

Communiqué du 23 janvier 2006

5^{ème} Table Ronde Internationale de Monaco

Différents projets pré-cliniques d'application du saut d'exon émergent en vue de traitements de la myopathie de Duchenne

Deux ans après la Table Ronde de janvier 2004 qui avait conclu à la possibilité d'utiliser la technique du saut d'exon comme stratégie thérapeutique, l'exon skipping confirme son potentiel clinique et se traduit par différentes approches de recherches (moléculaire, pharmaco-chimique, thérapie génique, thérapie cellulaire autologue) qui arrivent toutes aujourd'hui à un stade pré-clinique avancé. Plusieurs essais cliniques sont déjà en préparation mais, en parallèle, des travaux de recherche restent à mener pour répondre aux questions encore non résolues (réponse immunitaire, injection systémique, production de lots de médicaments notamment). La communauté internationale concernée par la myopathie de Duchenne se mobilise en vue de franchir une étape cruciale, à l'initiative du Parent Project USA, un consortium international vient d'être créé et a été présenté pour la 1^{ère} fois à Monaco le 15 janvier dans le but de lever des fonds destinés à financer les essais cliniques dans la myopathie de Duchenne utilisant la technique prometteuse du saut d'exon.

Un enchaînement d'évènements

Monaco, 17 janvier 2004, la 2^{ème} Table Ronde posait la question de la possibilité de restaurer le cadre de lecture de la dystrophine chez des patients atteints de la myopathie de Duchenne en utilisant des molécules interférant avec les processus de maturation (technique dite du saut d'exon ou exon skipping). Les résultats positifs in vitro et in vivo présentés à ce moment là par les différents spécialistes (T.Partridge-GB, J.Van Deutekom-Pays-Bas, S.Wilton-Australie) en faisait une voie prometteuse pour aller en clinique. Cependant, les chercheurs avaient attiré l'attention sur l'effet transitoire d'un traitement et pour palier cet inconvénient les équipes suisses (D.Schümperli), italiennes (I.Bozzoni) et françaises (L.Garcia) avaient montré qu'on pouvait envisager de combiner cette approche avec, en particulier, une stratégie de thérapie génique visant à produire de façon stable et continue les molécules antisens thérapeutiques au sein des fibres dystrophiques. Cette stratégie s'est ensuite révélée rapidement positive courant 2004 avec la publication dans Science du travail de l'équipe de L.Garcia réussissant le saut d'exon chez la souris en utilisant un petit ARN nucléaire U7 comme « navette » des séquences antisens, introduit dans un vecteur viral AAV, permettant une restauration massive et stable de dystrophine, associée à une amélioration significative du phénotype dystrophique de la souris mdx.

Monaco, 14 janvier 2006, 2 ans après, Duchenne Parent Project France et l'Association Monégasque contre les Myopathies invitent à leur 5^{ème} Table Ronde les chercheurs et médecins impliqués dans la mise au point de projets visant à restaurer le cadre de lecture dans la myopathie de Duchenne pour passer en revue les progrès réalisés en utilisant soit des oligos synthétiques, de la thérapie génique, ou de la thérapie génique combinée à de la thérapie cellulaire, soit des moyens pharmacologiques. En deux ans l'application du saut d'exon à la myopathie de Duchenne a fait naître pas moins de 4 approches thérapeutiques pour cibler un traitement : les oligonucléotides antisens synthétiques (AON, morpholinos), la thérapie génique (AAV-U7), l'intégration de U7 dans des cellules souches myogéniques, et une pharmacologie de l'épissage. C'est la pertinence de ces différentes voies et les perspectives thérapeutiques qu'elles peuvent offrir qui ont été débattus par 25 chercheurs et médecins, spécialistes internationaux, en présence d'une dizaine de représentants d'associations de la myopathie de Duchenne.

Imminence du démarrage de l'essai clinique AON hollandais, tandis que le consortium britannique MDEX mise sur les morpholinos

L'équipe hollandaise de **J. Van Deutekom** dispose aujourd'hui d'une collection d'AONs (avec la chimie 2'-O-méthyl phosphorothioate pour leur synthèse) ciblant la majorité des exons de la dystrophine humaine. La validation de ces AONs a été réalisée ex-vivo sur des cellules de patients maintenues en culture, et in vivo grâce à une souris transgénique humanisée contenant l'intégralité du gène humain de la dystrophine (Hdys). C'est l'équipe la plus avancée sur le plan clinique puisqu'elle est sur le point de démarrer dans les semaines à venir, en partenariat avec la société Prosensa, un essai clinique de phase I ciblant l'exon 51. Des patients DMD vont recevoir une injection intramusculaire, sans bénéfice thérapeutique attendu à ce stade.

Des résultats obtenus sur des souris indiquent qu'une administration par voie sanguine (systémique) serait envisageable. Les doses et la fréquence des injections restent à déterminer. Des études de toxicité sur le long terme doivent également être entreprises.

Le consortium britannique MDEX (**F. Muntoni**), en collaboration avec les laboratoires de **S. Wilton** (A) et **Q. Lu** (USA) mène des travaux similaires mais avec une autre chimie pour la synthèse des oligonucléotides : les morpholinos. Ces équipes se concentrent particulièrement sur l'administration par voie sanguine. Les résultats pré-cliniques sur la souris mdx sont très prometteurs, de nombreux muscles sont atteints après 6 injections de 2,5 mg de morpholinos mais le cœur semble réfractaire au traitement systémique. Des études d'accumulation/toxicité du produit à long terme font par ailleurs défaut.

Le consortium MDEX envisage de lancer en 2007 un essai clinique semblable à l'essai hollandais.

La réussite du saut d'exons chez le chien avec l'AAV-U7 renforce les chances de succès d'un essai thérapeutique malgré des problèmes encore non résolus

L'équipe française de **L. Garcia** poursuit ses travaux de thérapie génique avec l'AAV et le micro-gène U7 codant la séquence anti-sens indispensable au saut d'exon en transposant cette technologie sur le chien myopathes GRMD chez qui il faut pouvoir sauter non pas un mais 3 exons pour restaurer une dystrophine fonctionnelle. Les injections intramusculaires d'AAV-U7 chez GRMD donnent des résultats très encourageants, comparables à ceux de la souris, ce qui est très prometteur dans le cas du passage à l'homme, d'autant plus que cet animal de grande taille permet de simuler de futurs essais chez l'homme et d'en appréhender les limites. Pour le moment le vecteur est administré par injection sous pression à l'échelle d'un membre, à défaut d'un vecteur passant spontanément la barrière endothéliale des capillaires sanguins. L'option U7 confirme donc son efficacité majeure, néanmoins l'utilisation du vecteur viral pose le problème de la réponse immunitaire contre l'enveloppe du vecteur après la 1^{ère} injection ce qui interdirait toute ré-injection nécessitée par un traitement séquentiel de doses thérapeutiques. Les efforts se portent maintenant sur la mise au point d'un protocole d'immuno-modulation autorisant la ré-injection d'AAV.

Un essai clinique de phase I, attendu en 2007, est en cours d'élaboration à Généthon et l'Institut de Myologie. Afin d'évaluer la tolérance et la réalisation du saut d'exon (exon 51) sans pour autant disqualifier des patients DMD, les injections intra-musculaires, sans bénéfice ni risque majeur si ce n'est celui d'être vacciné contre le vecteur thérapeutique, seront effectuées sur des femmes conductrices hétérozygotes asymptomatiques.

L'équipe américaine de **L. Sweeney** se prépare aussi à lancer un essai clinique avec la même technologie, probablement en ciblant l'exon 53.

Le système vecteur+U7 ouvre des perspectives nouvelles pour la thérapie cellulaire qui devraient se concrétiser par des essais cliniques à moyen terme

Le système U7 a été transposé dans un vecteur rétroviral (lentivirus) afin de pouvoir implanter le micro-gène dans les cellules souches myogéniques en vue d'une thérapie cellulaire autologue (utilisant les propres cellules du patient).

J.Tremblay (Canada) a fait un rappel de son expérience en matière de greffe de myoblastes hétérologues (le donneur est un apparenté du patient) chez des patients DMD (essai de phase I). La procédure d'injection intramusculaire est laborieuse (sites d'injections espacés de 1mm) mais praticable sur des muscles de petite taille. La principale limite de cette approche est d'ordre immunologique et liée au rejet de greffe. L'utilisation de vecteurs lenti-U7 ouvre cependant des perspectives pour la poursuite de ces travaux. En effet, des expériences préliminaires sur des myoblastes en culture de patients traités par un lenti-U7 révèlent des niveaux significatifs de dystrophine.

Y.Torrente (Italie) a conduit un essai de thérapie cellulaire de phase I en injectant des cellules souches AC133+ autologues chez des patients. L'avantage de ces cellules est qu'elles peuvent être extraites du muscle et/ou du sang et qu'elles sont compatibles avec une administration systémique (au moins chez les souris). Les travaux présentés démontrent la faisabilité de générer in vivo, dans une souris mdx immuno-déficiente (SCID), des fibres musculaires exprimant une dystrophine réparée à partir de cellules AC133+ de patients Duchenne préalablement infectées par un lenti-U7 (exon 51).

J.Morgan (Grande Bretagne) a présenté un projet similaire, mais en utilisant une autre variété de cellules souches prélevées dans l'espace synovial.

M.Sampaolesi (Italie) a présenté ses travaux sur l'utilisation des « mésengioblastes » : une variété de cellule souche à forte capacité myogénique isolée à partir de vaisseaux musculaires. L'espoir que suscitent ces cellules vient du fait qu'elles semblent avoir la capacité de recoloniser le muscle dystrophique lorsqu'elles sont injectées par voie intra-artérielle. Les résultats sont d'autant plus prometteurs qu'ils semblent se confirmer avec le chien GRMD. Dans ce cas aussi, l'accès à des vecteurs lenti-U7 devrait permettre de s'affranchir des problèmes immunitaires inhérents à l'emploi de cellules hétérologues.

Et un jour pourquoi pas un comprimé ? Un pas est franchi vers la recherche de drogues agissant sur l'épissage

J.Tazi (France) a évoqué les travaux de son équipe qui convergent vers l'élucidation du mécanisme d'épissage et l'identification de nouvelles cibles parmi les facteurs impliqués dans ce mécanisme, pour corriger les anomalies d'épissage dans les maladies génétiques. Il a entrepris un projet de recherche de drogues pouvant interférer avec les partenaires moléculaires impliqués dans cette réaction et, la Dystrophie musculaire de Duchenne s'avère être un candidat idéal pour réaliser une validation des drogues identifiées. Le criblage de centaines de drogues l'a conduit à identifier 2 molécules sélectivement active sur le saut de l'exon 23 chez la souris mdx. Ces résultats prometteurs permettent à cette équipe de poursuivre les recherches par des criblages de molécules pour des exons humains. Il s'agit peut-être ici d'un tournant fondamental pour la quête de futurs médicaments pour traiter la myopathie de Duchenne.

L'International DMD Translational Research Consortium

En réponse à cette dynamique de recherche et à ces différentes applications possibles du saut d'exon vers la clinique, Parent Project USA, a décidé de créer un consortium international chargé de financer et d'exécuter des programmes de recherche parmi les plus prometteurs pour traiter la myopathie de Duchenne en nommant à sa tête des professionnels de la levée de fonds, du management, et de l'industrie pharmaceutique (Glaxo Smith Kline). Le consortium a pour mission de trouver les fonds et de s'entourer des compétences de l'industrie pharmaceutique, de la recherche académique et des fondations privées. La 5^{ème} Table Ronde de Monaco constituait une opportunité intéressante en raison de la présence de nombreux chercheurs et associations pour présenter ce consortium en cours de structuration .

