

# Rapport scientifique DEBRA France

Année 2013

Pr. Alain Hovnanian  
Services de Génétique et de Dermatologie  
Coordinateur du projet Européen GENEGRAFT  
Centre de diagnostic des maladies génétiques cutanées  
Institut *Imagine* des maladies Génétiques  
Inserm U781  
Tour Lavoisier  
3ème étage  
Hôpital Necker enfants malades  
149 rue de Sèvres  
75743 Paris cedex 15  
France  
Tel bur : +33 1 71 19 63 95  
Tel sec : +33 1 44 49 51 64  
Fax: +33 1 71 19 64 20  
e-mail: alain.hovnanian@inserm.fr

Notre équipe a une activité hospitalière, à la fois clinique et biologique, et une activité de recherche translationnelle centrée sur les épidermolyses bulleuses (EB) héréditaires. **L'activité hospitalière** couvre le diagnostic clinique et moléculaire, le conseil génétique et le diagnostic prénatal des trois grands groupes d'EB (EB simples (EBS), EB jonctionnelles (diagnostic prénatal seul) et EB dystrophiques (EBD) dominantes et récessives.

**L'activité de recherche translationnelle** est focalisée sur le développement de nouveaux traitements pour les EBD récessives, qui constituent les formes les plus sévères d'EBD, et la mise en place d'essais thérapeutiques innovants.

Nous présentons les principaux faits marquants de l'année 2013 pour chacune de ces activités :

## **I - Activité hospitalière (diagnostic moléculaire, conseil génétique et diagnostics prénataux**

### **II - Activité de recherche :**

#### **II-1. Projet européen GENEGRAFT de thérapie génique des EBD**

#### **II-2. Autres projets de recherche translationnelle**

## **I - Activité hospitalière**

Celle-ci recouvre les activités de :

- diagnostic clinique
- diagnostic moléculaire
- conseil génétique
- diagnostics prénataux des EB héréditaires

L'activité de diagnostic moléculaire de maladies génétiques humaines n'est autorisée en France que dans des structures autorisées qui ont obtenu un agrément du Ministère de la Santé, et par des personnes ayant un agrément délivré par l'Agence de la BioMédecine. Notre laboratoire répond à ces exigences réglementaires.

Les demandes de diagnostic moléculaire d'EB héréditaire nous sont adressées par différents hôpitaux de Paris et de province. Elles ont concerné :

- EB simples (EBS) : 11 cas
- EB jonctionnelles (EBJ) : 2 cas, transmis au centre de Nice
- EB dystrophiques (EBD) : 15 cas

Nous avons réalisé des diagnostics prénataux pour les risques de récurrence des formes suivantes :

- EB Simple généralisée sévère : 3 cas
- EBJ généralisée sévère : 2 cas
- EBD généralisée sévère : 4 cas

Cette activité est avantageusement complétée par des explorations plus sophistiquées menées dans notre laboratoire de recherche dans principalement trois situations (cf. paragraphe activité de recherche) :

- Etude des conséquences des mutations
- Recherche de mutations « cachées »
- Identification d'événements de correction génique spontanée

## **II - Activité de recherche :**

Celle-ci couvre plusieurs aspects. En particulier, elle vise à :

- Compléter l'activité de diagnostic hospitalier
- Mettre en place le projet européen GENEGRAFT
- Développer de nouvelles approches thérapeutiques innovantes

### **II-1 Activité complétant l'activité diagnostique hospitalière**

Dans certaines situations, l'activité diagnostique hospitalière seule est insuffisante pour porter le diagnostic moléculaire de certitude. Ceci peut correspondre à plusieurs situations dans lesquelles les techniques de diagnostic hospitalier ne permettent pas d'identifier les conséquences des mutations identifiées, ne parvient pas à identifier les mutations impliquées ou ne peut étudier des zones de peau particulières de la personne atteinte. Il est alors nécessaire de mettre en

place des explorations spécifiques qui dépassent le cadre de l'activité hospitalière car elles sont longues et sophistiquées et demandent des expertises spécifiques. Il s'agit des situations suivantes :

- **Etude des conséquences des mutations sur le découpage du gène**

Pour identifier les conséquences de mutations qui prédisent *in silico* une altération du découpage des pré-ARM afin de confirmer le caractère délétère de ces mutations et prédire leurs conséquences sur le plan protéique

- **Recherche de mutations « cachées »**

Pour identifier une ou deux mutations dont la recherche est restée négative après séquençage de tous les exons codants et des parties introniques flanquantes du gène (en particulier pour le gène *COL7A1* qui comprend 118 exons).

- **Identification de phénomènes de correction génique spontanée**

Pour confirmer ou infirmer une suspicion de réversion somatique responsable de régions de peau « d'apparence normale, non bulleuse, résistante aux frottements » comme nous l'avons observé chez plusieurs personnes atteintes de différentes formes d'EB.

Chacune de ces activités est très importante pour la confirmation moléculaire du diagnostic d'EB, le conseil génétique du couple et le traitement de la personne atteinte par des approches innovantes développées dans le laboratoire. Cinq patients en ont bénéficié à ce jour.

## II-2. Projet européen GENEGRAFT de thérapie génique des EBDR

Les grandes lignes de ce projet ont déjà été décrites dans les rapports précédents et dans des bulletins de DEBRA France en 2011 et 2013. Rappelons qu'il s'agit du premier essai clinique de thérapie génique des EBDR en Europe ([www.genegraft.eu](http://www.genegraft.eu))

Le projet GENEGRAFT a débuté en mars 2011. Il est coordonné par Alain Hovnanian (équipe Inserm : Matthias Titeux, Nathalie Pironon, Soëli Charbonnier), et implique plusieurs partenaires internationaux : Pr. John McGrath et Dr Alya Abdul-Wahab (Londres), Pr. Christine Bodemer (Paris), Dr Klaus Kühckle et Rainer Löw (EUFETS, Allemagne), Didier Caizergues et Géraldine Honnet (Généthon), Patricia Joseph-Mathieu (Inserm-Transfert), Clare Robinson (DebRA International), Pr. Michele de Luca et Dr Graziella Pellegrini (Université de Modène, Italie) et Marcela del Rio et Fernando Larcher (Ciemat, Madrid).

C'est un essai de phase I/II qui vise à étudier la faisabilité et la sécurité de la transplantation de peaux équivalentes autologues après correction génétique par un vecteur rétroviral sécurisé apportant une copie normale du gène *COL7A1*.

Il est basé sur la preuve de faisabilité pré-clinique apportée par notre équipe de recherche à l'aide d'un vecteur rétroviral sécurisé apportant une copie normale de *COL7A1* (Titeux *et al. Mol Ther* 2010) et sur la preuve de principe apportée chez l'homme par la transplantation de feuillets épidermiques génétiquement corrigés à l'aide d'un vecteur rétroviral classique transportant le gène *LAMB3* dans une forme d'EB jonctionnelle (Mavilio *et al. Nat Med* 2006).

Le projet GENEGRAFT prévoit de traiter 1 à 3 personnes, enfant ou adulte, par transplantation de 2 peaux équivalentes corrigées de 5 x 5 cm au niveau d'un membre, l'une en peau bulleuse et l'autre en peau non bulleuse. Les greffes ont reçu la désignation de **médicament orphelin** par l'Agence Européenne du Médicament en mars 2009.

Des progrès considérables ont été réalisés dans plusieurs aspects essentiels du projet. Ceux-ci peuvent être résumés de la façon suivante :

## **1. Pré-sélection et sélection des patients**

Afin de pouvoir inclure les personnes présentant des critères favorables, nous avons dû mettre en place le projet **EBGen** qui vise à déterminer la tolérance immunitaire vis à vis du collagène 7 et les capacités prolifératives des kératinocytes et fibroblastes de personnes atteintes d'EBDR. Nous avons obtenu toutes les autorisations réglementaires nécessaires des institutions (Promoteur, CPP, ANSM), ce qui nous a permis d'inclure les 4 premières personnes (3 à Londres et 1 à Paris). Le recrutement se poursuit dans les deux villes, sur la base de la liste de pré-sélection de 30 patients établie par chacun des centres de recrutement (15 personnes par Centre), au cours de consultations dédiées à cette activité, à Londres et à Paris.

Au delà des autorisations réglementaires, le projet EBGen a pu être mise en place grâce à deux étapes importantes :

- La mise en place et l'amélioration des tests *in vitro* d'étude de la tolérance immunitaire vis à vis du collagène 7. Ceci a été rendu possible par l'amélioration des techniques de production et de purification du collagène 7 recombinant servant à la réalisation des tests ELISA (détection d'anticorps anti-collagène VII circulants) et des tests ELISPOT (Test étudiant l'activation de lymphocytes T de la personne vis à vis du collagène VII normal purifié).
- L'identification d'un nouveau partenaire (Pr Michele De Luca, Centre de médecine Régénérative, Université de Modène, Italie) qui prendra en charge l'étude de la capacité de prolifération des kératinocytes et des fibroblastes des personnes étudiées (voir paragraphe 3).

## **2. Amélioration, production et utilisation du vecteur rétroviral**

Ces travaux ont été réalisés en étroite collaboration avec les Dr Klaus Kühckle et Rainer Löw (EUFETS)

### *a. Optimisation du vecteur*

Le vecteur viral servant à apporter une copie normale du gène *COL7A1* (ou plus précisément de son ADN complémentaire dépourvue d'introns) a été « optimisé ». Cela signifie qu'il a été modifié pour qu'il puisse permettre la production de lots plus concentrés de virus exprimant fortement le gène *COL7A1* dans les cellules cibles.

### *b. Développement d'une lignée productrice du vecteur viral*

Ce vecteur « optimisé » a été utilisé pour établir une lignée stable productrice de virus. Celle-ci produit des surnageants viraux ayant une concentration élevée de particules infectieuses (2 à 5 x 10<sup>6</sup> par ml de surnageant), ce qui est très satisfaisant pour l'essai clinique. L'établissement d'une lignée de productrice du vecteur est une étape clef car elle permet d'obtenir des taux stables et reproductibles de lots viraux.

### *c. Evaluation de l'efficacité de correction génétique des cellules*

Nous avons testé ces surnageants viraux et avons montré qu'ils corrigeaient très efficacement les cellules primaires de la peau des personnes atteintes d'EBDR. L'efficacité de correction génique est supérieure à 80% pour les kératinocytes et dépasse 65% pour les fibroblastes.

### *d. Master cell bank et GMP*

Cette lignée permettra de constituer une Master Cell bank et la production de lots cliniques en condition GMP (Good Manufacturing Practice) ce qui permettra leur utilisation pour l'essai clinique après la certification « GMP ». Celle-ci est prévu courant 2014.

### **3. Préparation des greffes cutanées génétiquement modifiées dans des conditions « GMP » (Good Manufacturing Practice »)**

Un aspect essentiel du projet réside dans la préparation des peaux équivalente génétiquement modifiées selon des conditions « GMP » afin qu'ils puissent être utilisés lors de l'essai clinique. Une étape essentielle a été franchie, dans la mesure où la réalisation des greffons génétiquement corrigés dans des conditions GMP a été confiée à l'équipe du Pr Michele de Luca et Dr Graziella Pellegrini de l'Université de Modène, Italie. Cette équipe dispose d'un savoir faire unique dans le domaine des greffes de peau génétiquement corrigées et dispose d'un établissement de production répondant aux conditions « GMP » Européennes. Les Dr Marcela del Rio et Fernando Larcher (Ciemat, Madrid) aideront également au transfert de technologie impliquant l'utilisation de peau équivalente avec derme constitué de fibrine.

### **4. Sécurité de l'essai clinique**

#### *a. Mutagénèse insertionnelle*

Nous avons montré chez l'animal que les cellules humaines corrigées avec le vecteur n'entraînaient pas de développement de tumeur, qu'elles soient injectées sous la peau ou transplantées dans des systèmes de peau équivalentes.

#### *b. Tolérance immunitaire*

##### Sélection des patients

L'étude de la tolérance immunitaire vis à vis du collagène VII repose sur la détection d'anticorps circulants anti-collagène VII (test ELISA) et de l'activation des lymphocytes T de la personne lors du test *ex vivo* (ELISPOT) que nous avons mis au point dans le laboratoire de recherche (*cf. supra*). En cas de positivité du test ELISA (détection d'anticorps circulants anti-collagène VII), ces tests seront complétés par un test d'immunofluorescence indirecte visant à déterminer si ces anticorps circulants anti-collagène VII se fixent à la membrane basale. Dans ce cas, ils seraient alors potentiellement délétères vis à vis du greffon.

#### *c. Intégrité du transgène*

Nous avons étudié en détail l'intégrité du collagène VII produit par le transgène au niveau des transcrits. Nos conclusions sont qu'il n'est pas approprié de modifier la séquence naturelle du gène *COL7A1* transporté par le rétrovirus sécurisé.

#### *d. Etude des sites d'intégration du vecteur*

Cette étude sera réalisée lors de l'essai clinique en suivant l'évolution des profils d'intégration des transgènes dans le greffon corrigé. Ceux-ci seront déterminés par Next Generation Sequencing au cours du temps. Elle permettra de suivre l'évolution de la diversité de la population cellulaire corrigée au cours du temps et l'émergence de clones surreprésentés.

### **5. Rédaction des documents réglementaires et éthiques pour l'essai clinique.**

Nous avons obtenu les accords des institutions suivantes pour l'étude EBGGen « Etude de la tolérance immunitaire et de la capacité à cicatriser des personnes atteintes d'EBDR » :

- Accord de l'INSERM en tant que promoteur, du COSSEC (cellules de thérapie génique de l'INSERM), ANSM (Agence nationale de Sécurité du Médicament), CPP (Comité de Protection des Personnes) de Necker, NHS REC (Londres). L'obtention de ces autorisations nous a permis d'inclure les 4 premiers patients dans l'étude EBGGen, qui est une première étape avant l'inclusion dans GENEGRAFT.

## **6. Inclusion de nouveaux partenaires :**

Cette année a été marquée par l'inclusion de deux nouveaux partenaires impliqués dans la préparation des peaux équivalents génétiquement corrigées selon des conditions GMP :

L'équipe du Pr. Michele de Luca et Dr Graziella Pellegrini (Université de Modène, Italie) et celle du Pr Marcela del Rio et Fernando Larcher (Ciemat, Madrid).

## **7. Perspectives**

Les prochaines étapes comprennent :

- Compléter la pré-inclusion dans le projet EBGen de 30 personnes « candidates »
- Pré-sélectionner 10 de ces personnes sur la base de leur tolérance immunitaire vis à vis du collagène VII
- Etudier les capacités de prolifération des kératinocytes et des fibroblastes de ces 10 personnes pour en sélectionner 3 à 6 ayant des critères optimaux d'inclusion
- Production et validation d'un lot clinique viral GMP
- Constitution d'une Biobanque de grade clinique des kératinocytes et fibroblastes des 3 à 6 patients EBDR sélectionnés
- Produire des peaux équivalentes génétiquement corrigées en conditions GMP
- Rédaction et soumission de l'IMPD à l'ASNM

Celles-ci seront développées au cours de l'année 2014 et bénéficieront de la participation des nouveaux partenaires.

## **8. Budget**

Salaires ingénieur et post-doctorant : 31101 €

Frais de fonctionnement du laboratoire et achat de matériel : 33 899 €

Total dépenses : 65 000 €

## **II-2. Autres projets de recherche translationnelle**

Les stratégies thérapeutiques développées ont toutes pour objectifs d'apporter un bénéfice clinique aux personnes atteintes en tenant compte des particularités de la maladie les concernant. Les interventions thérapeutiques peuvent cibler différentes étapes du processus pathologique allant du gène muté à l'absence de protéine fonctionnelle. Les approches thérapeutiques que nous développons visent à intervenir à plusieurs étapes de ce processus : l'ADN, l'ARN pré-messager, la lecture de l'ARN messager de COL7A1, les cellules pouvant exprimer le collagène VII et le collagène VII lui-même. Pour des raisons de confidentialité, ces projets feront l'objet de rapports dès que les résultats seront publiés.