



AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTE

Rapport du Groupe de Travail de Thérapie Génique de l'Afssaps du jeudi 30 janvier 2003

mise à jour: 12 février 2003

A propos de la survenue de deux événements indésirables graves dans l'essai clinique de thérapie génique du déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (DICS-X)

I / Historique

Le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (DICS-X) est une maladie génétique rare, associée à un déficit de l'immunité cellulaire B et T, provoquant une altération sévère des moyens de défense de l'organisme contre les infections.

Cette pathologie est liée à une (des) mutation(s) du gène codant pour la sous-unité γ_c , protéine trans-membranaire commune à plusieurs récepteurs d'interleukines (IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 et IL21). Ces mutations conduisent à un défaut d'expression ou de fonctionnalité de la protéine γ_c à la surface des précurseurs lymphocytaires, provoquant un blocage précoce de la différenciation de ces précurseurs en cellules T et NK.

En l'absence de traitement, la pathologie est fatale dans la première année de vie, de par la survenue d'infections sévères et récurrentes. Le traitement de référence est la greffe de moelle osseuse allogénique HLA-identique provenant d'un donneur intra-familial. Malheureusement, moins de 20% des patients atteints possèdent un tel donneur. En l'absence de donneur compatible, l'alternative est la greffe de moelle osseuse provenant d'un donneur haplo-identique. Cependant, un tel traitement n'est pas sans risques à court et à long terme : maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), infections persistantes dues à une restauration incomplète de l'immunité, déficit immunitaire B résiduel avec obligation d'un traitement continu par immunoglobulines, déclin à moyen ou long terme des cellules T fonctionnelles.

C'est pourquoi la recherche de nouveaux traitements, comme la thérapie génique, est fondamentale pour l'amélioration de la survie et de la qualité de vie de ces patients.

II / La stratégie rétrovirale de transfert de gène, proposée par l'équipe du Pr. Alain Fischer

En 1997, les Pr. Alain Fischer et Marina Cavazzana-Calvo ont soumis à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afssaps) une demande d'autorisation pour un essai clinique de thérapie génique pour le traitement de patients présentant un déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (DICS-X). Ce protocole consiste en une stratégie ex-vivo de transfert de gène, mettant en oeuvre un vecteur rétroviral, de type MFG, dérivé du virus Moloney de la leucémie murine (MoMuLV), dans lequel une copie normale du gène codant la protéine γ_c a été insérée. Le produit de thérapie génique final, à savoir le vecteur MFG- γ_c , défectif pour la réplication, a été utilisé pour modifier le génome des progéniteurs hématopoïétiques du patient, permettant l'expression de la protéine γ_c à la membrane des cellules, et donc la différenciation des progéniteurs en cellules T et NK matures.

Brièvement, le procédé de transfert ex-vivo a consisté à réaliser un prélèvement de cellules médullaires, suivi d'une sélection des cellules CD34+. Ces cellules CD34+ ont été activées en présence de cytokines, puis transduites par le vecteur rétroviral MFG- γ_c . Les cellules CD34+ transduites ont ensuite été récoltées, lavées puis ré-administrées par voie intra-veineuse aux patients.

III / La survenue de deux effets indésirables

Deux enfants, âgés respectivement de 1 et 3 mois au moment du traitement par thérapie génique, ont développé une prolifération clonale incontrôlée de lymphocytes T matures, 30 mois environ après le traitement.

Malgré l'efficacité démontrée de cette thérapie génique chez 9 sur 10 des enfants traités, l'essai clinique a été suspendu par le promoteur de l'essai en accord avec l'Afssaps, dès la notification du premier effet indésirable, en octobre 2002.

Immédiatement après la notification du premier effet indésirable, une collaboration internationale entre de nombreuses équipes scientifiques s'est mise en place. Celle-ci a permis d'identifier, très rapidement, l'insertion du vecteur rétroviral MFG- γ c au sein du locus du gène LM0-2 (mutagenèse insertionnelle). Dans le second cas, l'insertion a été mise en évidence à proximité du locus du gène LM0-2. Ces insertions, au sein ou à proximité du locus du gène LM0-2, en induisant son expression aberrante dans les clones lymphocytaires, sont vraisemblablement à l'origine des lymphoproliférations observées.

IV / Questions

En 1997, lors de la soumission du dossier de demande d'autorisation d'essai clinique à l'Afssaps, le risque lié à la mutagenèse insertionnelle était considéré comme théorique, mais susceptible de survenir avec ce type de vecteur rétroviral. Néanmoins, les études pré-cliniques réalisées sur différents modèles expérimentaux, pour valider le protocole de thérapie génique du traitement du DICS-X, n'avaient pas permis de mettre en évidence de risque leucémogène ou de développement d'autres formes tumorales.

De plus, à ce jour, aucun effet indésirable de ce type n'a été décrit ni rapporté, au cours du suivi d'essais cliniques de thérapie génique similaires, utilisant des vecteurs rétroviraux et ciblant des cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Il faut également signaler que le gène LM0-2 n'a jamais été décrit, dans la littérature, comme un site d'intégration commun du virus de Moloney dans les lymphomes T induits par ce virus chez la souris. Ceci laisse à penser qu'il n'y aurait aucun moyen de prédire les sites d'intégration « à risque » d'un virus (ou de vecteurs qui en sont dérivés) d'une espèce à l'autre (murine et humaine, par exemple).

Aussi, l'implication du même proto-oncogène dans les deux cas soulève plusieurs questions :

- 1/ Peut-on incriminer la présence de virus répliatifs chez les deux patients ?

Plusieurs considérations permettent d'exclure cette hypothèse :

- 1) Tous les lots de produit fini (qui correspond au surnageant de la culture cellulaire contenant les particules rétrovirales MFG- γ c) utilisés pour transduire les CSH des patients ont été testés pour la recherche de particules rétrovirales compétentes pour la réplication (RCR), et ceci en utilisant les méthodes validées les plus sensibles,
- 2) Chaque patient a subi, au cours de son suivi annuel, de tests de recherche de RCR : tous les résultats se sont avérés négatifs,
- 3) Aucun gène viral n'a été détecté dans le clone du premier patient,
- 4) Le type de prolifération clonale constatée chez les deux patients ne peut être expliqué par la présence de RCR.

- 2 / Existe-t-il un site préférentiel (« hot-spot ») d'intégration dans le locus LM0-2 pour les vecteurs rétroviraux de type MFG- γ c ?

On peut estimer, de façon très approximative, en considérant l'état de la chromatine dans les CSH ciblées, que la probabilité d'insertion d'un vecteur de transfert dans le gène considéré est de l'ordre de 1×10^{-5} ou moins. Dans la mesure où les patients ont reçu au moins 1×10^6 cellules transduites/kg, on peut considérer que tous ont reçu entre 1 à 10 cellules, présentant une insertion dans LM0-2, dont une certaine fraction d'entre elles a acquis un avantage prolifératif, grâce à un effet coopératif entre LM0-2 et la protéine γ c. A l'appui de cette hypothèse, il faut envisager l'existence de facteurs de risques spécifiques à cet essai, pour expliquer le fait que cette complication n'ait jamais été observée dans les essais cliniques de thérapie génique similaires et antérieurs (même stratégie rétrovirale ex-vivo, même cellules cibles).

Ces facteurs de risque sont probablement liés :

- au rôle du produit issu du transgène : l'expression de la protéine γ_c par les précurseurs lymphocytaires induit des signaux de survie et de prolifération (c'est le fondement rationnel de l'essai),
- à la pathologie : le déficit en protéine γ_c est susceptible d'induire l'accumulation ou l'augmentation du taux de précurseurs engagés dans la différenciation T et NK et cibles du gène thérapeutique, ce qui augmente le nombre de « cellules à risque »,
- à l'âge des enfants : les 2 patients atteints de cette complication sont les deux plus jeunes. Il est reconnu que la capacité proliférative des progéniteurs hématopoïétiques (telle qu'elle peut être mesurée sur les cellules du sang de cordon) est bien supérieure à la naissance qu'ultérieurement,
- au protocole ex-vivo : la possibilité qu'une combinaison particulière de cytokines ou le fait que des conditions de culture aient permis d'accroître « l'accessibilité » du locus LM0-2 lors de l'intégration, est à étudier.
- au rôle de la protéine LM0-2 : le rôle de la protéine LM0-2, sur l'état de la chromatine et sa participation à l'activation de promoteurs, doit être clarifié.

Il est donc envisageable que la conjonction de ces cinq facteurs augmente considérablement

1) le nombre de précurseurs à risque,

2) l'expansion de cellules présentant un site d'insertion du vecteur rétroviral MFG- γ_c dans le locus LM0-2. Il faut, dans cette hypothèse, considérer que l'expression dérégulée de LM0-2 ait fourni un avantage sélectif fort, supérieur à celui que pourrait exercer l'activation aberrante d'un autre proto-oncogène dans les précurseurs ou, plus vraisemblablement, dans les lymphocytes T matures.

-3 / Architecture du vecteur :

La nature du vecteur, de par sa construction, peut également contribuer à l'hyper-expression de la protéine LM0-2. L'activation de LM0-2 dans les lymphocytes T matures, après insertion du vecteur MFG- γ_c , peut être expliquée par un phénomène de cis-activation, sous le contrôle des promoteurs présents au sein des séquences U3 des LTR du vecteur.

V / Investigations menées

Dès l'annonce du premier cas, différents axes d'investigations ont été initiés pour caractériser la mutagenèse insertionnelle, ses causes et ses conséquences :

Ces recherches, dont certaines sont actuellement en cours, ont consisté en :

- Analyse moléculaire des transcrits RNA LM0-2 et de la protéine résultante,
- Caractérisation des altérations secondaires du génome,
- Activation de la voie JAK3/STAT5,
- Etude de la prédisposition génétique des enfants,
- Comparaison des cellules gd du clone du premier patient avec des cellules gd normales,
- Analyse du phénotype et du cycle cellulaire des précurseurs lymphocytaires T présents chez les patients atteints du DICS-X, et ce, en fonction de leur âge,
- Développement d'un modèle expérimental :
 - accélération de l'oncogenèse induite par LM0-2 (souris transgéniques LM0-2) par le transfert du gène gc , et recherche des partenaires de LM0-2,
 - recherche d'événements oncogéniques dans un modèle de transfert de gène gc dans des cellules hématopoïétiques $gc(-)$ fœtales. Analyse après transfert secondaire et tertiaire,
- Caractérisation systématique des sites d'intégration dans les leucocytes de tous les patients traités. Analyse de la fréquence d'intégration au sein du locus LM0-2,
 - Suivi des patients traités : sites d'intégration dans LM0-2, expression de LM0-2, polyclonalité des lymphocytes T.

VI / Conclusions

Au vu des premiers résultats et des discussions du groupe de travail de thérapie génique, et dans l'attente d'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués, la suspension de l'essai clinique DICS-X est maintenue.

Par ailleurs, pour toute nouvelle demande d'autorisation d'essai clinique mettant en œuvre des vecteurs rétroviraux murins sans LTR modifié, le groupe d'experts recommande que soient précisées les conditions du protocole et les précautions d'emploi envisagées, avant la mise en place de ces essais. L'évaluation devra être menée au cas par cas, en prenant en compte l'analyse bénéfice/risque qui devra notamment envisager les facteurs de risque avérés et inhérents à la pathologie traitée, la nature du gène transféré et la nature des cellules ciblées.

Le groupe d'experts recommande également que la sécurité des vecteurs soit améliorée. A ce titre, il encourage le développement et le recours à de « nouveaux » vecteurs, en privilégiant des approches du type LTR inactivés avec présence d'un promoteur interne, l'adjonction d'insulateur, ou encore l'utilisation de gène suicide dans la construction de ces vecteurs.

Bien que conscient de la difficulté de développer des modèles animaux pertinents pour chaque pathologie, le groupe d'experts insiste sur la nécessité de mettre au point une méthode prédictive du risque, adaptée à chaque maladie cible.