Mosaïcisme somatique & thérapie génique dans l'anemie de Fanconi

T. Leblanc.
Hôpital Robert-Debré, Paris
Avignon, 19 octobre 2019

Glossaire

Allèle: exemplaire d'un gène; pour chaque gène on a 2 allèles: 1 vient du père, 1 vient de la mère

Cellules CD34+: cellules exprimant un marqueur (CD34) parmi lesquelles une partie seront des cellules souches hématopoïétiques capables de reconstituer la moelle après greffe

cis: mutation en cis: mutation sur le même allèle que la mutation considérée (les 2 mutations sont sur le même allèle); une mutation en cis peut venir corriger l'effet d'une mutation de l'allèle considéré

Crossing over: mécanisme par lequel 2 allèles d'un gène s'échangent une partie de gène lors de la mitose (division cellulaire); ceci peut corriger un allèle (reconstitution d'un allèle normal)

Génotype: partie ou ensemble des caractéristiques génétiques d'un individu

Germinal: lignée germinale: lignée des gamètes (spermatozoides et ovocytes); mutation germinale: se dit d'une mutation présente dans toutes les cellules de l'organisme

IBMFs: Inherited Bone Marrow Failure syndromes: atteintes constitutionnelles de la moelle osseuse

Phase de lecture: quand la séquence de l'ARN messager est lue par le ribosome elle est lue par groupe de 3 nucléotides (triplets): le code génétique fait correspondre à chaque triplet un acide aminé qui est incorporéepar le ribosome dans la protéine naissante. Si se produit une délétion par exemple (perte d'un nucléotide) la phase de lecture va être décalée et la protéine ne pourra être synthétisée

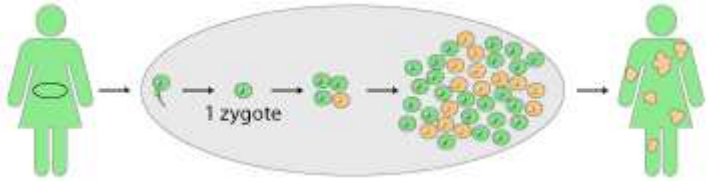
Phénocopie: phénotype faisant évoquer une maladie génétique alors que celle-ci n'est pas présente chez le patient

Phénotype: ensemble des signes cliniques d'une maladie donnée présents chez le patient

Mosaïcisme

Définit chez un individu la coexistence de 2 (ou plus) populations de cellules ayant un génotype différent.

Nombreux exemples:



-Inactivation du chromosome X

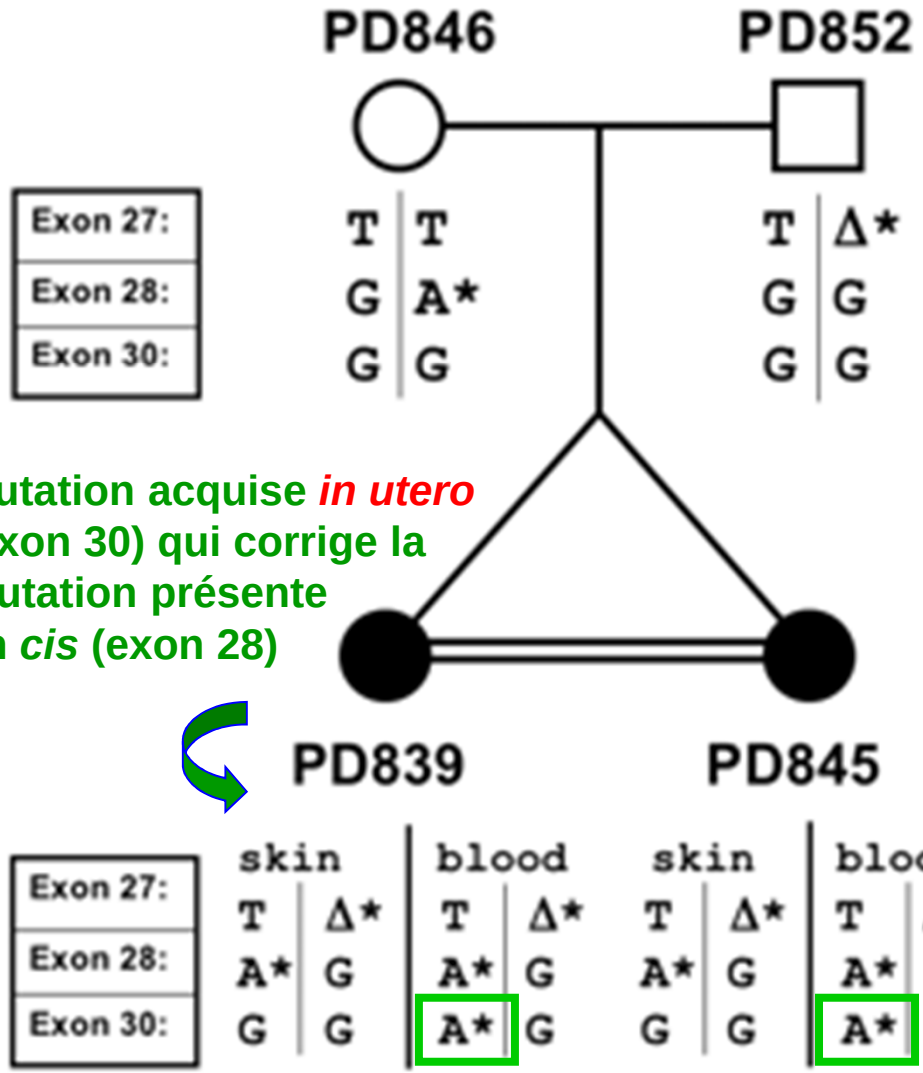
-Premiers stades du développement: ex: trisomie 21 ou syndrome de Turner partiels (phénotype atténué)

-Mosaïcisme germinal: permet la transmission d'une maladie génétique sans que la mutation soit identifiée si analyse faite sur le sang

-Maladies génétiques: sélection clonale d'une mutation acquise donnant un avantage à la cellule (correction phénotypique): très nombreuses maladies dont les IBMFs: Fanconi, Blackfan-Diamond & téloméropathies

Instabilité génétique

Natural gene therapy in monozygotic twins with Fanconi. *Mankad & al, Blood, 2004*

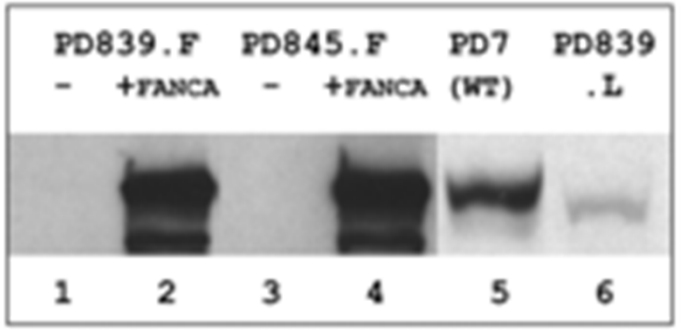


Age lors de l'étude: 28 ans

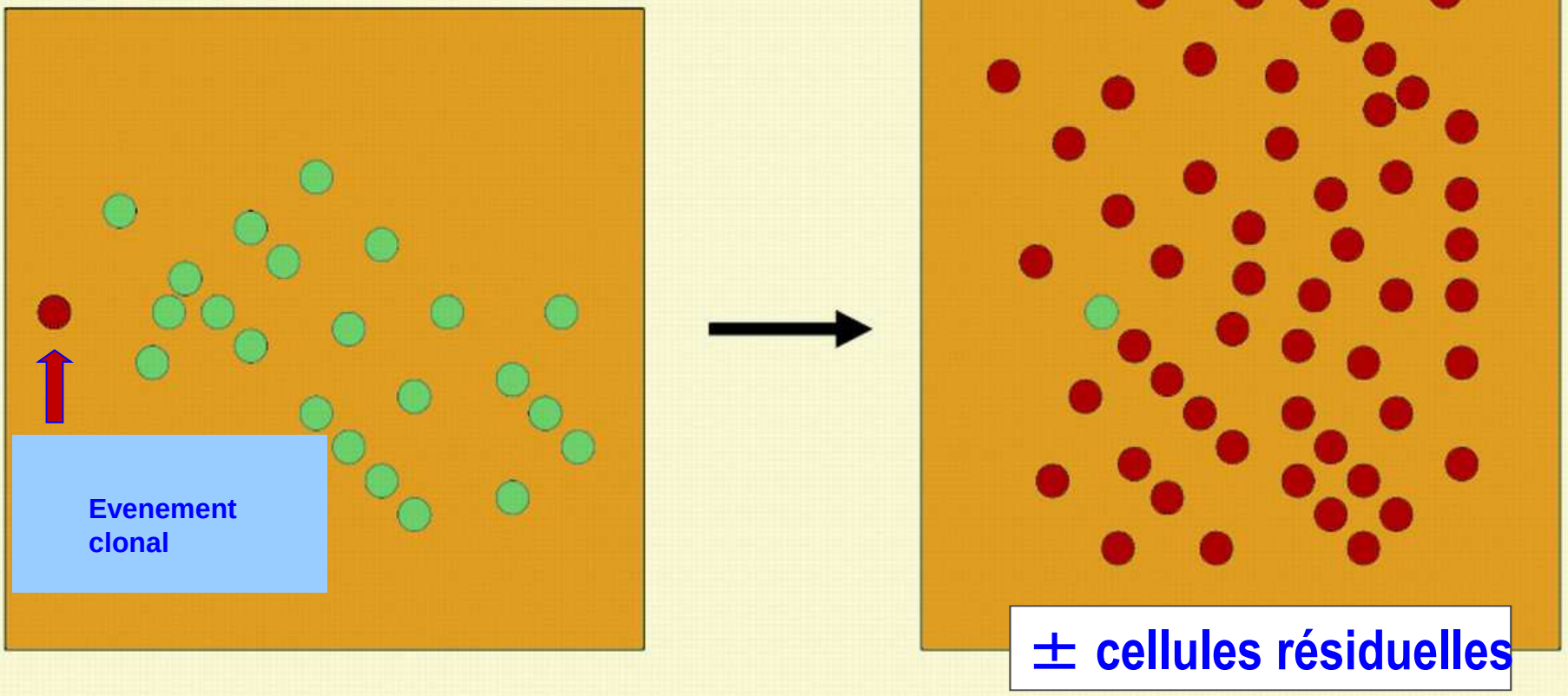
*** mutant allele:**

Exon 27; 2555 ΔT
Exon 28; 2670G>A; R880Q
Exon 30; 2927G>A; E966K

Mutation compensatrice (en cis de la mutation sur l'exon 28)

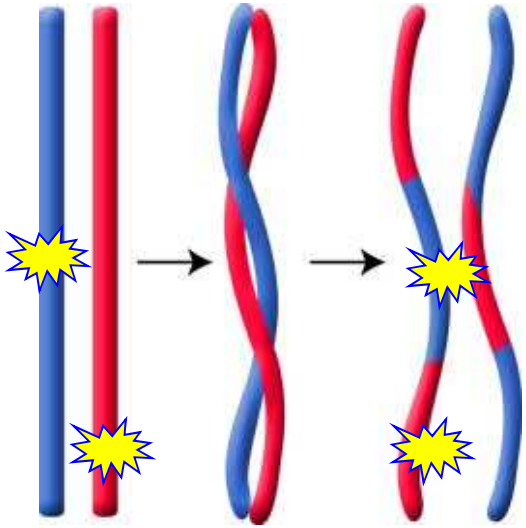


Mise en place d'un mosaïcisme dans l'AF



Mosaïcisme somatique

Gène *FANC*



15 to 20% of patients ?

Different méchanismes:

- crossing over
- correction directe d'un mutation ponctuelle
- nouvelle mutation qui vient corriger en cis l'impact de la mutation pathologique: ex: recadrage de la phase de lecture

Fanconi : mosaïcisme

Lignées cellulaires : 30%

Fréquence clinique : 15 à 25%?

Lignées lymphoïdes & myéloïdes

(pas toujours)

Impact : clinique certain ; pronostic à long terme?

Source +++ de difficultés diagnostiques

Profil des pts AF avec mosaïcisme: quand l'évoquer?

Patient AF diagnostiqué:

-Proportion de cellules sans cassures (10 à 50%)

-Stagnation voire amélioration des NFS

Patients non diagnostiqués:

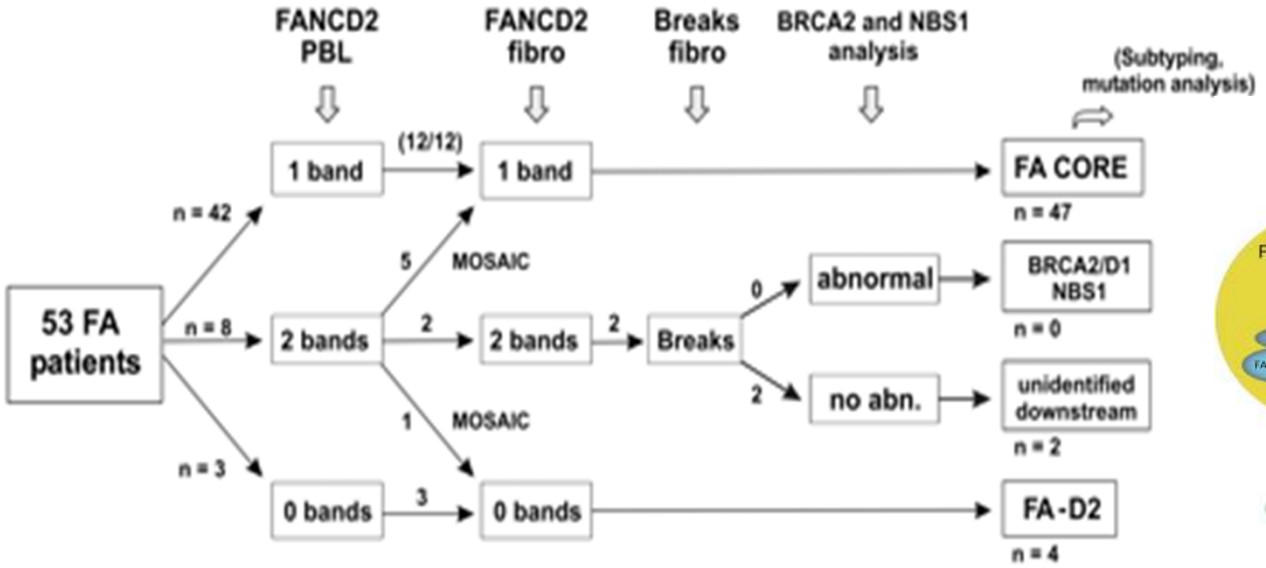
-Phénocopies avec NFS & TDC normaux

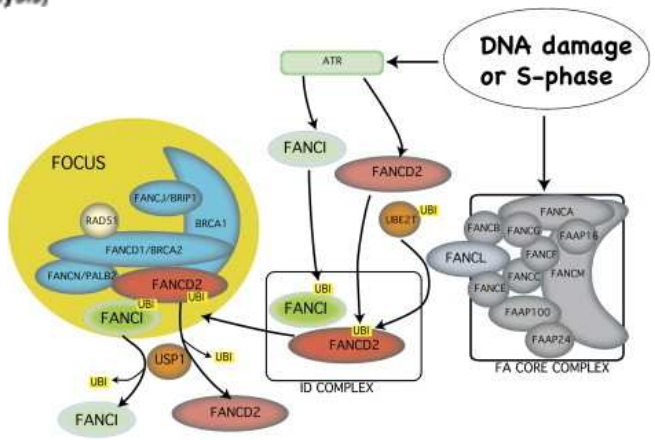
-Tumeur(s) solide(s) «surprenante(s)»

Mosaïcisme: comment le diagnostiquer?

Test de cassures: seulement si mosaïcisme partiel

Référence: comparaison sang & fibroblastes:





Sang : test de cassures & test FancD2
Fibroblastes : test FancD2 & test de viabilité cellulaire post MMC

(Soulier & al, Blood 2005)

Pronostic associé au mosaïcisme?

Bon pour les numérations: meilleurs comptes chez les patients révértants:

Table 3. FA reversion is associated with higher blood cell counts

	Revertant, median (range)	Nonrevertant, median (range)	*P*
WBC, × 10^9/L	5.4 (3.7-7.2)	3.4 (1.4-7.6)	.00017
ANC, × 10^9/L	2.5 (1.2-4.0)	1.1 (0.3-2.8)	.0001
Hb, g/L	131 (98-157)	108 (46-136)	.001
Platelets, × 10^9/L	107.5 (83-350)	51 (10-300)	.001
MCV, fL	96.1 (84-107)	101.1 (82-125)	.2*

For revertant, n = 8; for nonrevertant, n = 45. MCV indicates mean corpuscular volume.

*Nonsignificant.

⇨ **Patients qui vont échapper au risque d'aplasie médullaire**

Risque de leucémie chez les pts révértants?

Pt AF: dc à 9.5 ans *(enquête familiale; sœur AF de 7 ans)*

PHENOTYPE: RSP, pouces bifides, taches café au lait

NFS: GB: 3600 (PNN 1200), Hb 14,9g, plq: 64

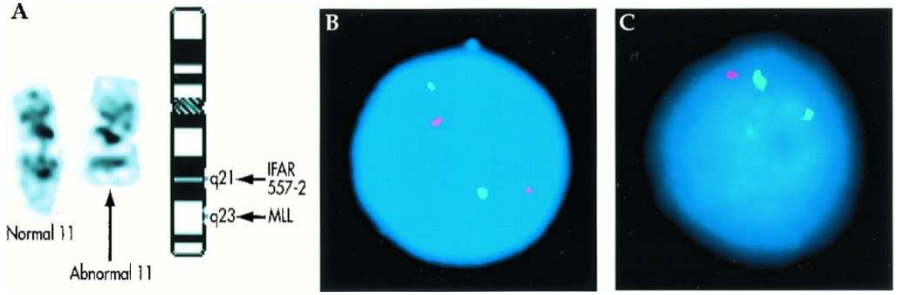
Test de cassures: +F mais présence d'une population de cellules résistantes: mosaïcisme partiel

Hétérozygote composite *FANCA*: insertion 19 pb EXON29 (mère) & grande délétion (père)

☞ suivi hématologique

Pendant 5 ans: 26 à 39% de cellules résistantes

A bout de 5 ans: apparition d'une anomalie clonale: del(11)(q21qter)



☞ l'anomalie clonale est apparue dans une cellule NON révertante

(Gregory JJ & al, PNAS 2001)

Risque de leucémie chez les pts révértants (2)

Donc OUI possible

Mais… risque faible *a priori*

Etude récente du groupe Espagnol: **27 pts** suivis pour la détection d'anomalies chromosomiques dans le sang: **1 seul cas: correspondait à une tumeur solide et pas à une leucémie**

A priori fonction du % de cellules révertantes

Réversion: qui & comment?

Profils de pts:

-Phénotype peu sévère? Ou l'inverse?

-Moins fréquent chez les pts homozygotes? Les pts avec délétion?

Peut on induire (!) une réversion par un traitement favorisant les mutations? Risque mutationnel trop important pour tente ceci…!

Peut on espérer attendre une réversion sous androgènes?

☞ **déjà rapporté**

Problèmes cliniques liés à la réversion

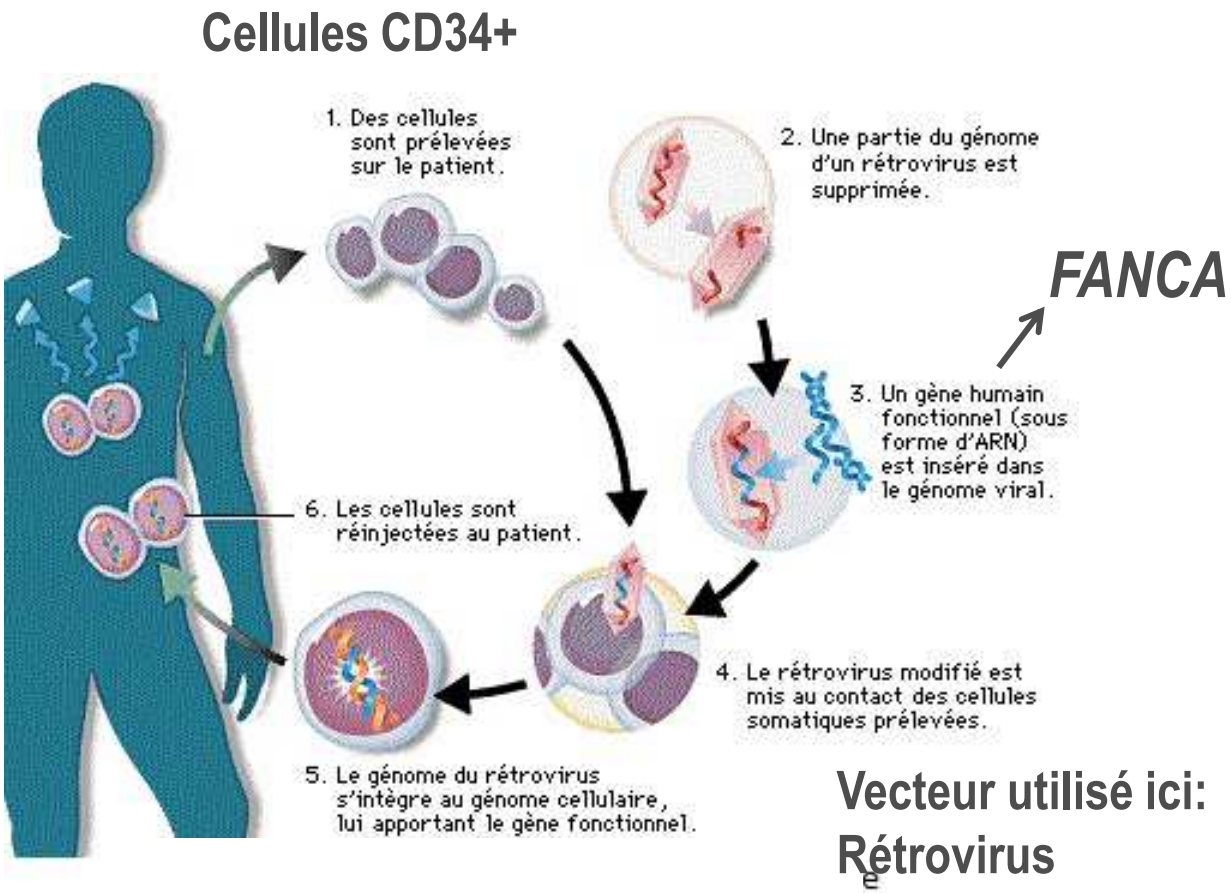
1) Diagnostic de l'AF: risque de **faux négatif**

Problème ++: pts recevant de la chimiothérapie

2) Diagnostic génétique: absence d'une des 2 mutations dans le sang

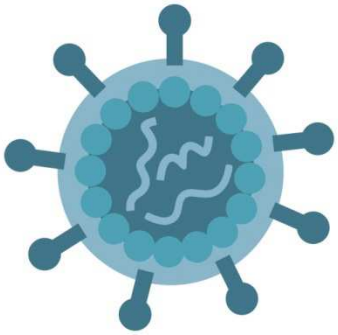
3) Problème en cas de greffe: risque de persistance des cellules révertantes *(si non éliminées par la réaction allogénique)*: sources de leucémie post-greffe?

Thérapie génique: principes



T. Leblanc. AFMF. Octobre 2019

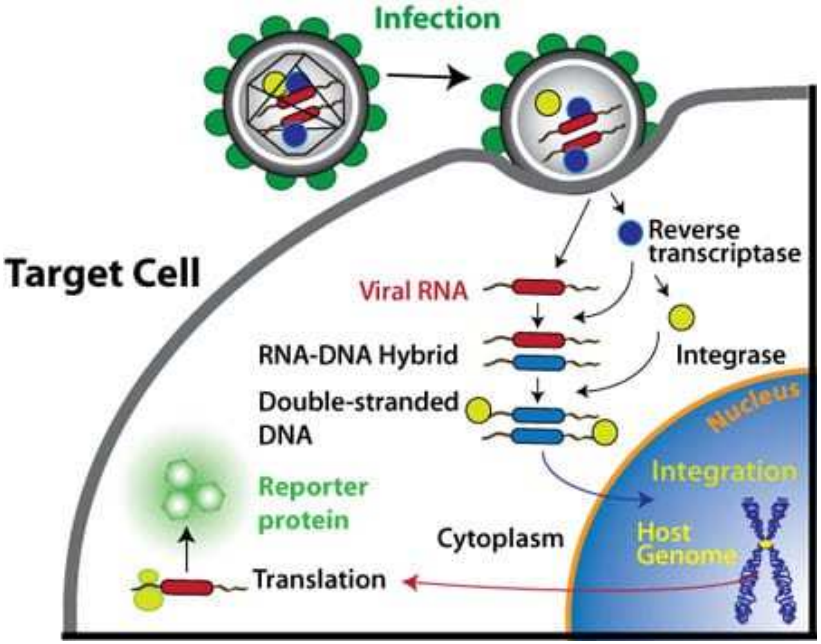
Lentivirus



Virus enveloppés, à ARN (famille des *Retroviridae*)

80 à 100 nm

S'intègrent à l'ADN de la cellule grâce à:
-un reverse transcriptase
-une intégrase



☞ 1ères étapes: pré-cliniques: construire & valider le vecteur

Projet EuroFancolen

3 essais cliniques:

FancoMob : essai de mobilisation

Fancolen-1 : 1er essai clinique de thérapie génique

Fancolen-2 : 2ème essai clinique de thérapie génique

FancoMob: essai de mobilisation

PROTOCOLE DE RECHERCHE BIOMEDICALE
Etude pilote évaluant la faisabilité de la mobilisation sanguine et de la collection des cellules CD34+ après traitement par G-CSF et plérixafor chez des patients atteints d'Anémie de Fanconi en vue d'un traitement ultérieur par thérapie génique

Titre abrégé	Acronyme
Mobilisation de CSH périphériques par G-CSF et plérixafor chez des patients atteints d'Anémie de Fanconi	FancoMob

N° Promoteur	N° EudraCT	N° CPP	N° ANSM
P130103	2014-005264-14	2-15-20FANCOMOB	14609A-11

2 points : 1) essai de mobilisation
: 2) utilisation de FCD hématopoïétiques

Facteurs de croissance hématopoïétiques (1): G-CSF

Récepteur au G-CSF: lignée granuleuse ++

1966: découverte du G-CSF

1986: gène cloné

1987: 1ers essais cliniques

DCI: filgastrim, pegfilgastril, lenogastrim

Large utilisation en clinique:

- Neutropénie post chimiothérapie
- Mobilisation de CSH (autogreffe, allogreffe, donneurs de PNN)
- Neutropénie constitutionnelles

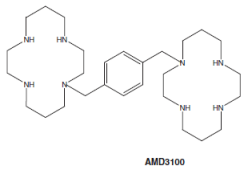
Posologie variable selon indication:

-don de CSH allogéniques: 7,5 à 10 µg/kg/j en 1 à 2 fois pour 4 à 5 jours

-Pts AF: doses de 16 à 32 µg/kg/j déjà utilisées

Associé à un risque augmenté de LAM dans certaines indications: dose cumulée et durée d'exposition

Facteurs de croissance hématopoïétiques (2)
Plerixaflor (AMD3100)



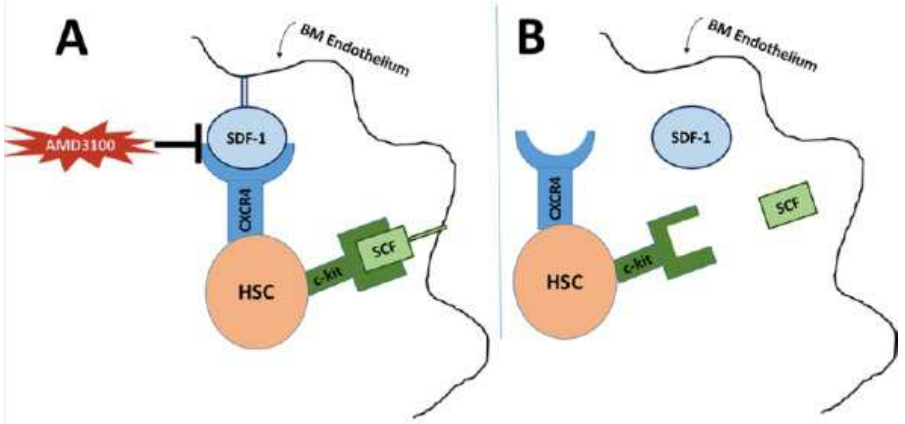
Antagoniste du récepteur (CXCRA) au SDF-1

Molécule beaucoup plus récente:

- **Effet sur la mobilisation CSH: 2005**
- **FDA approval il y a 10 ans**

Utilisation : **mobilisation de CSH en association avec le G-CSF (AMM pour les autogreffes); ou au VIAGRA; ou au CXCR2 agoniste**

: **autres: infection VIH (forme orale), WHIM syndrome, syndrome hépato pulmonaire, cancérologie…**



Posologie: 240 µg/kg/j (max 280)
En règle 1 à 4 doses (AMM)
& jusqu'à 7 doses

FancoMob: essai de mobilisation

Critères d'Inclusion

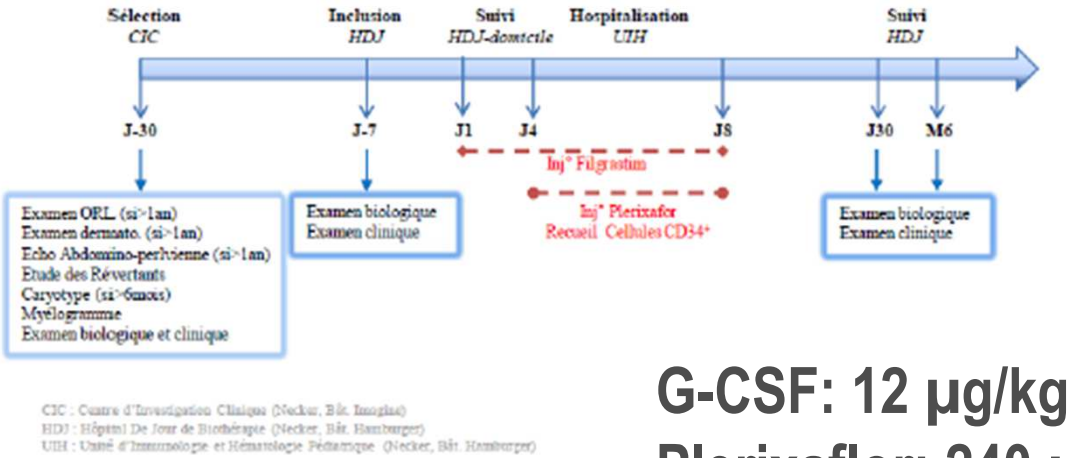
- ✓ Diagnostic d'une **anémie de Fanconi de type Fanc A.**
- ✓ Indication d'une greffe de moelle osseuse allogénique et **absence de fratrie HLA-identique** disponible
- ✓ Enfant **> 4 ans et < 18 ans**
- ✓ Enfant **> 20 kg**
- ✓ Test de grossesse négatif
- ✓ **Suivi > à 2 ans dans un centre spécialisé** (avec une évaluation complète de leur maladie).
- ✓ Affiliation à la sécurité sociale française
- ✓ Consentement éclairé

Objectifs: pré-selectionner 8 pts pour en collecter 5

Minimum en termes de cellules:

- obtenir 10 CD34/µl
- obtenir 5.10^6 CD34/kg (en poids projeté à 5 ans)

(+ 1 parachute de 5.10^6 CD34/kg)



CIC : Centre d'Investigation Clinique (Necker, Bât. Imagine)
HDJ : Hôpital De Jour de Biothérapie (Necker, Bât. Hamburger)
UIH : Unité d'Immunologie et Hématologie Pédiatrique (Necker, Bât. Hamburger)

NB: contraintes…
Dont myélogramme & pose d'un cathéter

G-CSF: 12 µg/kg x 2/j pour 6 à 7 jours
Plerixaflor: 240 µg/kg/j pour 2 à 3 jours

T. Leblanc. AFMF. Octobre 2019

FancoMob. Abstract présenté à l'EBMT 2019

	Pre-CD34 selection			Post-CD34 selection			
	TNC (10^8)	CD34 content (%)	CD34+/kg (10^6)	TNC (10^8)	CD34 content (%)	CD34+ recovery (%)	CD34+/kg (10^6)
FA3 (5 ans) -1st apheresis	167	0.07	0.73	0.16	8.4	11	0.08
FA3-2nd apheresis	203	0.04	0.54	0.31	9.3	35	0.19
FA3-3rd apheresis	163	0.02	0.21	0.09	12.6	38	0.08
FA3-4th apheresis	120	0.03	0.27	0.32	7.4	59	0.16
FA4 (2 ans)	450	0.26	11.7	0.51	20	8.6	1.01
HD (n=4) mean	112 (99-121)	2.68 (1.93-3.8)	NA	1.94 (0.92-2.5)	97 (93-99)	85 (77-100)	NA

☞ 2 patients n'ont pas atteints les seuils pour être prélevés

☞ 2 ont été prélevés mais 1 seul avec succès

T. Leblanc. AFMF. Octobre 2019

Ce qu'on a appris avec FancoMob

Il faut prélever des enfants très jeunes: moins de 4 ans voire moins de 2 ans…

Prélèvements restant limites avec perte supplémentaire après décongélation: le mieux est d'utiliser des cellules fraiches pour la correction

Fancolen-1

LETTERS
https://doi.org/10.1038/s41591-019-0550-z
nature medicine

Successful engraftment of gene-corrected hematopoietic stem cells in non-conditioned patients with Fanconi anemia

(Septembre 2019)

Fancolen-1

Initialement:

- 5 pts prévus (1er report: extension pour 6 autres pts)

- Attente entre collection et traitement: les pts doivent commencer à développer une AM: donc congélation

Réinjection des cellules corrigées SANS conditionnement

Article: données sur les 4 premiers pts traités *(entre janvier 2016 et mars 2017)* : recul de 18 à 30 mois

Patients inclus (1)

Patient ID	Gender	Ethnia	Compl. Group	Mutations	Protein
FA-02002	Male	Gypsy	FA-A	c295C>T	Truncated protein, p.Gln99*
				c295C>T	Truncated protein, p.Gln99*
FA-02004	Male	Caucasic	FA-A	c.1115_1118delTTGG	p.V372AfsX42
				c.1115_1118delTTGG	p.V372AfsX42
FA-02005	Male	Gypsy	FA-A	c295C>T	Truncated protein, p.Gln99*
				c295C>T	Truncated protein, p.Gln99*
FA-02006	Male	Caucasic	FA-A	exon38:c.3788_3790del	p.Phe1263del
				exon29:c.2851C>G	p.Arg951Gly

T. Leblanc. AFMF. Octobre 2019

Patients inclus (2)

Patient ID	Cryopr. $CD34^+$ cells	Screening visit	Age (years)	Hb (g/dL)	Neutroph/ µL	Platelets/ µL	BM $CD34^+$ cells/µL	BM $CD34^+$/ $CD38^-$cells/µL	CFCs/µL	CFCs Surv. to MMC (10 nM)	% aberrant T cells (DEB test)
FA-02002	Yes	HSC Collection	3.4	12.7	2,400	84,000	545.8	13.26	13.87	0.0 %	80%
		HSC Gene therapy	5.2	10.5	1,600	29,000	135.0	12.29	2.81	0.1 %	86%
FA-02004	Yes	HSC Collection	5.9	12.3	1,000	68,000	35.3	1.56	2.70	3.9 %	66%
		HSC Gene therapy	7.6	10.8	900	46,000	25.1	0.99	0.80	0.0 %	80%
FA-02005	No	HSC Collection/ Gene Therapy	4.0	12.5	1,680	38,000	276.1	0.39	5.25	0.0 %	74%
FA-02006	No	HSC Collection/ Gene Therapy	6.6	11.3	760	79,000	34.1	3.15	5.05	0.0 %	64%

Pour être traités: au moins 1 critère d'aplasie débutante: Hb < 8g, PNN < 750 (⇨ 1000) ou plaquettes < 30.000 (⇨ < 50.000)

T. Leblanc. AFMF. Octobre 2019

Nombre de cellules CD34 disponibles & transduites

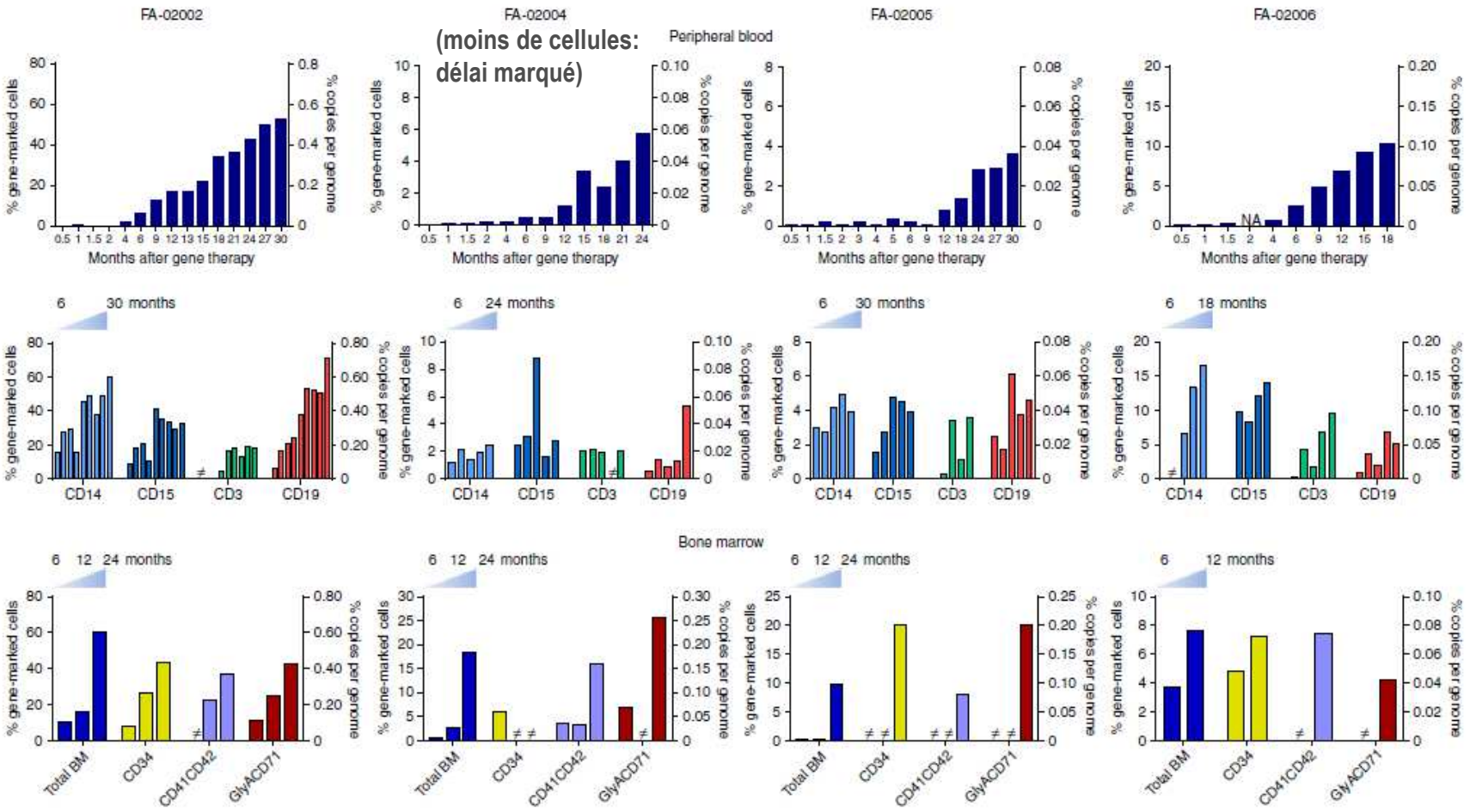
Cellules réinjectées:

PATIENT	$CD34^+$ cells/ kg	% $CD34^+$ cells	CFCs/kg	Mean VCN/cell (Total colonies)	CFCs Survival to MMC (10 nM)	Transduced $CD34^+$cells/kg	Transduced CFCs/kg
FA 02002 (Cryopr)	$0.55x10^6$	90.6%	$3.2x10^4 \pm 6.5x10^3$	$0.45^{\#}$	30.3%	$2.5x10^5$	$1.4x10^4 \pm 2.9x10^3$
FA 02004 (Cryopr)	$0.71x10^6$	57.0%	$3.2x10^4 \pm 3.8x10^3$	$0.24^{\$}$	27.0%	$1.6x10^5$	$7.3x10^3 \pm 8.8x10^2$
FA 02005 (Fresh)	$1.30x10^6$	80.5%	$1.7x10^4 \pm 2.4x10^3$	$0.17^{\#}$	12.1%	$2.2x10^5$	$2.8x10^3 \pm 4.0x10^2$
FA 02006* (Fresh)	$0.77x10^6$	3.5%	$3.1x10^5 \pm 2.2x10^4$	$0.53^{\#}$	49.2%	$4.1x10^5$	$1.6\ x10^5 \pm 1.2x10^4$

Dose minimale (greffe)
☞ 2.106 CD34/KG

T. Leblanc. AFMF. Octobre 2019

Progressive engraftement



T. Leblanc. AFMF. Octobre 2019

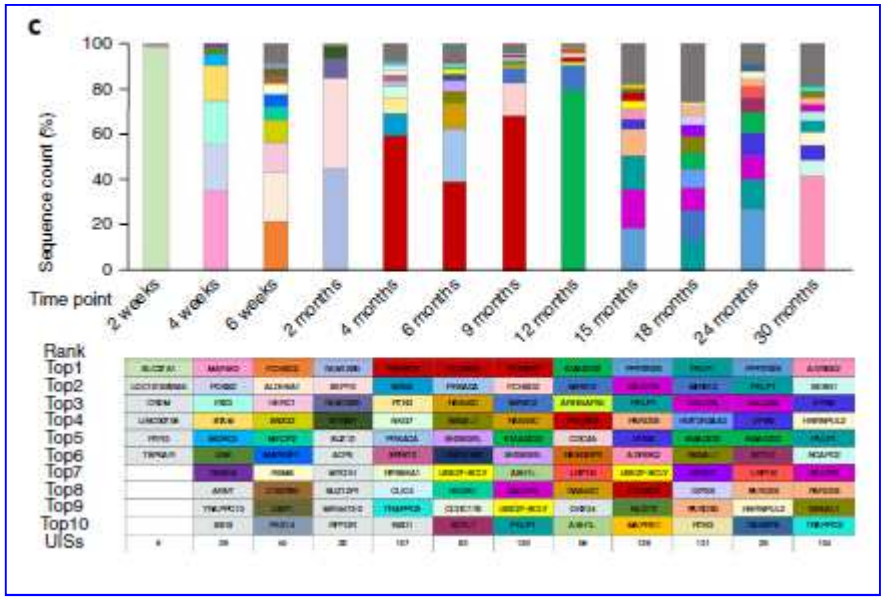
Sites d'intégration

Pas de site d'intégration préférentiel

(en particulier pour des oncogènes: comme *LMO2, CCND2, MECOM*)

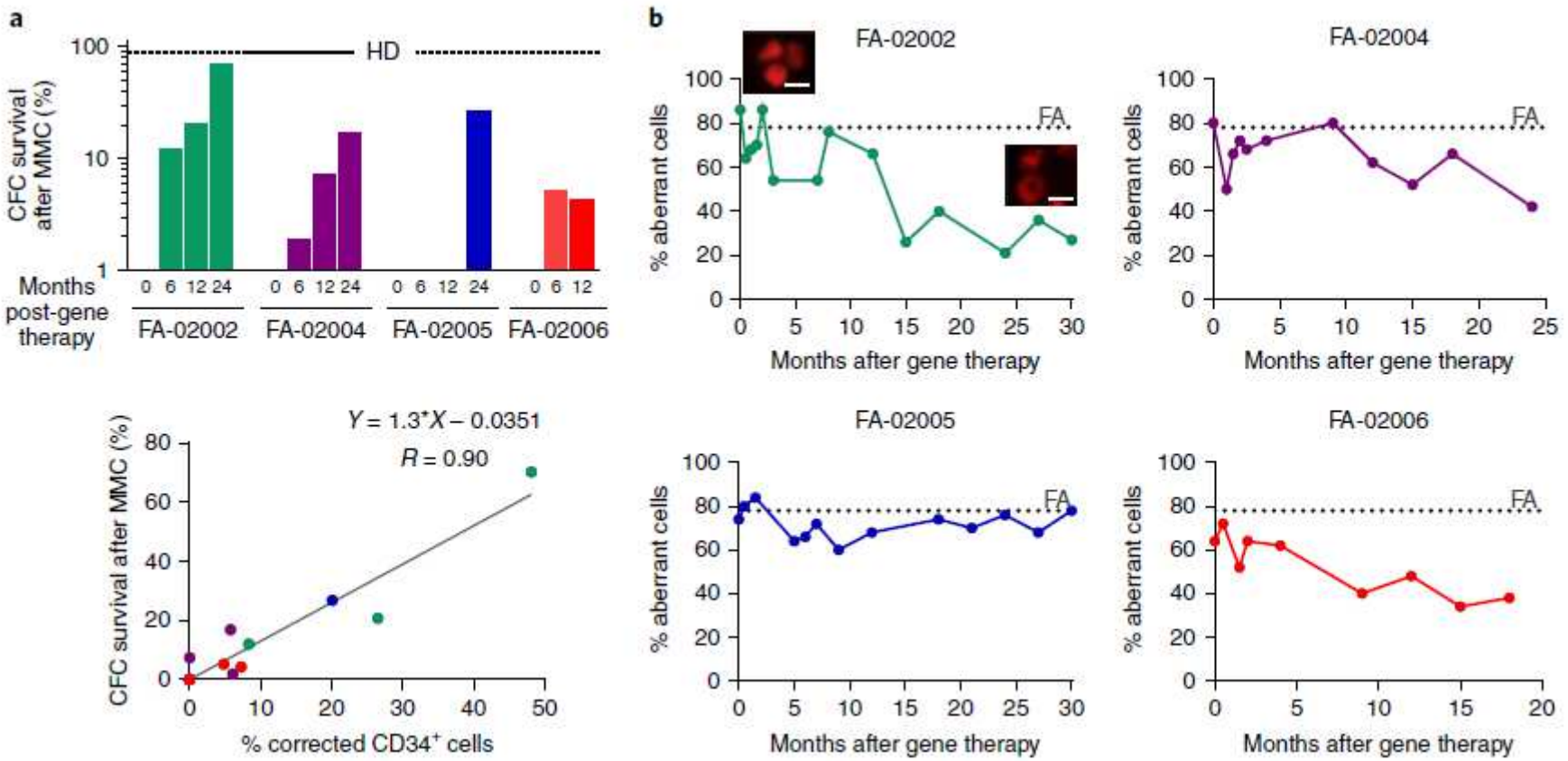
Profil oligoclonal s'enrichissant progressivement sans dominance clonale

NB: parfois site d'intégration restreint à une seule lignée…



T. Leblanc. AFMF. Octobre 2019

Correction phénotypique (*in vitro*)



Taux de cellules résistantes à la MMC et taux de cellules anormales dans le sang périphérique

Correction phénotypique *in vivo*: NFS

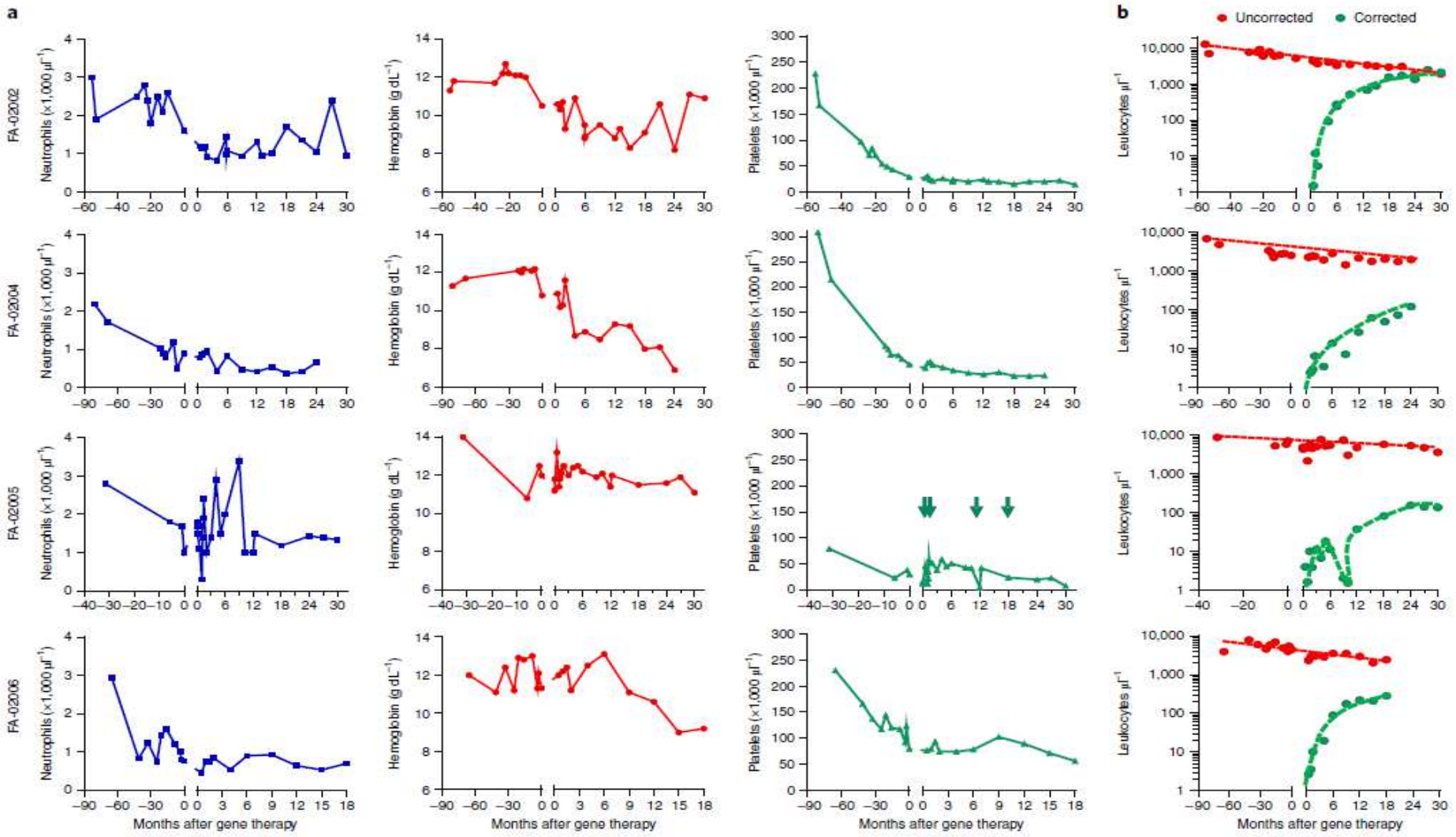


Fig. 4 | PB cell counts in patients with FA before and after gene therapy. a, Evolution of neutrophils (left; blue), hemoglobin levels (middle; red) and platelets (right; green) in PB of patients with FA before and after gene therapy. Green arrows indicate the administration of prophylactic platelet transfusions. **b**, Kinetics of uncorrected (red) and corrected leukocytes (green) in the PB of patients with FA before and after gene therapy.

Effets secondaires

Pas d'effet secondaire notable

Surveillance hématologique de la moelle osseuse (caryotype, FISH, NGS dont *RUNX1*): RAS

Fancolen-1: conclusion

Résultats encore préliminaires

La prise des cellules corrigées prend du temps: au mieux, à ce stade du suivi, on a corrigé la tendance à l'aggravation…

Pas d'ES notable

Expérience acquise devrait permettre d'améliorer les résultats.
Importance majeure du N de cellules corrigées réinjectées.
Pour faire mieux:

-Prélever tôt (+++ pour les familles multiplex)

-Ne pas congeler

-Améliorer certains aspects techniques

FANCOLEN-II

2ème essai clinique: ouvert en EU (Espagne, UK) et aux USA

Doit servir à l'enregistrement du vecteur comme un médicament pour obtention d'une AMM

20 patients prévus:

-10 en EU: 5 pour l'Espagne, 5 pour l'UK

-10 aux USA

FANCOLEN-II

Par rapport à Fancolen-I:

-tout est fait à Madrid (ou à Londres & USA)

-A priori on essayera de corriger les cellules fraiches (pas d'étape de congélation)

-Même mobilisation (G-CSF & perixaflor)

FANCOLEN-II

Au total:

- Contraintes d'un essai clinique

- Peu (plus?) de places

- Essai d'enregistrement: objectif: obtenir une AMM et commercialiser (2022 ou 2023?)

- Prochains gènes prévus: *FANCC* & *FANCD2*

Thérapie génique de l'AF (1)

EN FAVEUR	CONTRE
Bonne évolution hématologique des patients révértants Absence de conditionnement +++: - Risque toxique limité - Ne compromet pas l'avenir - Pas d'augmentation de risque de tumeurs solides *(pas de conditionnement, pas de GVHc)*	Approche expérimentale Quid du risque d'évolution leucémique?

Thérapie génique de l'AF (2)

Limitations:

- pts *FANCA* uniquement

(mais *FANCG* & *FANCD2* prévus rapidement)

- Patients doivent être diagnostiqués tôt

Thérapie génique de l'AF (3)

<u>Bons candidats actuels:</u>

Petits enfants diagnostiqués tôt & mutés *FANCA*

Absence de donneur adéquat

Adhésion des parents pour une approche expérimentale avec les contraintes d'un essai clinique

Conclusion

Mosaïcisme somatique: a priori: évènement chanceux pour les pts mais nécessité de suivi long terme & d'études cliniques

Thérapie génique:

-Enthousiasme raisonnable devant ce 1er essai clinique (enfin!) et l'approche choisie

-Résultats encore préliminaires pour une thérapie qui va demander 5 voire 10 ans pour être évaluée…

-Commercialisation attendue dans les 5 ans si TVB

Remerciements

Centre de Référence Maladies Rares: équipe de France!

Regis Peffault de la Tour, Flore Sicre de Fontbrune, Jean-Hugues Dalle, Thierry Leblanc

Laboratoire d'hématologie. Hôpital Saint-Louis, Paris

Jean Soulier, Anna Raimbault, Wendy Cuccuini

Merci pour votre attention