

# Le phénotype atténué, un criblage thérapeutique naturel compensant la défaillance de la moelle osseuse dans l'anémie de Fanconi

Dr Lise LARCHER  
AHU

Laboratoire d'Hématologie et Laboratoire des Aplasies médullaires, Hôpital St-Louis, Paris  
Equipe Génome et Cancer (Pr J.Soulier), Institut de Recherche St-Louis, INSERM U944

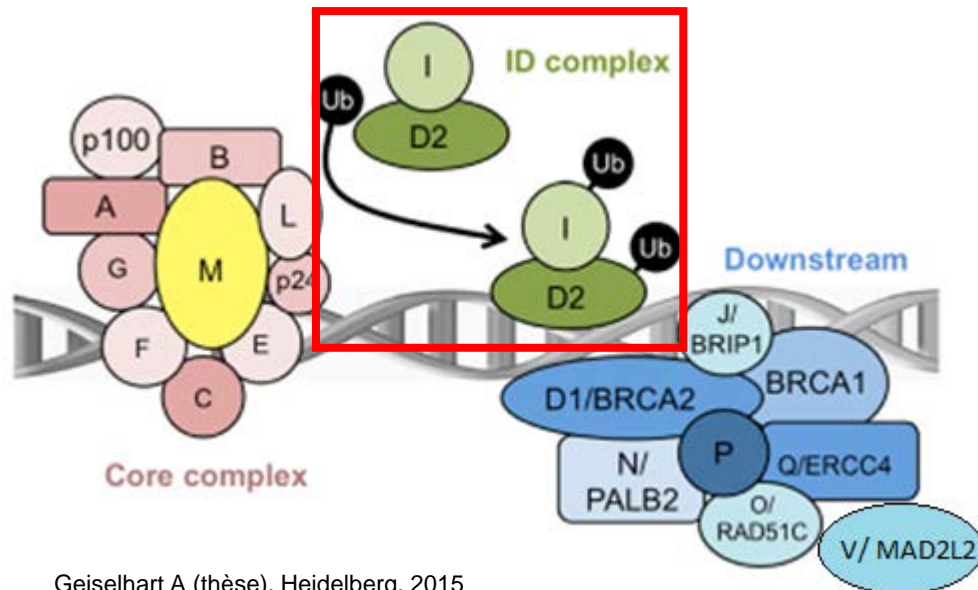
22 Octobre 2021 Journée des familles de l'AFMF

# Maladie de Fanconi

- Maladie rare génétique **récessive**
- Triade clinique avec une variabilité inter-individuelle
  - **Syndrome poly-malformatif**
  - **Signes hématologiques**
  - **Prédisposition aux cancers solides**
- **23** gènes *FANC* impliqués dans la voie : **FA/BRCA** de réparation des ponts interbrins de l'ADN

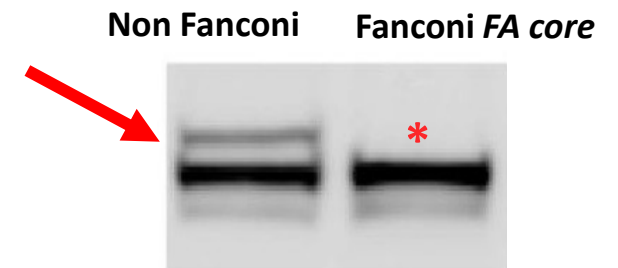


Après exposition à MMC



Geiselhart A (thèse), Heidelberg, 2015

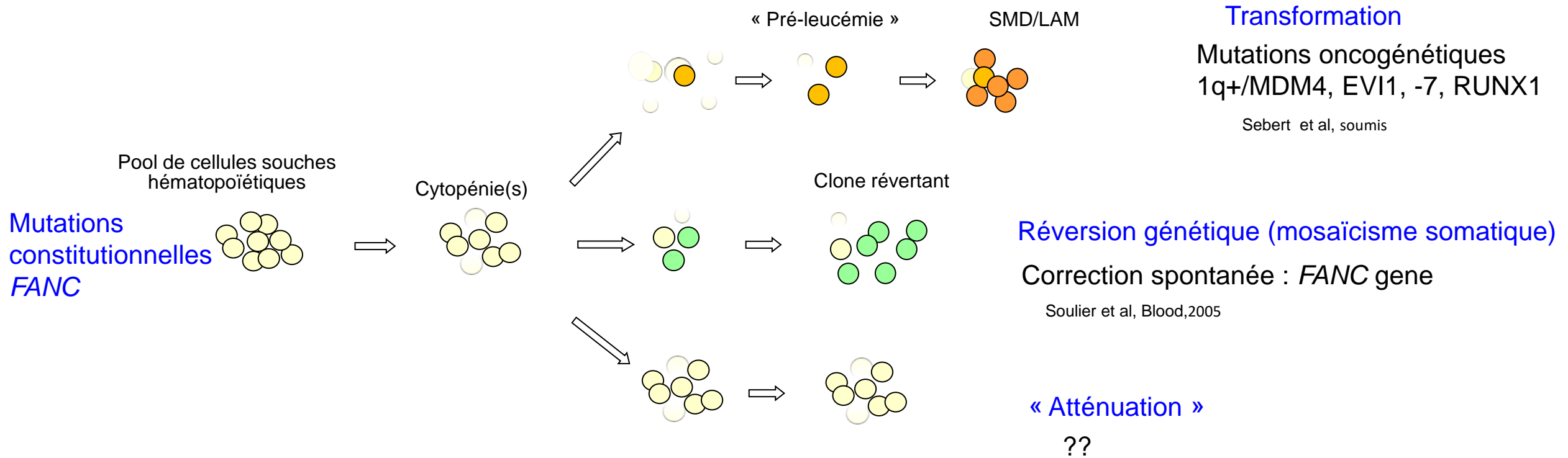
**Mono-ubiquitination**  
(activatrice)  
de **FANCD2**



**Western blot  
de FANCD2**

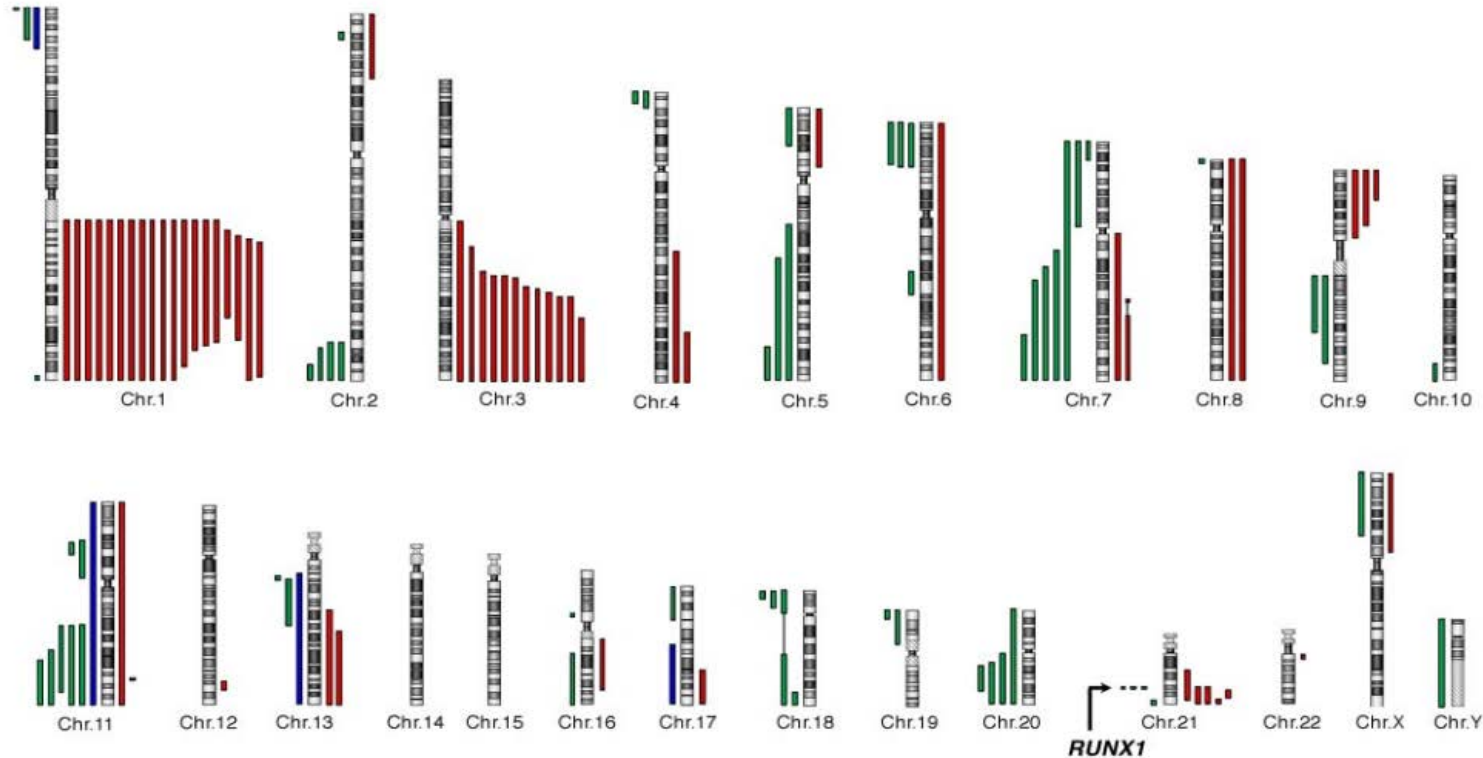
D'après Ceccaldi et al.,  
Cell Stem Cell, 2011

# Histoire naturelle hématopoïétique des patients Fanconi



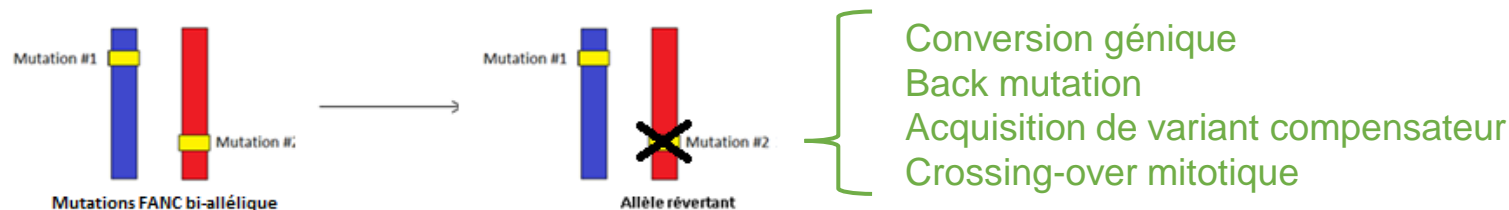
# Transformation maligne en Syndrome myélodysplasique (SMD) ou Leucémie aiguë myéloïde (LAM)

- Risque de développer une LAM supérieur à celui de la population générale (Rosenberg et al, 2003)
- Age médian de survenue : à l'adolescence ou au stade de jeune adulte
- Séquence oncogénique : accumulation de mutations spécifiques, en particulier gain et pertes de fragments chromosomiques

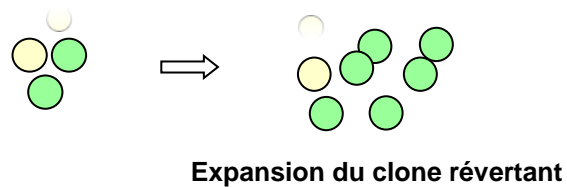


# 1- La réversion hématopoïétique, un modèle naturel de thérapie génique

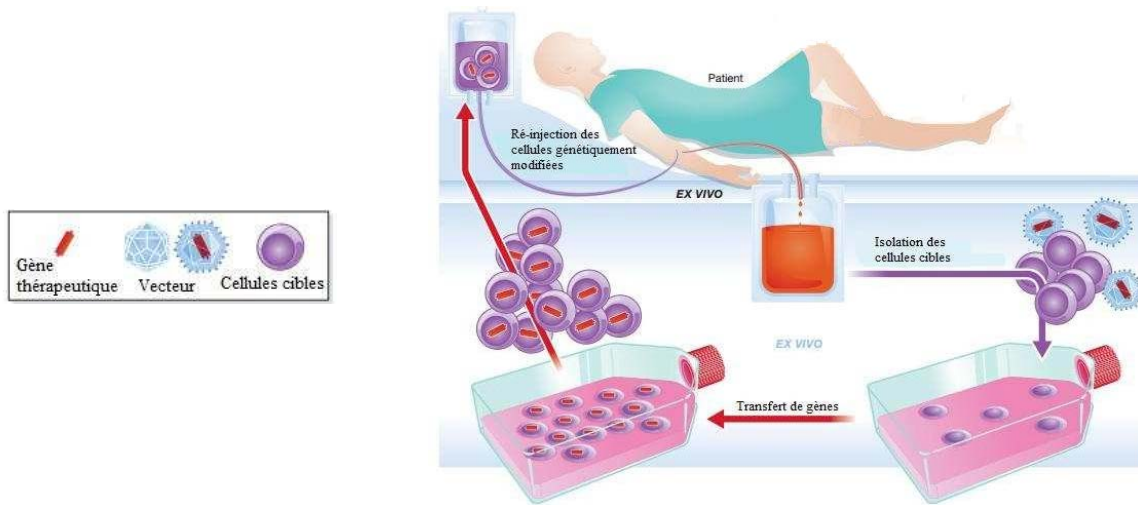
- **Correction génétique spontanée**



- **Rétablissement d'un allèle fonctionnel du gène *FANCD1* muté -> Reconstitution de l'hématopoïèse**



- **« Situation naturelle de thérapie génique »**

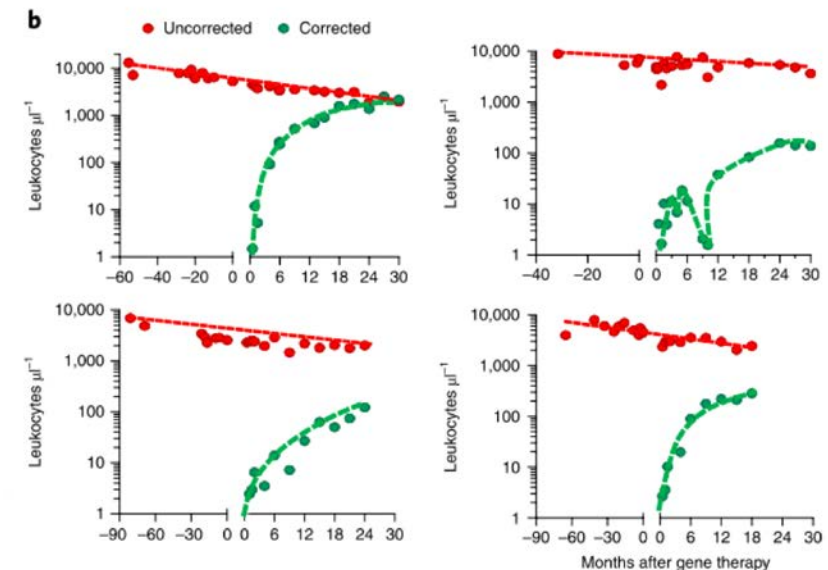


# La thérapie génique dans la maladie de Fanconi

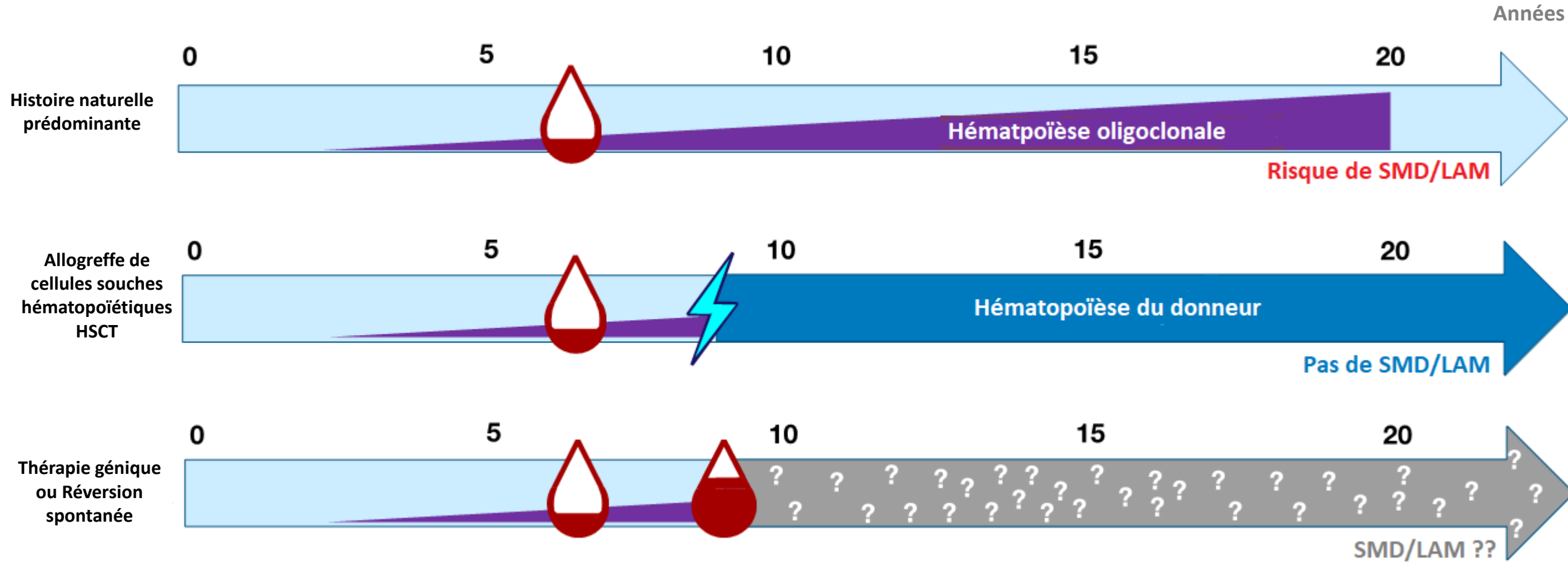
- L'H SCT est actuellement l'unique traitement curatif du tableau hématologique (aplasie et transformation)
- Essais récents encourageants de thérapie de génique dans la maladie de Fanconi

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

Paula Río<sup>1,2,3</sup>, Susana Navarro<sup>1,2,3</sup>, Wei Wang<sup>4,5</sup>, Rebeca Sánchez-Domínguez<sup>1,2,3</sup>, Roser M. Pujol<sup>2,6,7,8</sup>, José C. Segovia<sup>1,2,3</sup>, Massimo Bogliolo<sup>2,6,7,8</sup>, Eva Merino<sup>2,9</sup>, Ning Wu<sup>4</sup>, Rocío Salgado<sup>10</sup>, María L. Lamana<sup>1,2,3</sup>, Rosa M. Yañez<sup>1,2,3</sup>, José A. Casado<sup>1,2,3</sup>, Yari Giménez<sup>1,2,3</sup>, Francisco J. Román-Rodríguez<sup>1,2,3</sup>, Lara Álvarez<sup>1,2,3</sup>, Omaira Alberquilla<sup>1,2,3</sup>, Anna Raimbault<sup>11,12</sup>, Guillermo Guenechea<sup>1,2,3</sup>, M. Luz Lozano<sup>1,2,3</sup>, Laura Cerrato<sup>1,2,3</sup>, Miriam Hernando<sup>1,2,3</sup>, Eva Gálvez<sup>2,9</sup>, Raquel Hladun<sup>13,14</sup>, Irina Giralt<sup>14</sup>, Jordi Barquinero<sup>14</sup>, Anne Galy<sup>15</sup>, Nagore García de Andoín<sup>16</sup>, Ricardo López<sup>17</sup>, Albert Catalá<sup>2,18</sup>, Jonathan D. Schwartz<sup>19</sup>, Jordi Surrallés<sup>2,6,7,8</sup>, Jean Soulier<sup>11,12</sup>, Manfred Schmidt<sup>4,5</sup>, Cristina Díaz de Heredia<sup>13,14</sup>, Julián Sevilla<sup>1b,2,9</sup> and Juan A. Bueren<sup>1b,1,2,3\*</sup>



# Questionnements autour de la thérapie génique



Les patients Fanconi ont un risque intrinsèque de développer une leucémie

- Qu'en est il chez les patients porteurs de cellules génétiquement corrigées par thérapie génique ?



# Objectifs de l'étude de la réversion

## ➤1) Etude de la réversion dans une grande cohorte de patients Fanconi

**Centre National de Référence** « Aplasies médullaires constitutionnelles »

Hôpitaux Saint-Louis et Robert Debré, Laboratoire de référence « Aplasies médullaires » APHP et  
Equipe INSERM U944 Saint-Louis



Plus de **390 patients Fanconi** prouvés et suivis longitudinalement au cours des 20 dernières années

## ➤2) Création en cours d'un modèle murin de compétition cellulaire entre clones hématopoïétiques FA corrigés, non corrigés et pré-leucémiques

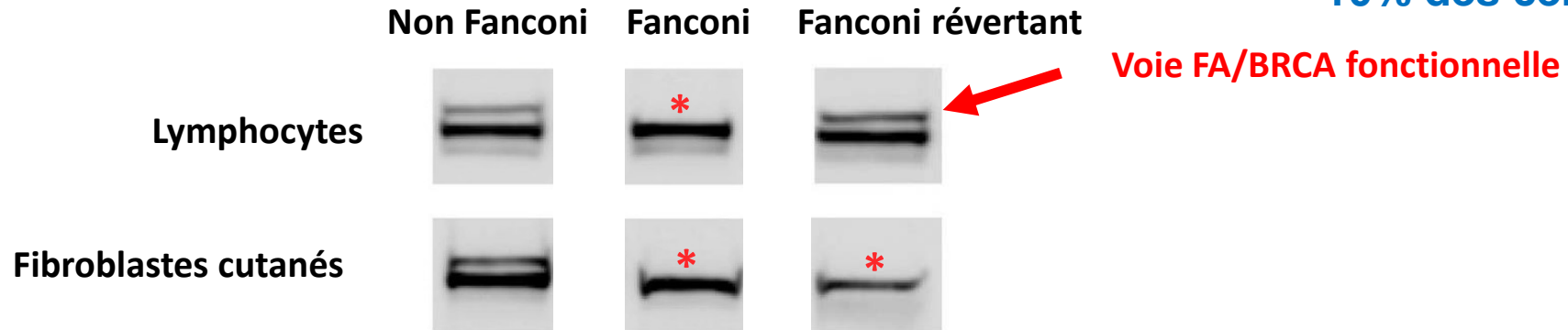


**Evaluer le risque résiduel de transformation leucémique chez les patients Fanconi traités par thérapie génique**



# 17 patients Fanconi révertants

- Réversion fonctionnelle définie sur le **Western blot de FANCD2 des lymphocytes (sensibilité 10% des cellules)**

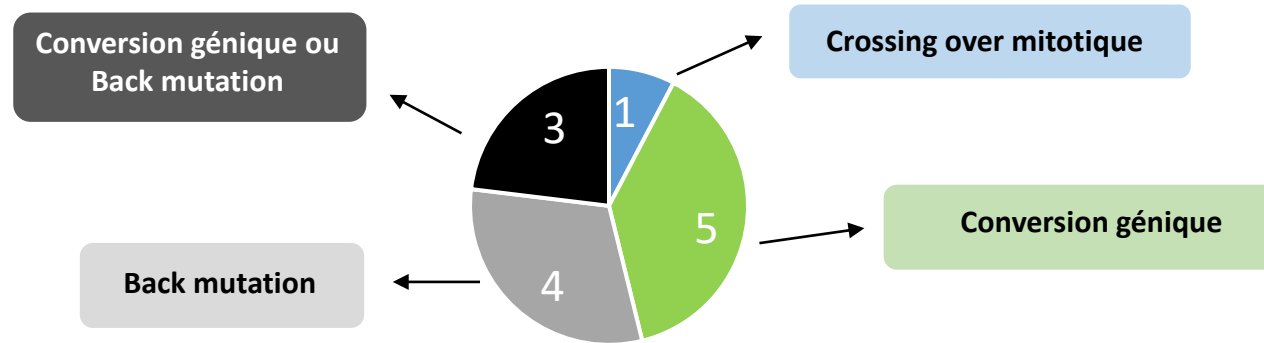


- Etude de la réversion génétique pour 13 patients du groupe *FANCA* en séquençant par capture NGS  
**Séquençage d'échantillons appariés : somatique (sang) et constitutionnel (fibroblastes cutanés)**

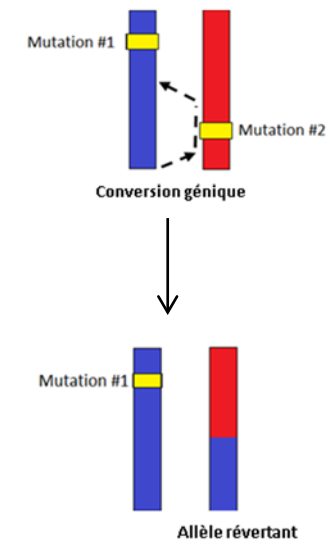
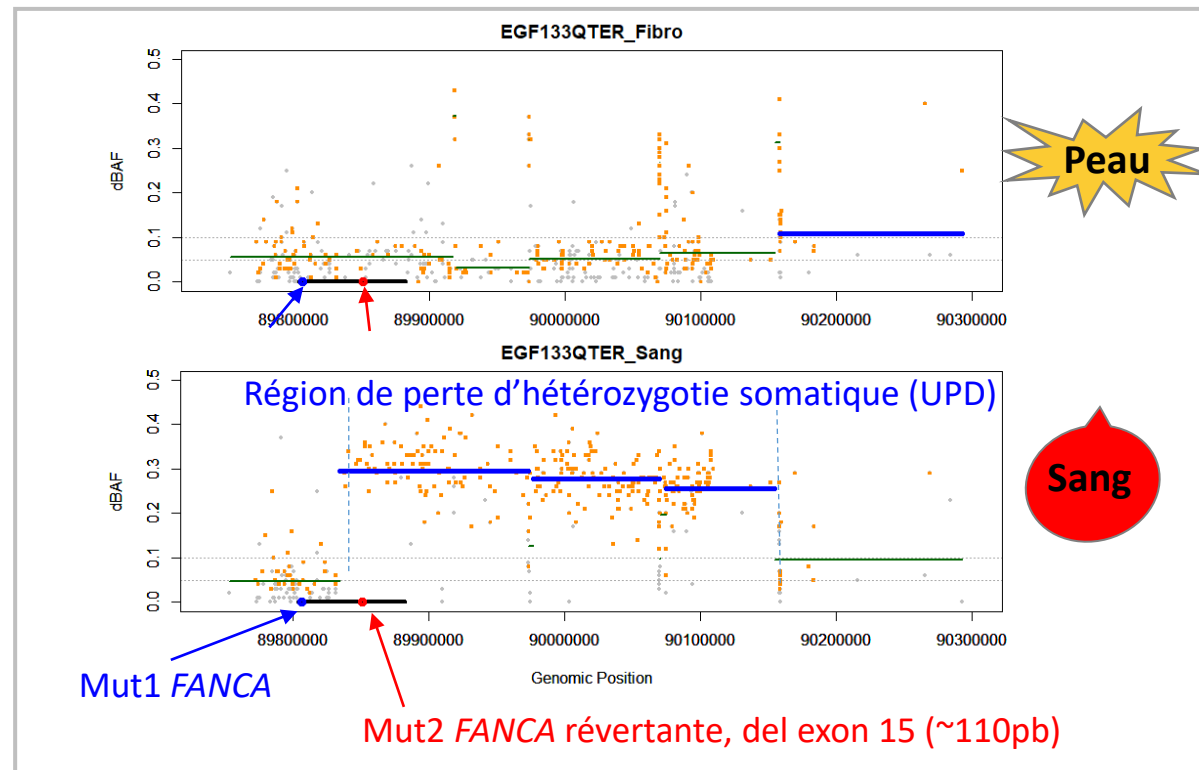


# Confirmation et précision de la réversion génétique

Mécanismes de réversion génétique pour 13 patients FANCA



Région 16qter

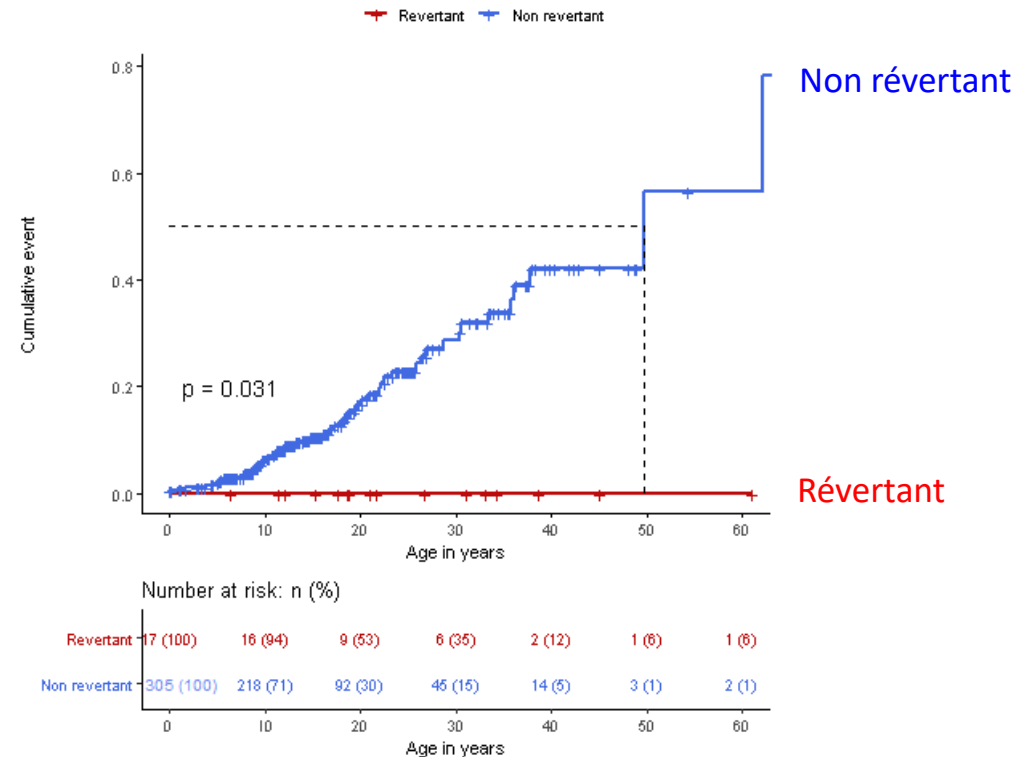


Données non publiées

# Impact de la réversion sur l'évolution clinique

- Aucun des 17 patients Fanconi révertants n'a développé de leucémie à un âge médian de 23.6 ans, ni présenté d'évolution clonale

## Incidence cumulée d'un excès de blastes médullaires



Age médian au dernier suivi :  
Révertants : 23,6 ans [7,3 – 62,8]  
Non révertants : 14,8 ans [0,06 – 64]

# Modèle murin Fanconi

- C57BL/6 *Fancg*<sup>-/-</sup> modèle souris

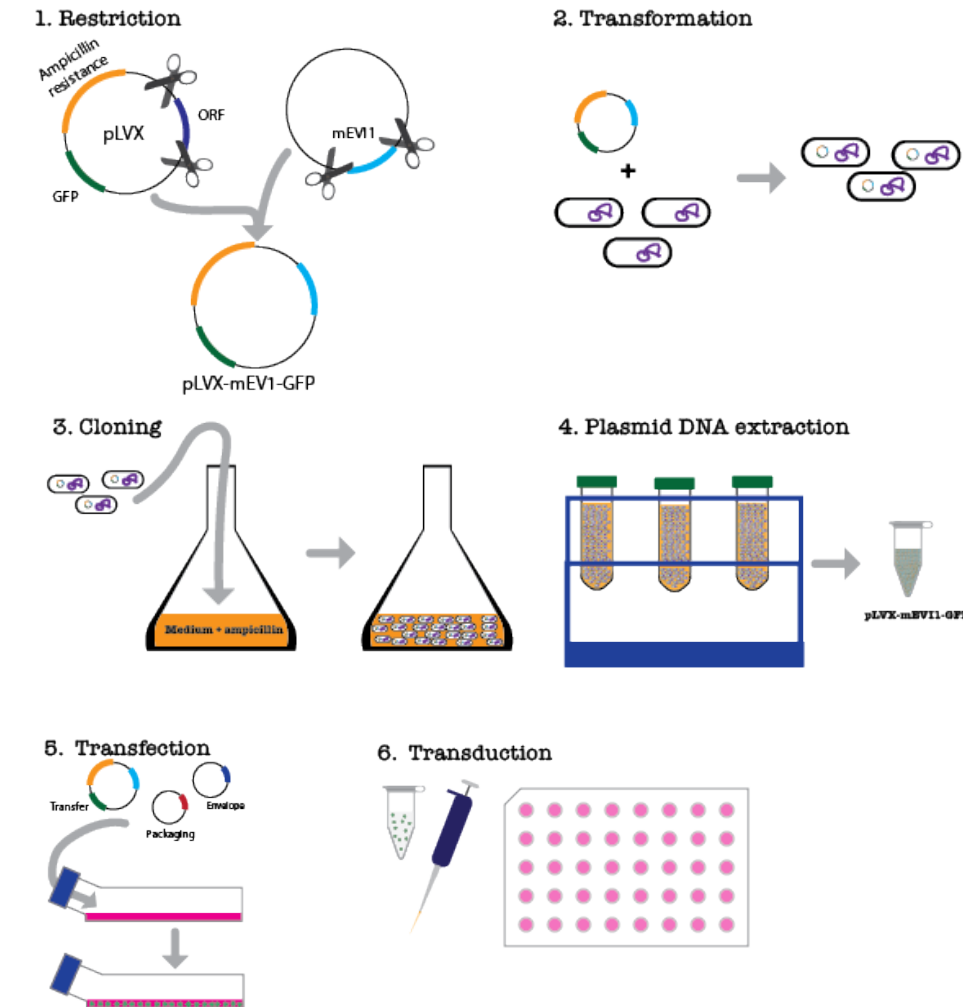


Derived from Koomen et al., Hum Mol Gen 2002  
Domenech et al., Stem Cell 2019

- Modification génétique des cellules hématopoïétiques afin de mettre en place une compétition cellulaire

Préparation des plasmides, production lentivirale, transduction des cellules

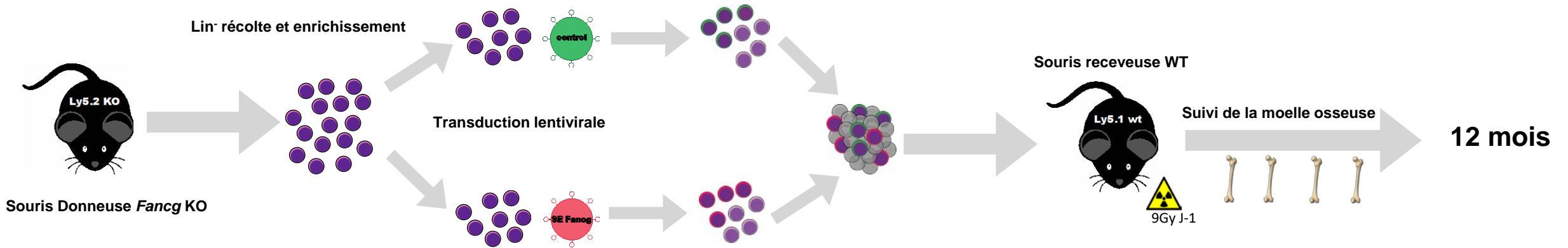
Pedro De Lima Prata, MD, PhD student



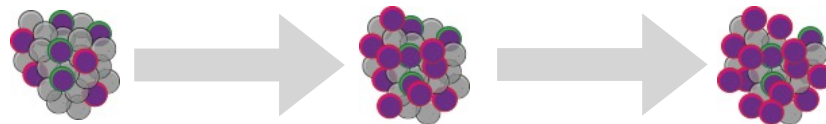
# Expérience 1: cellules génétiquement-corrigées versus non corrigées

**Lenti hEF1a mFancg P2A t-RFP IRES**

**Lenti hEF1a empty P2A eGFP IRES**



**Attendu :**

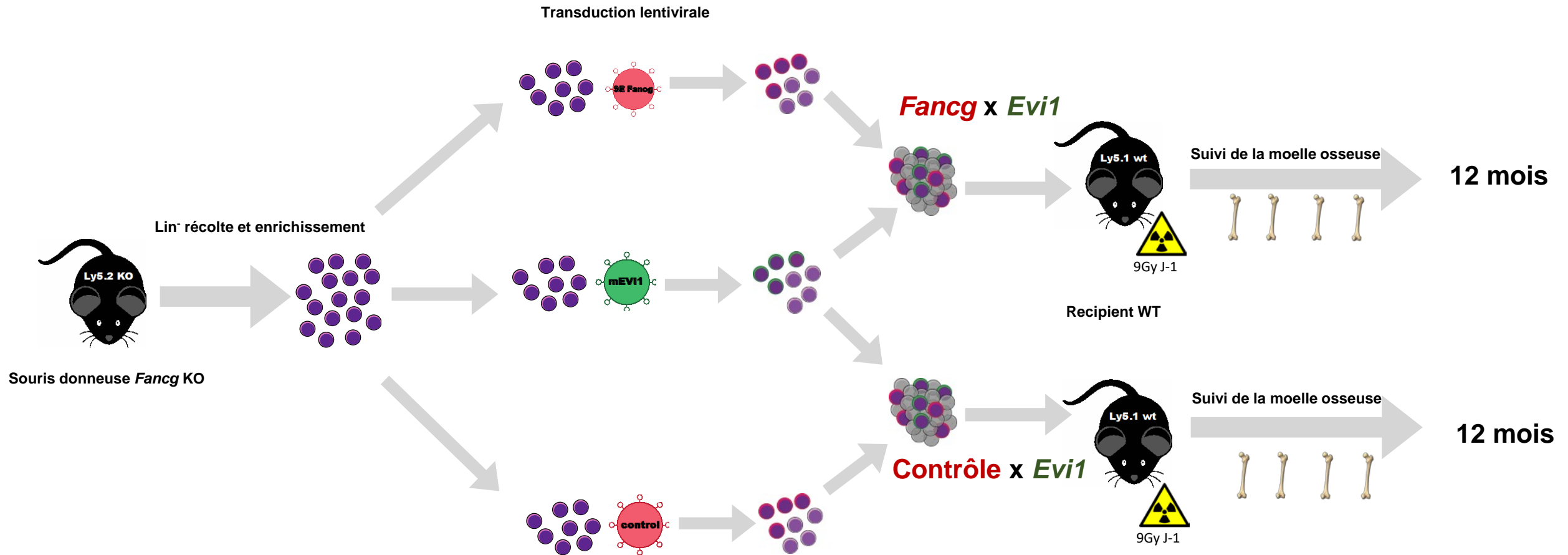


# Expérience 2: cellules génétiquement corrigées vs pré-leucémiques *mEvi1*<sup>1</sup>

Lenti hEF1a mFancg PZA t-RFP IRES

pLVX EF1a mEvi1-IRES ZsGreen

Lenti hEF1a empty PZA t-RFP IRES



1. Lux S et al, ESH meeting on BMF, 2020  
100% penetrant AML

# Conclusions et perspectives sur reversion

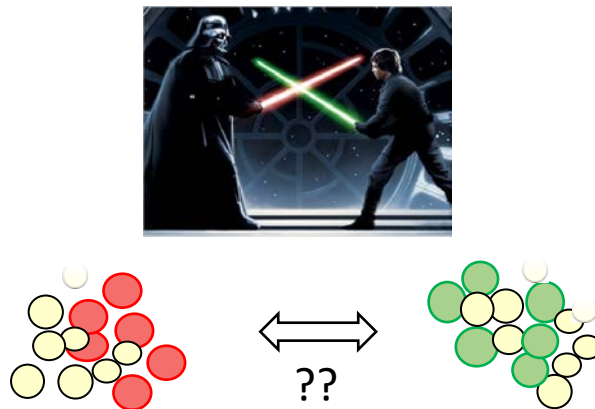
- Mise en évidence de la réversion génétique chez les patients Fanconi révertants
- Meilleur devenir clinique des patients Fanconi révertants

Encourage la thérapie génique

- Poursuite des expériences murines :

Valider l'avantage compétitif des cellules FA génétiquement corrigées sur les pré-leucémiques

Identifier une signature moléculaire du dialogue inter-clones dans ce contexte compétitif

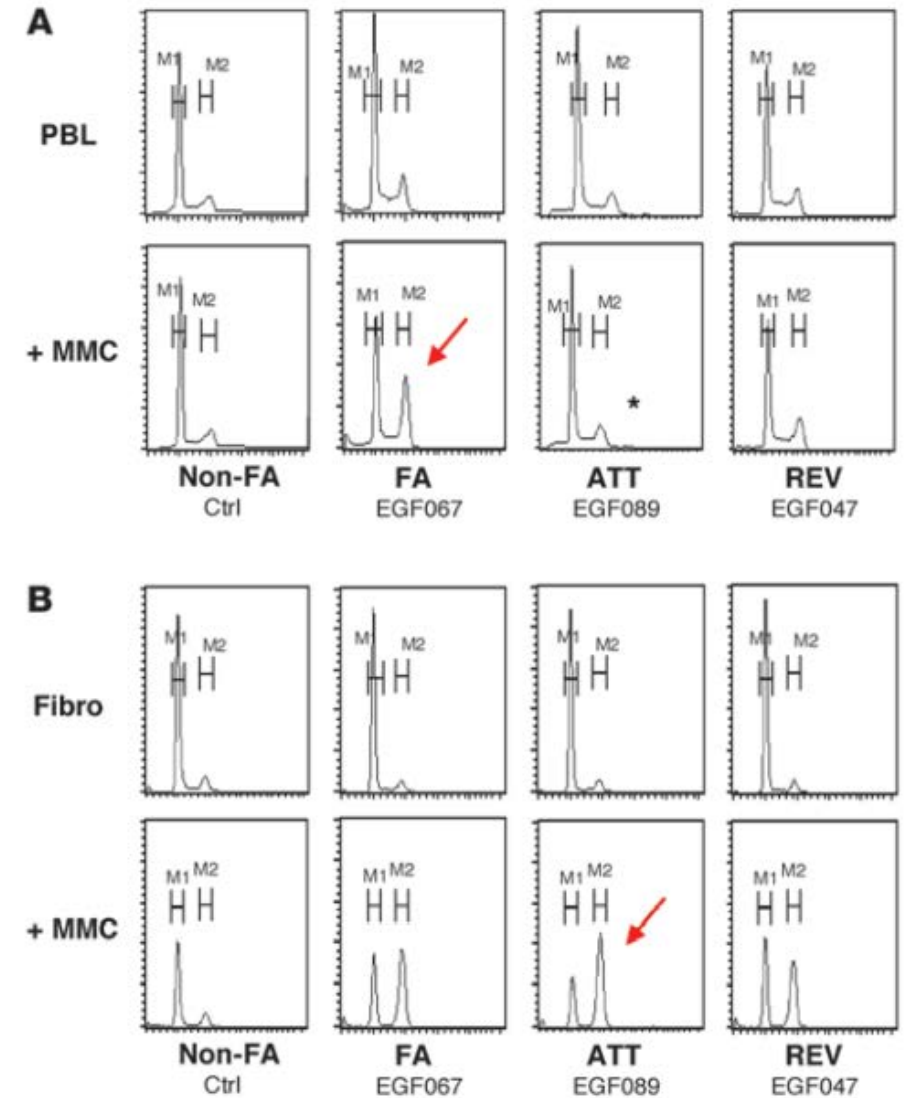




## 2- Phénotype hématologique atténué

- Phénotype hématologique moins grave :
  - Numération sanguine proche de la normale
  - Rares évolutions en SMD/LAM
  - Pas de réversion
- Modification du cycle cellulaire acquise dans les cellules sanguines

Ceccaldi et al, JCI 2011



# Objectifs de l'étude de l'atténuation

- 1) COMPRENDRE les mécanismes d'évolution clonale menant au phénotype hématologique atténué
- 2) MODÉLISER l'avantage des cellules « atténuées » *in vitro* et dans un modèle murin *in vivo*



**Identifier des thérapies innovantes contre la défaillance de la moelle osseuse**



# Matériels et méthodes

## ➤ Prélèvements de patients « atténués »

**Centre National de Référence** « Aplasies médullaires constitutionnelles »

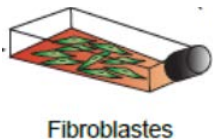
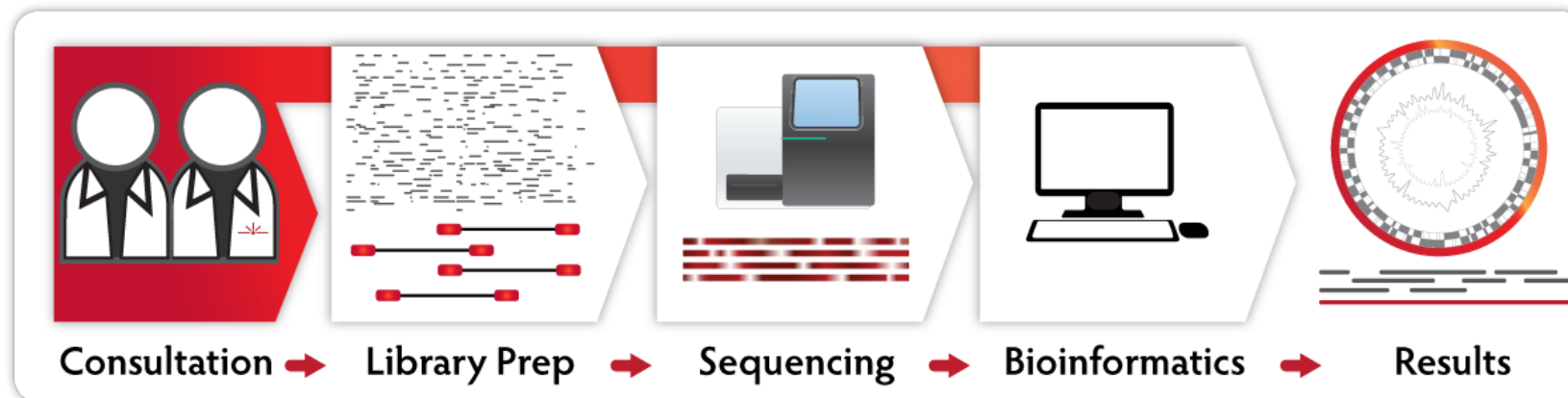
Hôpitaux Saint-Louis et Robert Debré, Laboratoire de référence « Aplasies médullaires » APHP et Equipe INSERM U944 Saint-Louis



**40 patients identifiés au sein de la cohorte de plus de 390 patients**

## ➤ Séquencer le génome entier de ces échantillons

**Référence constitutionnelle (fibroblastes) vs prélèvement somatique (moelle ou sang) « atténué »**



vs



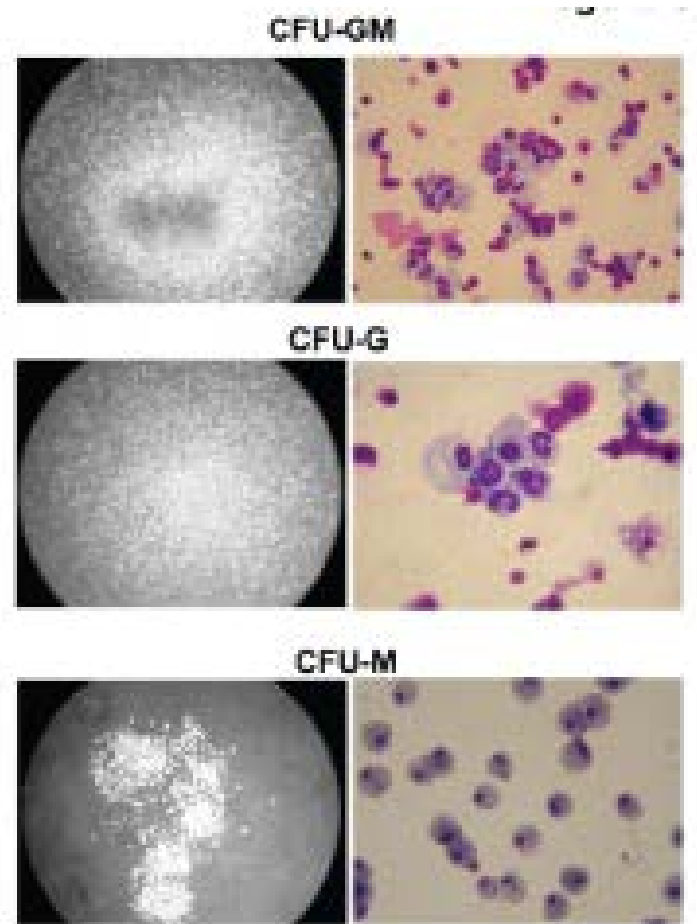
→ Identification d'événements génétiques candidats

# Matériels et méthodes

## ➤ Validation des événements candidats dans des modèles *in vitro*

Expériences fonction de l'événement identifié lors du séquençage

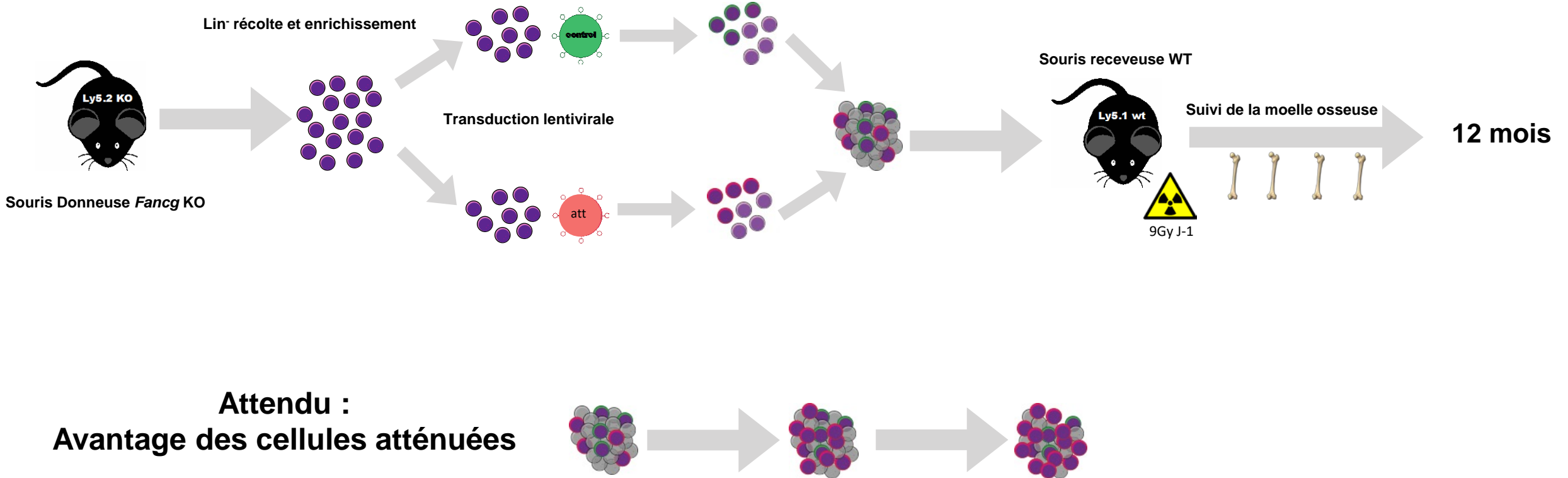
Tests de clonogénicité



# Matériels et méthodes

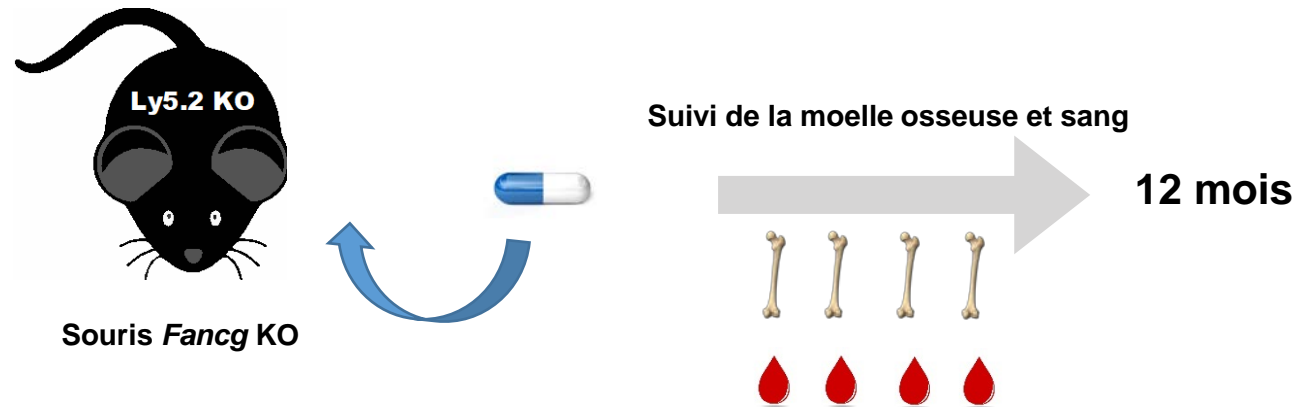
## ➤ Validation des événements candidats dans des modèles *in vivo*

Cellules hématopoïétiques « atténuées » versus « Fanconi classique »



# Identifier des thérapies innovantes contre la défaillance de la moelle osseuse

- Une fois les voies biologiques de l'atténuation identifiées, test de médicaments mimant l'atténuation



**Equipe INSERM/CNRS U944 / 7212  
et Service d'Hématologie APHP**

Dr Pedro De Lima Prata  
Dr Anna Raimbault  
Dr Nadia Vasquez  
Mélanie Da Costa  
Samuel Quentin  
Lucie Hernandez  
Dr Marie Sébert  
Dr Loïc Maillard  
Dr Stéphanie Gachet  
Dr Claude Gazin  
Dr Rathana Kim  
Dr Marie Passet  
Pr Emmanuelle Clappier

**Pr Jean Soulier**

**CRMR Aplasies Médullaires  
Hôpital St-Louis and Robert Debré, Paris**

Pr Régis Peffault de Latour  
Dr Thierry Leblanc  
Dr Flore Sicre de Fontbrune  
Pr Jean-Hugues Dalle  
Pr Gérard Socié

Nombreux pédiatres, hématologues et généticiens français



**Laboratoire d'oncogénétique**

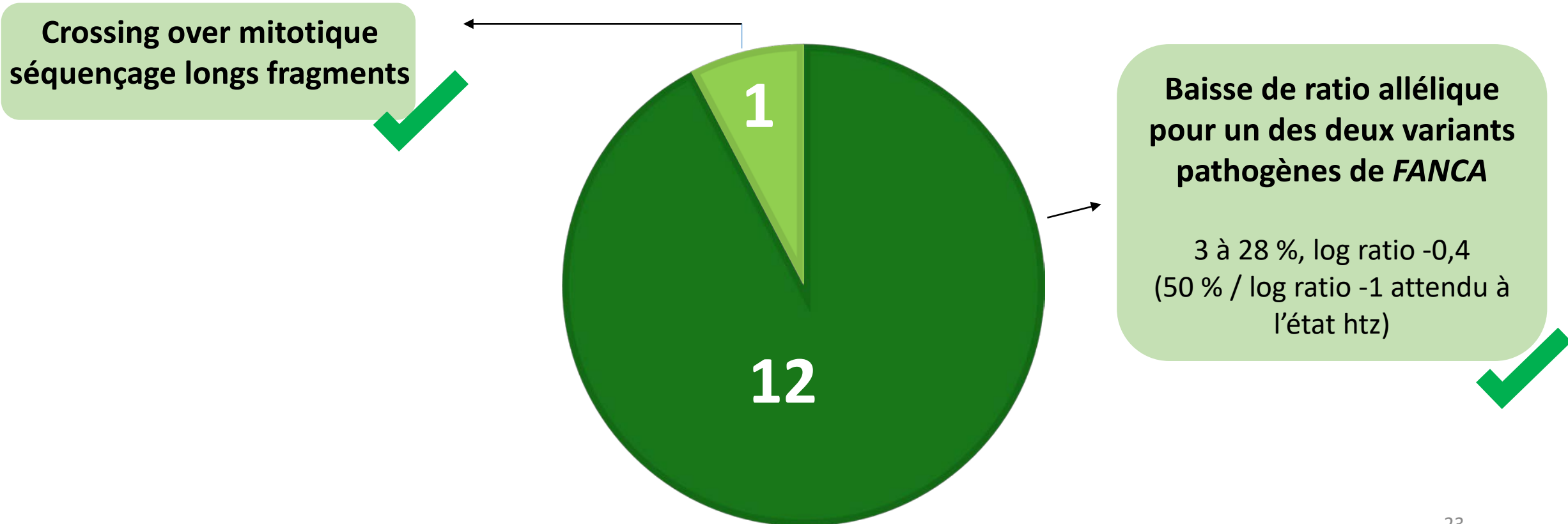
Pr Dominique Stoppa-Lyonnet  
Dr Maud Blanluet  
Catherine Dubois d'Enghien



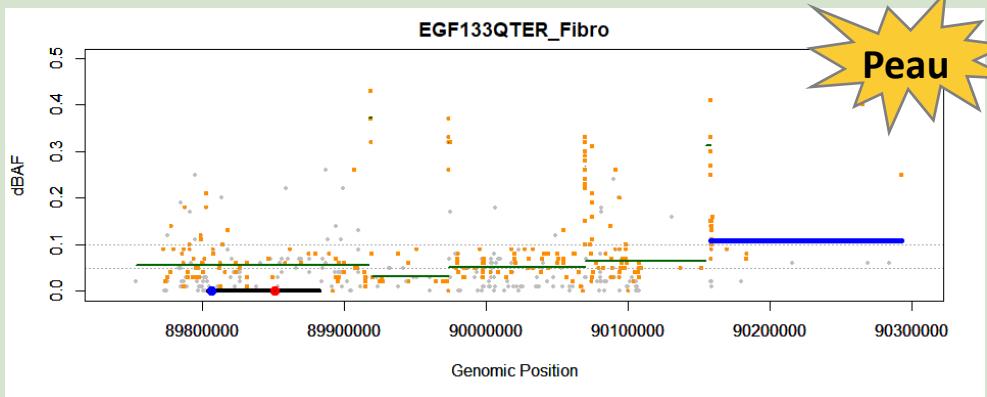
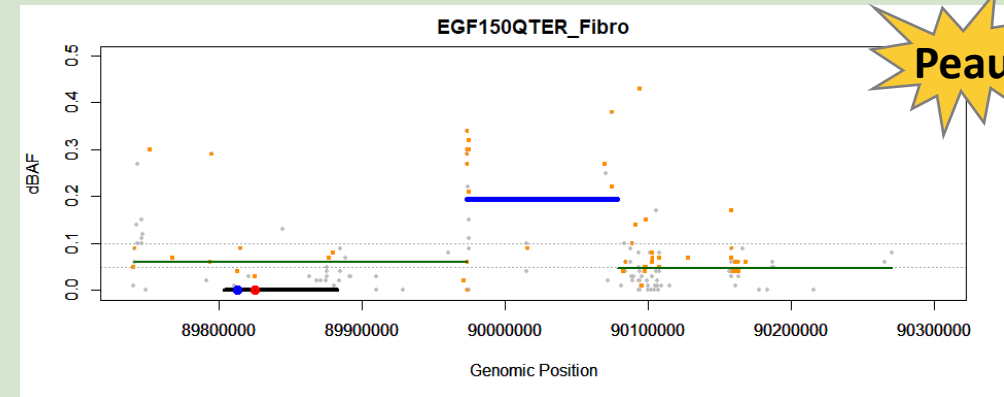
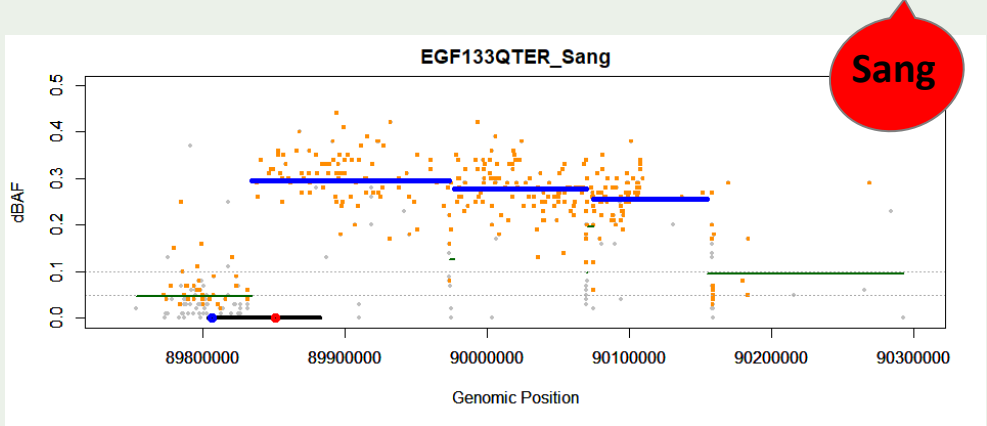
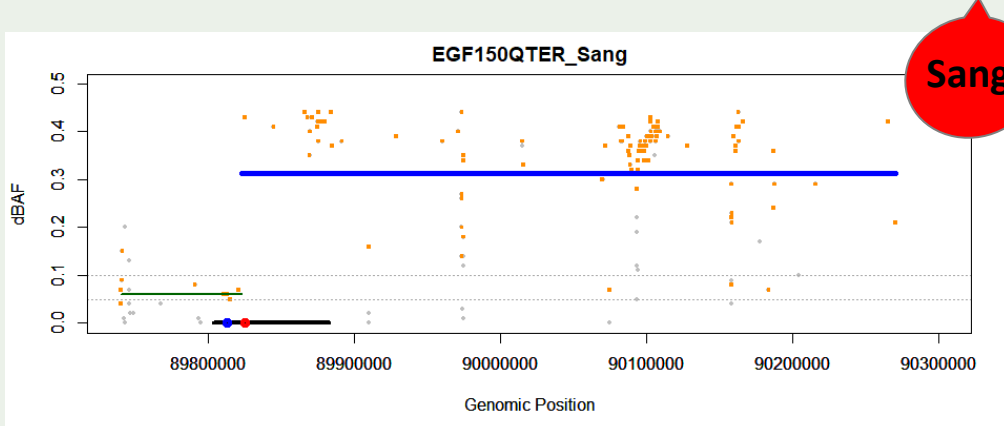


# Réversion fonctionnelle confirmée génétiquement pour les 13 patients FANCA

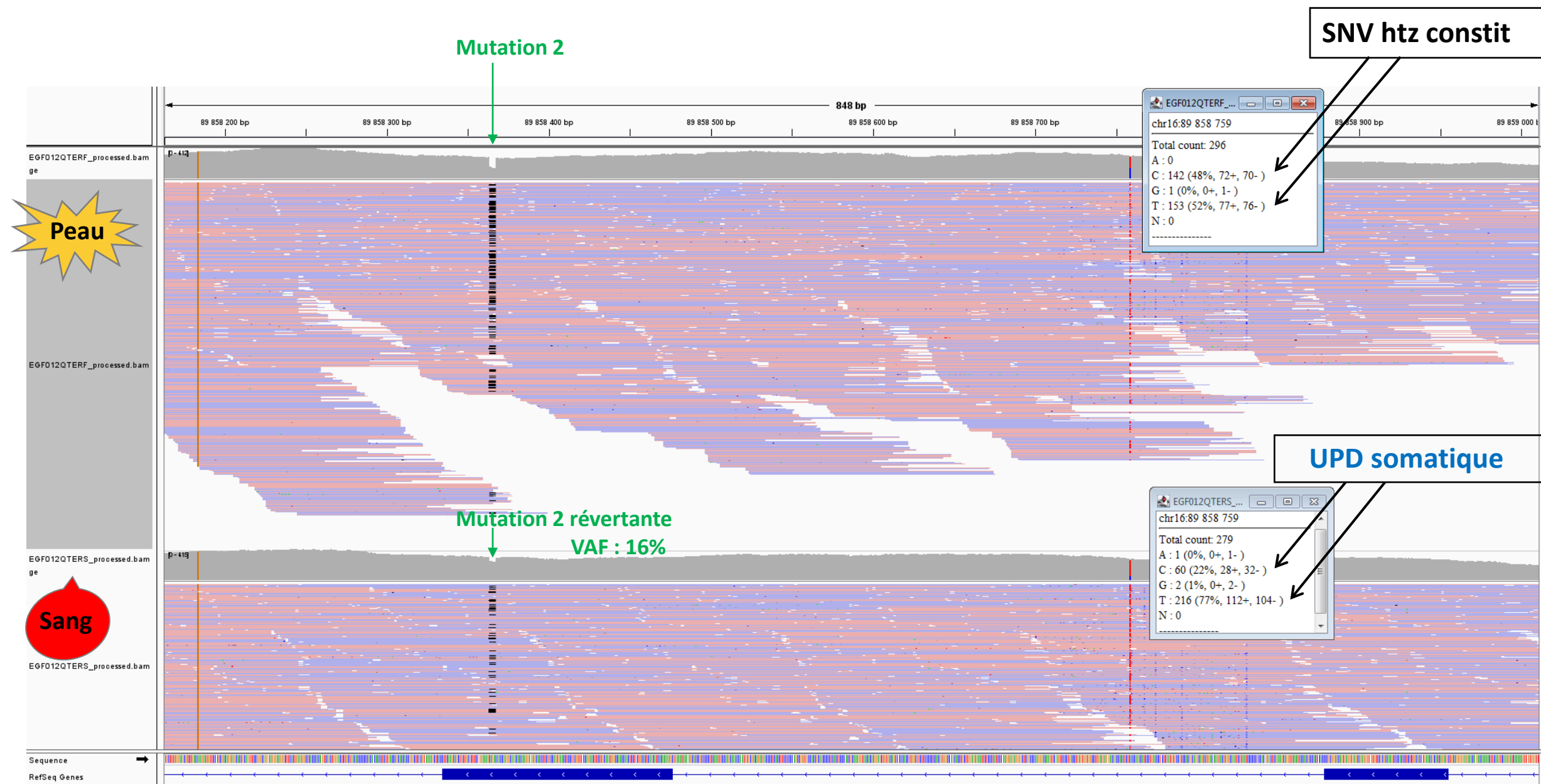
Re-séquençage de *FANCA* par NGS capture courts fragments et long fragments dans le sang et comparaison aux fibroblastes cutanés



# 5 patients /12 présentent une LOH somatique

PATIENT	EGF133	EGF150
Ech constitutionnel	 <p>EGF133QTER_Fibro</p> <p>Peau</p>	 <p>EGF150QTER_Fibro</p> <p>Peau</p>
Ech somatique	 <p>EGF133QTER_Sang</p> <p>Sang</p> <p>Mut1 <i>FANCA</i> Mut2 <i>FANCA</i> révertante, del exon 15 (~110pb)</p>	 <p>EGF150QTER_Sang</p> <p>Sang</p> <p>Mut1 <i>FANCA</i> Mut2 <i>FANCA</i> révertante, SNV</p>

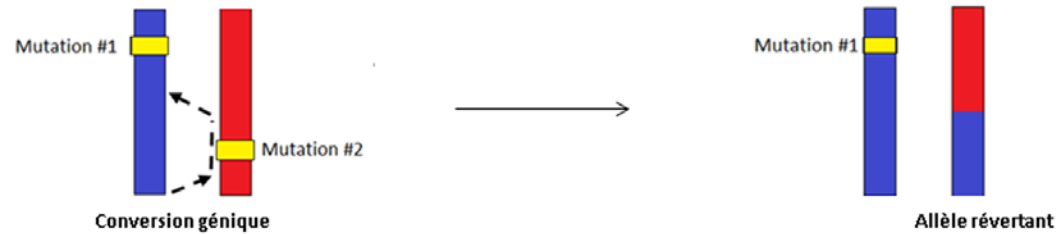
# LOH somatique



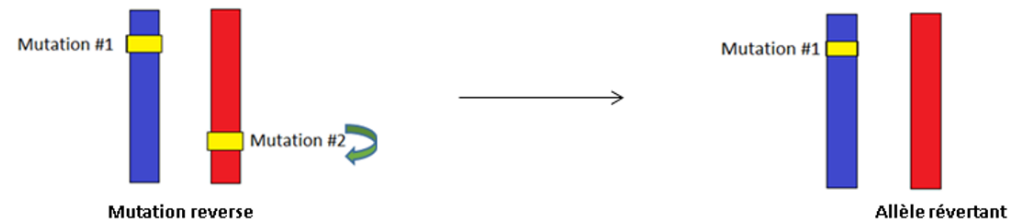
# Mécanismes théoriques de correction génétique spontanée

- Baisse de ratio allélique d'une des deux mutations

- Conversion génique



- Back mutation



- Pas de baisse de ratio allélique d'une des deux mutations

- Acquisition de variants secondaires compensateurs



- Crossing over mitotique

