

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT-

ANNEE: 2018

THESE N°: 78

**LA THERAPIE GENIQUE
ET SES APPLICATIONS**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le

PAR

Mlle. Manal ABIDAR
Née le 01 Novembre 1993 à Rabat

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Thérapie – Gène – CRISPR – Vectorisation.

JURY

Mme. N. EL HAFIDI

Professeur de Pédiatrie

Mr. A. IBRAHIMI

Professeur de Biologie Moléculaire

Mr. R. EL JAUDI

Professeur de Toxicologie

Mme. A. HASSANI

Professeur de Pédiatrie

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31



UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. Mohamed KARRA

1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS

**ET
PHARMACIENS**

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne – **Clinique Royale**
Anesthésie -Réanimation
pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID Younes

Pathologie Chirurgicale

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. CHAHED OUZZANI Houria
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYAOUI Mohamed

Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie

Décembre 1989

Pr. ADNABOU Mohamed
Pr. CHAD Bouziane
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Pr. EL AMRANI Sabah

Médecine Interne – **Doyen de la FMPR**
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation – **Doyen de la FMPO**
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – **Dir. du Centre National PV**
Chimie thérapeutique **V.D à la pharmacie+Dir du CEDOC**

Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie



Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Doyen de la FMPA
Gynécologie Obstétrique

Pr. EL BARDOUNI Ahmed
 Pr. EL HASSANI My Rachid
 Pr. ERROUGANI Abdelkader
 Pr. ESSAKALI Malika
 Pr. ETTAYEBI Fouad
 Pr. HADRI Larbi*
 Pr. HASSAM Badredine
 Pr. IFRINE Lahssan
 Pr. JELTHI Ahmed
 Pr. MAHFOUD Mustapha
 Pr. RHRAB Brahim
 Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
 Pr. ABDELHAK M'barek
 Pr. BELAIDI Halima
 Pr. BENTAHILA Abdelali
 Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
 Pr. BERRADA Mohamed Saleh
 Pr. CHAMI Ilham
 Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
 Pr. JALIL Abdelouahed
 Pr. LAKHDAR Amina
 Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
 Pr. AMRAOUI Mohamed
 Pr. BAIDADA Abdelaziz
 Pr. BARGACH Samir
 Pr. CHAARI Jilali*
 Pr. DIMOU M'barek*
 Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
 Pr. EL MESNAOUI Abbes
 Pr. ESSAKALI HOUSSEINI Leila
 Pr. HDA Abdelhamid*
 Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
 Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
 Pr. SEFIANI Abdelaziz
 Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
 Pr. BELKACEM Rachid
 Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
 Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
 Pr. GAOUZI Ahmed
 Pr. MAHFOUDI M'barek*
 Pr. OUADGHIRI Mohamed
 Pr. OUZEDDOUN Naima
 Pr. ZBIR EL Mehdi*

Traumato-Orthopédie
 Radiologie
 Chirurgie Générale- **Directeur CHIS**
 Immunologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Médecine Interne
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique
 Traumatologie – Orthopédie
 Gynécologie –Obstétrique
 Dermatologie

Urologie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Neurologie
 Pédiatrie
 Gynécologie – Obstétrique
 Traumatologie – Orthopédie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie

Réanimation Médicale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Gynécologie Obstétrique
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Cardiologie - **Directeur HMI Med V**
 Urologie
 Ophtalmologie
 Génétique
 Réanimation Médicale

Radiologie
 Chirurgie Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Radiologie
 Traumatologie-Orthopédie
 Néphrologie
 Cardiologie



Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Pédiatrie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*

Gastro-Entérologie
Neurologie – **Doyen de la FMP Abulcassis**
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie
Cardiologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Traumatologie Orthopédie- **Dir. Hop. Av. Marr.**
Anesthésie-Réanimation **Inspecteur du SSM**
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne



Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie **Directeur Hop. Chekikh Zaied**
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Neurologie

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

ORL

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJILIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUECHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSI Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBABH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIK BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie **Directeur. Hop.d'Enfants**
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie



Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale

Pr. CHKIRATE Bouchra
 Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 Pr. EL HAOURI Mohamed *
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. JAAFAR Abdelouhab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RACHID Khalid *
 Pr. RAISS Mohamed
 Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 Pr. RHOU Hakima
 Pr. SIAH Samir *
 Pr. THIMOU Amal
 Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 Pr. BOULAADAS Malik
 Pr. BOURAZZA Ahmed*
 Pr. CHAGAR Belkacem*
 Pr. CHERRADI Nadia
 Pr. EL FENNI Jamal*
 Pr. EL HANCHI ZAKI
 Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 Pr. HACHI Hafid
 Pr. JABOUIRIK Fatima
 Pr. KHARMAZ Mohamed
 Pr. MOUGHIL Said
 Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
 Pr. TARIB Abdelilah*
 Pr. TIJAMI Fouad
 Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
 Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 Pr. ALLALI Fadoua
 Pr. AMAZOUZI Abdellah
 Pr. AZIZ Noureddine*
 Pr. BAHIRI Rachid

Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie



Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Rhumatologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie

Pr. BARKAT Amina
 Pr. BENYASS Aatif
 Pr. BERNOUSSI Abdelghani
 Pr. DOUDOUH Abderrahim*
 Pr. EL HAMZAoui Sakina*
 Pr. HAJJI Leila
 Pr. HESSISSEN Leila
 Pr. JIDAL Mohamed*
 Pr. LAAROUSSI Mohamed
 Pr. LYAGOUBI Mohammed
 Pr. NIAMANE Radouane*
 Pr. RAGALA Abdelhak
 Pr. SBIHI Souad
 Pr. ZERAIDI Najia

Décembre 2005 Pr. CHANI Mohamed

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
 Pr. AKJOUJ Said*
 Pr. BELMEKKI Abdelkader*
 Pr. BENCHEIKH Razika
 Pr. BIYI Abdelhamid*
 Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
 Pr. BOULAHYA Abdellatif*
 Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
 Pr. DOGHMI Nawal
 Pr. FELLAT Ibtiissam
 Pr. FAROUDY Mamoun
 Pr. HARMOUCHE Hicham
 Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
 Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
 Pr. JROUNDI Laila
 Pr. KARMOUNI Tariq
 Pr. KILI Amina
 Pr. KISRA Hassan
 Pr. KISRA Mounir
 Pr. LAATIRIS Abdelkader*
 Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 Pr. MANSOURI Hamid*
 Pr. OUANASS Abderrazzak
 Pr. SAFI Soumaya*
 Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 Pr. SOUALHI Mouna
 Pr. TELLAL Saïda*
 Pr. ZAHRAOUI Rachida

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
 Pr. ACHACHI Leila
 Pr. ACHOUR Abdessamad*

Pédiatrie
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Biophysique
 Microbiologie
 Cardiologie (mise en disponibilité)
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Parasitologie
 Rhumatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Histo-Embryologie Cytogénétique
 Gynécologie Obstétrique

Anesthésie Réanimation

Rhumatologie
 Radiologie
 Hématologie
 O.R.L
 Biophysique
 Chirurgie - Pédiatrique
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie



Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
 Pr. AMHAJJI Larbi*
 Pr. AOUI Sarra
 Pr. BAITE Abdelouahed*
 Pr. BALOUCH Lhousaine*
 Pr. BENZIANE Hamid*
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHARKAOUI Naoual*
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
 Pr. ELABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GHARIB Noureddine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOU SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhoussain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ez zohra*
 Pr. RABHI Monsef*
 Pr. RADOUANE Bouchaib*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine*
 Pr. SIFAT Hassan*
 Pr. TABERKANET Mustafa*
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour*
 Pr. TLIGUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
 Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Chirurgie cardio vasculaire
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Anesthésie réanimation **Directeur ERSM**
 Biochimie-chimie
 Pharmacie clinique
 Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologie biologique
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie



Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale

Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. AGDR Aomar*
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali*
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae*
 Pr. BOUI Mohammed*
 Pr. BOUNAIM Ahmed*
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik*
 Pr. DOGHMI Kamal*
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENNASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid*
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. L'KASSIMI Hachemi*
 Pr. LAMSAOURI Jamal*
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem

Médecine interne
 Pédiatre
 Chirurgie Générale
 Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie orthopédique
 Hématologie biologique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Microbiologie **Directeur Hôpital My Ismail**
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-phtisiologie



Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 ORL
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie

Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Gastro entérologie
 Anatomie pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie générale
 Hématologie biologique
 Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
 Pr. ABOUELALAA Khalil*
 Pr. BELAIZI Mohamed*
 Pr. BENCHEBBA Driss*
 Pr. DRISSI Mohamed*
 Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
 Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
 Pr. EL OUAZZANI Hanane*
 Pr. ER-RAJI Mounir
 Pr. JAHID Ahmed
 Pr. MEHSSANI Jamal*
 Pr. RAISSOUNI Maha*

Chirurgie Pédiatrique
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Traumatologie Orthopédique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Médecine Interne
 Pneumophtisiologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie pathologique
 Psychiatrie
 Cardiologie



Février 2013

Pr. AHID Samir
 Pr. AIT EL CADI Mina
 Pr. AMRANI HANCHI Laila
 Pr. AMOUR Mourad
 Pr. AWAB Almahdi
 Pr. BELAYACHI Jihane
 Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
 Pr. BENCHEKROUN Laila
 Pr. BENKIRANE Souad
 Pr. BENNANA Ahmed*
 O.
 Pr. BENSGHIR Mustapha*
 Pr. BENYAHIA Mohammed*
 Pr. BOUATIA Mustapha
 Pr. BOUABID Ahmed Salim*
 Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
 Pr. CHAIB Ali*
 Pr. DENDANE Tarek
 Pr. DINI Nouzha*
 Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
 Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
 Pr. ELFATEMI Nizare
 Pr. EL GUERROUJ Hasnae
 Pr. EL HARTI Jaouad
 Pr. EL JOUDI Rachid*

Pharmacologie – Chimie
 Toxicologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Réanimation Médicale
 Anesthésie Réanimation
 Biochimie-Chimie
 Hématologie biologique
 Informatique Pharmaceutique

Anesthésie Réanimation
 Néphrologie
 Chimie Analytique
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie
 Cardiologie
 Réanimation Médicale
 Pédiatrie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Neuro-Chirurgie
 Médecine Nucléaire
 Chimie Thérapeutique
 Toxicologie

Pr. EL KABABRI Maria
 Pr. EL KHANNOUSSI Basma
 Pr. EL KHLOUFI Samir
 Pr. EL KORAICHI Alae
 Pr. EN-NOUALI Hassane*
 Pr. ERRGUIG Laila
 Pr. FIKRI Meryim
 Pr. GHFIR Imade
 Pr. IMANE Zineb
 Pr. IRAQI Hind
 Pr. KABBAJ Hakima
 Pr. KADIRI Mohamed*
 Pr. LATIB Rachida
 Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr. MEDDAH Bouchra
 Pr. MELHAOUI Adyl
 Pr. MRABTI Hind
 Pr. NEJJARI Rachid
 Pr. OUBEJJA Houda
 Pr. OUKABLI Mohamed*
 Pr. RAHALI Younes
 Pr. RATBI Ilham
 Pr. RAHMANI Mounia
 Pr. REDA Karim*
 Pr. REGRAGUI Wafa
 Pr. RKAIN Hanan
 Pr. ROSTOM Samira
 Pr. ROUAS Lamiaa
 Pr. ROUIBAA Fedoua*
 Pr. SALIHOUN Mouna
 Pr. SAYAH Rochde
 Pr. SEDDIK Hassan*
 Pr. ZERHOUNI Hicham
 Pr. ZINE Ali*

Pédiatrie
 Anatomie Pathologie
 Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Physiologie
 Radiologie
 Médecine Nucléaire
 Pédiatrie
 Endocrinologie et maladies métaboliques
 Microbiologie
 Psychiatrie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*
 Pr. GHOUNDALE Omar*
 Pr. ZYANI Mohammad*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Urologie
 Médecine Interne

***Enseignants Militaires**



MARS 2014

ACHIR ABDELLAH
BENCHAKROUN MOHAMMED
BOUCHIKH MOHAMMED
EL KABBAJ DRISS
EL MACHTANI IDRISSE SAMIRA
HARDIZI HOUYAM
HASSANI AMALE
HERRAK LAILA
JANANE ABDELLA TIF
JEAIDI ANASS
KOUACH JAOUAD
LEMNOUER ABDELHAY
MAKRAM SANAA
OULAHYANE RACHID
RHISSASSI MOHAMED JMFAR
SABRY MOHAMED
SEKKACH YOUSSEF
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.

***Enseignants Militaires**

DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'
AIT BOUGHIMA FADILA
BEKKALI HICHAM
BENAZZOU SALMA
BOUABDELLAH MOUNYA
BOUCHRIK MOURAD
DERRAJI SOUFIANE
DOBLALI TAOUFIK
EL AYOUBI EL IDRISSE ALI
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM
EL MARJANY MOHAMMED
FEJJAL NAWFAL
JAHIDI MOHAMED
LAKHAL ZOUHAIR
OUDGHIRI NEZHA
Rami Mohamed
SABIR MARIA
SBAI IDRISSE KARIM

***Enseignants Militaires**

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Urologie
Hématologie Biologique
Génécologie-Obstétrique
Microbiologie
Pharmacologie
Chirurgie Pédiatrique
CCV
Cardiologie
Médecine Interne
Génécologie-Obstétrique

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.



AOUT 2015

Meziane meryem
Tahri latifa

Dermatologie
Rhumatologie

JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE
EL ASRI FOUAD
ERRAMI NOUREDDINE
NITASSI SOPHIA

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia
Pr. ALAMI OUHABI Naima
Pr. ALAOUI KATIM
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
Pr. ANSAR M'hammed
Pr. BOUHOUCHE Ahmed
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
Pr. BOURJOUANE Mohamed
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia
Pr. DAKKA Taoufiq
Pr. DRAOUI Mustapha
Pr. EL GUESSABI Lahcen
Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes
Pr. HAMZAOUI Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohamed
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss
Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
Biochimie – chimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Génétique Humaine
Applications Pharmaceutiques
Microbiologie
Biochimie – chimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Biophysique
Chimie Organique
Biologie moléculaire
Biologie
Chimie Organique
Chimie
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

*Mise à jour le 14/12/2016 par le
Service des Ressources Humaines*





Dédicaces

A mes parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai pour vous.

Ce travail est le fruit de vos efforts et énormes sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

J'espère de tout mon cœur qu'en ce jour vous êtes fières de moi.

Que Dieu vous garde et vous procure longue vie.

A ma très chère famille

*Que ce travail puisse vous exprimer mon profond attachement, mon amour
et mon respect.*

Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite.

À mes très chers amis

Vous trouverez ici l'expression de mes sentiments les plus sincères.

Avec tout mon amour, je vous souhaite un avenir souriant.

*À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration
de ce travail.*



Remerciements

A notre maître et président de jury

Mme Naima EL HASSANI

Professeur de Pédiatrie

Nous sommes profondément touché par la gentillesse et la spontanéité de votre accueil. Nous vous remercions pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger cette thèse.

Votre compétence et votre gentillesse ont toujours suscité grande estime.

Veillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

A notre maître, et rapporteur de thèse

Mr Azdine IBRAHIMI

Professeur de Biologie Moléculaire

Vous nous avez toujours accueilli avec amabilité et sympathie, malgré vos nombreuses occupations professionnelles.

Votre haute compétence, votre gentillesse et vos conseils nous ont facilité l'élaboration de ce travail. Que ce travail soit l'expression de notre profonde gratitude et le témoignage de notre grande estime.

A notre maître et juge de thèse

MR Rachid EL JAOUDI

Professeur de toxicologie

Nous sommes profondément touché par votre gentillesse, votre accueil et vos remarquables qualités humaines et professionnelles qui méritent toute admiration et tout respect.

Veuillez accepter, l'expression de notre profond respect et notre reconnaissance.

A notre maître et juge de thèse

Mme Amal EL HASSANI

Professeur de Pédiatrie

*Nous vous remercions pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté
de nous juger.*

*Nous sommes heureux de l'honneur que vous nous faites en s'intéressant à
ce travail.*

*Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre estime et notre sincère
reconnaissance.*



Liste des abréviations

Liste des abréviations

AAV	: Virus associé à l'adénovirus
ADNc	: ADN complémentaire
BCL11A	: B-cell lymphoma/leukemia 11A
BLAST	: Basic local alignment search tool
BM	: Bone marrow
CAR-T	: Chimeric Antigen Receptor T-cells
CFTR	: Protéine (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)
COMP	: Committee for orphan medicinal products
cPPT	: Le tractus polypurine central
cPPT/flap	: Tractus polypurine central
CRISPR-Cas9	: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Cas9
CVO	: Crise douloureuse vaso-occlusive
DHSs	: DNASE hypersensitive sites
DSB	: Nuclease-induced /double strand break
EF1A	: Elongation factor 1 alpha
EF1A)	: Elongation factor 1 alpha
FDA	: Food and drug administration
FGF-1	: Fibroblast growth factor-1
G-CSF	: Granulocyte-colony stimulating factor
GFP	: The green fluorescent protein
GM-CSF	: Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
GTAC	: Therapy advisory committee
GvHD	: Réaction du greffon contre l'hôte
Gwas	: Genome-wide association study (Étude d'association pangénomique)

HbA	: Hémoglobine Adulte normale
HBB	: Hemoglobin subunit beta
HbF	: Hémoglobine fœtale
HBG	: Gènes de la gammaglobine
HbS	: Hémoglobine S
HDR	: Homology directed repair,
HIV	: LTR, virus de l'immunodéficience humaine de type 1, longue répétition terminale
HLA	: Human leucocyte antigen
HPCs/CSH	: Hematopoietic progenitor cells / cellule souche hématopoïétique
HPFH	: Persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale
HPLC	: High-performance liquid chromatography.
HSCT	: Hematopoietic stem cell transplantation
INDELs	: Small insertions and deletions in human genomes
iPSC/iPS	: Induced pluripotent stem cells
IRB	: Institutional Review Board (comité d'examen institutionnel)
IRES	: Séquences internes d'entrée des ribosomes
IRES	: Séquences internes d'entrée des ribosomes.
IRM	: L'imagerie par résonance magnétique
KO	: Knock-out (Invalidation génétique)
Lcr	: Région de contrôle du locus du gène de la bêta-globine
MCS	: Multispecies conserved sequences
néoR	: Gène bactérien de résistance à la néomycine
NHEJ	: Non homologous end joining
p. int	: Promoteur interne
PAM	: Protospacer adjacent motif

PB	: Peripheral Blood
PEG-ADA	: Polyéthylène glycol- Adenosine Desaminase
PPT	: Tractus polypurine ;
RBC	: Red blood cell
RefSeq	: The Reference Sequence
RGEN	: RNA-guided endonuclease
RRE	: L'élément de réponse de révolution
RRE	: Élément réactif
SCD	: Sickle cell disease
SD, SA	: Sites donneurs et accepteurs d'épissage
SIN	: Self-inactivating
SNP	: Single nucleotide polymorphism
SNPs	:Single-nucleotide polymorphisms (l'insertion des polymorphismes mononucléotidiques)
TALEN	: Transcription activator-like effector nuclease
TAT	: Trans-Activator of Transcription
TIL	: Tumor infiltrating lymphocytes
TPO	: Thrombopoïétine
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VSV-G	: Virus de la stomatite vésiculeuse - glycoprotéine
WT	: Wild-type /type sauvage
ZFN	: Nucléases à doigts de zinc
βp	: Promoteur humain β-globine



Liste des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : Les deux principales stratégies de traitement par thérapie génique (in vivo et ex vivo).....	12
Figure 2 . Principe du transfert de gènes à l'aide de rétrovirus recombinants.....	41
Figure 3 . Les différents types de vecteurs rétroviraux.	43
Figure 4 . Principe du marquage génique dans le cadre des autogreffes de moelle osseuse. ...	45
Figure 5 . Représentation du système CRISPR/Cas9.	48
Figure 6 Principe d'édition par le système CRISPR-Cas9.	50
Figure 7 Principes de l'édition du génome à l'aide de nucléases.	52
Figure 8 .Utilisation du système CRISPR/Cas pour éliminer une séquence d'ADN.....	57
Figure 9 : Image 3D représentant la structure de la molécule de l'hémoglobine.....	59
Figure 10 : l'expression des différentes hémoglobines au cours du développement	60
Figure 11 organisation des deux familles de gènes-globine	63
Figure 12 : Image en microscopie optique montrant la forme en faucille prise par certaines hématies drépanocytaires.....	65
Figure 13 . Nombre de nouveau-nés atteints de drépanocytose dans chaque pays en 2015.....	66
Figure 14 : Mécanisme physiopathologique de base de la drépanocytose..	67
Figure 15 : Mécanismes de la vaso-occlusion.....	71
Figure 16 : Physiopathologie du syndrome thoracique aigu.....	71
Figure 17 . Les étapes importantes de la recherche et du développement de la thérapie génique ex vivo pour les troubles hémoglobiniques. Les études cliniques LG001, HGB204, HGB205 et HGB206 sont menées avec des vecteurs lentiviraux	77
Figure 18 diagramme Du vecteur BB305	82
Figure 19 Diagramme du vecteur lentiviral HPV569 β -globine (β A-T87Q).	84

Figure 20. Constructions de vecteurs lentiviraux utilisées dans les récents essais	86
Figure 21 Conversion à l'indépendance transfusionnelle	92
Figure 22 Greffe avec des cellules modifiées et expression du gène thérapeutique chez le patient.	94
Figure 23. Résultats des tests de globules rouges spécifiques à une maladie falciforme.	97
Figure 24. Mécanisme de l'effet protecteur de l'HbF.....	106
Figure 25. Ciblage des délétions de HPFH5 cliniquement pertinentes par S. aureus CRISPR-Cas9 dans les cellules humaines.	111
Figure. 26. Suppression type de persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (HPFH). .	114
Figure 27 Étude par immunoprécipitation de la fixation de la protéine BCL11A sur différents éléments du locus β -globine.....	117
Figure 28. Édition du génome du gène BCL11A par les ZFNs	119
Figure 29. Traces représentatives sur HPLC. Des traces de 3 colonies d'érythroïdes dérivées de donneur 1 Les cellules MO-CD34+ sont montrées avec des pics de chaîne globine individuels annotés.	121
Figure 30. Représentation des quatre isoformes de BCL11A par suite d'un épissage alternatif	124

Liste des tableaux

Tableau 1 maladies génétiques candidate a une thérapie génique pour lesquelles la cellule cible appartient au système hématopoïétique.....	5
Tableau 2 propriétés des différents vecteurs viraux	40
Tableau 3. Analyse comparative de différentes méthodes d'édition du génome	55
Tableau 4 Essais cliniques humains à ce jour pour la thérapie génique de β -TM et/ou SCD sévère en France et à l'international avec les vecteurs lentiviraux (HPV569 puis BB305).....	91
Tableau 5. Valeurs clés de laboratoire avant la thérapie génique (au dépistage) et à des intervalles de 3 mois après la perfusion de cellules CD34+ transduites.	95
Tableau 6. Oligonucléotides pour les ARNg ciblant le locus β –globine	112



Sommaire

Introduction à la thérapie génique	1
❖ Introduction.....	2
❖ Historique.....	2
❖ La thérapie génique a commencé par les maladies monogéniques.....	5
❖ Le débat éthique	7
I. Situation actuelle de la thérapie génique	8
1. Modalités de la thérapie génique.....	8
2. Les techniques de traitement par thérapie génique	11
a. L'objectif thérapeutique du « gène-médicament »	11
b. Le traitement par thérapie génique ex vivo	13
➤ La thérapie génique ex vivo dans le cadre du traitement du cancer.....	14
c. Le traitement par thérapie génique in vivo.....	15
➤ La thérapie génique in vivo pour le traitement de l'amaurose de Leber.....	15
3. Indications de la thérapie génique.....	16
a. Quand la thérapie génique apparaît-elle logique et nécessaire ?.....	16
b. Autres situations où la thérapie génique a été utilisée ou envisagée	19
4. Les étapes de la thérapie génique : Du concept à l'essai clinique.	21
a. Le concept.	21
b. Les essais cliniques.....	22
i. Qu'est-ce qu'une étude clinique ?.....	22
▪ Essais cliniques.....	22
▪ Études d'observation	23

ii. Qui effectue les études cliniques ?	23
iii. Où les études cliniques sont-elles menées ?	23
iv. Quelle est la durée des études cliniques ?.....	23
v. Raisons de mener des études cliniques.....	24
vi. Participer à des études cliniques	24
➤ Qui peut participer à une étude clinique ?.....	25
➤ Comment les participants sont-ils protégés ?.....	25
➤ Lien avec les soins de santé habituels.....	26
➤ Considérations relatives à la participation	26
c. L'évaluation préclinique des produits de thérapie génique.....	28
5. La réglementation des essais cliniques de thérapie génique.....	30
6. Obstacles au développement de la thérapie génique et recommandations	32
a. -Les obstacles au développement de la thérapie génique	32
➤ Obstacles scientifiques	32
➤ Obstacles administratifs	34
➤ Obstacles financiers	34
b. Recommandations.....	34
➤ Dans le domaine scientifique	35
II. La thérapie génique en pratique.....	38
1. Les cellules hématopoïétiques, cible du transfert de gènes	38
2. Différents vecteurs pour le transfert de gènes.....	39
3. Marquage génique	44

III. Les récents essais en thérapie d'édition du génome cliniquement praticable par le système CRISPR-Cas9 dans les maladies héréditaires monoénniques /les hémoglobinopathies	46
1. Principe d'édition par le système CRISPR-Cas9.	46
➤ L'histoire des CRISPR.	49
2. La technique CRISPR-Cas9 : thérapie génique de demain ?	53
a. Avantages du système CRISPR.	54
b. Deux mécanismes de réparation de l'ADN	55
c. Délivrance des composants du système CRISPR dans la cellule.	56
d. Les mutations induites par le système CRISPR.	56
3. La thérapie génique chez les patient drépanocytaires	58
a. Introduction générale sur les hémoglobinopathie.	58
i. Structure moléculaire d'hémoglobine	58
ii. L'évolution ontogénique des hémoglobines humaines.	59
iii. Organisation génétique et régulation de l'expression des différentes hémoglobines	61
iv. Les β - thalassémies	63
b. La drépanocytose maladie monogénique la plus répandu.	64
i. Présentation de la drépanocytose	64
ii. Historique	65
iii. Prévalence de la drépanocytose	66
iv. Mode de transmission	66
v. Physiopathologie:	67
vi. Manifestations cliniques de la drépanocytose Homozygote.	68
1) Considérations générales.	68

2) Principaux Complications aiguës / chroniques	69
c. L'équipe menant l'essai clinique.....	73
4. Thérapie génique des hémoglobinopathies par transfert lentiviral du gène BA T87Q- GLOBINE	74
a. L'essai	74
i. Titre complet de la recherche biomédicale.....	74
ii. Condition médicale ou pathologie étudiée	74
iii. Brève description facilement compréhensible de la recherche.....	74
iv. L'essai HGB-205	76
v. nouvelles données de l'étude HGB-205 sur le produit LentiGlobin™ chez les patients atteints de drépanocytose sévère et de bêta-thalassémie transfusion- dépendants (TDT).....	78
• Résultats attendus.....	78
• Critères d'inclusion	78
• Critères d'exclusion	80
vi. Etat des patients drépanocytaires recruté dans l'essai de thérapie génique.....	80
b. Edition génomique des HSPCs par transfère lentiviral du gène BA-T87Q-globine	81
i. Vecteur de Thérapie Génique Antisickling	81
ii. Le développement du vecteur lentiviral BB305	84
iii. Rôles des vecteurs HPV569 et BB302.....	86
iv. Les avantage du vecteur LVBB305	87
v. Conception de l'étude et conditionnement de pré-transplantation	87
vi. Préparation du produit médicamenteux (cellules CD34+ génétiquement modifiées)	89

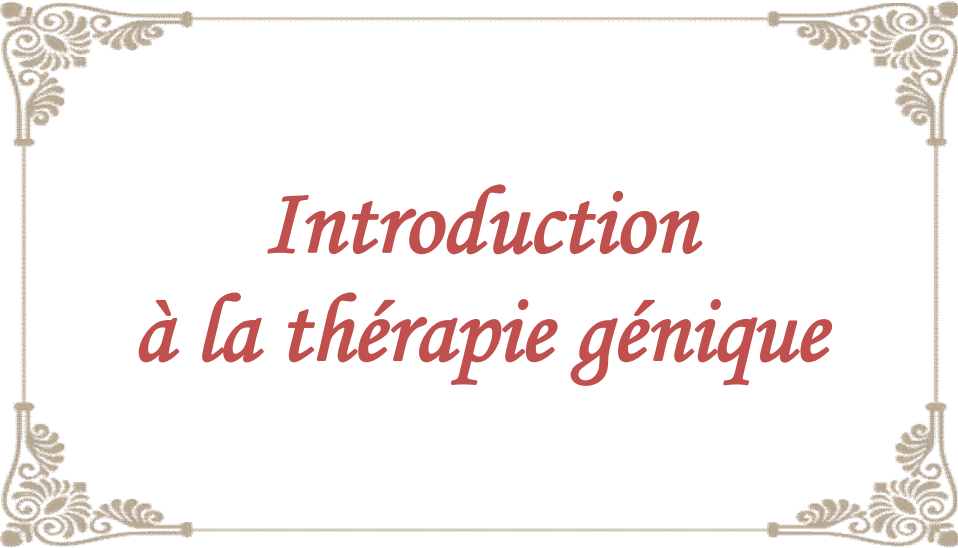
c. Résultats des essais à ce jour de Patients atteints d'un SCD et d'une β -TM dans l'essai HGB-205 avec le médicament BB305.....	90
i. Essais cliniques: Résultats intérimaires en France.....	90
ii. Les résultats à moyen terme du premier patient traité par LV T87Q globine seulement l'essai HGB205	93
• Greffe et expression du gène HbAT87Q.....	93
• Sécurité du produit médicamenteux LentiGlobin BB305	93
• Mesures cliniques et biologiques.....	95
• les tests de globules rouges spécifiques à une maladie falciforme.....	96
iii. Conclusions.....	99

IV. Induction de globine fœtale lors de la modification génétique du BLC11A dans les cellules souches hématopoïétique HSPC CD34+ dérivé de la moelle osseuse.....	100
a) Stratégie de Personnalisation du génome en tant que thérapie pour les β -hémoglobinopathies.....	101
b) Les différentes stratégies mises au point pour corriger génétiquement les β -hémoglobinopathies.....	102
1. Révision du génome à l'aide de CRISPR-Cas9 pour créer le génotype HPFH dans les HSPC s: une approche pour le traitement de la drépanocytose et β -thalassémie.....	103
a. Définition du syndrome HPFH	104
b. L'expression persistante de l'hémoglobine fœtale (HbF)	104
c. Modificateurs de la maturation érythroïde répercussions de l'HPFH	105
d. L'intérêt de créer le génotype HPFH chez les drépanocytaire et les β -thalassémique.....	106
e. L'utilisation de Crisper/Cas9 pour modifier les HSPCs	107

f. Crispr/Cas9- L'édition médiatique du génome des cellules CD34+ humaines Augmente la régulation de l'hémoglobine fœtale à des niveaux cliniquement pertinents dans les colonies d'érythroïdes dérivées d'une seule cellule.....	108
g. Guide de conception et de sélections des ARNs pour la génération délétionnelle HPFHs Sicilienne Sa Cas9 nucléase	109
h. Résultat	113
i. Conclusion	114
2. Utilisation des nucléases en doigt de zinc ZFN pour perturber l'expression du gène BCL11A	115
a. BCL11A contrôle l'expression de l'hémoglobine fœtale.....	115
b. Le locus β -globine, transmission mendélienne ou non d'expression de l'hbf.....	115
c. Bcl11a, répresseur de l'expression des gènes γ -globine	116
d. Le mode d'action de bcl11a dans les érythroblastes.....	116
e. Régulation à la hausse de l'expression de la globine fœtale lors d'une perturbation à médiation ZFN du gène BCL11A.	118
f. Discussion.....	121
g. Conclusion	126
h. Perspectives	126

Résumés

Références



Introduction à la thérapie génique

❖ Introduction

La thérapie génique est une biotechnologie basée sur le transfert de matériel génétique. Elle consiste à utiliser une séquence d'acides nucléiques (le plus souvent un gène, appelé transgène) afin de traiter une maladie ou ses symptômes. Cette séquence est insérée dans les cellules du sujet malade (qu'on appelle alors cellules transfectées) afin qu'elles produisent elles-mêmes le médicament à effet thérapeutique.

Pour réaliser cela, on construit une séquence d'acides nucléiques, appelée cassette génique, via des techniques de recombinaison de l'ADN. On y insère le transgène et tout ce qui sera nécessaire à la cellule cible afin qu'elle puisse l'exprimer (promoteur, autres séquences régulatrices, etc.). Cette cassette génique est ensuite prise en charge par un vecteur qui va la délivrer au sein des noyaux des cellules d'intérêt. On peut aussi utiliser, à la place d'une cassette génique, d'autres types d'acides nucléiques comme des ARN créés par synthèse chimique.

❖ Historique

Le concept de thérapie génique n'est pas récent. Dès les années 70, avec l'exploration et la cartographie du génome humain, on pense qu'il est possible de guérir d'une maladie génétique en modifiant les allèles mutés (réparation de la mutation ou adjonction de l'allèle sauvage)

La technique de transfert génétique *in vitro* est maîtrisée dans les années 80. La recherche en thérapie génique se tourne donc en premier lieu vers les syndromes d'immunodéficience congénitaux ou héréditaires. En effet, dans ces maladies, les cellules atteintes sont des cellules circulantes, qu'on peut prélever, mettre en culture et réinjecter après transfection. Les premiers vecteurs à avoir été utilisés sont les rétrovirus en raison de leur capacité à insérer leur génome de façon stable dans les cellules qu'ils infectent.

Le premier essai clinique approuvé a lieu en 1991. Il concerne un syndrome d'immunodéficience, la déficience en adénoside déaminase qui est une enzyme nécessaire au métabolisme des purines. Cet essai clinique implique deux patients. Le vecteur utilisé est un rétrovirus transportant le gène pour l'adénoside déaminase. Les résultats sont mitigés mais l'essai clinique ne met en évidence aucun effet secondaire.

La recherche en thérapie génique est fortement remise en question lors d'un autre essai clinique conduit en 1999 : des enfants immunodéficients (atteints d'immunodéficience combinée sévère liée au chromosome X) sont traités par thérapie génique via un vecteur rétroviral. Les premiers résultats sont très encourageants (reconstitution d'une population immunitaire normale), mais trois ans après l'essai clinique, deux des enfants traités développent une leucémie dont on détermine qu'elle est due à l'insertion du transgène dans le génome des cellules souches sanguines. L'un des deux décède des suites de sa leucémie

A partir de ce moment-là, les recherches en thérapie génique se portent vers d'autres vecteurs afin de mieux contrôler le lieu d'insertion du transgène. Malgré cet échec, la thérapie génique s'est bien développée dans différents domaines. Aujourd'hui, la thérapie génique est appliquée à de nombreuses maladies, génétiques comme acquises, telles que l'insuffisance cardiaque, le SIDA et les cancers. L'application de la thérapie génique aux maladies acquises repose sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la maladie et l'identification de cibles pouvant être modifiées par modulation de l'expression génique.

Les principes de la thérapie génique seront présentés dans une première partie afin de présenter les stratégies et les techniques nécessaires à la mise en place d'un traitement de thérapie génique. Nous verrons que plusieurs paramètres sont à prendre en compte avant de créer un traitement de thérapie génique. Il faut choisir le type de modification à apporter au génome, les modalités d'administration ainsi que le vecteur qui transportera la cassette génétique. Nous illustrerons ensuite ces principes à travers plusieurs maladies à l'étude à l'heure actuelle.

Au cours de ces dix dernières années, l'approche thérapeutique fondée sur l'addition d'un gène thérapeutique dans les cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH) a montré tout son potentiel curatif pour un nombre croissant de maladies héréditaires : le déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X (DICS-X), le défaut en adénosine désaminase, la leucodystrophie -hémoglobinopathies et le syndrome de β métachromatique, les Wiskott-Aldrich [1]. Les récents développements de la technologie de réparation des gènes vont encore étendre l'utilisation à visée curative de CSH autologues. L'utilisation de CSH autologues génétiquement corrigées élimine le risque des réponses alloréactives et diminue le risque de complications infectieuses. Malgré ces avantages, elle nécessite de traiter le patient par des drogues myélo-ablatives (ce que l'on nomme le conditionnement), afin de créer de « l'espace » aux cellules corrigées. Or ce conditionnement est responsable d'une toxicité aiguë et chronique. [1].

❖ La thérapie génique a commencé par les maladies monogéniques

Thérapie génique des maladies génétiques

Le concept de thérapie génique s'est d'abord appliqué à la correction des maladies génétiques monogéniques, dans le domaine de l'hémo-immunologie, ainsi qu'à d'autres pathologies où le transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques permet un apport à distance et à long terme de la protéine thérapeutique (exemple : maladies lysosomales) (*tableau 1*).[2]

Tableau 1 maladies génétiques candidate a une thérapie génique pour lesquelles la cellule cible appartient au système hématopoïétique [2]

Maladie	Produit de gène déficitaire	cellules cibles	Etat des protocoles
• déficit immunitaire combiné sévère avec un déficit en adénosine désaminase (ADA)	ADA	Lymphocytes T cellules de la moelle osseuse cellules CD34+du sang du cordon	En cours
• déficit immunitaire combiné sévère liée a l'X	Chaine gamma commune des récepteurs de l'IL2,4,7,9et15	Cellules CD34+de la moelle osseuse du sang du cordon	En cours
• Béta thalassémie	Béta-globine	Cellules souches	En projet
• Drépanocytose	Béta-globine	hématopoïétiques	En projet
• Porphyrie l'érythropoïétine congénitale	Un porphyrinogène synthase		En projet

La première tentative de traitement par thérapie génique a été effectuée en 1990 chez deux enfants porteurs d'un déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase (ADA) [2]. Le protocole a consisté à prélever des lymphocytes par leucophérèse,

à les mettre en culture et à les transduire par des rétrovirus recombinants véhiculant l'ADNc de l'ADA (*figure 1*). Les injections répétées de lymphocytes génétiquement modifiés toutes les 6 semaines ont permis l'obtention d'une amélioration clinique chez ces enfants. Le transgène a pu être détecté deux ans après le transfert rétroviral. Toutefois, du fait de la durée de vie limitée des cellules corrigées, d'autres protocoles ont vu le jour, utilisant des cellules CD34⁺ du sang de cordon [3] ou des cellules de moelle [4]. Le rôle thérapeutique du gène transféré est toutefois difficile à démontrer car le PEG-ADA (protéine de remplacement) a toujours été maintenu pour des raisons de sécurité pendant les essais.

Des essais thérapeutiques sont en cours dans un certain nombre d'autres maladies génétiques hématologiques, immunologiques ou de surcharge lysosomale (*tableau 1*)[2]

Le problème essentiel de ces différents protocoles thérapeutiques réside dans le fait que les cellules (souches) réinjectées transduites représentent chez le patient un pourcentage très faible par rapport au nombre de cellules (souches) endogènes restantes et non transduites. Aussi, la mise en évidence d'un avantage sélectif, *in vitro* et surtout *in vivo*, dans un modèle animal de la maladie est un argument de poids pour l'acceptation de ces protocoles. Cela est le cas pour le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X où l'anomalie génétique porte sur le gène de la chaîne gamma commune du récepteur des interleukines ainsi que le déficit immunitaire combiné sévère lié au déficit en JAK3 : les auteurs ont pu mettre en évidence un avantage sélectif très important des lymphocytes T corrigés dans le modèle murin de la maladie [5].

❖ Le débat éthique

Le débat éthique autour de la thérapie génique est encore plus sensible et complexe que le débat médico-économique et scientifique. Quelles sont, en effet, les règles pour inclure des patients adultes ou pédiatriques dans des essais cliniques de phase I/II ? Quel statut doivent avoir les patients face au système de protection sociale ? Si l'Agence Européenne des Médicaments (EMA, European medicines agency) a homogénéisé les règles encadrant les qualités auxquelles la production des cellules génétiquement modifiées doivent obéir, aucune recommandation européenne ne régit l'inclusion des patients dans des protocoles de phase I/II, et chaque pays européen suit ses propres lois. En France, la loi à ce sujet est très précise : « interdiction de traiter des patients qui n'appartiennent pas au système de sécurité sociale nationale ou qui n'appartiennent pas à un pays de l'UE dans le plus grand souci de protection des patients ». Cela n'est pas vrai par exemple en Allemagne ou en Italie. Tout aussi difficile est le débat éthique autour de l'édition du génome. Le nombre de personnes qui ont participé au symposium de Keystone sur la thématique « precision genome engineering » prouve, une fois de plus, que la technologie CRISPR est la plus importante avancée biotechnologique de ce siècle. La question la plus importante soulevée par cette méthode est de savoir comment traduire ses potentialités en outils thérapeutiques. L'avantage de CRISPR est sa spécificité car la protéine Cas9 peut être guidée jusqu'à un site particulier du génome afin d'insérer le nouveau fragment d'ADN. Cependant, malgré le fait que la séquence cible soit unique (l'ADN est composé de quatre bases seulement), des séquences similaires à celle-ci peuvent également représenter des sites de coupure pour l'enzyme [6]. Ces sites appelés « off-target¹ » sont identifiés *in silico*. Mais prédire lesquels d'entre eux seront réellement modifiés reste le défi le plus important de cette nouvelle technologie et, pour reprendre une phrase du généticien George Church, un pionnier de l'édition du génome : « most of what we call genome editing is really genome vandalism »¹. Si beaucoup de défis technologiques vont trouver une solution dans les années à venir, il nous faut, très vite, donner vie à un profond débat éthique et social, afin de définir les obligations que les chercheurs doivent respecter pour éviter une utilisation erronée et dangereuse de cette technologie révolutionnaire. ‡²

¹ Off-target : Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering/ Effets hors cible dans le génie génomique à médiation CRISPR/Cas9.

² « La plupart de ce que nous appelons édition du génome n'est en fait que du vandalisme du génome ».

I. Situation actuelle de la thérapie génique

1. Modalités de la thérapie génique

La thérapie génique a été appliquée selon des stratégies et des modalités multiples qui varient avec le but recherché (complémentation ou réparation), le type de nucléotide transféré (ADN complémentaire, ADN génomique, oligonucléotide synthétique ou chimère d'ADN et d'ARN), le vecteur d'administration utilisé (viral ou non viral) et enfin le protocole clinique retenu (administration du transgène *in vivo* ou *ex vivo* dans des cellules préalablement prélevées et purifiées). Le but recherché a été le plus souvent l'utilisation du transgène comme un médicament, c'est-à-dire l'apport d'un nombre suffisant de copies du gène manquant pour remplacer la protéine non ou insuffisamment synthétisée. Plus exceptionnellement, il a été essayé de réparer *in situ* un gène porteur d'une mutation ponctuelle par chiméraplastie³. Cette technique consiste à transférer un oligonucléotide chimérique fait d'ADN et d'ARN qui s'hybride à la région à corriger et déclenche le processus physiologique de réparation. Pour faciliter la pénétration du transgène dans la cellule, on fait appel à des vecteurs viraux ou à d'autres méthodes. Le vecteur viral permet une meilleure efficacité du transfert et assure l'expression prolongée du gène transduit, tout au moins s'il est intégré dans le génome. Les inconvénients et risques, certains ayant un caractère théorique, sont la taille limitée de l'ADN transféré, les infections dues à la dissémination et à la réplication du virus ou même au nombre trop élevé de particules virales injectées, la possibilité de recombinaison du virus administré avec un virus sauvage, les réactions immunitaires vis-à-vis des protéines de l'enveloppe virale et la transformation maligne des cellules transduites. Au contraire, les méthodes d'administration non virales éliminent tous les risques liés à l'injection d'un virus, permettent le transfert d'un segment d'ADN de grande taille et facilitent la production industrielle du médicament en supprimant toutes les étapes complexes relatives à la préparation et à la transformation du virus en un outil sans danger. En revanche, ces

³ La « chiméraplastie » (« chiméraplastie » ou génoplastie), dans le domaine de la génomique est la réparation ou le changement, via une «chimère ADN-ARN» d'un court segment d'ADN ou d'un gène ciblé, au niveau d'un seul nucléotide, ou de quelques nucléotides d'un gène, sans affecter physiquement le reste du génome ni modifier le fonctionnement normal des protéines et des cellules. Elle vise à « assurer la guérison sans nécessité d'un traitement prolongé puisqu'elle a pour objet de corriger définitivement la mutation »

techniques non virales ont une faible efficacité de transfert et n'assurent pas une expression du transgène de longue durée.

La recherche d'un vecteur performant et sûr est toujours d'actualité malgré les nombreux progrès effectués. Le principe général de conception d'un vecteur viral est de déléter les régions du génome commandant la réplication du virus tout en maintenant son pouvoir infectant. Pour cela, les virus défectifs en gènes de structure sont introduits dans des cellules d'« emballage » ou de « complémentation » qui leur fournissent les protéines manquantes. Les particules virales libérées dans le milieu par ces cellules sont infectantes puisqu'elles possèdent les protéines permettant le démarrage du cycle viral, mais incapables de se reproduire puisqu'elles ne possèdent plus les régions indispensables du génome. Initialement les rétrovirus et les adénovirus furent seuls utilisés. Les rétrovirus dérivés habituellement d'onco-rétrovirus murins comme le virus de Moloney sont constitués d'un seul brin d'ARN. Ils ont été surtout utilisés *ex vivo* pour infecter les cellules de la moelle osseuse. Le virus s'intègre dans le génome des cellules en division. Le gène transféré se retrouve dans les cellules filles, ce qui explique la durée prolongée d'expression du transgène. Le virus ne se réplique pas diminuant fortement ainsi le risque de mutagenèse insertionnelle. L'efficacité du transfert est relativement faible. De ce fait, le succès repose sur l'acquisition par les cellules transduites d'un avantage sélectif de prolifération permettant ainsi la multiplication de ces cellules et donc la production d'une quantité suffisante de la protéine manquante. Les adénovirus sont constitués d'un double brin d'ADN. Ils appartiennent à une famille de virus très répandue responsable d'affections laryngo-pharyngées chez l'Homme. Ils peuvent infecter les cellules au repos avec un rendement élevé et ont surtout été utilisés *in vivo*. Leur expression est limitée dans le temps puisque le virus n'intègre pas le génome. En plus de réactions inflammatoires dont l'intensité augmente avec la quantité de virus injectée, l'introduction du virus déclenche également des réactions immunitaires qui sont à envisager sous un double aspect. D'une part, les anticorps préexistants provenant d'une exposition antérieure à un adénovirus sauvage de même sérotype et ceux produits à l'occasion de la nouvelle injection peuvent neutraliser les adénovirus et ainsi empêcher le transfert de gène. D'autre part, ces anticorps peuvent entraîner l'accumulation de lymphocytes T cytotoxiques au voisinage du point d'injection. Cette réponse immunitaire locale a été considérée comme

bénéfique dans le traitement des tumeurs. Les techniques de préparation des adénovirus se sont perfectionnées de manière à réduire leur caractère immunogène et le risque infectieux. Les virus des générations les plus récentes sont dépourvus de plusieurs régions du génome viral ou même de la totalité des gènes empêchant ainsi l'expression des protéines virales. Ils permettent une plus grande sécurité et une expression prolongée du transgène. Plus récemment, on a utilisé des virus associés aux adénovirus (AAV) et des lentivirus. Les AAV sont des parvovirus sans pouvoir pathogène chez l'Homme. Ils peuvent infecter les cellules au repos avec une bonne efficacité et de manière persistante après intégration au génome et ne sont pas immunogènes. Leurs principaux inconvénients sont la limitation de la taille du gène pouvant être inséré et la difficulté de leur production industrielle. Les lentivirus sont des rétrovirus apparentés au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui peuvent infecter des cellules au repos avec une grande efficacité. Ils s'intègrent dans le génome permettant ainsi une expression de longue durée. Leur utilisation chez l'Homme soulève des problèmes de sécurité dont on peut raisonnablement espérer la solution.

Les constructions non virales sont faites d'ADN nu ou d'ADN complexé. L'ADN nu se présente sous forme de plasmides optimisés comme les minicercles ou les plasmides pCOR. Les minicercles ne contiennent ni séquence de résistance aux antibiotiques pour éviter les dangers éventuels de leur dissémination dans l'environnement ni séquence d'origine de réplication dans les bactéries. Les plasmides pCOR ("conditional origin of replication") ne peuvent se multiplier que dans une souche spécifique d' *Escherichia coli* qui elle-même ne pousse que dans un milieu spécial. Comme les minicercles, ils ne possèdent pas de gène marqueur de résistance aux antibiotiques. L'ADN complexé est uni à des molécules facilitant son transfert dans la cellule. Il peut s'agir de lipides cationiques solubles dans la membrane cellulaire et attirés par les charges négatives présentes à sa surface ou de polyéthylèneimine. La faible efficacité de transfert de l'ADN nu est améliorée par la technique d'électrotransfert qui augmente considérablement sa pénétration dans le muscle squelettique.

2. Les techniques de traitement par thérapie génique

La thérapie génique possède un objectif thérapeutique unique qui consiste à traiter une pathologie en se servant des gènes de l'individu malade [8]. Pour parvenir à ce but, nous allons voir qu'il existe actuellement différentes stratégies thérapeutiques de thérapie génique : *ex vivo* et *in vivo* [9,10]

a. L'objectif thérapeutique du « gène-médicament »

La thérapie génique utilise des acides nucléiques, c'est-à-dire des séquences d'acide désoxyribonucléique (ADN) ou d'acide ribonucléique (ARN), dans l'objectif de soigner certaines maladies géniques, qui sont le plus souvent rares et incurables.

En fonction de la pathologie à traiter, cet objectif peut être atteint en utilisant différentes stratégies thérapeutiques. La principale stratégie de thérapie génique consiste à délivrer aux cellules du patient un gène à action thérapeutique ou un nouveau gène fonctionnel. L'introduction d'un gène à action thérapeutique va permettre de relayer la fonction du gène déficient ou de l'empêcher de s'exprimer si son rôle est néfaste pour l'individu. L'ajout d'un gène fonctionnel pourra, quant à lui, aller directement remplacer le gène défectueux à l'origine de la maladie. Il est également possible de modifier la lecture d'un gène altéré par une technique baptisée le « saut d'exon », réalisée en injectant des molécules capables de se fixer sur l'exon muté, qui correspond à la partie codante du gène responsable de la maladie. Cela permet à la machinerie cellulaire du patient d'éviter de lire l'erreur présente sur l'exon et donc de contribuer à le soigner. [11]

Pour parvenir aux objectifs désirés, les acides nucléiques à visée thérapeutique utilisés par la thérapie génique peuvent être injectés directement dans les cellules de l'individu sous forme d'ADN nu, mais ils sont généralement transportés par un vecteur. [12] Dans ce cas, le vecteur est responsable du transport du « gène-médicament » dans les cellules cibles du patient. Afin de parvenir à ce résultat, il est important que ces systèmes de transfert de gènes soient sûrs, efficaces et capables d'exercer leur fonction dans des cellules qui ne se divisent pas. Ils doivent également assurer la stabilité de l'expression du gène à action thérapeutique.

Pour fonctionner, la thérapie génique nécessite donc toujours la présence de plusieurs éléments : un « gène-médicament », un vecteur pour le transport et une cellule cible où le gène doit aller s'exprimer.

La modification génique peut ensuite se réaliser de façon *in vivo* (directement chez le patient) ou *ex vivo* (à l'extérieur du corps humain), comme illustré en (figure 1).[13]

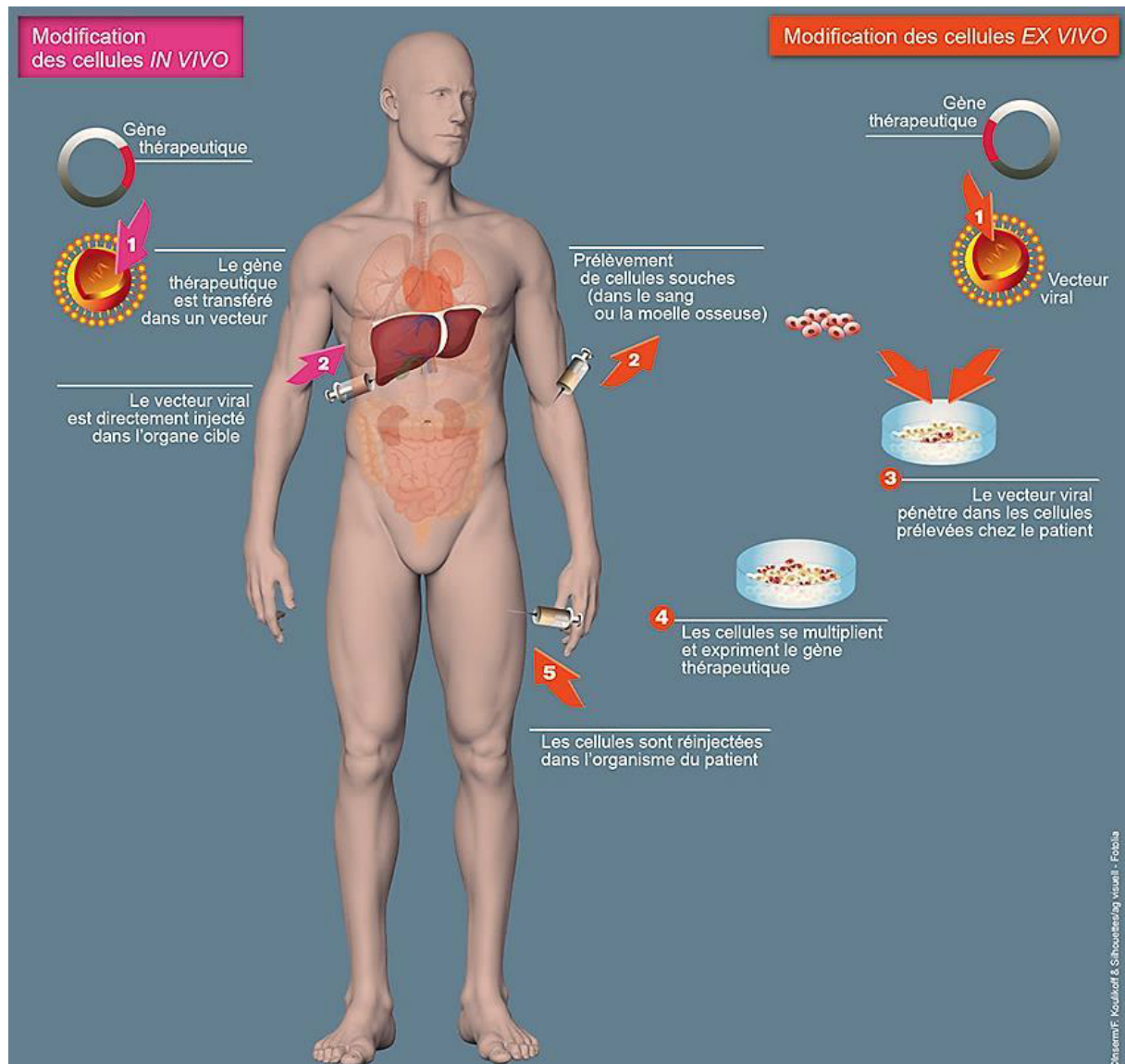


Figure 1 : Les deux principales stratégies de traitement par thérapie génique (*in vivo* et *ex vivo*) [13]

Les protocoles de thérapie génique varient en fonction des indications et des objectifs thérapeutiques à atteindre. Cependant, ils consistent toujours à modifier génétiquement les cellules de la personne atteinte de la maladie, de manière *ex vivo* ou *in vivo* et d'une façon pouvant être pérenne ou transitoire.

b. Le traitement par thérapie génique *ex vivo*

Le traitement par thérapie génique *ex vivo*⁴ consiste à prélever en premier lieu des cellules chez le patient ou chez un donneur compatible, qui seront ensuite modifiées à l'extérieur du corps humain (de manière *ex vivo*) avant la réinjection. Les cellules utilisées peuvent être soit autologues, c'est-à-dire prélevées et réinjectées chez le même patient, soit allogéniques, lorsque le receveur et le donneur sont deux personnes distinctes. Dans ce dernier cas, les individus doivent posséder des systèmes HLA (*Human Leucocytes Antigen*) compatibles pour que l'intégration des cellules du donneur ne provoque pas de réaction immunitaire de rejet chez le receveur.

Un vecteur est ensuite utilisé pour délivrer aux cellules un « transgène » thérapeutique contenant le gène d'intérêt, avant d'être placées en culture pendant un temps déterminé. L'objectif de la mise en culture est de permettre l'expression du gène d'intérêt par les cellules, en quantité souhaitée. Lorsque ces cellules commencent à exprimer le gène d'intérêt, elles sont finalement réinjectées à l'individu atteint de la maladie. Les cellules, devenues génétiquement modifiées, vont alors pouvoir proliférer dans l'organisme du patient pour effectuer leur action thérapeutique et contribuer à le soigner.

Plusieurs médicaments de thérapie génique actuellement en cours de développement utilisent cette technique de traitement *ex vivo*. Elle peut être illustrée à travers l'exemple ci-dessous.

⁴ Thérapie génique *ex vivo*. Les cellules hématopoïétiques sont prélevées soit à partir de la moelle osseuse, soit à partir du sang périphérique après mobilisation des cellules par des facteurs de croissance. Les cellules CD34⁺ sont isolées à l'aide d'un anticorps anti-CD34, puis mises en culture *ex vivo* en présence de cytokines. Leur transduction à l'aide des vecteurs rétroviraux a lieu au cours de l'expansion cellulaire. Les cellules génétiquement modifiées sont ensuite réinjectées au patient.

➤ La thérapie génique *ex vivo* dans le cadre du traitement du cancer

Pour parvenir à traiter certains cas rares de cancers, notamment hématologiques, une piste consiste aujourd'hui à stimuler le système immunitaire du patient contre sa propre tumeur, de manière à faciliter la reconnaissance des cellules cancéreuses puis leur élimination définitive. Afin d'atteindre cet objectif, des essais cliniques sont actuellement en cours à l'initiative d'équipes de recherche et de laboratoires pharmaceutiques.

L'une des principales stratégies consiste à prélever des lymphocytes T chez les patients, afin d'y introduire un gène codant pour une protéine impliquée dans la reconnaissance des cellules tumorales ou dans leur destruction. Les lymphocytes T sont une catégorie de globules blancs particulièrement sollicités dans la reconnaissance et la destruction des cellules dysfonctionnelles et des organismes étrangers. Une fois modifiées génétiquement pour aller cibler l'antigène tumoral, ces cellules sont ensuite réinjectées dans l'organisme des patients pour qu'elles puissent aller exercer leur action contre les cellules malignes de la tumeur. Ces thérapies sont appelées cellules « CAR-T », de l'anglais *Chimeric Antigen Receptor T-cells*. La majorité des traitements à l'étude sont autologues, car ce sont les propres lymphocytes du patient qui sont modifiés puis réinjectés.

En 2010, une équipe américaine de Philadelphie a prouvé l'efficacité des cellules T modifiées dans le cadre du traitement de leucémies, un type spécifique de cancer du sang dans lequel des cellules sanguines malignes se développent. Pour cela, les chercheurs ont utilisé un vecteur lentiviral de type HIV-1 car celui-ci s'intègre naturellement dans les lymphocytes T. Ce vecteur a permis le transfert de gènes codant pour des protéines qui facilitent la reconnaissance des cellules tumorales pour les éliminer. Certains résultats d'essais cliniques réalisés sur ces thérapies sont très prometteurs.

Actuellement, plusieurs sociétés pharmaceutiques sont en cours de développement de médicaments « CAR-T », dont les plus avancés sont les laboratoires Kite Pharma, Novartis et Juno Therapeutics [14]. Parmi eux, la société suisse Novartis a investi dans ce secteur, avec plusieurs essais cliniques en cours actuellement avec le médicament expérimental CTL019, dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique à cellules B et du lymphome diffus à grandes cellules B.

c. Le traitement par thérapie génique *in vivo*

Pour réaliser le traitement d'une pathologie par thérapie génique, le prélèvement de cellules chez un patient ou un donneur n'est pas toujours nécessaire, ni réalisable. En effet, il n'est pas toujours possible de prélever de telles cellules, par exemple lorsqu'il s'agit de cellules provenant d'organes spécifiques, tels que le cœur ou encore les neurones présents dans le cerveau.

Par conséquent, lorsque le traitement *ex vivo* ne peut être utilisé ou n'est pas nécessaire, il existe une autre stratégie de traitement par thérapie génique qui se réalise de manière *in vivo*. Le principe de traitement de cette seconde stratégie de thérapie génique repose sur l'injection du vecteur contenant le gène thérapeutique d'intérêt directement dans les organes cibles du patient.

Cette technique de traitement *in vivo* est utilisée dans le développement de plusieurs médicaments de thérapie génique, et peut être illustrée à travers l'exemple ci-dessous.

➤ La thérapie génique *in vivo* pour le traitement de l'amaurose de Leber

Actuellement, de nombreuses recherches concernent les pathologies rétinienne rares, comme par exemple, l'amaurose congénitale de Leber, qui a fait l'objet d'essais cliniques aux résultats remarquables.

La maladie de Leber est une dystrophie rétinienne héréditaire précoce, causée par une mutation affectant le gène RPE65. Ce gène est responsable de la régénération d'un pigment visuel (la rhodopsine) dans les photorécepteurs de la rétine. Lorsque ce gène est muté, cette pathologie provoque donc une dégénérescence pigmentaire pouvant conduire progressivement à la cécité avant l'âge de 20 ans, et au plus tard à 40 ans. Elle constitue l'une des principales causes de cécité chez l'enfant.[15]

Dans les essais cliniques menés sur cette maladie, une injection unique dans la rétine d'un vecteur de type viral adéno-associé (AAV) contenant une copie fonctionnelle du gène défectueux a permis de stopper l'évolution de la maladie et de préserver la vision qui restait aux patients atteints. Les premiers essais réussis ont eu lieu en Angleterre et aux Etats-Unis en

2007. Les chercheurs ont observé une amélioration de l'acuité visuelle et du champ de vision chez les personnes traitées par cette thérapie génique, après une injection pour un seul œil traité. L'effet perdure avec un recul de trois ans et demi pour les premiers patients traités.

Des sociétés ont été créées pour développer cette stratégie thérapeutique. Parmi elles, l'entreprise française GenSight développe GS010, un candidat « gène-médicament » actuellement en phase III d'études cliniques, dont le recrutement de patients est engagé jusqu'au premier semestre 2017. La société américaine Spark Therapeutics est également très avancée dans le développement de la thérapie génique dans le cadre des maladies rétinienne héréditaires, avec notamment un produit en cours de phase III également [16].

A travers ces différents exemples, on peut voir que les médicaments de thérapie génique, tels qu'ils sont conçus aujourd'hui, sont des produits prometteurs sur le plan thérapeutique mais complexes car ils impliquent une approche spéciale lors de leur conception et de leur développement. Ils dérivent d'une variété de matériaux biologiques (cellules, vecteurs viraux), et possèdent des caractéristiques uniques (modes d'action spécifiques, structures complexes, production complexe).

Aujourd'hui, on remarque l'arrivée de nouvelles thérapies géniques révolutionnaires et possédant en apparence moins de complexités, telles que la technique «CRISPR-Cas9».qu'on va traiter spécifiquement dans cette thèse

3. Indications de la thérapie génique

a. Quand la thérapie génique apparaît-elle logique et nécessaire ?

Les essais effectués ces dix dernières années ont montré qu'une des causes essentielles des échecs de la thérapie génique était la faible efficacité du transfert, la brièveté de l'expression du transgène et la difficulté, dans les maladies polygéniques, de définir le meilleur gène cible. Les indications logiques de ce traitement sont donc essentiellement les situations où ces problèmes peuvent être résolus : maladies héréditaires monogéniques avec déficit fonctionnel dont le gène muté responsable est connu, besoin limité en protéine manquante de sorte que la guérison est obtenue même lorsque la synthèse codée par le transgène est peu importante, cas où la population cellulaire transduite va acquérir un

avantage sélectif par rapport aux autres cellules lui permettant de se multiplier. Il faut de plus que les insuffisances des traitements disponibles justifient la recherche de nouvelles approches.

L'exemple typique d'une réussite est le traitement du déficit immunitaire combiné sévère (DICS) de l'enfant par l'équipe du Pr. A. Fischer. Il s'agit d'une maladie liée à l'X, due à une mutation du gène de la sous-unité -C du récepteur de plusieurs cytokines, IL-2, 4, 7, 9 et 15. La voie de la thérapie génique paraissait justifiée, le traitement par allogreffe avec un donneur de la famille porteur d'antigènes HLA identiques n'étant pas toujours possible. Dans cet exemple, beaucoup de conditions théoriques de succès étaient réunies. L'expérience clinique montrait que les filles conductrices ne souffrent pas de déficit immunitaire, donc qu'un pourcentage réduit de précurseurs génétiquement normaux suffit. De plus, l'expression de la protéine -C dans les précurseurs des lymphocytes T et NK leur procure un avantage de croissance de sorte que la faible fraction de cellules initialement transduites se multiplie suffisamment pour corriger le déficit en lymphocytes T fonctionnels avec l'avantage supplémentaire d'une durée de vie longue pour ces cellules. Tout ceci explique qu'un bénéfice clinique ait été obtenu avec la guérison des infections et le retour à une vie normale des enfants traités. Enfin, le gène -C est exprimé de manière constitutive. On n'a donc pas à craindre comme dans d'autres déficits immunitaires que l'expression anormale de la protéine dans les lymphocytes non activés consécutive à la transduction, conduise à l'apparition d'un lymphome malin. En contraste avec ce succès, de nombreux échecs sont survenus dans le traitement d'autres maladies héréditaires monogéniques. Dans la mucoviscidose, la faible longévité des cellules épithéliales bronchiques transduites avec le gène de la protéine CFTR ("Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator") et l'absence de récepteurs des adénovirus sur ces cellules, a rendu l'expression du transgène trop faible pour obtenir la guérison. Dans d'autres déficits immunitaires que le DICS, il n'y a pas ou peu d'avantage sélectif de prolifération des cellules transduites. C'est le cas des granulomatoses septiques chroniques, des déficits d'adhésion leucocytaire, du syndrome d'hyper IgM et du défaut d'expression des molécules d'histocompatibilité HLA de classe II. Enfin, avant de parler de succès, il faut avoir le recul nécessaire parce que l'expression de l'ADN codant le gène d'intérêt peut s'éteindre par méthylation du transgène. Cette extinction n'est pas prévisible et

pose le problème du renouvellement du traitement. A l'inverse des maladies précédentes correspondant à des déficits de fonction, les maladies génétiques avec gain de fonction soulèvent plus de difficultés parce qu'il convient dans ce cas d'inhiber l'expression d'un gène muté et non d'apporter un gène normal.

La thérapie génique représente une alternative avantageuse à l'administration répétée de protéines spécifiques, hormones, facteurs de croissance ou de coagulation, chaque fois que le produit synthétisé sous le contrôle du gène introduit est actif à faibles concentrations. L'avantage essentiel est, dans ce cas, une meilleure pharmacocinétique parce que la protéine est sécrétée de façon stable et prolongée après administration unique d'ADN. La suppression des pics de concentration liés à l'injection répétée de la protéine diminue le risque de désensibilisation des récepteurs. De plus, le coût d'un oligonucléotide de synthèse est bien inférieur à celui d'une protéine recombinante ou extraite, puis purifiée. Il faut, dans ce dernier cas, compter avec le risque de contamination virale que les techniques d'inactivation utilisées n'ont pas complètement supprimé. Les inconvénients sont l'absence de contrôle physiologique de la sécrétion de la protéine pouvant conduire à des concentrations sanguines excessives et la nécessité de prévoir l'administration répétée du transgène, même si les intervalles à envisager sont toujours plus longs que pour la protéine. Ce dernier impératif rend préférable l'utilisation de vecteurs non viraux. Un exemple de maladie répondant à ces conditions est l'hémophilie de type A par mutation du gène du facteur VIII ou de type B par mutation du gène du facteur IX rendant insuffisantes leurs concentrations dans le plasma. Trois raisons théoriques peuvent être invoquées pour le succès de la thérapie génique dans ce cas : de faibles accroissements de la concentration plasmatique du facteur en cause sont suffisants pour prévenir les hémorragies ; une régulation précise de l'expression du transgène n'est pas nécessaire parce que l'élévation des taux physiologiques ne semble pas conduire à des effets nocifs ; la libération dans le plasma de ces deux facteurs ne nécessite pas l'expression de leurs gènes dans un organe déterminé, ce qui permet l'administration intramusculaire ou intrapéritonéale du transgène. Une publication récente (Roth et *al.*, 2001) a confirmé la validité de cette approche par les résultats obtenus chez six malades après injection dans le péritoine de fibroblastes autologues transduits *in vitro* avec le gène du facteur VIII. Le succès reste cependant relatif, la concentration de facteur VIII circulant

atteinte ne dépassant pas 1 % de sa valeur normale. D'autres maladies sont ou ont été traitées au cours d'essais cliniques ou expérimentaux lorsqu'elles ont été considérées comme de bonnes candidates. C'est le cas du nanisme hypophysaire par défaut de sécrétion de l'hormone de croissance. Le gène de l'érythropoïétine a été également utilisé pour apporter le supplément nécessaire d'hormone au traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique et de la -thalassémie.

Les techniques de vaccination habituellement utilisées pour la prévention des maladies infectieuses consistent à injecter pendant une période relativement courte une quantité minimale d'antigène en un site corporel limité. Il était donc logique de penser que l'administration par voie intradermique ou intramusculaire d'ADN codant pour l'antigène vaccinal répondrait à ces conditions. Effectivement, un résultat positif a été obtenu chez les animaux d'expérience avec réponse humorale (apparition d'anticorps) et cellulaire (lymphocytes cytotoxiques). L'intérêt de cette méthode porterait aussi sur son coût et sa plus grande facilité, la synthèse d'oligonucléotides étant peu onéreuse et l'ADN une molécule thermostable voyageant aisément dans les pays tropicaux.

b. Autres situations où la thérapie génique a été utilisée ou envisagée

Le plus grand nombre des essais cliniques de thérapie génique ont eu pour but le traitement de tumeurs malignes. Une liste non exhaustive des cancers traités inclut le mélanome, le glioblastome, les cancers du poumon, du colon, de l'ovaire, de la thyroïde, du foie, de la tête et du cou On est frappé d'emblée par la multitude des méthodologies et des gènes transduits montrant qu'aucun succès réel aboutissant à la guérison du patient avec un recul suffisant n'a été jusqu'à présent obtenu. Citons quelques exemples : la thérapie par utilisation d'un gène suicide utilise le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV1-TK). Cette enzyme phosphoryle le ganciclovir le rendant fortement toxique pour les cellules en division. Dans ce système, des fibroblastes sont transduits et injectés dans la tumeur, le patient recevant du ganciclovir. Il se produit un effet de voisinage assurant la destruction des cellules tumorales non transduites proches du site de l'injection.

L'efficacité de ce traitement paraît limitée à cause du faible rendement du transfert. La simple administration du vecteur viral suffit à déclencher un processus immunitaire avec accumulation locale de lymphocytes cytotoxiques entraînant un processus de cytolyse tumorale. C'est ce qui a été constaté dans le cancer du poumon où l'injection dans la tumeur d'un adénovirus porteur d'un gène rapporteur a suffi pour obtenir la régression de cette tumeur. Les gènes des cytokines augmentant la capacité du système immunitaire à reconnaître et détruire les cellules tumorales comme l'interféron- (IFN-) ou l'interleukine-2 (IL-2) ont été également utilisés. Le gène de l'angiostatine a été choisi pour inhiber la néovascularisation associée au développement de la tumeur et à la migration de métastases. Un effet cytostatique a été recherché avec le gène de la protéine p53 inhibitrice de la prolifération cellulaire. Parfois, la thérapie génique a été utilisée comme adjuvant de la chimiothérapie. Ainsi, le transfert du gène du transporteur des iodures peut faciliter la pénétration de l'iodure de sodium radioactif dans une tumeur de la thyroïde.

Les maladies cardio-vasculaires représentent un deuxième groupe de maladies majeures en santé publique qui ont suscité des essais de thérapie génique. On a cherché à favoriser la revascularisation dans les maladies ischémiques comme l'artérite des membres inférieurs ou l'infarctus du myocarde par transfert de gènes de facteurs de croissance tels le “ fibroblast growth factor-1 ” (FGF-1) ou le “ vascular endothelial growth factor ” (VEGF). La construction porteuse du transgène est administrée dans le muscle squelettique, dans le myocarde ou dans la circulation coronarienne. Ces techniques sont justifiées lorsque les autres solutions thérapeutiques sont impossibles ou inefficaces. Le transfert de gène dans les coronaires a été aussi appliqué à la prévention de la resténose post-angioplastie. Des gènes cytostatiques (protéine gasc, protéine p21), cytotoxiques (thymidine kinase avec administration de ganciclovir) ou des gènes à effet paracrine (NO synthase favorisant la production de monoxyde d'azote, peptide natriurétique de type C) ont été utilisés. Le caractère transitoire de la thérapie génique convient parfaitement au traitement préventif de la resténose, la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires étant maximum dans les deux semaines suivant l'angioplastie. Enfin, on a essayé de prévenir les accidents cardio-vasculaires de survenue précoce chez les malades atteints de dyslipidémies en manipulant le

gène du récepteur des LDL (“ low-density lipoproteins ”) ou de l’apoA-1 en vue de réduire la fraction athérogène des lipoprotéines ou d’augmenter leur fraction protectrice.

La question de la thérapie génique chez l’embryon s’est également posée. L’Académie de médecine avait conclu en 1995 que la sélection des embryons non porteurs de la mutation suivant une fécondation *in vitro* qui implique toujours plusieurs ovocytes, était préférable à toute introduction de gène chez l’embryon. Il semble sage de s’en tenir toujours à cette recommandation tout en sachant que certaines éventualités théoriques posent problèmes (homozygote pour affection dominante, couple d’homozygotes sur mutation récessive, cas où aucun embryon implantable n’est obtenu).

4. Les étapes de la thérapie génique : Du concept à l’essai clinique.

a. Le concept.

La décision de recourir à la thérapie génique suppose avant tout que la sévérité de la maladie réclame un traitement et que les traitements connus soient inefficaces. Comme dans tout autre traitement, l’évaluation du risque encouru par rapport au bénéfice escompté doit être effectuée. Un exemple où cet impératif a été méconnu est le cas du patient américain atteint d’un déficit atténué en ornithine transcarbamylase décédé à la suite de l’injection d’un nombre trop élevé d’adénovirus dans la circulation hépatique alors que cette maladie est habituellement compatible avec une vie normale, le seul danger potentiel étant la survenue d’une hyperammoniémie aiguë en cas de maladie intercurrente ou d’accident. La deuxième condition est une connaissance parfaite de la physiopathologie de la maladie à traiter. Le gène à suppléer n’est pas obligatoirement celui dont la mutation est à l’origine de la maladie. De même, la population cellulaire ciblée doit être correctement choisie. Par exemple, le transfert du gène de la protéine CFTR dans l’épithélium nasal ou bronchique ne guérit pas la mucoviscidose. La -thalassémie qui est due au défaut de synthèse de la chaîne de l’hémoglobine peut être améliorée par le transfert du gène de l’érythropoïétine qui corrige l’anémie. La faiblesse des rationnels sur lesquels sont basées les thérapies géniques anticancéreuses explique en partie leur échec.

b. Les essais cliniques.

La dernière étape est la programmation de l'essai clinique.

i. Qu'est-ce qu'une étude clinique ?

Une étude clinique implique une recherche utilisant des volontaires humains (aussi appelés participants) qui a pour but d'enrichir les connaissances médicales. Il existe deux principaux types d'études cliniques : les essais cliniques (aussi appelés études interventionnelles) et les études d'observation.

▪ Essais cliniques

Dans un essai clinique, les participants reçoivent des interventions spécifiques selon le plan ou le protocole de recherche créé par les chercheurs. Ces interventions peuvent être des produits médicaux, comme des médicaments ou des dispositifs ; des procédures ; ou des changements dans le comportement des participants, comme un régime alimentaire. Les essais cliniques peuvent comparer une nouvelle approche médicale à une approche médicale standard qui est déjà disponible, à un placebo qui ne contient aucun ingrédient actif ou à aucune intervention. Certains essais cliniques comparent des interventions qui sont déjà disponibles les unes pour les autres. Lorsqu'un nouveau produit ou une nouvelle approche est à l'étude, on ne sait généralement pas s'il sera utile, nocif ou s'il ne sera pas différent des solutions de rechange disponibles (y compris l'absence d'intervention). Les chercheurs tentent de déterminer la sécurité et l'efficacité de l'intervention en mesurant certains résultats chez les participants. Par exemple, les chercheurs peuvent donner un médicament ou un traitement aux participants qui souffrent d'hypertension artérielle pour voir si leur tension artérielle diminue.

Les essais cliniques utilisés dans le développement de médicaments sont parfois décrits par phase. Ces phases sont définies par la Food and Drug Administration (FDA).

Certaines personnes qui ne sont pas admissibles à participer à un essai clinique peuvent obtenir des médicaments ou des dispositifs expérimentaux en dehors d'un essai clinique grâce à un accès élargi.

▪ Études d'observation

Dans le cadre d'une étude observationnelle, les chercheurs évaluent les résultats pour la santé de groupes de participants selon un plan ou un protocole de recherche. Les participants peuvent recevoir des interventions (qui peuvent inclure des produits médicaux tels que des médicaments ou des dispositifs) ou des procédures dans le cadre de leurs soins médicaux de routine, mais les participants ne sont pas affectés à des interventions spécifiques par l'investigateur (comme dans le cadre d'un essai clinique). Par exemple, les chercheurs peuvent observer un groupe de personnes âgées pour en apprendre davantage sur les effets des différents modes de vie sur la santé cardiaque.

ii. Qui effectue les études cliniques ?

Chaque étude clinique est dirigée par un chercheur principal, qui est souvent un médecin. Les études cliniques ont également une équipe de recherche qui peut comprendre des médecins, des infirmières, des travailleurs sociaux et d'autres professionnels de la santé.

Les études cliniques peuvent être parrainées ou financées par des sociétés pharmaceutiques, des centres médicaux universitaires, des groupes bénévoles et d'autres organisations, en plus des organismes fédéraux comme les National Institutes of Health, le département de la Défense des États-Unis et le département des Anciens combattants des États-Unis. Les médecins, les autres fournisseurs de soins de santé et d'autres personnes peuvent également parrainer la recherche clinique.

iii. Où les études cliniques sont-elles menées ?

Les études cliniques peuvent avoir lieu dans de nombreux endroits, y compris les hôpitaux, les universités, les cabinets de médecins et les cliniques communautaires. L'emplacement dépend de la personne qui mène l'étude.

iv. Quelle est la durée des études cliniques ?

La durée d'une étude clinique varie en fonction de ce qui est étudié. On dit aux participants combien de temps durera l'étude avant qu'ils ne s'inscrivent.

v. Raisons de mener des études cliniques

En général, les études cliniques sont conçues pour compléter les connaissances médicales liées au traitement, au diagnostic et à la prévention de maladies ou d'affections. Parmi les raisons courantes de mener des études cliniques, mentionnons les suivantes :

- Évaluer une ou plusieurs interventions (par exemple, médicaments, dispositifs médicaux, approches chirurgicales ou radiothérapie) pour le traitement d'une maladie, d'un syndrome ou d'un état.
- Trouver des moyens de prévenir le développement initial ou la récurrence d'une maladie ou d'une condition. Il peut s'agir, entre autres, de médicaments, de vaccins ou de changements de mode de vie.
- Évaluer une ou plusieurs interventions visant à identifier ou à diagnostiquer une maladie ou un état particulier.
- Examiner les méthodes d'identification d'une condition ou les facteurs de risque pour cette condition.
- Explorer et mesurer les moyens d'améliorer le confort et la qualité de vie grâce à des soins de soutien pour les personnes atteintes d'une maladie chronique.

vi. Participer à des études cliniques

Une étude clinique est menée selon un plan de recherche connu sous le nom de protocole. Le protocole est conçu pour répondre à des questions de recherche spécifiques et protéger la santé des participants. Il contient les informations suivantes :

- Raison d'être de l'étude
- Qui peut participer à l'étude (les critères d'éligibilité)
- Le nombre de participants nécessaires
- Le calendrier des tests, des procédures ou des médicaments et leurs dosages.
- La durée de l'étude

Quelles informations seront recueillies sur les participants ?

➤ **Qui peut participer à une étude clinique ?**

Les études cliniques ont des normes qui précisent qui peut participer. Ces normes sont appelées critères d'admissibilité et sont énumérées dans le protocole. Certaines études de recherche recherchent des participants qui ont les maladies ou les conditions qui seront étudiées, d'autres études sont à la recherche de participants en bonne santé, et certaines études sont limitées à un groupe prédéterminé de personnes auxquelles les chercheurs demandent de s'inscrire.

Admissibilité. Les facteurs qui permettent à une personne de participer à une étude clinique sont appelés critères d'inclusion, et les facteurs qui disqualifient une personne de participer sont appelés critères d'exclusion. Ils sont basés sur des caractéristiques telles que l'âge, le sexe, le type et le stade d'une maladie, les antécédents de traitement et d'autres conditions médicales.

➤ **Comment les participants sont-ils protégés ?**

Le consentement éclairé est un processus utilisé par les chercheurs pour fournir aux participants potentiels et aux participants inscrits des renseignements sur une étude clinique. Cette information aide les gens à décider s'ils veulent s'inscrire ou continuer à participer à l'étude. Le processus de consentement éclairé vise à protéger les participants et devrait fournir suffisamment d'information pour qu'une personne puisse comprendre les risques, les avantages potentiels et les solutions de rechange à l'étude. En plus du document de consentement éclairé, le processus peut comprendre du matériel de recrutement, des instructions verbales, des séances de questions-réponses et des activités pour mesurer la compréhension des participants. En général, une personne doit signer un document de consentement éclairé avant de participer à une étude pour montrer qu'elle a reçu de l'information sur les risques, les avantages potentiels et les solutions de rechange et qu'elle la comprend. Signer le document et donner son consentement n'est pas un contrat. Les participants peuvent se retirer d'une étude à tout moment, même si l'étude n'est pas terminée. Consultez la section Questions à poser sur cette page pour connaître les questions à poser à un fournisseur de soins de santé ou à un chercheur au sujet de la participation à une étude clinique.

Comités d'examen des établissements. Chaque étude clinique financée ou menée par le gouvernement fédéral et chaque étude d'un médicament, d'un produit biologique ou d'un instrument médical réglementé par la FDA doit être examinée, approuvée et surveillée par un comité d'examen institutionnel (IRB). Une CISR est composée de médecins, de chercheurs et de membres de la communauté. Son rôle est de s'assurer que l'étude est éthique et que les droits et le bien-être des participants sont protégés. Il faut notamment s'assurer que les risques liés à la recherche sont réduits au minimum et qu'ils sont raisonnables par rapport aux avantages potentiels, entre autres responsabilités. La CISR examine également le document de consentement éclairé.

En plus d'être surveillées par un IRB, certaines études cliniques sont également surveillées par des comités de surveillance des données (également appelés comités de sécurité et de surveillance des données).

Divers organismes fédéraux, dont l'Office of Human Subjects Research Protection et la FDA, ont le pouvoir de déterminer si les promoteurs de certaines études cliniques protègent adéquatement les participants à la recherche.

➤ **Lien avec les soins de santé habituels**

Généralement, les participants continuent de voir leurs fournisseurs de soins de santé habituels pendant qu'ils sont inscrits à une étude clinique. Bien que la plupart des études cliniques fournissent aux participants des produits médicaux ou des interventions liées à la maladie ou à l'affection à l'étude, elles ne fournissent pas de soins de santé complémentaires ou complets. En demandant à son fournisseur de soins de santé habituel de travailler avec l'équipe de recherche, un participant peut s'assurer que le protocole de l'étude n'entrera pas en conflit avec d'autres médicaments ou traitements qu'il reçoit.

➤ **Considérations relatives à la participation**

La participation à une étude clinique contribue à la connaissance médicale. Les résultats de ces études peuvent faire une différence dans les soins aux futurs patients en fournissant de l'information sur les avantages et les risques des produits ou des interventions thérapeutiques, préventifs ou diagnostiques.

Les essais cliniques constituent la base du développement et de la commercialisation de nouveaux médicaments, produits biologiques et dispositifs médicaux. Parfois, l'innocuité et l'efficacité de l'approche ou de l'utilisation expérimentale peuvent ne pas être pleinement connues au moment de l'essai. Certains essais peuvent offrir aux participants la possibilité de recevoir des avantages médicaux directs, alors que d'autres ne le font pas. La plupart des essais comportent un certain risque de préjudice ou de blessure pour le participant, bien qu'il ne soit pas nécessairement plus grand que les risques liés aux soins médicaux de routine ou à la progression de la maladie. (Pour les essais approuvés par les IRB, l'IRB a décidé que les risques de participation ont été minimisés et sont raisonnables par rapport aux avantages escomptés. De nombreux essais exigent que les participants subissent des procédures, des tests et des évaluations supplémentaires fondés sur le protocole de l'étude. Ces exigences seront décrites dans le document de consentement éclairé. Un participant potentiel devrait également discuter de ces questions avec les membres de l'équipe de recherche et avec son fournisseur de soins de santé habituel. [17]

En somme la programmation de l'essai clinique doit être assurée par des médecins cliniciens et répondre aux exigences de la Loi Huriet. Les conditions d'inclusion et d'exclusion seront clairement définies ainsi que les tests de sécurité et d'efficacité utilisés. Les essais relèvent, en général, des phases I ou II. Dans le cas de la thérapie génique, les essais de phase I se font chez des malades et non des sujets sains, sont sans bénéfice direct et ont pour objectif d'évaluer la sécurité d'emploi du produit. Les essais de phase II étudient l'activité à court terme du produit et permettent de préciser la posologie appropriée. Ces deux types d'essais sont souvent combinés. Les essais de phase III sont plus rares parce que l'étape de la phase II est difficile à franchir dans beaucoup de cas. Ils restent indispensables pour confirmer les propriétés thérapeutiques et apprécier l'efficacité en comparaison avec les traitements en vigueur. La plupart des études cliniques entreprises jusqu'à présent sont monocentriques. Les essais cliniques multicentriques sont malheureusement encore trop rares, sinon exceptionnels

c. L'évaluation préclinique des produits de thérapie génique

La deuxième étape comporte en premier le bon choix de l'outil de transfert du transgène. Il faut là aussi mettre en balance les risques possibles et l'efficacité attendue. Deux questions essentielles se posent : 1- Seul le tissu ciblé sera-t-il touché? En particulier, est-on sûr de l'absence d'atteinte des gamètes ? 2- Le gène transféré va-t-il persister dans les cellules avec les avantages (effet prolongé) et les inconvénients potentiels (mutagénèse) que cela implique ? Les techniques *ex vivo* ciblent parfaitement bien la population choisie si elle est convenablement purifiée. Les rétrovirus donnent des effets prolongés, mais qui ne sont pas réversibles à volonté, en opposition avec les constructions non virales dépourvues des risques liés aux virus, mais d'activité transitoire et nécessitant des injections répétées.

Cette étape comporte aussi la réalisation de l'ensemble des travaux précliniques nécessaires à la mise à disposition du clinicien d'une préparation répondant aux exigences de qualité pharmaceutique et de toxicopharmacologie requises pour tout nouveau médicament. Différentes notes explicatives européennes présentées dans le volume I des “ Rules governing medicinal products in the European Community ” définissent les conditions de production et de contrôle de qualité des produits destinés à la thérapie génique. En particulier, les critères de qualité exigés pour la production des vecteurs et celle des cellules somatiques génétiquement modifiées ainsi que les critères d'innocuité et d'efficacité sont détaillés dans ces différentes notes.

Les principaux tests analytiques réalisés pour les vecteurs viraux et plasmidiques doivent vérifier l'identité du produit (le transgène administré est-il celui choisi ?), la pureté (stérilité bactérienne et fongique, absence de virus réplicatifs), le dosage (nombre de particules virales) et la stabilité. Les lieux de production et de contrôle sont soumis à une réglementation stricte précisant les conditions de fonctionnement et de confinement ainsi que les mesures de protection prises pendant et après la fabrication.

Les études toxico-pharmacologiques ont pour objet d'établir, préalablement à l'essai clinique, l'efficacité (en intensité et en durée), l'innocuité et le devenir des préparations administrées. Ces études doivent porter sur le vecteur et le produit final. A côté des données classiques de tolérance locale et générale, des effets plus spécifiques incluant les réactions

immunitaires sont à rechercher. L'étude de nouvelles voies d'administration comme l'électrotransfert réclame des expériences propres afin d'être validées avant toute application humaine. Un des problèmes posés par l'expérimentation animale en matière de thérapie génique est l'insuffisance de modèles animaux suffisamment prédictifs. Il n'existe pas de protocoles standards destinés aux études toxicologiques et d'efficacité. Dans le cas des plasmides, les protocoles sont identiques à ceux appliqués aux produits de biotechnologie. Dans le cas des vecteurs viraux, on doit utiliser une espèce permissive pour le virus choisi. La majorité des études pharmacologiques sont effectuées chez les rongeurs. Quelques rares études portant sur le transfert de gènes dans les maladies cardio-vasculaires ont été réalisées chez le Porc. Les difficultés liées à l'approvisionnement en chiens ou en primates limitent les études de chronicité pourtant indispensables à l'appréciation à moyen et long terme des effets de la préparation administrée.

A côté des études précédentes portant sur les questions de sécurité, il reste à savoir si le traitement prévu sera efficace. Le modèle animal utilisé le plus souvent dans ce but est la souris invalidée pour le gène d'intérêt. Il est possible de vérifier si l'administration de la préparation contenant ce gène entraîne l'expression d'un transgène fonctionnel et fait disparaître de façon stable les symptômes pathologiques. Cependant, la souris mutante reste très éloignée de l'Homme et il paraît judicieux de rechercher d'autres modèles expérimentaux plus adaptés. Il existe bien quelques modèles de maladies héréditaires chez le Chien (maladie de Hurler, myopathie de Duchenne, hémophilie), mais leur utilisation reste très coûteuse.

Enfin, le devenir du transgène dans l'organisme doit être connu avant tout essai clinique. La biodisponibilité du vecteur et la durée de son expression sont des données essentielles. Les études de distribution du matériel injecté doivent rechercher la présence du transgène dans les tissus, notamment dans les gamètes pour tester le risque de transmission à la descendance, et définir également les lieux d'expression de la protéine. L'analyse des excréta doit être poursuivie durant une période suffisante pour évaluer le risque de dissémination dans l'environnement.

5. La réglementation des essais cliniques de thérapie génique

Les réglementations française et européenne se superposent. La réglementation française codifie les conditions d'autorisation des essais cliniques. La réglementation européenne définit dans quelles conditions une thérapeutique est considérée comme s'appliquant à une maladie orpheline. Elle définit également les étapes de l'enregistrement auprès de l'Agence Européenne du Médicament. La mise en place d'un statut du médicament " orphelin " en vue de faciliter le traitement des maladies rares avait été demandée par l'Académie nationale de médecine dans son rapport de 1995.

Le transgène n'est pas considéré en France comme une spécialité pharmaceutique qui relèverait du processus habituel d'autorisation de mise sur le marché (AMM), sa nature d'organisme génétiquement modifié (OGM) lui conférant des caractères spéciaux. Une double autorisation est nécessaire. La première est celle d'un comité consultatif pour la protection des personnes se prêtant à une recherche biomédicale (CCPPRB) saisi par l'investigateur et qui se prononce sur la conformité à la loi Huriot du projet présenté comme cela est obligatoire pour tout protocole de recherche biomédicale. Cependant, dans le cas de la thérapie génique, ce comité ne rend son avis définitif qu'à réception d'une copie de l'autorisation délivrée par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). Cette autorisation est donnée par le Directeur de l'Agence après avis de la commission prévue à l'article L 676-2 du Code de la Santé Publique dont la mise en place attend le décret d'application de la loi. Dans la période intermédiaire actuelle, le Directeur fait instruire le dossier par ses services et le transmet également pour avis, d'une part à la Commission de Génie Génétique (CGG) qui se prononce sur la classe de risque et le niveau de confinement pour la manipulation de l'OGM, d'autre part à la Commission d'étude de la dissémination des produits issus du Génie Biomoléculaire (CGB) qui se prononce sur la durée de confinement et les tests à pratiquer pour autoriser le patient à se soustraire aux conditions de confinement imposées. L'AFSSAPS sert de guichet unique. Cette agence dépend du ministère de la Santé alors que la CGG dépend du ministère de la Recherche et la CGB du ministère de l'Agriculture. L'AFSSAPS est saisie par le promoteur, habituellement un industriel ou un établissement public de recherche. La durée de l'instruction du dossier, sans compter le temps d'examen par le

CCPPRB, est de trois mois. Le dossier fournit des renseignements sur l'OGM (nature, construction et production, classement proposé), les locaux et le personnel relatifs au projet (conditions de confinement), les incidences sur l'environnement (transport et stockage de l'OGM, conditions de sortie de l'essai). Il doit détailler la stratégie adoptée pour le transfert de gène, les conditions de production, de stockage et de contrôle du produit fini, et fournir les données toxicologiques et pharmacologiques recueillies au cours de la phase d'études précliniques. Il doit enfin exposer le rationnel de l'essai, ses objectifs (de quelle phase relève-t-il ?) et résumer le protocole en indiquant les critères d'inclusion et d'exclusion des patients, les critères d'évaluation de l'activité et de la tolérance du produit, les conditions de suivi à court et à long terme.

Chaque pays de la Communauté Européenne applique sa propre législation et est souverain en matière d'autorisation sur son territoire. Certains pays ont une législation spécifique pour les médicaments de thérapie génique comme la France. C'est le cas du Royaume Uni où le " Gene therapy advisory committee (GTAC) " doit être obligatoirement saisi en complément du comité d'éthique local alors que dans d'autres pays aucune différence n'est faite avec les autres médicaments. Cependant, il existe une législation européenne qui concerne, d'une part les médicaments destinés aux maladies dites " orphelines ", et d'autre part la procédure d'enregistrement auprès de l'Agence Européenne du Médicament dont l'autorisation est nécessaire pour toute utilisation du produit dans la Communauté hors le territoire national. Les critères de désignation d'un médicament pour maladie " orpheline " exigent que la prévalence de la maladie ne dépasse pas cinq sur dix mille, qu'elle soit de gravité suffisante pour réclamer un traitement et que cet éventuel traitement puisse amener un bénéfice pour le malade. Un comité d'experts européens, le " Committee for orphan medicinal products " (COMP) siégeant à Londres, évalue la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit. L'avantage pour un produit de thérapie génique d'acquérir cette désignation est la diminution des frais d'enregistrement et l'exclusivité commerciale accordée au promoteur pour dix ans. La procédure s'effectue en trois temps : 60 jours de présentation et de validation du dossier, 90 jours d'examen par le Comité et 45 jours pour la décision finale de la Commission Européenne. Le COMP sert également de conseiller scientifique pour la préparation des dossiers d'enregistrement auprès de l'Agence Européenne du Médicament. Cette procédure

est obligatoire pour l'administration aux malades des produits de biotechnologie hors de France dans un autre état de la Communauté. Il s'agit d'une procédure coûteuse et de longue durée : quatre à six mois de présentation et de validation du dossier, quatre mois pour le premier rapport d'évaluation incluant les demandes d'éclaircissement, sept mois pour connaître l'opinion du comité instruisant le dossier y compris sur les réponses aux questions posées, trois mois pour l'avis définitif du comité et trois mois enfin pour l'avis de l'Agence Européenne. Le promoteur d'un produit de thérapie génique peut donc se limiter au dépôt de son projet à l'AFSSAPS et au CCPPRB de son choix s'il envisage un essai uniquement en France et ne prévoit pas une mise sur le marché dans d'autres pays. Dès que ses ambitions sont plus étendues, il doit passer par la législation européenne avec le risque d'un avis divergent de celui obtenu en France.[7]

6. OBSTACLES AU DÉVELOPPEMENT DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE ET RECOMMANDATIONS

a. -Les obstacles au développement de la thérapie génique

Ces obstacles sont de trois ordres : scientifiques, administratifs et financiers. Leur identification a été au coeur des discussions qui ont précédé la rédaction de ce rapport. Ils expliquent sans doute le fait que la France ne se situe, par le nombre des essais de thérapie génique réalisés, qu'au troisième rang, les deux premiers pays étant les Etats-Unis et le Royaume Uni. Il convient cependant de noter que, en contrepartie, la France n'a connu à ce jour, contrairement aux Etats-Unis, aucun accident majeur lié à la thérapie génique et que, par ailleurs, le brillant résultat obtenu par l'équipe du Professeur Alain Fischer chez quatre enfants atteints d'un grave déficit immunitaire constitue une première dans le traitement d'une déficience génétique caractérisée.

➤ Obstacles scientifiques

les obstacles scientifiques sont nombreux comme on peut s'y attendre pour une thérapeutique encore essentiellement expérimentale. Ces obstacles proviennent d'abord du fait que des questions scientifiques importantes restent à ce jour non résolues comme l'isolement et la transduction des cellules souches, le ciblage par les vecteurs des cellules à

transduire, le contrôle de la réponse immunitaire, la stabilité de l'expression du transgène. Au départ un problème conceptuel se pose, celui de la décision de lancer un projet. Une bonne décision suppose que la physiopathologie de la maladie à traiter soit clairement caractérisée, le gène d'intérêt reconnu et la cellule cible définie. L'ensemble des connaissances nécessaires ne peut être réuni que dans des équipes associant des compétences multiples en biologie moléculaire, physiopathologie et clinique médicale. De telles équipes sont encore trop peu nombreuses. Un autre obstacle vient ensuite, celui de l'expérimentation animale. Une des principales indications de la thérapie génique concerne les maladies héréditaires monogéniques. Malheureusement, les modèles de ces maladies chez les gros animaux manquent ou, s'ils existent, ne sont pas facilement disponibles ce qui handicape considérablement les études précliniques. De plus, les laboratoires capables de mener à bien les études pharmacologiques et toxicologiques du transgène chez l'animal sont en nombre insuffisant à la fois pour des raisons matérielles, le manque de personnel compétent et une préférence de beaucoup de pharmacologues académiques pour les essais cliniques. Il est également clair que de tels laboratoires ne peuvent fonctionner qu'en aval d'unités de production de vecteurs leur fournissant le matériel d'étude. Ces unités de production de vecteurs viraux et non viraux capables de respecter les bonnes pratiques de fabrication en fournissant un produit fini stable, pur, efficace et de concentration assurée sont encore trop peu nombreuses en France malgré les efforts de quelques industriels de la pharmacie pour atteindre une capacité suffisante à la réalisation des lots destinés aux essais cliniques. Leur mise en route est coûteuse du fait du confinement des locaux, de la qualification du personnel et du pari industriel sur leur avenir. Le même effort n'a pas été fait dans le domaine public. En particulier, la Pharmacie Centrale de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris ne possède pas de structures adaptées à la production ou à la mise en forme pharmaceutique de préparations contrôlées destinées à la thérapie génique à partir des recherches faites dans les laboratoires du secteur public. Enfin, des essais cliniques convaincants nécessitent l'inclusion d'un nombre suffisant de malades dont le recrutement implique des essais multicentriques à l'échelon européen dans le cas des maladies rares et des moyens hospitaliers adéquats en raison des précautions qu'imposent de telles études.

➤ **Obstacles administratifs :**

La réglementation de la thérapie génique en France repose sur de nombreux textes parus successivement au fil des ans et dont les décrets d'application relèvent de trois ministères (Santé, Recherche, Agriculture) avec parfois des retards gênants telle l'absence de parution du décret concernant l'autorisation obligatoire de l'AFSSAPS pour les essais cliniques de thérapie génique alors que la loi date de 1996. Malgré un effort de simplification des procédures, celles-ci sont nettement plus longues que dans d'autres pays, notamment les Etats-Unis, et manquent de transparence. Le nombre d'experts compétents en thérapie génique est trop limité ce qui favorise les conflits d'intérêt. Les procédures ne sont pas contradictoires et les différentes législations européennes ne sont pas harmonisées.

➤ **Obstacles financiers :**

Les structures de production de lots cliniques de vecteurs destinés à la thérapie génique nécessitent des investissements lourds, en raison notamment des exigences des bonnes pratiques de fabrication. La situation actuelle est celle de la pénurie due au nombre très limité de firmes pharmaceutiques possédant cette capacité et à l'absence dans le secteur public de toute installation pouvant suppléer cette carence en cas de maladies rares n'entrant pas dans les objectifs de l'industrie privée. Cette situation découle essentiellement de problèmes financiers. En outre, l'expérimentation sur gros animaux et les demandes d'enregistrement ont également un coût élevé qui parfois peut être dissuasif.

b. Recommandations

En 1994, le ministère de la Santé a créé un “ Groupe de Réflexion sur la Thérapie Génique ” dont les travaux ont abouti à un rapport rédigé par les professeurs J.-P. Cano et A. Fischer. Ce rapport présentait une série de propositions pour stimuler et mieux encadrer la recherche et le développement de produits destinés à cette nouvelle thérapeutique, dont certaines touchaient au domaine réglementaire. Il introduisait une distinction entre l'ensemble vecteur-transgène considéré comme un médicament et la réinjection dans l'organisme de cellules ou tissus modifiés génétiquement *in vitro* qui eux n'étaient pas considérés comme tels. Cette question avait été débattue.

En 1995, l'Académie nationale de médecine a émis des recommandations en conclusion de son rapport sur le diagnostic génétique et la thérapie génique. Nous ne considérerons que celles ayant trait à la thérapie génique. Plusieurs de ces recommandations ont été suivies d'effet : (i) création d'une commission chargée d'examiner les protocoles de thérapie génique et de les autoriser, structure créée avec l'AFSSAPS ; (ii) mise en place d'un statut du médicament orphelin réalisé par l'instauration au plan européen du " Committee for Orphan Medicinal Products " chargé d'examiner les dossiers d'habilitation selon un processus comparable à ceux en cours aux Etats-Unis avec l'" Orphan drug act " et au Japon. D'autres recommandations n'ont pas été appliquées à ce jour : (i) création d'unités de production de vecteurs ; (ii) incitation à une meilleure coopération entre les établissements de recherche publique et l'industrie pharmaceutique ainsi que mise en place dans les hôpitaux de centres spécialisés en thérapie génique ; (iii) réflexion sur la brevetabilité de la séquence d'ADN du génome humain incluse dans le produit administré.

Au terme du bilan que nous avons dressé, nous ne reviendrons pas sur les recommandations qui ont été suivies d'effet, nous compléterons celles déjà retenues mais non réalisées et nous ajouterons celles qui nous semblent nécessaires avec l'expérience d'une période supplémentaire de dix ans. Ces recommandations touchent au domaine scientifique, à l'enseignement et au domaine administratif.

➤ **Dans le domaine scientifique :**

- Développer les recherches notamment dans trois directions, la vaccination génique, les techniques de blocage de l'expression des gènes et la réparation des gènes. Bloquer l'expression d'un gène est nécessaire chaque fois que la mutation est associée à un gain de fonction. L'approche anti-sens utilisant des séquences nucléotidiques s'appariant à des brins d'ADN ou d'ARN peut permettre d'y parvenir. La technique nouvelle de chiméraplastie qui repose sur l'utilisation d'une chimère d'ADN et d'ARN apparaît également prometteuse et aurait l'intérêt remarquable d'assurer la guérison sans nécessité d'un traitement prolongé puisqu'elle a pour objet de corriger définitivement la mutation.

- Encourager les études physiopathologiques afin d'identifier les gènes cibles appropriés dans les maladies susceptibles d'être traitées par thérapie génique. Cette identification impose de caractériser la ou les protéines codées et de définir leurs fonctions. Ce type d'études est facilité lorsqu'on dispose d'animaux invalidés pour le gène considéré. Des laboratoires capables d'explorer les fonctions physiologiques des souris, animaux de choix pour la transgénèse, ont été créés ou sont en cours de création. Ce processus doit être poursuivi. Néanmoins, la Souris par sa petite taille, ne se prête pas facilement aux explorations physiologiques et des études complémentaires sur de gros animaux porteurs de la mutation sont souhaitables. Pour disposer de tels modèles, il conviendrait de mobiliser les vétérinaires afin qu'ils s'efforcent de dépister chez les animaux qu'ils traitent, bétail et animaux de compagnie, des anomalies pouvant être héréditaires. Ces animaux devraient être adressés aux écoles vétérinaires pour identification de la maladie et, le cas échéant, création d'une lignée.

- Encourager les recherches sur les vecteurs. Le vecteur idéal n'existe pas encore et il convient d'essayer de s'en rapprocher. Ce vecteur devrait posséder les qualités suivantes : être spécifique de la population cellulaire ciblée, assurer un transfert efficace et prolongé, mais réversible à volonté par un contrôle pharmacologique adéquat, n'entraîner aucun risque de complication infectieuse ni de développement tumoral et ne pas déclencher de réaction immunitaire susceptible de le neutraliser, être enfin facile à produire industriellement dans des conditions reproductibles et à un coût acceptable. Le besoin d'une standardisation précise permettant des mesures d'activité et des comparaisons entre laboratoires est toujours d'actualité. Il existe déjà en France, en grande partie grâce à l'Association contre les myopathies (AFM), des unités de production de vecteurs à usage expérimental (Evry et Nantes). Il manque des unités de production pouvant répondre aux besoins des investigateurs pour les essais cliniques en complément de celles dépendant de l'industrie. L'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, une des plus importantes structures hospitalières du monde, ne peut actuellement préparer des produits de thérapie génique. Une structure nouvelle associée à la Pharmacie Centrale des Hôpitaux serait très souhaitable. Cette mise en place pourrait être associée à la création de centres de thérapie génique et cellulaire au sein des Hôpitaux de Paris et en Province qui réuniraient le maximum de compétences et grouperaient à la fois des laboratoires de recherche et développement et des lits spécialisés en confinement protégé. La

région Languedoc-Roussillon envisage la création d'un centre de ce type à Montpellier. Au plan national, il convient de se féliciter du lancement par l'INSERM d'un appel d'offres en 2001 ayant pour objectif de soutenir la mise en place dans les hôpitaux de centres de recherches en thérapie cellulaire et génique. Cette initiative devrait favoriser le partenariat entre les administrations hospitalières, les universités, les établissements publics de recherche et les Associations.

- Imposer un contrôle pharmacologique des produits de thérapie génique à l'instar de ce qui est fait pour tout nouveau médicament. Ces contrôles pharmacologiques devront explorer le devenir dans l'organisme des produits injectés ainsi que leurs effets : effets attendus en relation avec les indications thérapeutiques et effets secondaires. De telles explorations ne sont prédictives de ce qui peut advenir chez le malade qu'à la condition d'être effectuées sur de gros animaux chez lesquels les progrès techniques actuels permettent de tester des méthodes invasives ou non, proches de celles utilisées chez l'Homme. 7

II. La thérapie génique en pratique

La thérapie génique, ou transfert d'un gène à effet thérapeutique (ou marqueur), est conceptuellement très simple : il s'agit d'introduire un matériel génétique dans une cellule pour en corriger le phénotype « malade ». La thérapie génique a été développée tout d'abord dans le cadre des maladies génétiques où il est bien sûr tout à fait logique et naturel de corriger le défaut génétique à l'origine de la maladie. Mais le concept s'est très rapidement étendu aux autres maladies beaucoup plus fréquentes, à savoir les maladies cancéreuses, les maladies infectieuses (infections virales, en particulier le sida) et les maladies dégénératives.

En pratique, de nombreux obstacles existent pour rendre la stratégie efficace : Quel gène thérapeutique choisir ? Quelle cellule cible choisir et comment l'atteindre ? Quel système de transfert utiliser pour une expression appropriée, stable ou non ?

L'application de la thérapie génique en hématologie est extrêmement facilitée par la nature particulière du tissu-cible : les cellules de la moelle osseuse. En effet, la moelle est relativement facile à manipuler, à cultiver en présence de facteurs de croissance appropriés, de manière à effectuer un transfert de gènes *ex vivo* avant sa réinjection intraveineuse une fois génétiquement modifiée[18] (*figure 2*). [33]

1. Les cellules hématopoïétiques, cible du transfert de gènes

Du fait de ses propriétés de prolifération et de différenciation vers les différentes lignées hématopoïétiques, la cellule souche est une cellule cible idéale pour le transfert de gènes. Les sources de cellules hématopoïétiques sont essentiellement de trois ordres : le sang de cordon chez le fœtus et le nouveau-né, la moelle osseuse et le sang périphérique. Dans ce dernier cas, la présence de cellules progénitrices dans le sang circulant est connue depuis longtemps, mais leur concentration est très faible par rapport à celle de la moelle osseuse. Cette concentration peut fortement augmenter pendant la phase de régénération médullaire après chimiothérapie intensive [18], ou après administration chez le patient de facteurs de croissance tels que le GM-CSF (*granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*) [19] ou le G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) [20].

Les cellules souches du sang périphérique sont utilisées de façon croissante et tendent à supplanter les greffons médullaires [21]. Les progrès importants réalisés dans la connaissance de l'hématopoïèse ont permis de développer des méthodes de purification des cellules hématopoïétiques primitives. L'antigène CD34 est l'antigène de référence utilisé pour purifier les cellules hématopoïétiques. Il est exprimé par 2 à 4 % des cellules médullaires normales, 1 à 6 % des cellules du sang de cordon et 0,02 à 0,1 % des cellules du sang périphérique [22,23]. Les cellules CD34⁺ représentent une population hétérogène comprenant les cellules clonogéniques, qui regroupent les progéniteurs engagés dans les voies myéloïde, érythroïde et mégacaryocytaire, et des cellules plus primitives capables d'initier des cultures à long terme (LTC-IC, ou *long term culture-initiating cells*) dont une fraction est capable de reconstituer l'hématopoïèse *in vivo* [24-25]. Les cellules souches possèdent d'autres caractéristiques phénotypiques qui sont une absence d'expression du CD38 et de l'antigène HLA-DR, et une faible expression de l'antigène thy 1 [26-27].

2. Différents vecteurs pour le transfert de gènes

Le transfert d'ADN dans les cellules en culture, destinées à être réimplantées, doit être très efficace pour limiter au maximum les opérations de sélection des cellules modifiées. En effet, ces opérations risquent de modifier les caractéristiques des cellules, et notamment leurs propriétés d'auto renouvellement et de différenciation nécessaires au bon fonctionnement de l'autogreffe de cellules génétiquement modifiées. De nombreuses méthodes permettant de transférer de l'ADN dans les cellules ont été décrites. Il s'agit soit de méthodes dites non virales, soit de méthodes virales.

La transfection utilise, pour transférer l'ADN étranger dans les cellules hôtes, des méthodes chimiques, comme la co-précipitation au phosphate de calcium, ou l'utilisation de complexes variés de l'ADN avec des vésicules lipidiques (liposomes) ou des protéines (protéosomes). Cependant, l'efficacité du transfert d'ADN par transfection est à ce jour très faible.

La transduction utilise pour le transfert d'ADN des virus comme les rétrovirus (dont les lentivirus), les adénovirus, les virus associés à l'adénovirus (AAV) (*tableau 2*).[33]

Tableau 2 propriétés des différents vecteurs viraux [33]

VECTEUR VIRAUX	SPECIFITE CELLULAIRE	LOCALISATION SUBE-CELLULAIRE	TAILLE MAXIMALE DE L'INSERT
Retrovirus	Large cellules en division	Intégration au hasard dans l'ADN chromosomique	7-7.5KB
Adenovirus	Très large	Intégration en un site privilégié de l'ADN chromosomique ou extra chromosomique	+/- 30KB 3.5-4KB
Lentivirus	Très large (si pseudo typé par l'enveloppe du VSV-G)	Intégration au hasard dans l'ADN chromosomique	7-7.5KB

Les méthodes de transfert viral, et notamment rétroviral, sont actuellement beaucoup plus efficaces que les méthodes de transfert non viral. Les rétrovirus recombinants classiques, dérivant du génome du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV), permettent d'infecter avec une bonne efficacité une très grande variété de cellules en culture. Ils sont capables d'intégrer très efficacement leur matériel génétique dans le génome des cellules cibles en y constituant un « provirus » de structure bien définie et stable (*figure 2*).[33]

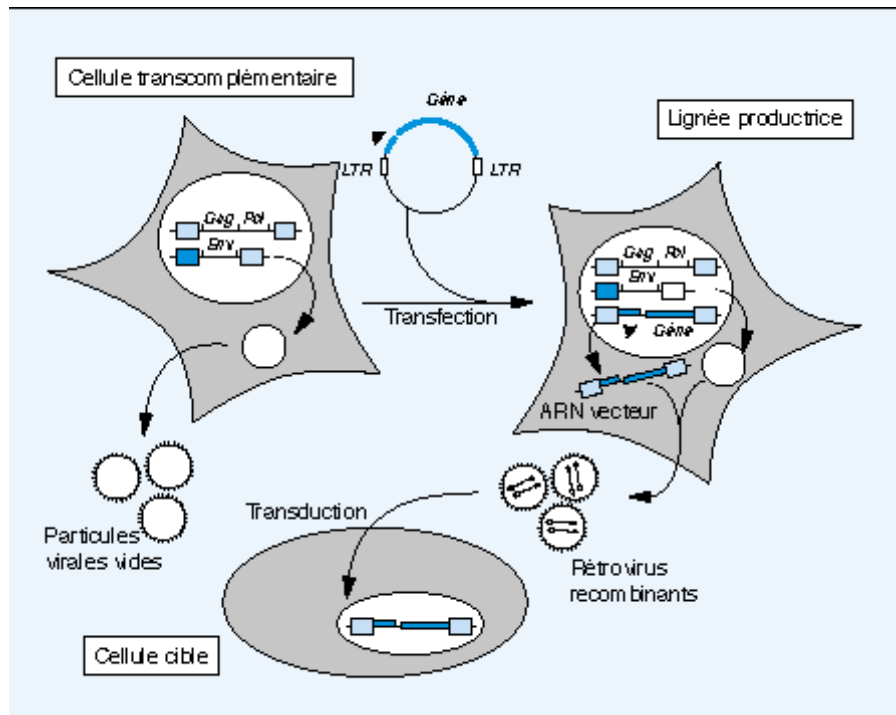


Figure 2. Principe du transfert de gènes à l'aide de rétrovirus recombinants.[33]

Le vecteur rétroviral porte le gène thérapeutique et une séquence d'encapsulation *psy*. Lorsqu'il est introduit dans les cellules trans-complémentantes contenant le provirus MoMLV dépourvu de sa séquence *psy*, une lignée productrice est établie. Les particules rétrovirales produites sont capables d'infecter les cellules cibles et d'y intégrer leur génome, mais ne sont pas capables de réplication. Le tropisme du vecteur rétroviral recombinant est déterminé par les glycoprotéines d'enveloppe codées par le gène *env*. Ces glycoprotéines se fixent à des récepteurs spécifiques membranaires nécessaires à l'entrée du rétrovirus dans la cellule.[33]

La modification génétique est donc transmise aux cellules dérivant des cellules initialement transduites et elle devient permanente si on réussit à modifier les cellules souches d'un tissu [28]. L'enveloppe amphotrope des vecteurs rétroviraux provenant du virus de Moloney peut être aujourd'hui remplacée par celle du virus de la leucémie du gibbon (GALV), ce qui améliore l'efficacité de transduction. Cette amélioration serait due à un niveau d'expression plus fort à la surface des cellules souches hématopoïétiques du récepteur utilisé par le GALV comparé à celui du virus amphotrope de Moloney.

La limitation principale de ce type de vecteur est la nécessité d'une division de la cellule cible pour obtenir une intégration chromosomique. Or la grande majorité des cellules souches sont quiescentes. Il est donc nécessaire de les mettre en cycle. De nombreuses études ont pour objet de trouver la combinaison de facteurs de croissances (interleukine 3, *stem cell factor*, flt3-ligand, thrombopoïétine...), permettant une prolifération des cellules souches sanguines sans provoquer une différenciation terminale avec perte de la totipotence cellulaire.

À ce jour, plus de 80 % des 350 protocoles cliniques de thérapie génique acceptés ont pour principe la transduction, avec une majorité utilisant la transduction rétrovirale. La liste des protocoles cliniques est régulièrement mise à jour dans la revue *Human Gene Therapy*.

Les adénovirus recombinants restent dans le cytoplasme de la cellule en position extrachromosomique et le transgène est en général perdu par effet de dilution au cours des divisions cellulaires successives. Ils peuvent conduire à une réaction immune de rejet par l'organisme hôte. En revanche, les avantages des vecteurs adénoviraux, par rapport aux rétrovirus, sont d'une part leur grande stabilité et leur titre très élevé, et d'autre part leur capacité à infecter les cellules qui ne se divisent pas. Aussi, leur utilisation est appelée à se développer dans le cadre de la thérapie génique anticancer [29].

Le virus associé à l'adénovirus (AAV) est un parvovirus non pathogène nécessitant l'adénovirus comme auxiliaire pour sa réplication. L'intérêt de ce vecteur réside dans le fait qu'il peut infecter des cellules qui ne se divisent pas. Cependant, si l'expression transitoire est très efficace, l'intégration chromosomique reste faible et l'expression d'un gène fonctionnel décline progressivement au cours des divisions cellulaires.

L'avenir des vecteurs viraux s'oriente d'une part vers les systèmes d'expression à plusieurs gènes (*figure 3*)/[33] et d'autre part vers les vecteurs lentiviraux qui combinent les avantages respectifs des rétrovirus classiques (intégration dans le génome) et des adénovirus (infection des cellules quiescentes). Le remplacement de l'enveloppe du lentivirus par la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) confère à ce type de vecteur un tropisme très large et une stabilité de la particule permettant une concentration des rétrovirus par ultracentrifugation [30,31].

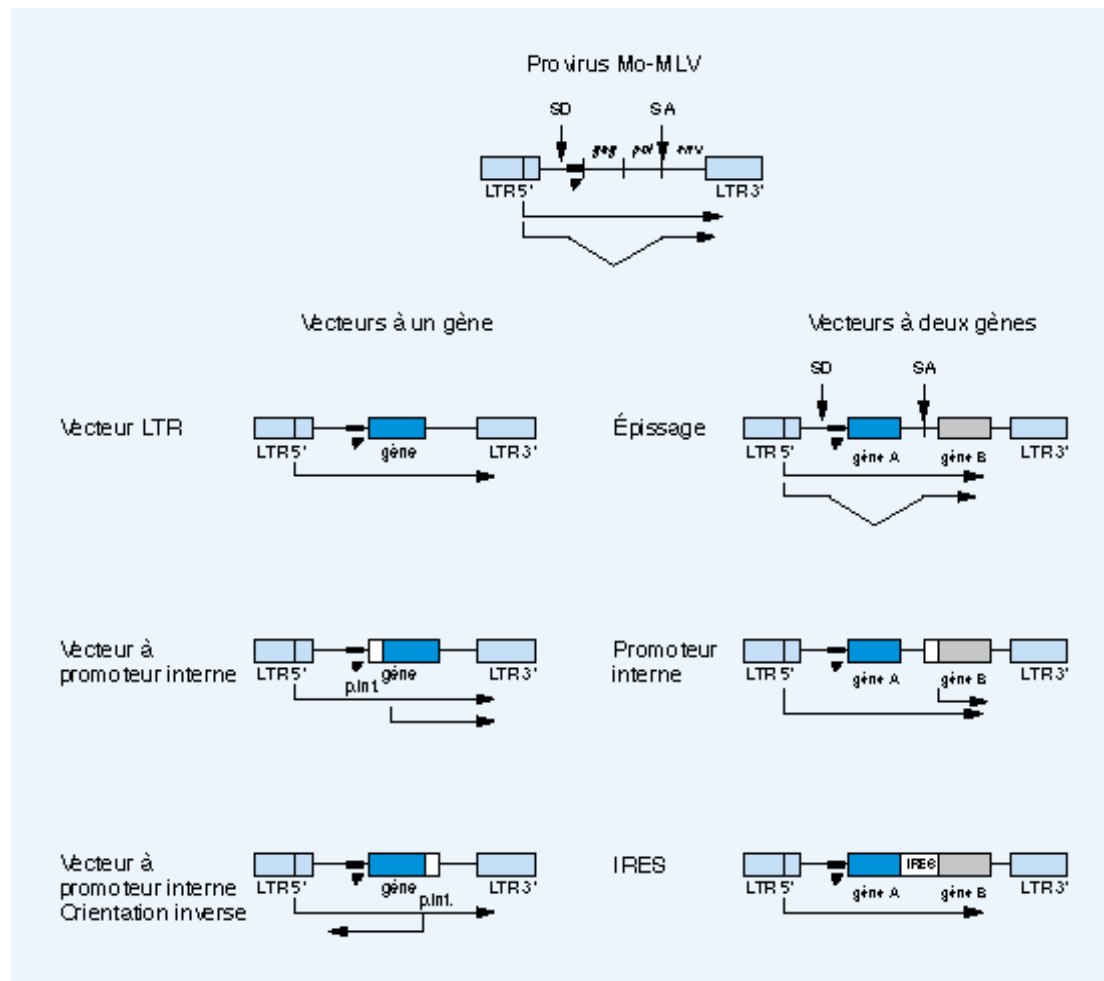


Figure 3 . Les différents types de vecteurs rétroviraux.[33]

On distingue les vecteurs à LTR (longue répétition terminale) et les vecteurs à promoteurs internes. Pour les vecteurs à LTR, la transcription du transgène est sous la dépendance des signaux transcriptionnels du LTR en 5'. Dans les vecteurs à « promoteur interne », l'expression d'un ADNc transféré est sous la dépendance d'un promoteur hétérologue (d'origine virale ou cellulaire). Le promoteur interne peut être en orientation inverse pour limiter les interférences avec le promoteur LTR 5' rétroviral. Pour les constructions à deux gènes, l'expression des deux gènes peut être sous la dépendance : soit d'un seul promoteur LTR en 5', le deuxième gène étant en aval d'un site accepteur d'épissage ou sous des séquences internes d'entrée des ribosomes (IRES), soit de deux promoteurs, par exemple un LTR 5' et un promoteur interne. Le sens des flèches correspond au sens de la transcription. [33]

p. int : promoteur interne

SD, SA : sites donneurs et accepteurs d'épissage ;

IRES : séquences internes d'entrée des ribosomes.

3. Marquage génique

Le dernier développement du marquage génique se situe dans le cadre de l'amplification des cellules du greffon. Pour diminuer la durée de la phase d'aplasie après une autogreffe de cellules souches sanguines, un certain nombre d'équipes réalisent une amplification des cellules *ex vivo* avant la réinjection. Deux types de greffe sont alors réalisés simultanément chez le patient, la greffe des cellules souches sanguines d'origine et la greffe de ces mêmes cellules amplifiées pendant 8 à 12 jours. Afin de déterminer pour chaque population la contribution et la cinétique de reconstitution hématologique, un marquage s'avère nécessaire pour discriminer les deux populations [31](figure 4)[33].

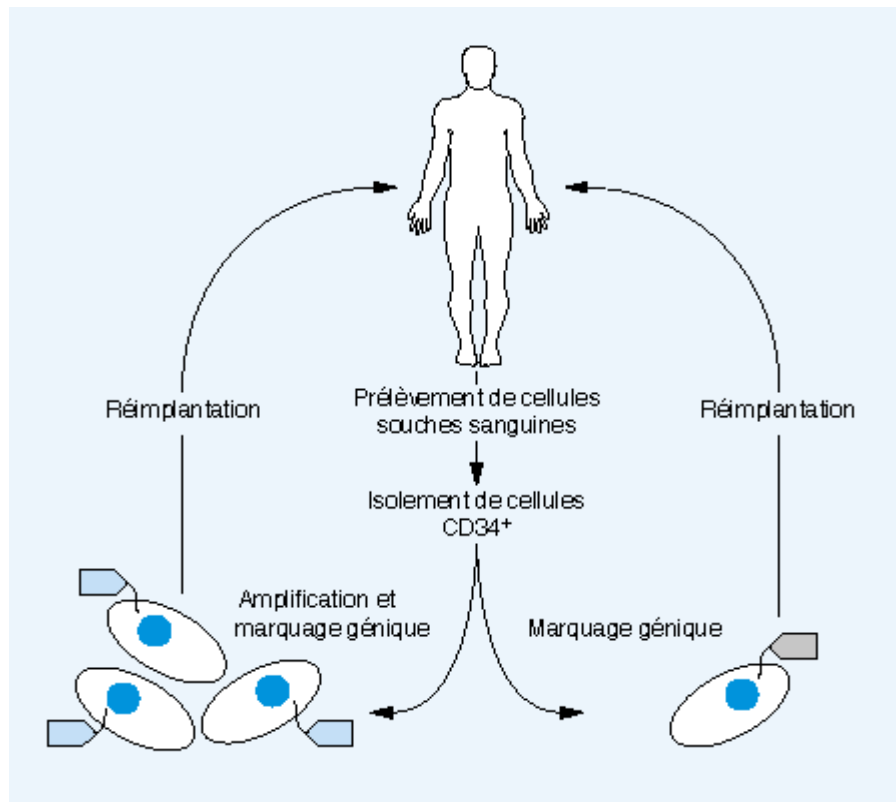


Figure 4. Principe du marquage génétique dans le cadre des autogreffes de moelle osseuse.[33]

Les cellules hématopoïétiques du patient sont prélevées et purifiées à l'aide d'un anticorps anti-CD34. Une partie sera congelée directement. Une deuxième partie sera amplifiée pendant 8 à 15 jours en présence de cytokines et marquée génétiquement. Les deux populations de cellules seront ensuite réinjectées au patient. Le marquage génétique sera ensuite étudié après reconstitution hématopoïétique *in vivo*. Le double marquage génétique consiste à marquer de manière différentielle les deux populations comme cela est représenté sur la figure. [33]

Dans cette partie on va faire part des récents essais entamés dans le cadre des maladies génétiques héréditaires plus spécialement la drépanocytose par la technique révolutionnaire Crispr/cas9

III. Les récents essais en thérapie d'édition du génome cliniquement praticable par le système CRISPR-Cas9 dans les maladies héréditaires monogéniques⁵ (les hémoglobinopathie)

1. Principe d'édition par le système CRISPR-Cas9.

Le système CRISPR utilise un ARN guide (ARNg) constitué d'une séquence constante de 42 nucléotides et d'une séquence variable de 20 nucléotides complémentaires d'une séquence choisie d'ADN (*Figure 5A*) [39]. Ce système est, à l'origine, présent chez les bactéries qui l'utilisent pour dégrader des séquences d'ADN non autologues provenant de plasmides ou de virus. C'est donc une sorte de système « immunitaire » bactérien qui leur permet de se protéger contre les infections virales [34]. À cette fin, les bactéries et les archées capturent de petits fragments d'ADN d'environ 30 paires de bases (appelés protospacers) provenant des phages ou des plasmides envahisseurs, et les insèrent dans leur propre génome. Ces séquences sont transcrites en ARN pré-CRISPR (*pre-crRNA*) et traitées pour donner naissance à un crARN (CRISPR-ARN). Il existe trois types de système CRISPR qui ciblent l'ARN ou l'ADN exogènes. Nous n'aborderons dans cette revue que le système de type II qui est le plus utilisé pour l'édition de gènes à des fins thérapeutiques.

Le système CRISPR de type II est composé de trois éléments le crARN qui est composé d'un ARN provenant de la transcription de l'ADN sauvegardé dans la matrice CRISPR et d'une partie d'une répétition un second ARN présentant une complémentarité partielle avec la répétition, connu sous le nom de tracrARN (*trans-activating crRNAs* [*tracrRNA*]) ; et la nucléase Cas9. Le complexe formé par le crARN et le tracrARN active la Cas9 et la guide vers sa cible. En 2012, Jinek et ses collègues [35] ont fusionné le crARN et le tracrARN de la bactérie *Streptococcus pyogenes* en un seul ARN guide (ARNg) qui induit de façon efficace le clivage par la Cas9 (*Figure 5A*) [39]. La Cas9 possède deux régions à activité nucléase, chacune permettant de cliver un brin de l'ADN ciblé. Elle se lie en premier à une séquence spécifique de 3 à 5 nucléotides appelée *protospacer adjacent motif* (PAM), située après la séquence ciblée par l'ARN guide, puis au complexe formé entre l'ARN guide et l'ADN. Pour

⁵ : Maladie génétique qui est due à la présence d'une ou plusieurs mutations au sein d'un seul gène.

la Cas9 provenant de *S. pyogenes*, le motif PAM est formé par les nucléotides NGG (nucléotide-guanine-guanine). Les PAM sont très fréquents dans tous les génomes. Ils ne limitent donc pas le nombre de séquences qui peuvent être ciblées. Il est aussi possible d'utiliser des Cas9 provenant d'autres bactéries qui possèdent des PAM différents.

Dès la publication de l'article de Jinek et ses collègues [35], les possibilités d'ingénierie du génome que présente le système CRISPR/Cas9 apparurent évidentes à plusieurs équipes. En janvier 2013, quatre groupes avaient déjà appliqué ce système à des cibles génomiques présentes dans des cellules humaines [36-37] et Gratz et ses collaborateurs décrivaient son utilisation dans la drosophile [38]. D'autres publications ont relaté l'emploi du système pour induire des mutations ciblées dans les bactéries, les embryons de poisson zèbre et des cellules de mammifères. Depuis, des mutations ont été réalisées dans des plantes, des nématodes, des souris, des rats, des primates non humains et dans des cellules souches pluripotentes humaines.

Un consensus ressortant de ces différentes études est que l'ARN guide (ARNg) doit avoir une séquence de guidage de 17 à 20 nucléotides correspondant à l'ADN ciblé, suivie d'un motif constant correspondant au PAM spécifique de la Cas9 sélectionnée. L'ARNg est produit par transcription *in vitro* ou *in vivo*, et est habituellement associé aux promoteurs SP6, T3 et T7 (issus des bactériophages du même nom). L'ARN guide, ou l'ADN le codant, peut être introduit dans des cellules en utilisant, par exemple, des vecteurs viraux.

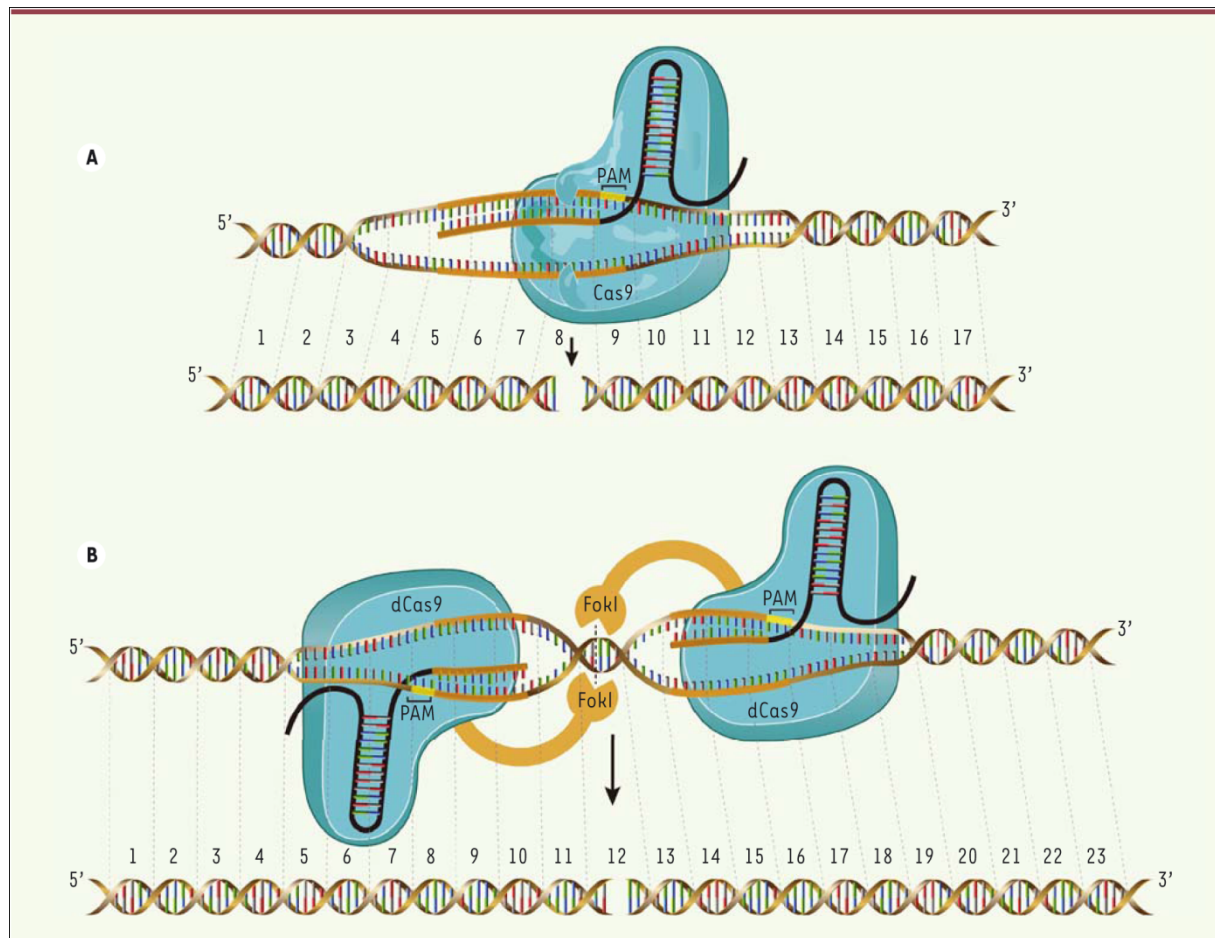


Figure 5. Représentation du système CRISPR/Cas9. [39]

A. Pour couper un gène avec la méthode CRISPR, il faut un ARN guide (ARNg) (noir et marron) complémentaire à une séquence de 17 à 20 nucléotides du gène ciblé. La seule restriction est que cette séquence doit être suivie par une séquence NGG ou NGA (appelée un PAM). L'ARNg forme un complexe avec l'ADN et la nucléase Cas9 (en bleu). La coupure par la nucléase se fait exactement trois nucléotides avant le PAM. Les lignes pointillées relient les séquences de nucléotides qui sont les mêmes avant et après la coupure.

B. Pour éviter de couper des séquences d'ADN similaires à celle qui est ciblée, il est possible d'utiliser une nucléase Cas9 non-fonctionnelle (dCas9) qui est fusionnée avec la nucléase FokI. La nucléase FokI doit former un dimère pour couper l'ADN. Ce dimère ne peut être formé que si deux ARNg ciblent des séquences de nucléotides séparées de 13 à 17 nucléotides.

➤ L'histoire des CRISPR

Date de la fin des années 1980. Une équipe japonaise découvre alors une séquence d'ADN chez la bactérie *E. coli*, qui comprend un fragment d'ADN ressemblant à un bactériophage entre deux séquences répétées palindromiques. Ce n'est qu'au milieu des années 2000 que l'on découvre qu'il s'agit là d'un système immunitaire primitif de bactéries leur permettant de se défendre contre les infections virales [40]. En effet, l'ARN transcrit à partir de cette séquence (crARN) subit une maturation en une bibliothèque de petits ARN contenant chacun une séquence guide dérivée du génome de bactériophages virulents. Chacun de ces petits ARN est lié à des protéines associées (Cas) qui sont des nucléases, et les complexes ainsi formés patrouillent dans l'environnement cellulaire à la recherche de l'envahisseur porteur du génome viral homologue. Si la bonne cible est identifiée, elle sera clivée par la nucléase, l'empêchant de poursuivre sa route et protégeant d'autant la cellule de l'infection.

Il faudra attendre encore quelques années pour qu'une chercheuse française, Emmanuelle Charpentier, et son équipe, qui travaillaient alors sur la bactérie *Streptococcus Pyogenes*, identifient chez celle-ci un système CRISPR dépendant d'une seule nucléase Cas9. Un duplex est formé entre le crARN et un ARN transactivateur, appelé tracrARN, qui active Cas9 et guide l'endonucléase vers la cible [41]. La même équipe montre par la suite que le clivage de chacun des brins de l'ADN requiert ce duplex d'ARN : crARN-guide et tracrARN [35], qui tous deux peuvent être associés en une seule molécule guide. Cas9 coupera la séquence d'ADN cible sur les deux brins seulement si celle-ci est flanquée d'une séquence de trois nucléotides NGG, appelée PAM (*proto-spacer adjacent motif*), présente à une fréquence élevée dans le génome tant elle est peu discriminante [42] (*Figure 6*) [39]. Tout s'emballe alors rapidement. La première démonstration de l'utilisation du système CRISPR-Cas9 pour modifier spécifiquement le génome de cellules eucaryotes date de 2013 [43-36]

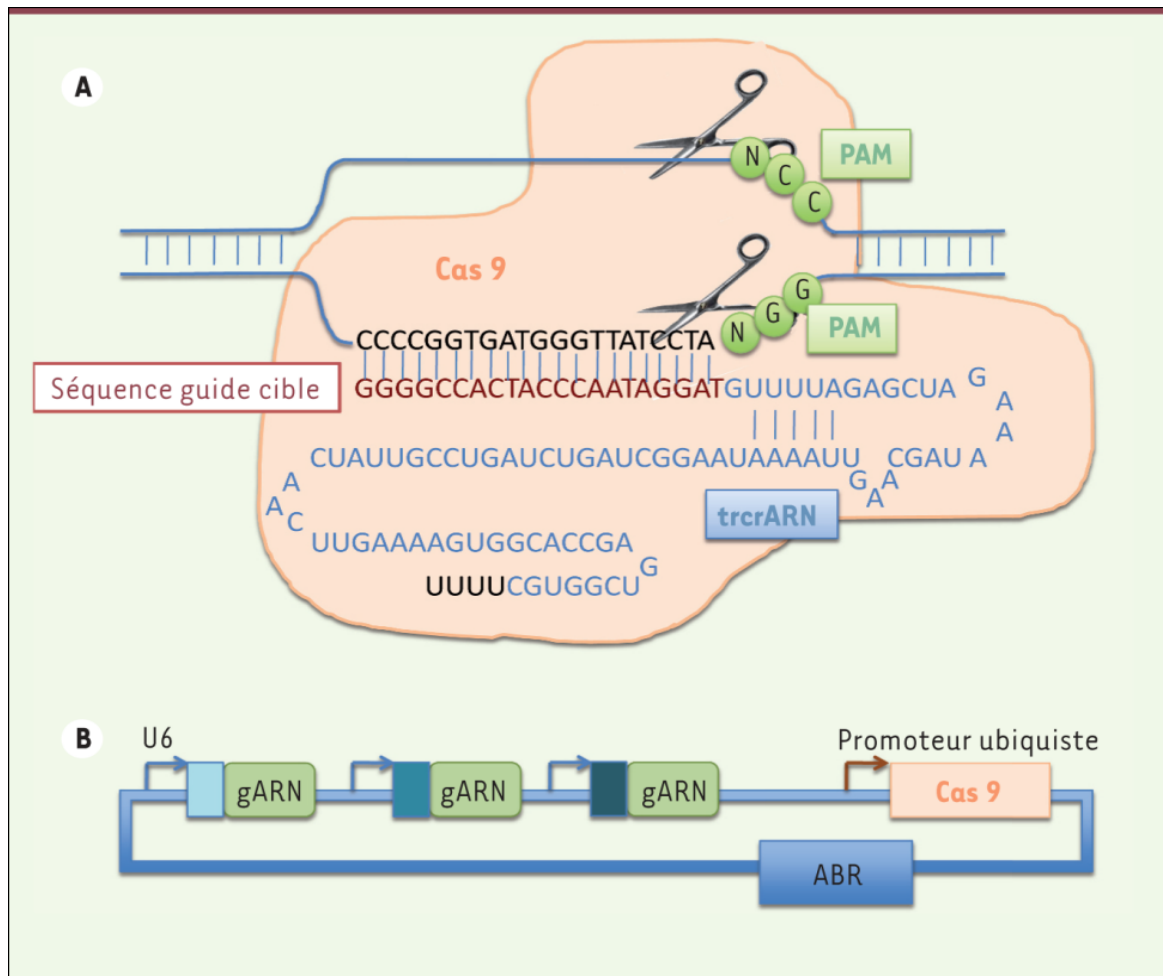


Figure 6 Principe d'editing par le système CRISPR-Cas9. [39]

A. Cassure double brin par le système CRISPR-Cas9. La nucléase Cas 9 (en orange) est guidée par une séquence comprenant une séquence ARN homologue à la séquence cible (en rouge) et une séquence appelée trcrARN (en bleu). La nucléase CRISPR-Cas9 cible une séquence de 3 nucléotides de type NGG appelée PAM (en vert), ouvrant l'ADN complémentaire à la séquence guide (en noir) et créant un hétéroduplex, sgARN-ADN cible. Cas9 comprend deux domaines nucléasiques coupant chacun un des brins d'ADN.

B. Construction multiplex. Un seul plasmide peut contenir plusieurs séquences guide (gARN) ainsi que la séquence codant pour Cas9 et un gène de résistance à un antibiotique (ABR).

Les technologies de modification du génome évoluent rapidement. Il y a quelques années encore, les nucléases à doigts de zinc (en anglais *zinc finger nucleases*, ZFN) étaient la seule option à la disposition des chercheurs voulant modifier un génome. À la fin de 2011, une nouvelle méthode de modification des gènes, celle des TAL *effector nucleases* (TALEN) [44], a été découverte. Elle a été sélectionnée par la revue *Nature Methods* comme la « Méthode de l'année ». Cette nouvelle technologie permettait de cibler des séquences de nucléotides plus facilement qu'avec des nucléases à doigts de zinc [45]. Dès janvier 2013, une autre méthode a cependant émergé à partir de travaux indépendants de plusieurs groupes de recherche. Cette nouvelle méthode (désignée sous le nom CRISPR, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) utilisait une nucléase appelée Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*) pour couper l'ADN et permettre l'édition du génome⁶ [46]. Les trois types de nucléases partagent le même mécanisme d'action : elles clivent l'ADN chromosomique de manière spécifique (*Figure 7*) [39] en déclenchant les systèmes endogènes de réparation de l'ADN introduisant une modification génomique ciblée. Chaque nucléase possède toutefois des caractéristiques uniques [47, 48]

⁶ De l'anglais *genome editing*, « réécriture du matériel génétique »

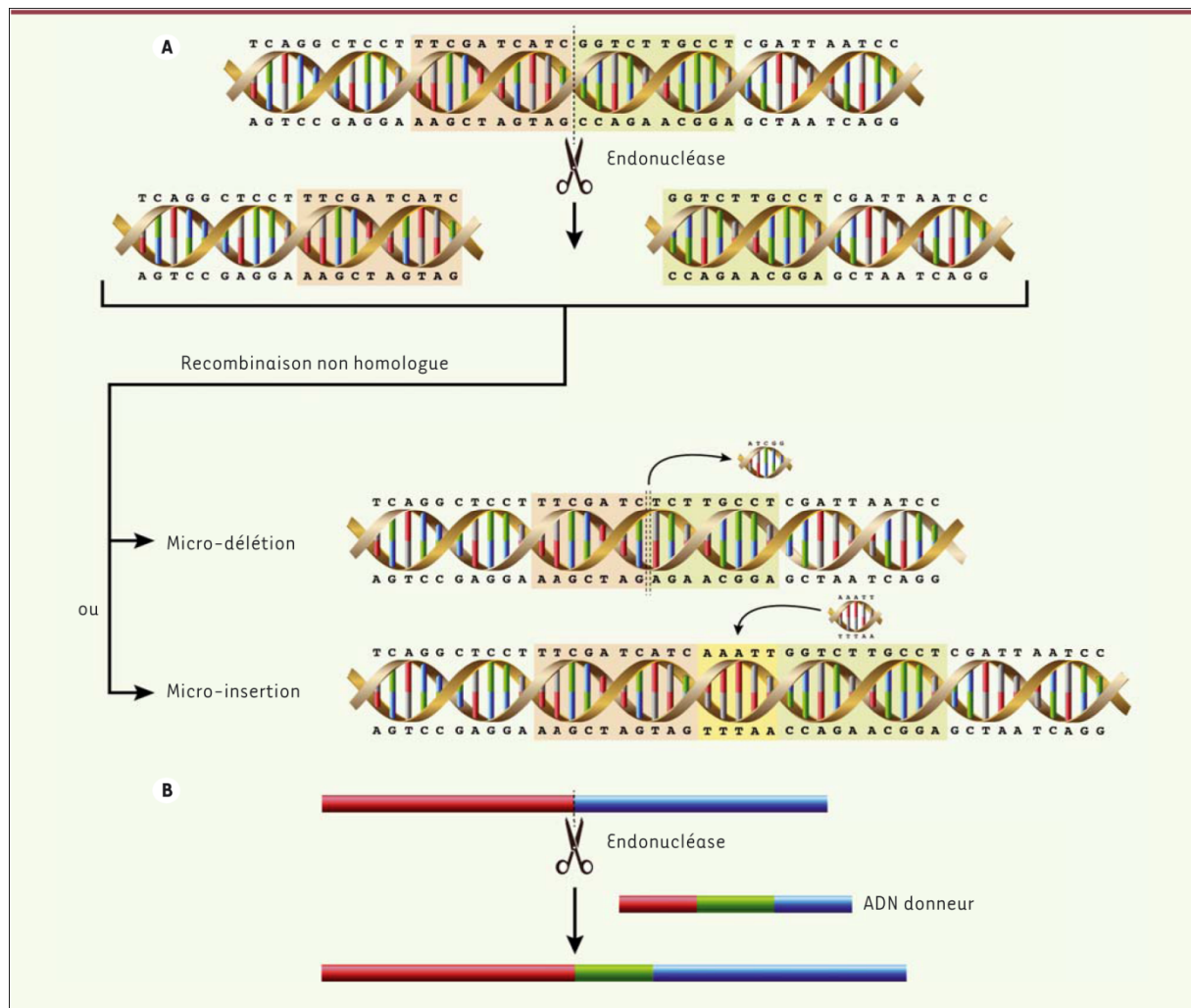


Figure 7 Principes de l'édition du génome à l'aide de nucléases. [39]

Plusieurs sortes d'endonucléases (méganucléases, nucléases à doigts de zinc, nucléases TAL effecteur et la combinaison d'un ARN guide et d'une Cas9) peuvent être conçues et produites par des méthodes de biologie moléculaire pour cibler une séquence choisie d'ADN afin d'y induire des coupures touchant les deux brins. Ces coupures peuvent être réparées soit par recombinaison non-homologue

(A) soit par recombinaison homologue

(B) . Pour la recombinaison homologue, la présence d'une séquence d'ADN donneur est nécessaire. Cet ADN donneur doit contenir des séquences de nucléotides homologues (en rouge et bleu) à celles qui précèdent et suivent le site de coupure. Dans le schéma ces séquences sont courtes mais elles peuvent contenir jusqu'à 500 nucléotides. Entre les deux séquences homologues, l'ADN donneur peut contenir une séquence de nucléotides (en vert) plus ou moins longue qui permet de modifier quelques nucléotides du gène ciblé, d'y introduire un ou plusieurs exons manquants, ou même d'introduire un gène complet. La recombinaison non-homologue induit une réparation moins précise qui peut résulter soit en une micro-délétion, soit en une micro-insertion (en jaune) d'un nombre variable de nucléotides. Ces micro-insertions ou micro-délétions, si elles ne sont pas des multiples de trois nucléotides, changent le cadre de lecture du gène résultant soit en un gène non fonctionnel soit dans le rétablissement d'un gène fonctionnel lorsque le gène ciblé ne l'était pas.

2. La technique CRISPR-Cas9 : thérapie génique de demain ?

L'année 2016 a été marquée par l'émergence d'une nouvelle technique de thérapie génique, appelée CRISPR-Cas9 (de l'anglais Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9). Le potentiel de ce nouvel outil a été décrit pour la première fois dans un article de la revue scientifique américaine Science en 2012, et pourrait devenir une révolution dans le monde de la thérapie génique dans les prochaines années. Cette technique de modification génétique permet de supprimer, modifier ou ajouter des gènes sur mesure, grâce à un complexe formé d'un brin d'ARN « guide », le CRISPR, et d'une enzyme endonucléase « ciseau », la Cas9. Le mécanisme consiste à amener l'enzyme au niveau du gène défectueux responsable de la maladie chez le patient, afin que le complexe puisse alors le couper et le remplacer par un gène sain. La technique CRISPR-Cas9, possédant ainsi le surnom de « ciseaux génétiques ciblés », est représentée schématiquement en (figure6)[39]. Le complexe CRISPR-Cas9 est formé d'un brin d'ARN possédant une partie en palindrome et une séquence homologue à celle de l'ADN à couper (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées), et de l'enzyme Cas9. Dans la cellule cible, le brin d'ARN va permettre de reconnaître la séquence homologue sur l'ADN-cible et s'y placer pour que l'enzyme se charge de couper la chaîne d'ADN complémentaire au brin du complexe. Le vide laissé par le passage du complexe CRISPR-Cas9 pourra alors être réparé grâce à l'introduction d'un nouveau fragment d'ADN étranger. Au-delà du terme de thérapie génique, on peut donc ici parler de « chirurgie génomique ». Pour les recherches, le procédé à mettre en place par les scientifiques est simple. Il consiste à déterminer la séquence CRISPR contre le gène à cibler. Une fois que le brin d'ADN correspondant à la séquence CRISPR est confectionné, l'ADN est injecté dans les cellules cibles et se dirige vers le gène à remplacer. La simplicité et la modularité de ce système permettent aux chercheurs de réaliser des interventions ciblées plus rapides et plus précises que celles menées actuellement.

Car telle qu'elle a été conçue et pratiquée jusqu'à aujourd'hui, la thérapie génique actuelle souffre malheureusement d'un défaut majeur qui est son incapacité à contrôler très précisément le point d'insertion du gène-médicament. En effet, le gène-médicament s'insère au hasard dans le génome cible du patient. Par conséquent, la thérapie génique reste une

thérapie complexe, assez peu précise, longue et difficile à mettre en œuvre. De plus, elle est également très coûteuse. De ce fait, les résultats obtenus lors des essais cliniques et issus de la surveillance après autorisation de mise sur le marché restent plutôt mitigés (les essais cliniques de thérapie génique sont vus dans les parties II et III de cette thèse). A l'inverse, la technique CRISPR-Cas9 permet de cibler précisément le gène déficient et de la remplacer par sa version saine [49]. Elle représente un outil puissant, rapide, facile à mettre en œuvre et beaucoup moins onéreux. Afin de mettre en application cette nouvelle technique pour pouvoir guérir certaines maladies pour lesquelles il n'existe aujourd'hui pas de traitements, les deux auteurs de l'article scientifique de 2012 ont fondé leurs propres laboratoires. La française Emmanuelle Charpentier a cofondé une société de biotechnologie baptisée CRISPR Therapeutics, et l'américaine Jennifer Doudna, a créé Editas Medicine. Les premières maladies génétiques humaines ciblées par les CRISPR seront potentiellement des pathologies sanguines et hépatiques, car le sang et le foie représentent des cibles faciles à atteindre et sont constitués d'un nombre limité de types cellulaires. Certains chercheurs se penchent également vers des applications de CRISPR dans le domaine des greffes, car, à l'heure actuelle, les greffes de rein sont compliquées en raison de la présence fréquente de cytomégalovirus. Les CRISPR pourront alors permettre d'éliminer ces virus dans les greffons. Nous allons désormais voir qu'en raison de leurs caractéristiques spécifiques, la plupart des thérapies géniques actuelles qui viennent d'être citées possèdent la particularité d'être considérées comme des organismes génétiquement modifiés.

a. Avantages du système CRISPR

Les avantages du système CRISPR, comparé aux nucléases à doigts de zinc (ZFN) et aux TALEN, sont les suivants : (1) une seule protéine (Cas9) est nécessaire et, puisqu'elle est universelle, aucune ingénierie de protéines n'est nécessaire, contrairement aux méthodes utilisant les nucléases ZFN et les TALEN ; (2) le ciblage dépend de l'appariement des bases, de sorte que la conception des ARN guides nécessite uniquement une connaissance des règles de Watson et Crick ; (3) de nouveaux ARN guides sont très faciles à produire ; (4) il est possible de cibler différentes séquences simultanément en utilisant un mélange de plusieurs

ARN guides ; (5) contrairement aux nucléases ZFN et TALEN, le système CRISPR permet de cliver un ADN méthylé. (Tableau3) [50]

Tableau 3. Analyse comparative de différentes méthodes d'édition du génome [50]

	CRISPR-Cas9	TALEN	ZFN	Méganucléase
Reconnaissance (tête chercheuse/cible)	ARN-ADN	Protéine-ADN	Protéine-ADN	Protéine-ADN
Cibles non désirées(Off targets)	> aux autres nucléases ?	< CRISPR-Cas9 ?	> aux TALEN	Potentielles
Cibles multiples (Multiplexing)	Facile	DifficileRarement utilisé	DifficileRarement utilisé	DifficileRarement utilisé
Séquences cibles	Adjacentes à PAM Dépendent des espèces	Chaque répétition TAL lie une paire de bases. Nécessite une thymine pour une activité maximale	Chaque ZN lie une séquence de 3 paires de bases. Toutes ne peuvent pas être ciblées	Site de reconnaissance préexistant qui ne doit pas être contenu dans le vecteur de ciblage

b. Deux mécanismes de réparation de l'ADN

Les cassures du double brin d'ADN produites par la Cas9 peuvent être réparées spontanément par jonction d'extrémités non-homologues (en anglais, *non homologous end joining*, NHEJ) ou en présence d'une séquence d'ADN donneur, par recombinaison homologue (en anglais, *homology directed repair*, HDR) (Figure 7)[39]. Cet ADN donneur doit contenir, de chaque côté de la coupure de l'ADN ciblé, des séquences homologues allant de 50 à 2000 nucléotides. Entre ces deux séquences homologues, l'ADN donneur peut comporter une longue séquence de nucléotides à introduire dans le gène ciblé. Cette partie de l'ADN donneur permet ainsi d'induire une mutation d'un ou plusieurs nucléotides dans le gène qui a été ciblé, ou d'introduire des segments de gène qui en sont absents.

c. Délivrance des composants du système CRISPR dans la cellule

Pour les cellules en culture, les options pour l'introduction du gène qui code la protéine Cas9 incluent la transfection d'ADN plasmidique, l'utilisation d'un vecteur viral et la transfection d'ARN messagers (ARNm) synthétiques. Le gène de la nucléase doit être encadré par un promoteur et une séquence de poly A (succession de nucléotides adénosine). La protéine elle-même doit inclure un signal permettant son transport vers le noyau. Lorsque l'ARN guide et le gène de la protéine Cas9 sont délivrés à un organisme entier, d'autres méthodes, qui doivent être adaptées à chaque situation particulière, sont nécessaires. Dans certains cas, l'injection d'ARNm ou de l'ADN codant pour la nucléase est possible. C'est le cas chez les poissons zèbres, où les injections sont réalisées directement dans le cytoplasme de l'embryon peu après la fécondation. L'expression précoce des composants du système CRISPR conduit, après réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ, *non-homologous end joining*), à des mutations somatiques et germinales. La même approche a été utilisée avec de nombreux autres organismes y compris des mammifères [51,52]. Pour tous les organismes, un ADN donneur peut être ajouté pour permettre une recombinaison homologue. L'efficacité de modification qui est ainsi obtenue dépend beaucoup du système utilisé et des séquences ciblées. En général, elle est bien inférieure au taux de mutations induites par NHEJ en l'absence de donneur.

d. Les mutations induites par le système CRISPR

Comme mentionné précédemment, lorsque la Cas9 clive avec succès le gène ciblé, des modifications spontanées sont introduites par jonction d'extrémités non-homologues. Ces modifications sont généralement des délétions et/ou des insertions d'une ou quelques dizaines de nucléotides. Les deux tiers d'entre elles vont induire un décalage du cadre de lecture dans une séquence codant la protéine et ainsi inactiver complètement le produit du gène. Si la modification se trouve dans une région critique de la protéine, un changement d'un multiple de 3 paires de bases peut également engendrer une protéine non fonctionnelle. Typiquement, la modification introduite dans la séquence est caractérisée par une amplification par PCR (*polymerase chain reaction*), suivie du séquençage de l'amplicon, ou de la digestion du

produit de l'amplification par l'endonucléase T7EI⁷. Parmi les mutations induites par une coupure par la Cas9, la délétion d'un faible nombre de nucléotides est la plus fréquente. Ni la région hybride ARN/ADN, ni le PAM, ne sont épargnés par ces délétions. De temps en temps, des insertions et des suppressions de plusieurs centaines de paires de bases peuvent être produites.

Bien que chaque interruption soit habituellement réparée indépendamment, il est possible d'éliminer la séquence d'ADN présente entre deux coupures produites par deux ARN guides [53] (*Figure 8*). [39] Dans le poisson zèbre, le porc, et les cellules humaines, des délétions importantes de plusieurs centaines de milliers de paires de bases, voire de sections de chromosomes, ont été obtenues par clivage au niveau de deux sites largement séparés [53,54].

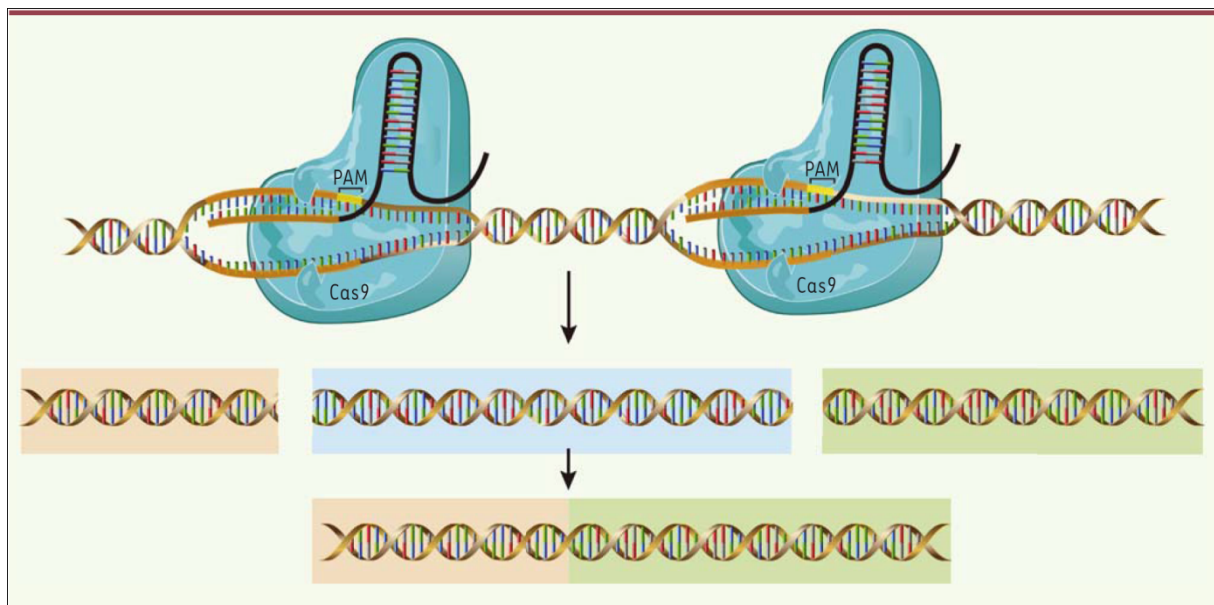


Figure 8. *Utilisation du système CRISPR/Cas pour éliminer une séquence d'ADN.* [39]

Il est possible de couper, en utilisant deux ARN guide (ARNg), les deux brins d'ADN à deux endroits dans un même chromosome. Ceci permet d'enlever une séquence de quelques nucléotides ou même de centaines de milliers de nucléotides.

⁷L'endonucléase T7EI permet de détecter des mutations car elle coupe les mésappariements des hétéroduplexes formés entre le brin sauvage et le brin muté après une étape de dénaturation/renaturation des produits de la PCR.

3. La thérapie génique chez les patient drépanocytaires

a. Introduction générale sur les hémoglobinopathie

Les hémoglobinopathies sont des maladies génétiquement déterminées qui constituent un problème de santé publique dans de vastes parties du monde [55].

L'hémoglobine (Hb) est une protéine contenue sous forme soluble au sein des érythrocytes (ou globules rouges), cellules anucléées, avec une forte concentration intracellulaire d'environ 34 g/dL. L'érythrocyte a une structure de disque biconcave, parfaitement déformable et adapté à sa fonction de transport et de libération de l'oxygène jusqu'au niveau des capillaires les plus fins.

Trois notions de bases majeures permettent de comprendre les maladies génétiques de l'hémoglobine :

i) la structure tétramérique de la molécule d'Hb, avec 2 chaînes polypeptidiques identiques deux à deux (*figure 9*), [57] lui permettant d'assurer de façon optimale sa fonction oxyphorique ii) l'expression des différentes hémoglobines au cours du développement

iii) l'organisation des gènes de l'Hb [56]. Les hémoglobinopathies sont classiquement séparées en deux catégories :

- soit un défaut qualitatif avec production en quantité normale d'une Hb « anormale »;
- soit un défaut quantitatif de production de l'Hb normale, ce qui correspond à une thalassémie La différence est physiopathologique plus que génétique car les mêmes anomalies moléculaires sont le plus souvent rencontrées dans les deux pathologies.

i. Structure moléculaire d'hémoglobine :

L'hémoglobine constituant majeure de l'érythrocyte est une hémoprotéine de poids moléculaire apparent de 64500 daltons, de structure tétramérique, constituée de 4 chaînes polypeptidiques de globine associées à une molécule d'hème. Ces monomères sont de deux types assemblés par l'intermédiaire de liaison de faible énergie: deux chaîne α (type α : ζ et α -

globine) constituées chacune de 141 acides aminés et deux chaînes non α (type β : ϵ , γ , δ , et β -globine) composées de 146 acides aminés. Chaque chaîne est liée à une molécule d'hème ayant en son centre un atome de fer (*figure 10*). [57] Que la molécule d'hémoglobine soit oxygénée ou désoxygénée, l'atome de fer est sous forme réduite (Fe^{++}). [58]

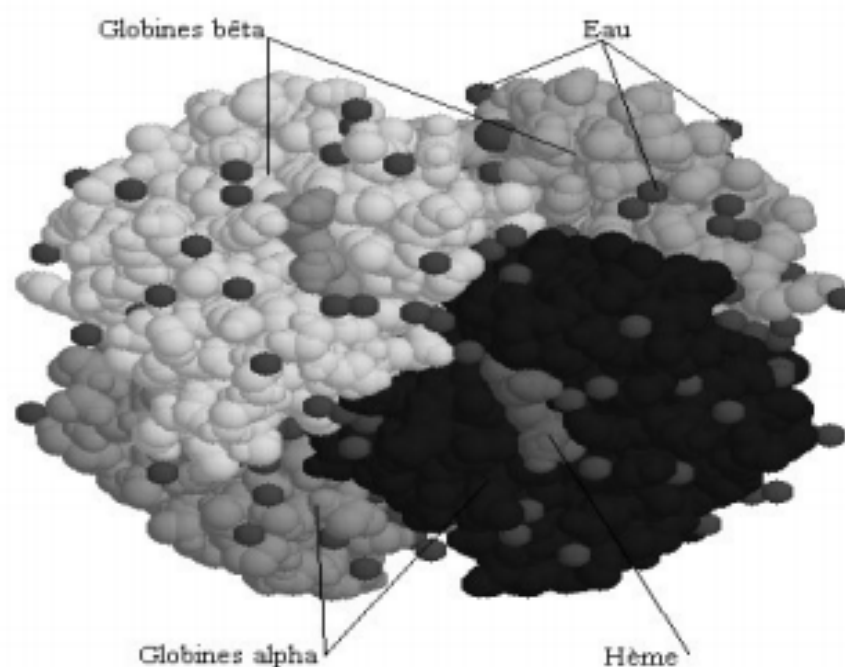


Figure 9 : Image 3D représentant la structure de la molécule de l'hémoglobine [57]

La structure tétramérique de l'hémoglobine régit sa fonction fondamentale de transporteur d'oxygène. La régulation de cette fonction oxyphorique est assurée selon un mécanisme allostérique par différents ligands : protons, 2,3 diphosphoglycerate et CO_2 .

ii. L'évolution ontogénique des hémoglobines humaines

Plusieurs hémoglobines se succèdent au cours de la vie. Ces hémoglobines se distinguent par la nature des sous-unités qui les constituent. Durant la vie embryonnaire, deux chaînes de la famille α coexistent : ζ , qui apparaît la première, puis α . De même, il existe deux chaînes de type β : ϵ , spécifique à cette période initiale de la vie et les chaînes γ (ou foetales)

(figure 10) [61]. Ces diverses sous-unités permettent de réaliser les trois hémoglobines de l'embryon, l'Hb Gower 1 (ζ_2, ϵ_2), l'Hb Gower 2 (α_2, ϵ_2) et l'Hb Portland (ζ_2, γ_2). [59]

L'hémoglobine foetale (Hb F) de structure (α_2, γ_2) est détectable à partir de la 5ème semaine de vie intra-utérine. Parallèlement à cette modification de la nature des sous-unités de globine, il y a un changement du lieu où s'effectue l'érythropoïèse: le sac vitellin dans la vie embryonnaire puis le foie et la rate dans la vie foetale et enfin la moelle osseuse chez l'adulte [60]

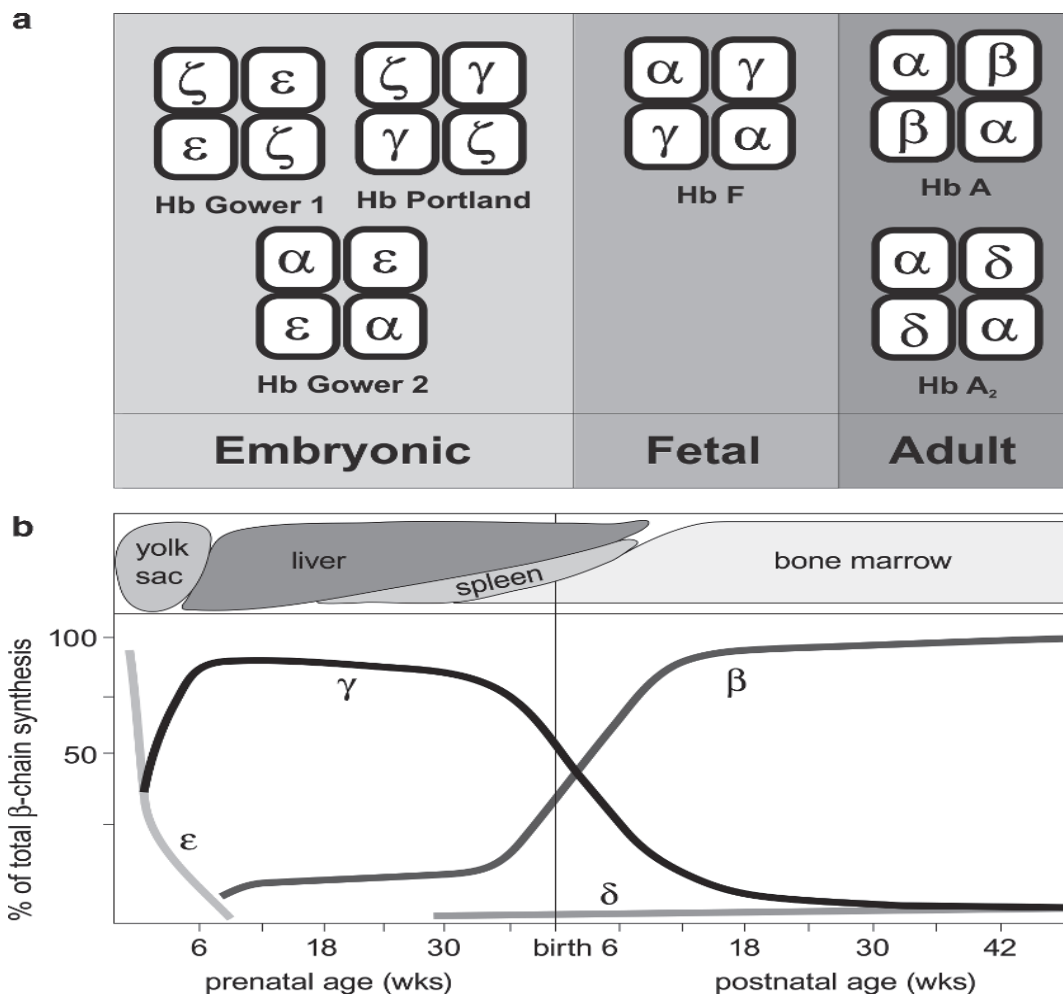


Figure 10 : l'expression des différentes hémoglobines au cours du développement [61]

(a) ; les tétramères d'hémoglobine au cours du développement embryonnaire, foetale, et adulte.

(b) ; la synthèse de la chaîne de globine au cours de développement et les différents tissus qui contribuent à l'hématopoïèse aux différents stades du développement

iii. Organisation génétique et régulation de l'expression des différentes hémoglobines

La régulation de l'expression de l'Hb est complexe car elle doit assurer la spécificité érythroïde de l'expression, l'expression séquentielle des différentes hémoglobines au cours du développement, un équilibre de production des différentes chaînes (α/γ puis α/β) et une coordination avec la biosynthèse de l'hème. Schématiquement, deux familles de gènes (ou cluster) contrôlent l'expression des chaînes de globine : le cluster alpha et le cluster bêta (*figure 11*). [62] Dans ces 2 familles, l'ordre des gènes sur le chromosome de 5' en 3' est le même que celui de leur expression au cours du développement. Le cluster⁸ alpha, situé sur le chromosome 16, proche de la région télomérique (16p13.3), comporte trois gènes fonctionnels : un gène embryonnaire ζ (HBZ) et deux gènes exprimés dès la vie fœtale $\alpha 2$ (HBA2) et $\alpha 1$ (HBA1). Entre 25–65 kb en amont des gènes $\alpha 2$ et $\alpha 1$, se situent 4 régions non-codantes hautement conservées : « multispecies conserved sequences » (MCS-R1 à -R4), qui contrôleraient l'expression des gènes du cluster alpha. À l'heure actuelle, seul MCS-R2 (connu aussi comme HS-40) a été démontré comme essentiel à l'expression des gènes α [63]. Ce cluster ne subit qu'une seule transition ou « switch » d'expression de gènes, ζ vers α , qui a lieu dès la 6e semaine de vie embryonnaire. Le cluster bêta, situé sur le chromosome 11, comporte 5 gènes fonctionnels : un gène embryonnaire ϵ (HBE1), deux gènes fœtaux γ et $A\gamma$ (HBG2 et HBG1) et deux gènes adultes δ et β (HBD et HBB). De façon similaire à la famille des gènes α , en amont des gènes se situe le « regulatory locus control region » (LCR) jouant un rôle primordial dans le contrôle de l'expression des gènes de la famille β au cours du développement [64]. Ainsi, l'expression érythroïde-spécifique et séquentielle des gènes résulte de l'interaction du LCR de façon spécifique avec les promoteurs individuels des gènes de globine par formation de boucles chromatinienne complexes. Ce cluster est le siège de deux « switch » consécutifs : le premier de ϵ vers γ a lieu précocement durant la vie embryonnaire ; le second de γ vers δ et β , beaucoup plus tardif commence à la fin de la vie fœtale. Ce dernier, responsable de la transition de l'HbF vers l'HbA, est encore actuellement imparfaitement élucidé. Il fait intervenir un ensemble complexe et intriqué de facteurs de

⁸ Cluster de gènes : groupe de plusieurs gènes situés sur un même chromosome, proches les uns des autres, et dont les fonctions sont voisines

transcription, dont un des derniers découverts récemment, BCL11a, semble avoir un rôle majeur comme répresseur de l'expression des gènes γ [65]. La chaîne polypeptidique α -globine de 141 acides aminés, doit s'associer avec différents partenaires au cours de la vie embryonnaire, fœtale et adulte (ϵ , γ , β). Sa synthèse est sous le contrôle d'un total 4 gènes α codant tous pour une protéine de structure identique. Il a été démontré que les gènes $\alpha 2$ sont plus exprimés que les gènes $\alpha 1$ dans un rapport $\alpha 2/\alpha 1$ d'environ 1,2 [66]. La chaîne polypeptidique β -globine de 146 acides aminés est sous le contrôle d'un total 2 gènes β et chaque gène β contribue pour 50 % de la synthèse des chaînes β . Durant la différenciation érythroïde, les chaînes α -globine ainsi que β -globine (ou γ -globine) sont exprimées à haut niveau. Cependant, il est important que les chaînes de globine soient synthétisées de façon équilibrée. Le déséquilibre entre les différentes chaînes est à la base de la physiopathologie des thalassémies. Les chaînes libres α -globine en excès sont toxiques pour le globule rouge. Les chaînes néo-synthétisées se lient spontanément à l'hème formant des monomères d'Hb. Une protéine chaperonne, stabilisant spécifiquement les monomères α -Hb (chaînes α -globine liées à l'hème), l' « α -hemoglobin stabilizing protein » (AHSP) est synthétisée dans les cellules érythroïdes [67]. Lorsqu'elle rencontre un monomère β -Hb libre, le monomère α -Hb se dissocie de l'AHSP pour former un dimère $\alpha\beta$ stable. C'est l'association des dimères qui va aboutir à la forme tétramérique fonctionnelle de l'Hb telle que l'HbA adulte (Hb $\alpha 2\beta 2$)

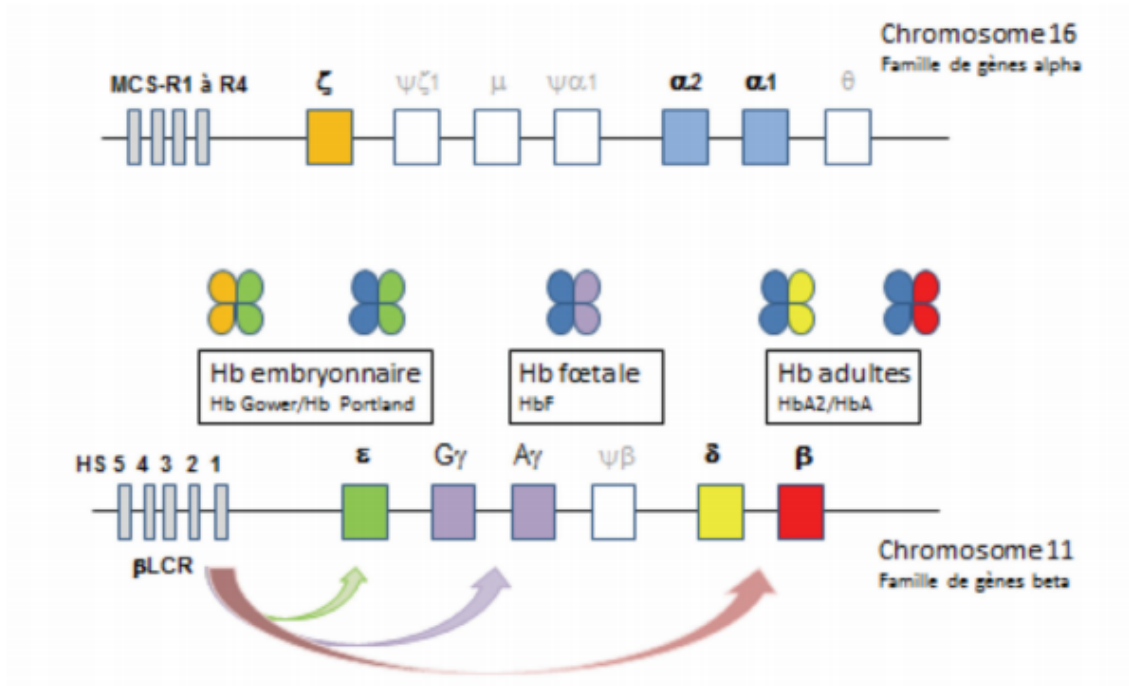


Figure11 organisation des deux familles de gènes-globine [62]

La famille α -globine est localisée sur le chromosome 16, la famille β -globine sur le chromosome 11. Les gènes sont organisés de 5' en 3' selon leur ordre d'expression au cours du développement : dans la famille α , gène ζ embryonnaire, $\alpha2$ et $\alpha1$ fœtaux/adultes ; dans la famille β , gène ϵ embryonnaire, $G\gamma$ et $A\gamma$ fœtaux, δ (minoritaire) et β adultes. En amont du locus β -globine, cinq sites hypersensibles à l'ADNase I (HS1 $\rightarrow$ 5) constituent une zone régulatrice majeure : le LCR (« regulatory locus control region ») qui va séquentiellement activer l'expression des gènes. Sur le chromosome 16 (locus α -globine), un site unique, correspondant à une zone régulatrice majeure, le site MCS-R2 (connu aussi comme HS-40), a été mis en évidence 40 kb en amont du gène ζ .

iv. Les β - thalassémies :

Les thalassémies se caractérisent par un certain nombre d'anémies héréditaires chroniques très sévères chez l'enfant [68] et couvre un ensemble très hétérogène d'affections dont le caractère commun est le défaut de synthèse, partiel ou total, d'une ou plusieurs chaînes de l'hémoglobine [69]. Ce déficit a pour conséquence spécifique un déséquilibre entre les chaînes, avec un excès de chaînes non appariées [70]. Ces désordres sont génétiquement déterminés.

Elles sont observées initialement dans le bassin méditerranéen où elles sont endémiques, elles sont, en réalité, encore plus fréquentes dans toute l'Asie du Sud ou du Sud-Est où a sévi le paludisme. La première classification a été phénotypique : β^+ ou β^0 selon que l'électrophorèse montrait ou non l'existence d'HbA chez les homozygotes atteints

b. La drépanocytose maladie monogénique la plus répandue

i. Présentation de la drépanocytose :

La drépanocytose est une maladie génétique, transmise selon le mode autosomique récessif et est caractérisée par la présence d'hémoglobine S. Il s'agit d'une anémie hémolytique chronique provoquée par une mutation ponctuelle du gène de la globine entraînant une substitution de l'acide glutamique en position 6 sur la chaîne de la bêta globine par la valine. Ceci rend l'Hb insoluble sous sa forme désoxygénée. Les chaînes insolubles cristallisent dans les érythrocytes en provoquant une déformation de lame de faux (*figure12*).[72]

On distingue cliniquement:

- la forme hétérozygote ou trait drépanocytaire qui est typiquement asymptomatique sur le plan clinique;
- et les syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) qui regroupent la forme homozygote SS et les hétérozygoties composites par association de l'hémoglobine S à d'autres hémoglobinopathies (SC, S β thalassémie, etc...). [71]

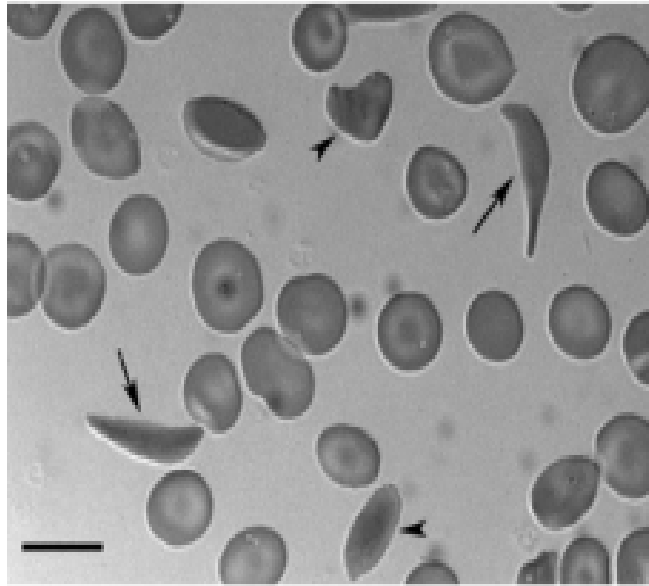


Figure 12 : Image en microscopie optique montrant la forme en faucille prise par certaines hématies drépanocytaires [72]

ii. Historique :

En 1904, **James Herrick** décrit pour la première fois cette pathologie suite à l'observation d'un frottis sanguin qui montre des hématies inhabituelles en forme de faucille ou feuille d'acanthé.

En 1949, **James Neel** démontre que la transmission de cette maladie est mendélienne. La drépanocytose a été la première maladie moléculaire identifiée il y'a plus de 50 ans, **Pauling** en, 1949, met en évidence la migration électrophorétique anormale de l'hémoglobine Hb S. **Ingram** en 1956, caractérise la structure primaire de la chaîne d'Hb S et révèle la substitution d'un acide glutamique par une valine expliqué ultérieurement par une mutation GAG→GTG au niveau du 6ème codon du gène β -globine. Cette mutation autosomique récessive sur le chromosome 11 a été trouvé identique dans tous les cas explorés. **Purtez**, met en évidence, en 1950, la solubilité diminuée de l'Hb S désoxygéné, puis, en 1960, la structure tridimensionnelle de l'Hb, déterminée par la cristallographie de rayon X et, enfin, celle des modifications stéréochimiques induites par la fixation, puis la libération d'oxygène [71]

iii. Prévalence de la drépanocytose :

Chaque année, quelque 300 000 enfants naissent (*figure 13*) [73] avec une anomalie majeure de l'hémoglobine et l'on recense plus de 200 000 cas de drépanocytose en Afrique. La drépanocytose est particulièrement fréquente chez les personnes originaires d'Afrique subsaharienne, d'Inde, d'Arabie saoudite et de pays méditerranéens. Les migrations ont accru la fréquence du gène incriminé dans les Amériques. La prévalence du trait drépanocytaire atteint 10 à 40 % en Afrique équatoriale, alors qu'elle n'est que de 1 à 2 % sur la côte de l'Afrique du Nord et de moins de 1 % en Afrique du Sud. Cette répartition reflète le fait que le trait drépanocytaire confère un avantage en termes de survie face au paludisme et que la pression de sélection due au paludisme a rendu le gène mutant plus fréquent, surtout dans les zones à forte transmission palustre [74]

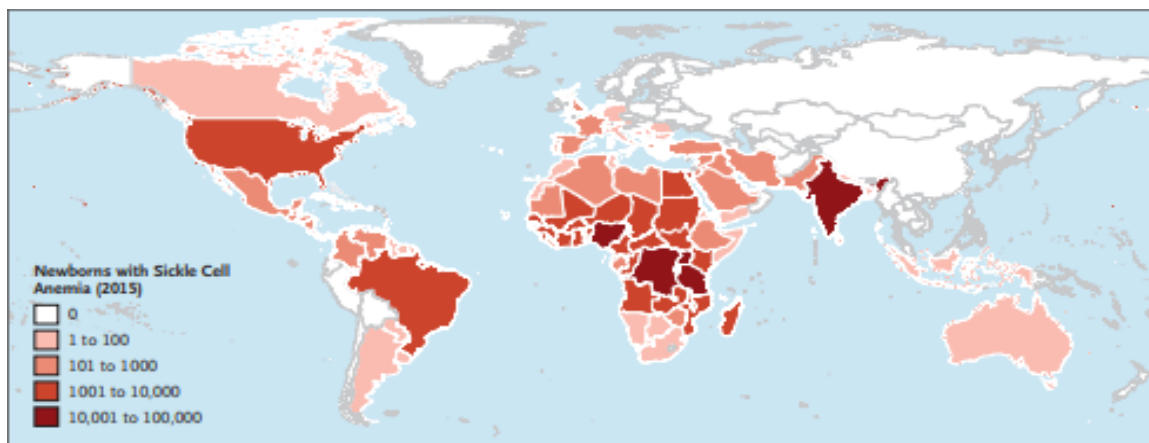


Figure 13. Nombre de nouveau-nés atteints de drépanocytose dans chaque pays en 2015.[73]

Les données sont basées sur les estimations de Piel et al.1.

L'Alaska est présenté séparément du reste des États-Unis.

iv. Mode de transmission :

La drépanocytose est une affection génétique qui se transmet selon le mode autosomique récessif, car seuls les homozygotes sont considérés comme malades.

Ainsi dans un couple de sujets hétérozygotes (AS), à chaque grossesse, la probabilité de naissance d'un enfant homozygote SS est de 25 %, celle d'un homozygote AA de 25 % et celle d'un hétérozygote AS de 50 %.

v. Physiopathologie:

Première maladie moléculaire décrite en 1949, son étude a été entreprise par des abords multiples. Son mécanisme physiopathologique de base a été très précisément décrit, centré sur la polymérisation de l'Hb S désoxygénée et les déformations cellulaires subséquentes observées chez les homozygotes SS [75] (*figure 14*). [70]

Au cours de la désoxygénation qui suit le passage dans la microcirculation, la molécule d'Hb S subit un changement de conformation. Celui-ci permet à la valine $\beta 6$ d'établir des liaisons hydrophobes avec la chaîne β d'une autre molécule d'Hb, en particulier avec la phénylalanine $\beta 85$ et la leucine $\beta 88$. Une seule des deux valines opère ce contact, de sorte que l'interaction β - β entraîne la formation d'un polymère qu'on a pu représenter comme l'enchaînement de deux rangées de molécules [75] (*figure 14*). [70]

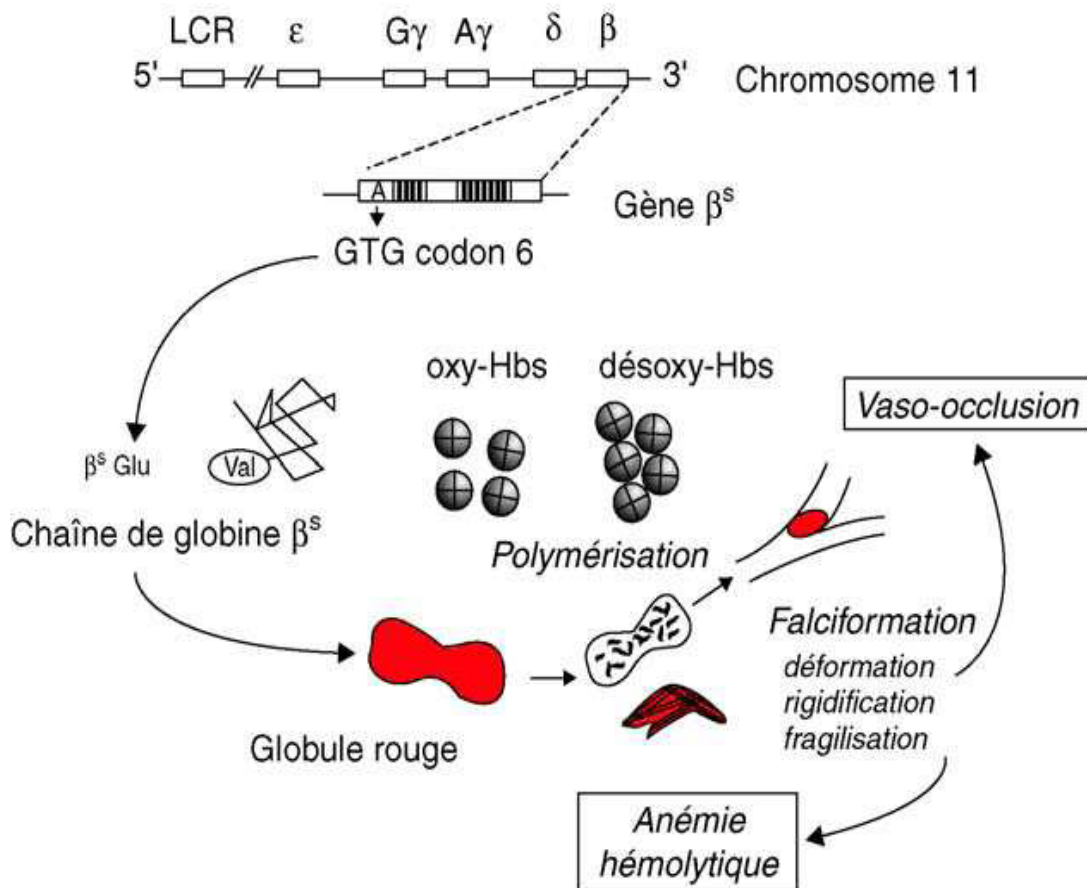


Figure 14 : Mécanisme physiopathologique de base de la drépanocytose.. [70]

vi. Manifestations cliniques de la drépanocytose Homozygote:

1) Considérations générales

La grande variabilité de la maladie, dans son intensité et son mode d'expression clinique, est une des caractéristiques de la drépanocytose. Cette variabilité existe en premier lieu entre les différents individus, mais également pour un même individu, selon les périodes de sa vie. Cette variété dans l'expression phénotypique est liée à l'existence de gènes modulateurs et de facteurs d'environnement, qui ne sont qu'imparfaitement connus. Par exemple, la présence d'une alpha-thalassémie hétérozygote associée à la drépanocytose s'accompagne d'une augmentation de la concentration sanguine en hémoglobine, de l'espérance de vie, et d'une modification des manifestations cliniques (diminution du risque d'ulcères cutanés et de rétinopathie, et augmentation du risque de crises vaso-occlusives). La vie des patients drépanocytaires est marquée par une alternance de phases de stabilité (complications chroniques) et de phases de complications aiguës. Pendant les phases de stabilité, la symptomatologie est essentiellement en rapport avec l'anémie. En effet, l'anémie provoquée par l'hémolyse chronique liée à la destruction accélérée des hématies est permanente : chez les patients drépanocytaires, la durée de vie moyenne des globules rouges est estimée à 17 jours. La concentration sanguine en hémoglobine en phase stationnaire est fonction de l'équilibre entre la destruction des globules rouges (appréciée sur les valeurs des lactodéshydrogénases et de la bilirubine) et la capacité de régénération de la moelle osseuse (évaluée par le taux de réticulocytes). Cette concentration est variable selon les patients. Elle est en général comprise entre 7 et 9 g/dl. L'hyperhémolyse chronique a aussi pour conséquence l'apparition fréquente de calculs vésiculaires pigmentaires, survenant chez 40 % des patients avant l'âge de 20 ans.[76,77]

2) Principaux Complications aiguës / chroniques

Complications aiguës	Complications chroniques
A- cvo Crise douloureuse vaso-occlusive : La crise douloureuse vaso-occlusive (CVO) représente l'événement le plus fréquent chez le patient drépanocytaire. Elle est caractérisée par l'apparition plus ou moins brutale de douleurs provoquées par des phénomènes d'occlusion microvasculaire (<i>figure 15</i>) [72] survenant le plus souvent dans les os. La principale caractéristique de la douleur est son intensité, qui est souvent extrêmement forte. Elle peut intéresser les os longs, le bassin, le rachis, le sternum, les côtes..., et généralement plusieurs territoires sont atteints simultanément. La fréquence des CVO est variable selon les malades, et pour un même malade, dans le temps. Dans une étude américaine, il a été montré que la fréquence de survenue des douleurs est maximale entre 19 et 39 ans et que la mortalité est plus élevée chez les patients ayant des douleurs fréquentes. La durée de la CVO est généralement comprise entre 2 et 7 jours [78].	A- Atteinte ostéoarticulaire chronique : [88]. La complication ostéoarticulaire chronique la plus fréquente chez l'adulte drépanocytaire est l'ostéonécrose aseptique épiphysaire. Aux États-Unis, 20 % à 40 % des adultes drépanocytaires homozygotes (tous âges confondus) auraient une ostéonécrose aseptique, elle serait plus fréquente encore chez les patients ayant une alpha-thalassémie associée.
B- STA Syndrome thoracique aigu : Le syndrome thoracique aigu (STA) représente chez l'adulte la deuxième complication aiguë en fréquence après la CVO, mais la première cause de mortalité [79-80.] La définition repose sur l'association d'un infiltrat radiologique avec l'un ou plusieurs signes fonctionnels ou physiques respiratoires (toux, dyspnée, fièvre, douleur thoracique...). L'aggravation d'un STA peut être rapide et extrêmement sévère avec mise en jeu du pronostic vital. Il faut donc prévenir et dépister précocement cette complication, surveiller de façon rapprochée un STA installé et, dès la mise en évidence de signes de gravité, discuter le transfert en unité de soins intensifs et la transfusion sanguine. La physiopathologie du STA (<i>Figure 16</i>) est complexe et incomplètement comprise, avec l'intrication de plusieurs mécanismes : embolies graisseuses à partir de foyers de nécrose médullaire [81], hypoventilation alvéolaire, vasoocclusion	B- Atteinte rénale : La néphropathie drépanocytaire est fréquente puisqu'on estime que 79 % des adultes drépanocytaires homozygotes ont une micro- ou macroalbuminurie et 5 % à 18 % sont au stade d'insuffisance rénale [89]. Les mécanismes physiopathologiques sont mal connus, incluant à la fois des altérations glomérulaires et tubulaires. L'atteinte glomérulaire est probablement multifactorielle : effet de l'hyperfiltration, souvent majeure dès l'enfance et secondaire à l'anémie chronique, hypertrophie glomérulaire, glomérulosclérose segmentaire et focale, lésions de glomérulonéphrite avec dépôts d'immunocomplexes, hémossidérose. L'atteinte tubulaire, dont la manifestation principale est un défaut de concentration et d'acidification des urines, pourrait être secondaire à une réduction néphronique juxtamédullaire profonde par atteinte de la microvascularisation locale [90].
Priapisme Le priapisme est défini par une érection prolongée, souvent douloureuse, survenant indépendamment de toute stimulation. Une prise en charge urgente est indispensable afin de réduire le risque de séquelles fonctionnelles graves. C'est une complication	C- Atteinte cardiaque : Les complications cardiaques chez l'adulte drépanocytaire sont mal connues et rares, dominées par l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).

fréquente puisque sa prévalence chez les adultes drépanocytaires est estimée entre 26 % et 42 % [82]. Dans la majorité des cas, le priapisme est dû à un mécanisme vaso-occlusif dans les corps caverneux. Il en résulte un blocage du drainage veineux, une stase, une ischémie, une anoxie à l'origine de la douleur, pouvant évoluer, en l'absence de traitement, vers une nécrose du muscle lisse puis une fibrose et une impuissance définitive [83].	Il y a une adaptation constante de la fonction cardiaque à l'anémie chronique, qui est compensée par une augmentation du débit cardiaque évoluant progressivement vers une dilatation ventriculaire gauche. [91-92].
Complication Infectieuse L'infection est une complication fréquente de la drépanocytose. Le risque infectieux est particulièrement élevé chez les enfants, chez qui la mise en place de mesures préventives a été déterminante pour diminuer la mortalité. Chez l'adulte, le risque infectieux a été moins étudié. Il a une présentation très différente de celle de l'enfant : le risque vital est moins souvent mis en jeu, la présentation est plus souvent chronique, les germes et localisations sont différents. L'altération de la fonction splénique liée à la survenue répétée d'infarctus est à l'origine de la susceptibilité aux infections constatée dans la drépanocytose. Il y a de ce fait une prédisposition aux infections provoquées par les germes encapsulés, comme le pneumocoque. Cependant, « l'asplénie fonctionnelle » n'est pas la seule anomalie immunologique décrite dans la drépanocytose : des anomalies fonctionnelles concernant le complément, les immunoglobulines, les leucocytes [84] et particulièrement l'expression des molécules CD1 sur les monocytes [85] ont été rapportées.	D- Atteinte pulmonaire : Le parenchyme pulmonaire est le siège d'une altération progressive pouvant évoluer vers une insuffisance respiratoire. Elle concernerait 40 % d'une série autopsique de patients drépanocytaires. Radiologiquement, il s'agit le plus souvent d'une atteinte interstitielle avec épaississements des septa interlobulaires et pleuraux, mais également d'atélectasies, de bronchiectasies, de dilatations lobulaires focales. Histologiquement, ces anomalies correspondent à des foyers de nécrose dans les parois alvéolaires, puis à l'apparition d'une fibrose. Le retentissement fonctionnel n'est pas corrélé à l'étendue des lésions radiologiques [93].
Agravation de l'anémie Les patients drépanocytaires homozygotes (SS) présentent une Hb généralement comprise entre 7 et 9 g/dl, avec une bonne tolérance. L'Hb est souvent plus élevée chez les patients Hétérozygotes composites SC et Sβ+thalassémie (Hb de base autour de 9–12 g/dl) [86]. Le volume globulaire moyen est normal, sauf chez des patients prenant l'hydroxyurée (macrocytose) ou lorsqu'il existe une α-thalassémie associée (microcytose et hémoglobinémie plus élevée) [87].	E- Atteinte oculaire : L'atteinte oculaire de la drépanocytose concerne essentiellement la rétine. Elle reste longtemps non symptomatique et peut se révéler par une complication laissant des séquelles irréversibles (hémorragie intravitréenne ou décollement de la rétine). Elle doit donc être recherchée de façon systématique. L'atteinte rétinienne, qui débute en périphérie, est en rapport avec les phénomènes vasoocclusifs, entraînant l'apparition de zones non perfusées. Puis les stigmates de la rétinopathie proliférative apparaissent, sous la forme de néovaisseaux, fragiles, qui se développent à la limite des zones normales et non perfusées. [94].

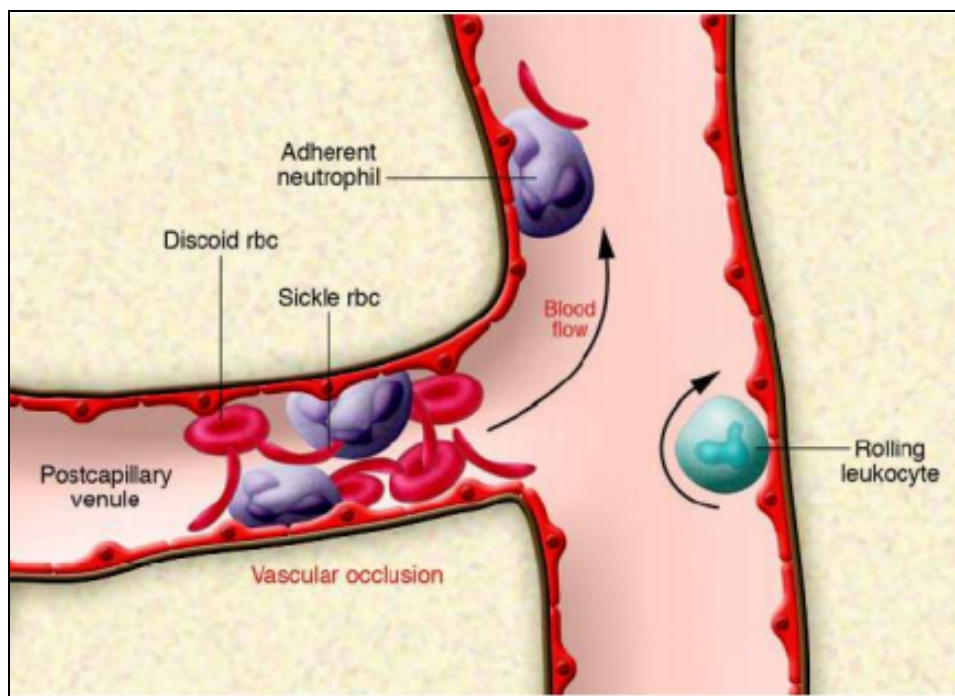


Figure 15 : Mécanismes de la vaso-occlusion [72]

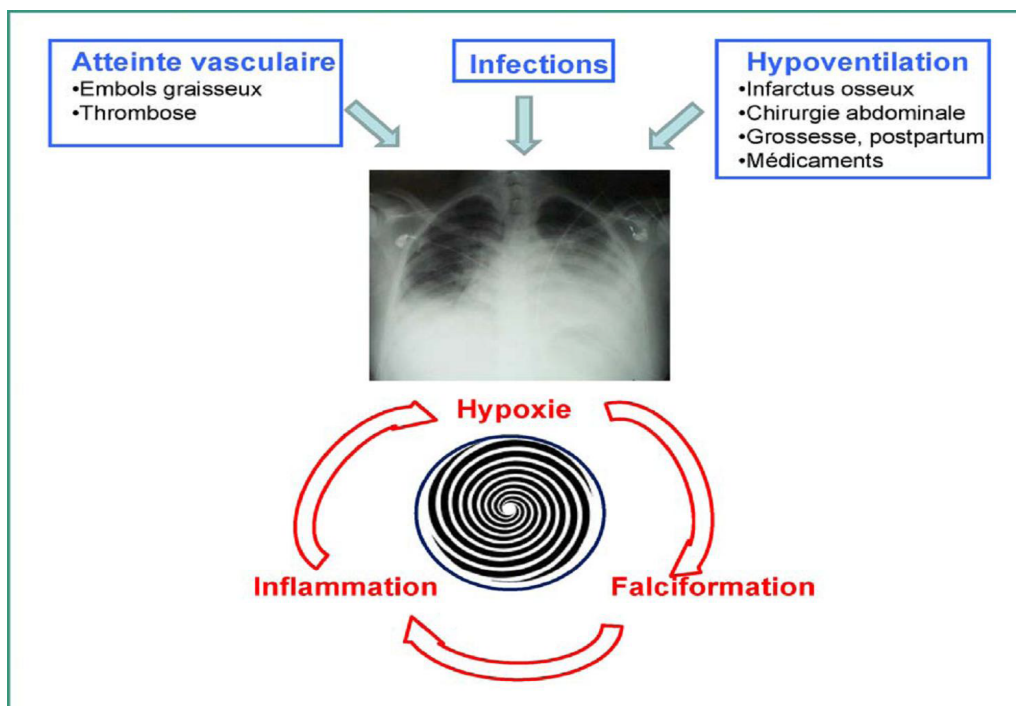


Figure 16: Physiopathologie du syndrome thoracique aigu. [81]

L'essentiel de la pathologie est lié à une interaction complexe entre érythrocytes (et autres cellules hématopoïétiques), cellules endothéliales et facteurs plasmatiques qui aboutit à une vasculopathie s'exprimant à la fois sur le mode aigu vaso-occlusif, mais également chronique, altérant la fonction de différents organes. De considérables progrès thérapeutiques ont été réalisés ces 20-30 dernières années : qualité du support transfusionnel, chélation martiale⁹, sur-expression de l'hémoglobine fœtale par l'hydroxycarbamide (atténuant le phénomène de polymérisation de l'hémoglobine S), prévention anti-infectieuse [95]. La prise en charge précoce grâce au dépistage néonatal, l'établissement de circuits de soins, la formation des équipes médicales et l'éducation thérapeutique des patients ont également un rôle majeur dans l'amélioration globale de la santé des enfants et jeunes adultes atteints. Malgré ces progrès, une importante morbidité et mortalité persistent, et le devenir à l'âge adulte demeure incertain y compris dans le cadre d'un accès à des soins optimaux qui n'ont pas fait disparaître le besoin d'un traitement curateur [96].

À ce jour, seule l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est capable de guérir la maladie après un conditionnement myélo-ablatif et immunosuppresseur [97]. Les résultats sont globalement remarquables au regard de l'évolution de la maladie, mais la procédure, conditionnée par la disponibilité d'un donneur HLA (*human leucocyte antigen*) géno-identique (greffe syngénique), reste grevée par le risque de morbidité propre à la greffe, parfois sévère. Des progrès substantiels sont apparus avec la possibilité de donneurs alternatifs (cellules de sang de cordon, donneur HLA phéno-identique, fichiers de donneurs intra-familiaux HLA haplo-identiques), mais le niveau de morbidité et de mortalité résiduelles de ce type de greffe apparaît encore trop élevé en comparaison du traitement conventionnel. Elles ne sont envisagées que dans des situations individuelles très spécifiques [98].

L'approche de thérapie génique développée par plusieurs équipes - d'abord chez l'animal puis récemment chez l'homme - apparaît donc aujourd'hui comme une alternative sérieuse pour les patients ne bénéficiant pas de donneur HLA géno-identique [99,100] .

⁹ Chélation martiale ou complexation du fer

c. L'équipe menant l'essai clinique

L'essai clinique, coordonné par le Pr Marina Cavazzana*, a été mené à l'hôpital Necker-Enfants malades de l'AP-HP et à l'Institut Imagine.

****Pr Marina Cavazzana** - M.D., Ph.D. professeur d'hématologie à l'Université Paris-Descartes, chef du département de Biothérapie et du Centre d'Investigation Clinique de biothérapie de l'Hôpital Necker-Enfants malades, AP-HP et co-directrice du laboratoire de Lymphohématopoïèse humaine Inserm à l'Institut des maladies génétiques *Imagine*, Paris, France.

La première phase a consisté à prélever des cellules souches hématopoïétiques, à l'origine de la production de toutes les lignées de cellules sanguines, au niveau de la moelle osseuse du patient. Un vecteur¹⁰ viral porteur d'un gène thérapeutique, déjà mis au point pour traiter la β -thalassémie, a ensuite été introduit dans ces cellules afin de les corriger. Ce vecteur lentiviral, capable de transporter de longs segments d'ADN complexes, a été développé par le Pr Philippe Leboulch** et est produit à grande échelle par la société américaine bluebird bio¹¹

****Pr. Phillipe Leboulch**, professeur de médecine à la faculté de l'Université Paris-Sud ainsi que Haut Conseiller du CEA pour l'innovation médicale et Directeur Scientifique International de l'institut de biologie François Jacob et visiting professor/lecturer à Harvard Medical School et le Brigham & Women's Hospital à Boston, MA, USA, a été à l'origine du vecteur thérapeutique utilisé (publié en 2001 dans le journal *Science*), et il a dirigé les études précliniques avec son collaborateur le Dr. Emmanuel Payen (Inserm, CEA).

Les cellules traitées ont ensuite été réinjectées au jeune patient par voie veineuse en octobre 2014. L'adolescent a ensuite été pris en charge durant son hospitalisation dans le service d'immunohématologie pédiatrique de l'Hôpital Necker-Enfants malades en collaboration avec le Pr. Stéphane Blanche et le Dr. Jean-Antoine Ribeil. [101]

¹⁰ Un vecteur est une molécule d'ADN ou d'ARN capable de s'autorépliquer (plasmide, cosmide, ADN viral) dans laquelle on introduit de l'ADN étranger et que l'on utilise ensuite pour faire pénétrer cet ADN dans une cellule cible.

¹¹ Société fondée par le Pr. Philippe Leboulch et promotrice de l'essai clinique.

Quinze mois après la greffe des cellules corrigées, le patient n'a plus besoin d'être transfusé, ne souffre plus de crises vaso-occlusives, et a complètement repris ses activités physiques et scolaires. « *Nous notons aussi que l'expression de la protéine thérapeutique provenant du vecteur, hautement inhibitrice de la falciformation pathologique, est remarquablement élevée et efficace* » explique le Pr Philippe Leboulch.

« *Nous souhaitons, avec cette approche de thérapie génique, développer de futurs essais cliniques et inclure un nombre important de patients souffrant de drépanocytose, en Ile-de-France et sur le territoire national* » indique le Pr. Marina Cavazzana [101]

4. Thérapie génique des hémoglobinopathies par transfert lentiviral du gène BA T87Q-GLOBINE

a. L'essai

i. Titre complet de la recherche biomédicale

Etude ouverte de Phase I/II évaluant la sécurité et l'efficacité de la thérapie génique des bêta-hémoglobinopathies (drépanocytose et bêta-thalassémie majeure) par autogreffe de cellules souches CD34+ modifiées ex vivo avec un vecteur lentiviral beta-A-T87Q-globine (LentiGlobin BB305)

ii. Condition médicale ou pathologie étudiée

Les maladies génétiques de l'hémoglobine suivantes : la drépanocytose dans sa forme la plus sévère et la bêta-thalassémie majeure.[102]

iii. Brève description facilement compréhensible de la recherche

L'essai clinique HGB-205 vise à évaluer le produit de thérapie génique LentiGlobin BB305 Drug Product pour le traitement des maladies génétiques de l'hémoglobine et en particulier la bêta-thalassémie majeure et la drépanocytose dans sa forme la plus sévère. - globine. Dans la drépanocytose, les β -Thalassémies majeur Ces deux maladies rares sont dues à des mutations du gène de la gène muté produit une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S. L'hémoglobine S forme des fibres de polymères dans les globules rouges, causant leur

déformation et des occlusions aiguës des petits vaisseaux, ce qui entraîne des “crises vaso-occlusives” très douloureuses et des destructions tissulaires dans de nombreux organes. Une minorité de patients ont une forme particulièrement sévère avec une espérance de vie très limitée. Dans la bêta-thalassémie majeure, des mutations du gène bêta-globine empêchent l’expression du gène, ce qui provoque une anémie profonde nécessitant des transfusions, de manière régulière et pour toute la vie, induisant une surcharge en fer potentiellement létale si un traitement spécifique à vie, permanent et pénible à supporter, n’est pas suivi d’une manière très stricte. Le seul traitement curateur actuel de ces deux maladies est la greffe de cellules souches des cellules sanguines provenant d’un donneur parfaitement compatible. Malheureusement, peu de patients ont un tel donneur et ceux qui en ont un restent cependant à risque de rejet ou de réactions de la greffe dirigées contre les cellules du receveur. L’essai clinique HGB-205 a pour objectifs d’évaluer la sécurité et l’efficacité de la thérapie génique pour 7 patients ayant une forme sévère de drépanocytose ou une forme majeure de bêta-thalassémie, âgés de 5 à 35 ans, sans donneur compatible disponible. Les cellules de la moelle des patients seront prélevées sous anesthésie générale, ou bien les cellules sanguines périphériques mononuclées des patients seront collectées par aphérèse. Les cellules collectées seront ensuite purifiées et modifiées génétiquement à l’hôpital Necker à Paris avec le vecteur lentiviral LentiGlobin BB305 qui introduira un gène bêta-globine normal modifié ponctuellement afin d’inhiber la polymérisation de l’hémoglobine S et pour corriger l’anémie de la bêta-thalassémie majeure. Le vecteur utilisé pour le transfert du gène thérapeutique n’est pas un virus mais il contient de petites portions du virus de l’immunodéficience humaine (VIH) de façon à rendre plus efficace son transfert dans les cellules souches des patients. Ce vecteur est incapable de se multiplier. Ceci est vérifié par des méthodes très sensibles pour le vecteur lentiviral et pour les cellules génétiquement modifiées de chaque patient. Les résultats des essais effectués chez les animaux atteints de ces maladies et dans les cellules humaines ont indiqué une efficacité de l’approche évaluée dans l’étude HGB-205. Trois patients ont déjà été traités avec une approche de thérapie génique ex-vivo très similaire dans l’étude de Phase I/II LG001 conduite par bluebird bio avec le vecteur lentiviral LentiGlobin HPV569.[102] (*figure 17*) [103] L’étude HGB-205 est considérée comme la suite de LG001. Un de ces patients atteint de bêta-thalassémie majeure n’a maintenant plus besoin de

transfusion [99] . Les risques et complications possibles seront expliqués aux patients et aux parents de manière très détaillée avant la signature d'un "consentement éclairé". Les cellules génétiquement modifiées des patients seront ré-administrées par voie intraveineuse après contrôles rigoureux. Les patients recevront un conditionnement pendant quelques jours avant cette autogreffe de façon à remplacer la moelle produisant des globules rouges malades par la moelle modifiée génétiquement produisant des globules rouges sains. Ce conditionnement est moins toxique que celui utilisé pour les greffes de cellules provenant d'un donneur. Les patients seront suivis régulièrement pendant 2 ans, puis de façon plus espacée pendant un total de 15 ans. [102]

iv. L'essai HGB-205

« L'essai HGB-205 a été conçu comme une étude « preuve de concept » évaluant la faisabilité de la thérapie génique avec LentiGlobin des patients atteints de β TM et de drépanocytose sévère. À ce jour, les résultats de cette étude démontrent que cette approche thérapeutique peut induire des effets thérapeutiques durables, avec une production de HbA^{T87Q} stable jusqu'à 3,5 années après l'administration et des avantages cliniques à long terme », déclare David Davidson, M.D., Chief Medical Officer de bluebird bio. « Les deux patients atteints de drépanocytose plus récemment traités, qui présentaient tous deux une production de HbA^{T87Q} en hausse, sont l'illustration des avantages potentiels de certaines des modifications de protocole que nous avons apportées à notre étude dans la drépanocytose, la HGB-206 . Comme avec le Patient 1204, premier patient atteint de drépanocytose traité dans l'étude HGB-205, ces deux derniers patients ont reçu un conditionnement avec busulfan plus rigoureux et des transfusions sanguines régulières avant prélèvement de leur cellules souches. Un suivi plus long sera nécessaire pour mesurer leur production de HbA^{T87Q} et les effets cliniques sur le long-terme, mais il est encourageant de constater que leur VCN *in vivo* montre des signes de stabilisation précoce à un niveau plus élevé en comparaison du groupe initial de patients de l'étude HGB-206. Il est également important de noter que dans l'étude HGB-206, ces modifications s'accompagnent d'une amélioration du processus de fabrication et d'une

évaluation de l'emploi du plerixafor¹² pour mobiliser les cellules souches. Ce qui pourrait, selon nous, optimiser les résultats pour les patients.»

HGB-205 est une étude de Phase 1/2 multicentrique, ouverte et en cours, conçue pour évaluer l'innocuité et l'efficacité du produit médicamenteux LentiGlobin dans le traitement de patients atteints de TDT et de drépanocytose sévère. Quatre patients atteints de TDT et trois patients atteints de drépanocytose sévère ont reçu une injection de LentiGlobin dans le cadre de cette étude, le 2 juin 2017. [102] (*figure17*) [103]

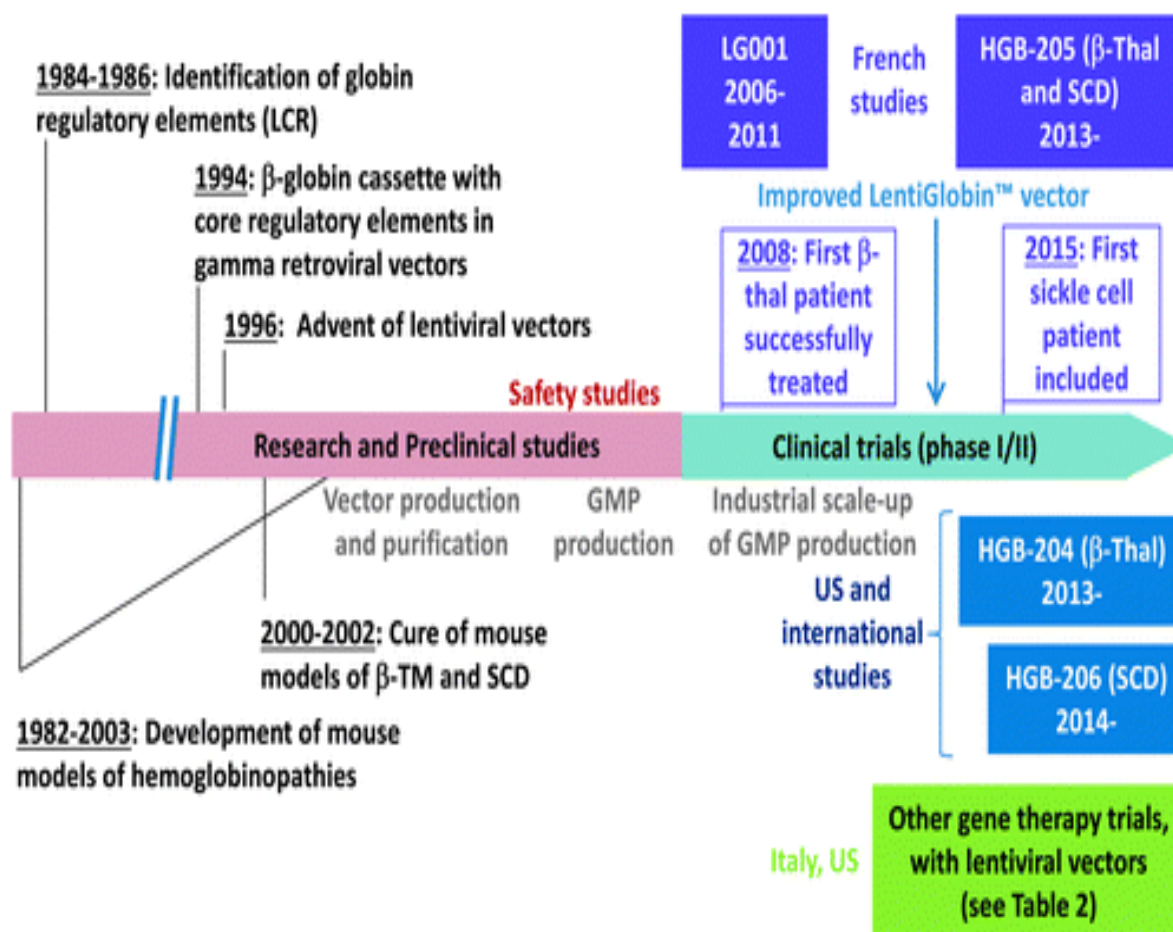


Figure 17. Les étapes importantes de la recherche et du développement de la thérapie génique ex vivo pour les troubles hémoglobiniques. Les études cliniques LG001, HGB204, HGB205 et HGB206 sont menées avec des vecteurs lentiviraux [103]

¹² Le **plerixafor** appartient à la classe des médicaments appelés agents hématopoïétiques. Il s'emploie pour aider à la collecte de cellules souches

v. nouvelles données de l'étude HGB-205 sur le produit LentiGlobin™ chez les patients atteints de drépanocytose sévère et de bêta-thalassémie transfusion- dépendants (TDT)...

• Résultats attendus

– L'indépendance aux transfusions perdue allant jusqu'à 3,5 ans chez les patients atteints de bêta-thalassémie transfusion-dépendants (TDT); trois patients ont arrêté leur traitement chélateur du fer –

– Le premier patient atteint de drépanocytose sévère traité par thérapie génique maintient une amélioration clinique significative des symptômes de la drépanocytose, un nombre de copies de vecteur et des niveaux d'HbA^{T87Q} stables dans le sang périphérique –

– Deux patients atteints de drépanocytose sévère récemment traités, présentent des niveaux d'hémoglobine (HbA^{T87Q}) en hausse et un nombre de copies de vecteur (VCN)¹³ stable –

Âges admissibles aux études : 5 ans à 35 ans (enfant, adulte)

Sexe admissible aux fins de l'étude : Tous

Accepte les bénévoles en santé : Non

Critères

• Critères d'inclusion :

Avoir entre 5 et 35 ans, inclusivement.

Avoir une drépanocytose grave ou une bêta-thalassémie majeure dépendante de transfusion, quel que soit le génotype dont le diagnostic a été confirmé par des études sur l'Hb. La dépendance transfusionnelle est définie comme nécessitant au moins 100 mL/kg/an de concentré de globules rouges (pRBC).

¹³ Nombre moyen de copies vectorielles des populations cellulaires du sang périphérique et de moelle contenant le lentiglobine

Être admissible à une greffe allogénique de CSH selon les lignes directrices médicales de l'établissement, mais sans donneur apparenté apparenté.

Avoir été traité et suivi pendant au moins les deux dernières années dans un centre spécialisé qui tient à jour des dossiers médicaux détaillés, y compris les antécédents transfusionnels.

Les sujets atteints d'un trouble de la coagulation sévère doivent également le faire :

N'ont pas réussi à obtenir un bénéfice clinique adéquat après un traitement par hydroxyurée avec une dose suffisante, pendant au moins 4 mois, sauf si ce traitement n'était pas indiqué ou n'était pas bien toléré.

Avoir un ou plusieurs des facteurs de risque de mauvais pronostic suivants :

Crises vaso occlusives récurrentes (au moins deux épisodes au cours de l'année précédente ou au cours de l'année précédant le début d'un programme régulier de transfusion).

Présence de toute anomalie cérébrale significative sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (comme la sténose ou les occlusions).

AVC sans déficience cognitive grave.

Ostéonécrose de 2 articulations ou plus.

Alloimmunisation anti-érythrocytaire (>2 anticorps).

Présence d'une cardiomyopathie drépanocytaire documentée par échocardiographie Doppler.

Syndrome thoracique aigu (au moins 2 épisodes) défini par un événement aigu présentant des symptômes semblables à ceux d'une pneumonie (p. ex. toux, fièvre[>38,5 °C], dyspnée aiguë, expectoration, douleur thoracique, résultats de l'auscultation pulmonaire, tachypnée ou respiration sifflante) et la présence d'un nouvel infiltrat pulmonaire. Les sujets dont la saturation chronique en oxygène est inférieure à 90 % (à l'exclusion des périodes de crise de SCD) ou dont la capacité de diffusion de monoxyde de carbone (DLco) est inférieure à 60 % en l'absence d'infection ne devraient pas être inclus dans l'étude.**[104]**

- **Critères d'exclusion :**

Disponibilité d'un donneur de cellules hématopoïétiques HLA identiques de 10 /10, à moins que le Comité de surveillance ne recommande l'inscription à la suite d'un examen du cas.

Infection bactérienne, virale, fongique ou parasitaire cliniquement significative, active, bactérienne, virale ou parasitaire.

Contre-indication à l'anesthésie pour le prélèvement de moelle osseuse.

Toute affection maligne antérieure ou actuelle, myéloproliférative ou immunodéficience. Numération des globules blancs $<3 \times 10^9/L$ et/ou numération plaquettaire $<120 \times 10^9/L$. Antécédents de lésions d'organes majeurs, y compris Maladie du foie, avec des taux de transaminases $>3 \times$ la limite supérieure de la normale. Cette observation ne sera pas exclue si une biopsie du foie ne révèle aucune preuve d'une fibrose, d'une cirrhose ou d'une hépatite aiguë.

Preuves histopathologiques d'une fibrose, d'une cirrhose ou d'une hépatite aiguë lors d'une biopsie du foie. Maladie cardiaque, avec une fraction d'éjection ventriculaire gauche $<25\%$. Maladie rénale avec une clairance calculée de la créatinine $<30\%$ valeur normale. Sévère surcharge en fer, ce qui, de l'avis du médecin, constitue un motif d'exclusion. Un T2 cardiaque* <10 ms par imagerie par résonance magnétique (IRM). Preuve d'hypertension pulmonaire cliniquement significative nécessitant une intervention médicale. [104]

vi. Etat des patients drépanocytaires recruté dans l'essai de thérapie génique

- **Le Patient 1204 avait 13 ans** au moment du recrutement. Lors du dernier suivi (31,7 mois), ce patient produisait 50% de HbA^{T87Q}, bien au-dessus des 30% d'hémoglobine anti-drépanocytose, estimés nécessaires pour un impact clinique potentiel sur la maladie.

Environ 30 mois après le traitement, le Patient 1204 a souffert d'un épisode de gastroentérite aiguë avec vomissements et 2 jours de fièvre atteignant 40°C (104°F), suivi d'une crise vaso-occlusive et d'une hospitalisation. Ses niveaux de HbA^{T87Q} et de VCN dans le

sang périphérique, sont restés stables (HbA^{T87Q}: 6,1 g/dL, VCN: 2,3 copies/génome diploïde à 30 mois), suggérant une persistance de la thérapie génique.

- **Le Patient 1207 avait 16 ans** au moment du recrutement. Lors du dernier suivi (6,1 mois), ce patient produisait 20% de HbA^{T87Q}. Ce patient avait des antécédents avant-traitement de fréquents épisodes de crises vaso-occlusives et de syndromes thoraciques aigus malgré le traitement avec l'hydroxyurée et avant de commencer des transfusions régulières. Il a souffert d'un épisode de syndrome thoracique aigu et à été hospitalisé 6 mois après le traitement.

- **Le Patient 1208 avait 21 ans** au moment du recrutement. Lors du dernier suivi (3,4 mois), ce patient produisait 15% de HbA^{T87Q}.

Le profil de sécurité continue d'être comparable à celui de la greffe autologue. Aucun événement indésirable lié à la thérapie génique n'a été observé, et il n'existe aucun signe de dominance clonale. [105]

b. Edition génomique des HSPCs par transfère lentiviral du gène BA-T87Q-globine

i. Vecteur de Thérapie Génique Antisickling

Les vecteurs lentiviraux (VL) dérivés du virus VIH avec un tropisme particulier pour les lymphocytes basés sur les ARN lentivirus monocaténaire, qui sont une sous-classe de rétrovirus. Ils combinent les avantages d'une capacité de clonage de milieu de gamme avec une expression génétique stable. Ils sont capables de transduire des cellules en division ou non, y compris les neurones, d'intégrer des transgènes dans le génome de l'hôte et de favoriser l'expression génique à long terme. [106]

Lentiglobine BB305

lentiglobine BB305 vecteur lentiviral est un virus de l'immunodéficience humaine de type 1 VIH-1 de troisième génération auto-inactivante SIN (- self-inactivating-) basé sur le vecteur lentiviral pseudotypé avec la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse VSV-

G portant le gène de la bêta-globine humaine avec une seule modification au codon 87 ($\beta^A 87$ Thr : Gln [β^{A-T87Q}])

Le gène thérapeutique de la globine β^A -T87Q est sous le contrôle transcriptionnel du promoteur de la bêta-globine humaine spécifique de l'érythroïde et des éléments amplificateurs spécifiques de l'érythroïde DNaseI sites hypersensibles HS2 HS3 et HS4 de la LCR bêta-globine LCR [104] (figure 18) [107]

Le vecteur lentiGlobine BB305 lentiviral ne code pour aucune protéine VIH ; les seules séquences dérivées du VIH dans la transcription sont les longues répétitions terminales (LTR) (rendues auto-inactives (SIN) en supprimant les séquences promoteur/enhancer), les régions atténuées de l'antigène du groupe (gag), le tractus polypurine central (cPPT), et l'élément de réponse de révolution (RRE), tous ces éléments aidant à la production, l'emballage ou le transfert de la transcription contenant le gène thérapeutique. D'autres séquences sont dérivées du gène humain β^A -globin.

Il est important de souligner que le vecteur lentiGlobine BB305 lentiviral n'est pas compétent pour la réplication et ne code aucun gène pathogène.

Le LentiGlobin BB305 Drug Product insert est intégré de façon stable dans le génome de la cellule, et n'a pas la capacité de mobilisation. La transcription de l'ARN conditionnée dans le vecteur lentiviraux recombinant LentiGlobine BB305 est stable et n'a pas de capacité de réplication. [104]

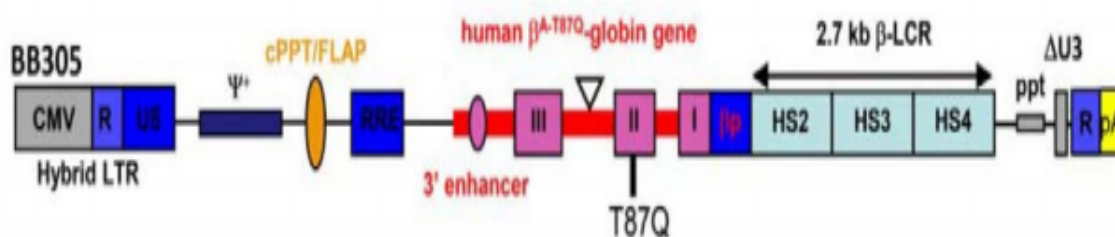


Figure18 diagramme Du vecteur BB305 [107]

Le vecteur lentiviral HPV569 a été évalué lors du premier essai LG001 chez l'homme.

Les LV originales utilisées pour corriger à long terme le SCD et le β -thalassémie chez la souris [108-110] comprenaient (1) le RRE du VIH1 et le tractus polypurine central ; (2) le gène humain β A-globine, en orientation inverse, de type sauvage ou avec la mutation β Q ; (3) le promoteur humain β A-globine, et (4) un mini-LCR composé de HS2, HS3 et HS4 de 644, 845, et 1153 bp de longueur, respectivement.

Pour préparer les essais cliniques chez l'humain, des modifications d'innocuité ont été apportées au vecteur original, comme suit, afin de produire le vecteur appelé HPV569.[109-110] Ces modifications comprennent la mutation du gène GAG et la suppression de l'amplificateur viral et des éléments promoteurs dans la région U3 du 3'LTR afin de générer un vecteur SIN (*Figure. 19*) [103]. La modification du NAS réduit la probabilité de propagation du VL recombinant capable de réplication dans les cellules vecteurs et les cellules cibles, diminue le risque de mobilisation du génome vecteur lors d'une infection secondaire par le VIH,132 et réduit l'activation résiduelle des oncogènes cellulaires par les activités d'enhancer/promotrice des LTR intégrés. [111-112] Une autre modification a concerné la région U5 du 3'LTR, qui a été remplacée par un signal artificiel de polyadénylation/termination dérivé du gène du lapin β -globine. [113]. Cette dernière modification a donné des titres viraux plus élevés pour les versions SIN du vecteur HPV569 en raison d'une polyadénylation plus efficace et de la fin de la transcription virale¹³⁶. Dans un effort pour protéger les cellules transduites contre l'activation cis des gènes adjacents par des activités d'amplification présentes dans le LCR β -globine [114], deux copies des 250 éléments de base bp de l'isolant chromatinique β -globine de poulet (chicken β -globin locus DNase I hypersensitive site 4 : cHS4) ont été insérées à la place de la région U3 supprimée du vecteur.

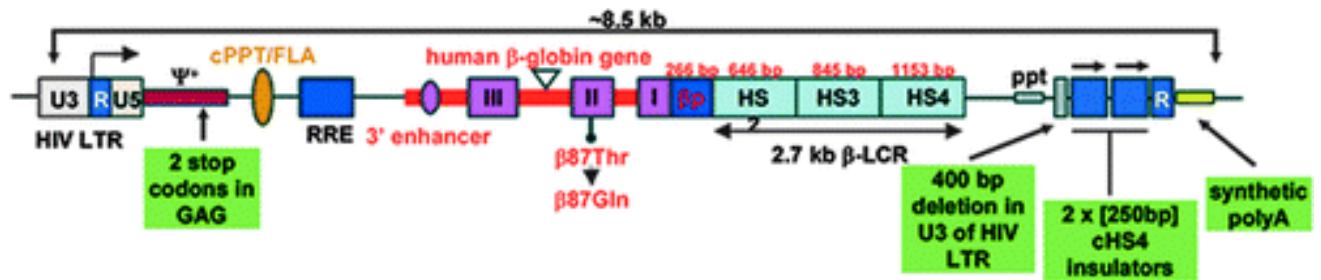


Figure 19 Diagramme du vecteur lentiviral HPV569 β -globine (β A-T87Q). [103]

Le 3' β -globin amplificateur, la suppression de 372 bp IVS2, la mutation β A-T87Q (ACA[Thr] à CAG[Gln]), et les sites hypersensibles DNase I (HS) 2, HS3 et HS4 de la région de contrôle du locus β -globine humaine (LCR) sont indiqués. Les modifications de sécurité, y compris les 2 codons d'arrêt dans le signal d'emballage ψ^+ , la suppression de 400 bp dans l'U3 du LTR VIH droit, le signal polyA lapin β -globin polyA et les isolateurs chromatine 2×250 bp cHS4, sont indiquées. Dans le vecteur lentiviral BB305, le promoteur/augmenteur U3 a été remplacé par le promoteur/augmenteur cytoméglovirus (CMV) et les éléments isolants cHS4 de 2×250 bp ont été enlevés.

cPPT/flap, tractus polypurine central ;

HIV LTR, virus de l'immunodéficience humaine de type 1, longue répétition terminale;

ppt, tractus polypurine ;

RRE, élément réactif ;

β p, promoteur humain β -globine.

ii. Le développement du vecteur lentiviral BB305

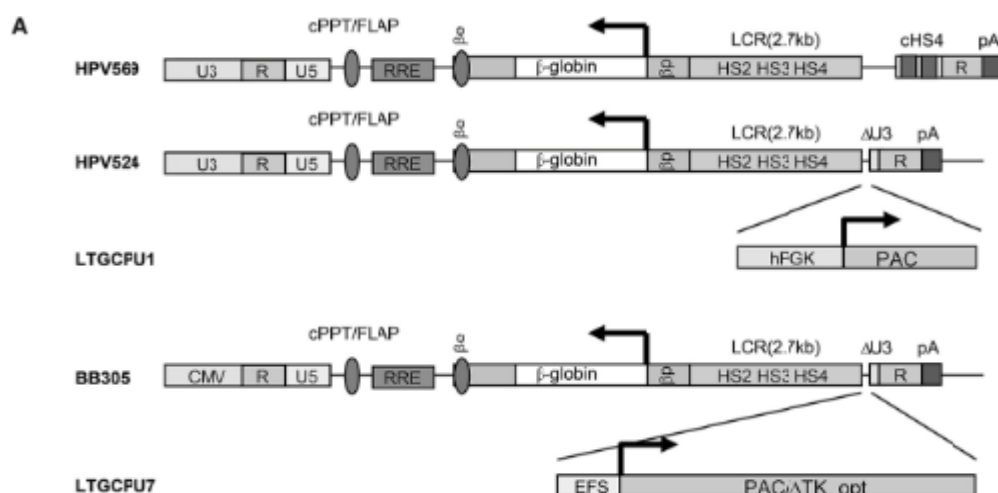
Le vecteur BB305 de nouvelle génération a été produit, purifié et testé sur des cellules CD34⁺ humaines, ainsi que dans un modèle murin de β -thalassémie. [115] La comparaison côte à côte de HPV569 et BB305 a montré que les changements vectoriels ont entraîné à la fois une augmentation des titres vectoriels (3 à 4 fois) et une augmentation de l'efficacité de la transduction (2 à 3 fois). Des études toxicologiques exhaustives chez la souris et des comparaisons vectorielles ont montré une correction du phénotype β thalassémique sans effet toxique lié à aucun des vecteurs et des modèles d'intégration similaires (surtout dans les gènes

RefSeq¹⁴), sans aucun signe de croissance clonale ou de sélection in vivo [115]. Des essais d'immortalisation in vitro (IVIM), mis au point par le laboratoire Baum, 146 ont été réalisés afin d'évaluer le risque de transformation des cellules hématopoïétiques lors de l'intégration vectorielle. Les deux vecteurs (HPV569 et BB305) présentaient un risque fortement réduit d'immortalisation des cellules hématopoïétiques murines comparativement aux vecteurs rétroviraux témoins, et les VL contenant le puissant promoteur viral du SFFV. [108 107] (*Figure19*) [119]

LV LTGCPU7Double PAC et HSV1-TK Globine

Afin d'améliorer la sécurité et l'efficacité du vecteur de thérapie génique, une version supprimée du gène suicide du virus de l'herpès simplex de type 1 thymidine kinase (TK) a été fusionner au cadre de lecture ouvert PAC (*Figure 20A*) [116] et conçu une séquence pour optimiser l'expression dans les cellules humaines (PAC/ Δ TK_{opt} ; Figure S1). Nous avons remplacé le promoteur du phosphoglycérate humain (PGK) par la version courte et sans intronisation du promoteur du facteur 1 alpha (EF1A) (elongation factor 1 alpha) et le promoteur U3 dépendant du TAT par le promoteur du cytomégalo virus (CMV), afin de diminuer la taille du vecteur et d'augmenter son titre.¹⁴ Le vecteur LTGCPU7 résultant avait un titre fonctionnel qui variait de 52 % à 87 % de celui du BB305 VL clinique parental [108] (*figure 20B*).[116]

¹⁴ La base de données qui est une collection en libre accès, annotée et conservée de séquences nucléotidiques accessibles au public (ADN, ARN) et de leurs produits protéiques.



B

Batch	Mean titers (TU/ ML)		Fold difference
	BB305	LTGCPU7	
1	2.9×10^5	1.5×10^6	2.0
2	1.5×10^5	1.3×10^6	1.2
3	9.0×10^5	4.9×10^5	1.8
4*	5.5×10^7	3.4×10^7	1.6

*après un tour en centrifugation

Figure 20. Constructions de vecteurs lentiviraux utilisées dans les récents essais [116]

(A) Toutes les VL utilisées codent la chaîne βQ-globine sous le contrôle du promoteur humain β-globine (βAT) et des sites hypersensibles (HS) de la région de contrôle du locus β-globine (LCR). Les vecteurs HPV569, HPV524, et LTGCPU1 contiennent une répétition terminale longue de 5' complète dérivée du VIH, tandis que BB305 et LTGCPU7 contiennent un promoteur et un amplificateur de cytomégalo virus (CMV) au lieu de la région U3 du VIH. Les squelettes des vecteurs HPV524 et LTGCPU1 sont similaires au vecteur lentiviral HPV569, sauf qu'ils ne contiennent pas d'isolants chromatine (cHS4).

(B) Comparaison côte à côte des titres BB305 et LTGCPU7 de quatre expériences de production indépendantes.[116]

iii. Rôles des vecteurs HPV569 et BB302

Les vecteurs HPV569 et BB305 sont conçus pour être utilisés comme un seul produit pour la thérapie génique des β-hémoglobinopathies (SCD et β⁻TM). La conception vectorielle est destinée à surmonter le déficit des chaînes de β-globine dans la β-thalassémie et à fournir une activité de polymérisation anti-HbS dans le SCD. Le vecteur HPV569 est le premier vecteur à avoir été testé dans le monde entier dans le cadre d'un essai humain approuvé pour

la thérapie génique des hémoglobinopathies, le premier patient ayant été transplanté avec des cellules transduites en 2006. [103]

iv. Les avantages du vecteur LVBB305

Un essai clinique publié antérieurement a démontré l'avantage des cellules autologues CD34+ transduites avec un vecteur lentiviral auto-activant (HPV569) contenant un gène de β -globine (β A-T87Q-globine) dans un sujet atteint de bêta thalassémie majeure. Ce vecteur a été modifié pour augmenter l'efficacité de la transduction sans compromettre la sécurité. Les analyses in vitro ont indiqué que les changements ont entraîné une augmentation des titres vectoriels (de 3 à 4 fois) et de l'efficacité de la transduction (de 2 à 3 fois). Une étude in vivo dans laquelle 58 souris bêta talassémiques ont été transplantées avec des cellules de moelle osseuse syngénique produites par vecteur ou par moelle osseuse simulée a indiqué une efficacité thérapeutique soutenue. Des transplantations secondaires impliquant 108 receveurs ont été effectuées pour évaluer l'innocuité à long terme. L'étude de six mois n'a révélé aucune toxicité hématologique ou biochimique. Le profil du site d'intégration a révélé une reconstitution hématopoïétique oligo-polyclonale dans les greffes primaires et une clonalité réduite dans les greffes secondaires. Des cellules tumorales ont été détectées chez les souris de transplantation secondaire dans tous les groupes de traitement (y compris le groupe témoin), sans différences statistiques dans l'incidence de la tumeur. Ces données exhaustives d'efficacité et d'innocuité ont servi de base au lancement de deux essais cliniques avec ce vecteur de deuxième génération (BB305) en Europe et aux Etats-Unis chez des patients atteints de drépanocytose et de β -thalassémie majeure. [103]

v. Conception de l'étude et conditionnement de pré-transplantation

Les études cliniques menées en France sur les produits HPV569 et BB305 sont des études non randomisées, ouvertes, à dose unique, de phase 1/2 et ne portent que sur des patients n'ayant pas de donneur frère ou sœur. Le premier essai réalisé, dont l'approbation réglementaire a été obtenue en 2006, s'intitulait LG001 et visait à évaluer le produit pharmaceutique HPV569, tel que décrit dans la section "Le vecteur lentiviral HPV569 a été évalué dans le cadre du premier essai LG001 chez l'humain" chez 10 sujets atteints d'une SCD ou d'une β -TM. Après le traitement de 3 sujets, le vecteur HPV569 a été remplacé par le

vecteur BB305 amélioré et sa fabrication, et un nouveau protocole d'essai clinique, appelé HGB-205, a été mis en œuvre pour traiter les 7 autres sujets. L'étude HGB-205 est toujours en cours en France pour β -TM et SCD. (Tableau 4) [121-122]

En plus des caractéristiques du vecteur de qualité clinique (titre élevé, haute pureté du lot fabriqué, propriétés intrinsèques d'expression de la globine thérapeutique), les paramètres clés du succès comprennent

- la dose de cellules CD34+ perfusées
- le nombre moyen de copies vectorielles (VCN) dans la préinfusion de cellules CD34+ et
- un conditionnement myéloablatif efficace. Parce qu'il y a peu de preuves convaincantes dans les modèles animaux et les essais cliniques que le transfert efficace de gènes lentiviraux aux CSH peut être réalisé avec un chimérisme soutenu élevé pour les cellules porteuses de vecteurs en l'absence d'une myéloablation étendue, lorsqu'une dose de cellules CD34+ semblable à celle applicable aux paramètres autologues humains est utilisée, nous avons décidé d'appliquer une dose complète d'agent myéloablatif avec le busulfan¹⁵ intraveineux (IV) comme traitement de conditionnement de pré-transplantation. Cependant, l'utilisation additionnelle d'un agent immunosuppresseur (p. ex., cyclophosphamide) n'est pas nécessaire dans le contexte autologue. La surveillance du conditionnement du busulfan afin d'optimiser la transplantation de CSH est une composante importante du succès [117] et est réalisée avec soin. Lorsque la fabrication du produit médicamenteux est terminée, le sujet reçoit un conditionnement myéloablatif avec du busulfan IV à une dose initiale de 3,2 mg/kg/jour pendant 4 jours à la suite d'une analyse pharmacocinétique. La dose et le schéma posologique du busulfan sont surveillés quotidiennement et peuvent être ajustés en fonction des concentrations plasmatiques de busulfan afin de maintenir des niveaux appropriés d'exposition à la myéloablation (exposition à l'ASC de 4500-5000[μ M•min]/jour pour un schéma

¹⁵ Le **busulfan** est un diester sulfonique utilisé comme anticancéreux dans le conditionnement préalable à une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Son activité pharmacologique ne s'exerce que sur la moelle osseuse

posologique quotidien, sur une période de 4 jours). Après le lavage du busulfan pendant plusieurs jours après la fin de l'administration IV du busulfan, le produit médicamenteux est perfusé. Le sujet reste hospitalisé jusqu' à la greffe (nombre absolu de neutrophiles[ANC]? $0,5 \times 10^9$ /litre pendant 3 jours consécutifs) et le patient est médicalement stable. Les sujets sont suivis mensuellement pendant les 6 premiers mois après la transplantation, puis tous les 3 mois jusqu' à 24 mois après la transplantation. Les sujets sont ensuite enrôlés dans une étude de suivi à long terme pendant 13 années supplémentaires.

vi. Préparation du produit médicamenteux (cellules CD34+ génétiquement modifiées)

- Produit médicamenteux

Le produit médicamenteux Lentiglobine BB305 est défini comme étant des cellules souches CD34+ hématopoïétiques autologues transduites avec le vecteur lentiviral lentiglobine BB305 codant pour le gène humain bêta at87q globine et en suspension dans le sérum albumine 5 /100 du sérum humain HSA.

- Préparation des sujets a l'introduction des cellules CD34+ transduite par le lentiglobine BB305

Une fois que les sujets ont subi un dépistage et que l'admissibilité a été déterminée, les cellules hématopoïétiques CD34+ autologues sont prélevées soit par aphérèse de cellules sanguines périphériques mobilisées (pour les sujets atteints de la maladie BTM β thalassemie majeur), soit par prélèvement de moelle osseuse (pour les sujets atteints de la SCD). Des récoltes multiples peuvent être effectuées au besoin pour atteindre la dose minimale de cellules requise pour la fabrication du produit pharmaceutique et pour la sauvegarde non provoquée. La mobilisation est réalisée avec le filgrastim, une forme recombinante du facteur de stimulation des granulocytes et des colonies (G-CSF), en association avec le plerixafor. La combinaison de plerixafor et du filgrastim peut être la stratégie de mobilisation la plus efficace pour les sujets atteints d'une β -thalassémie. [118,119] L'aphérèse est réalisée le cinquième jour de la mobilisation. L'objectif est de recueillir suffisamment de cellules pour la fabrication et le traitement de secours. Après l'approvisionnement, la population de cellules

CD34+ est enrichie par purification. Une partie du produit est cryoconservée pour la thérapie de secours. Les cellules CD34+ sont cultivées dans un milieu exempt de sérum, enrichies de cytokines humaines recombinantes, de thrombopoïétine (TPO) et de récepteur de tyrosine kinase de type FMS-3 (Flt3-L) pendant environ deux jours. Les cellules sont ensuite incubées pendant une journée supplémentaire pour l'étape de transduction lentivirale. Après la transduction, une partie des cellules et du surnageant est enlevée pour les essais de libération. Le rappel des cellules est cryoconservées. Une fois les essais de libération et l'élimination terminés, le produit médicamenteux, défini comme cellules souches hématopoïétiques CD34+ transduites avec le BB305 LV, est perfusé après conditionnement myéloablatif du patient.

c. Résultats des essais à ce jour de Patients atteints d'un SCD et d'une β -TM dans l'essai HGB-205 avec le médicament BB305

Les études LG001 et HGB-205 ont été les premières études de thérapie génique au monde à traiter les sujets SCD et β -TM, respectivement, réalisant la première conversion vers l'indépendance transfusionnelle à long terme d'un sujet β -TM et les premières preuves de bénéfice clinique en SCD.[121] (*figure 21*) [123]

i. Essais cliniques: Résultats intérimaires en France

Les essais français ont été à l'avant-garde de l'expérimentation des produits pharmaceutiques HPV569 et BB305 et sont le sujet principal de cet article de synthèse. Le programme BB305 a maintenant pris de l'expansion à l'échelle internationale, et les résultats initiaux sont résumés dans le (*tableau 4*) [121-122] et dans la section Essais multicentriques aux États-Unis et à l'échelle internationale pour le β -TM (HGB-204) et le SCD (HGB-206) avec le médicament BB305.

En date de novembre 2015, quatre sujets avec β -TM et un sujet avec SCD avaient été traités avec un produit médicamenteux BB305 selon le protocole HGB-205. Les premiers résultats ont été présentés lors de réunions scientifiques, mais n'ont pas encore été publiés, et l'essai est en cours. [119-120] Les quatre sujets traités β -TM sont jusqu'à présent devenus indépendants de la transfusion, et le sujet traité présente des avantages cliniques précoces

Tableau 4 Essais cliniques humains à ce jour pour la thérapie génique de β -TM et/ou SCD sévère en France et à l'international avec les vecteurs lentiviraux (HPV569 puis BB305).

Les résultats ont été donnés lors de plusieurs réunions internationales [121-122]

Gene	β^{A-T87Q} -globin	β^{A-T87Q} -globin	β^{A-T87Q} -globin
Vector	HPV569	BB305	BB305
Location	France	France	USA
Protocol number	LG001 study	NCT02151526(HGB-205 study)[121]	NCT02140554(HGB-206 study)[122]
Sponsor	bluebird bio (for merly Genetix Pharmaceuticals)	bluebird bio	bluebird bio
Condition	β -thalassemia major and severe sickle cell disease	β -thalassemia major and severe sickle cell disease	Severe sickle cell disease
Conditioning	Myeloablative conditioning	Myeloablative conditioning	Myeloablative conditioning
Intervention	Transplantation of HSCs transduced ex vivo with a lentiviral vector	Transplantation of HSCs transduced ex vivo with a lentiviral vector	Transplantation of HSCs transduced ex vivo with a lentiviral vector
Phase	I/II	I/II	I
Title	A Phase I/II Open Label Study with Anticipated Benefit Evaluating Genetic Therapy of the β -Hemoglobinopathies (Sickle Cell Anemia and β -Thalassemia Major) by Transplantation of Autologous CD34+ Stem Cells Modified ex-vivo with a Lentiviral β A-T87Q Globin (Lentiglobin™) Vector	A Phase 1/2 Open Label Study Evaluating the Safety and Efficacy of Gene Therapy of the β -Hemoglobinopathies (Sickle Cell Anemia and β -Thalassemia Major) by Transplantation of Autologous CD34+ Stem Cells Transduced Ex Vivo with a Lentiviral β A-T87Q-Globin Vector (LentiGlobin®BB305 Drug Product)	Phase 1 Study Evaluating Gene Therapy by Transplantation of Autologous CD34+ Stem Cells Transduced Ex Vivo with the LentiGlobin BB305 Lentiviral Vector in Subjects with Severe Sickle Cell Disease
Start date	Sept 2006	July 2013	August 2014
Results as of december2015	First β E/ β O-treated patient in the world, independent of transfusions for more than 7 years	First β S/ β S-treated patient in the world, with >50% β T87Q-globin2 β E/ β O patients independent of transfusions, 1 β O/ β O treated recently	3 β S/ β S subjects treated. No clinical results available yet
Estimated primary completion	Terminated	December 2017	March 2019

Le premier essai clinique avec le produit candidat-médicament HPV569 (LG001) a été initié en 2006 en France (*tableau 4*). [121-122] Trois sujets ayant reçu β -TM ont été traités et un (sujet n° 1003) est devenu indépendant de la transfusion [115] . (*Figure 21*) [123]

Résultats des essais à ce jour

Les premiers essais

Les études LG001 et HGB-205 ont été les premières études de thérapie génique au monde à traiter les sujets SCD et β -TM , respectivement, réalisant la première conversion vers l'indépendance transfusionnelle à long terme d'un sujet β -TMe et les premières preuves de bénéfice clinique en SCD. [159 121]

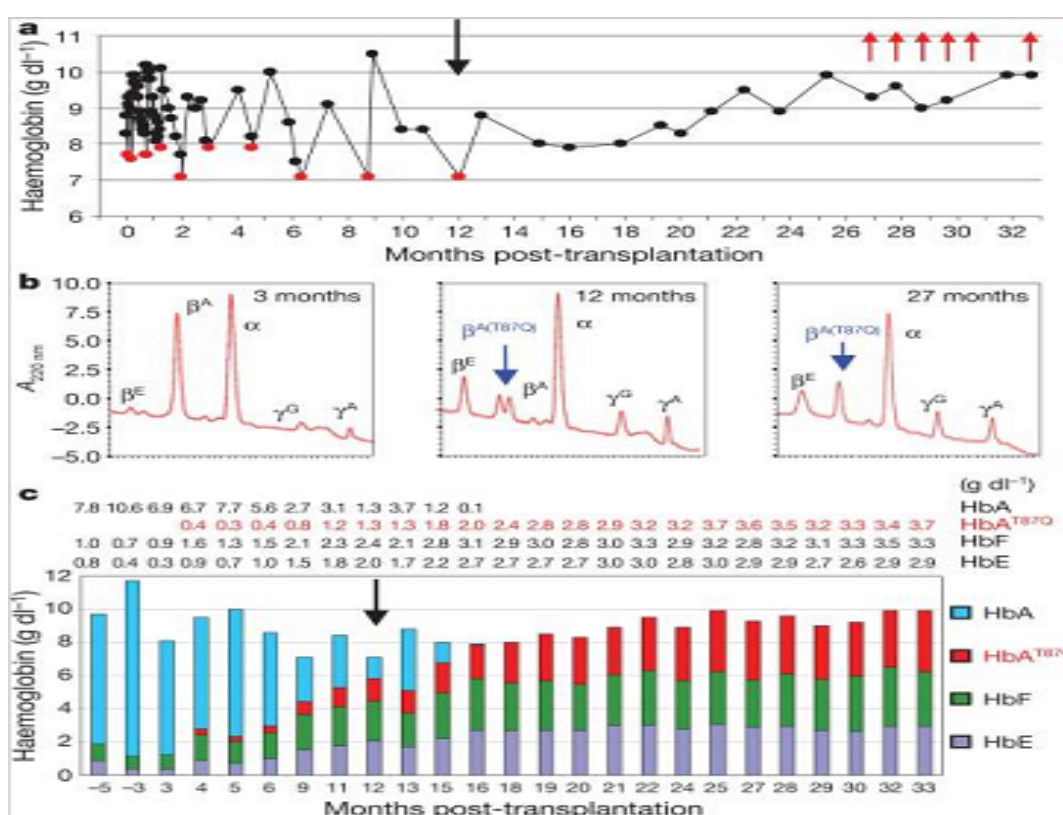


Figure 21 Conversion à l'indépendance transfusionnelle [115 123]

- a.** les concentrations totales d'Hb dans le sang total. Points rouges, points de temps de transfusion ; flèche verticale noire, la dernière fois que le patient a été transfusé ; flèches rouges, phlébotomies (200 ml chacune) pour éliminer l'excès de fer.
- b.** profils de la chaîne globine sanguine HPLC. Notez que β^A ne provient que de transfusions sanguines.
- c.** Contribution de chaque espèce d'Hb, quantifiée par HPLC, aux concentrations sanguines totales d'Hb (en g dl⁻¹). Les chiffres réels pour chaque espèce d'Hb sont indiqués au-dessus du tableau.

ii. Les résultats à moyen terme du premier patient traité par LV T87Q globine seulent l'essai HGB205

• Greffe et expression du gène HbAT87Q

La greffe de neutrophiles a été réalisée le 38^e jour après la transplantation, et la greffe de plaquettes le 91^e jour après la transplantation. La (*figure 22A*) [124,107] montre la trajectoire du nombre de copies vectorielles et la figure 1B montre la production de HbAT87Q. Le marquage génétique a augmenté progressivement dans le sang total, les cellules CD15, les cellules B et les monocytes, se stabilisant 3 mois après la transplantation. L'augmentation des niveaux de cellules T vectrices a été plus graduelle.

Les taux d'HbAT87Q ont également augmenté régulièrement (*figure 22B*) [124,107] et les transfusions de globules rouges ont été interrompues, la dernière transfusion ayant eu lieu le 88^e jour. Les niveaux d'HbAT87Q ont atteint 5,5 g par décilitre (46 %) au mois 9 et ont continué d'augmenter à 5,7 g par décilitre (48 %) au mois 15, avec une diminution réciproque des niveaux d'HbS à 5,5 g par décilitre (46 %) au mois 9 et 5,8 g par décilitre (49 %) au mois 15. Les taux d'hémoglobine totale sont demeurés stables entre 10,6 et 12,0 g par décilitre après le sixième mois suivant la transplantation. Les taux d'hémoglobine fœtale sont demeurés inférieurs à 1,0 g par décilitre.

• Sécurité du produit médicamenteux LentiGlobin BB305

Aucun effet indésirable lié aux cellules souches transduites par LentiGlobin BB305 n'a été signalé. Les résultats des tests de détection de la présence d'un lentivirus capable de se répliquer ont été uniformément négatifs. La surveillance en série des sites d'intégration dans les échantillons de sang périphérique a montré un profil polyclonal constant sans détection d'un clone dominant (défini comme un clone unique représentant plus de 30 % des événements d'intégration uniques) jusqu'au 12^e mois. [124,107]

Le transgène est détecté dès la sortie d'aplasie et reste stable dans la totalité des neutrophiles, avec un recul de 18 mois. La production de l'hémoglobine thérapeutique (identifiable par sa mutation anti-polymérisation) est détectée parallèlement (*Figure 22*) [124, 107] pour se stabiliser à environ 50 %, c'est à dire à égalité avec la production résiduelle

d'hémoglobine S. Cliniquement, ce mélange d'hémoglobines (équivalent à celui d'une personne hétérozygote) permet la disparition de tous les symptômes cliniques et biologiques de la maladie : indépendance transfusionnelle, absence de symptôme de vasculopathie

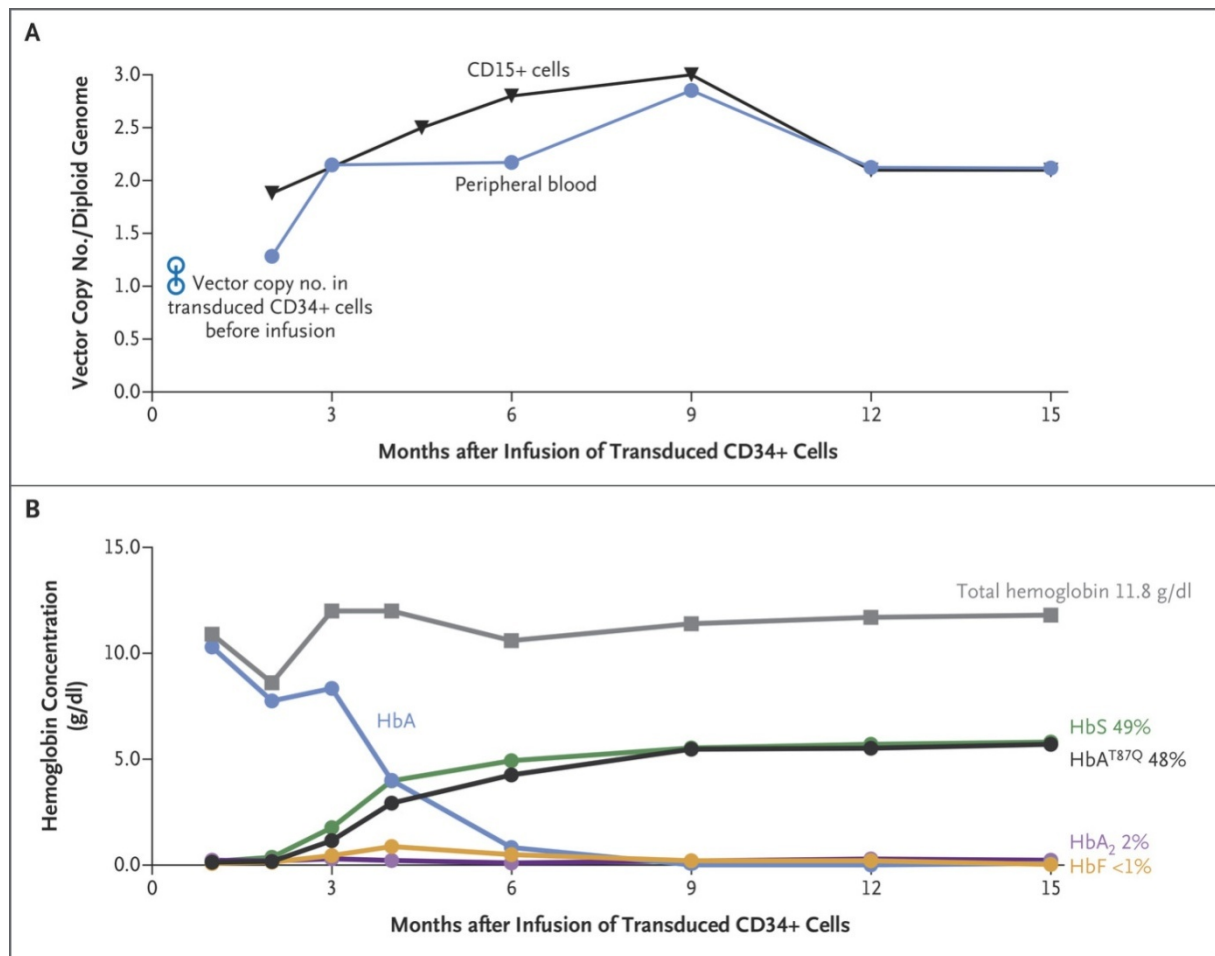


Figure22 Greffe avec des cellules modifiées et expression du gène thérapeutique chez le patient.
[124,107]

A. Nombre de copies de vecteurs présentes dans les cellules nucléées du sang et les neutrophiles CD15⁺ à courte durée de vie pendant les 15 mois suivant la transduction des progéniteurs CD34⁺. Les valeurs initiales dans ces cellules, avant la perfusion, sont indiquées sur la partie gauche.

B. Taux d'hémoglobines totaux et spécifiques de chaque fraction, calculés à partir des résultats d'une analyse HPLC (*high-performance liquid chromatography*). La contribution de chaque type d'hémoglobine au cours du 15^e mois est également indiquée. Le niveau d'hémoglobine A (HbA) est la conséquence des perfusions de globules rouges reçues par le patient avant le traitement de thérapie génique et au début de celui-ci (jusqu'au jour 88).

HbA2 est une hémoglobine adulte ne provenant pas des transfusions.

HbF : hémoglobine fœtale ;

- **Mesures cliniques et biologiques**

Les changements dans les mesures biologiques liées à la drépanocytose sont présentés au tableau 1. La numération globulaire complète était stable, la numération réticulocytaire a diminué considérablement et les érythroblastes circulants n'ont pas été détectés. Les valeurs de laboratoire, y compris les taux de microalbumine dans l'urine, indiquent des fonctions rénale et hépatique normales. Bien que la chélation du fer ait été interrompue avant la transplantation, les niveaux de ferritine ont diminué à 363 µg par litre au mois 15, et l'IRM du foie 1 an après le traitement a montré une faible charge en fer (niveau de fer mobilisable circulant, taux de relaxation R2*=117 Hz ; et niveau de fer, 3,1 mg par gramme vs 54 Hz et 14,6 mg par gramme avant la thérapie génique). Les taux plasmatiques de bilirubine totale et de lactate déshydrogénase sont normalisés. Les taux de récepteurs solubles de la transferrine se sont améliorés et étaient 3,4 fois plus élevés que les valeurs normales au dépistage et 1,5 fois plus élevés au 12e et au 15e mois, ce qui indique une normalisation progressive de l'érythropoïèse. [124, 107]

Tableau 5. Valeurs clés de laboratoire avant la thérapie génique (au dépistage) et à des intervalles de 3 mois après la perfusion de cellules CD34+ transduites. [124, 107]

Measure	Normal Range	Screening*	Month 3*	Month 6	Month 9	Month 12	Month 15
Total hemoglobin (g/dl)	13.0–18.0	10.1	12.0	10.6	11.4	11.7	11.8
Red-cell count (per mm ³)	4,500,000–6,200,000	3,700,000	3,900,000	3,700,000	4,000,000	4,200,000	4,300,000
Reticulocyte count (per mm ³)	20,000–80,000*	238,000	259,000	132,000	131,000	143,000	141,000
Mean corpuscular hemoglobin (pg/red cell)	25–30	28	31	29	28	28	28
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl)	31–34	35	34	35	36	35	35
Platelet count (per mm ³)	150,000–450,000	356,000	52,000	122,000	157,000	168,000	201,000
Neutrophil count (per mm ³)	1500–7000	4200	2400	3100	2500	3000	2200
Total bilirubin (µmol/liter)	0–17	50	15	20	14	12	12
Lactate dehydrogenase (U/liter)	125–243	626	285	254	226	274	212
C-reactive protein (ng/ml)	<500	191	814	129	ND	135	158
Ferritin (µg/liter)	22–275	265	869	1095	ND	520	363
Transferrin (g/liter)	1.9–3.2	1.4	1.6	1.7	ND	1.5	1.7
Transferrin saturation (%)	16–35	72	ND	ND	35	56	40
Serum transferrin receptor (mg/liter)	0.8–1.7	5.7	3.0	2.3	ND	2.6	2.5
Iron (µmol/liter)	12–30	26	18	14	ND	20	17
Hepcidin (ng/ml)	1–20	ND	ND	ND	ND	12.9	19.9
Alanine aminotransferase (U/liter)	5–45	22	76	125	116	53	41
Aspartate aminotransferase (U/liter)	5–40	53	57	71	50	49	35

❖ la transfusion d'échange a été effectuée avant le début de la thérapie génique et la transfusion de globules rouges de soutien a été complètement interrompue 88 jours après la transplantation.

- **les tests de globules rouges spécifiques à une maladie falciforme**

Une série de marqueurs fonctionnels érythrocytaires confirme l'efficacité de l'hémoglobine thérapeutique : déformabilité, densité, profil des courbes de désoxygénation (*Figure 23*). [124, 107]

Les proportions de globules rouges fauchés dans le sang du patient au 6e et au 12e mois étaient significativement plus faibles que chez les patients non traités atteints de drépanocytose ($\beta S/\beta S$) (*Figure 23A*). [124, 107] Au 12e mois, le taux de faucille dans des conditions hypoxiques n'était pas significativement différent de celui de la mère asymptomatique et hétérozygote du patient ($\beta A/\beta S$) (*Figure 23B*) [124, 107]. Les études de dissociation de l'oxygène, qui quantifient la saturation en oxygène par rapport à la pression partielle de l'oxygène, ont montré que les résultats chez le patient au mois 12 et les résultats chez un témoin hétérozygote ($\beta A/\beta S$) étaient similaires (*Figure 23C et 23D*). [124, 107]

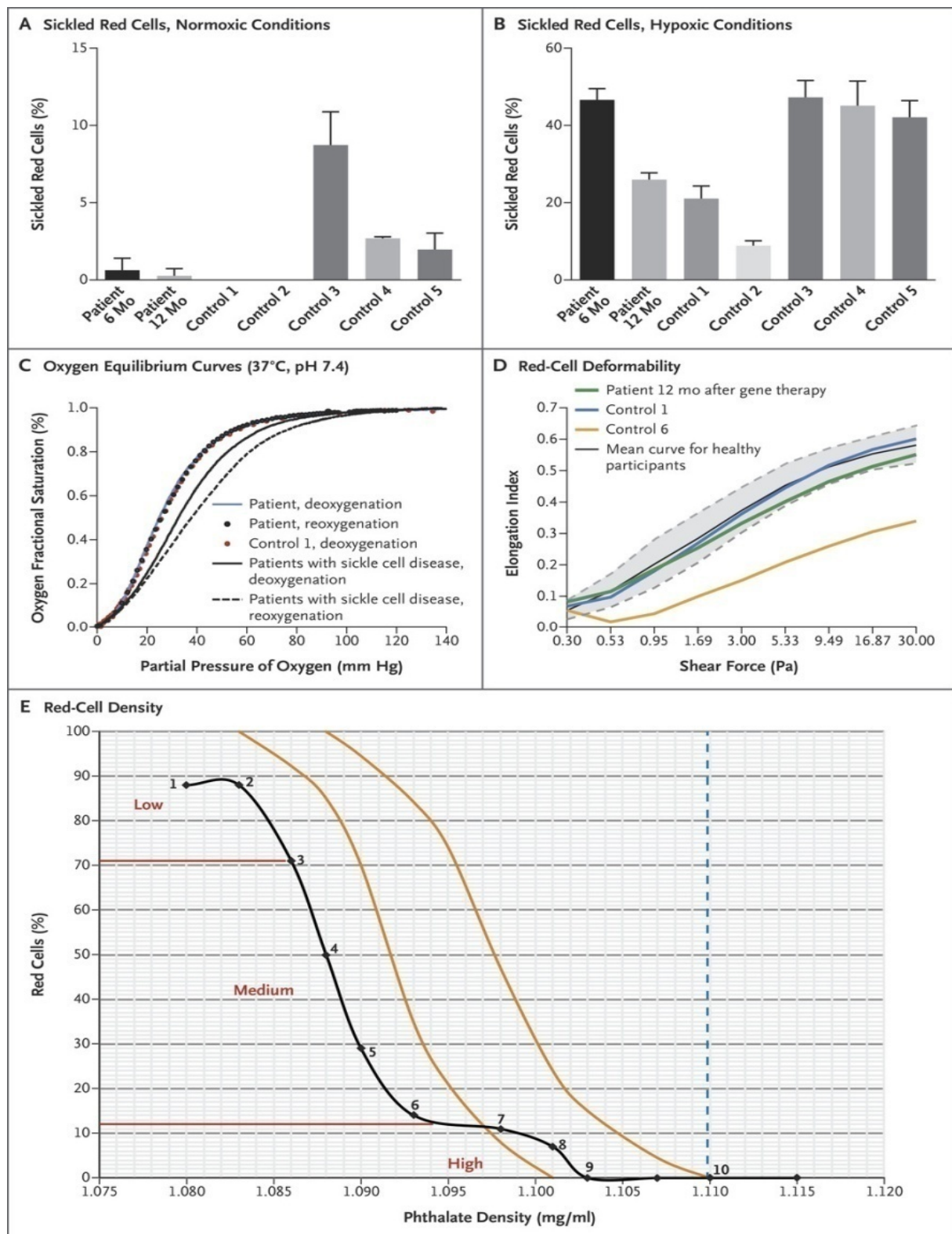


Figure 23. Résultats des tests de globules rouges spécifiques à une maladie falciforme. [124, 107]

A. Taux de globules rouges déformés (en forme de faucille) en conditions normoxiques (20 % de saturation en oxygène).

B. Taux de globules rouges déformés en conditions hypoxiques (10 % de saturation en oxygène) chez le patient, 6 (Pa 6m) et 12 mois (Pa 12m) après la thérapie génique. Comparaison avec des prélèvements témoins de patients soit hétérozygotes pour l'hémoglobine A/S (HbS ou hémoglobine faucille ; contrôles Co1 et Co2 ; le prélèvement 1 étant celui de la mère du patient), soit porteurs de la maladie (contrôles Co3 à Co5). Les barres représentent l'erreur standard.

C. Courbe de dissociation de l'oxygène des globules rouges du patient, 12 mois après la thérapie génique à comparer à celle de sa mère (patient hétérozygote HbA/S, contrôle 1 [Co1]). Des courbes moyennes de déoxygénation des globules rouges (ligne continue) et de leur réoxygénation (ligne discontinue) sont obtenues en prélevant 15 patients porteurs de la maladie et n'ayant pas bénéficié du traitement.

D. La capacité de déformation des globules rouges du patient, 12 mois après la thérapie, est comparée à celles des globules rouges de la mère (HbA/S) et d'un autre patient porteur de la maladie (contrôles Co1 et Co6, respectivement). 95 % des globules rouges de patients sains sont dans la zone grisée, la moyenne étant représentée par la courbe noire. L'index d'élongation est le rapport entre la longueur A et la largeur B de la cellule, calculé par la formule $(A-B)/(A+B)$, sa valeur varie entre 0 et 1.

E. Densité de globules rouges chez le patient, un an après la thérapie génique. Cette estimation est réalisée sur 10 prélèvements et en utilisant un gradient de phtalate. Les lignes oranges indiquent la limite d'un profil normal. Les valeurs mesurées pour le patient sont inférieures en raison de la suppression d'un seul gène d' α -globine

iii. Conclusions

La thérapie génique pour les troubles de l'hémoglobine a fait des progrès majeurs, depuis la découverte précoce des éléments régulateurs de la β -globine ; le développement des VL, y compris les vecteurs HPV569 et BB305 décrits ici ; la transduction efficace des cellules souches hématopoïétiques ; la preuve de principe de l'efficacité chez les modèles murins ; la première conversion à l'indépendance transfusionnelle pluriannuelle d'un patient avec β -TM ; et le bénéfice clinique précoce maintenant observé chez le SCD.

La mise en œuvre réussie d'une stratégie de thérapie génique pour les hémoglobinopathies β implique une approche intégrée de la réglementation, de la fabrication, de la conception et de l'exécution des essais cliniques. La promesse d'apporter cette modalité thérapeutique à un grand nombre de patients nécessitera une industrialisation et une commercialisation réussies ainsi que l'approbation réglementaire du produit.

Jusqu'à présent, aucun effet indésirable grave n'a été attribué à la thérapie génique HSC ex vivo à base de VLV pour les hémoglobinopathies, mais des données à long terme sur un plus grand nombre de patients sont nécessaires pour évaluer pleinement les risques. Les vecteurs actuels sont conçus pour minimiser la possibilité de génotoxicité, y compris l'oncogenèse, mais ce risque ne peut pas encore être quantifié ou exclu de façon concluante. Les études cliniques en cours et futures permettront de mieux comprendre le profil avantages-risques de cette approche thérapeutique. La mise en œuvre de la thérapie génique pour β -TM et SCD dépendra dans une large mesure du rapport bénéfice/risque/coûts. [121]

IV. Induction de globine fœtale lors de la modification génétique du BLC11A dans les cellules souches hématopoïétique HSPC CD34+ dérivé de la moelle osseuse

L'objectif est d'induire un taux d'HbF suffisant pour prévenir la polymérisation de l'hémoglobine drépanocytaire (HbS). Dans β -thalassémie, l'objectif est de remplacer β -globine déficiente et de réduire ainsi le déséquilibre de la chaîne globine. [124]

La drépanocytose comme décrite précédemment est causée par une mutation A→T qui transforme l'acide glutamique chargé négativement en valine hydrophobe en position 6 (E6V) de la sous-unité β -globine de l'hémoglobine adulte (HbA). Lorsqu'elles sont désoxygénées, des plaques hydrophobes de molécules d'hémoglobine falciforme (HbS) interagissent les unes avec les autres, formant des fibres tubulaires d'HbS qui augmentent la rigidité des globules rouges (GR). Les globules rouges faucilles (RBCs) ont une durée de vie raccourcie dans la circulation ; ils adhèrent à l'endothélium et l'activent, favorisent l'inflammation et interagissent avec les leucocytes, ce qui entraîne des épisodes douloureux de drépanocytose et des dommages progressifs aux organes.[125-126] Le traitement de la drépanocytose est principalement le soulagement des complications de la maladie. L'hydroxyurée, qui induit le fœtus γ -globine³ et inhibe la polymérisation de l'HbS ,[127-128] est le seul médicament approuvé pour la prise en charge du SCD dont les réductions de la morbidité et de la mortalité ont été démontrées.[129-130] Cependant, les préoccupations concernant ses propriétés cancérogènes potentielles ont contribué à sa sous-utilisation.⁹ L'espérance de vie actuelle des patients atteints de drépanocytose aux États-Unis est environ trois décennies plus courte que celle de la population générale. [131-132]

La greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (HSCT) peut être curative pour le SCD, mais seulement 18 % des patients atteints de SCD ont des donneurs apparentés.[133] Le fait de recevoir une greffe d'un donneur non apparentés est associé à un risque plus élevé de mortalité et de morbidité. [134] Des essais cliniques utilisant des cellules CD34+ de moelle osseuse autologue (BM) transduites avec des vecteurs lentiviraux porteurs de gènes de globine contre la faucille décrite précédemment dans ce travail sont toujours en

cours .,[121-135] Une autre approche de thérapie génique à l'ARN épingle à cheveux courte à base de lentilles (ARN shRNA) qui détruit sélectivement le lymphome à cellules B/leucémie 11A (BCL11A), l'un des principaux suppresseurs de l'anti faucille fœtale --globine[136-138] dans les cellules érythroïdes est activement à l'étude [139-140] . D'autres nouvelles stratégies de thérapie génique telles que la correction de la mutation drépanocytaire dans les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) [141-142] ou dans les cellules souches hématopoïétiques CD34+ humaines primaires et les cellules progénitrices (HSPC) [143-144] ont été explorées en préclinique. Toutefois, les CSH pleinement fonctionnelles n'ont pas encore été dérivées des CSHI [145], et l'atteinte de niveaux efficaces de correction génique dans le repeuplement à long terme des CSH par des voies de réparation dirigée par homologues (HDR) sans utiliser un marqueur sélectionnable [144] est demeurée un défi [146], ce qui limite la pertinence clinique de ces approches. Contrairement au HDR, la perturbation des gènes par les voies de réparation de la jonction d'extrémité non-homologique (NHEJ) se produit à une fréquence élevée dans les HSC [146]. Par conséquent, la réactivation du fœtus γ -globine tout en réduisant l'expression de la drépanocytose chez l'adulte β -globine par la perturbation du BCL11A, dont la seule fonction connue dans la lignée érythroïde semble être la médiation entre le fœtus et la globine adulte, [137,147,148] offre une stratégie potentielle pour mettre au point un traitement efficace contre le trouble déficitaire de la coagulation

a) Stratégie de Personnalisation du génome en tant que thérapie pour les β -hémoglobinopathies

Malgré une compréhension presque complète de la génétique des β -hémoglobinopathies depuis plusieurs décennies, les options thérapeutiques définitives ont pris du retard. Les développements récents dans les technologies de manipulation facile du génome (nucléases de doigt de zinc, nucléases effectrices de type activateur de transcription, ou nucléases palindromiques à courtes répétitions palindromiques intercalées régulièrement en grappes) offrent des perspectives d'application clinique. L'utilisation des technologies d'édition du génome dans les cellules souches hématopoïétiques CD34+ autologues et les cellules progénitrices représente une avenue thérapeutique prometteuse pour les troubles de la β -

globine. Les stratégies de correction génétique reposant sur la voie de réparation dirigée par l'homologue peuvent réparer les défauts génétiques, tandis que les stratégies de perturbation génétique reposant sur la voie de jonction non homologue peuvent induire l'expression compensatoire de l'hémoglobine fœtale. L'exploitation de la puissance de l'édition du génome peut ouvrir la voie à une forme de thérapie génique de deuxième génération pour les troubles de la β -globine.

b) Les différentes stratégies misent au point pour corriger génétiquement les β -hémoglobinopathies

L'émergence de nucléases de concepteur pour l'édition du génome eucaryote a inauguré une ère de contrôle sans précédent sur le génome. Le développement de nucléases de doigt de zinc (ZFNs), [148,149] comme activateur de transcription (TALENs), [150,151] et meganucleases [152,153] a établi que l'édition du génome comme une technique de laboratoire précieuse. L'émergence du système de nucléase à protéine 9 (Cas9), qui utilise un seul guide ARN (ARN sgRNA) pour diriger la nucléase Cas9 pour le clivage spécifique du site, a engendré un enthousiasme énorme au sujet des applications cliniques potentielles. La vitesse à laquelle de nouvelles variations sur le thème général sont développées est vraiment remarquable. D'autres systèmes semblables à Cas9 comprennent la plate-forme de nucléase CRISPR/Cpf1, [154] nucléases FokI guidées par l'ARN dimère [155,156] et l'utilisation de Cas9s dérivés d'une variété d'espèces procaryotes. [157,158] Il est peu probable que la découverte de nouveaux systèmes CRISPR et de nucléases de type Cas9 capables de modifier le génome eucaryote prendra bientôt fin. [159] Les avantages relatifs des nouveaux systèmes CRISPR, des ZFN et des TALEN font encore l'objet de débats. Bien que les systèmes basés sur CRISPR soient souvent cités comme étant les plus efficaces [160], les ZFN sont la seule technologie d'édition qui a jusqu'à présent fait l'objet d'un essai clinique. Le gène CCR5 a été ciblé par les ZFN dans les lymphocytes T CD4⁺ autologues de patients atteints du VIH. Les cellules modifiées par le gène ont ensuite été réinfusées, ce qui a entraîné une diminution du taux sanguin de VIH chez la plupart des patients. [161] Cette étude a notamment démontré que la réinfusion de cellules humaines primaires autologues modifiées par le génome pouvait être réalisée, bien tolérée et, éventuellement, entraîner des bienfaits cliniques.

Les thérapies fondées sur la modification du génome reposent sur la correction ou la perturbation des gènes. L'induction de rupture double brin (DSB) par une nucléase artificielle est réparée par les voies de réparation endogène de la réparation dirigée par les homologues (HDR) ou de la jonction d'extrémité non homologue (NHEJ). [162] Les stratégies de correction génétique exploitent la voie HDR pour insérer des séquences personnalisées dans le génome grâce à la codélivrance d'un modèle de réparation extrachromosomique en conjonction avec une nucléase artificielle. La création d'un DSB améliore la fréquence des HDR. [163] Ainsi, des séquences de type sauvage (ou personnalisées) peuvent être fournies en tant que donneur extrachromosomique pour réparation à la suite d'un clivage spécifique du site par la nucléase. En revanche, les stratégies de perturbation génétique s'appuient sur la voie NHEJ après le DSB induit par la nucléase pour produire des insertions/délétions locales (indels). [164,165,162] L'introduction de 2 nucléases modifiées peut entraîner une délétion ou inversion ciblée, une duplication, des indels locaux aux sites de clivage de nucléase, ou des translocations/réarrangements chromosomiques. [166,167]

1. Révision du génome à l'aide de CRISPR-Cas9 pour créer le génotype HPFH dans les HSPC s: une approche pour le traitement de la drépanocytose et β -thalassémie.

L'hémoglobine fœtale (HbF) est abondante au stade tardif du fœtus et du nouveau-né, mais elle est progressivement perdue au cours des six premiers mois de la vie à mesure que les gènes codant pour la sous-unité γ -globine de l'HbF sont réprimés. L'expression de l'HbF peut apporter un bénéfice clinique aux patients présentant une β -globine β déficiente ou défectueuse, par exemple dans la drépanocytose (SCD) et β -thalassémie, respectivement. La technologie CRISPR-Cas9 offre une modalité de traitement unique qui peut être utilisée pour éditer ex vivo des séquences d'ADN régulateur dans les cellules souches hématopoïétiques CD34+ et progénitrices (HSPC) contenant des cellules souches hématopoïétiques et progénitrices afin de réguler l'HbF. La réinfusion de CD34+ HSPC modifié devrait mener à la production d'érythrocytes exprimant des taux élevés d'HbF et à l'amélioration de la maladie.

a. Définition du syndrome HPFH

Le syndrome de persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (HPFH) comprend un grand nombre de mutations génétiques principalement du groupe de gènes β -globine, entraînant des taux élevés d'hémoglobine fœtale (HbF) qui persistent jusqu'à l'âge adulte [168]. Ces troubles peuvent être dus à des mutations ponctuelles dans la région promotrice en amont d'un gène γ -globine ou, souvent, à différentes délétions affectant les groupes de gènes β -globine [169]. Plusieurs individus homozygotes pour la HPFH délétionnelle n'expriment que l'HbF et sont en bonne santé [170-171]. Les individus doublement hétérozygotes pour ce type de HPFH et β -thalassémie ou SCD ont des conséquences cliniques minimales ou légères par opposition à la maladie grave chez les patients homozygotes pour ces maladies [172-173]. Les endonucléases à séquence spécifique récemment mises au point offrent la possibilité de mettre au point ces délétions bénéfiques de l'HPFH dans l'homozygote β -thalassémie ou les cellules souches hématopoïétiques des patients atteints de SCD afin de permettre une transplantation autologue.

b. L'expression persistante de l'hémoglobine fœtale (HbF)

Au-delà de la période néonatale est une affection rare et naturelle, appelée persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale, qui améliore considérablement la pathologie de la drépanocytose et de la thalassémie (β -thalassémie). Des études génétiques et épidémiologiques approfondies ont démontré que cette affection est associée à l'une des nombreuses mutations ou délétions ponctuelles spécifiques qui conduisent à l'expression de γ -globine, entraînant une régulation à la hausse de l'HbF. la stratégie consiste à utiliser la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9 dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques CD34+ humaines primaires (HSPC) pour recréer efficacement des variantes génétiques spécifiques associées à l'HbF élevée et pour évaluer leur sécurité, leur efficacité et leur durabilité en tant que stratégie thérapeutique potentielle pour traiter le SCD et β -thal. [174]

c. Modificateurs de la maturation érythroïde répercussions de l'HPFH

Très tôt, l'action bénéfique de l'Hb F a été notée. Les manifestations pathologiques ne sont observées qu'après quelques mois de vie [175], avec la diminution spontanée de l'HbF dans les globules rouges des sujets homozygotes [176]. Cet effet de l'HbF sur la présentation clinique était corroboré par plusieurs séries de faits. La maladie se présente, au moins statistiquement, comme moins sévère dans les groupes de population où est retrouvée par ailleurs une proportion plus élevée, en moyenne, d'HbF [177]. Une première explication vient du fait que la concentration corpusculaire en hémoglobine est remarquablement constante et que l'élévation de l'HbF dans le globule rouge s'accompagne d'une diminution parallèle de la concentration en HbS, donc du facteur déterminant de la polymérisation. Les études *in vitro* confirmaient aussi le pouvoir inhibiteur puissant de l'HbF sur la polymérisation de l'HbS [178]. Le mécanisme en est la formation de molécules hybrides ($\alpha_2\beta^S\gamma$) qui s'intercalent dans le polymère et en interrompent la croissance (*figure 24*) [179]. Il était logique d'en inférer qu'une approche thérapeutique susceptible d'augmenter la production d'HbF serait bénéfique aux malades en influant sur le désordre premier de la maladie, la polymérisation, et donc sur ses conséquences au niveau cellulaire.

Il faut citer, pour mémoire, des essais de manipulation hormonale du taux d'HbF. Connaissant l'augmentation transitoire du taux d'HbF au deuxième trimestre de la grossesse, des essais de traitement par la gonadotrophine chorionique ou par la progestérone ont été tentés, qui n'ont entraîné qu'un effet transitoire et très modeste [180].

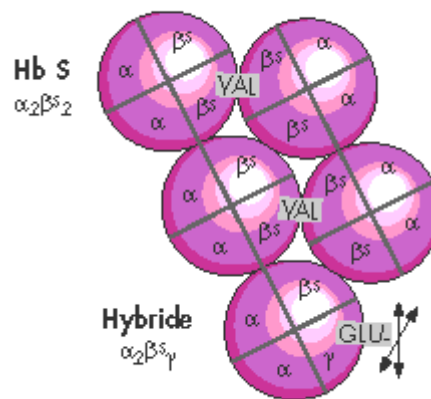


Figure 24. Mécanisme de l'effet protecteur de l'HbF.[179]

La polymérisation de l'Hb S dans sa forme désoxy est initiée par l'établissement d'interactions non covalentes entre la chaîne latérale hydrophobe de la valine mutée en position 6 avec des résidus partenaires (Phe 85 et Leu 88) sur la chaîne b d'une autre molécule d'Hb S. Lorsque de l'hémoglobine foetale ($\alpha_2\beta_g$) est présente dans le globule rouge en même temps que l'Hb S ($\alpha_2\beta^s_2$), il y a formation de molécules hybrides ($\alpha_2\beta^s\gamma$) qui s'intercalent dans le polymère. Le résidu en position 6 dans la chaîne g est un acide glutamique dont la chaîne latérale est chargée et hydrophile. La croissance du polymère est ainsi interrompue. Chez un individu donné, seule une population particulière de globules rouges bénéficie de cet effet : les cellules F

d. L'intérêt de créer le génotype HPFH chez les drépanocytaire et les β -thalassémique

L'étude a été conçue pour augmenter l'hémoglobine foetale pour le traitement de β -thalassémie et de la drépanocytose. Il est connu depuis longtemps que certaines personnes qui sont hétérozygotes composés de β -thalassémie ou SCD avec persistance héréditaire délétionnelle de l'hémoglobine foetale (HPFH) ont des anomalies hématologiques minimales et des manifestations cliniques légères par rapport aux patients homozygotes. Nous avons utilisé CRISPR-Cas9 pour modifier les cellules souches hématopoïétiques et progénitrices (HSPC) de la moelle osseuse normale au génotype délétionnel HPFH. Les cellules érythroïdes dérivées de ces HSPC modifiées ont montré une expression de γ -globine significativement plus élevée par rapport aux cellules non modifiées par suppression. Cette étude fournit une preuve de concept pour le développement d'une nouvelle approche potentielle à la thérapie de transplantation autologue pour le traitement de l'homozygote β -thalassémie et SCD.

e. L'utilisation de Crisper/Sacas9 pour modifier les HSPCs

Parmi les endonucléases modifiées actuellement disponibles, les répétitions palindromiques courtes et régulièrement espacées (CRISPR) et la protéine 9 associée à CRISPR (Cas9) adaptée d'un élément du système immunitaire bactérien facilitent grandement l'édition du génome des mammifères en raison de la facilité de manipulation, du faible coût et de la grande flexibilité [181,182]. Utilisation dans de récentes études la nucléase de *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) à médiation par l'ARN pour exciser un segment de 13 ko du locus du gène β -globine dans la moelle osseuse CD34+ et les cellules souches hématopoïétiques et progénitrices (HSPC) pour ressembler à la délétion sicilienne naturelle de la HPFH (HPFH5). Après différenciation en cellules érythroïdes, les cellules avec délétion ont montré une expression du gène γ -globine plus élevée que les cellules sans délétion. Nous concluons que cette approche, applicable au SCD homozygote et à la plupart des β -thalassémie, est très prometteuse pour leur traitement

Le système CRISPR-Cas9 a été adapté pour obtenir un clivage de l'ADN dirigé vers le site par des ARN guides (ARNg) et l'endonucléase Cas9. Les chercheurs ont identifié des ARNg très puissants (ARNg) qui peuvent cibler des régions au sein du locus β -globin associé à la HPFH. Les ARNg, lorsqu'ils sont combinés et livrés sous forme d'ARNg doubles, ont donné lieu à des suppressions qui imitent les suppressions naturelles associées à la HPFH. Il y a eut également optimisation de la dose et le rapport de transfection de ces ARNs sg avec l'ARNm Cas9 ou la protéine Cas9 en CD34+ HSPCs humains primaires à partir de sang périphérique mobilisé de donneurs sains et pouvons atteindre un taux de transfection supérieur à 85% avec une perte cellulaire minimale (85-95% de viabilité). Nous avons constaté que les ARNg délivrés avec la protéine Cas9 donnent une meilleure viabilité cellulaire que lorsqu'ils sont délivrés avec l'ARNm Cas9, en particulier à des doses plus élevées, tout en atteignant les mêmes taux d'efficacité d'édition. Enfin, la différenciation érythroïde des CD34+ HSPC a démontré une augmentation significative du niveau d'expression du gène γ -globine par qRT-PCR¹⁶ ainsi que des niveaux de protéine HbF, mesurés par FACS et LC/MS.

¹⁶ **RT-PCR quantitative/qRT-PCR.** La RT-qPCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc).

La persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale, est associée à la variation génétique au locus β -globine et c'est une condition naturelle qui améliore substantiellement la drépanocytose et β -thalassémie,. La stratégie étudiée consiste à utiliser le système CRISPR-Cas9 pour recréer des variétés génétiques spécifiques associées à la HPFH dans les cellules souches hématopoïétiques CD34+ et les cellules progénitrices (HSPC) et démontrer leur relation de cause à effet avec des taux élevés d'hémoglobine fœtale (HbF) comme stratégie thérapeutique potentielle pour traiter le SCD et β -thalassémie.

f. Crispr/Cas9- L'édition médiatique du génome des cellules CD34+ humaines Augmente la régulation de l'hémoglobine fœtale à des niveaux cliniquement pertinents dans les colonies d'érythroïdes dérivées d'une seule cellule.

Un certain nombre de variantes génétiques d'origine naturelle sont associées à la persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (HPFH), probablement en raison de la perte de séquences régulatrices qui, autrement, lieraient les protéines régulatrices qui régulent vers le bas l'expression de l'HbF. Ainsi, en utilisant le système CRISPR-Cas9 pour recréer les variations de séquence d'ADN associées à la HPFH dans CD34+ HSPC, cette stratégie vise à soulager l'inhibition transcriptionnelle de la γ -globine, résultant en une régulation à la hausse de l'HbF.

Les HSPC CD34+ humains primaires sains ont été transfecté avec Cas9 et guidé par les ARNsg afin de recréer des variantes génétiques naturelles de HPFH. Les HSPC CD34+ transfectées ont été triées en tant que cellules individuelles post-édition et développées en tant que colonies érythroïdes. Ces colonies ont ensuite été génotypées pour confirmer l'édition et ont fait l'objet d'une évaluation plus poussée de la transcription de la globine et de la protéine. L'analyse clonale a démontré que l'assemblage en bout non homologique (NHEJ) a servi de médiateur dans plus de 90 % des colonies. Ces événements d'édition ont recréé les variantes génétiques prévues de l'HPFH dans jusqu'à 75 % des colonies. Pour certaines, mais pas toutes les variantes génétiques de la HPFH, les modifications génétiques mono- et bi-alléliques ont conduit à une régulation à la hausse significative de l'HbF [183]. Ces résultats ont fourni une stratégie d'édition qui soutient une approche thérapeutique viable pour le traitement de SCD et de β -thalassémie.

g. Guide de conception et de sélections des ARNs pour la génération délétionnelle HPFHs Sicilienne Sa Cas9 nucléase

Pour améliorer l'efficacité des séquences de clivage dans les régions 5' et 3', les chercheurs ont choisi la nucléase de *S. aureus* Cas9 (SaCas9) pour l'édition du génome. Estimant que

(i) il est plus petit que les *Streptococcus pyogenes* classiques (SpCas9), ce qui augmente l'efficacité de la délivrance des gènes, et

(ii) il nécessite un motif protospacer-adjacent (PAM) plus long que SpCas9 pour la reconnaissance des nucléases Cas9 (NNGRRT contre le NNGRRT contre les nucléases), et NGG, respectivement), réduisant ainsi le nombre de sites hors cible dans le génome.

Quatre sites ont été choisis par BLAST¹⁷ ciblant chacun des 5' et 3' points de rupture à la délétion qui montrent moins d'homologie avec d'autres sites du génome (*Figure. 25A*) .[184]. Les huit ARN guides (ARNg), L1 à L4 et R1 à R4 (*tableau 6*).[184] correspondant aux points de rupture 5' et 3', respectivement, ont été construits en pX601 (Addgene) qui contient à la fois SaCas9 et RNAg dans un seul vecteur. Les constructions ont été transfectées individuellement dans des cellules 293T pour déterminer l'efficacité de la génération d'indel par rupture de peuplement double induite par nucléase (DSB) et ensuite réparées par jonction d'extrémité non homologue (NHEJ) en utilisant l'essai d'endonucléase 1 de l'endonucléase T7. Deux ARNg, L2 et L3 et R2 et R3 de chaque côté des points de rupture, induisent des taux d'INDELs¹⁸ plus élevés que les autres (*Figure. 25B*).[184]. Nous avons ensuite déterminé

¹⁷ BLAST (basic local alignment search tool) est une méthode de recherche heuristique utilisée en bio-informatique. Il permet de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés, et de réaliser un alignement de ces régions homologues.

¹⁸ **Indel** est un mot-valise utilisé en génétique et en bio-informatique pour désigner une insertion ou une délétion dans une séquence biologique (acide nucléique ou protéine) par rapport à une séquence de référence. On peut observer en particulier mettre en évidence des indels lorsqu'on effectue des comparaisons au moyen de programmes d'alignement de séquences. Le terme indel a été introduit parce que la notion d'insertion ou de délétion est relative suivant le choix de la séquence utilisée comme référence : à une insertion dans une séquence correspond une délétion dans la séquence qui lui est comparée. Indel permet ainsi de désigner globalement la variation biologique, sans préjuger de quelle séquence constitue la référence. Le mot indel a été inventé par le mathématicien Joseph Kruskal1.

l'efficacité de l'excision des fragments d'environ 13 kb en combinant l'ARNg gauche (L) avec l'ARNg droit (R) en utilisant l'amplification PCR par une paire d'amorces choisies parmi les zones de jonction 5' et 3'. Les combinaisons de 5' et 3' paires d'ARNg (L2/R2 ou L3/R3) ont été les plus efficaces pour obtenir une suppression claire dans les cellules 293T (*Figure. 25C*) [184]. Le sous-clonage et le séquençage des produits PCR de L2/R2 ont également confirmé que les 3' et 5' extrémités des DSBs en amont et en aval après les suppressions de 13 kb étaient parfaitement connectées ou avec une suppression de paire de base à la jonction (*Figure 25D*). [184] Ces résultats indiquent que les ARNg choisis peuvent induire le DSB , causant une suppression de ~13-kb et la réintégration subséquente des deux extrémités.[184]

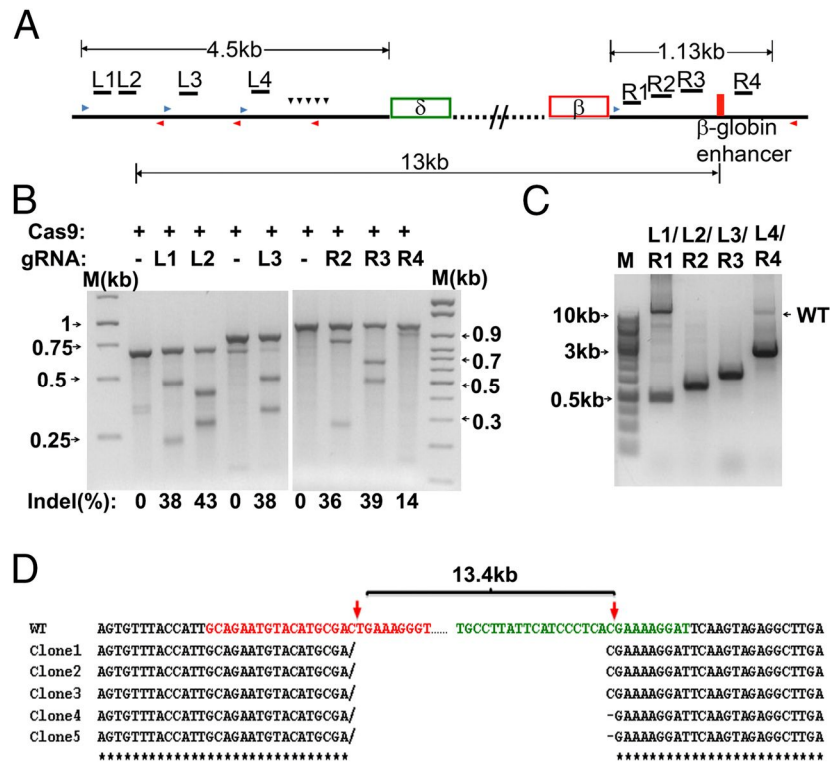


Figure 25. Ciblage des délétions de HPFH5 cliniquement pertinentes par *S. aureus* CRISPR-Cas9 dans les cellules humaines. [184]

(A) Schéma des ARNg ciblant les délétions dans le locus β -globine pour imiter la délétion naturelle de la HPFH sicilienne. Les ARNg ont été choisis parmi 4,5 kb en amont de HBD et 1,13 kb en aval de HBB. Pointes de flèches noires vers le bas, sites de reliure BCL11A putatifs. Pointes de flèche bleues et pointes de flèche rouges, amorces avant et arrière flanquant chaque séquence de ciblage de l'ARNg utilisée pour amplifier les fragments pour le dosage de l'endonuclease 1 T7 (dosage T7E1). Les 5' ARNg du point de rupture sont étiquetés avec "L" ; les 3' ARNg du point de rupture sont étiquetés avec "R" ; le "13kb" représente la longueur de la délétion HPFH-5 représentée sur la figure S1A.

(B) Représentants du test T7E1 de l'ARNg ciblant le locus β -globine dans les cellules 293T. Le pourcentage d'indels est indiqué sous chaque ARNg. La taille de chaque amplification et la taille du produit de clivage par dosage T7 sont indiquées dans le tableau S3.

(C) Suppression à double médiation de l'ARNg par PCR en utilisant l'ensemble d'amorces des plus à gauche et des plus à droite représentés en A. Les tailles de chaque produit de PCR sont énumérées dans le tableau S3.

(D) Résultats représentatifs du séquençage Sanger de deux zones de jonction DSB à partir du sous-clonage du produit PCR des transfectants L2/R2 alignés avec les séquences de jonction WT. Les flèches rouges indiquent les sites de clivage DSB (3 bp à partir des séquences PAM NNGRRT). Entre les deux sites de clivage de l'ARNg, il y a un fragment de ~-kb qui a été supprimé dans les cinq clones examinés. Les séquences rouges dans la jonction 5' et les séquences vertes dans la jonction 3' sont représentées comme des séquences que l'ARNg, L2 et R2 utilisent pour le ciblage.

Tableau 6. Oligonucléotides pour les ARNg ciblant le locus β -globine [184]

gRNA	Targeting sequences-PAM (NNGRRT)	Oligonucleotide used to make gRNA construct
L1	gtccactggattcagtgagcta GTGGGT	5'-CACCGtccactggattcagtgagcta-3'
		5'-AAACtagctcactgaatccagtgga-3'
L2	gcagaatgtacatgcgactga AAGGGT	5'-CACCGcagaatgtacatgcgactga-3'
		5'-AAACtcaagtcgcatgtacattctgc-3'
L3	tgggaggtatactaaggactc TAGGGT (C)	5'-CACCGtgggaggtatactaaggactc-3'
		5'-AAACgagtccttagtatacctccac-3'
L4	cacaagaatagggccacattt GTGAGT (C)	5'-CACCGcacaagaatagggccacattt-3'
		5'-AAACaatgtggccctattctgtgc-3'
R1	gtggagtcaaggctgagagatg CAGGAT (C)	5'-CACCGtggagtcaaggctgagagatg-3'
		5'-AAACcatctctcagccttgactccac-3'
R2	tgccttattcatccctcagaa AAGGAT	5'-CACCGtgccttattcatccctcagaa-3'
		5'-AAACttctgaggatgaataaggcac-3'
R3	gtccttccaaagcagactgtga AAGAGT (C)	5'-CACCGtccttccaaagcagactgtga-3'
		5'-AAACtcacagtctgcttggaggac-3'
R4	gtcctctctccagtcgaatt CTGAAT	5'-CACCGtcctctctccagtcgaatt-3'
		5'-AAACaatttgactgggagaggac-3'

❖ (C), séquences cibles dans le brin complémentaire ; L, 5' étiquetage de l'ARNg du point de rupture ; R, 3' étiquetage du point de rupture. Les lettres en gras sont les séquences PAM.

h. Résultat

Il existe huit types courants de HPFH délétionnelle qui ont été définis au niveau moléculaire (170,171,169,185) (*Figure. 26A*) [184]. Des études analysant la corrélation entre le phénotype et le génotype de patients atteints de différentes HPFH délétionnelles ont révélé que les niveaux élevés d'HbF sont associés à la perte de séquences répressives $\gamma\delta$ -intergéniques dans le locus β -globin [186]. En particulier, une zone critique située à 5' du gène δ -globine a été définie comme un site de liaison important pour le BCL11A qui a principalement une activité répressive pour l'expression de γ -globine [185,187]. La plus petite délétion HPFH est la délétion de Corfou de 7,2 ko qui s'étend de la région $\gamma\delta$ -intergène en amont du gène δ jusqu'à l'extrémité 5' du gène structurel δ -globine [188] (*Figure. 26A*) [184]. Deux patients présentant une délétion homozygote de Corfou ont montré une expression de γ -globine régulée à la hausse, ce qui n'était pas le cas des parents hétérozygotes [188,189]. L'incohérence de l'expression de γ -globine entre le statut homozygote et hétérozygote peut suggérer que l'importation du 3' HS enhancer¹⁹ à la proximité du gène γ -globine est critique pour augmenter l'expression de γ -globine. Pour ces raisons, nous nous sommes d'abord concentrés sur la HPFH5 sicilienne, dans laquelle la délétion de 12,9 kb commence à 3,2 kb en amont du gène δ et se termine à la région flanquante 3' du gène β -globine [190]. La délétion abolit l'ensemble des sites de liaison BCL11A en amont du gène de la globine δ et s'étend jusqu'en amont de l'amplificateur de gène 3' β -globine, rapprochant ce dernier du gène de la $A\gamma$ -globine (*Figure.26B*) [184]. La suppression peut non seulement augmenter l'expression de γ -globine mais aussi réduire la production de β -globine mutante, ce qui peut être d'une importance particulière pour le SCD.

¹⁹ Une séquence **enhancer** est une région d'ADN qui peut fixer des protéines pour stimuler la transcription de gène

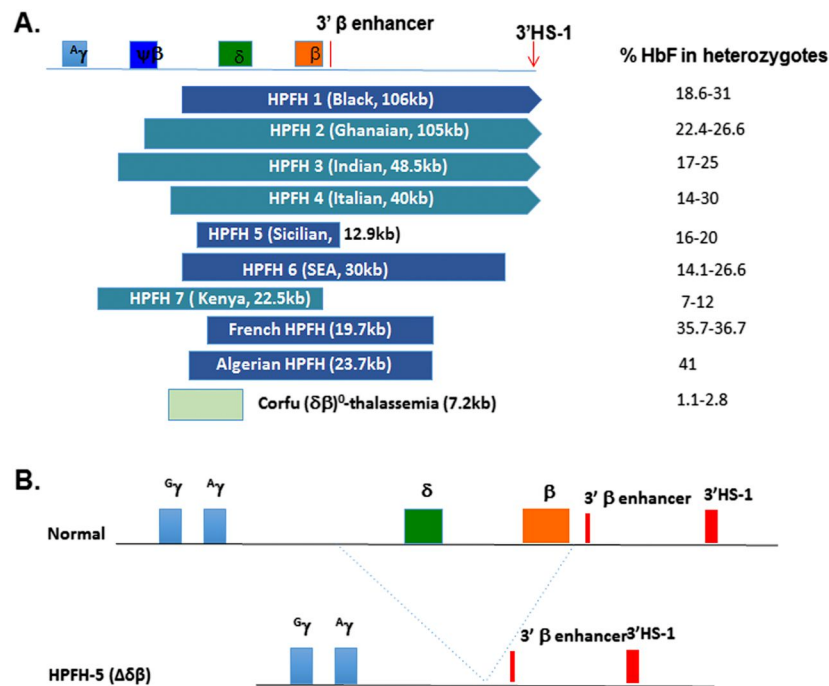


Figure. 26. Suppression type de persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (HPFH). [184]

(A) Représentation schématique de la délétion génomique dans les types de délétion courants de HPFH et leur niveau correspondant d'hémoglobine fœtale (HbF) selon les données publiées. La structure du cluster β -globin. Les gènes correspondants de γ -globine à 3' DNase I hypersensible site (3'HS-1) sont montrés sur le panneau supérieur. Le point de rupture 3' dans HPFH1 à HPFH 4 est au-delà du site 3'HS-1. Le niveau HbF correspondant à chaque suppression d'hétérozygote est indiqué à droite.

(B) Schéma de locus normal β -globin (supérieur) et HPFH-5 sicilien naturel (inférieur). La suppression de 12,9 ko du gène 5' δ -globin à 3' du gène β -globin abolit les sites de liaison BCL11A situés sur la région $\gamma\delta$ -intergenic et rapproche le site 3' β -enhancer et 3' HS-1 du gène γ -globin.

i. Conclusion

Les résultats montrent qu'une thérapie basée sur CRISPR/Cas9 a le potentiel de réguler à la hausse l'HbF et de traiter les maladies de la β -globine. les conditions d'édition ont été optimisé pour obtenir une efficacité et une viabilité élevées de l'édition dans les HSPC primaires humains sans perturbation de séquence hors cible détectable , la durabilité de cette approche in vivo a été à son tour démontré . les résultats à ce jour appuient l'initiation d'études cliniques pour un traitement CRISPR/Cas9 pour les patients atteints de SCD et β -thal. [174]

2. Utilisation des nucléases en doigt de zinc ZFN pour perturber l'expression du gène BCL11A

Édition à l'échelle clinique du génome du BCL11A amplificateur érythroïde humain / model murin /pour le traitement des hémoglobinopathies.

a. BCL11A contrôle l'expression de l'hémoglobine fœtale

L'hémoglobine fœtale (HbF) $\alpha 2\gamma 2$ est le constituant majeur exprimé au cours de la vie fœtale, substituée dans la période périnatale par l'hémoglobine adulte (HbA) $\alpha 2\beta 2$. La substitution est normalement achevée vers 6 mois, l'HbA est alors le constituant majeur, l'HbF ne représentant le plus souvent que moins de 1 % de l'hémoglobine totale. Cette HbF résiduelle continue, cependant, à être synthétisée pendant la vie adulte, et des taux très variables ont pu être observés. Il est maintenant admis que ces variations quantitatives sont liées à des polymorphismes. Ces variations ont fait depuis plusieurs décennies l'objet de nombreux travaux ; la commutation (switch) HBG>HBB est, en effet, un modèle d'étude, et son importance physiopathologique est majeure, car le taux d'HbF est un élément essentiel modulant la gravité des hémoglobinopathies.

b. Le locus β -globine, transmission mendélienne ou non d'expression de l'hbf

Les premières variations identifiées ont été des mutations à transmission mendélienne localisées au locus β -globine et responsables de syndromes de persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (PHHF). On a décrit des mutations dans la région promotrice d'un des gènes HBG (HBG1 ou HBG2) et des délétions plus ou moins étendues du locus, englobant le gène HBB lui-même [191] Les taux d'HbF sont, dans ces cas, élevés (10-40 %), et son expression est pancellulaire. Au cours de la drépanocytose et des β -thalassémies, mutations affectant le gène HBB, l'élévation de l'HbF est pratiquement constante. Si cette élévation s'explique en partie par une érythropoïèse de stress due à l'anémie, l'observation de taux extrêmement variables n'avait pas reçu d'explication satisfaisante. Dans une population normale, enfin, des évaluations précises ont également révélé une hétérogénéité [192]. Ces mesures se font par chromatographie HPLC ou, de façon plus sensible, en évaluant par

immunofluorescence les cellules F [193]. On a alors constaté des taux inférieurs à 0,7 % chez la majorité des individus (~95 %), mais des taux plus élevés pouvant atteindre 4-5 % chez d'autres. La distribution en est alors hétérocellulaire, et ce résultat, initialement décrit par Marti, a longtemps été qualifié de PHHF de type Suisse. Comme dans le cas des hémoglobinopathies, la transmission du taux d'HbF n'est pas mendélienne. L'expression de l'HbF se présente donc comme un trait quantitatif, génétiquement complexe, qui serait lié à l'expression de plusieurs mutations exerçant chacune un effet limité [194].

c. Bcl11a, répresseur de l'expression des gènes γ -globine

Une étape vient d'être franchie en ce qui concerne le rôle du/(des) polymorphisme(s) du gène BCL11A par l'équipe de S.H. Orkin, du Children's Hospital Harvard Medical School à Boston. Dans un premier travail, mené en collaboration avec des cliniciens, les auteurs avaient étudié chez des sujets drépanocytaires homozygotes SS la relation entre le taux d'HbF, la fréquence des crises vaso-occlusives, et l'existence des divers polymorphismes [195]. Ils avaient montré que la coexistence de trois variants de séquence, SNP²⁰ sur les chromosomes 11 (cis), 6 et 2 (trans), semblait nécessaire pour modifier la gravité de la maladie et permettre une évaluation pronostique, alors qu'individuellement aucun de ces éléments n'avait de conséquences significatives.

Des travaux plus récents démontrent que l'expression de l'HbF est sous le contrôle d'un facteur de transcription codé par la séquence BCL11A, et variable lui-même au cours du développement [196]

d. Le mode d'action de bcl11a dans les érythroblastes

Quelle était la nature de l'interaction ? Elle pouvait être indirecte sur le cycle cellulaire ou quelque autre signal, ou être l'interaction directe de BCL11A avec des sites en cis du locus β -globine. Le problème a été abordé par des techniques d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) dans des cultures de cellules primaires. Aucune interaction n'a été trouvée au niveau des promoteurs γ - et β -globine, mais une forte liaison a été identifiée dans d'autres zones du locus. On les trouve entre autres au niveau du site hypersensible HS3 du LCR (locus control

²⁰ Single nucleotide polymorphism (SNP) : polymorphisme d'un seul nucléotide, mutation d'une seule base de l'ADN.

region), ainsi que dans la zone séparant les gènes fœtaux des gènes adultes, en aval du gène HBG2 et en amont du gène HBD (*figure 27*) [197]. Ces deux dernières zones correspondent à des délétions caractérisées au cours d'une PHHF, et il faut noter aussi que tous ces éléments individualisés en cis ont été à quelques occasions supposés intervenir dans l'extinction du gène γ -globine. Les auteurs concluaient à la nécessité d'une caractérisation plus précise de la localisation chromatinienne de BCL11A et de ses partenaires. Les résultats obtenus laissaient supposer que les isoformes courtes, présentes en début de différenciation dans les cellules exprimant en abondance l'HbF, ont un rôle dans la régulation transcriptionnelle du locus β -globine, et interviennent au cours du développement pour reconfigurer la chromatine.

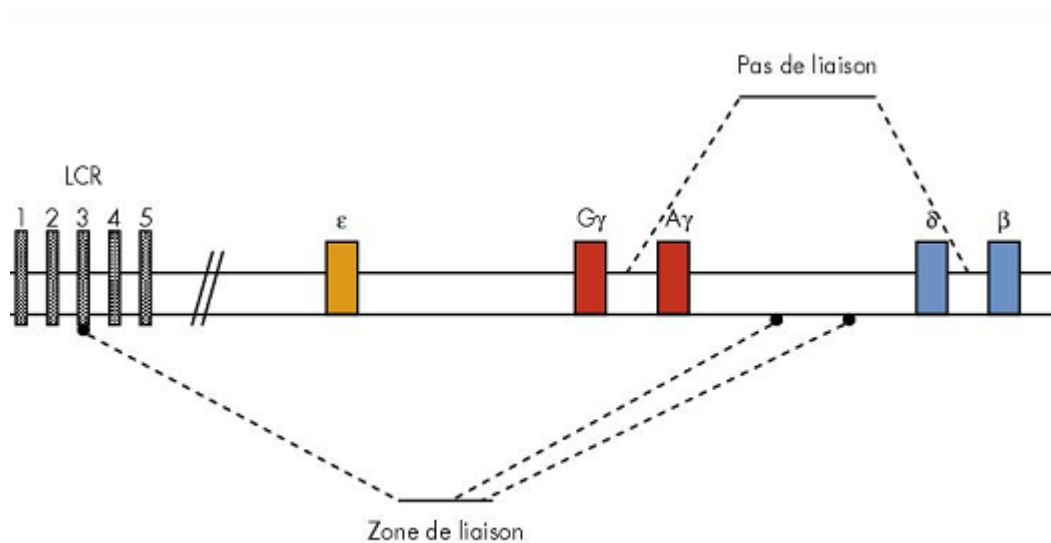


Figure 27 Étude par immunoprécipitation de la fixation de la protéine BCL11A sur différents éléments du locus β -globine [197]

Aucune fixation n'est retrouvée au niveau des promoteurs γ -globine et β -globine. On observe, en revanche, une forte fixation au niveau du site HS3 du LCR, ainsi que dans une zone séparant gènes fœtaux et gènes adultes, en aval du gène $A\gamma$ -globine, et en amont du gène δ -globine. Cette zone a été souvent suspectée d'inclure un(des) élément(s) régulateur(s) du switch

Induction de globine fœtale lors de la modification génétique du BCL11A dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques HSPC CD34+ dérivées de la moelle osseuse.

Les nucléases de doigt de zinc (ZFNs) sont utilisées pour perturber l'expression du gène BCL11A dans les cellules CD34+ dérivées de la moelle osseuse provenant de volontaires sains. Grâce à une combinaison d'études in vitro et in vivo, nous montrons que la perturbation ciblée du motif GATAA dans l'activateur érythroïde spécifique du BCL11A peut à la fois réactiver la globine fœtale γ -globine à des niveaux qui devraient empêcher la polymérisation de l'HbS et produire des HSPC édités capables de greffe à long terme chez des souris immunodéficientes. Ensemble, ces données fournissent une justification convaincante pour poursuivre l'édition du génome du BCL11A, un activateur spécifique de l'érythroïde pour la thérapie cellulaire autologue chez les patients atteints d'un trouble déficitaire de la coagulation.

e. Régulation à la hausse de l'expression de la globine fœtale lors d'une perturbation à médiation ZFN du gène BCL11A.

Des ZFNs²¹ ciblant l'exon 2 (codant les ZFNs) ou le motif GATAA [198,199] au sein d'un amplificateur intronique spécifique de l'érythroïde (amplificateur ZFNs) du gène BCL11A ont été mis au point (*Figure 28A*) [200]. Introduction de l'ARNm ZFN par électroporation dans des cellules BM-CD34+ induisant des cassures d'ADN double brin qui ont été réparées par la voie de réparation de l'ADN NHEJ. Il en est résulté un spectre de petites insertions ou suppressions (indels) centrées sur le site de clivage ciblé, qui a été quantifié par séquençage d'amplicon²² ciblé. Lorsque des cellules primaires BM-CD34+ ont été transfectées avec des quantités croissantes d'ARNm codant les ZFNs, des niveaux accrus d'indels ont été détectés jusqu'à ce qu'un plateau (~60% du total des allèles) soit atteint. Lorsque ces cellules CD34+ transfectées ont été cultivées dans des conditions érythroïdes, elles ont donné naissance à des cellules érythroïdes avec des augmentations correspondantes dans les indels et dans leur expression de globine fœtale, qui a atteint jusqu'à 35 % des chaînes globulaires totales de type β ($G\gamma + A\gamma + \beta + \beta + \delta$) dans les deux groupes, comme mesuré par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (HPLC)

²¹ Zinc Finger Nuclease (ZFN). Les ZFN ont été les premiers outils d'édition de génome à utiliser des endonucléases personnalisables. Les ZFN sont des enzymes chimériques comprenant un domaine de doigt de zinc (ZF), qui se lie à l'ADN, fusionné à un domaine de clivage bactérien de l'endonucléase FokI.

²² amplicon est un fragment d'ADN amplifié par PCR (réaction en chaîne par polymérase).

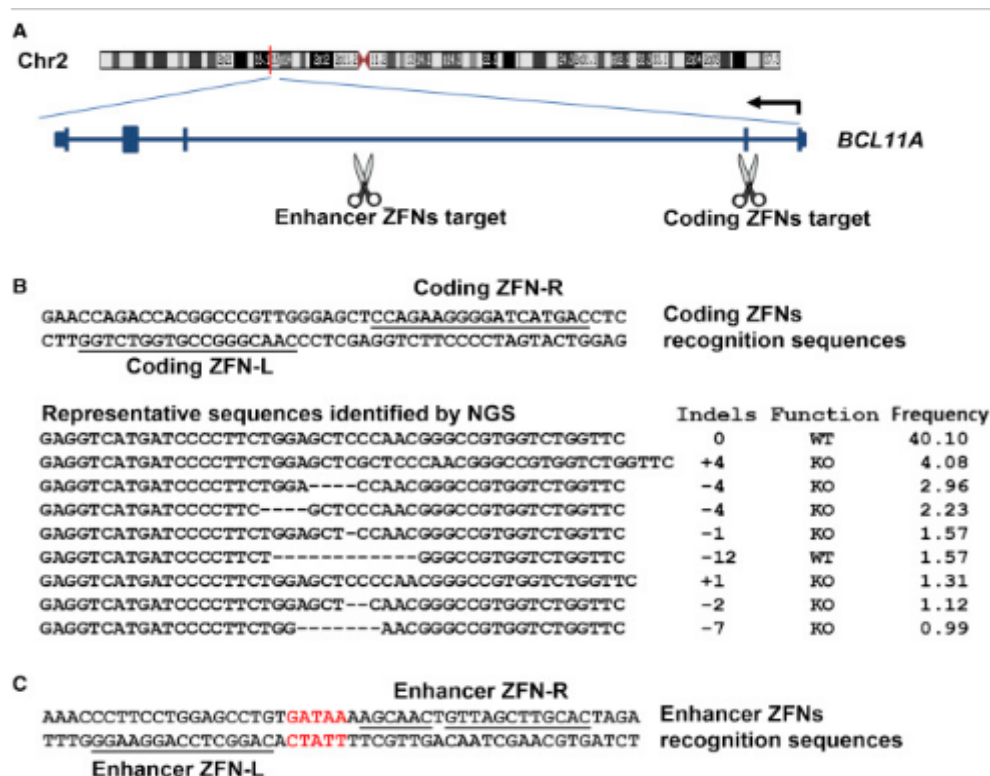


Figure 28. Édition du génome du gène BCL11A par les ZFNs [200]

(A) Représentation schématique de l'emplacement dans le locus BCL11A ciblé par les ZFNs de codage ou les ZFNs d'amélioration. Le codage ZFN-L, le codage ZFN-R et l'amplificateur ZFN-R ont chacun six doigts. Amplificateur ZFN-L a cinq doigts.

(B) Séquences génomiques reconnues par les ZFN codantes et les séquences représentatives identifiées par le séquençage profond de nouvelle génération (NGS) après traitement ZFN. Les mutations Frameshift décalage du cadre de lecture sont classées en tant que knockout (KO), alors que les allèles non édités ou les mutations in-frame sont classées en tant que type sauvage wild-type (WT). La fréquence fait référence au pourcentage de lectures de séquençage identifié comme une séquence spécifique parmi l'ensemble des lectures de séquençage sur ce site.

(C) Séquences génomiques reconnues par l'amplificateur ZFN et séquences représentatives identifiées par NGS après traitement ZFN. Les séquences avec un motif GATAA intact sont notées comme WT, alors que les mutations qui perturbent le motif GATAA sont notées comme KO.

Lorsque l'impact de la perturbation du motif GATAA du BCL11A à médiation ZFN a été évalué, les niveaux d'expression des globines fœtales ont augmenté. En moyenne, 37 % des chaînes globulaires de type β , d'après les données de cinq donneurs individuels, ont été observées dans les cellules érythroïdes KO/KO du motif GATAA par rapport aux cellules WT/WT ou WT/KO du motif GATAA. Cependant, contrairement aux effets négatifs de

l'édition de l'exon 2 du BCL11A sur l'énucléation, les mutations KO/KO du motif GATAA n'ont pas eu d'impact sur l'efficacité de l'énucléation. Les cytoplines ont confirmé les résultats basés sur le flux et ont montré que, tout comme les cellules érythroïdes WT/WT et WT/KO du motif GATAA, les cellules érythroïdes KO/KO day-18 étaient principalement des globules rouges. La majorité des érythroblastes restants présentaient une faible expression de l'intégrine $\alpha 4$ ²³ et de l'antigène du groupe sanguin RhD élevé et ressemblaient à des érythroblastes orthochromatiques, quel que soit leur génotype. Ces données indiquent que la perturbation du motif BCL11A erythroid-enhancer GATAA augmente significativement l'expression de globine fœtale dans les cellules érythroïdes en phase terminale sans interférer avec la différenciation ou la maturation des progéniteurs érythroïdes. (figure29) [200]

BCL11A Exon 2 Modification des déficiences d'édition par greffe de cellules MO-CD34+.

Pour déterminer le potentiel de greffe des HSPC à génome édité, nous avons transplanté des cellules MO-CD34+ traitées au ZFN dans des souris (NSG)²⁴. Les cellules humaines repeuplées (hCD45+) étaient facilement détectables dans le sang périphérique (PB) de tous les animaux transplantés à la semaine 8 après la transplantation. Cependant, une forte baisse de la fréquence d'indel après la transplantation a été observée dans le groupe traité par ZFN codant, mais beaucoup moins dans le groupe traité par l'amplificateur ZFN, malgré le fait que les viabilités des cellules CD34+ étaient comparables après électroporation au moment de la récolte. Ceci est conforme au rôle récemment décrit du BCL11A dans le maintien des fonctions HSC. [201,202,203] Pris ensemble, l'impact négatif de la perturbation de l'exon 2 du gène BCL11A sur l'énucléation érythroïde terminale ainsi que sur la fonction HSC plaide fortement contre la perturbation de la séquence codante du BCL11A en tant que stratégie thérapeutique.

²³ l'intégrine $\alpha 4$ Fait parti d'une grande famille de récepteurs transmembranaires permettant aux cellules d'adhérer à différents substrats et ligands solubles, exposés par la matrice extracellulaire ou exprimés par les cellules de l'organisme.

²⁴ Souris NSG NOD *scid* gamma Les modèles murins humanisés supportant une greffe plus importante de cellules souches hématopoïétiques humaines (cellules hu-CD34+) par rapport à toutes les autres souches.

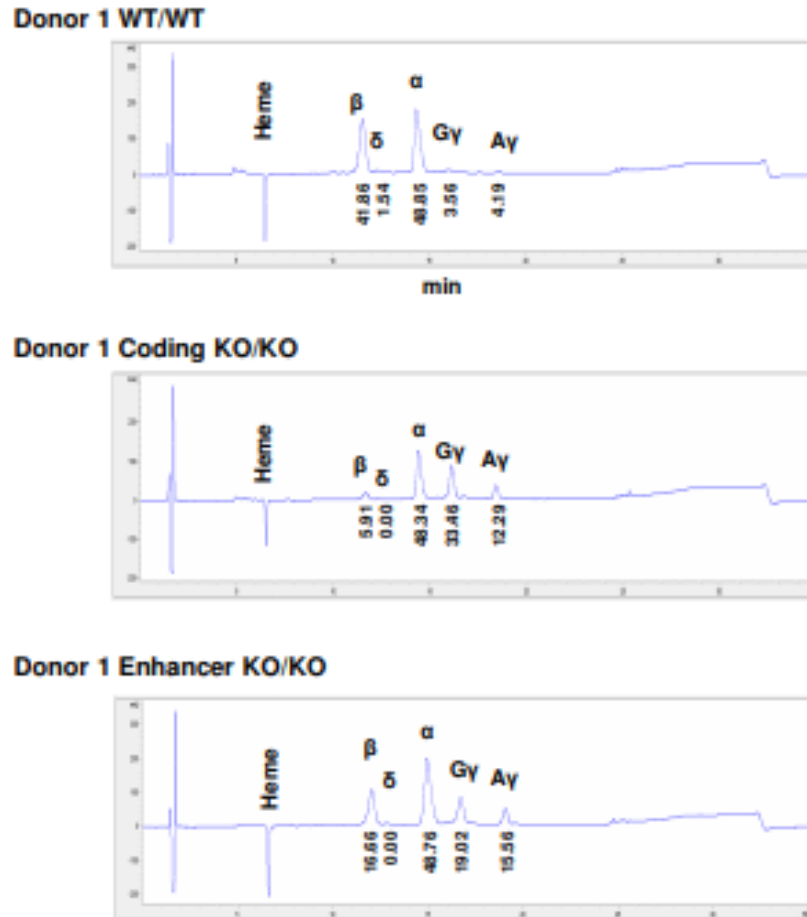


Figure 29. Traces représentatives sur HPLC. Des traces de 3 colonies d'érythroïdes dérivées de donneur 1 Les cellules MO-CD34⁺ sont montrées avec des pics de chaîne globine individuels annotés. [200]

les pics représentent l'aire en pourcentage sous la courbe pour chaque pic. L'augmentation de γ -globine et la réduction de l'expression de β -globine dans le codage ou l'exhausteur KO/KO cellules érythroïdes. par rapport aux cellules érythroïdes WT/WT sont compatibles avec la notion d'inversion du BCL11A à médiation fœtale par le BCL11A. à la globine adulte en passant de l'un à l'autre.

f. Discussion

L'hémoglobine fœtale (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) est reconnue comme l'un des modificateurs de la maladie les plus importants pour le SCD parce qu'elle inhibe non seulement la polymérisation

de l'HbS, mais réduit également la concentration corpusculaire moyenne de l'HbS HbF est l'hémoglobine prédominante à la naissance, mais elle est généralement inférieure à 1 % de l'hémoglobine totale en moins d'un an et est remplacée par l'hémoglobine adulte ($\alpha_2\beta_2$) .

La réactivation pharmacologique de l'HbF présente une stratégie pour traiter le SCD et a fait l'objet d'une attention considérable sur le terrain. Conceptuellement, il est également possible de réactiver en permanence l'expression de la globine fœtale en interférant avec la machine à faire taire la globine fœtale par manipulation génomique des CSH autologues d'un patient. Le locus β -globine lui-même, BCL11A, et la région intergénique HBS1L-MYB²⁵ ont été associés à la persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (HPFH) dans des études d'association à l'échelle du génome (GWAS)²⁶ et fournissent des cibles moléculaires tangibles pour une telle approche. En effet, deux études récentes ont utilisé la révision du génome à médiation CRISPR-Cas9 pour récapituler les mutations connues de la HPFH dans le locus β -globine dans les cellules CD34+ humaines primaires. Bien que l'expression de globine fœtale régulée à la hausse dans la progéniture érythroïde des cellules CD34+, il reste à voir à quelle fréquence les CSH à repeupler à long terme ont été ciblés par ces stratégies d'édition du génome.[200]

Dans cette étude, les chercheurs ont utilisé la technologie d'édition du génome ZFN pour cibler le BCL11A dans les cellules CD34+ primaires humaines dérivées de la BM au lieu de cellules CD34+ mobilisées dérivées de PBen raison des complications potentiellement mortelles lors de la mobilisation de patients SCD avec facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF). Le BCL11A est un suppresseur clé de l'expression de la globine fœtale et l'élimination conditionnelle du BCL11A dans la lignée érythroïde augmente significativement l'expression de la globine fœtale et a guéri un modèle murin de SCD. Ici, deux stratégies de ciblage ont été utilisées.

²⁵ l'intervalle entre le gène HBS1L qui appartient à la famille des « GTP binding protein » et le gène MYB. Le gène MYB qui est un oncogène de la famille des facteurs de transcription myéloblastique/ La protéine MYB semble également activer des gènes réprimant l'expression du gène de la gamma-globine (comme BCL11A)

²⁶ (GWAS) Genome wide association study: analyse des variants génétiques d'une vaste partie de l'ADN dans une population pour rechercher une association entre une mutation et un trait phénotypique (par exemple une hémoglobine fœtale élevée), grâce à l'ADN microarray.

La première stratégie visait l'exon 2 du gène BCL11A. Comme l'exon 2 est partagé par toutes les isoformes BCL11A (*figure 30*) [204], les mutations de décalage de trames dans cette région devraient complètement désactiver l'expression du BCL11A à partir des allèles édités. Bien que Bjurstrom et ses collègues montrent que le BCL11A exon 2-édités mobilisé PB-CD34+ peut greffer avec succès des souris NSG, ils ont trouvé que la greffe par les cellules BM-CD34+ modifiées était sévèrement altérée. Parce qu'il a récemment été rapporté que le BCL11A n'est pas seulement important pour le développement lymphoïde, mais joue également un rôle critique dans le maintien des fonctions vitales du HSC, un défaut dans la greffe des cellules exon 2 KO/KO n'était donc pas inattendu. Contrairement à ce qui est essentiel pour préserver les fonctions HSC, il a été rapporté que le BCL11A est dispensable pour la production de globules rouges sur la base des données obtenues à partir de l'élimination du BCL11A spécifique à l'érythroïde chez la souris et de l'élimination de l'ARNsh²⁷ du BCL11A dans les érythroblastes humains primaires. Bien qu'il est constaté que les progéniteurs érythroïdes BCL11A codant KO/KO étaient capables de se différencier et de mûrir en érythroblastes orthochromatiques²⁸, l'efficacité d'énucléation des cellules érythroïdes KO/KO était significativement inférieure à celle de leurs homologues WT/WT ou WT/KO. La raison de l'énucléation sous-optimale dans le codage des cellules KO/KO n'est pas claire. Cependant, il est peu probable qu'il s'agisse d'un résultat d'édition hors cible parce que l'énucléation altérée n'a été observée que dans les cellules présentant des mutations hors cadre bi-alléliques, et non dans celles présentant des mutations dans l'image bi-alléliques au niveau de l'exon 2 du BCL11A. En tout état de cause, la greffe sous-optimale de cellules CD34+ exon 2-éditées et la réduction de l'énucléation érythroïde suggèrent que l'édition du génome de la région codante du BCL11A n'est pas une stratégie durable pour le SCD. [200]

²⁷ARNsh short hairpin Les petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) sont des ARN adoptant une structure en tige et boucle pouvant être utilisé pour réduire l'expression d'un gène cible via phénomène d'interférence par ARN.

²⁸ fait référence à un colorant qui ne change pas de couleur en se liant à une cible ca indique la conservation de la position du pic spectral

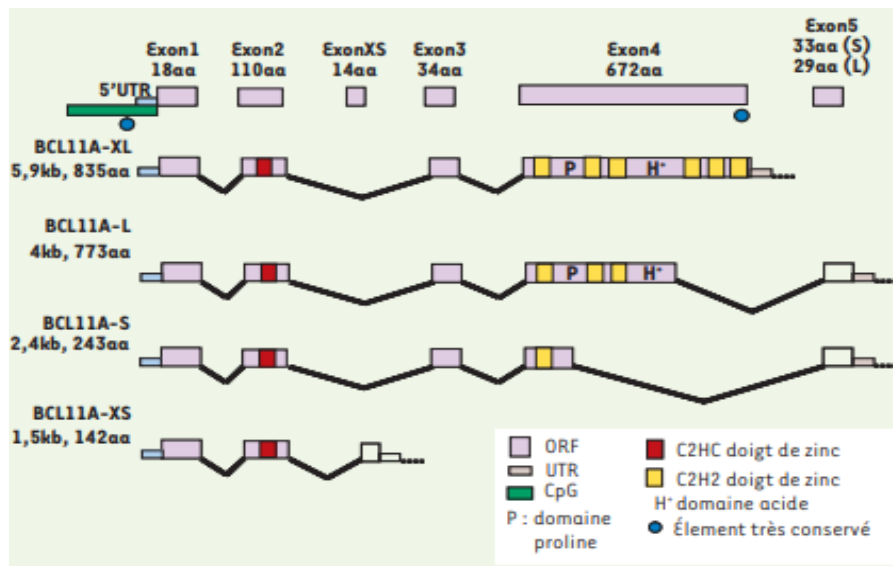


Figure 30. Représentation des quatre isoformes de BCL11A par suite d'un épissage alternatif. [204]

Comme solution de rechange, on a ciblé un amplificateur spécifique de l'érythroïde dans le deuxième intron du gène BCL11A qui contrôle l'expression du BCL11A exclusivement dans cette lignée cellulaire. Plus précisément, les ZFN ont été conçus pour cibler le motif GATAA, un élément réglementaire clé situé dans le site d'hypersensibilité +58 DNaseI de l'amplificateur. Contrairement au montage de l'exon 2 du BCL11A, l'élimination bi-allélique du motif GATAA n'a pas affecté l'efficacité de l'énucléation²⁹ probablement en raison de l'expression résiduelle du BCL11A. Bien que l'induction de l'expression des globines fœtales dans les cellules érythroïdes KO/KO soit moins robuste que dans le codage des cellules érythroïdes KO/KO, les niveaux d'expression des globines fœtales, qui représentent en moyenne 37 % des globines totales de type β avec une réduction réciproque de la globine β -globine adulte, devraient néanmoins être suffisants pour inhiber la polymérisation de l'HbS si elle est maintenue in vivo. Il convient de noter que la quantification de l'expression des protéines de la globine fœtale a été effectuée dans des cellules érythroïdes d'origine clonale. Cela est particulièrement important parce que l'expression de la globine fœtale au niveau des cellules individuelles, et non au niveau de la population, détermine si les érythrocytes peuvent être protégés contre la polymérisation par HbS4.

²⁹ L'énucléation caractérise la phase de maturation terminale de l'érythropoïèse

Enfin, contrairement à l'édition de l'exon 2 du BCL11A, les cellules BM-CD34+ éditées à l'aide d'un enhancer sont parvenues à une greffe robuste et à long terme chez les souris NSG. Le génotypage des colonies BFU-E dérivées des cellules humaines repeuplées dans la BM chimérique a permis de quantifier l'efficacité de l'édition dans les CSH repeuplées à long terme, qui ne pouvaient être analysées que sur des souris NSG ou des systèmes de modèles in vivo similaires. D'après les données allogéniques HSCT, les études sur la souris et la modélisation mathématique, un chimérisme HSC non-S aussi faible que 10 à 20 % peut mener à une amélioration clinique. Si les globules rouges exprimant la globine fœtale ont un avantage de survie similaire à celui des globules rouges normaux, une fréquence de 26% de motifs GATAA KO/KO HSCs et 14% de WT/KO HSCs devrait offrir un soulagement substantiel et à long terme des symptômes chez les patients atteints de SCD. [200]

Dans l'ensemble, les données des études fournissent des preuves in vitro et in vivo que le motif GATAA dans l'amplificateur spécifique de l'érythroïde du gène BCL11A est une cible efficace et sûre par rapport à la région codante du BCL11A pour la perturbation génique pour le traitement du SCD. L'édition à médiation ZFN de ce motif GATAA se produit efficacement dans les HSCs de repeuplement fonctionnel à long terme et n'interfère pas avec la maturation érythroïde terminale. De plus, la perturbation motivée par le GATAA produit des cellules érythroïdes qui expriment la globine fœtale à des niveaux qui devraient être efficaces pour inhiber la polymérisation de l'HbS. Par conséquent, nos résultats fournissent une preuve de concept préclinique solide qui soutient le développement clinique de l'édition du génome pour perturber l'activateur spécifique de l'érythroïde BCL11A dans les CSH autologues en tant que traitement potentiellement curatif pour les patients atteints de SCD

Pour développer une thérapie cellulaire efficace et durable contre la drépanocytose, les chercheurs ont été orientés vers l'étude de la faisabilité d'une perturbation ciblée du gène BCL11A, soit au niveau de l'exon 2, soit au niveau du motif GATAA dans l'amplificateur intronique spécifique de l'érythroïde, en utilisant des nucléases de doigt de zinc dans la moelle osseuse humaine (BM) CD34+ et des cellules souches hématopoïétiques et progénitrices (HSPC). Les deux stratégies de ciblage visent à réguler l'expression des globines fœtales dans les cellules érythroïdes à des niveaux qui devraient inhiber la polymérisation de l'hémoglobine

S. Cependant, l'inactivation complète du BCL11A résultant de mutations bi-alléliques du BCL11A exon 2 a affecté négativement l'érythroïde énucléation. En revanche, la perturbation bi-allélique du motif GATAA dans le rehausseur érythroïde du BCL11A n'a pas eu d'impact négatif sur l'énucléation. De plus, les cellules BM-CD34⁺ du BCL11A exon 2-edited BM-CD34⁺ ont démontré un potentiel de greffe significativement réduit chez les souris immunodéficientes. Un tel effet négatif sur la fonction HSPC n'a pas été observé sur le BCL11A erythroid-enhancer GATAA motif d'édition, parce que les cellules CD34⁺ éditées avec enhancer ont obtenu une solide greffe à long terme et ont donné naissance à des cellules érythroïdes avec des niveaux élevés d'expression de globine fœtale lorsque la BM chimérique a été cultivée ex vivo. Dans l'ensemble, les résultats des recherches soutiennent la poursuite du développement clinique de l'édition de l'amplificateur érythroïde spécifique du BCL11A dans les BM-CD34⁺ HSPC en tant que thérapie autologue par cellules souches chez les patients atteints SCD. [200]

g. Conclusion

Décrite il y a plus de 100 ans, la drépanocytose a été la première « maladie moléculaire » dont la cause a été identifiée. Depuis lors, la thérapeutique, bien que partiellement efficace, n'a souvent été qu'empirique. Les travaux de l'équipe de S.H. Orkin apportent la preuve de principe que BCL11A est une cible thérapeutique chez les patients drépanocytaires, et il est logique d'anticiper qu'il en sera de même pour les -thalassémies. Il est cependant évident qu'un nombre considérable de problèmes restent à résoudre. Différents abords peuvent être envisagés pour la déplétion de BCL11A : des méthodes biologiques, telles que l'usage d'un ARN d'interférence (siARN) ou le transfert d'un ARN en épingle à cheveux (shARN) [205] ; un criblage pharmacologique de petites molécules ou de peptides [206]. Le contrôle sur modèle animal de toute manipulation d'un composant majeur dans la régulation des gènes de globine est évidemment un préalable absolu avant toute application en pathologie humaine

h. Perspectives

C'est dans cette même perspective d'action sur la modulation par l'HbF que se situent des travaux récents. Les facteurs contrôlant la commutation (switch) HbF→HbA au cours du développement ontogénique ont été un sujet de recherche depuis plusieurs décennies, se

fondant souvent sur l'exploration de mutants naturels ; mais les explications valables pour un cas particulier ne le sont en général pas pour d'autres cas. Depuis quelques années plusieurs équipes ont cherché à mettre en évidence une trans-régulation de l'HbF. Des explorations de l'ensemble du génome (GWAS) ont été menées par plusieurs équipes, parmi lesquelles il faut citer en priorité celle de Stuart H. Orkin à Harvard, mais aussi celle de Swee Ley Thein à l'Imperial College de Londres. Elles ont progressivement cerné plusieurs sites dont un polymorphisme (SNP) était en association avec un taux élevé d'HbF. Dans une première approche, trois de ces sites ont été retenus : dans le locus β -globine lui-même, à proximité d'un SNP C/T en -158 du gène HBG1 connu depuis 30 ans (rs 7482144) ; un ou des SNP du gène BCL11A sur le bras court du chromosome 2 ; une région du chromosome 6 dans l'intervalle HB1SL→MYB [207]. Ces données ont été plus récemment affinées. On avait montré l'existence d'isoformes de BCL11A dont l'expression adulte était répressive de l'expression de γ -globine ; l'étude d'une grande famille maltaise a montré sur le chromosome 19p12 deux SNP du gène KLF1 susceptibles de contrôler l'expression de BCL11A [208] ; ces données ont été retrouvées chez la souris [209]. L'exploration sur de grandes séries de la région intergénique HB1SL-MYB a également montré des SNP et validé l'hypothèse du rôle de MYB, codant un régulateur transcriptionnel de l'érythropoïèse, comme associé à la persistance d'HbF [210]. Les mêmes auteurs, dans une exploration systématique du locus β -globine, ont identifié un site Hématologie, vol. 16, n° 6, novembre-décembre 2010 457 polymorphe en aval de HBG1 (rs10128556) dont l'association au taux élevé d'HbF est supérieur de deux magnitudes à celui de rs7482144, éliminant ce dernier comme facteur causal d'une HbF élevée [210]. L'ensemble de ces variants expliquerait environ 50 % d'un héritage quantitatif (hidden heritability) qui pose question depuis des décennies. Le problème n'est encore que partiellement résolu. Les résultats ouvrent cependant une perspective, celle de molécule(s) agissant sur un de ces facteurs trans-régulateurs [211, 212] ,ou l'utilisation d'ARNi d'interférence [213]. La drépanocytose est centenaire, elle est présente dans le monde entier, surtout en Afrique, et la thérapeutique, souvent empirique, en est encore en état de recherche, mais cette recherche progresse, d'autres données sont sans doute à attendre bientôt. Le problème de la thérapeutique sera peut-être résolu quand on aura compris celui du switch et la régulation de l'hémoglobine fœtale [214]



Résumés

Résumé

Titre : la thérapie génique et ses applications

Auteur : ABIDAR Manal

Mots clés : hémoglobine-gène-thérapie génique

Les progrès technologiques dans le domaine de la manipulation du génome sont époustouflants en termes de vitesse à laquelle ils ont été rapportés au cours des dernières années. Le potentiel des approches d'édition du génome pour le bénéfice clinique dans les troubles β -globine est immense.

Dans ce sens La bioPharma bluebird bio (Cambridge, Massachusetts), a développé un vecteur lentiviral le lentiglobin BB305 comportant la version fonctionnelle du gène HBB (β A T87Q) pour remplacer le gène muté de la β -globine par transduction de cellules souches hématopoïétiques HSPCs par le billet de la technique révolutionnaire CRISPR/CAS9 stratégie parmi d'autres pour traiter les β hémoglobinopathies dans le cadre de l'essai français HGB205 parallèlement à l'essai américain HGB206. Cette stratégie en thérapie génique s'avère suffisamment efficace pour que, plus de trois ans après le début du traitement, le patient n'ait plus besoin de transfusions sanguines pour mener une existence normale alors qu'il était jusqu'alors transfusé tous les mois pour permettre sa survie

L'espoir est aussi de mettre en évidence de nouvelles cibles sur lesquelles on pourrait agir pour améliorer la prise en charge des patients. Plusieurs locus associés à l'hémoglobine fœtale ont ainsi été identifiés. L'un d'eux est le facteur de transcription BCL11A. Celui-ci joue un rôle majeur dans l'arrêt de la production d'hémoglobine fœtale peu après la naissance. Son inhibition chez les drépanocytaires permettrait de rétablir la production de cette hémoglobine, au dépend de l'hémoglobine S.

Abstract

Title: Gene therapy application

Author: Manal ABIDAR

Keywords : gene- hemoglobinopathy-gene therapy

Technological advances in genome manipulation are breathtaking in terms of the speed at which they have been reported in recent years. The potential of genome editing approaches for clinical benefit in β -globin disorders is immense.

In this sense BioPharma bluebird bio (Cambridge, Massachusetts), has developed a lentiviral vector lentiglobin BB305 containing the functional version of the HBB gene (β^A T87Q) to replace the mutated gene of β -globin by transduction of HSPCs hematopoietic stem cells by the revolutionary CRISPR/CAS9 strategy among others to treat hemoglobinopathy β in the context of the French HGB205 trial in parallel to the American HGB206 trial. This gene therapy strategy is proving sufficiently effective that, more than three years after the start of treatment, the patient no longer needs blood transfusions to lead a normal life, whereas he was previously transfused every month to allow his survival.

The hope is also to identify new targets on which action could be taken to improve patient management. Several locus associated with fetal hemoglobin have been identified. One of them is the BCL11A transcription factor. It plays a major role in stopping fetal hemoglobin production shortly after birth. Its inhibition in sickle-cell anaemia would restore the production of this hemoglobin, at the expense of hemoglobin S.

ملخص

العنوان: العلاج الجيني وتطبيقاته

من طرف : منال ابيدار

الكلمات الأساسية: الهيمغلوبين- جين- العلاج الجيني

التقدم ا لتكنولوجي في مجال العلاج الجيني مدهش من حيث السرعة التي تم الإبلاغ عنها في السنوات الأخيرة . إن إمكانيات مناهج التعديل الجيني من اجل الفائدة السريرية في اضطرابات الغلوبين هائلة و في هذا الصدد قامت بيوفارما الحيوية بلوبيرد(كامبردج م.ا) بتطوير ناقلات من نوع لونتيغلوبين ب.ب305 تضم نسخة وضيفية من جين الغلوبين لاستبدال تاجين الطافر عن طريق نقل الخلايا الجذعية المكونة للدم عبر التقنية الثورية (كريسبر/كاز9) استراتيجية من بين اخرى لعلاج اعتلال الهيمغلوبين كجزء من الاختبار الفرنسي205 بالموازات مع الاختبار الأمريكي 206 أثبتت استراتيجية العلاج الجيني هذه فعالية كافية اد أن المريض لم يعد يحتاج نقل الدم حتى بعد مرور أكثر من ثلاث سنوات من بدء العلاج ليعيش بعد ذلك حياة طبيعية . البحوث تميل ايضا نحو تسليط الضوء على أهداف جديدة يمكن ان يعمل من خلالها الباحثون على تحسين الأعراض السريرية للمريض وبالتالي تم تحديد مواقع عديدة مرتبطة بالهيمغلوبين الجنيني من بينهم عامل النسخ (ب.ب س.ل11) (ا) هذا الأخير يلعب دورا رئيسيا في وقف إنتاج الهيمغلوبين الجنيني مباشرة بعد الولادة الشيء الذي من شأنه ان يعيد إنتاج الهيمغلوبين على حساب الهيمغلوبين المعتل.



Références

- [1] Naldini L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet* 2011 ; 12 : 301-15
- [2] Blaese MR, Culver KW, Miller D, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID. Initial trial results after 4 years. *Science* 1995 ; 270 : 475-80.
- [3] Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nature Medicine* 1995 ; 1 : 1017-23.
- [4] Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 1995 ; 270 : 470-5.
- [5] Bunting KD, Sangster MY, Ihle JN, Sorrentino BP. Restoration of lymphocyte function in janus kinase 3-deficient mice by retroviral-mediated gene transfer. *Nature Medicine* 1998 ; 4 : 58-64.
- [6] May A. Base editing on the rise. *Nat Biotechnol* 2017 ; 35 : 428-9./ Thérapie génique : beaucoup plus de questions que de réponses *médecine/sciences* 2017 ; 33 : 461-2 TIRÉS À PART M. Cavazzana
- [7] Raymond.A, RAPPORT au nom du groupe de travail bi-académique (Académie nationale de médecine – Académie nationale de pharmacie) La thérapie génique : bilan et perspectives /Gene therapy : present evaluation and prospects Site de Genopole - <http://www.genopole.fr/Histoire-de-la-genetique.html#.WGF6VfnhC00> [consulté le 12 avril 2017]
- [8] Site de Médecine et Santé - <http://medecine.savoir.fr/heredite-et-chromosomes/> [consulté le 13 avril 2017]

- [9] Site gouvernemental
http://www.ogm.gouv.qc.ca/information_generale/info_ogm/info_elements_bio.html [consulté le 14 mai 2017]
- [10] Document Téléthon – disponible sur
http://education.telethon.fr/IMG/pdf/fiche_therapie_genique.pdf [consulté le 20 novembre 2017]
- [11] Site de Genopole - <http://www.genopole.fr/Quand-le-gene-devient-medicament.html?lang=fr> [consulté le 3 juillet 2017]
- [12] Site de l'INSERM - <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/therapie-genique> [consulté le 2 février 2017]
- [13] “KOL Views: CAR-T cell therapies poised to make commercial debuts but one company is best positioned for initial success, according to leading medical oncologist”, FirstWord Pharma, December 19th, 2016 – disponible sur <http://www.firstwordpharma.com>
- [14] Site du Syndicat National des Ophtalmologistes de France - <http://www.snof.org/encyclopedie/amaurose-congenitale-de-leber-therapie-genique> [consulté le 26 novembre 2017]
- [15] Site de BioPharma Dive - <http://www.biopharmadive.com/news/spark-therapeutics-on-track-to-file-gene-therapy-in-2017/424299/> [consulté le 20 décembre 2017]
- [16] Learn About Clinical Studies/US.National library of medicine/Clinical trials.gov/Consulte le 28-03-2018
- [17] Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann RL, Kanz L. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. N Engl J Med 1995 ; 333 : 283-7.

- [18] Gianni AM, Sienna S, Bregni M, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haematopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet* 1989 ; II : 580-4.
- [19] Höglund M, Smedmyr B, Simonsson B, Tötterman T, Bengtsson M. Dose-dependent mobilisation of haematopoietic progenitor cells in healthy volunteers receiving glycosylated rHuG-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1996 ; 18 : 19-27.
- [20] Harousseau JL. Autogreffe de progéniteurs hématopoïétiques collectés dans le sang circulant : le problème de la contamination. *Hématologie* 1997 ; 3 : 379-83.
- [21] Li J, Sensebe L, Hervé P, Charbord P. Nontransformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrows. III. The maintenance of hematopoiesis from CD34+ cell populations. *Exp Hematol* 1997 ; 25 : 582-91.
- [22] Sandhaus LM, Edinger MG, Tubbs RR, et al. A simplified method of CD34+ cell determination for peripheral blood progenitor cell transplantation and correlation with clinical engraftment. *Exp Hematol* 1998 ; 26 : 73-8.
- [23] Hogan CJ, Shpall EJ, McNulty O, McNiece I, Dick JE, Shultz LD, Keller G. Engraftment and development of human CD34+-enriched cells from umbilical cord blood in NOD/LtSz-scid/scid mice. *Blood* 1997 ; 90 : 85-96.
- [24] Terstappen LWMM, Huang S, Safford M, Landsdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single non lineage committed CD34+ CD38 progenitor cells. *Blood* 1991 ; 77 : 1218-27.
- [25] Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993 ; 177 : 1331-2.
- [26] Verfaillie C, Blakolmer K, McGlave P. Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med* 1990 ; 172 : 509-20.

- [27] Lehn P. Vecteurs rétroviraux pour le transfert de gènes dans le tissu hématopoïétique in vivo. *Medecine/Science* 1990 ; 6 : 797-9.
- [28] Bregni M, Shammah S, Malaffo F, et al. Adenovirus vectors for gene transduction into mobilized blood CD34+ cells. *Gene Ther* 1998 ; 5 : 465-72.
- [29] Miyake K, Suzuki N, Matsuoka H, Tohyama T, Shimada T. Stable integration of human immunodeficiency virus-based retroviral vectors into the chromosomes of nondividing cells. *Hum Gene Ther* 1998 ; 9 : 467-75.
- [30] Richardson JH, Hofmann W, Sodroski JG, Marasco WA. Intrabody-mediated knockout of the high-affinity IL2 receptor in primary human T cells using a bicistronic lentivirus vector. *Gene Ther* 1998 ; 5 : 635-44.
- [31] Hussein AM. The potential applications of gene transfer in the treatment of patients with cancer : a concise review. *Cancer Invest* 1996 ; 14 : 343-52.
- [32] Perspectives de thérapie génique en hematologie / volume 57, numero, 1, janvier-fevrier 1999 / *Revue annale de biologie clinique*
- [33] Fineran PC, Charpentier E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. *Virology* 2012 ;
- [34] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012 ; 337 : 816–821.
- [35] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013
- [36] Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 2013
- [37] Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* 2013

- [38] Jacques P. Tremblay* Med Sci (Paris) Volume 31, Number 11, Novembre 2015 ; 31 : 1014–1022
- [39] R. Barrangou. Cas9 targeting and the CRIPSR révolution. Science 2014 ; 344 : 707–708.
- [40] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 2011 ; 471: 602–607
- [41] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature 2014 ; 507 : 62–67
- [42] Le Cong, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex génome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 2013 ; 339 : 819–823.
- [43] Dion S, Demattei MV, Renault S. Les domaines à doigts de zinc. Med Sci (Paris) 2007 ;
- [44] Dupret B, Angrand PO. L'ingénierie des génomes par les TALEN. Med Sci (Paris) 2014 ; 47. Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. Med Sci (Paris) 2014 ; 30 :
- [45] Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. Med Sci (Paris) 2014 ; 30 : 1066–1069.
- [46] Gaudin R. Améliorons notre expérience de la molécule unique grâce à CRISPR. Med Sci (Paris) 2015 ;
- [47] Jordan B. CRISPR-Cas9, une nouvelle donne pour la thérapie génique. Med Sci (Paris) 2015
- [48] Site de Sciences et Avenir - http://www.sciencesetavenir.fr/sante/crispr-cas9-la-revolution-de-la-chirurgie-du-gene_30130 [consulté le 22 décembre 2017]

- [49] Hélène Gilgenkrantz* The revolution of the CRISPR is underway/ Volume 30 / No 12 (Décembre 2014) ▶ Med Sci (Paris), 30 12 (2014) 1066-1069 tableau1
- [50] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013 ; 31 : 822–826.
- [51] Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, Bao G. CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res* 2013 ; 41 : 9584–9592.
- [52] Zheng Q, Cai X, Tan MH, et al. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *Biotechniques* 2014 ; 57 : 115–124
- [53] He Z, Proudfoot C, Mileham AJ, et al. Highly efficient targeted chromosome deletions using CRISPR/Cas9. *Biotechnol Bioeng* 2015 ; 112 : 1060–1064.
- [54] Williams, T. N. & Weatherall, D. J. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a011692 (2012).
- [55] Labie, D. & Elion, J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie* 2, 220–239 (2005)
- [56] url :[www.inrp.fr/Acces/biotic/gpe/dossiers / drepanocytose](http://www.inrp.fr/Acces/biotic/gpe/dossiers/drepanocytose) / consulted [5/10/2017]
- [57] Wajcman H, Lantz B, Girot R; 1992. Les maladies du globule rouge. ISERM/ Médecine-Science Flammarion, Paris.
- [58] Gale RE, Clegg JB, Huehns ER; 1979; Human embryonic haemo-globins Gower 1 and 2. *Nature* 280 :162–4.

- [59] Stamatoyannopoulos G; 2000, Molecular and cellular basis of hemoglobin switching. In: Steinberg ML, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. Disorders of hemoglobins, genetics, pathophysiology, and clinical management. New York: Cambridge University Press; p. 131–45.
- [60] (Speicher et al., 2010). Figure 11 : l'expression des différentes hémoglobines au cours du développement
- [61] Génétique des maladies de l'hémoglobine (PDF Download Available). Available from: https://www.researchgate.net/publication/301720418_Genetique_des_maladies_de_l_hemoglobine [accessed Apr 09 2018].
- [62] Higgs, D. R. & Wood, W. G. Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 15, 176–183 (2008).
- [63] Li, Q., Peterson, K. R., Fang, X. & Stamatoyannopoulos, G. Locus control regions. *Blood* 100, 3077–3086 (2002).
- [64] Xu, J. et al. Transcriptional silencing of {gamma}-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev.* 24, 783–798 (2010).
- [65] Molchanova, T. P., Pobedinskaya, D. D. & Huisman, T. H. The differences in quantities of alpha 2- and alpha 1-globin gene variants in heterozygotes. *Br. J. Haematol.* 88, 300–306 (1994).
- [66] Kihm, A. J. et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin. *Nature* 417, 758–763 (2002)
- [67] Whipple GH, Bradford WL; 1933, Mediterranean disease-thalassemia (erythroblastic anemia of Cooley); associated pigment abnormalities simulating hemochromatosis. *JPediatr*, 9:279–311.

- [68] Weatherall DJ. 2001; Phenotype-genotype relationships in mono-genic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet.* 2:245–55.
- [69] Labie D, Elion J; 2005; Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC-Hématologie* 2, 220–239.
- [70] Robet Giro, Pierre Bégué, Frédéric Galacteros. 2003, La drépanocytose. Edition; John Libbey, Eurotext, Paris, p:1.
- [71] Frenette, P. S. and G. F. Atweh (2007). "Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise." *J Clin Invest* 117(4): 850-8.
- [72] Piel FB, Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010- 2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *PLoS Med* 2013;10(7):e1001484
- [73] (OMS, 2006).
- [74] Bunn HF. 1997; Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 337:762–9.
- [75] POWARS DR, CHAN LS, HITI A, RAMICONE E, JOHNSON C. Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. *Medicine* 2005;84:363-76.
- [76] DARBARI DS, KPLE-FAGET P, KWAGYAN J, RANA S, GORDEUK VR, CASTRO O. Circumstances of death in adult sickle cell disease patients. *Am J Hematol* 2006;81:858-63.
- [77] JACOB E, BEYER JE, MIASKOWSKI C, SAVEDRA M, TREADWELL M, STYLES L. Are there phases to the vaso-occlusive painful episode in sickle cell disease? *J Pain Symptom Manage* 2005;29:392-400.

- [78] PERRONNE V, ROBERTS-HAREWOOD M, BACHIR D, ROUDOTTHORAVALE, DELORD JM, THURET I, ET AL. Patterns of mortality in sickle cell disease in adults in France and England. *Haematol J* 2002;3:56–60.
- [79] VICHINSKY EP, NEUMAYR LD, EARLES AN, WILLIAMS R, LENNETTE ET, DEAN D, ET AL. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:1855-
- [80] B. MAÎTREA, A. MEKONTSO-DESSAPB, A. HABIBIC, D. BACHIR, F. PARENTD, B. GODEAUE, F. GALACTEROSC Complications pulmonaires des syndromes drépanocytaires majeurs chez l'adulte *Revue des Maladies Respiratoires* (2011) 28, 129—137.
- [81] GBADOE AD, DOGBA A, SEGBENA AY, NYADANU M, ATAKOUMA Y, KUSIAKU K, ET AL. Priapism in sickle cell anemia in Togo: prevalence and knowledge of this complication. *Hemoglobin* 2001;25:355-61.
- [82] FOWLER JJ, KOSHY M, STRUB M, CHIN SK. Priapism associated with the sickle cell hemoglobinopathies: prevalence, natural history and sequelae. *J Urol* 1991;145:65-8.
- [83] OVERTURF GD. Infections and immunizations of children with sickle cell disease. *Adv Pediatr Infect Dis* 1999;14:191-218.
- [84] SLOMA I, ZILBER MT, CHARRON D, GIROT R, TAMOUZA R, GELIN C. Upregulation and atypical expression of the CD1 molecules on monocytes in sickle cell disease. *Hum Immunol* 2004;65:1370-6.
- [85] LIONNET F, ARLET JB, HABIBI A, BARTOLUCI P, RIBEIL JA, STANKOVIC K. Recommandations pratiques de prise en charge de la drépanocytose adulte. *Rev Med Interne* 2009;30:S161–224.

- [86] KODURI PR. Acute splenic sequestration crisis in adults with sickle cell anemia. *Am JHematol* 2007;82:174-5.
- [87] HERNIGOU P, POIGNARDA, NOGIERA. Hip prosthesis in sickle cell anemia: a delicate affair. *Rev Prat* 2004;54:1570.
- [88] GUASCH A, NAVARRETE J, NASS K, ZAYAS CF. Glomerular involvement in adults with sickle cell hemoglobinopathies: Prevalence and clinical correlates of progressive renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;17: 2228-35.
- [89] ATAGA KI, ORRINGER EP. Renal abnormalities in sickle cell disease. *Am J Hematol* 2000;63:205-11.
- [90] GLADWIN MT, SACHDEV V, JISON ML, SHIZUKUDA Y, PLEHN JF, MINTER K, ET AL. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med* 2004;350:886-95.
- [91] ATAGA KI, MOORE CG, JONES S, OLAJIDE O, STRAYHORN D, HINDERLITER A, ET AL. Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: a longitudinal study. *Br J Haematol* 2006;134:109-15.
- [92] BOYD JH, MACKLIN EA, STRUNK RC, DEBAUN MR. Asthma is associated with acute chest syndrome and pain in children with sickle cell anemia. *Blood* 2006;108:2923-7.
- [93] DOWNESSM, HAMBLETON IR, CHUANG EL, LOIS N, SERJEANTGR, BIRDAC. Incidence and natural history of proliferative sickle cell retinopathy: observations from a cohort study. *Ophthalmology* 2005;112:1869-75.
- [94] Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet* 2017. Jan 31. pii: S0140–6736(17)30193–9. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30193-9.
- [95] Ngo S, Bartolucci P, Lobo D, et al. Causes of death in sickle cell disease adult patients: old and new trends. *ASH 56th annual meeting. Blood* 2014 ; 124 : 2715.

- [96] Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F, et al. Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2017 ; 129 : 1548–1556.
- [97] Angelucci E, Matthes-Martin S, Baronciani D, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. *Haematologica* 2014 ; 99 : 811–820.
- [98] Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* 2010 ; 467 : 318–322.
- [99] Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A. Dix ans de thérapie génique : réflexions. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 115–118.
- [100] url : <https://presse.inserm.fr/en/sickle-cell-disease-remission-of-disease-symptoms-in-the-world-s-first-patient-treated-using-gene-therapy/27624/> 01 MAR 2017 consulted [5/10/2017]
- [101] REPERTOIRE PUBLIC DES ESSAIS CLINIQUES AUTORISÉS - INFORMATIONS SUR L'ESSAI (EN FRANÇAIS) (telles que reportées par le promoteur de l'essai) Thierry Rousselot /AFSSAPS Doc. réf : Repec 14.05.09
- [102] Cavazzana M, Leboulch P, and Payen E. Human Gene Therapy Vol. 27, No. 2 .Feb 2016. ahead of print <http://doi.org/10.1089/hum.2016.007>
- [103] Responsible Party: bluebird bio/ ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02151526 History of Changes/ Other Study ID Numbers: HGB-205 -2012-000695-42 (EudraCT Number)/ First Posted: May 30, 2014/ Last Update Posted: December 18, 2017/ Last Verified December 2017

- [104] Bluebird bio, Inc. Elizabeth Pingpank, 617-914-8736 bluebird bio Presents New Data from HGB-205 Study of LentiGlobin™ Drug Product in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia (TDT) and Severe Sickle Cell Disease (SCD) at European Hematology Association (EHA) Annual Meeting
- [105] Andrea Gambotto, ... Paul D. Robbins, Genetic engineering of dendritic cells in Dendritic Cells (Second Edition), 2001 chapitre 43
- [106] Ribeil J, LeboulchP, CavazzanaM Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease SUPPLEMENTARY APPENDIX March 2, 2017 N Engl J Med 2017; 376:848-855
- [107] PawliukR, WestermanKA, FabryME, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy
- [108] BankA, DorazioR, LeboulchP. A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia. Ann N Y Acad Sci
- [109] ImrenS, PayenE, WestermanKA, et al. Permanent and panerythroid correction of murine beta thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A
- [110] CesanaD, RanzaniM, VolpinM, et al. Uncovering and dissecting the genotoxicity of self-inactivating lentiviral vectors in vivo. Mol Ther 2014;22:774–785
- [111] ZychlinskiD, SchambachA, ModlichU, et al. Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. Mol Ther 2008;16:718–725
- [112] LevittN, BriggsD, GilA, et al. Definition of an efficient synthetic poly(A) site. Genes Dev 1989;3:1019–1025
- [113] HargrovePW, KepesS, HanawaH, et al. Globin lentiviral vector insertions can perturb the expression of endogenous genes in beta-thalassemic hematopoietic cells. Mol Ther 2008;16:525–533

- [114] NegreO, BartholomaeC, BeuzardY et al. Preclinical evaluation of efficacy and safety of an improved lentiviral vector for the treatment of beta-thalassemia and sickle cell disease. *Curr Gene Ther* 2015;15:64–81
- [115] LeboulchP, BhukhaiK Original Article Ex Vivo Selection of Transduced Hematopoietic Stem Cells for Gene Therapy of β -Hemoglobinopathies Volume 26, Issue 2, 7 February 2018, Pages 480-495 *molecular therapy*
- [116] BourgetP, FalaschiL, SuarezF et al. [A medical-pharmaceutical partnership model as a contributor to the success in conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: A cross-reflection on our organizations]. *Bull Cancer* 2012;99:643–653
- [117] YannakiE, KarponiG, ZervouF et al. Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy: Superior mobilization by the combination of granulocyte-colony stimulating factor plus plerixafor in patients with beta-thalassemia major. *Hum Gene Ther* 2013;24:852–860
- [118] KarponiG, PsathaN, LedererCW et al. Plerixafor+G-CSF-mobilized CD34+ represent an optimal graft source for thalassemia gene therapy. *Blood* 2015;126:616–619.
- [119] CavazzanaM, RibeilJA, PayenE et al. Study Hgb-205: Outcomes of gene therapy for hemoglobinopathies via transplantation of autologous hematopoietic stem cells transduced ex vivo with a lentiviral β A-T87Q-globin vector (LentiGlobin BB305 drug product) [abstract]. *Blood* 2014;124:4797.
- [120] CavazzanaM, RibeilJA, PayenE, et al. Outcomes of gene therapy for severe sickle disease and beta-thalassemia major via transplantation of autologous hematopoietic stem cells transduced ex vivo with a lentiviral beta AT87Q-globin vector. *Blood* 2015;126: Abstract 202

- [121] KanterJ, WaltersM, HsiehM, et al. Initial results from study HGB-206: A phase 1 study evaluating gene therapy transplantation of autologous CD34+ stem cells transduced ex vivo with the Lentiglobin BB305 lentiviral vector in subjects with severe sickle cell disease. *Blood* 2015;126: Abstract 3233.
- [122] Cavazzana-CalvoM, PayenE, NegreO, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 2010;467:318–322.
- [123] Matthew C. Canver and Stuart H. Orkin Customizing the genome as therapy for the β -hemoglobinopathies /*Blood* 2016 127:2536-2545; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-678128>
- [124] D. Manwani, P.S. Frenette Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies/*Blood*, 122 (2013), pp. 3892-3898
- [125] M.J. Telen Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease/*Blood*, 127 (2016), pp. 810-819
- [126] M.H. Steinberg, D.H.K. Chui, G.J. Dover, P. Sebastiani, A. Alsultan Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full?/*Blood*, 123 (2014), pp. 481-485
- [127] F.A. Ferrone Sickle cell disease: its molecular mechanism and the one drug that treats it/*Int. J. Biol. Macromol.*, 93 (Pt A) (2016), pp. 1168-1173
- [128] M.H. Steinberg, W.F. McCarthy, O. Castro, S.K. Ballas, F.D. Armstrong, W. Smith, K. Ataga, P. Swerdlow, A. Kutlar, L. DeCastro, M.A. Waclawiw, Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia and MSH Patients' Follow-Up The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up/*Am. J. Hematol.*, 85 (2010), pp. 403-408

- [129] E. Voskaridou, D. Christoulas, A. Bilalis, E. Plata, K. Varvagiannis, G. Stamatopoulos, K. Sinopoulou, A. Balassopoulou, D. Loukopoulos, E. Terpos The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS)/Blood, 115 (2010), pp. 2354-2363
- [130] S.T. Paulukonis, J.R. Eckman, A.B. Snyder, W. Hagar, L.B. Feuchtbaum, M. Zhou, A.M. Grant, M.M. Hulihan Defining sickle cell disease mortality using a population-based surveillance system, 2004 through 2008/Public Health Rep., 131 (2016), pp. 367-375
- [131] O.S. Platt, D.J. Brambilla, W.F. Rosse, P.F. Milner, O. Castro, M.H. Steinberg, P.P. Klug Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death/N. Engl. J. Med., 330 (1994), pp. 1639-164
- [132] W.C. Mentzer, S. Heller, P.R. Pearle, E. Hackney, E. Vichinsky Availability of related donors for bone marrow transplantation in sickle cell anemia/Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol., 16 (1994), pp. 27-29
- [133] F. Alfraih, M. Aljurf, C.D. Fitzhugh, A.A. Kassim Alternative donor allogeneic hematopoietic cell transplantation for hemoglobinopathies/Semin. Hematol., 53 (2016), pp. 120-128
- [134] J. Kanter, M.C. Walters, M.M. Hsieh, L. Krishnamurti, J. Kwiatkowski, R.T. Kamble, C. von Kalle, F.A. Kuypers, M. Cavazzana, P. Leboulch, et al. Interim results from a phase 1/2 clinical study of lentiglobin gene therapy for severe sickle cell disease/Blood, 128 (2016), p. 1176
- [135] V.G. Sankaran, T.F. Menne, J. Xu, T.E. Akie, G. Lettre, B. Van Handel, H.K. Mikkola, J.N. Hirschhorn, A.B. Cantor, S.H. Orkin Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A/Science, 322 (2008), pp. 1839-1842

- [136] V.G. Sankaran, J. Xu, S.H. Orkin Transcriptional silencing of fetal hemoglobin by BCL11A/Ann. N Y Acad. Sci., 1202 (2010), pp. 64-68
- [137] J. Xu, V.G. Sankaran, M. Ni, T.F. Menne, R.V. Puram, W. Kim, S.H. Orkin Transcriptional silencing of gamma-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6/Genes Dev., 24 (2010), pp. 783-798
- [138] C. Brendel, S. Guda, R. Renella, P. Du, D.E. Bauer, M.C. Canver, S.C. Kamran, J. Thornton, H. de Boer, M.D. Milsom, et al. Optimization of Bcl11a Knockdown by miRNA scaffold embedded shRNAs leading to enhanced induction of fetal hemoglobin in erythroid cells for the treatment of beta-hemoglobinopathies/Blood, 124 (2014), p. 2150
- [139] C. Brendel, S. Guda, R. Renella, D.E. Bauer, M.C. Canver, Y.J. Kim, M.M. Heeney, D. Klatt, J. Fogel, M.D. Milsom, et al. Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype/J. Clin. Invest., 126 (2016), pp. 3868-3878
- [140] V. Sebastiano, M.L. Maeder, J.F. Angstman, B. Haddad, C. Khayter, D.T. Yeo, M.J. Goodwin, J.S. Hawkins, C.L. Ramirez, L.F. Batista, et al. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases/Stem Cells, 29 (2011), pp. 1717-1726
- [141] C. Li, L. Ding, C.W. Sun, L.C. Wu, D. Zhou, K.M. Pawlik, A. Khodadadi-Jamayran, E. Westin, F.D. Goldman, T.M. Townes Novel HDAd/EBV reprogramming vector and highly efficient Ad/CRISPR-Cas sickle cell disease gene correction/Sci. Rep., 6 (2016), p. 30422
- [142] M.D. Hoban, G.J. Cost, M.C. Mendel, Z. Romero, M.L. Kaufman, A.V. Joglekar, M. Ho, D. Lumaquin, D. Gray, G.R. Lill, et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells/Blood, 125 (2015), pp. 2597-2604

- [143] D.P. Dever, R.O. Bak, A. Reinisch, J. Camarena, G. Washington, C.E. Nicolas, M. Pavel-Dinu, N.Saxena, A.B. Wilkens, S. Mantri, *et al.* CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells/Nature, 539 (2016), pp. 384-389
- [144] J. Lee, B. Dykstra, R. Sackstein, D.J. Rossi Progress and obstacles towards generating hematopoietic stem cells from pluripotent stem cells/Curr. Opin. Hematol., 22 (2015), pp. 317-323
- [145] P. Genovese, G. Schioli, G. Escobar, T. Di Tomaso, C. Firrito, A. Calabria, D. Moi, R. Mazziere, C. Bonini, M.C. Holmes, *et al.* Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells/Nature, 510 (2014), pp. 235-240
- [146] D.E. Bauer, S.H. Orkin Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies/Curr. Opin. Pediatr., 23 (2011), pp. 1-8
- [147] J. Xu, C. Peng, V.G. Sankaran, Z. Shao, E.B. Esrick, B.G. Chong, G.C. Ippolito, Y. Fujiwara, B.L. Ebert, P.W. Tucker, S.H. Orkin Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing/Science, 334 (2011), pp. 993-996
- [148] Kim YG, /Cha J, /Chandrasegaran S/. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93(3):1156-1160.
- [149] Smith J, /Berg JM, /Chandrasegaran S/. A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme. Nucleic Acids Res 1999;27(2):674-681.
- [150] Bibikova M, /Golic M, /Golic KG, /Carroll D/. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. Genetics 2002;161(3):1169-1175.
- [151] Bibikova M, /Beumer K, Trautman JK, /Carroll D/. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. Science 2003;300(5620):764.

- [152] Porteus MH, /Baltimore D/ Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 2003;300(5620):763.
- [153] Urnov FD, Miller JC, /Lee Y-L, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 2005;435(7042):646-651.
- [154] Moehle EA, Rock JM, Lee Y-L, et al. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(14):6090]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(9):3055-3060.
- [155] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 2010;11(9):636-646.
- [156] Miller JC, Holmes MC, Wang J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 2007;25(7):778-785. 60-----73 pa encor
- [157] Li H, Haurigot V, Doyon Y, et al. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 2011;475(7355):217-221.
- [158] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-typeIII effectors. *Science* 2009;326(5959):1509-1512.
- [159] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009;326(5959):1501.
- [160] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 2010;186(2):757-761.
- [161] Li T, Huang S, Jiang WZ, et al. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res* 2011;39(1):359-372.

- [162] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 2011;29(2):143-148.
- [163] Stoddard BL. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure* 2011;19(1):7-15.
- [164] Smith J, Grizot S, Arnould S, et al. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res* 2006;34(22):e149.
- [165] Silva G, Poirot L, Galetto R, et al. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2011;11(1):11-27.
- [166] Thierry A, Dujon B. Nested chromosomal fragmentation in yeast using the meganuclease I-Sce I: a new method for physical mapping of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 1992;20(21):5625-5631.
- [167] Conley CL, /Weatherall DJ, /Richardson SN, /Shepard MK, /Charache S (1963) Hereditary persistence of fetal hemoglobin: A study of 79 affected persons in 15 Negro families in Baltimore. *Blood* 21:261–281.
- [168] Forget BG (1998) Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci* 850:38–44.
- [169] Huisman TH, et al. (1971) Hereditary persistence of fetal hemoglobin: Heterogeneity of fetal hemoglobin in homozygotes and in conjunction with -thalassemia. *N Engl J Med* 285(13):711–716.
- [170] Ringelmann B, et al. (1977) Homozygotes for the hereditary persistence of fetal hemoglobin: The ratio of G gamma to A gamma chains and biosynthetic studies. *Biochem Genet* 15(11-12):1083–1096.

- [171] Bank A (2006) Regulation of human fetal hemoglobin: New players, new complexities. *Blood* 107(2):435–443.
- [172] Hassell KL (2010) Population estimates of sickle cell disease in the U.S. *Am J Prev Med* 38(Suppl 4):S512–S521
- [173] Michelle I. Lin et al CRISPR/Cas9 Genome Editing to Treat Sickle Cell Disease and B-Thalassemia: Re-Creating Genetic Variants to Upregulate Fetal Hemoglobin Appear Well-Tolerated, Effective and Durable. **Volume:** 130/**Issue:** Suppl 1/**Pages:** 284/ *Blood* 2017 130:284
- [174] Watson J, Stahman AW, Bilello FP. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. *Am J Med Sci* 1948 ; 215 : 419.
- [175] Serjeant GR. Fetal hemoglobin in homozygous sickle cell disease. *Clin Haematol* 1975 ; 4 : 109-22.
- [176] Pembrey ME, Wood WG, Weatherall DJ, Perrine RP. Fetal hemoglobin production and the sickle gene in the oases of Eastern Saudi Arabia. *Br J Haematol* 1978 ; 49 : 415-29.
- [177] Sunshine HR, Hofrichter J, Eaton WA. Gelation of sickle cell hemoglobin in mixtures with normal and fetal hemoglobins. *J Mol Biol* 1978 ; 133 : 435-67.
- [178] Poillon WN, Kim BC, Rodgers GP, Noguchi CT, Schechter AN. Sparing effect of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S at physiological ligand saturations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 5039-43.
- [179] De Ceulaer K, Gruber C, Hayes RJ, Serjeant GR. Medroxyprogesterone acetate and homozygous sickle cell disease. *Lancet* 1982 ; 2 : 229-31.
- [180] Cong L, et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121):819–823.

- [181] Ran FA, et al. (2015) In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520(7546):186–191.
- [182] Bibhu Mishra et al., Crispr/Cas9- Mediated Genome Editing of Human CD34+ Cells Upregulate Fetal Hemoglobin to Clinically Relevant Levels in Single Cell-Derived Erythroid Colonies Volume: 128/Issue: 22/Pages: 3623 *Blood*/ 2016 128:3623;
- [183] Lin Ye, Wang J, Tan Y, Ashley I. Beyer, Fei Xie, Marcus O. Muench and Yuet Wai Kan Genome editing using CRISPR-Cas9 to create the HPFH genotype in HSPCs: An approach for treating sickle cell disease and β -thalassemia Contributed by Yuet Wai Kan, July 25, 2016 (sent for review June 28, 2016; reviewed by Tohru Ikuta and Stephen A. Liebhaber)
- [184] Sankaran VG, et al. (2011) A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. *N Engl J Med* 365(9):807–814.
- [185] Katsantoni EZ, et al. (2003) Persistent gamma-globin expression in adult transgenic mice is mediated by HPFH-2, HPFH-3, and HPFH-6 breakpoint sequences. *Blood* 102(9):3412–3419.
- [186] Sankaran VG, et al. (2008) Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* 322(5909):1839–1842.
- [187] Galanello R, et al. (1990) Deletion delta-thalassemia: The 7.2 kb deletion of Corfu delta beta-thalassemia in a non-beta-thalassemia chromosome. *Blood* 75(8):1747–1749.
- [188] Chakalova L, et al. (2005) The Corfu deltabeta thalassemia deletion disrupts gamma-globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of HbF expression. *Blood* 105(5):2154–2160.

- [189] Camaschella C, et al. (1990) A new hereditary persistence of fetal hemoglobin deletion has the breakpoint within the 3' beta-globin gene enhancer. *Blood* 75(4):1000–1005.
- [190] Forget BG. Molecular mechanisms of beta-thalassemia. In : Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, eds. *Disorders of hemoglobin*. Cambridge : Cambridge University Press, 2001 : 252-66.
- [191] Marti HR, Butler R. Increase of haemoglobin F and haemoglobin A2 in the Swiss population. *Acta Haematol (Basel)* 1961 ; 26 : 65-74.
- [192] Dover GJ, Boyer SH. Quantitation of hemoglobins within individual red cells : asynchronous biosynthesis of fetal and adult hemoglobin during erythroid maturation in normal subjects. *Blood* 1980 ; 56 : 1082-91.
- [193] Menzel S, Thein SL. Genetic architecture of hemoglobin F control. *Curr Op Hematol* 2009 ; 16 : 179-86.
- [194] Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB and β -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 11869-74.
- [195] Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* 2008 ; 322 : 1839-42.
- [196] Labie, Les mécanismes de régulation de l'hémoglobine fœtale Regulation mechanisms controlling fetal hemoglobin expression *Hématologie*, vol. 16, n° 3, mai-juin 2010

- [197] M.C. Canver, E.C. Smith, F. Sher, L. Pinello, N.E. Sanjana, O. Shalem, D.D. Chen, P.G. Schupp, D.S. Vinjamur, S.P. Garcia, *et al.* BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis/Nature, 527 (2015), pp. 192-197
- [198] J. Vierstra, A. Reik, K.H. Chang, S. Stehling-Sun, Y. Zhou, S.J. Hinkley, D.E. Paschon, L. Zhang, N. Psatha, Y.R. Bendana, *et al.* Functional footprinting of regulatory DNA/Nat. Methods, 12 (2015), pp. 927-930
- [199] Kai-Hsin Chang¹ Sarah E. Smith^{1,3} Timothy Sullivan^{1,3} Kai Chen¹ Qianhe Zhou¹ Jason A. West¹ Mei Liu¹ Yingchun Liu¹ Benjamin F. Vieira¹ Chao Sun¹... Siyuan Tan¹ Long-Term Engraftment and Fetal Globin Induction upon BCL11A Gene Editing in Bone-Marrow-Derived CD34⁺ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Volume 4, 17 March 2017, Pages 137-148
- [200] C. Brendel, S. Guda, R. Renella, D.E. Bauer, M.C. Canver, Y.J. Kim, M.M. Heene y, D. Klatt, J. Fogel, M.D. Milsom, *et al.* Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype J. Clin. Invest., 126 (2016), pp. 3868-3878
- [201] S. Luc, J. Huang, J.L. McEldoon, E. Somuncular, D. Li, C. Rhodes, S. Mamoor, S. Hou, J. Xu, S.H. Orkin Bcl11a deficiency leads to hematopoietic stem cell defects with an aging-like phenotype Cell Rep., 16 (2016), pp. 3181-3194
- [202] J.C. Tsang, Y. Yu, S. Burke, F. Buettner, C. Wang, A.A. Kolodziejczyk, S.A. Teichmann, L. Lu, P. Liu Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in Bcl11a-deficient hematopoietic stem cells Genome Biol., 16 (2015), p. 178
- [203] Labie D. L'expression de l'hémoglobine fœtale est sous le contrôle du répresseur BCL11A. médecine/sciences. mai 2009;25(5):457-60.

- [204] Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 2006 ; 126 : 231-5.
- [205] Koehler ANN. A complex task ? Direct modulation of transcription factors with small molecules. *Curr Op Chem Biol* 2010 ; 14 : 331-40.
- [206] Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 11595-8.
- [207] Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, et al. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet* 2010 ; 42 : 801-5.
- [208] Zhou D, Liu K, Sun CW, et al. KLF1 regulates BCL11A expression and γ - to β -globin gene switching. *Nat Genet* 2010 ; 42 : 742-4.
- [209] Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, et al. Fine mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet*, 2010 [Epub ahead of print].
- [210] Bradner JE, McPherson OM, Koehler AN. A method for the covalent capture and screening of diverse small molecules in a microarray format. *Nat Protoc* 2006 ; 1 : 2344-52.
- [211] Bradner JE, Mak R, Tanguluri SK, et al. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 12617-22.
- [212] Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutic-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol Med* 2009 ; 1 : 142-51.
- [213] Orkin SH, Higgs DR. Sickle cell disease at 100 years. *Science* 2010 ; 329 : 291-2.



Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisée de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

وأحس بالله العظيم



- ◀ أن أراقب الله في مهنتي
 - ◀ أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
 - ◀ أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
 - ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
 - ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
 - ◀ لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.
- "والله على ما أقول شهيد"

العلاج الجيني وتطبيقاته

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم

من طرفه

الآنسة: منال أبيدار

المزودة في: 01 نونبر 1993 بالرباط

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: العلاج الجيني - جين - كريسبر - عامل بيولوجي.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيدة: نعيمة الحفيظي

أستاذة في طب الأطفال

مشرف

السيد: عز الدين إبراهيمي

أستاذ في علم الأحياء الجزيئي

السيد: رشيد الجودي

أستاذ في علم السموم

أعضاء

السيدة: أمال الحسني

أستاذة في طب الأطفال