

## LES TECHNOLOGIES DE MODIFICATION GÉNÉTIQUE

ÉTATS DES LIEUX SUR L'OUTIL CRISPR  
ET L'IMMUNOTHÉRAPIE CAR-T

P3 ➤ CRISPR

---

P5 ➤ Cellules CAR-T

---

P8 ➤ Conclusion

---

P8 ➤ Bibliographie

# Introduction

---

Reconnues comme avancées majeures des biotechnologies au début du 21ème siècle, les cellules CAR-T et les ciseaux moléculaires CRISPR étaient au cœur des conférences en 2010-15.

Ces technologies ont été découvertes à différents moments et développées indépendamment pendant ces dernières années et, plus récemment, on trouve des études qui les combinent.

Qu'en est-il aujourd'hui ? Faisons le point.

# CRISPR

CRISPR est considéré comme la plus grande découverte de biotechnologie du siècle. Cet outil a déjà révolutionné la recherche en laboratoire en rendant plus facile l'étude des maladies et plus rapide la découverte de médicaments et est en passe d'impacter significativement la production industrielle basée sur les microorganismes.

Les CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), sont des familles de séquences répétées dans l'ADN. Ces répétitions se rencontrent dans les lignées d'archées et de bactéries, mais n'ont pas encore été observées chez les eucaryotes. Les séquences intercalées entre ces palindromes sont souvent des morceaux d'ADN de bactériophages.

Régulièrement utilisé avec Cas9 (CRISPR associated protein 9), une endonucléase d'ADN guidée par ARN qui est utilisée pour détecter et couper l'ADN étranger. (Fig. 1)

Tandis qu'au cours des vingt dernières années, beaucoup de chercheurs ont contribué, petit à petit, à développer cette technologie, deux parties prenantes sont souvent citées comme étant les acteurs clés ayant rendu la technologie accessible

à la communauté scientifique, à savoir Emmanuelle Charpentier de l'Université suédoise d'Umea et Jennifer Doudna de l'Université de Californie à Berkeley d'une part et Feng Zhang du Broad Institute associé à Harvard et au MIT d'autre part [1,2].

Il est important de rappeler que CRISPR n'est pas le premier outil permettant d'éditer l'ADN dans toutes sortes d'organismes. D'autres technologies ont été largement utilisées auparavant : les TALENs (Transcription activator-like effector nucleases) et les ZFNs (Zinc finger nucleases). Mais les CRISPR ont l'avantage d'être très facile et plus rapide à utiliser étant donné qu'une même molécule Cas9 peut être dirigée vers n'importe quelle séquence en fournissant simplement une molécule d'ARN guide.

Depuis 2013, beaucoup d'études rapportent l'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 *in vivo*.

D'abord utilisé chez le zébrafish comme modèle pour une meilleure compréhension des cancers et des maladies cardiovasculaires, puis chez la drosophile qui est également un excellent modèle

et permet l'étude de maladies humaines neurodégénératives telles que Parkinson et Alzheimer [3]. Par la suite, l'outil a également été utilisé chez les mammifères (souris, porc, singe) [4,5].

Dans le végétal, l'utilisation de CRISPR permet de faire de la recherche sans que l'organisme modifié soit considéré comme un OGM (étant donné que cette technique n'introduit pas de gènes étrangers d'autres espèces mais corrige l'ADN).

Ces différentes études ont permis de mieux comprendre la fonction d'un gène d'intérêt, surtout celui qui est responsable d'une maladie ou celui qui permet à une récolte d'avoir de meilleurs rendements ou de survivre dans des conditions climatiques plus rudes [6].

En Chine, des chercheurs ont même annoncé en avril 2015, puis en février 2016 et avril 2017, avoir modifié le génome d'embryons (ceux-ci n'ont pas été réimplantés). Cependant, la loi française interdit toute modification germinale du génome, c'est-à-dire transmissible à la descendance, car ceci soulève un problème éthique.

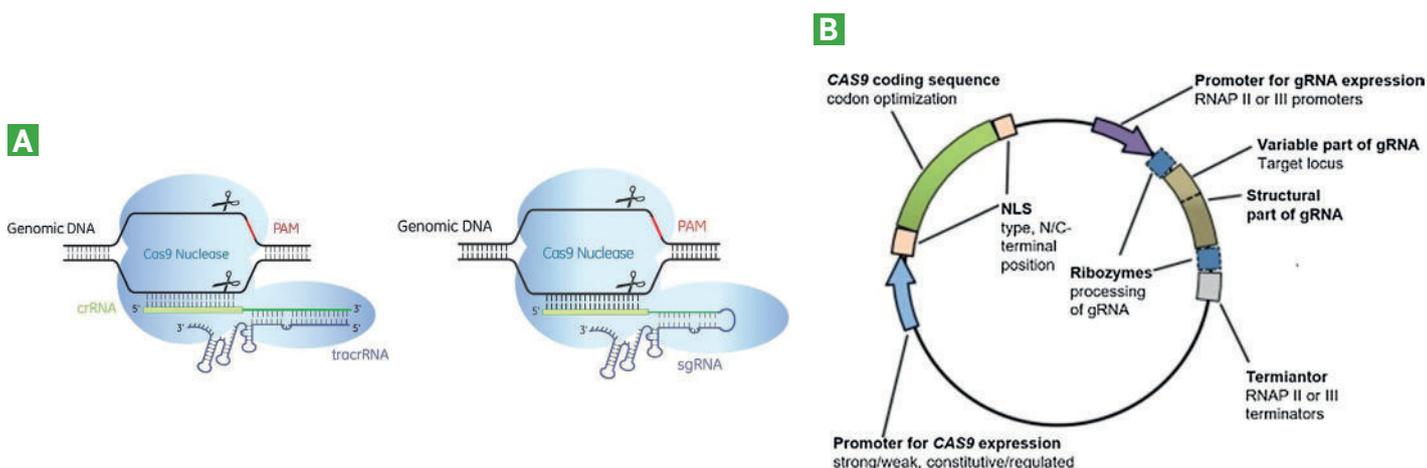


Figure 1 : A - Combinaison de crARN (CRISPR ARN) et l'ARN guide (gauche) vs sgARN chimérique (single guide ARN)  
B - Plasmide CRISPR Cas9 comprenant un NLS (nuclear localisation pour utilisation chez eucaryotes sequence)

[2]

L'une des applications médicales les plus attendues avec CRISPR est la correction au sein de l'organisme d'anomalies génétiques responsables de maladies graves. CRISPR a déjà été utilisé avec succès *in vivo* chez des souris ou rats modélisant des maladies génétiques graves. Dans ces études, les symptômes des animaux modèles ont pu être partiellement soulagés grâce à la correction génétique par CRISPR de la mutation au sein des organes touchés. Néanmoins, l'acheminement de CRISPR dans les cellules pathologiques reste une difficulté. A cet obstacle s'ajoute le risque d'effets indésirables de CRISPR, qui constitue un frein majeur au développement clinique. Il est indispensable de s'assurer que le système n'effectue pas de coupures non spécifiques dans l'ADN qui soient préjudiciables pour l'organisme. L'évaluation de ces coupures non spécifiques et des réarrangements chromosomiques potentiels a progressé mais malgré ces avancées, il n'y a pas encore d'essai clinique de correction génétique *in situ* impliquant l'outil CRISPR [7].

Outre ces approches classiques de thérapie génique *in vivo*, CRISPR se greffe également à des approches *ex vivo*, où des cellules de patients sont isolées, modifiées génétiquement en laboratoire avec CRISPR de manière spécifique à chaque patient, puis réinjectées dans l'organisme. Avec les approches *ex vivo*, l'efficacité de la modification génétique et l'absence d'effets néfastes peuvent ainsi être vérifiées avant de réintroduire ces cellules-médicaments chez les patients [8].

Des études cliniques ont ainsi débuté. En Suisse, la société CRISPR Therapeutics cofondée par Emmanuelle Charpentier, a récemment annoncé que le premier essai clinique mené avec CRISPR en Europe allait débuter en 2018. Sa cible sera la bêta-thalassémie, maladie génétique de l'hémoglobine, utilisant une approche *ex vivo* où les cellules souches hématopoïétiques du patient sont génétiquement modifiées à l'extérieur du corps du patient. (Fig. 2)

Le deuxième essai concerne une maladie congénitale de l'œil. Initialement prévu en 2017, il a été retardé. Il sera réalisé par Editas, la société de Jennifer Doudna qui travaille en parallèle sur la drépanocytose, la bêta-thalassémie et la mucoviscidose.

CRISPR est également utilisé comme outil diagnostic.

Les équipes de Feng Zhang du Broad Institute associé à Harvard et au MIT ont développé la plateforme SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing).

SHERLOCKv2 peut détecter l'ARNsb du virus Dengue ou Zika ainsi que des mutations dans les échantillons de biopsie liquide du patient par flux latéral, mettant en évidence son potentiel en tant que plateforme de détection multiplexable, portable, rapide et quantitative des acides nucléiques [9].

Les équipes de Jennifer Doudna ont une approche similaire avec CRISPR-Cas12a (Cpf1) et ont créé la méthode DETECTR (CRISPR Trans Reporter) qui permet une détection rapide et spécifique du virus du

papillome humain dans les échantillons de patients, fournissant ainsi une plateforme simple pour le diagnostic moléculaire [10].

En cancérologie, CRISPR est particulièrement intéressant dans le cadre des thérapies cellulaires CAR-T, des cellules immunitaires spécifiques reprogrammées pour cibler et éliminer des cellules cancéreuses du système immunitaire.

La production des CAR-T se fait en isolant puis en reprogrammant génétiquement *in vitro* certaines cellules immunitaires issues du patient pour ensuite lui réinjecter ce «médicament» sur mesure (approche *ex vivo*). Jusqu'à présent, le remaniement génétique des CAR-T reposait sur d'autres outils d'ingénierie génétique (TALEN notamment) et la venue de CRISPR promet de faciliter le développement de cette approche et notamment son application à d'autres types de cancers.

Le bureau européen des brevets a accordé à Cellectis le premier brevet pour utiliser la technologie CRISPR dans les cellules T le 2 janvier 2018. Ce brevet couvre l'utilisation des versions Cas9 et Cpf1 de CRISPR dans l'édition génétique des cellules T jusque 2034, toute entreprise souhaitant utiliser cette technologie a donc besoin d'une licence de Cellectis. Depuis, Cellectis a annoncé le dépôt d'un deuxième brevet le 13 février 2018.

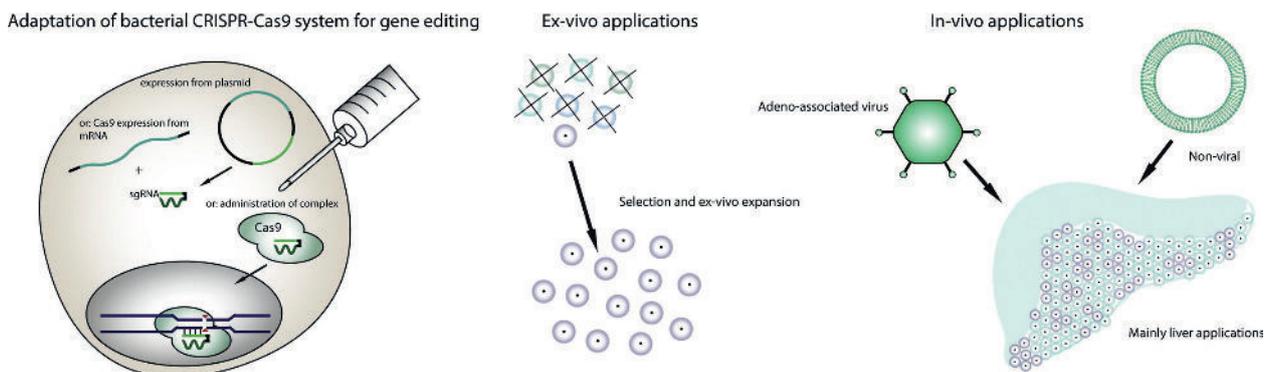


Figure 2 : Approche *in vivo* et *ex vivo*

# Cellules CAR-T

Durant les dernières décennies, notre compréhension du rôle du système immunitaire dans les cancers a considérablement évolué au même titre que les technologies pour purifier et manipuler certaines cellules immunitaires spécifiques dans le but de traiter ces maladies.

Pour rappel, les cellules CAR-T sont le fruit de l'intensité de recherche sur le système immunitaire et le cancer. C'est à la fin des années 1980 que Gross et son équipe ont décrit la possibilité de dessiner et rediriger la spécificité des lymphocytes T par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), en faisant exprimer un récepteur T chimérique composé d'une partie constante de récepteur T, fusionné au fragment variable d'une immunoglobuline [11].

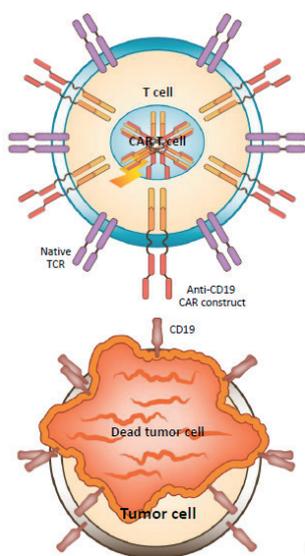


Figure 3 : Construction cellule CAR-T anti CD19

Plusieurs stratégies d'immunothérapie sont envisageables, l'une d'entre elles consiste à « éduquer » des lymphocytes T autologues afin qu'ils reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales et s'attaquent à elles. Les lymphocytes T prélevés chez un patient atteint d'un cancer métastatique sont cultivés et modifiés génétiquement *ex vivo* pour leur faire exprimer un récepteur antigénique chimérique (Chimeric Antigen Receptor ou CAR). (Fig. 4)

Ce récepteur est conçu de telle manière que sa partie extracellulaire puisse reconnaître un antigène tumoral le plus spécifiquement possible afin d'éviter les effets néfastes sur d'autres organes du patient. La partie intracellulaire va, elle, se charger de l'activation des lymphocytes après fixation sur les cellules cancéreuses : elle se compose de plusieurs domaines d'activation et de co-activation pour les cellules CAR-T de seconde génération [12,13].

Plus récemment, des cellules CAR-T de 4<sup>ème</sup> génération sont utilisées, elles combinent un CAR de seconde génération avec une cytokine pro-inflammatoire (IL-12) [14].

Il est également possible d'avoir recours à un donneur allogénique mais dans ce cas, même si le donneur est choisi pour sa relative compatibilité, il est impératif de détruire le système immunologique du patient receveur pour éviter le rejet.

Les traitements exploitant ces cellules CAR-T sont plus avancés dans le domaine des cancers liquides.

La plupart des données cliniques utilisant la thérapie basée sur les cellules CAR-T ont été générées avec l'antigène CD19, une protéine exprimée à la surface de presque tous les lymphocytes B sains ou cancéreux, y compris sur les cellules leucémiques et les cellules de lymphome B.

Il y a déjà deux thérapies sur le marché et plus de 150 essais cliniques en cours.

Ainsi, des cellules CAR-T développées par Novartis, appelées Kymriah™, ont obtenu une AMM (autorisation de mise sur le marché) aux États-Unis dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique pédiatrique (LAL) [15].

Kite Pharma du groupe Gilead est le second à avoir apporté la thérapie CAR T sur le marché avec Yescarta™ pour le traitement de patients adultes atteints de lymphome à grandes cellules B (LDGCB) réfractaire ou récidivant qui ont reçu une ou plusieurs lignes de traitement systémique [16].

D'autres entreprises effectuent des essais cliniques, telles que Juno Therapeutics, Celgene et Mustang Bio aux États-Unis, Celyad en Belgique et le français Servier en partenariat avec Pfizer.

Les essais cliniques sur les cellules CAR-T dans ce type de cancers donnent des résultats encourageants avec un bon taux de rémission à hauteur de 90%. Ce chiffre est particulièrement impressionnant étant donné que les patients recrutés n'avaient pas répondu aux autres traitements contre le cancer.

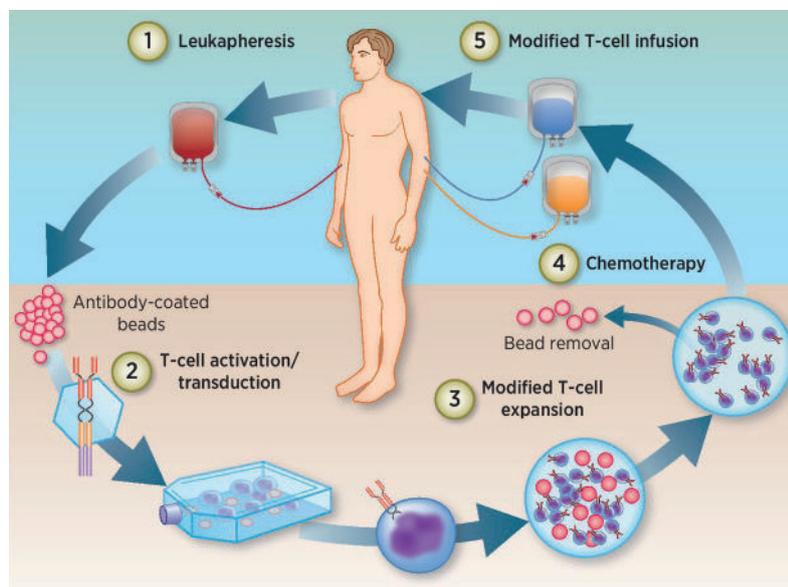


Figure 4 : Vue d'ensemble d'une thérapie cellule CAR-T au niveau clinique

Il est tout de même important de rappeler que cette thérapie a aussi des failles. Effectivement les cellules CAR-T présentent de sévères effets secondaires, tels que des complications métaboliques, réactions anaphylactiques, neurotoxicité (surement dû au fait que les cellules CAR-T peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique). Le syndrome de relargage des cytokines est la complication la plus fréquente avec une incidence de 50 à 100% dont 2 à 50% de formes sévères pouvant engager le pronostic vital [17]. Lors d'un choc cytokinique sévère, il faut assurer une prise en charge immédiate du patient, il est donc impératif d'avoir un service de réanimation

à proximité lors d'un traitement par cellules CAR-T.

En 2016, plusieurs entreprises ont rapporté des décès à long terme durant les essais cliniques. Mais malgré ces effets secondaires graves, la thérapie CAR-T mérite d'être menée quand les patients ne répondent pas aux autres traitements.

Certains utilisateurs ont amélioré les cellules CAR-T afin qu'elles soient plus sûres pour les patients, c'est le cas du français Collectis qui a développé UCART19 pour le traitement des hémopathies malignes exprimant l'antigène CD19, il inclut un système de contrôle qui active uniquement les cellules

T modifiées quand le patient reçoit la rapamycine (médicament). En 2015, Servier a acquis les droits exclusifs de Collectis sur UCART19, qui est codéveloppé par Servier et Pfizer [18]. Servier est le promoteur de l'étude de Phase I CALM sur UCART19, cette étude a été initiée au Royaume-Uni en août 2016.

Collectis utilise également la technologie CRISPR et d'autres équipes travaillent également avec l'outil CRISPR dans les cellules CAR-T. Par exemple, CRISPR Cas9 peut induire un KO du gène PD-1 dans la cellule T afin de réduire son expression et d'améliorer la réponse immune in vitro [19].



**Immune insighT**  
Save the balance.

Lorsque des essais cliniques sont menés, il est important d'anticiper les effets secondaires. L'entreprise biopharmaceutique Immune insighT est spécialisée dans l'évaluation préclinique *ex vivo* et *in vivo* de nouveaux candidats-médicaments ou nouvelles molécules actives sur le système immunitaire dans les domaines du cancer, de la transplantation, des maladies auto-immunes et inflammatoires. La société Immune insighT est actuellement la seule société à offrir à ses clients un service permettant de valider l'innocuité d'un candidat-médicament vis-à-vis d'une population particulière de cellules immunitaires (les Lymphocytes T régulateurs : Treg), qui sont connues pour jouer un rôle prépondérant dans le contrôle de l'immunité. La réalisation, à un niveau précoce, de

l'ensemble des tests proposés par Immune insighT, permet de prévenir de façon fiable et rapide les effets indésirables d'un candidat médicament ou de toutes autres molécules sur le système immunitaire et d'anticiper l'éventuel échec d'un essai clinique long et coûteux.

**Aujourd'hui, Immune insighT souhaite développer au travers de son activité R&D, un test compagnon décliné sous la forme d'un Kit « TregSign » qui s'appuiera sur la signature moléculaire unique des Treg et qui permettra à la communauté scientifique, aux industriels et aux académiques d'évaluer de façon autonome, fiable, reproductible et simple, les effets de tous traitements physiques ou chimiques sur cette sous-population.**

[www.immune-insight.com](http://www.immune-insight.com)

Des recherches sont aussi en cours sur l'application de la thérapie CAR-T dans le traitement des tumeurs solides (une centaine d'essais cliniques sont en cours ou en phase de démarrage). Des études ont été menées visant différentes cibles idéales présentes en surface des cellules dans plusieurs types de cancers CEA (antigène carcino-embryonnaire), EGFR (facteur de croissance épidermique), HER2 (facteur de croissance épidermique humain) et MSLN (mésothéline). Les résultats ne sont pas concluants pour l'instant car des effets indésirables persistent [20].

Bellicum Pharmaceuticals, basée à Houston au Texas, développe la technologie GoCAR-T qui nécessite l'activation par un agent appelé rimiducide, cette étude est basée sur le même système avec point de contrôle que celui utilisé dans les cancers liquides. Les essais sont en phase I, la thérapie est menée dans les cancers pancréatiques inopérables [21,22].

Celyad a également lancé un essai clinique en phase I dans sept cancers réfractaires, dont cinq tumeurs solides (cancer colorectal, de l'ovaire, de la vessie, du sein triple négatif et du pancréas) et deux tumeurs hématologiques (leucémie myéloïde aiguë et myélome multiple). Ils ont développé une version de cellules CAR-T qui exprime le récepteur Natural Killer (NKR) afin de déclencher une destruction cellulaire une fois que la liaison récepteur/ligand s'est produite. L'essai THINK (Therapeutic Immunotherapy with NKR-2) est actuellement mené aux États-Unis et en Europe.

L'une des stratégies possible est d'utiliser d'autres modalités de traitement en synergie avec la thérapie CAR-T. La chimiothérapie et la radiothérapie peuvent modifier le microenvironnement de la tumeur afin d'améliorer l'immunothérapie en facilitant la migration de la cellule T dans la tumeur [23].

Il est important de noter que les cellules CAR-T sont considérées comme des médicaments de thérapie génique et innovante (MTI). La législation française n'autorise donc pas de mener des essais sur des patients. L'EMA (European Medicines Agency) n'a pas encore délivré l'AMM. Ceci explique le retard de la France en terme de nombre d'essais cliniques.

Les demandes d'autorisation de mise sur le marché européen de ces thérapies sont en cours et en France beaucoup de patients vont bénéficier à partir de 2018 de ces innovations majeures soit dans le cadre des essais cliniques ou à travers des dispositifs d'Autorisations temporaires d'utilisation (ATU) qui vont se mettre en place.

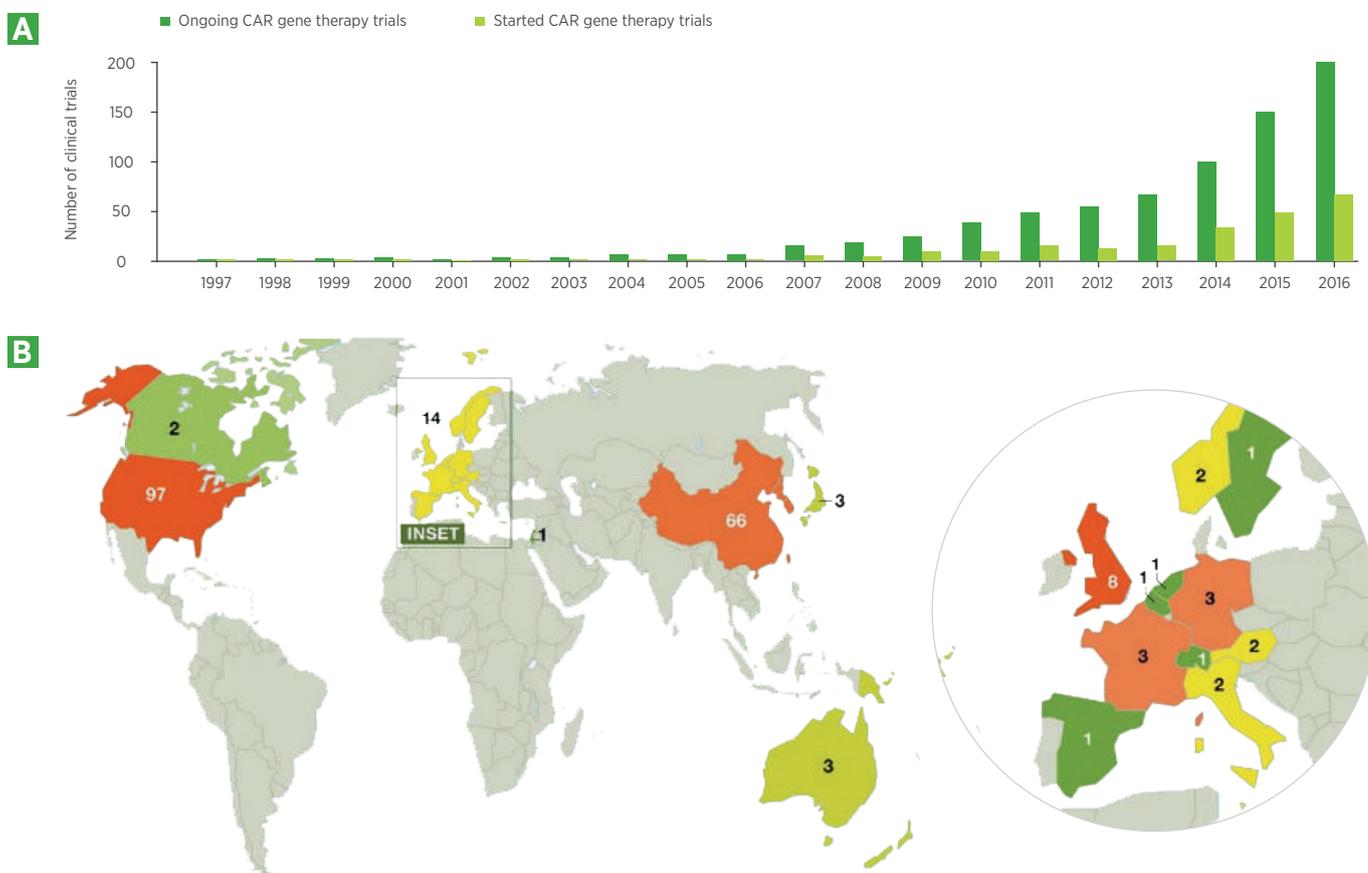


Figure 5 : A - Evolution des essais cliniques avec cellules CAR-T  
B - Distribution géographique mondiale des essais cliniques CAR-T

# Conclusion

---

Aujourd'hui il y a toujours une forte dynamique autour du cancer et les recherches se poursuivent.

Avec l'outil CRISPR on commence à travailler en *ex vivo*. CRISPR ayant fait ses preuves comme outil de recherche en permettant de

mieux comprendre la fonction des gènes d'intérêt.

Dans les deux cas, on en attend encore beaucoup sur la dimension clinique. Ces deux technologies promettent de faire encore beaucoup parler d'elles.

# Bibliographie

---

- [1] Martin Jinek. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, volume 337, Pages 816-821
- [2] Storz Ulrich. CRISPR Cas9 – Licensing the unlicensable. *Journal of Biotechnology*, 2018, volume 265, Pages 86-92
- [3] Jao LE. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, volume 110, Pages 13904-13909
- [4] Randall J. Platt. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, volume 159, Pages 440-455
- [5] Helen Shen. First monkeys with customized mutations born. *Nature news*, 2014
- [6] Singh Vijai. Recent Advances in CRISPR-Cas9 Genome Editing Technology for Biological and Biomedical Investigations. *Journal of cellular biochemistry*, 2018, volume 119, Pages 81-94
- [7] Gori Jennifer L. Delivery and specificity of CRISPR-Cas9 genome editing technologies for human gene therapy. *Human gene therapy*, 2015, volume 26
- [8] Erik Oude Blenke. CRISPR-Cas9 gene editing: delivery aspects and therapeutic potential. *Journal of controlled release*, 2016, volume 244, Pages 139-148
- [9] Jonathan S. Gootenberg. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 2018
- [10] Janice S. Chen. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018
- [11] Gross G. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, volume 86, Pages 10024-10028
- [12] Yannick Le Bris. CAR T cell: An update. *Revue d'oncologie hématologie pédiatrique*, 2016, volume 4, Pages 202-209
- [13] Marcela V. Maus. Making better chimeric antigen receptors for adoptive T-cell therapy. *Clinical cancer research*. 2016
- [14] Hartmann J. Clinical development of CAR T cells – challenges and opportunities in translating innovative treatments concepts. *EMBO Molecular Medicine*. 2017
- [15] Novartis. 2017 Prescribing Information (Kymriah™) <https://www.pharma.us.novartis.com/sites/www.pharma.us.novartis.com/files/kymriah.pdf>
- [16] Yescarta™. 2017 Prescribing Information <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM581226.pdf>
- [17] Ping-Pin Zheng. Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug discovery today*, In Press 2018
- [18] Servier and Pfizer announce preliminary results of the first-in-human trials of UCART19. *ENP Newswire*. 2017
- [19] Shu Su. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Scientific Reports*. 2016
- [20] Shengnan Yu. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *Journal of hematology & oncology*. 2017
- [21] Phase 1 Trial of CAR T-Cell Drug for Pancreatic Cancer Doses First Patient. *Immuno-oncology news*. 2017
- [22] Carl J. DeSelm. CAR T-cell therapy for pancreatic cancer. *Journal of surgical oncology*. 2017, volume 116, Pages 63-74
- [23] Maria C. Ramello. CAR-T cells and combination therapies: what's next in the immunotherapy revolution? *Pharmacological research*. 2018, volume 129, Pages 194-203

Le Pôle NSL répond  
à l'ensemble  
de vos besoins  
en matière **de veille  
stratégique**

Pour vous permettre de détenir les données clés  
des secteurs de la nutrition et de la santé, le Pôle NSL  
vous offre une série de services vous apportant des  
informations essentielles.



Contactez notre équipe pour être  
certain d'avoir les bonnes informations  
au bon moment.

**Votre contact : Pauline Dhordain**  
Chargée d'affaires projets collaboratifs  
pdhordain@pole-nsl.org  
03.28.55.50.14