

# Rapport scientifique annuel DEBRA France

Année 2017

Pr. Alain Hovnanian  
Coordinateur du projet Européen GENEGRAFT  
INSERM UMR 1163, Laboratoire des Maladies génétiques cutanées  
Institut IMAGINE  
Service de Génétique  
Hôpital Necker -Enfants malades  
24 bld du Montparnasse  
75015 Paris  
FRANCE  
Tél: +33 1 42 75 42 89  
Portable : +33 6 08 98 67 11  
Fax: +33 1 44 49 51 50  
e-mail: alain.hovnanian@inserm.fr  
[www.institutimagine.org](http://www.institutimagine.org)

## A - Introduction

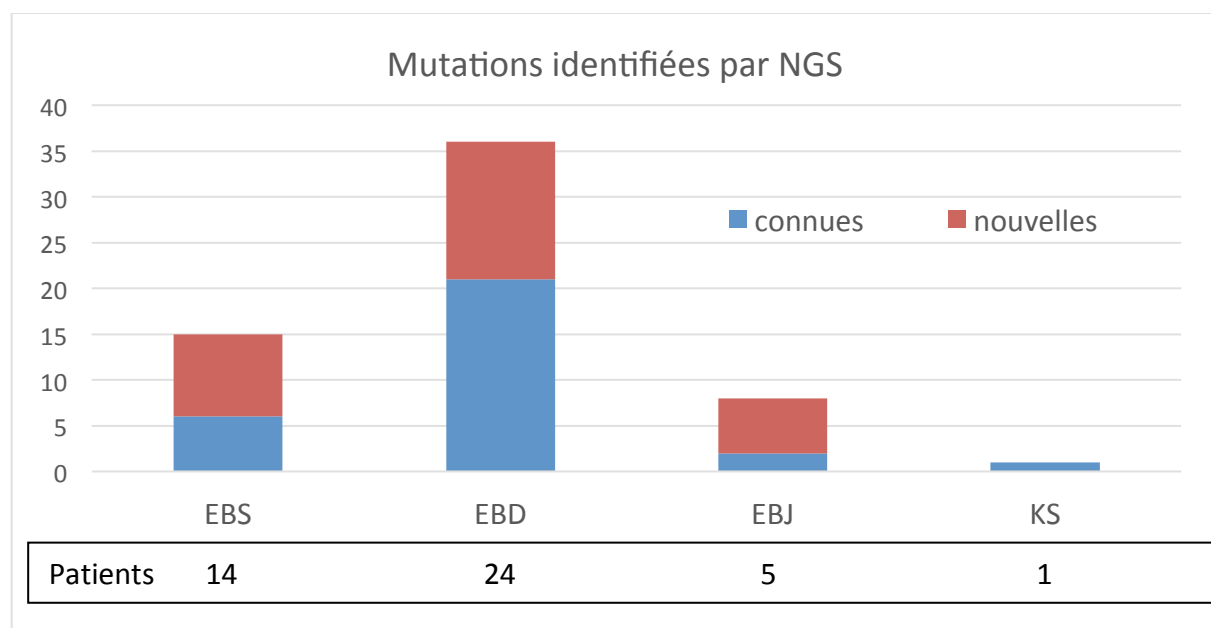
Au cours de cette année, nous avons poursuivi l'optimisation des moyens de diagnostic moléculaire par séquençage nouvelle génération des différentes formes d'EB et l'étude des conséquences de ces mutations au laboratoire de recherche INSERM UMR 1163 à l'Institut Imagine. Ces études sont essentielles pour le développement des nouvelles stratégies thérapeutiques et la préparation des essais cliniques chez les patients. Les approches que nous développons utilisent la thérapie génique, la thérapie cellulaire et les approches pharmacologiques. Cette année a marqué un tournant car elle a permis la **soumission de la demande d'essai clinique pour le projet EBGRAFT de thérapie génique des EBDR auprès de l'ANSM** et a permis d'obtenir des résultats très positifs dans les approches utilisant des **cellules stromales mésenchymateuses et l'édition du génome**. Les progrès spécifiques réalisés en 2017 dans chacune de ces thématiques sont exposés dans le rapport ci-dessous.

## B- Résultats

### *1. Diagnostic moléculaire d'EB à l'aide du nouveau panel de séquençage nouvelle génération*

Nous avons optimisé le panel de séquençage nouvelle génération que nous avons mis au point dans notre laboratoire de recherche pour améliorer le diagnostic moléculaire de toutes les formes d'EB (EBS, EBJ, EBD, Syndrome de Kindler). La nouvelle version de ce panel comprend les 20 gènes actuellement connus impliqués dans les EB héréditaires. Ce panel sert actuellement de panel de référence sur le plan national pour le diagnostic moléculaire des EB. Il permet ainsi de faire

rapidement le diagnostic moléculaire de toutes les formes connues d'EB, y compris les plus rares dont le diagnostic était resté méconnu jusqu'à récemment. Le bilan d'activité de diagnostic de l'année 2017 est résumé dans la Figure 1. 44 patients nous ont été adressés pour avis et diagnostic moléculaire d'EB, comprenant 15 patients issus de collaborations internationales. Il est remarquable de noter que l'utilisation de ce panel de séquençage nouvelle génération a permis d'identifier la/les mutations responsables de la maladie dans 100% des cas. L'identification des mutations impliquées a permis de montrer que 54% des patients présentaient une EB dystrophique, 32% une EB simple, 11% une EB jonctionnelle et 1 patient (2%) était atteint du syndrome de Kindler. A noter que 50% des mutations identifiées sont nouvelles (cad non rapportées dans la littérature à ce jour). Ceci souligne bien l'intérêt d'identifier la/les mutations chez chaque patient non seulement pour le conseil génétique du patient et de sa famille qui repose sur l'identification de la/les mutations spécifique responsable de la maladie dans la famille, mais également parce que cette information permet de mieux comprendre la diversité des mutations impliquées et d'en tenir compte lors des différentes stratégies thérapeutiques développées. En conclusion, le développement du panel de séquençage NGS a permis d'accélérer l'identification des mutations impliquées dans les EB et d'établir les bases moléculaires de tous les patients EB étudiés.



**Figure 1. Distribution des mutations identifiées dans les différentes formes d'EB à l'aide du panel de séquençage nouvelle génération.** 50% des mutations identifiées sont nouvelles. Les mutations déjà rapportées sont indiquées en bleu. Les nouvelles mutations sont indiquées en rouge. Nombre total de patients = 44

## 2. Caractérisation moléculaire des nouvelles mutations identifiées

Les conséquences des nouvelles mutations identifiées ont été étudiées sur le plan moléculaire et protéique. Ceci a nécessité de réaliser des biopsies cutanées et mettre en culture les cellules de l'épiderme (kératinocytes) et/ou du derme (fibroblastes) chez les patients étudiés. 19 patients EB (17 EBD et 2 EBS) ont ainsi pu être explorés. L'expression et la localisation de la protéine d'intérêt (collagène VII, plectine ou kératine 5 et 14) a été étudiée à l'aide d'anticorps spécifiques sur une biopsie cutanée (immunohistofluorescence). La taille et l'abondance de ces protéines d'intérêt ont été également étudiées à partir des protéines extraites des cellules des patients en culture (immunotransfert ou Western blot). Enfin, des anomalies d'épissage (découpage de l'ARN messager qui est la molécule intermédiaire entre le gène et la protéine) ont été recherchées pour les mutations dont l'analyse *in silico* prédisait une altération d'épissage. Ces analyses ont été recherchées à partir des ARNs extraits des kératinocytes et des fibroblastes des patients en culture. Ces études ont permis d'identifier les conséquences exactes de plusieurs mutations de *COL7A1*, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique, ce qui constitue une information précise pour corréliser le phénotype observé aux conséquences moléculaires des mutations identifiées.

Ainsi, nous

Le panel de séquençage a aussi facilité l'identification de mutations particulières nécessitant des études fonctionnelles spécifiques. Nous avons ainsi identifié trois mutations situées dans la région promotrice de *COL7A1*. Cette région du gène contrôle le niveau de production (transcription) de l'ARNm du collagène VII (C7). Ces mutations n'ont pas été précédemment rapportées. Nous avons montré qu'elles conduisent à la diminution du niveau de production de l'ARNm et de la protéine du collagène VII (C7) dont la séquence reste normale. Ces résultats sont très importants car ils prédisent la production d'une très faible quantité de C7 normal. Celle-ci serait suffisante pour induire une tolérance immunitaire normale vis à vis du collagène VII normal exogène apporté lors de thérapie génique ou protéique. Ces informations sont donc très utiles pour le développement des différentes stratégies thérapeutiques chez ces patients. Nous avons également identifié et caractérisé 2 mutations introniques du gène *COL7A1* situées à grande distance des séquences codantes (exons). Nous avons démontré qu'elles altéraient l'épissage de *COL7A1* dans les cellules en culture des patients EBD étudiés. Enfin, nous avons identifié dans deux nouvelles familles EBD, la présence d'une mutation dominante de *COL7A1* associée à une mutation récessive de *COL7A1* chez les membres les plus sévèrement atteints de ces familles, expliquant les différences de sévérité clinique intrafamiliales observées.

### **3. Etude pré-clinique de thérapie génique ex vivo utilisant l'injection de cellules stromales mésenchymateuses.**

Différentes études précliniques et cliniques ont montré que des injections locales ou systémiques de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) dérivées de la moelle osseuse d'un sujet non apparenté (allogéniques) sont capables de réduire l'inflammation cutanée et d'améliorer la cicatrisation des plaies chez les patients EBDR. Ces améliorations cliniques sont cependant transitoires et les mécanismes d'action des CSM dans l'EBDR et leur durée de vie après injection sont mal connus. Les CSM pourraient agir *via* leurs propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires, l'expression de collagène VII (C7) endogène par un effet paracrine et/ou l'expression de C7 par les CSM injectées. Nous avons étudié l'expression de C7 après injection intradermique de CSM humaines dans un modèle de xélogreffe EBDR chez la souris. Ce modèle consiste en la greffe sur des souris immunotolérantes, d'une peau reconstruite à partir de kératinocytes et de fibroblastes de patients EBDR porteurs de mutations de *COL7A1* ne permettant la production d'aucune molécule de C7 détectable. Nos résultats montrent qu'une injection intradermique unique de CSM dans la peau EBDR reconstruite permet de restaurer une expression de C7 humain normal et la formation des fibres d'ancrage jusqu'à 6 mois après l'injection. Le modèle utilisé (peau équivalente EBDR faite de cellules portant une mutation nulle de *CO7A1* greffée sur souris immunotolérante) a permis de conclure que le C7 détecté était produit par les CSM injectées. Les CSM injectées survivent jusqu'à 4 mois après l'injection. Ces données montrent que les CSM injectées par voie intradermique ont le potentiel de restaurer l'expression de C7 normal *in vivo* de façon prolongée et d'améliorer l'adhésion dermo-épidermique de la peau EBDR. Ces résultats font l'objet d'une publication en cours (Ganier *et al.* 2018).

### **4. Etude pré-clinique de correction génique par gene editing**

Plusieurs études récentes ont montré le potentiel thérapeutique de la correction génique par "édition de gènes". Cette approche utilise des nucléases ("ciseaux moléculaires") spécifiques de séquences d'ADN telles le système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated Cas9). Ces enzymes permettent d'induire des cassures spécifiques d'ADN double brin et de stimuler de manière efficace la recombinaison homologue (RH) (réparation de la séquence d'ADN) en présence d'une matrice d'échange (apportant la séquence normale).

Nous avons poursuivi le développement de cette approche utilisant le système CRISPR/Cas9 pour corriger une mutation nulle retrouvée chez plusieurs patients située dans l'exon 2 de *COL7A1*. Nous avons dans un premier temps identifié les meilleures séquences (ARN guides ou ARNg) ciblant les régions adjacentes de la mutation. Deux de ces ARNg ont montré une spécificité et une activité

élevées de clivage dans des fibroblastes et des kératinocytes humains primaires. Nous les avons donc utilisés pour corriger la mutation ciblée dans les cellules d'un patient porteur de cette mutation sur ses deux copies du gène *COL7A1*. Nous avons donc traité les kératinocytes et les fibroblastes en culture de ce patient à l'aide de la nucléase Cas9, de l'ARNg le plus efficace et de la matrice d'échange correspondant à la séquence normale de cette partie du gène *COL7A1*. Nous avons pu obtenir une correction génique de 11 et 15,7% dans les kératinocytes et les fibroblastes primaires, respectivement, de ce patient EBDR. Ces cellules corrigées permettaient la production de collagène VII détectable en culture. Afin de montrer que la quantité et la qualité du collagène VII produit était suffisantes pour permettre la formation de fibres d'ancrage fonctionnelles et restaurer une jonction dermo-épidermique normale, nous avons contruit des peaux équivalentes à partir des kératinocytes et des fibroblastes primaires corrigés de ce patient que nous avons greffées sur des souris immuno-déficientes (tolérantes pour les cellules humaines). Nous avons ainsi pu démontrer à l'aide d'anticorps marqués spécifiques du collagène VII humain, une forte réexpression de collagène VII humain le long de la jonction dermo-épidermique de ces peaux reconstruites greffées génétiquement corrigées. De façon remarquable, cette expression de collagène VII, mesurée à 26% de l'expression normale, permettait la formation de fibres d'ancrage qui étaient très nettement visibles en microscopie électronique 2 mois après la greffe.

Notre étude a donc permis de montrer la faisabilité et l'efficacité de l'édition génique des mutations de *COL7A1* par CRISPR/Cas9 et recombinaison homologue. Elle permet d'envisager le développement de modèles de peau génétiquement corrigée selon des protocoles permettant une application clinique. Ce travail a fait l'objet d'un article qui est en cours de révision (Izmiryman *et al.* 2018).

### **5. Etude des carcinomes épidermoïdes dans les EBDR**

Le développement de carcinomes épidermoïdes (CE) est une complication malheureusement très fréquente, chez les patients atteints d'EBDR. Ils surviennent de façon préférentielle mais non exclusive, sur les plaies cutanées chroniques et peuvent se développer précocement chez l'adulte jeune. Ils sont volontiers récidivants, agressifs et précocement métastatiques. Leur diagnostic est difficile et l'exérèse chirurgicale, qui constitue actuellement le seul traitement efficace, n'empêche pas toujours les récives locorégionales et les localisations secondaires à distance.

L'étiologie des CE chez les patients EBDR (CE-EBDR) est inconnue de même que leurs facteurs pronostiques. Ces carcinomes ne sont pas induits par les ultraviolets (UV) car ils surviennent sur des zones non photo-exposées (extrémités, dos) et couvertes de pansements alors que le visage n'est jamais concerné. Par contre, il semble que le microenvironnement tumoral (inflammation chronique, fibrose, remodelage de la matrice extracellulaire) joue un rôle important dans le développement

tumoral. Les études de séquençage nouvelle génération dans les CE sporadiques (non EBDR) ont permis de montrer que la signature mutationnelle prédominante était secondaire aux UV. Le caractère non UV induit et le profil évolutif différent des CE-EBDR impliquent probablement des mécanismes de carcinogène et un profil génomique différents. L'identification d'une signature moléculaire spécifique des CEC-EBDR permettrait de mieux comprendre leurs spécificités en termes de prévalence et de pronostic. Dans le but d'identifier les gènes mutés des CE-EBDR et de rechercher une signature moléculaire spécifique, nous avons généré un panel NGS dédié et avons constitué une banque d'échantillons tumoraux de patients EBDR.

## **6. Activité translationnelle**

La finalité de notre recherche est la mise au point et la réalisation d'essais thérapeutiques efficaces et innovants permettant une amélioration de la maladie chez les patients atteints d'EB. Cette stratégie est poursuivie avec succès et nous a permis de participer à un essai clinique pour les EBS et de préparer un premier essai clinique de thérapie génique pour les EBDR.

### **6.1 Participation à un essai clinique de phase III du traitement des EBS par Diacérine**

L'essai clinique de phase II utilisant la Diacérine topique pour le traitement des EB simples auquel nous avons participé en 2016 a montré de très bons résultats. La Diacérine est un composé naturel inhibant l'interleukine 1 qui est un médiateur de l'inflammation. Ces résultats viennent d'être publiés dans une très bonne revue américaine de Dermatologie (*JAAD*)(cf. *liste publications*).

Devant ces bons résultats, la société américaine pharmaceutique Castelcreeks a mis en place un essai clinique international multicentrique de phase III visant à traiter environ 100 individus atteints d'EB simple (EBS). Cet essai clinique a débuté en septembre 2017. Nous participons au recrutement de ces patients EBS et à leur inclusion dans le protocole.

### **6.2 Préparation du traitement du premier patient par greffe de peau équivalente génétiquement corrigée (projet EBGRAFT)**

Durant l'année 2017, une étape fondamentale a été franchie pour la réalisation de cet essai clinique : nous avons en effet finalisé la rédaction de tous documents de l'**IMPD (Investigational Medicinal Product Dossier)** et soumis ce dossier ainsi que les autres documents nécessaires à de demande d'essai clinique auprès de l' **Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM)**. Ces documents comprenaient en particulier :

- le protocole clinique
- la brochure investigateur

- les formulaires de consentement
- Le cahier d'observation
- le dossier IMPD (Investigational Medicinal Product Dossier)
- le document « first in man »
- la constitution du comité de pilotage de l'essai clinique
- l'autorisation par l'ANSM de l'export des biopsies de patient
- l'autorisation par le Haut Conseil des Biotechnologies de la manipulation des OGM (greffons génétiquement modifiés) à l'Hôpital Necker

Nous avons également finalisé les études de toxicologie chez l'animal. Celles-ci ont permis de démontrer l'absence de risques accrus de cancérogénèse, de diffusion du vecteur ou de toxicité aigue.

Le centre de production (Laboratoire de Thérapie Génétique du Dr Manuel Ramirez à l'hôpital Nino Jesus à Madrid) a finalisé la validation de la production de grade clinique (BPF, bonnes pratiques de fabrication) des greffons de peau génétiquement corrigés. Il a ainsi pu obtenir l'agrément de l'agence espagnole du médicament pour la production de ces greffons génétiquement corrigés.

Ces avancées considérables nous ont permis de déposer le dossier IMPD de demande d'autorisation d'essai clinique auprès de l'ANSM en novembre 2017. Ce dossier est en cours d'évaluation par les experts de l'ANSM. L'obtention de l'autorisation d'essai clinique devrait permettre l'inclusion du premier patient au cours du 4<sup>ème</sup> trimestre 2018.

## C- Conclusion et perspectives

1. Le panel de séquençage nouvelle génération (NGS) que nous avons développé est devenu le panel de référence sur le plan national permettant d'établir rapidement et avec une grande efficacité le diagnostic moléculaire de toutes les formes d'EB actuellement connues (20 gènes).
2. Son utilisation a largement amélioré le service rendu aux patients et à leurs familles, a permis un conseil génétique et un diagnostic prénatal adaptés à chaque famille, et l'identification de mutations dont le diagnostic restait difficile par les techniques de séquençage classiques.
3. L'étude des conséquences des mutations de *COL7A1* sur la qualité et la quantité des ARNm de *COL7A1* et la production du collagène VII reste importante pour prédire la tolérance immunitaire vis à vis du collagène VII normal et établir des corrélations génotype-phénotype.
4. Les résultats obtenus avec les cellules stromales mésenchymateuses injectées par voie intradermique sont très encourageants. Ils ont confirmé leur potentiel thérapeutique et conduisent à développer des études pré-cliniques utilisant leur administration systémique avec et sans correction génétique.
5. La correction génétique d'une mutation de *COL7A1* par édition génique à l'aide de CRISPR/Cas9 et la démonstration de sa fonctionnalité après greffe chez la souris apportent une preuve de faisabilité de l'approche. Ce résultat va permettre d'utiliser cette nouvelle stratégie pour corriger des mutations récurrentes de *COL7A1* à partir de cellules primaires et d'iPSC (cellules induites pluripotentes) qui sont en cours de développement dans le laboratoire.
6. Le panel de gènes de cancers développé et le matériel tumoral collecté seront de précieux atouts pour développer un nouveau projet sur l'étude génétique des cancers cutanés survenant chez les patients EBD.
7. La qualité des résultats obtenus lors de la Phase II de traitement des EBS par la Diacerin topique en 2015 à laquelle nous avons participé, a conduit la société CastelCreeks Pharma à mettre en place un essai international de phase III impliquant un grand nombre de patients auquel nous participons.
8. Des étapes clés du projet EBGRAFT ont été franchies en 2017. Le dossier de demande d'autorisation d'essai clinique est en cours d'évaluation par les experts de l'ANSM et devrait permettre la greffe du premier patient avant la fin de l'année 2018.



## D- Conférences nationales et internationales

**9<sup>ème</sup> Assises Génétique Médicales, 24-26 janvier 2018, Nantes**

**Ganier C\*., Titeux M., Gaucher S.,** Le Lorch M., Peltzer J, Lataillade JJ. et **Hovnanian A.**

Thérapie cellulaire de l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive par injection intradermique de cellules stromales mésenchymateuses dans un modèle de xéno greffe murin.

*Présentation orale\* en session plénière*

**Titeux M, Pironon N et Hovnanian A.**

Mutations introniques profondes conduisant à l'inclusion de pseudo-exons dans les épidermolyses bulleuses : challenge diagnostique, identification du mécanisme mutationnel et stratégies de modulation d'épissage.

*Poster*

**Duchatelet, S., Pironon, N., Miskinyte, S.,** Bourrat E., **Titeux, M. et Hovnanian A.**

Sévérité variable dans des cas d'Épidermolyse Bulleuse Dystrophique hétérozygotes composites pour des mutations récessives et dominantes de *COL7A1* : implications pour le conseil génétique.

*Poster*

**Izmiryan A\*., Ganier C.,** Bovolenta M., Schmitt A., Mavilio F. et **Hovnanian A.**

Correction *ex-vivo* du gène *COL7A1* par CRISPR/Cas9 et recombinaison homologue pour les épidermolyses bulleuses dystrophiques récessives.

*Présentation orale\*.*

**European Society of Dermatology Research (ESDR), 26-28 September 2017, Salzburg, Autriche**

**S. Duchatelet, N. Pironon, S. Miskinyte, M. Titeux,** Bourrat E., **Hovnanian A.**

Diagnostic challenge of compound heterozygosity for dominant and recessive *COL7A1* mutations in dystrophic epidermolysis bullosa

*Poster*

**European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), 2018, Berlin, Allemagne**

**Izmiryan A.,** Lefort N. et **Hovnanian A.**

CRISPR/Cas9-mediated *COL7A1* editing in induced pluripotent stem cells from patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. ESGCT. Berlin 2017

*Poster*

### **DeBRA research meeting**

Alain Hovnanian. GENEGRAFT for RDEB.

*EB2017 Research & EB-CLINET Conferences 2017.*

25 September 2017, Salzburg, Austria

*Présentation orale.*

### **E - Publications dans des journaux internationaux à comité de lecture**

**1. Wally V, Hovnanian A, Ly J, Buckova H, Brunner V, Lettner T, Ablinger M, Felder TK, Hofbauer P, Wolkersdorfer M, Lagler FB, Hitzl W, Laimer M, Kitzmüller S, Diem A, Bauer JW.**

Diacerein Orphan Drug Development for Epidermolysis Bullosa Simplex: A Phase 2/3 Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial.

*J Am Acad Dermatol.* 2018, 78 : 892-901.

**2. Clarisse Ganier, Matthias Titeux, Sonia Gaucher, Juliette Peltzer, Marc Le Lorc'h, Jean-Jacques Lataillade, Akemi Ishida-Yamamoto and Alain Hovnanian**

Intradermal injection of bone marrow-MSC corrects Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa in a xenograft model

*Article accepté pour publication dans J Invest Dermatol.*

*DEBRA France a été remercié dans cet article.*

**3. Izmiryan A, Ganier C., Bovolenta M, Schmitt A., Mavilio F and Hovnanian A.**

*Ex vivo COL7A1* correction for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa using CRISPR/Cas9 and Homology Directed Repair.

*Article soumis, en cours de révision*

*DEBRA France a été remercié dans cet article.*