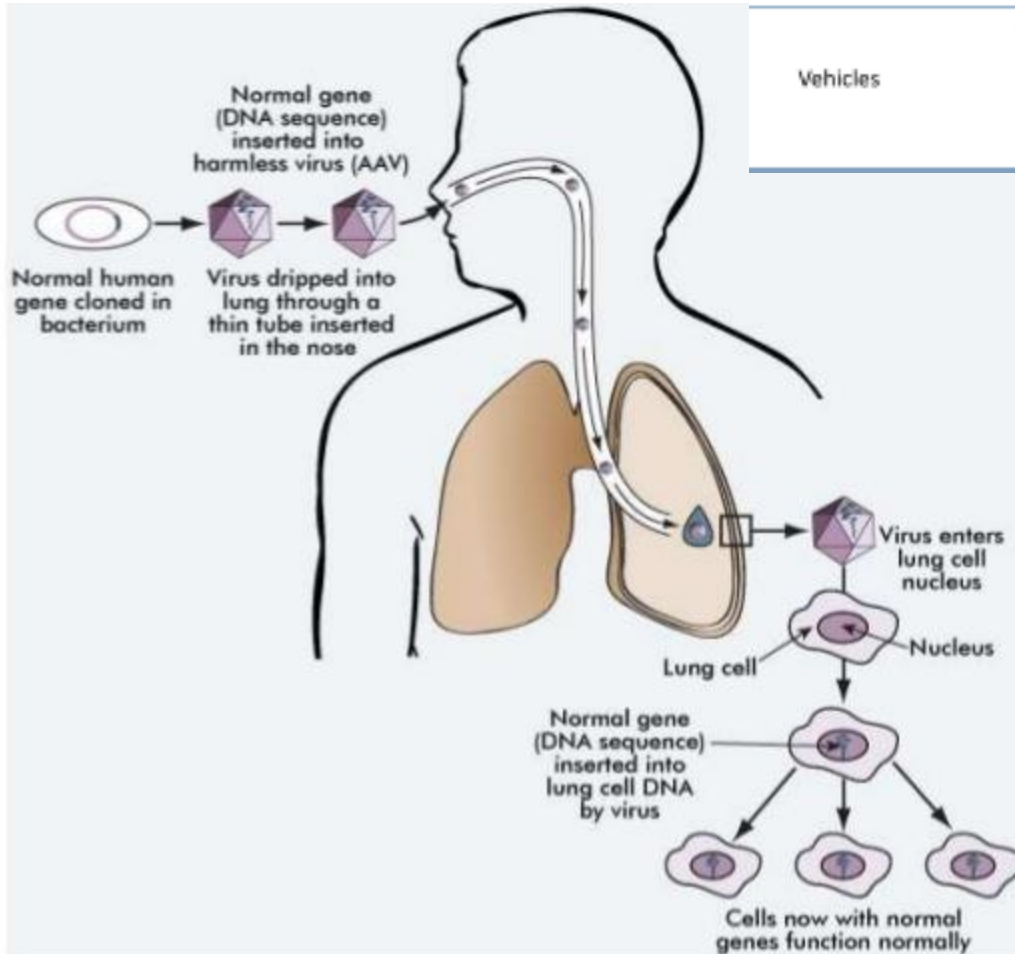
# Principes de thérapie génique

- La **thérapie génique** peut être réalisée ***in vivo***.
  - ✓ Le vecteur contenant le gène d'intérêt est injecté directement dans l'organisme en ciblant le tissu à traiter.





# Les vecteurs



Vehicles

Viral vectors



Liposomes



Peptides



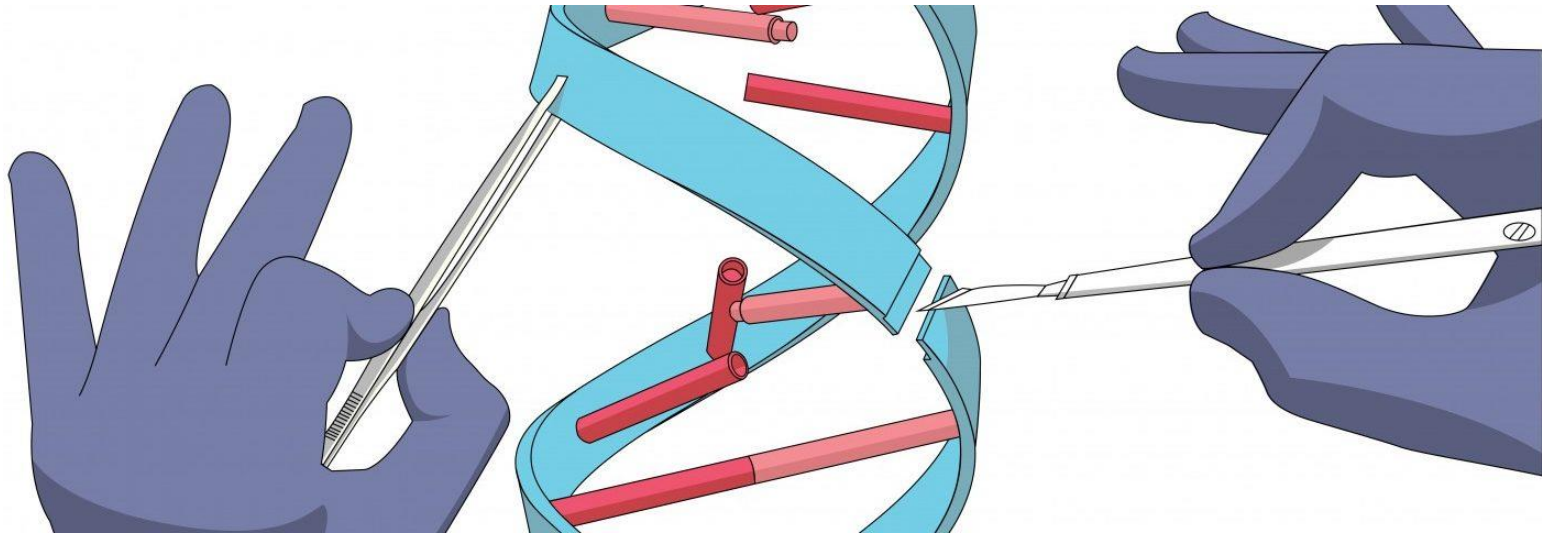
**clairance mucociliaire**

**renouvellement de  
l'épithélium respiratoire**

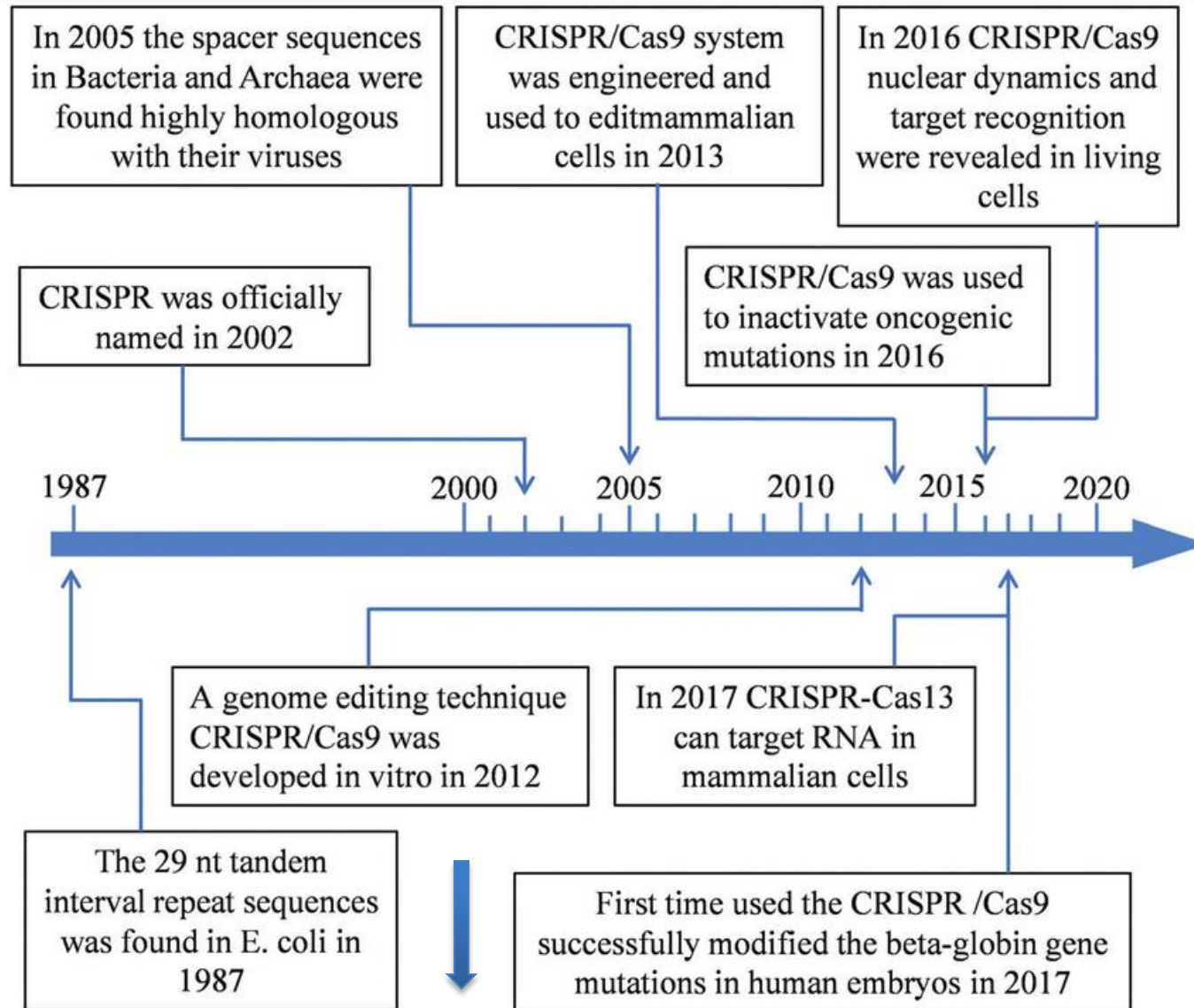
# Gene editing

## Crispr-Cas9, des « ciseaux moléculaires »

Le *gene editing* consiste à réparer le gène défectueux au niveau de l'ADN en utilisant de vrais ciseaux moléculaires pour couper l'hélice de l'ADN au point souhaité et remplacer l'ADN défectueux par une copie saine.



# Etapes du Gene editing

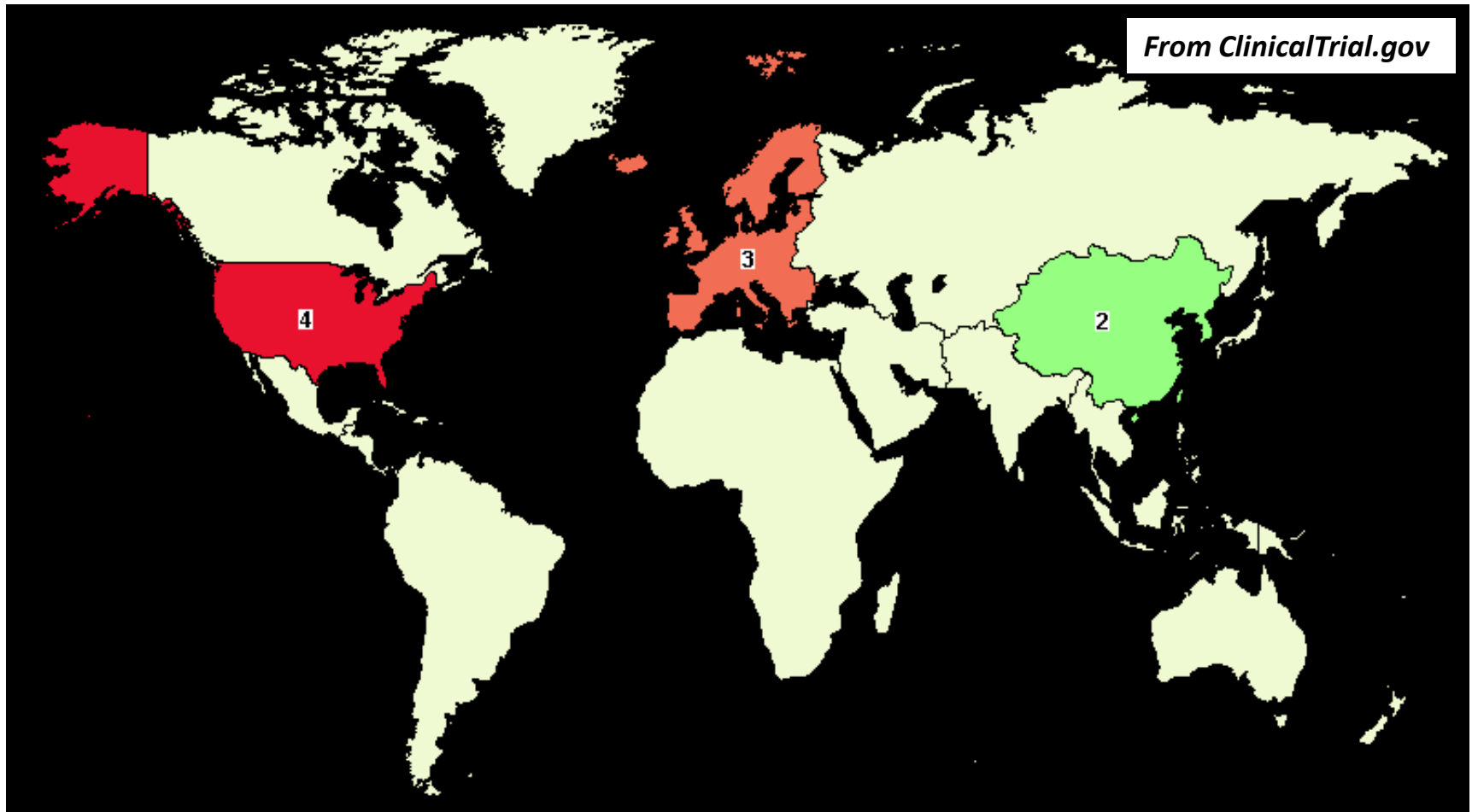


2012 Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna

# Gene editing: comment ça marche?

- Gene editing fonctionne en réparant le gène défectueux au niveau de l'ADN
- Deux avantages majeurs:
  - le gène corrigé reste sous le contrôle de son promoteur endogène, garantissant ainsi une expression à vie et une régulation naturelle dans la cellule.
  - La correction génique a le potentiel d'éviter l'implication d'ADN étranger, réduisant ainsi le risque de mutagenèse par insertion

# Gene editing: les applications



Etudes cliniques actuellement en cours pour traiter: Hemophilie, MPS, ADA, Leucémie, Lymphomes, sdr Kabuki (*in vitro*)

# Gene editing in CF: comment ça marche?

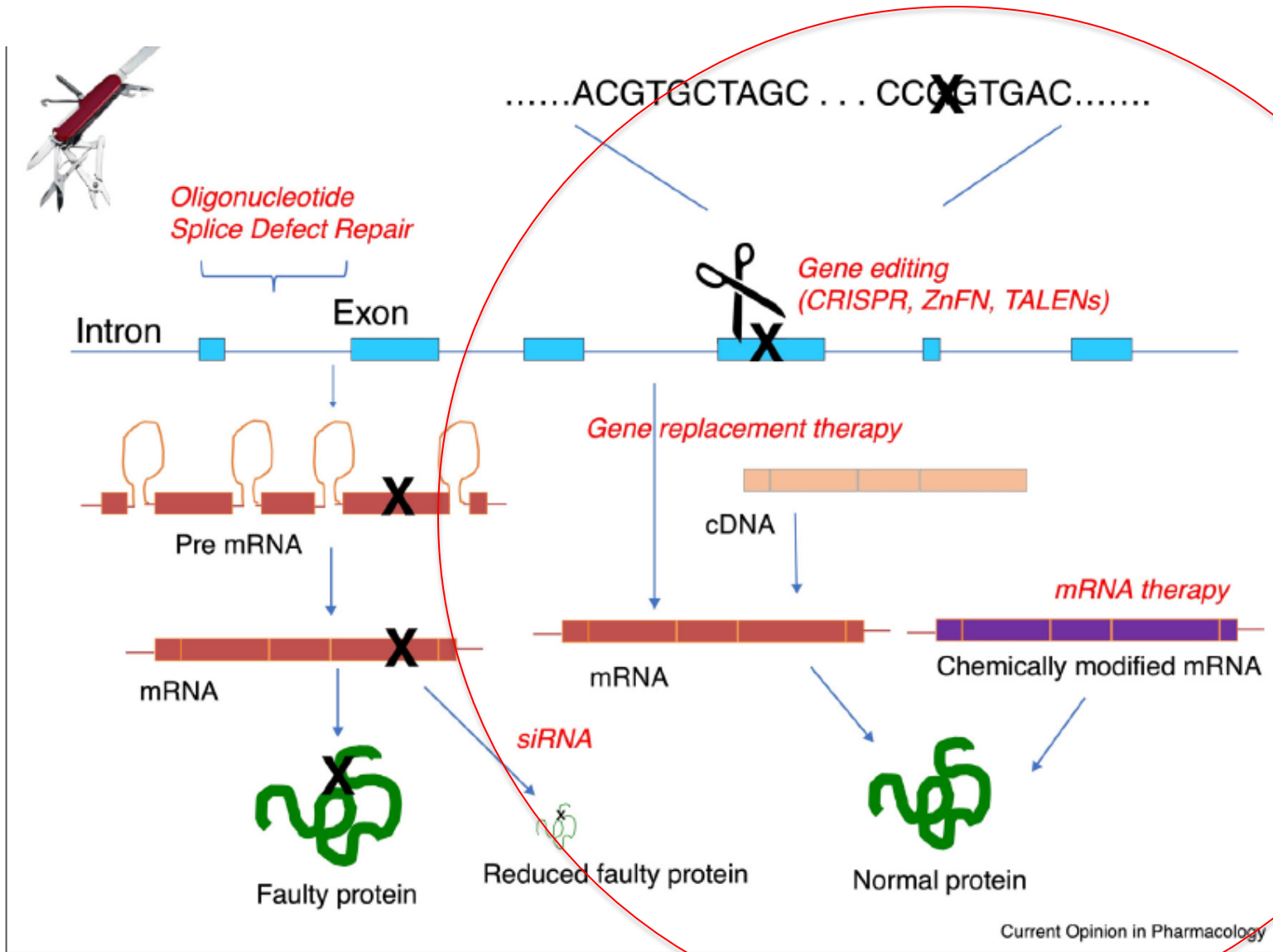
Les outils de CRISPR gene editing comprennent un «guide» localisant la séquence mutée dans le gène CFTR, un modèle avec le segment correct des lettres d'ADN et des «ciseaux» qui cassent l'ADN du patient sur le site de la mutation. Une fois que les outils entrent dans la cellule et atteignent la séquence d'ADN mutée, les ciseaux coupent la mutation.

Plusieurs études pré-cliniques  
actuellement en cours (Schwank et al. (2013);  
Firth et al., 2015...)





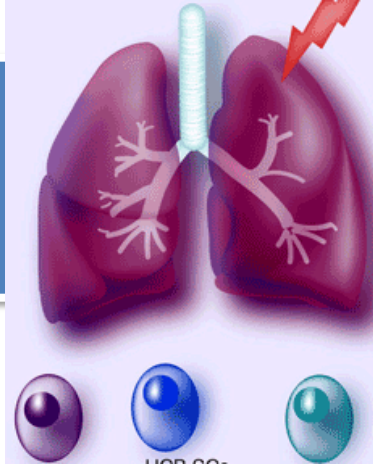
# Gene editing offre une approche permettant de réparer des mutations spécifiques de CFTR avec une grande précision



# Gene editing: les limites

- Gene editing n'est pas parfait
- Chaque outil de gene editing doit être évalué **individuellement** pour déterminer s'il est suffisamment précis pour pouvoir être utilisé chez des patients
- **Division cellulaire**: le gene editing ne pourrait corriger les mutations de CFTR dans de nombreuses cellules pulmonaires à moins que les cellules souches ne soient spécifiquement ciblées
- L'**objectif** devra être une administration unique ciblant suffisamment de cellules souches pour peupler les voies respiratoires et rétablir le fonctionnement tout au long de la vie.

# Gene editing: le future?



Des ***niches de cellules souches*** ont été identifiées dans les poumons (cellules souches broncho-alvéolaires).

1. Récupérer des cellules souches du poumon d'un patient atteint de mucoviscidose
2. Le traiter par Crispr/Cas9 pour corriger la mutation CFTR
3. Transfert dans l'une de ces niches pulmonaires où les cellules souches trouvent le micro-environnement adéquat pour leur survie et leur croissance.
4. Utilisation des iPSCs?

# Gene editing: conclusions

- **Probablement le bon outil pour la thérapie génique dans la mucoviscidose**
- **Des efforts supplémentaires doivent être déployés afin de vérifier la sécurité et l'efficacité à long terme (mutations off target?)**
- **Identifier les profils des patients atteints de mucoviscidose qui pourraient bénéficier de ce traitement**