



HAL
open science

Mise en œuvre et surveillance d'un traitement par thérapie génique dans le syndrome de Crigler-Najjar

Manon Sanz

► **To cite this version:**

Manon Sanz. Mise en œuvre et surveillance d'un traitement par thérapie génique dans le syndrome de Crigler-Najjar. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-04133274

HAL Id: dumas-04133274

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04133274v1>

Submitted on 19 Jun 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

**MISE EN ŒUVRE ET SURVEILLANCE D'UN TRAITEMENT PAR
THERAPIE GENIQUE DANS LE SYNDROME DE CRIGLER-NAJJAR**

Thèse

présentée à la Faculté de Pharmacie de Montpellier

en vue d'obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par

Manon SANZ

soutenue le 9 décembre 2022 à Montpellier

<u>Président</u> :	Mme Anne-Dominique LAJOIX	Professeur des Universités, Docteur en Pharmacie Directeur UR-UM101 Co-responsable du Master IBIS
<u>Assesseurs</u> :	Mme Céline MUFFANG	Docteur en Pharmacie, Directeur associé de Pharmacovigilance
	Mme Mathilde LUCAS	Docteur en Pharmacie, Chef de projet logistique clinique

Remerciements

Je tenais à remercier sincèrement :

Tout d'abord le Docteur Madame Anne-Dominique Lajoix. Je vous remercie pour la qualité de vos cours de Biotechnologies dès les premières années du cursus universitaire de Pharmacie, mais également pour la pertinence des cours et exercices dispensés dans votre Diplôme Universitaire « Biotechnologies appliquées à la santé ». Enfin, je vous remercie d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.

Ensuite, le Docteur Madame Céline Muffang. Je te remercie pour l'accueil et la bienveillance dont tu as fait preuve lors de mon arrivée au Généthon. Je te remercie pour la transmission de ta rigueur, mais également ta joie de vivre au quotidien. Je te remercie encore d'avoir accepté de m'accompagner sur ce travail de rédaction de thèse du début à la fin et pour ta présence ce jour. Je te souhaite le meilleur pour la suite, tant au niveau professionnel que personnel.

Le Docteur Madame Mathilde Lucas. Je te remercie pour ta bonne humeur, ton sourire rayonnant et ton leadership, tu m'as transmis des valeurs essentielles à la bonne conduite d'un mandat associatif lors de notre année passée au sein du bureau de Pharm&Cie. Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury, je te remercie pour tes retours constructifs sur le manuscrit de thèse, et pour ta présence aujourd'hui. J'ai pris plaisir à écouter ta douce voix.

Mes parents, Agnès et Patrick. Je vous remercie d'avoir toujours été derrière moi, de m'avoir fait confiance, en me donnant de l'amour pour que je puisse réussir mes projets, professionnels et personnels. Sans vous, tout aurait été plus difficile, vous avez été d'un soutien indescriptible. Je suis extrêmement fière de vous, et d'être votre fille. Je vous aime.

Ma sœur, Maéva. Je te remercie tout d'abord pour ta présence, car tu es venue de loin. Je te remercie pour ton amour, tu m'as transmis ton ouverture d'esprit, tu m'as tant inspirée depuis des années. Je te remercie sincèrement pour ton soutien. Je t'aime et je te souhaite le meilleur.

Florent. Je te remercie pour ton amour, sincère et authentique. Tu es mon pilier depuis 2017, tu as toujours été là pour me relever et me faire sourire. Ma vie est tellement belle et spontanée à tes côtés, grâce à ton humour et ta bienveillance. Je t'aime du plus profond de mon cœur.

Marlène, mon ça, toujours là pour moi depuis plus de 10 ans, toujours présente, malgré la distance. Je te remercie pour tout ton amour, ta folie et ta sincérité. Tu es une femme merveilleuse, lumineuse et forte, tu mérites d'être heureuse. Je t'aime fort.

Tou(te)s mes ami(e)s. Vous avez joué un rôle immense dans la réussite de mes études, j'ai appris tellement en échangeant avec vous, et je continue de le faire chaque jour qui passe. Tous ces moments de bonheur et de joie sont gravés à jamais dans ma mémoire. Je suis persuadée que d'autres vont s'ajouter à cette longue liste. Je vous remercie, vous qui êtes présents ce soir pour moi, vous qui avez fait de la route pour me voir. Je suis pleine de gratitude. Je vous aime.

Tou(te)s mes collègues. Vous, que j'ai croisé lors de mon parcours universitaire et/ou professionnel, je vous remercie pour votre temps, votre partage, j'ai passé de superbes moments à vos côtés et j'en ai appris tellement grâce à vous. Ces multiples échanges m'ont permis de comprendre ce que je voulais réellement faire comme métier et dans quel environnement de travail je voulais travailler. Je vous remercie tous et toutes avec le cœur.

Vous tou(te)s. Je tenais également tout simplement à vous remercier, pour le temps que vous m'avez accordé à lire cette thèse et à venir ce jour, qui est tant important pour moi.

Table des matières

Introduction	5
I. Description du syndrome de Crigler-Najjar	6
1. La découverte du syndrome de Crigler-Najjar	6
2. Syndrome de Crigler-Najjar : État des lieux en 2022	8
a. Transmission du syndrome	8
b. Diagnostic du syndrome.....	11
c. Les risques de toxicité du syndrome	15
d. Traitements actuels du syndrome	19
3. Enjeux de la recherche clinique dans le syndrome de Crigler-Najjar.....	29
II. Mise en place et surveillance d'un traitement par thérapie génique dans le traitement du syndrome de Crigler-Najjar (CareCN).....	33
1. Description du traitement développé par les experts du Généthon	33
a. Principes généraux de la thérapie génique	33
b. Les caractéristiques du virus sélectionné pour ce traitement	34
2. Surveillance du traitement par thérapie génique lors des phases cliniques.....	39
a. Les risques observés dans la littérature avec les thérapies géniques	39
b. Principales caractéristiques de l'essai clinique CareCN	46
c. Particularités réglementaires des essais cliniques par thérapie génique.....	50
d. Premiers résultats d'efficacité de l'essai clinique CareCN	52
Conclusion.....	53
Bibliographie.....	55

Abréviations

(r)AAV	AdénoVirus Associé (recombinant)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AE	Adverse Event (Effets indésirables : EI)
ALAT	ALanine AminoTransférase
ASAT	ASpartate AminoTransférase
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
B/A	Bilirubine/Albumine
BPAR	Biopsy-Proven Acute Graft Rejection
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CN	Crigler-Najjar
CTFG	Clinical Trials Facilitation and Coordination Group
EASL	European Association for the Study of the Liver
EBV	Epstein-Barr Virus
EMA	European Medicines Agency (Agence Européenne des Médicaments)
ESGCT	European Society of Gene and Cell Therapy
GVHD	Graft Versus Host Disease
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HSV	Herpès Simplex Virus
ICH	International Conference on Harmonization
IFN	Interférons
ITR	Inverted Terminal Repeats
IV	Intraveineuse
kb	kilobases
kDa	Kilos Dalton
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities (Dictionnaire Médical pour les Activités Règlementées)
NAb	Neutralizing Antibodies
NHP	Non-Human Primate
nm	nanomètres
pA	queue poly-A
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTLD	Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders
RCP	Résumé des Caractéristiques du Produit
SAE	Serious Adverse Event (Effets indésirables graves : EIG)
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
SNC	Système Nerveux Central
SOC	System Organ Class
TLR	Toll-Like Receptors
TNF	Tumor Necrosis Factor – facteur de nécrose tumorale
UDP	Uridine diphosphate
UGT1A1	Uridine diphosphate-GlucuronosylTransférase 1A1
UGT	Uridine diphosphate Glucuronosyl Transférase
Vg/kg	Vector genome / kilograms
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
XLMTM	Myopathie Myotubulaire Liée au chromosome X

Introduction

L'ictère (jaunisse) est un problème fréquemment rencontré en néonatalogie et en pédiatrie malgré les progrès importants réalisés ces dernières années dans la prise en charge de l'hyperbilirubinémie (taux de bilirubine élevé dans le sang). Cinquante pourcents des nouveau-nés à terme et quatre-vingts pourcents des nouveau-nés prématurés développent une jaunisse néonatale dans les quatre premiers jours de vie. La plupart du temps, cette hyperbilirubinémie est physiologique. Elle est le résultat d'une dégradation importante des globules rouges ainsi qu'une diminution de l'excrétion de la bilirubine.(1) En effet, la durée de vie des globules rouges chez les nouveau-nés, et particulièrement chez les prématurés, est plus faible que chez l'adulte avec un renouvellement plus fréquent.(2) De plus, le foie est immature, l'activité de la glucuronosyl transférase est encore faible alors que la circulation entéro-hépatique est augmentée. Dans la littérature, on observe que les nourrissons allaités au sein exclusivement sont plus susceptibles de développer un ictère physiologique au cours de la première semaine de vie. Cela pourrait s'expliquer par un apport calorique inférieur au lait industriel ainsi qu'une circulation entéro-hépatique accrue.(3)

Parmi les autres causes possibles d'hyperbilirubinémie, la maladie de Gilbert, découverte en 1901, est une affection hépatique qui touche environ 4 à 16% de la population et est plus fréquente chez les humains de sexe masculin.(4) Elle est à différencier du syndrome de Crigler-Najjar (CN), qui est une maladie héréditaire autosomique récessive extrêmement rare. La prévalence de ce syndrome CN est estimée à moins d'une naissance sur un million dans le monde.(5,6) Celui-ci est caractérisé par l'absence ou la diminution de l'activité de l'uridine diphosphate-glucuronosyltransférase 1 (UGT1A1), une enzyme nécessaire à la glucuronidation de la bilirubine non conjuguée dans le foie, permettant physiologiquement son élimination. (7) Cette diminution (ou absence) de l'activité enzymatique de l'UGT1A1 entraîne un taux élevé de bilirubine non conjuguée dans le sang (sérum), apparaissant généralement dans les jours suivant la naissance de l'enfant, et persistant dans le temps, sans traitement. Au niveau clinique, cela s'exprime par un ictère cutanéomuqueux franc, visible à l'œil nu : la peau, les muqueuses ainsi que les globes oculaires sont plus jaunes que la moyenne.(8) A long terme, le principal risque est la toxicité neurologique, entraînée par l'accumulation de bilirubine, qui peut mettre en jeu le pronostic vital des patients atteints de ce syndrome, ou leur causer de sévères handicaps. Il existe aujourd'hui deux types de syndrome (I et II) que nous détaillerons par la suite.

Les traitements développés par thérapie génique sont des médicaments de thérapie innovante. Après plusieurs dizaines d'années de recherche fondamentale et de tests précliniques sur les animaux, ceux-ci sont testés chez l'humain depuis environ 20 ans.(9) Innovants, mais aussi très controversés pour leurs effets indésirables spécifiques, notamment hépatiques(10) dus à une réponse du système immunitaire chez les patients traités, nous verrons que leur balance bénéfice risque doit toujours être estimée et discutée.

Le premier objectif de cette thèse est de comprendre l'enjeu d'un traitement par thérapie génique pour les personnes atteintes du syndrome de Crigler-Najjar ainsi que leur entourage, cette maladie ayant un large impact sur la durée de vie (« espérance de vie »), mais aussi sur la qualité de vie. Le deuxième objectif est d'étudier le traitement par thérapie génique mis au point par les experts du Généthon dans cette pathologie. Enfin, reconnaître les potentiels effets indésirables connus associés aux thérapies géniques pour comprendre la mise en place des mesures de gestion des risques dans les essais cliniques réalisés chez la personne humaine.

I. Description du syndrome de Crigler-Najjar

1. La découverte du syndrome de Crigler-Najjar

Le syndrome de Crigler-Najjar (CN) a été reconnu pour la première fois dans trois familles consanguines (affiliées par le sang), chez six enfants. Ces cas ont été rapportés dans la littérature médicale en 1952 par le docteurs John Fielding Crigler et Victor Assad Najjar, qui ont donné leurs noms au syndrome par la suite.(11) Ces six enfants ont développé des symptômes à type d'ictère dès les premiers jours de vie (ictère néonatal) ou durant leur enfance. Ces patients présentaient une hyperbilirubinémie dite sévère, c'est-à-dire que leur concentration sanguine en bilirubine non conjuguée était très élevée : autour de 340 $\mu\text{mol/L}$ (soit 20 mg/dL). A titre de comparaison, les valeurs normales dans la population générale sont situées entre 3,4-20 $\mu\text{mol/L}$ (soit 0.2-1.2 mg/dL) chez l'enfant de plus d'un mois et l'adulte, soit plus de 16 fois inférieures.(5) Dans le syndrome de Gilbert, les concentrations en bilirubine non conjuguée sont, en général, plus basses que celles retrouvées chez les patients CN. On parle alors d'hyperbilirubinémie modérée c'est-à-dire entre 20 et 100 $\mu\text{mol/L}$ (soit 1.2-6 mg/dL)(12). En 1962, le docteur Arias a signalé dans la littérature une autre version de ce trouble, plus légère appelé aujourd'hui le syndrome de Crigler-Najjar de type II, mais aussi syndrome d'Arias.(13)

Il faudra néanmoins attendre 1969 pour qu'on puisse distinguer clairement les deux types de syndrome (type I et type II), grâce à la réponse thérapeutique à la molécule Phénobarbital.(14) En effet, la prise du médicament contenant la molécule de Phénobarbital permet une diminution d'environ 70% de la bilirubinémie en trois semaines chez les patients atteints du syndrome de type II. Ceci n'a malheureusement pas été observé chez les patients atteints du syndrome de type I : la prise de Phénobarbital n'ayant aucun effet chez ces patients.

Par ailleurs, une faible activité enzymatique (15%) de l'UDP (Uridine diphosphate)-glucuronosyltransférase est détectée chez les patients atteints du syndrome de type II, alors qu'aucune activité n'est détectée chez les patients atteints du syndrome de type I.(15) Le risque principal de ce syndrome (type I et II) est l'évolution vers une encéphalopathie bilirubinique (appelé aussi ictère nucléaire) qui se manifeste par une hypertonie, surdité, paralysie oculomotrice et/ou léthargie. En général, les patients atteints du syndrome CN de type II ont des symptômes cliniques moins intenses et peuvent parfois vivre jusqu'à l'âge adulte sans avoir de séquelle neurologique, en comparaison avec les patients atteints du syndrome de type I chez qui le risque de toxicité neurologique est plus accru. Cependant, le risque n'est à écarter dans aucun des cas et les patients doivent être surveillés de manière quotidienne.(16)

Un tableau récapitulatif des caractéristiques des deux types de syndrome est disponible ci-dessous pour plus de clarté.

Tableau 1: Tableau récapitulatif des différences entre les deux types de syndrome de Crigler-Najjar

	Syndrome de type I	Syndrome de type II
Bilirubinémie(17)	20-40 mg/dL ou 342-684 μ mol/L	6-20 mg/dL ou 103-342 μ mol/L
Activité de l'UDP-glucuronosyltransférase	Absente (0%)	Faible (15%)
Intensité des symptômes cliniques et sévérité	Très sévère Symptômes plus intenses que le type II : peut évoluer vers une encéphalopathie bilirubinique (ictère nucléaire)	Sévère Symptômes moins intenses que le type I, le risque d'ictère nucléaire est beaucoup plus faible, mais n'est pas à écarter
Effets du phénobarbital	Pas de baisse de la bilirubinémie	Baisse de la bilirubinémie (70% environ en 3 semaines)
Traitements possibles	Photothérapie Transplantation hépatique	Phénobarbital Photothérapie Transplantation hépatique

2. Syndrome de Crigler-Najjar : État des lieux en 2022

Aujourd'hui, on recense moins de 20 cas de personnes atteintes du syndrome de Crigler-Najjar en France, et seulement quelques centaines en tout dans le monde. Il y a, malgré tout, une présence du syndrome de type I plus marquée dans les populations Amish et Mennonite de Pennsylvanie et du Midwest des États-Unis.(18)

a. Transmission du syndrome

Le syndrome de Crigler-Najjar est une maladie génétique qui a une transmission autosomique récessive. Une transmission autosomique signifie que la mutation du gène responsable de la maladie est située sur un des 22 chromosomes non sexuels.

Chaque individu possède deux allèles de chaque gène, hérités de ses deux parents. Chaque allèle peut être muté = non fonctionnel ou non porteur de la maladie = sain, fonctionnel.

Une transmission récessive signifie qu'il faut que les deux copies reçues du gène soient non fonctionnelles pour que la maladie s'exprime chez la descendance. Autrement dit, un patient atteint du syndrome de Crigler-Najjar a forcément reçu deux copies non fonctionnelles du gène responsable de la maladie. Si un individu possède un allèle normal et un allèle anormal, il n'aura pas de symptôme clinique et ne sera donc pas atteint de la maladie de Crigler-Najjar.

Il existe quatre schémas de transmission possibles, que nous allons détailler ci-après.

Les ronds bleus représentent les allèles fonctionnels et les ronds rouges représentent les allèles non fonctionnels. Les personnages bleus représentent les personnes non porteuses de la maladie, c'est-à-dire les homozygotes sains (qui ont 2 allèles identiques pour l'allèle normal).

Les personnages violets représentent les porteurs de la maladie qui ne sont pas malades, c'est-à-dire les hétérozygotes (qui ont 2 allèles différents). Les personnages rouges représentent les personnes atteintes de la maladie, ils sont homozygotes anormaux pour l'allèle non fonctionnel.

1^{er} cas de figure : Aucun des deux parents n'est malade, cependant l'un des deux parents est porteur de l'allèle non fonctionnel.

Il y a 50% de chance que la descendance directe soit hétérozygote, c'est à dire porteuse de la maladie mais non malade, et 50% de chance que la descendance directe soit homozygote pour l'allèle normale, c'est-à-dire non porteuse de la maladie, et non malade.

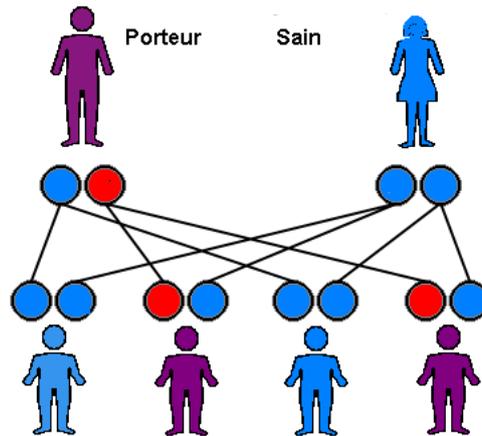


Figure 1 : Schéma transmission génétique d'un porteur et d'un non porteur (Source : <https://crigler-najjar.fr/>)

2^{ème} cas de figure : Les deux parents sont porteurs de l'allèle non fonctionnel mais aucun des deux n'est malade (hétérozygotes).

Il y a 25% de chance que la descendance directe soit non porteuse de l'allèle muté (homozygote pour l'allèle normale), 50% de chance que la descendance directe soit hétérozygote, c'est à dire porteuse de la maladie mais non malade et 25% de chance que la descendance directe soit atteinte de la maladie, porteuse de deux allèles non fonctionnels.

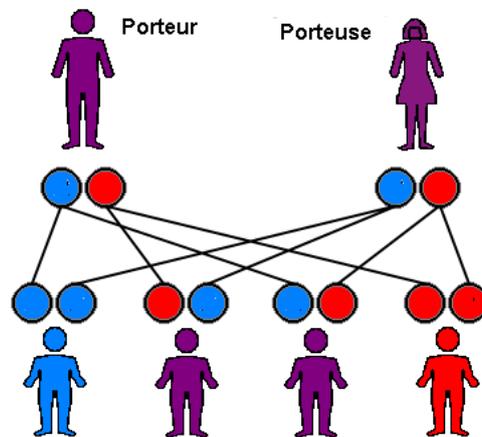


Figure 2 : Schéma transmission génétique de deux porteurs (Source : <https://crigler-najjar.fr/>)

3^{ème} cas de figure : L'un des parents est malade (homozygote anormal), et l'autre est non porteur (homozygote sain).

Il y a 100% de chance que la descendance soit porteuse de l'allèle muté et de l'allèle normal, c'est-à-dire hétérozygote.

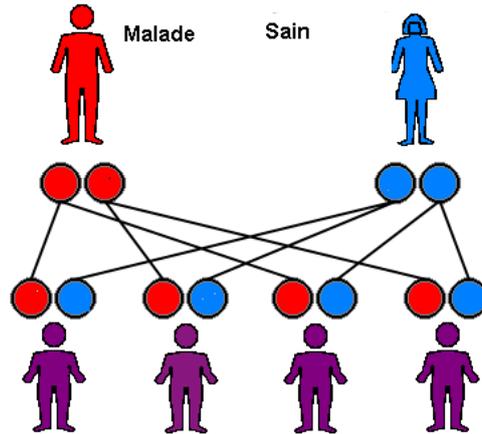


Figure 3: Schéma transmission génétique d'un porteur et d'un malade (Source : <https://crigler-najjar.fr/>)

4^{ème} cas de figure : Les deux parents sont malades.

Il y a 100% de chance que la descendance directe soit atteinte de la pathologie, c'est-à-dire homozygote pour l'allèle muté/non fonctionnel/anormal.

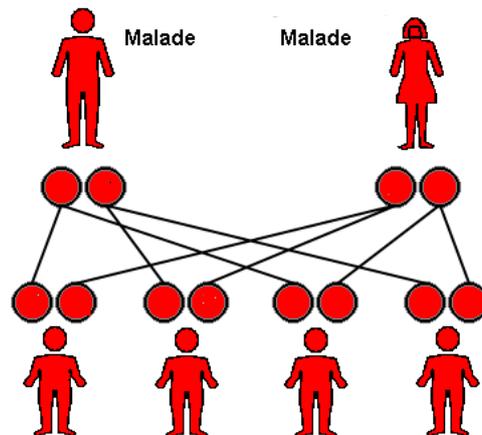


Figure 4: Schéma transmission génétique de deux malades (Source : <https://crigler-najjar.fr/>)

Très souvent, les personnes hétérozygotes ne sont pas au courant qu'elles sont porteuses de de la maladie car elles ne sont pas malades, sauf si elles ont découvert qu'il y avait une personne atteinte de ce syndrome dans leur descendance directe ou dans la famille, et ont fait des tests génétiques ensuite. En 2022, ces tests génétiques ne sont pas systématiquement réalisés avant chaque naissance, ce qui contribue à la propagation de la maladie dans le monde.

b. Diagnostic du syndrome

Au départ, le diagnostic différentiel et le diagnostic des deux types de syndrome CN ne reposait que sur la composition pigmentaire de la bile en bilirubine, déterminée par chromatographie liquide haute performance, abrégée HPLC (19). Aujourd'hui, le diagnostic du syndrome de Crigler-Najjar est constitué à partir de plusieurs paramètres : cliniques, biologiques, chimiques et génétiques. Nous allons les passer en revue un à un dans la suite de cette partie.

- **Paramètres cliniques**

La jaunisse de la peau, des globes oculaires et des muqueuses, appelée ictère, est le symptôme qui apparaît le plus rapidement, parfois après seulement quelques jours, voire quelques heures de vie, de manière très intense et persistante.

Les photos ci-dessous montrent des ictères cutanéomuqueux très prononcés.



Figure 5 : Photo de jumeaux dont un est atteint du syndrome de Crigler-Najjar (Source : <https://crigler-najjar.fr/la-maladie/>)



Figures 6 et 8 : Photo d'une jaunisse chez un adulte (Source : <https://afef.asso.fr/la-maladie/maladies/jaunisse-ictere/>)

Il s'agit en général du symptôme qui alerte les professionnels de santé et/ou pousse les parents à consulter un professionnel de santé si ce symptôme apparaît alors que les parents ne sont plus à la maternité. L'ictère du nouveau-né (néonatal) est très fréquent dans les premières semaines de vie (60-80% des naissances), et est considéré, la plupart du temps, comme physiologique.(20) En effet, le métabolisme de la bilirubine doit s'adapter à la vie extra-utérine après la naissance et évolue durant les quinze premiers jours de la vie du nouveau-né.(1) Le métabolisme de la bilirubine n'est totalement mature qu'au bout de quelques mois.

Cependant, toute survenue d'un ictère néonatal doit être surveillée précautionneusement. Dans la grande majorité des cas, il y a une hyperbilirubinémie associée à type de bilirubine non conjuguée. Nous ne parlons pas ici des ictères à bilirubine conjuguée (patients présentant un taux très élevé de bilirubine conjuguée mais ayant un taux de bilirubine non conjuguée normal), qui sont des urgences vitales requérant une prise en charge spécialisée.(20) La dangerosité des ictères à bilirubine non conjuguée est directement corrélée à la durée d'exposition à ces taux.

Dans l'ictère néo-natal physiologique, la bilirubinémie reste inférieure à 300 $\mu\text{mol/L}$ et se résout généralement après deux semaines de vie. Une prise en charge médicale et biologique est nécessaire si ce taux d'alerte est atteint (300 $\mu\text{mol/L}$), afin de traiter les patients et de comprendre l'origine étiologique de l'ictère, sa gravité et mettre en place un suivi thérapeutique.(2,20)

Le diagnostic différentiel permet de différencier une maladie d'autres pathologies qui présentent des symptômes proches ou similaires, ici par exemple les autres pathologies provoquant des ictères néonataux. Au niveau clinique, il n'existe pas de signe pathognomonique (symptôme ou signe spécifique d'une maladie) du syndrome de Crigler-Najjar, c'est l'ensemble des paramètres qui permettent de poser le diagnostic.

- **Paramètres biologiques**

Le dosage de la bilirubine dans le sang est rapidement proposé après la description d'un ictère chez un nouveau-né. Des prélèvements de sang et des urines du patient sont effectués puis analysés par HPLC. Pour le syndrome de Crigler-Najjar, les résultats montrent une bilirubinémie (totale) très élevée, de type bilirubine non conjuguée. En effet, la bilirubinémie conjuguée reste dans la norme, alors que la bilirubinémie non conjuguée est bien au-dessus des limites supérieures des valeurs normales. La bilirubinémie totale est également augmentée, à cause de l'augmentation de la bilirubinémie non conjuguée.

Ce taux en bilirubine sanguine rentre en compte dans le choix des traitements (photothérapie, transfusion sanguine et transplantation hépatique qui seront détaillés par la suite).(21)

L'accumulation de bilirubine non conjuguée peut également s'apprécier avec le calcul du rapport (ou ratio) molaire Bilirubine/Albumine (B/A). Il s'agit d'un rapport entre le nombre de molécules de Bilirubine et le nombre de molécules d'Albumine. Chez une personne saine, c'est-à-dire sans altération/déficit enzymatique et n'ayant pas de symptôme hépatique, ce rapport molaire est de 0,01. En effet, physiologiquement dans le sang, presque la totalité (99%) des molécules de bilirubine non conjuguée se lie à l'albumine, via les sites de liaison présents sur les molécules d'albumine.(21) Cela signifie qu'il y a, dans la population générale, 100 fois plus de molécules d'albumine que de molécules de bilirubine dans le sang. Chez les personnes atteintes du syndrome de Crigler-Najjar ce rapport moléculaire peut atteindre 1, c'est-à-dire qu'il y aurait autant de molécules d'albumine que de molécules de bilirubine dans le sang.

La bilirubine non conjuguée étant une substance liposoluble, elle a une forte affinité pour les lipides, dont certains se trouvant dans le système nerveux central (SNC).(22) Le complexe Bilirubine/Albumine étant trop volumineux, il ne peut pas passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et ne peut pas passer dans le cerveau : il n'y a pas de toxicité induite par la bilirubine. Cependant, s'il y a une accumulation trop importante de bilirubine non conjuguée dans le sang, il n'y a plus assez de molécules d'albumine disponibles pour se lier à la bilirubine et former ce complexe Bilirubine/Albumine. Ainsi, la bilirubine non conjuguée est sous forme libre et peut passer la BHE et s'accumule dans le cerveau. Ceci peut engendrer une toxicité neurologique dont nous verrons les conséquences dans la prochaine partie ci-après.(21) La surveillance de rapport molaire Bilirubine/Albumine peut servir à estimer le risque de toxicité encéphalique et permet d'adapter la prise en charge médicale associée. A noter que ce rapport Bilirubine/Albumine peut varier au cours de la vie d'un patient et doit donc être surveillé continuellement.

Le dosage de l'hémoglobine, des réticulocytes et l'analyse de la morphologie des globules rouges constituent des paramètres du diagnostic biologique différentiel. En effet, dans le syndrome de Crigler-Najjar ces paramètres sont normaux, ce qui permet d'écarter les pathologies où les patients présentent une hémolyse.(20) On peut citer notamment les anémies hémolytiques où les patients présentent une anémie avec réticulocytose, avec une morphologie des globules rouges altérée. Ces affections peuvent être aiguës, chroniques, de pronostic variable et causées par différentes étiologies.(23)

Il en est de même pour les dosages de l'alanine amino-transférase (ALAT), l'aspartate amino-transférase (ASAT), la phosphatase alcaline, la gamma-glutamyl-transférase, le taux total de protéine et l'albuminémie qui reviennent normaux chez les patients CN. Il n'y a, par ailleurs, pas d'autres signes d'atteinte hépatique au niveau biologique chez les patients atteints du syndrome CN.(17)

- **Paramètres chimiques**

Comme nous l'avons vu précédemment, la réponse à la thérapie par le Phénobarbital fait partie du diagnostic du syndrome de Crigler-Najjar, notamment dans la distinction des deux types de syndrome (type I et type II). Nous détaillerons le mécanisme d'action du Phénobarbital dans la partie I.2.d. Traitements actuels du syndrome dans la suite de cette thèse.

- **Paramètres génétiques**

Le syndrome CN est provoqué par une mutation génétique apparaissant parmi les cinq exons du gène codant pour l'UDP-GT sur les chromosomes humains n°2 et n°4.(24) Le séquençage du gène UGT1A1, c'est-à-dire la lecture des bases d'ADN du génome du patient, est alors requis pour le diagnostic moléculaire. L'ADN du patient est extrait à partir d'une prise de sang permettant de récupérer les lymphocytes circulants périphériques.(7) Après amplification par méthode PCR (polymerase chain reaction) du promoteur, des cinq exons et des régions introniques, la mesure est réalisée par la technique de séquençage de Sangler®.(17)

Il existe de multiples mutations possibles sur le gène UGT1A1 : plus de cent mutations ont été rapportées sur ce gène dans la base de données des mutations génétiques humaines, au niveau des exons, des introns, de la séquence par exemple. Le syndrome de Gilbert (GS pour Gilbert Syndrome) se caractérise par une diminution de l'activité de l'UGT1A1 d'environ 25 à 30 % à la suite de mutations homozygotes, hétérozygotes composées ou hétérozygotes de l'UGT1A1.(17) Dans la littérature, la plupart des patients atteints du syndrome CN de type II présentent des mutations homozygotes faux sens qui réduisent l'activité enzymatique à moins de 10 % de la normale.(12) Au contraire, les mutations associées au syndrome CN de type I sont souvent des mutations non-sens qui compromettent la totalité de l'activité enzymatique : codons stop prématurés, mutations d'insertion/délétion, mais aussi des substitutions de nucléotides critiques.(17)

Ce diagnostic moléculaire permet d'apporter une réponse rapide et évite au patient de devoir réaliser une biopsie hépatique pour mesurer l'activité enzymatique.(7)

c. Les risques de toxicité du syndrome

Aujourd'hui, le risque clinique principal du syndrome de Crigler-Najjar est la toxicité neurologique, induite par une bilirubinémie très fortement élevée.

La bilirubine est un dérivé pigmentaire constitué d'une chaîne de 4 noyaux pyrroles, que l'on peut voir dans la représentation de la molécule ci-dessous.

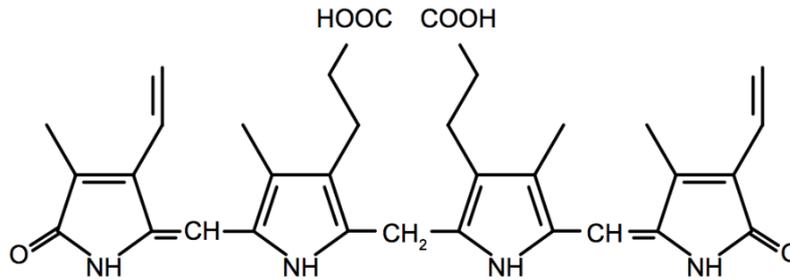


Figure 7 : Molécule chimique de bilirubine (Source : <https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/physrev.00004.2019>)

Physiologiquement, les globules rouges contiennent de l'hémoglobine et ont une durée de vie assez courte, de 120 jours. Lors de leur dégradation, l'hème et la globine se séparent. Ensuite, le catabolisme de l'hème, c'est à dire sa décomposition, produit du fer, du monoxyde de carbone et de la biliverdine qui est un pigment vert. Cette biliverdine est convertie en bilirubine non conjuguée par l'action d'une enzyme (réductase). La bilirubine non conjuguée étant liposoluble (soluble dans les corps huileux) et hydrophobe (insoluble dans les milieux aqueux), il est nécessaire qu'elle soit sous forme conjuguée pour être excrétée vers l'intestin par la bile.

L'albumine est la protéine sanguine majoritaire dans le plasma humain, sa masse est estimée à 65 kDa (kilo Dalton). Sa fonction principale est de réguler la pression oncotique sanguine, c'est-à-dire la pression osmotique exercée par les protéines dans le plasma d'un vaisseau sanguin.

Pour cela, elle joue un vrai rôle de transporteur dans le sang, pour des substances exogènes (produites hors de l'organisme) et endogènes (produites dans l'organisme).(25) Ainsi, la bilirubine non conjuguée se lie, de façon physiologique, à l'albumine pour être acheminée vers le foie depuis la circulation sanguine. A son arrivée dans le foie, l'UDP-GT convertit la bilirubine non conjuguée en bilirubine conjuguée par mécanisme de glucuronidation (ajout de dérivés glucuronisés à la Bilirubine) afin de permettre son excrétion vers l'intestin, à l'aide de protéines.(26) Le schéma ci-dessous illustre le mécanisme de la bilirubine décrite dans ce paragraphe.

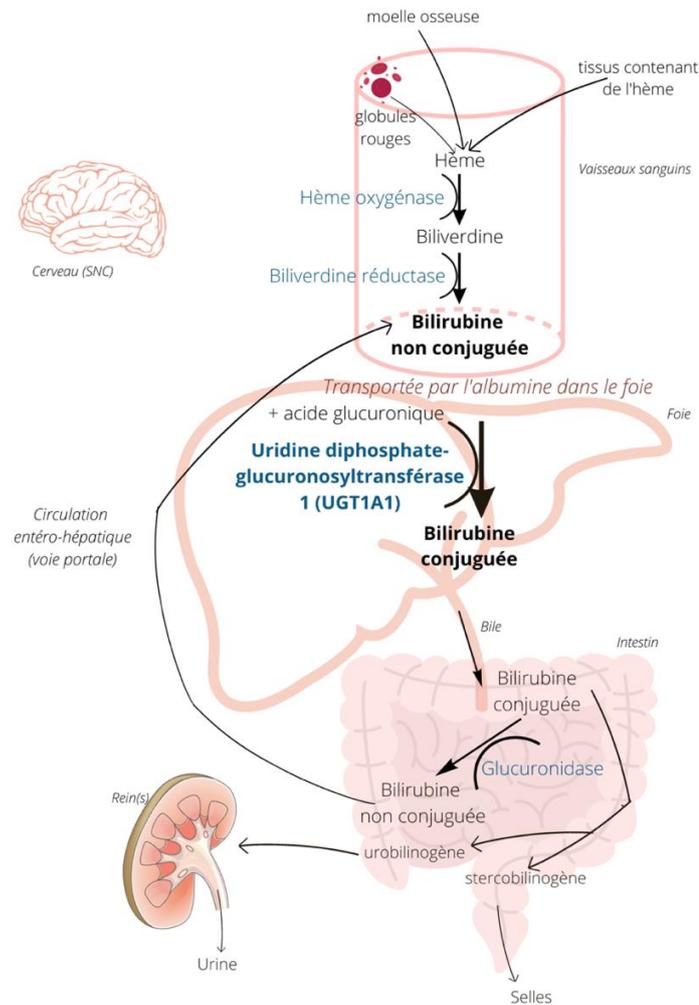


Figure 8 : Métabolisme de l'hème (Source : <https://obgynkey.com/19-jaundice/>)

Si une mutation génétique est présente dans la séquence du gène UGT1A1, comme dans le syndrome de Crigler-Najjar, on observe une absence ou diminution de son activité enzymatique : la conjugaison de la bilirubine ne peut pas s'effectuer (ou s'effectue trop faiblement), la bilirubine reste sous forme non conjuguée et s'accumule dans la circulation sanguine.(11)

Cette accumulation entraîne, dans un premier temps, un ictère au niveau clinique. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, la bilirubine a une forte affinité pour les structures lipidiques. Le SNC (système nerveux central) est la partie du système nerveux qui comporte la moelle spinale et l'encéphale. Il est séparé de la circulation sanguine par une membrane physiologique, la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui ne laisse passer par diffusion libre que de petites molécules lipophiles.

Le complexe Bilirubine/Albumine est considéré comme une « grosse molécule » ayant une masse moléculaire importante et ne passe pas la BHE librement. Toutefois, si la bilirubine non conjuguée circule dans le sang sous forme libre (= non liée à l'albumine) elle va pouvoir passer facilement la barrière hémato-encéphalique (BHE) et se retrouver dans le cerveau, où elle va s'accumuler car il n'y a pas de mécanisme d'élimination spécialisé. Le schéma ci-dessous illustre le mécanisme de la bilirubine lorsqu'il y a une mutation partielle ou complète de l'UGT1A1 spécifique du syndrome de Crigler-Najjar.

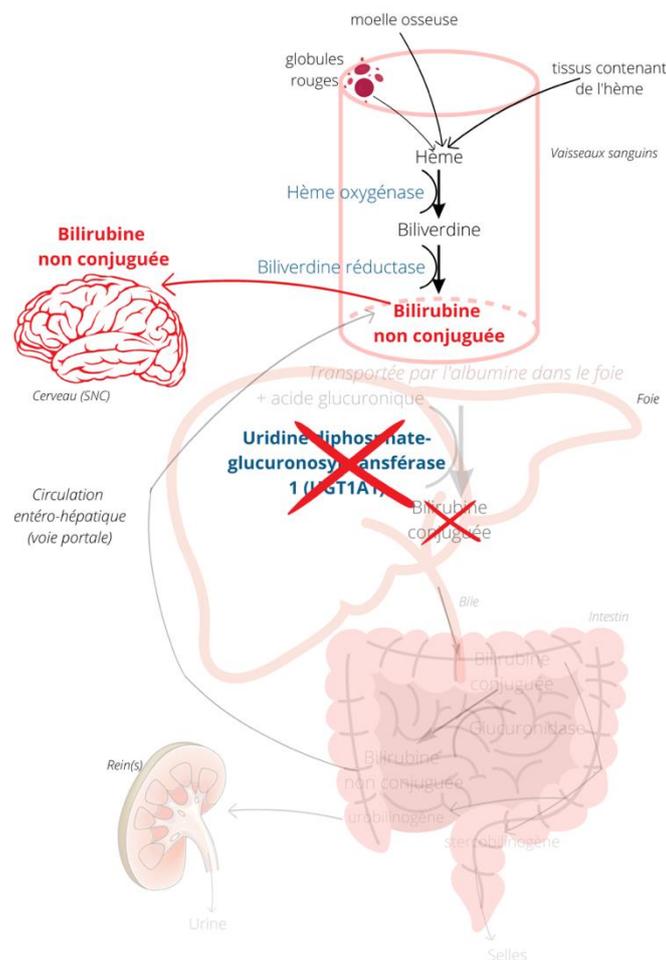


Figure 9 : Métabolisme de la bilirubine en cas de mutation génétique de l'UGT1A1

L'atteinte neurologique, appelée aussi dysfonction neurologique induite par la bilirubine (BIND pour Bilirubin induced neurological dysfunction en anglais) entraîne des séquelles neurologiques graves, réversibles au départ mais pouvant devenir rapidement irréversibles, notamment lorsqu'on atteint le stade de l'ictère nucléaire.(6)

Au stade de l'ictère nucléaire, on observe une atteinte des noyaux gris centraux, où se trouvent des dépôts de bilirubine donnant une couleur jaune à ceux-ci.(7) Une dyspnée, un désintérêt général, une apathie associée à des signes extrapyramidaux comme l'hypertonie musculaire et l'hyper-extension de la nuque sont présents et peuvent mener au coma. Cliniquement, on peut observer des troubles du tonus extrêmement sévères, des troubles de la déglutition, des troubles de l'élocution, une surdité, et un ralentissement intellectuel. Cet état peut s'améliorer dans les jours suivants, mais le patient conservera de séquelles neurologiques lourdes, et peut devenir handicapé moteur et/ou mental. La survenue d'un décès quelques jours après est également un risque possible.(7)

Ce risque d'encéphalopathie est directement corrélé au rapport molaire sanguin Bilirubine/Albumine dont nous avons parlé dans un précédent paragraphe : ils augmentent dans le même sens. Le tableau ci-dessous détaille certains seuils du rapport B/A utilisés en clinique pour évaluer le risque neurologique. En pratique, pour les patients atteints du syndrome de type I, les cliniciens essaient de maintenir des seuils < 0,5 chez les nouveau-nés pour avoir un risque faible d'encéphalopathie, et un seuil entre 0,5 et 0,7 chez les enfants et les adultes.(18) Pour rappel, chez les individus sains, le rapport est généralement de 0,01.

Tableau 2 : Correspondance entre B/A ratio et risque (Source : <https://crigler-najjar.fr/rapport>)

Rapport Bilirubine/Albumine (sang)	Risque d'encéphalopathie
< 0,5	Faible
Entre 0,5 et 0,7	Modéré
Entre 0,7 et 1	Élevé
> 1	Très élevé = URGENCE VITALE

L'atteinte neurologique peut survenir à tout âge, aussi bien chez le nouveau-né, que pendant l'enfance, l'adolescence ou à l'âge adulte. Le risque peut être majoré dans certaines situations, parce que celles-ci induisent une accentuation de l'hyperbilirubinémie. On peut notamment citer les infections, les périodes de jeûne, la fatigue accumulée, les périodes de stress ou lorsque le traitement symptomatique est interrompu, par exemple la photothérapie que nous allons détailler juste après.(7) C'est principalement pour cette raison qu'une observance (adhésion du patient au traitement, respect des posologies, régularité de la prise des traitements...) est primordiale dans cette pathologie.

d. Traitements actuels du syndrome

A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif hormis la greffe hépatocellulaire, qui n'est pas sans conséquences au long terme et qui a ses limites. Cependant, il existe des traitements symptomatiques, que nous détaillerons ensuite, qui permettent aux patients de survivre avec leur maladie, et d'améliorer leur qualité de vie au quotidien.

La transplantation hépatique

Il s'agit d'une allogreffe, c'est-à-dire d'une greffe d'organe ou de cellules entre deux membres d'une même espèce. Dans le cadre d'une transplantation hépatique, l'organe est généralement obtenu à partir d'un donneur décédé par mort cérébrale : ayant un cœur fonctionnel qui continue de perfuser les organes. Une compatibilité du système sanguin est nécessaire entre le donneur et le receveur, au niveau du groupe sanguin ABO et du système HLA (Human Leukocyte Antigen).

Le système HLA est un système de reconnaissance propre à l'organisme appelé « complexe majeur d'histocompatibilité ». Les antigènes du système HLA sont des protéines présentes à la surface des cellules humaines. Elles permettent au système immunitaire de déterminer si une cellule est exogène ou endogène. Chaque individu a son propre typage HLA. Pour une greffe, plus les typages HLA entre le donneur et le receveur sont similaires, moins il y aura de risques de développement d'anticorps préformés contre les antigènes du donneur, plus le risque de rejet est faible. La recherche d'anticorps anti-HLA permet d'optimiser l'attribution des greffons, afin de limiter les risques de rejets et de réactions immunitaires en réaction à la greffe d'organe chez le receveur.

Ces deux facteurs limitent le nombre d'organes compatibles et disponibles au moment où le patient en a besoin. En effet, il peut s'écouler plusieurs années avant qu'il y ait un organe compatible. Il n'y a pas de limite d'âge supérieure pour le don de foie mais les foies de donneurs âgés de plus de 50 ans sont généralement moins souvent utilisés chez les enfants.(27)

Les risques associés à la transplantation hépatique sont importants, que ce soit au court terme (précoce) ou au long terme (tardif). Cela peut être dû à la survenue d'une septicémie (infection généralisée du sang), de troubles lymphoprolifératifs post-transplantation (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders PTL, en anglais), ou à cause d'une non observance du traitement immunosuppresseur.(27)

Le rejet de greffe est fréquent. Dans 40 à 70% des cas, il survient de manière aiguë, c'est-à-dire peu de temps après la greffe et est détecté par biopsie du greffon (BPAR : Biopsy-Proven Acute Graft Rejection), mais il peut également survenir plus tardivement.(28) Pour lutter contre le risque de rejet du greffon par le système immunitaire du patient, un traitement immunosuppresseur est mis en place pour le reste de la vie du patient. Les piliers historiques de la classe des immunosuppresseurs utilisés après transplantation d'organe solide (foie, rein, cœur) sont les inhibiteurs de la calcineurine : la ciclosporine (Cyclosporine A) et le tacrolimus.(29)

La ciclosporine est un polypeptide cyclique à onze acides aminés, isolé pour la première fois en 1971 à partir du champignon *Tolypocladium inflatum*. Le tacrolimus est une molécule de lactone macrolide isolée à partir de *Streptomyces tsukubaensis*. Les études mentionnées dans le RCP (Résumé des Caractéristiques du Produit) des médicaments contenant de la ciclosporine suggèrent que cette molécule inhibe les réactions immunitaires à médiation cellulaire, y compris l'immunité de l'allogreffe et la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD pour Graft Versus Host Disease en anglais). Le tacrolimus inhibe notamment la formation des lymphocytes cytotoxiques qui sont principalement responsables du rejet du greffon.(30)

La ciclosporine est métabolisée préférentiellement par les cytochromes P450 3A4 et minoritairement aux CYP 3A5, à l'inverse du tacrolimus.(31) Les deux molécules sont des inhibiteurs connus de la glycoprotéine P (ABCB1) qui est exprimée à de nombreuses interfaces (intestin, foie, reins).(32) Le génotype des cytochromes du donneur et du receveur doit être établi avant le don, afin d'ajuster les posologies et de surveiller l'évolution du patient greffé.(29)

Comme nous l'avons vu, le risque de rejet de greffe est plus important au cours des trois premiers mois post-greffe. Durant cette période, l'immunosuppression peut être renforcée par l'administration de stéroïdes cependant, ils sont ensuite généralement rapidement retirés, à cause du risque d'effets indésirables au long terme. L'azathioprine ou le mycophénolate mofétil peuvent également être utilisés pour renforcer l'immunosuppression en bithérapie associés à des stéroïdes ou en trithérapie associés à des stéroïdes et à un inhibiteur de calcineurine.(30,33)

La compliance du traitement (adhésion du patient et respect des posologies) est essentielle pour la survie du greffon et du patient : la non-compliance étant un risque de mortalité post-transplantation tardive.

Tous ces médicaments peuvent entraîner des effets indésirables, et augmentent grandement le risque d'infections ou d'aggravation d'infections préexistantes(18), puisque le système immunitaire est diminué. Dans la littérature, on peut citer notamment les cholangites bactériennes, les infections à cytomégalovirus (CMV) et Epstein-Barr Virus (EBV) dont peuvent découler des syndromes lymphoprolifératifs post-greffe, c'est-à-dire la survenue d'un lymphome B associé à la présence de l'EBV.(34) Les autres effets indésirables sont divers et peuvent être retrouvés sur le site de la base de données publique des médicaments.(30)

Dans une étude réalisée entre 1991 et 2018, le taux de survie à 10 ans post-transplantation des patients était de 100%, même si pour certains patients, il avait fallu plusieurs greffes d'organe (2 ou 3) avant qu'ils soient stabilisés. Les taux enzymatiques (ASAT/ALAT), les paramètres choléstatiques et les taux de bilirubine se situaient dans les limites de la normale.(34)

Une autre technique de greffe a été testée sur les patients atteints du syndrome de Crigler-Najjar : la transplantation de cellules hépatiques isolées. Les premiers essais ont été réalisés en 1998(28). La technique de transfusion intra portale (par la veine porte) de cellules hépatiques isolées est décrite par Ira J. Fox comme moins invasive donc plus sécuritaire pour le patient. En effet, l'architecture et la fonction du foie étant conservée dans ce syndrome, à l'exception de l'activité de l'UDP-GTc, cette technique permet de conserver la fonction de l'organe et de le préserver si d'autres troubles apparaissent dans la suite de la vie du patient. (28) C'est notamment une technique compatible avec des traitements par thérapie génique. Le patient reste éveillé pendant la transfusion d'hépatocytes.

Dans l'article de Ira J. Fox, on constate chez le patient atteint du syndrome CN de type I une nette augmentation de l'activité enzymatique de la bilirubine-UDP-GT (De 0,4% jusqu'à 5,5% de l'activité normale moyenne, 7 jours après l'intervention), ce qui suggère une potentielle efficacité. De plus, on observe sur les prélèvements biliaires des conjugués glucuronidés (diglucuronide de bilirubine) qui n'étaient pas présents avant la transfusion. Cependant, le patient a dû prendre du phénobarbital pour booster l'activité de l'enzyme au jour 7, continuer la photothérapie pendant plus de six heures tous les jours et a dû recevoir des antibiothérapies orales pendant plusieurs mois. Au final, la transfusion s'est bien déroulée et les hépatocytes isolés normaux reçus ont survécu pendant presque qu'un an post-transfusion, corrigeant partiellement un trouble métabolique d'origine hépatique.(28)

Le Phénobarbital

Les patients atteints du syndrome de Crigler-Najjar de type II peuvent prendre un traitement qui permet de diminuer leur hyperbilirubinémie : le Phénobarbital. Cette molécule peut également permettre de distinguer les deux types de syndrome CN lors du diagnostic, comme mentionné plus haut.

Le Phénobarbital, aussi connu sous le nom d'acide 5-phenyl-5-ethylbarbiturique, est un anticonvulsivant de la famille pharmacologique des dérivés barbituriques. Il a été introduit dans la pratique clinique en 1904 comme premier médicament antiépileptique, pour le traitement des crises d'épilepsie, grâce à son action sur les récepteurs GABA.(35)

Le phénobarbital est un inducteur enzymatique, il est métabolisé par les cytochromes hépatiques CYP450 2C9, 2C19 et 2E1 et augmente donc leur activité métabolique. Il n'est actif que sur les patients atteints d'un syndrome CN de type II car ils ont une activité enzymatique de l'UGT1A1, bien que faible (contrairement aux patients atteints du syndrome de type I chez qui il y a une absence totale d'activité). Ainsi, le Phénobarbital peut agir en tant qu'inducteur enzymatique et augmenter l'expression de l'enzyme UGT1A1. Cependant, le mécanisme exact reste encore inconnu.(36)

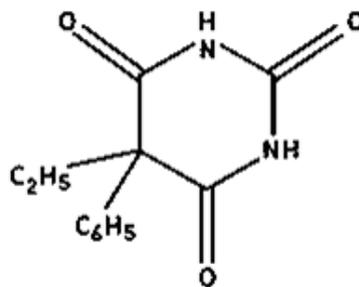


Figure 10 : Molécule chimique du Phénobarbital (Source : <https://doi.org/10.1051/medsci/2002184429>)

Les effets indésirables sont nombreux et dose dépendants.

Nous allons citer quelques effets indésirables « fréquents » (≥ 1 % mais < 10 %) tirés des différents RCP français, mais cette liste n'est pas exhaustive. Le RCP est le document clinique et médical obligatoire pour chaque médicament commercialisé en France, que l'on peut retrouver sur la base de données publique de l'Agence française, l'ANSM.(30)

- Affections du système nerveux : somnolence, troubles cognitifs, atteinte de la mémoire
- Affections psychiatriques : anomalies du comportement, agitation, agression
- Affections de la peau et du tissu sous-cutané : dermatite allergique (en particulier, éruptions maculo-papuleuses morbiliformes ou scarlatiniformes)
- Affections hépatobiliaires : augmentation des gammaglutamyltransférases, des transaminases et/ou des phosphatases alcalines
- Affections musculo-squelettiques et systémiques : rétraction de l'aponévrose palmaire (maladie de Dupuytren)
- Affections gastro-intestinales : nausées, vomissements

Par ailleurs, la prise prolongée de phénobarbital peut entraîner l'apparition d'un syndrome de dépendance. Ce traitement doit donc être bien encadré et s'il est arrêté (grossesse), son arrêt doit être progressif. Cela renforce l'importance pour le patient d'avoir un bon suivi médical.

Le phénobarbital peut entraîner des carences en certaines vitamines, notamment la vitamine D, essentielle au développement de la structure osseuse. Chez l'enfant soumis au traitement par le phénobarbital au long cours, il est recommandé d'ajouter un traitement préventif contre le rachitisme, comme la vitamine D2.

Concernant la toxicité materno-fœtale, le phénobarbital a la capacité de traverser le placenta maternel humain. Des malformations congénitales majeures, y compris les fentes labiales et palatines, ainsi que des troubles neuro-développementaux ont été rapportés chez des enfants dont la mère avait été traitée par Phénobarbital durant la grossesse. Le traitement par Phénobarbital doit être réévalué si la patiente a un souhait de conception ou lors de la découverte d'une grossesse. Ce traitement sera poursuivi chez la mère pendant la grossesse uniquement si le bénéfice est jugé supérieure aux risques. Un suivi du nouveau-né et de l'enfant exposé in-utero est fortement recommandé.(30)

Comme nous l'avons vu précédemment le Phénobarbital est un inducteur enzymatique des cytochromes P450. La prise d'un médicament de cette classe thérapeutique peut perturber l'assimilation d'autres molécules (médicaments, aliments, plantes, compléments alimentaires).(37) Le praticien doit alors connaître toutes les habitudes alimentaires et médicales du patient pour mesurer l'effet potentiel qu'aura le Phénobarbital et éviter que celui-ci n'induisse une diminution de l'efficacité d'un traitement ou une augmentation de la toxicité d'un autre.

En France, le phénobarbital est principalement utilisé pour traiter les crises épileptiques de type généralisées (cloniques, toniques, tonico-cloniques) ou partielles. Il s'utilise en monothérapie ou en association avec un autre traitement antiépileptique, chez les enfants et les adultes. Cette molécule est commercialisée en France aujourd'hui sous forme de comprimés de différentes doses de principe actif (10, 15, 50, 100 et 150 mg) mais également sous forme de poudres et solvants pour solution injectable (40mg/2mL ou 200mg/4mL). Certaines formulations incluent de la caféine pour atténuer la somnolence des débuts de traitements (dû au mécanisme d'action du Phénobarbital lui-même).(30) Trois laboratoires commercialisent cette molécule sous ces différentes formes pharmaceutiques : SANOFI-AVENTIS FRANCE, TEOFARMA S.R.L et le laboratoire RICHARD. Au total, 10 spécialités contenant du Phénobarbital sont commercialisées en France en 2022. Aucun de ces médicaments n'appartient à un groupe générique à ce jour alors que les Autorisations de Mise sur le Marché (AMM) de certains de ces médicaments datent d'il y a plus de trente ans (1989, 1994 et 1996).(30)

Il est à noter qu'en France, aucun de ces médicaments n'a d'autorisation de mise sur le marché dans l'indication du traitement du syndrome de Crigler-Najjar, dans le traitement des hyperbilirubinémies ou dans d'autres pathologies hépatiques liées à la bilirubine. Il n'y a donc pas de dosage spécifique pour le traitement de ces patients. La seule indication thérapeutique autorisée est l'épilepsie.(30) Effectivement, le syndrome de Crigler-Najjar est une pathologie extrêmement rare donc le traitement par Phénobarbital des patients atteints du syndrome CN de type II est très peu répandu, ce qui n'amène pas les détenteurs d'AMM à s'appuyer sur des études suffisamment robustes pour supporter l'extension de l'AMM à ces indications. La prise de ces médicaments par les patients rentre alors dans le cadre d'un usage hors-AMM et doit être encore plus encadré qu'un traitement classique, notamment chez les nouveau-nés et les enfants.

Le traitement par le Phénobarbital peut être associé à de la photothérapie en complément, si la diminution des taux de bilirubine sanguine n'est pas suffisante.

La Photothérapie

La photothérapie (PTH), connue depuis les années 1970, est le traitement standard des ictères néonataux avec hyperbilirubinémie.(38) Pour traiter l'hyperbilirubinémie présente dans le syndrome CN, la photothérapie agit par un mécanisme de dégradation de la bilirubine à l'aide d'un rayonnement lumineux, dont le spectre actif se trouve au niveau de la longueur d'onde du bleu (410 à 460 nanomètres).(39)

En pratique, cela consiste à positionner le patient sous une lumière bleue (non Ultra-Violet) pour favoriser la photoisomérisation et la photo-oxydation de la bilirubine afin de lui permettre d'être transformée en une forme excrétable dans la bile, sans glucuroconjugaison, puis d'être éliminée dans les urines et les selles. Ici, l'exposition à la lumière va induire un processus photochimique qui entraîne une modification de conformation de la molécule de bilirubine, qui se transforme en une forme hydrosoluble et peut être excrétée au niveau rénal et biliaire.(40) Ce processus est complexe et implique plusieurs types d'isomérisation.(38) En grande majorité, c'est l'isomérisation structurelle de la bilirubine en lumirubine et photobilirubine qui permet de réduire la bilirubinémie.(41) Par ailleurs, un mécanisme photo-oxydatif de transformation de la bilirubine en un composant polaire incolore, principalement excrété par l'urine, est présent mais reste très minoritaire. Les produits de photoisomérisation (lumirubine et photobilirubine) ainsi que les dérivés de photo-oxydation créés doivent ensuite être éliminés afin de ne pas s'accumuler.(41,42)

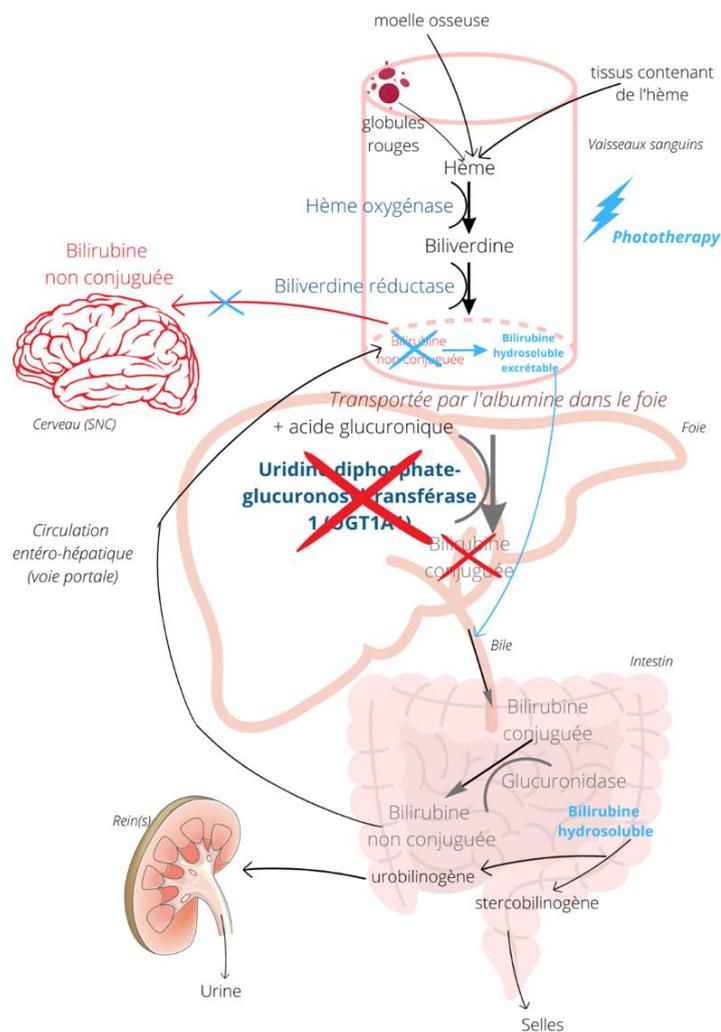


Figure 11 : Schéma simplifié mécanisme de photoisomérisation de la bilirubine

Ainsi, la photothérapie permet une réduction de l'accumulation de bilirubine non conjuguée dans le plasma.(28) Il s'agit d'une technique relativement simple à mettre en place, non invasive et efficace.

Cependant, seule la bilirubine présente en surface (jusqu'à 2 mm de profondeur de l'épiderme) peut être dégradée, la photothérapie ne peut donc pas traiter le problème en profondeur. C'est pour cette raison que l'exposition n'est pas curative et doit être répétée. En effet, la bilirubine non conjuguée est produite en permanence (en continu). Pour obtenir une réponse thérapeutique efficace, il faut que les patients s'exposent parfois jusqu'à 16h par jour sous la lampe bleue. S'ils ne répètent pas l'exposition chaque jour, les molécules de bilirubine produites depuis la dernière exposition s'accumulent, et les symptômes associés réapparaissent (ictère, toxicité etc). C'est pour ces raisons qu'il s'agit d'un traitement dit symptomatique, et non curatif.

Malheureusement, l'efficacité de la photothérapie peut s'atténuer au cours du temps, notamment à partir de la puberté ayant lieu à l'adolescence, où les patients sont confrontés à un risque croissant d'ictère et de toxicités hépatique et neurologique. Les raisons sont principalement physiques. Le patient grandit, les lampes doivent être de plus en plus volumineuses, et les lits adaptés doivent être larges et spacieux. La peau s'épaissit également avec l'âge, la durée de l'exposition doit être plus longue pour avoir la même efficacité qu'auparavant, cependant cela n'est pas toujours possible lorsque le nouveau-né ou l'enfant passait déjà 14 à 16h sous cette lampe bleue.

Sur les photos ci-dessous nous pouvons voir des exemples de photothérapie à domicile, pour traiter un bébé et un enfant.



Figure 12: Photos de patients sous lampe (source: <http://https://crigler-najjar.fr/phototherapie/>)

La source lumineuse peut être placée en dessous ou au-dessus du patient, l'efficacité de la photothérapie étant directement corrélée à la surface de la peau ayant reçu un rayonnement lumineux.(43) Les nourrissons reçoivent en général une photothérapie dite « maternisée » : l'éclairage est faiblement énergétique et vient du dessous du lit. Ceci permet au nouveau-né de rester dans une chambre maternelle à l'hôpital et n'impose pas une protection des yeux, donc favorise l'endormissement du bébé, parfois difficile.(7)

La photothérapie comporte peu d'effets indésirables. Néanmoins, la déshydratation et l'instabilité thermique (hypothermie ou hyperthermie) sont les effets secondaires les plus fréquemment cités dans la littérature. En prévention, il est important d'augmenter les apports en eau, afin de renforcer l'élimination des dérivés photo-oxydatifs et prévenir cette déshydratation. Une surveillance régulière et un apport en minéraux, comme le calcium et le potassium, sont recommandés.(41) Une alimentation régulière par voie entérale, complétée par une prise d'acide ursodésoxycholique peut augmenter le flux biliaire, et permettre d'accélérer l'élimination des photo-isomères de la bilirubine.(44)

Les brûlures cornéennes, les lésions rétiniennes et les atteintes gonadiques sont rares, puisqu'aujourd'hui il existe des outils pour bien protéger les yeux des patients avec des protections oculaires, et les gonades avec les couches.(7) La photothérapie chez les nouveau-nés et enfants est souvent délivrée à l'hôpital pour des raisons de sécurité. En effet, les nouveau-nés sont plus exposés aux risques cités plus haut, et nécessitent une plus grande surveillance.

Il a été démontré dans certaines études que la photothérapie pouvait avoir un effet toxique sur le génome humain, notamment causer des dommages de l'ADN(41). Cependant, les effets au long terme sur l'ADN n'ont pas été clairement établis à ce jour.(45) Le rapport bénéfice/risque reste en faveur de la photothérapie à ce jour, pour les patients atteints du syndrome CN.

Concernant l'exposition d'une femme enceinte, une thèse datant de 2006 relate une observation clinique d'une femme atteinte du syndrome de Crigler-Najjar traitée par Photothérapie. Elle a donné naissance à un enfant en bonne santé, qui n'avait, à sa première année de vie, aucune séquelle décelable : examen clinique normal, développement psychomoteur normal, IRM normal, bilirubinémie dans la normale.(44) Une étude plus approfondie pourrait être pertinente puisqu'il existe des femmes en âge de procréer atteintes du syndrome CN.

L'exsanguino-transfusion

Le principe de l'exsanguino-transfusion est de remplacer une partie du sang du patient par le sang d'un ou plusieurs donneurs. Cette technique a été décrite dans la littérature dès 1946 par Wallerstein pour traiter des cas sévères de maladie hémolytique dû à une incompatibilité materno-fœtale du système sanguin Rhésus (Rh). Dans le syndrome de Crigler-Najjar, l'exsanguino-transfusion permet une réduction de l'hyperbilirubinémie puisque la bilirubine non conjuguée accumulée est éliminée progressivement avec le renouvellement du sang. Le volume retiré est équivalent au volume administré et l'intervention peut durer jusqu'à 4 heures.

Cependant, la réduction des incompatibilités materno-fœtales et le développement de la photothérapie font qu'aujourd'hui l'exsanguino-transfusion est une technique très rarement utilisée(46), notamment au long terme comme dans le syndrome de Crigler-Najjar ou d'autres pathologies chroniques. Elle est réservée aux ictères sévères précoces : bilirubinémie supérieure à 340 $\mu\text{mol/L}$ avant 24h de vie chez le nouveau-né à terme, au cours desquels la photothérapie ne permet pas une diminution assez rapide de la bilirubinémie, ou lorsque le rapport B/A est supérieure à 0,8.(14,20)

Les risques associés à l'exsanguino-transfusion sont principalement des risques infectieux inhérents à la pose d'un cathéter. Les autres risques cités sont des changements d'ordres métaboliques (déséquilibre électrolytique) et des complications cardiorespiratoires. Une étude indique que 5% des patients traités par exsanguino-transfusion développeront des complications, et en 2014 le taux de mortalité était estimé à 4 enfants sur 1000.(47)

Autres traitements

Lors des périodes de décompensation, l'étude de Strauss cite d'autres traitements potentiels. Une perfusion d'albumine peut être envisagée si les patients hospitalisés atteignent un seuil trop élevé de rapport molaire B/A. Également des solutions glucosées peuvent être administrées pour maintenir l'euglycémie, nécessaire au bon fonctionnement de la BHE. L'acide acétylsalicylique, la ceftriaxone, le cotrimoxazole et l'aminophylline peuvent être utilisés, cependant ils sont impliqués dans la liaison entre l'albumine et la bilirubine et peuvent perturber les liaisons entre les deux molécules par déplacement de la bilirubine, c'est pour cela qu'ils ne sont pas recommandés en première intention.(44)

3. Enjeux de la recherche clinique dans le syndrome de Crigler-Najjar

De nos jours, comme nous l'avons vu précédemment, il n'y a aucun traitement curatif hormis la transplantation hépatique. Et Il n'y a aucun médicament qui n'a été autorisé pour traiter cette pathologie, dans le monde.

La transplantation hépatique nécessite d'avoir un donneur compatible et peut entraîner des complications au long terme. De plus, à la suite d'une transplantation d'un organe solide, le patient doit prendre un traitement immunosuppresseur à vie. Ces traitements, comme tous les médicaments peuvent entraîner des effets indésirables, plus ou moins graves et fréquents.

Cependant, l'observance de ce traitement joue un rôle très important dans la survie post-transplantation des patients greffés. La prise d'un médicament tous les jours pendant toute une vie, les rendez-vous fréquents chez les spécialistes et les hospitalisations potentielles impactent la qualité de vie des patients transplantés.

Les alternatives thérapeutiques sont non-curatives et permettent de maintenir le patient en vie : en augmentant la durée de vie, cependant leur qualité de vie n'est pas forcément améliorée.

La photothérapie fonctionne relativement bien, mais nous avons vu qu'elle a ses limites notamment à cause de la taille des appareils qui doivent s'adapter à la taille de l'enfant, l'adolescent puis l'adulte. Ces appareils coutent chers, la rentabilité de ces appareils sous grand format adapté aux adolescents et aux adultes n'est pas idéale pour les fabricants, ce qui complique la prise en charge par la photothérapie des patients atteints du syndrome de Crigler-Najjar lorsqu'ils grandissent. Dans les pays moins développés, et ayant des ressources plus limitées, l'accessibilité à ces appareils est encore plus compliquée et donc restreinte.

Un témoignage d'une petite fille atteinte du syndrome CN sur le site de l'association française de Crigler-Najjar indique « Quand je me mets sous la lampe pour lire, j'y arrive pas, parce que je suis trop grande et ça me fait mal au dos parce que je touche la lampe ». Ceci montre que l'évolution de la taille de l'enfant impacte sa prise en charge par la photothérapie, ce qui se ressent sur sa vie personnelle. De plus, les lumières bleues dégagent de la chaleur, qui peut être potentiellement agréable en hiver, ne l'est pas en mi-saison ou en été et perturbe grandement le sommeil des enfants et adolescents. Par ailleurs, l'efficacité du traitement par photothérapie a tendance à diminuer avec le temps comme nous l'avons vu précédemment.

D'un point de vue organisation personnelle et santé mentale, la photothérapie complique très largement la vie quotidienne des patients et de leur entourage (famille et aidants), qui doivent être très vigilants tous les jours, toutes les nuits. Le traitement par photothérapie limite également les interactions sociales puisque le patient ne peut pas se déplacer comme il le souhaite à cause de la durée d'exposition, notamment lors des événements festifs, les périodes de vacances. Ne pas aller à un anniversaire, rater des jours d'écoles, ne pas pouvoir aller dormir chez des amis peut avoir un retentissement négatif sur le développement social d'un enfant.

L'exsanguino-transfusion pourrait être une bonne solution au très court terme, par exemple durant les premiers jours/mois de vie des nouveau-nés. Cette solution thérapeutique peut également être utilisée en complément d'un autre traitement symptomatique comme la photothérapie, notamment lors des phases de décompensation. Néanmoins, le développement de la photothérapie à domicile des patients place l'exsanguino-transfusion en second plan car cette alternative n'est pas compatible avec la chronicité du syndrome de Crigler-Najjar.

Le phénobarbital est efficace uniquement chez les patients atteints du syndrome CN de type II. Ce qui exclut d'office les patients atteints du syndrome de type I. De plus, nous avons vu qu'il peut entraîner de nombreux effets indésirables doses dépendants.

Cela peut poser des problèmes de toxicité au long terme dans une pathologie chronique comme Crigler-Najjar, puisque le traitement doit être pris durant toute une vie. Il peut également entraîner un syndrome de dépendance qui sera à prendre en charge en plus de la pathologie initiale. D'un point de vue juridique, il n'est autorisé aujourd'hui en France que dans l'indication de l'épilepsie et constitue un usage hors AMM lorsqu'il est prescrit à des patients atteints du syndrome CN. Malgré tout, aujourd'hui il reste l'un des seuls traitements efficaces existants pour les patients atteints du syndrome CN de type II.

En faisant une recherche sur la base de données PubMed avec les mots clés « (Crigler-Najjar) AND (quality of life) » seulement 5 résultats sont apparus. Tous étaient issus de publications sur les risques de la transplantation hépatique dans les maladies métaboliques. Ceci montre qu'il reste encore du chemin à parcourir dans le monde médical pour accorder de l'importance à la balance qualité de vie/espérance de vie. En effet, le syndrome de Crigler-Najjar peut constituer en lui-même une charge mentale pour les parents et l'entourage des patients. La prise en charge quotidienne de cette pathologie nécessite une surveillance accrue de l'enfant, c'est-à-dire 24h/24.

Le patient et l'entourage des enfants malades doivent être formés pour effectuer des mesures cutanées fréquentes à domicile, à l'aide d'appareils appelés bilirubinomètres. L'appareil mesure la concentration en bilirubine sous-cutanée de manière non invasive. L'objectif est de suivre l'évolution de la bilirubinémie cutanée quotidiennement, afin d'être alerté si le seuil critique est dépassé pour pouvoir adapter le traitement symptomatique.



Figure 13 : Utilisation d'un bilirubinomètre (Source : <https://crigler-najjar.fr/reportages-dans-le-cadre-du-teleton-2016>)

C'est la peur de la survenue de complications notamment neurologiques pouvant entraîner un décès et l'angoisse de ne pas avoir de traitement curatif à disposition, qui ont un retentissement sur l'entourage. Un témoignage où le papa d'une petite fille de 5 ans atteinte du syndrome CN (Elena) se confie mentionne « il n'y a pas un jour où je n'ai pas pensé à cette maladie depuis la naissance de ma fille ».



Figure 14: Photo d'Elena et sa famille (Source : <https://crigler-najjar.fr/reportages-dans-le-cadre-du-teleton-2016>)

Dans ce contexte, les associations de patients jouent un rôle clé dans les pathologies chroniques, dans le monde entier. L'association Française de Crigler-Najjar, portée par le Téléthon depuis des années, possède un site internet très détaillé et organise des évènements pour que les différents adhérents se rencontrent. Les témoignages de l'entourage des patients convergent vers l'espoir d'obtenir un traitement curatif. On parle de cet espoir de traitement par thérapie génique depuis plus de 10 ans.

Médicalement et socialement, le traitement par thérapie génique serait une avancée importante dans la prise en charge de ce syndrome. L'objectif principal est la guérison du patient, c'est-à-dire la diminution voire l'arrêt des traitements symptomatiques comme la photothérapie, tout en ayant un niveau de risque de toxicité non alarmant. De plus, l'administration unique (une seule injection) de la thérapie génique est mise en avant dans les articles à ce propos, puisque cela permettrait une hospitalisation unique de quelques jours pour la surveillance du patient, puis un retour à la vie quotidienne « normale ».

Le syndrome CN est une pathologie idéale pour une thérapie génique médiée par un vecteur AdénoVirus Associé (AAV) pour les raisons suivantes(44,48,49) :

- Il existe un seuil de bénéfice clinique défini : le lien entre la bilirubine et le risque d'atteinte neurologique (voir la sous-partie I.2.c.Les risques de toxicité du syndrome).
- L'évolution du critère d'efficacité est assez simple à démontrer grâce aux résultats des prises de sang (bilirubinémie notamment).
- Il existe des modèles animaux pertinents (rat Gunn), qui ont montré des résultats satisfaisants quant à l'efficacité et la sécurité d'emploi.
- Le traitement par thérapie génique n'empêcherait pas d'envisager une future transplantation hépatique ou un traitement par photothérapie pour le patient. Ce qui ne réduit pas les chances pour le patient de guérir s'il y a un foie compatible disponible.

Nous allons étudier en détail ce traitement d'avenir dans le début de la prochaine partie, sa mise en place en phase clinique (médicament testé chez les personnes humaines) et nous discuterons des résultats ensuite.

II. Mise en place et surveillance d'un traitement par thérapie génique dans le traitement du syndrome de Crigler-Najjar (CareCN)

1. Description du traitement développé par les experts du Généthon

a. Principes généraux de la thérapie génique

La thérapie génique est développée depuis plus de 40 ans en laboratoire. La première thérapie génique a été administrée à un patient atteint d'un déficit DICS-ADA il y a presque 30 ans. L'évolution des thérapies géniques a été différente selon les laboratoires, chacun progressant à un rythme différent (dynamique différente). Les premières techniques à avoir démontrées une efficacité clinique sont les administrations ex-vivo de cellules souches hématopoïétiques, et les transferts in vivo des AAV recombinants.(50) Selon la HAS, depuis 1989, environ 2000 essais cliniques ont été réalisés avec des thérapies géniques.(51)

Pour comprendre les principes et le fonctionnement de la thérapie génique il faut comprendre le fonctionnement des gènes chez l'être humain.

Les gènes sont tous constitués d'ADN (Acide désoxyribonucléique), et servent à donner les informations structurales aux enzymes et aux protéines afin de faire fonctionner le corps entier. D'après la littérature, le génome humain serait composé de 20 000 à 25 000 gènes. Ces gènes sont hérités de nos deux parents et sont présents, normalement, en deux copies pour chaque gène. Comme nous l'avons vu précédemment, ces gènes peuvent être défectueux, modifiant le fonctionnement normal des protéines, et pouvant entraîner des pathologies comme le syndrome de Crigler-Najjar.

Le principe général de la thérapie génique consiste à introduire, éliminer ou modifier le matériel génétique, c'est-à-dire l'ADN ou l'ARN (Acide Ribonucléique) des cellules du patient atteint de la maladie.(52) Cependant, pour effectuer tout ça, ce nouveau matériel génétique, appelé transgène, doit franchir beaucoup de barrières biologiques afin d'atteindre le noyau des cellules ciblées. Le transgène est transporté par un vecteur afin d'arriver jusqu'à la cellule cible de mammifères. Cette technologie utilise des virus en guise de vecteur car ils sont naturellement programmés pour s'insérer dans les cellules et infecter l'organisme en insérant leurs gènes dans le noyau de celle-ci (ce sont leurs propriétés intrinsèques). Les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique sont des virus modifiés : les capacités de reproduction du génome viral ont été retirées et remplacées par le gène humain déficient chez le patient.

Ainsi, le virus délivre le bon matériel génétique, sans risque de pathogénicité pour la cellule et donc l'organisme du patient.(53) Les virus naturels sont appelés wild-type (wt) et les virus modifiés sont appelés recombinants (r).

Il existe différents types de vecteurs viraux, chacun offrant des avantages et des inconvénients(54), notamment par rapport à la taille du gène pouvant être inséré. Nous ne détaillerons pas tous les types ici mais ils sont visibles dans le schéma ci-dessous.

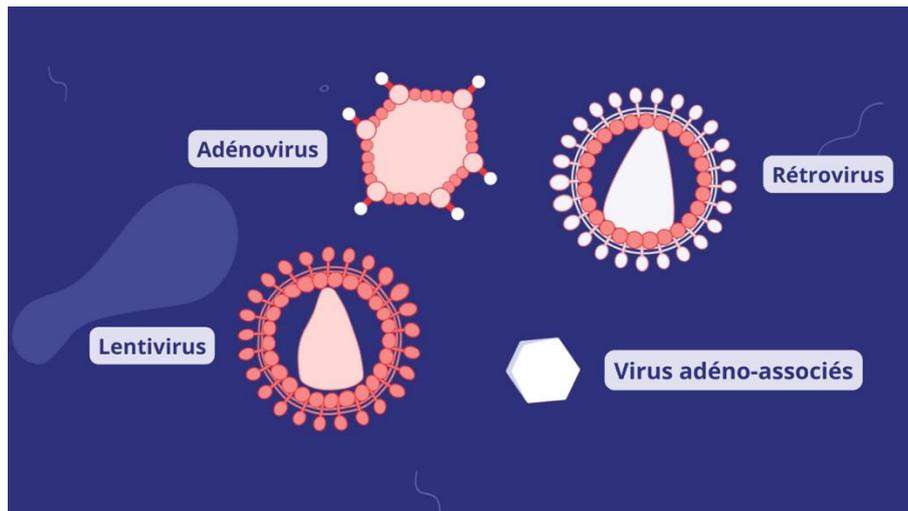


Figure 15 : Les différents types de vecteurs (Source : SFTCG)

Par ailleurs il existe des vecteurs non viraux : les vecteurs chimiques, molécules naturelles ou synthétiques, appelés lipoplexes ou polyplexes. Ils sont plus faciles à produire que les vecteurs viraux. Néanmoins, leur efficacité de transfert d'ADN est encore aujourd'hui, inférieure à celle des vecteurs viraux, et sont donc largement moins utilisés.

b. Les caractéristiques du virus sélectionné pour ce traitement

Le traitement développé par les experts du Généthon est un nouveau vecteur rAAV (virus adéno-associé recombinant) de sérotype 8 codant pour le transgène UGT1A1, il a été nommé GNT0003. Celui-ci a été optimisé grâce à la cassette d'expression afin d'obtenir une expression sur long terme dans l'organe cible : le foie, qui soit sécuritaire pour le patient. Les résultats indiquent que l'optimisation du codon du transgène, associée à l'optimisation de l'intron, entraîne des niveaux plus élevés d'expression du transgène. Il a été démontré que l'accumulation pathologique de bilirubine non conjuguée chez les modèles animaux présentant un syndrome CN, les souris et les rats, est corrigée(49).

Les AAV sont de la famille des virus *Parvoviridae* et appartiennent au genre Dependovirus, dont les membres ont besoin d'un virus auxiliaire (par exemple l'adénovirus ou le virus de l'herpès simplex) pour accomplir leur cycle de réplication complet, comme l'indique leur nom. Les AAV sont des virus à ADN d'environ 4,7 kilobases (kb) monocaténares (ayant un seul brin d'acides nucléiques) non enveloppés. Le génome de l'AAV code pour deux gènes : le gène « rep », qui sert à la réplication et à l'encapsulation de l'ADN, et le gène « cap » qui code pour les protéines de la capsid virale. Ce génome est encadré par des séquences répétées terminales inversées (ITR) essentielles à l'encapsulation du génome. Dans les rAAV, les gènes « rep » et « cap » sont remplacés par une cassette d'expression du transgène (promoteur, transgène et queue PolyA abrégée pA). Les seules séquences génomiques virales de l'AAV wt restantes sont les ITRs qui sont essentielles à l'encapsulation.(55,56)

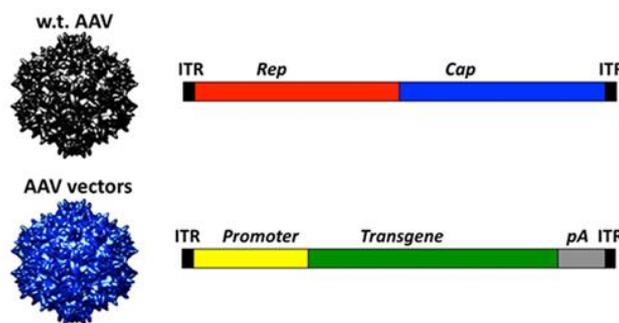


Figure 16 : Schéma de la construction du rAAV
(Source : *Humoral Immunity to AAV Vectors in Gene Therapy: Challenges and Potential Solutions*)

La capsid icosaédrique (en forme de 20 triangles équilatéraux de même dimension) des AAV mesure environ 20 à 25 nanomètres (nm), il s'agit d'une catégorie de virus assez petits en comparaison à d'autres types de virus, dont les capsides peuvent aller jusqu'à 400 nm. La faible taille des AAV est un avantage d'un point de vue clinique, car cela signifie que le génome recombinant est également de faible taille. Le risque d'effet indésirable augmentant avec la taille du génome recombinant, les AAV sont dits « moins toxiques » que d'autres virus.

Un autre point positif : les AAV sont des virus non intégratifs (à l'inverse des lentivirus) par principe, ce qui signifie que le matériel génétique contenu dans le virus ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte et reste sous forme épisomale (il reste dans la cellule, hors des chromosomes), s'exprimant pendant toute la vie de la cellule hôte.(56) Le gène thérapeutique importé ne modifie pas le gène déficient, il s'ajoute seulement au patrimoine génétique des cellules pour compenser la fonction déficiente. Le génome humain du receveur n'est, par conséquent, pas modifié et le gène thérapeutique ne sera pas transmis aux cellules filles lors des futures divisions cellulaires.(54)

Les AAV sont donc recommandés par les autorités réglementaires internationales de l'ICH (International Conference on Harmonization), qui conviennent que, compte tenu des arguments scientifiques, éthiques et juridiques actuels, le risque d'intégration germinale doit être minimisé en raison du potentiel de transmission ultérieure de l'ADN du vecteur à la descendance.(57) Le risque d'intégration germinale par inadvertance est basé sur un certain nombre de facteurs, notamment le type de vecteur, la voie d'administration, la dose et le site d'administration. L'approche scientifique doit être étudiée au cas par cas pour évaluer ce risque.(57) Par exemple ici, la voie IV et les doses de vecteur élevées présentent un risque plus élevé d'intégration germinale. Cependant, les AAV sont, par principe non intégratifs et présentent donc un risque très peu élevé.

Dans la gestion des essais cliniques, quel que soit le résultat des données de biodistribution non cliniques, des mesures contraceptives sont généralement recommandées pour la durée de l'essai clinique. En effet, le CTFG (Clinical Trials Facilitation and Coordination Group) a publié en 2020 des recommandations relatives à la contraception et aux tests de grossesse dans les essais cliniques. Ce document a été publié suite aux travaux du CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use) sur le sujet. Dedans, trois niveaux de risques sont gradés en fonction des résultats précliniques de génotoxicité et de folliculogénèse. Ces recommandations concernent les femmes en âge de procréer mais également les hommes, en tant que partenaires sexuels d'une femme traitée, ou comme personne recevant directement le traitement. En général, ces données sont rares, ou encore non disponibles donc l'évaluation doit être basée sur le niveau de risque le plus élevé, par défaut.(58)

Le gros point négatif de ces rAAV est la séropositivité élevée dans la population générale. La séropositivité signifie que les personnes possèdent des anticorps neutralisants anti-AAV car ils ont déjà été exposés à ces types de virus. Leur système immunitaire pourra déclencher une réaction immunitaire contre le soi s'il rencontre ce type de virus de nouveau. Nous le verrons dans la prochaine partie, notamment sur les conditions d'éligibilité des patients dans l'étude clinique menée par le Généthon (CareCN).

Malgré tout, les AAV sont des vecteurs populaires puisqu'ils représentent 24% des études de thérapie génique utilisant des vecteurs viraux, dans le monde.(59)

Comme vous pouvez le voir sur la figure ci-dessous, il existe deux stratégies thérapeutiques pour traiter un patient par thérapie génique. La modification des cellules peut se faire in vivo ou ex vivo.(54)

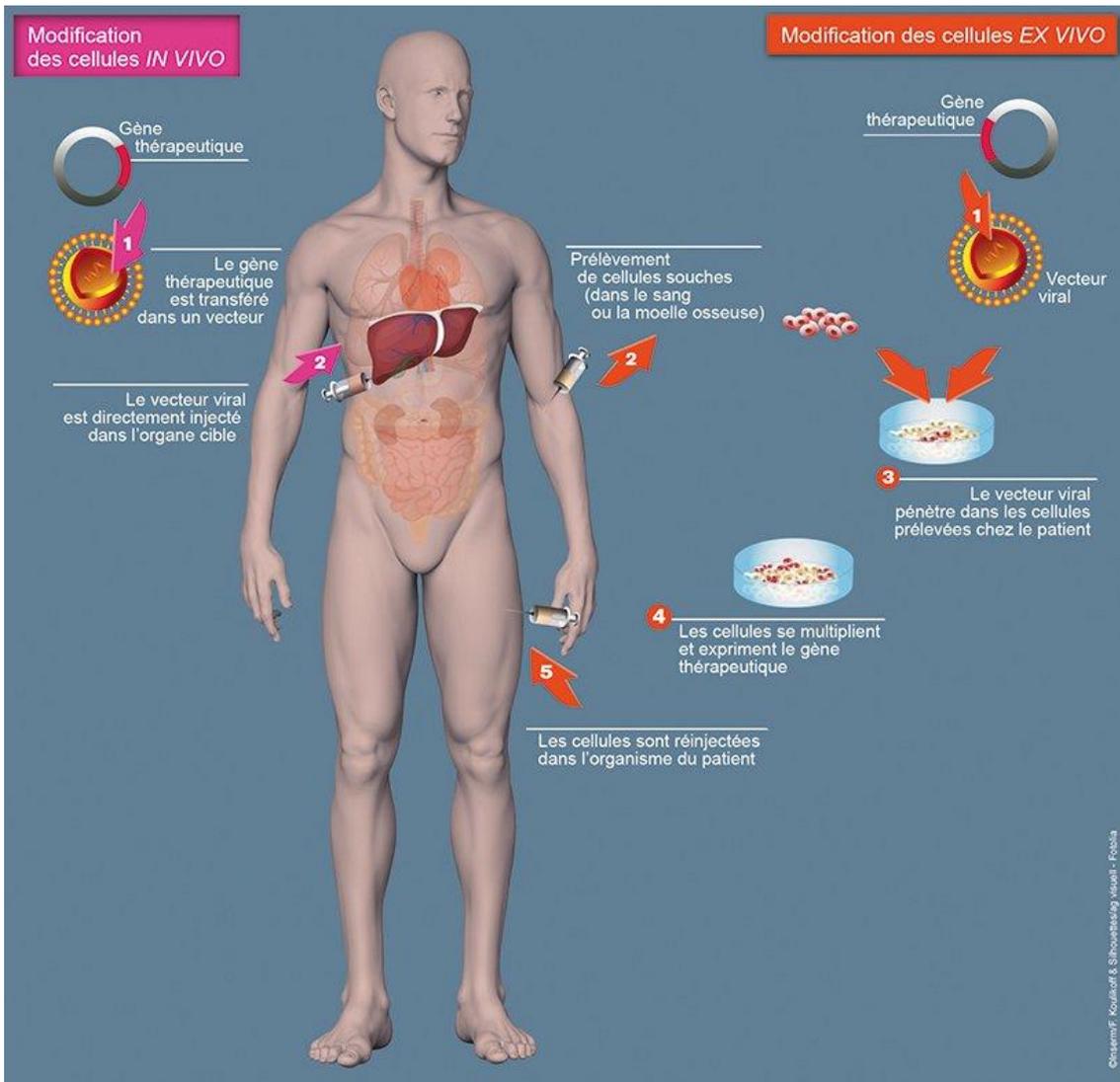


Figure 17 : Schéma explicatif (Source : Inserm, F. Koulikoff, <https://www.inserm.fr/dossier/therapie-genique/>)

L'intégration du gène correcteur dans le vecteur viral se fait de la même façon dans les deux stratégies. La différence réside dans la méthode de pénétration du virus et le processus d'injection au patient.

- **In vivo** : Le vecteur viral possédant le gène correcteur est injecté directement chez le patient par injection intraveineuse (IV) dans l'organisme ou dans l'organe cible (si possible).
- **Ex vivo** : Le vecteur viral possédant le gène correcteur est mis en culture avec les cellules souches de l'organe du patients, prélevées en amont dans le sang ou la moelle osseuse. Le vecteur pénètre alors dans les cellules du patient, qui expriment le gène thérapeutique. C'est l'ensemble de ces cellules qui sont ensuite réinjectées au patient.

L'avantage de la technique ex vivo est qu'elle permet un contrôle précis de toutes les étapes de la modification des cellules, afin de cibler les cellules de façon certaine. Cependant, cette technique ne peut pas s'appliquer à toutes les pathologies. Elle est particulièrement utilisée pour traiter des maladies sanguines, où le simple prélèvement par prise de sang permet d'accéder aux cellules souches de la lignée sanguine. C'est le cas notamment de la thérapie génique Strimvelis®, approuvée en 2016, contenant des cellules hématopoïétiques CD34+ modifiées en laboratoire. Les patients sont atteints d'un déficit immunitaire sévère (ADA-DICS) qui est caractérisé par l'absence de la protéine ADA, nécessaire à la production de lymphocytes.(60)

Pour la maladie de Crigler-Najjar, les cellules du foie étant très facilement accessibles par la circulation sanguine, la stratégie in vivo par voie IV a été choisie.

Il existe une variété de sérotypes d'AAV caractérisés par différents antigènes contenus dans leurs capsides. Chaque sérotype a un tropisme (affinité pour certains types de cellules) différent. Le choix du sérotype doit se faire en fonction de l'organe ciblé, même si ce n'est pas le seul critère de sélection.(54) A noter que le sérotype AAV2 a été le premier à être isolé puis développé dans un vecteur recombinant pour la délivrance de transgène en 1982. Il a ensuite été utilisé dans plus de 20 essais cliniques pour différentes pathologies.(61)

Des chercheurs ont établi un tableau hiérarchique de l'efficacité de la transduction des différents sérotypes d'AAV que vous pouvez retrouver ci-dessous.

Tableau 3 : Différents sérotypes d'AAV en fonction de leur tropisme (37)

Sérotype	Tropisme
AAV1	SNC, muscles squelettiques
AAV2	SNC, reins, rétine
AAV3	Foie
AAV4	SNC, cœur, poumons
AAV5	SNC, rétine
AAV6	Muscles squelettiques, cœur, pancréas
AAV7	Muscles squelettiques, cœur, foie, rétine
AAV8	Muscles squelettiques, cœur, foie , pancréas, rétine
AAV9	SNC, muscles squelettiques, cœur, poumons, foie, pancréas, rétine
AAV10	SNC, iléon, tissus lymphatiques
AAV11	Iléon, tissus lymphatiques

On peut observer que plusieurs sérotypes d'AAV ont un tropisme pour le foie. C'est l'AAV8 qui a finalement été sélectionné pour le développement de cette nouvelle thérapie génique par les chercheurs du Généthon pour traiter le syndrome CN.

2. Surveillance du traitement par thérapie génique lors des phases cliniques

a. Les risques observés dans la littérature avec les thérapies géniques

Comme nous l'avons vu brièvement, les thérapies géniques peuvent être développées avec plusieurs types de vecteur (vecteur viral ou non viral), cependant nous parlerons dans la suite de la thèse uniquement des thérapies géniques par technologie AAV.

Les rAAV peuvent engager toutes les branches du système immunitaire : innée, humorale et cellulaire, malgré le fait qu'ils ne soient pas considérés comme pro-inflammatoires de manière générale.

Dans plusieurs essais cliniques, des toxicités à médiation immunitaire y compris rénales et hépatiques, sont survenues après administration de vecteurs viraux types rAAV.

Nous allons lister ci-dessous les principaux risques observés avec des traitements par thérapie génique dans la littérature scientifique et médicale. Cette liste a été faite en 2022, cependant elle peut évoluer dans les mois ou années à venir, car les thérapies géniques sont de plus en plus présentes dans la littérature.

Hépatotoxicité

Une toxicité hépatique a été observée dans les études précliniques chez les animaux, mais également lors des études cliniques chez les humains, après administration de traitement par thérapie génique. Aujourd'hui, les experts internationaux essaient de comprendre le rôle des anticorps anti-capside, des cellules immunitaires anti-capside et de l'activation du complément, cependant pour le moment rien n'est certain à 100%.⁽⁵⁹⁾

Une première corrélation a été faite entre la dose de génomes viraux (vg/kg) administrée au patient et l'immunogénicité engendrée par le vecteur viral. Cependant, la comparaison des doses entre les études cliniques est assez difficile, en raison du manque de données standardisées et des différences dans la conception et la précision des tests.⁽⁵⁹⁾

Dans les modèles animaux utilisés pour tester la thérapie génique contre l'amyotrophie spinale, une hépatotoxicité aiguë sévère a été observée après l'administration intraveineuse de 2×10^{14} vg/kg de vecteurs de type AAV9 (AAVhu68) exprimant le gène SMN1 humain chez trois macaques rhésus juvéniles, et a été fatale chez l'un des trois primates non humains injectés.(62) La dose était similaire à celle employée dans l'essai clinique Avexis. Les hypothèses formulées sont l'atteinte directe de l'hépatocyte et l'activation de l'inflammation systémique associée à une coagulopathie. Suite à l'essai clinique et à l'administration en vie réelle, une hépatotoxicité non choléstatique a été fréquemment trouvée : 90% des patients ont présenté des élévations des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT et/ou concentrations de bilirubine). Cependant, 61 % d'entre eux présentaient de légères élévations de base, avant l'administration du médicament. La période de latence, entre la prise du médicament et la survenue de l'effet indésirable, était d'une semaine (le plus souvent) ou d'un mois. Les anomalies se sont rétablies à l'aide des stéroïdes ou bien spontanément, aucun événement hépatique n'a été fatal.(63)

L'hépatotoxicité a également été caractérisée dans la myopathie myotubulaire liée au chromosome X (XLMTM) en 2020, aux États-Unis. Sur 24 enfants traités par la thérapie génique, 3 patients (2 traités à la dose forte et 1 à la dose faible) ont présenté une hépatotoxicité et sont décédés. Ils présentaient tous une maladie du foie préexistante au traitement.(64) A ce jour, le mécanisme physiopathologique précis n'a pas été élucidé.

L'hypothèse soulevée dans une analyse est une inflammation systémique secondaire à la présence d'anticorps contre l'adénovirus, préexistants ou développés rapidement après l'injection, qui auraient formé des complexes immuno-activateurs avec le vecteur administré.(65) Par ailleurs, d'autres facteurs tels que l'existence d'une maladie hépatobiliaire dans la population XLMTM et le titre du génome du vecteur doivent également être pris en compte.(66)

Tout essai de thérapie génique par AAV nécessitant de très fortes doses de vecteur viral devrait inclure une surveillance attentive des cellules T spécifiques de la capsid de l'AAV dans le sang pour aider à l'analyse des événements indésirables graves potentiels. Ces données ne sont malheureusement pas disponibles pour l'essai XLMTM.(64)

Dans le cadre de la mise en place d'une thérapie génique pour traiter une maladie du foie, comme ici pour le syndrome CN, l'hépatotoxicité doit être encore plus surveillée et encadrée.

Immunogénicité

• Réponse adaptative à médiation cellulaire

La thérapie génique AAV, par l'activation des récepteurs Toll (TLR), peut déclencher non seulement une réponse immunitaire innée médiée par la libération d'interférons (IFN) de type I, mais aussi une réponse immunitaire adaptative, qui comprend l'immunité à médiation cellulaire (cellules T CD4+ et CD8+) et l'immunité humorale (cellules B).(67) Cela a été prouvé chez les souris(68) et les humains.

Alors que l'immunité innée fournit une défense de première ligne rapide et non spécifique, l'immunité adaptative se développe plus lentement, est hautement spécifique à un pathogène particulier et entraîne le développement d'une mémoire immunologique.

Les réponses immunitaires adaptatives cellulaires sont médiées par :

- les cellules CD4+, par le biais des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II, pour les protéines exogènes ingérées par la cellule et traitées par protéolyse dans les compartiments endosomaux,
- les cellules CD8+, par le biais des molécules du CMH de classe I, pour les protéines qui ont été synthétisées dans la cellule.

Elles peuvent être dirigées contre la capsidie ou le transgène. Bien que la transduction du rAAV ne conduise pas à la production intracellulaire de protéines de capsidie, la présentation croisée d'antigènes exogènes de l'AAV, normalement présentés par la voie du CMH II, par les molécules du CMH de classe I sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA), permet aux AAV d'activer les cellules CD4+ et CD8+.(69)

En ce qui concerne cette immunité à médiation cellulaire, depuis la première description humaine, aucun modèle animal approprié n'a pu prédire l'immunotoxicité observée chez les patients.(70) De plus, l'immunité à médiation cellulaire est un phénomène particulièrement complexe puisque l'immunité du produit transgénique peut varier en fonction de la capsidie et du génome de l'AAV(71), de la voie d'administration, de la mutation sous-jacente, de l'utilisation de promoteurs restreignant les tissus, de l'inflammation liée à la maladie (72) et du patrimoine génétique.

Les réponses des lymphocytes T contre la protéine du transgène peuvent représenter un problème chez les porteurs de mutations nulles (mutations non-sens, induisant une protéine incomplète), car la protéine thérapeutique délivrée par l'AAV peut être reconnue comme un antigène étranger (à cause de sa longueur différente de la protéine du virus wild-type), stimulant ainsi les réponses des lymphocytes T contre les cellules transduites exprimant le transgène. Ceci est documenté dans les essais de thérapie génique traitant l'hémophilie(73) et explique l'échec du premier essai clinique sur la mini-dystrophine dans lequel les patients traités ont produit des cellules T spécifiques contre la mini-dystrophine alors que la protéine elle-même n'était pas exprimée.(74)

- **Réponse adaptative humorale**

Outre l'immunité adaptative à médiation cellulaire, les réponses adaptatives humorales peuvent également être activées après une infection AAV par des anticorps neutralisants, des anticorps qui interagissent avec les récepteurs cellulaires et par des anticorps activateurs du complément.

En ce qui concerne les anticorps neutralisants, les patients qui en sont porteurs sont exclus des essais cliniques, car les anticorps neutralisants peuvent entraîner une neutralisation complète, même en présence de doses vectorielles élevées d'AAV appliquées par voie systémique. (75)

Pour l'activation du complément, il faut rappeler que le complément est une cascade protéolytique, composée d'une trentaine de protéines solubles ou membranaires, responsable de la détection et de la destruction des pathogènes. Le complément comprend trois voies (voie classique, voie liée à la lectine et voie alternative) qui convergent vers le clivage du composé C3. L'activation du complément peut donc se produire après une infection AAV, comme après toute infection virale.(76)

L'activation du complément conduit dans les premiers temps à la libération d'anaphylatoxines C3a et C5a et de cytokines (interleukine 1 et TNF : Tumor Necrosis Factor – facteur de nécrose tumorale). Étant donné que différents composants du complément ont la capacité de se lier aux récepteurs plaquettaires et/ou d'interagir avec les facteurs de coagulation, l'activation des plaquettes et de la coagulation sont déclenchées secondairement, avec un effet auto-entretenu d'un système activé sur l'autre, créant une boucle d'amplification délétère.(77) Une thrombocytopénie a, par exemple, été observée dans les essais de thérapie génique pour traitement de l'amyotrophie spinale (SMA).(63)

Cela peut entraîner une microangiopathie thrombotique (TMA), qui associe une thrombocytopenie non auto-immune, une anémie hémolytique et des lésions organiques.(64) Si l'activation du complément est généralisée, une défaillance multi-organique et/ou une coagulation intravasculaire disséminée peuvent se produire.(78) L'atteinte sera cependant le plus souvent limitée à un seul organe, qui est généralement le rein, avec un tableau de syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUA).(79) La survenue d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU) a été observée chez des enfants ayant reçu une thérapie génique par *onasemnogène abeparvovec* (ZolgensMA®) dans le cadre d'une amyotrophie spinale infantile de type 1.(10) Un de ces patients est décédé par sepsis après la survenue de la TMA.(80) Deux effets indésirables graves ont également été jugés liés à l'activation du système de complément terminal C5b-9 soluble au cours de l'essai de thérapie génique de la microdystrophine par Solid et Sarepta, contre la DMD(81). L'effet indésirable semble dépendre de la dose.(82) Dans les deux essais, il y a eu une administration d'éculizumab (anticorps monoclonal humanisé) pour inhiber la TMA médiée par le complément. Solid a décidé de restreindre l'administration aux garçons pesant moins de 18 kg, la reprise de l'essai a été autorisée par la FDA.(80) Ces événements pourraient limiter dans le futur la réalisation d'essai clinique par thérapie génique chez les patients à partir d'un certain poids de corps.

Neurotoxicité

La toxicité des ganglions de la racine dorsale a été démontrée chez les primates (NHP : Non-Human Primate) et les porcelets.(62) La toxicité est apparue plus fréquemment lorsque la thérapie génique était administrée par voie neurologique via le liquide céphalo-rachidien (LCR) par opposition à la voie IV. La gravité augmentait avec la dose IV et avec l'âge (plus grave chez les animaux adultes par rapport aux jeunes).(83)

Chez l'humain, une autopsie réalisée chez un patient décédé ayant été traité lors d'un essai clinique par thérapie génique à type d'AAVrh10 contre la SLA (Sclérose Latérale Amyotrophique) par voie intrathécale rapporte une toxicité des ganglions de la racine dorsale. Des picotements et douleurs dans les deux mains et un pied, 3 à 4 semaines après le traitement par vecteur AAV auraient été rapporté par le patient.

Par ailleurs, des anomalies ont été observées lors d'une IRM cérébrale (Hyperintensifications T2), après administration par voie intra-parenchymateux d'un traitement de thérapie génique à type AAVrh10 contre la maladie de Batten infantile tardive, chez 13 participants. Ces anomalies étaient localisées au niveau des sites d'administration, 48 heures après celle-ci.

Chez seulement 2 patients, ces anomalies étaient résolues lors de l'IRM réalisé 18 mois après. Parmi les 13 participants chez qui l'anomalie a été observée, des effets indésirables sérieux ont été rapportés chez 6 d'entre eux.

Dans un autre essai, deux patients sous immunosuppression ont reçu un vecteur rhAAV10 exprimant le motoneurone de survie 1 par voie intraveineuse pour le traitement de la SMA de type 2 et, là encore, l'un des patients a développé une toxicité du DRG (80). L'hypothèse de savoir si chez l'homme les réponses immunitaires adaptatives telles que les cellules T CD8+ spécifiques de l'AAV contribuent au DRG est envisagée mais reste pour l'instant non prouvée.

Le vecteur AAV, la procédure de délivrance, les dispositifs utilisés sont remis en cause. Cependant, l'étiologie de ces anomalies observées est assez difficile à déterminer de manière exacte. D'autres études sont justifiées pour comprendre la neurotoxicité observée dans les modèles animaux et chez l'humain.

Cardiotoxicité

Des effets secondaires au niveau cardiaque dans des études traitant la maladie de Duchenne (DMD) ont été publiés dans la littérature. Dans l'essai mené par le laboratoire Pfizer : Deux patients ont développé une myocardite après traitement par thérapie génique à type d'AAV9. Un des deux patients est décédé. Dans l'essai mené par le laboratoire Sarepta, un patient a développé une myocardite après traitement par thérapie génique à type d'AAVrh74. Celle-ci s'est résolue après administration d'un traitement par stéroïdes.

Ces réactions sont observées principalement à forte dose. Bien que le mécanisme d'installation de la myocardite ne soit pas encore totalement élucidé, l'hypothèse avancée dans une analyse est que le milieu inflammatoire des tissus musculaires endommagés chez les patients atteints de DMD favorise l'induction d'une réponse immunitaire au produit du transgène des vecteurs AAV ou bien que la réaction inflammatoire supplémentaire induite par les vecteurs AAV favorise les réponses auto-réactives des cellules T aux cellules musculaires.(64)

Tumorigénicité / mutagenèse d'insertion

L'insertion du génome du vecteur dans l'ADN génomique, appelée génotoxicité, est théoriquement évitée par l'utilisation de vecteurs non intégratifs tels que les AAV ou HSV (Herpès Simplex Virus). Les AAV ont également une faible fréquence d'insertion. Cependant, il a été démontré que les vecteurs recombinants AAV2, 8 et 9 s'intègrent chez les souris dans le locus Rian, régulant ainsi à la hausse l'ARN non codant et les gènes proximaux de ce locus.

Ceci déclenche secondairement un taux accru de carcinome hépatocellulaire chez les souris néonatales, ce qui n'est pas observé chez les plus âgées.(84) L'intégration à basse fréquence n'a pas démontrée de développement de malignité chez le chien, principalement dans les régions intergéniques.

La pertinence clinique des événements d'intégration reste donc à clarifier. Certaines études indiquent un effet potentiel de tumorigenèse chez l'Homme(85,86). Aucune tumeur du foie n'a été diagnostiquée dans des essais cliniques ou dans la vie réelle à ce jour, cependant il n'y a peut-être pas assez de recul nécessaire pour voir émerger ces potentiels effets au long terme. Chez l'animal (souris néonatales), l'existence de maladies du foie n'a pas démontré un rôle dans la génotoxicité du rAAV. Cependant, une pathologie chronique du foie préexistante peut augmenter le risque de génotoxicité liée au rAAV chez les adultes.(56)

Conclusion sur les risques

Avec l'expérience des essais cliniques précédents et en cours, les nouvelles thérapies géniques sont plus encadrées du point de vue sécurité d'administration. En effet, des procédures d'atténuation des risques sont mises en place et peuvent inclure :

- L'exclusion des patients présentant un taux élevé d'anticorps neutralisants anti-AAV.
- Une immunosuppression améliorée, basée sur les corticostéroïdes, le tacrolimus (87), le mycophénolate mofétil et/ou le rituximab (88), mise en place avant même l'injection du médicament par thérapie génique.
- Le développement de capsides de vecteurs moins immunogènes avec un tropisme amélioré pour la cellule cible souhaitée.
- La sélection d'une séquence promotrice appropriée et non toxique.
- Un rapport contrôlé entre l'ADN du vecteur et le nombre de capsides. C'est-à-dire un contrôle du pourcentage entre les capsides pleines et vides (89). En effet, les capsides vides ne jouent pas de rôle thérapeutique en soi, cependant elles peuvent stimuler l'immunité des patients, ce qui entraîne des effets négatifs.(64) De nombreuses discussions entre les instances et les acteurs de la chaîne du médicament ont été faites sur ce point, et une standardisation de la caractérisation des capsides ressort comme être un élément indispensable afin de fixer un seuil applicable par tous.

- L'utilisation d'une faible dose est recommandée, suite aux récentes observations toxiques en clinique et préclinique. La FDA a permis d'engager une discussion à la suite de l'événement « Cellular, Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee » organisé en Septembre 2021. Cependant, il n'y a pas de recommandation formelle sur la dose maximale à respecter.
- La surveillance très régulière des résultats biologiques immunologiques ainsi que de tous les événements secondaires sont rapportés par l'équipe clinique. Nous allons détailler ces aspects dans la partie suivante.

b. Principales caractéristiques de l'essai clinique CareCN

L'étude clinique est conduite en « ouvert », Open label en anglais, puisqu'il n'y a qu'un type de traitement à recevoir : le traitement actif. Aucun placebo (traitement inactif) n'a été formulé pour cette étude, donc toutes les personnes impliquées (infirmières, médecins, statisticiens, pharmaciens) savent ce que va recevoir (ou a reçu) le patient. C'est une étude de phase I/II, c'est-à-dire que ce sont les premiers tests chez la personne humaine (phase I) et que l'objectif est d'évaluer la sécurité, mais également l'efficacité du produit administré, ici un médicament de thérapie génique (phase II)(90).

En général, dans les maladies rares, les études cliniques sont souvent des phases I/II ou I/II/III car il est difficile de faire d'abord une phase I, puis une phase II puis une phase III. En effet, le nombre de patients diagnostiqués étant très limité dans le monde, il est compliqué d'avoir suffisamment de patients pour effectuer plusieurs phases d'essai clinique à la suite, sachant que les études sont longues à réaliser. De même, les essais sur volontaires sains (non malades) sont extrêmement rares.

L'étude clinique est multinationale car localisée dans plusieurs pays : il y a 4 centres investigateurs en Europe, en France (Pr Labrune - Hôpital Bécclère à Clamart) en Italie (Pr Brunetti-Pierri – Hôpital Federico II à Naples, Pr d'Antiga - Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII à Bergame) et aux Pays-Bas (Pr Beuers - Academic Medical Center à Amsterdam).(91,92) Le projet a le soutien d'un consortium européen appelé CureCN qui réunit 11 partenaires européens. De plus, ce projet a reçu un financement du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union Européenne.

Il s'agit en premier lieu d'une étude d'escalade de dose, pour évaluer la sécurité et l'efficacité du produit, et trouver la dose appropriée ayant le meilleur rapport bénéfice-risque. Le médicament GNT0003, développé par les chercheurs du Généthon, est testé chez des patients atteints sévèrement du syndrome CN âgés d'au moins 9 ans au moment de la signature du consentement, qui ont besoin de photothérapie. L'administration se fait en dose unique par voie intraveineuse (IV). Les patients sont suivis pendant au moins 5 ans après avoir reçu une seule dose IV du médicament, en ligne avec les recommandations actuelles des autorités de santé.(92)

Plusieurs points de suivi sont prévus au protocole et notamment deux sont très importants :

- A la semaine 48 (environ 1 an après injection). Cela correspond à la mesure du principal critère d'efficacité de l'étude.
- Au bout de 4 ans (48 mois après l'injection). Cette mesure a été ajoutée afin de s'aligner aux Guidelines du Comité des médicaments à usage humain sur les thérapies géniques datant du 22 octobre 2009 de l'EMA (European Medicines Agency : Agence Européenne des Médicaments)

Dans le protocole d'une étude clinique, les résultats sont mesurés à partir d'un ou plusieurs critère(s) d'évaluation primaire(s), et d'un ou plusieurs critère(s) d'évaluation secondaire(s). Le(s) critère(s) primaire(s) est(sont) le(s) plus important(s) et celui(ceux) qui va(vont) conditionner la réussite de l'étude clinique. Juste en dessous, nous avons listé les critères publiés sur le site officiel clinicaltrials.gov en rapport avec l'étude CareCN.

Critères d'évaluation primaires :

Mesures de sécurité : Incidence de tous les Événements Indésirables (EI) et Événements Indésirables Graves (EIG ou SAE, pour Serious Adverse Events), sur les 12 premiers mois post-injection.

Ces événements sont évalués par les changements des valeurs biologiques, des signes vitaux, de l'examen physique, rapportés à chaque visite depuis la visite de Baseline (visite du jour du traitement, pour chaque patient). Les résultats cliniques pertinents anormaux concernant les valeurs biologiques, les signes vitaux et les résultats de l'examen physique seront signalés comme des événements indésirables.

L'incidence et la sévérité des événements indésirables pour chaque SOC (système de classification des organes par MedDRA : SOC pour System Organ Class) seront présentées pour chaque niveau de dose et résumées globalement.

- Mesures d'efficacité :
 - Diminution du taux de bilirubine totale sérique 4 mois après l'interruption de la photothérapie quotidienne
 - Concentration en bilirubine totale sérique inférieure ou égale à 300 µmol/L, 7 jours après l'interruption de la photothérapie quotidienne survenant à la semaine 16 après l'administration du GNT0003.

Critère d'évaluation secondaire :

Évaluation de la qualité de vie durant les 60 premiers mois (soit pendant 5 ans)

- Échelle “36-Item Short Form Survey” (SF-36 Health Survey) pour les adultes.
- Échelle “10-Item Short Form Survey” (SF-10 Health Survey) pour les enfants.

Mesure des résultats : changement de la qualité de vie entre la visite de Baseline et jusqu'à 48 mois après l'administration de l'IMP (plusieurs mesures).

Critères d'inclusion :

Les critères d'inclusion sont les critères que doivent obligatoirement présenter les patients pour être inclus dans l'étude. Voici la liste de ceux-ci pour CareCN :

- Patients présentant un syndrome de Crigler-Najjar sévère résultant d'une confirmation moléculaire de mutations du gène UGT1A1 et nécessitant une photothérapie.
- Homme ou femme âgé(e) d'au moins 9 ans à la date de signature du consentement éclairé. Un consentement éclairé est un consentement du patient qui a été formulé après avoir reçu des informations loyales, claires et adaptées à son degré de compréhension, tout en étant libre de toute pression ou contrainte.
- Patient capable de donner son assentiment éclairé et/ou son consentement par écrit. L'information préalable au consentement éclairé est aujourd'hui une obligation légale.

Critères d'exclusion :

Les critères d'exclusions sont les critères que ne peuvent pas présenter les patients inclus dans l'étude.

Voici la liste de ceux-ci pour CareCN :

- Les patients ayant subi une transplantation hépatique
- Patients atteints d'hépatite B ou C chronique
- Patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)
- Patients présentant une maladie hépatique sous-jacente importante
- Patients présentant une encéphalopathie significative
- Patients incapables de se conformer aux exigences du protocole ou refusant de le faire

Par ailleurs, les patients participant à l'étude CareCN ne peuvent participer à aucun autre essai interventionnel, pour des raisons de sécurité et de mesures de l'efficacité.

Actuellement, les personnes atteintes du syndrome CN sévère ne sont pas toutes éligibles à recevoir le traitement expérimental, notamment en raison d'une immunité préexistante aux vecteurs AAV8. En effet, si les patients possèdent des anticorps neutralisants anti-AAV (neutralizing antibodies abrégé NAb en anglais) ils sont inéligibles à recevoir ce traitement de thérapie génique.

D'après une étude réalisée en 2019, 30% de la population serait immunisée contre les AAV8.(93) Il a été observé, par ailleurs, une réactivité croisée avec des sérotypes relativement conservés (AAV2) et éloignés (AAV5). Une autre conclusion de la même publication est que les sujets plus âgés semblent avoir plus de chances d'être séropositifs pour ce type d'AAV.(93) Étant donné que l'immunité préexistante contre le virus AAV de type 8 apparaît après l'exposition naturelle au virus, cette observation n'est pas surprenante et correspond aux précédents rapports publiés.

Des recherches sont en cours pour essayer de trouver des solutions pour contrer ces anticorps neutralisants anti-AAV afin de pouvoir administrer les traitements de thérapie génique aux personnes déjà immunisées contre ces AAV, mais pour le moment aucune solution efficace et sûre n'a été identifiée.(93,94) C'est également pour cette raison que l'injection de thérapie génique est unique pour le moment : le patient ne reçoit qu'une seule injection du médicament de thérapie génique au cours de l'essai clinique.

En effet, les patients ayant reçu une thérapie génique peuvent développer des anticorps neutralisants contre l'AAV injecté, ainsi la réinjection d'une thérapie génique pourrait engendrer une réponse immunitaire importante, néfaste voire fatale.

Dans les maladies rares (voire extrêmement rares), nous pouvons rarement anticiper combien de patients précisément pourront entrer dans l'étude clinique, et il s'agit en général de très petits effectifs comparés aux grandes études menées sur des maladies, chroniques ou aiguës, très répandues dans le monde. Cela peut poser problème lors du dépôt du dossier d'autorisation d'essai clinique puisqu'il est demandé au sponsor d'estimer combien de personnes pourront bénéficier du traitement. Pour cette étude clinique, le nombre de patients a été estimé à 17.(92) La demande d'autorisation d'essai clinique doit être alignée avec les lois en vigueur. Actuellement, c'est la Règlement européen No 536/2014 qui s'applique et les Good Clinical Practice. Cependant, les autorités compétentes internationales et européennes adaptent leurs pratiques et émettent des recommandations supplémentaires pour les médicaments innovants, tout en maintenant un niveau de rigueur scientifique élevé, de la transparence et de l'indépendance.

c. Particularités réglementaires des essais cliniques par thérapie génique

Au niveau national français, la HAS (Haute Autorité de Santé) a sorti en Janvier 2020 un guide intitulé « Plan d'action pour l'évaluation des médicaments innovants ».(51) Dedans, la HAS discute de son rôle et déploie un plan composé de 6 mesures.

La HAS souhaite faire partie du processus de réflexion autour des essais cliniques en accompagnant les entreprises, notamment pour les études pivots, en organisant des « rendez-vous précoces ». Également, des procédures de « fast-tracking » sont promut par la HAS afin d'accélérer l'accès aux médicaments innovants (réduction des délais réglementaires d'évaluation). La notion d'« avis conditionnels » est évoquée, parce que l'évaluation peut être amenée à faire « des paris » qui devront être levés, à court terme, par des données qui ne sont pas disponibles au moment de l'évaluation. Également, la notion de « données de vie réelle » est soulevée à plusieurs reprises. C'est l'une des raisons pour lesquelles le suivi des patients post-injection par thérapie génique est aussi long (cinq voire quinze ans, selon le type de vecteur viral utilisé).

La commission de transparence (CT) de la HAS intègre le concept d'innovation dans son évaluation. D'après elle, « un nouveau médicament peut être considéré comme une innovation dès lors qu'il sauve ou change la vie des patients atteints d'une maladie grave ou évolutive dans un contexte de besoin médical mal couvert (pas d'alternative ou alternatives peu efficaces).»(95) Par ailleurs, un comité Français de la Pharmacopée « produits biologiques et thérapies innovantes » a été créé auprès de l'ANSM en 2021 pour une durée de 4 ans.(96)

Au niveau européen, l'EMA en collaboration avec le CHMP a publié plusieurs Guidelines relatives aux thérapies géniques depuis de nombreuses années. Elles concernent le développement des vecteurs, les études non cliniques mais également les études cliniques et le risque environnemental. Parmi ceux-ci, une guideline importante, publiée en 2009, concerne le suivi des patients (« Follow-up »).(97) Il est indiqué que le protocole de suivi des patients durant l'essai clinique doit dépendre fortement du profil de risque de la thérapie génique. Bien que les principes généraux des GCP (Good Clinical Practice)(98) énoncés dans les textes réglementaires de l'ICH soient applicables aux essais cliniques par thérapie génique, dans certains cas, il peut être nécessaire de les adapter aux caractéristiques spécifiques de ces médicaments innovants. En 2019 la Commission européenne a sorti un document intitulé "GUIDELINES on Good Clinical Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products"(99)

Plusieurs sujets y sont abordés notamment par rapport au design des essais cliniques. L'utilisation de comparateur, la randomisation, la méthode de blinding, l'utilisation de placebo ainsi que les différentes phases des essais, en parallèle du niveau de doses choisis. Le suivi des patients après l'arrêt de l'étude est également discuté.

De manière générale, un plan de gestion des risques est toujours demandé et doit être mis à jour avec les données les plus récentes et pertinentes, comme pour tout essai clinique. L'essentiel est que les décisions prises par le sponsor soient bien documentées, et s'appuient sur des choix éclairés.

d. Premiers résultats d'efficacité de l'essai clinique CareCN

Aujourd'hui, 5 patientes ont été traitées dans le cadre de cette étude clinique internationale :

- 1^{ère} cohorte : 2 patientes ont été traitées avec la première dose minimale (1 en France, 1 aux Pays-Bas) entre 2018 et 2020
- 2^{ème} cohorte : 3 patientes à Bergame en Italie ont été traitées avec une dose plus importante entre Novembre 2020 et Juin 2021 (Service du Docteur D'Antiga)

Certains résultats préliminaires ont été présentés lors de différents congrès, dont le congrès de l'EASL (European Association for the Study of the Liver) le 26 juin 2021. Également, ces résultats ont été par la suite présentés lors du congrès de l'ESGCT (European Society of Gene and Cell Therapy) le 22 octobre 2021. Ces résultats ont été retransmis dans des communiqués de presse datant du 28 juin 2021 en version anglaise et du 27 octobre 2021 en français.(91) Depuis, un abstract a été soumis pour le congrès d'hépatologie (ESPGHAN) en 2022.(100)

Les résultats préliminaires montraient à ces dates des améliorations biologiques et cliniques : la bilirubinémie des patientes traitées dans la cohorte 2 avait chuté et la couleur de la peau et des muqueuses n'était plus jaune. La réponse au traitement chez ses patientes a été très rapide puisque la bilirubinémie commence à décroître dès le 10^{ème} jour post-administration et atteint un niveau proche de celui de la population générale 1 mois post-administration. Ceci réduit les risques de toxicité cérébrale et d'atteinte neurologique. De plus, cela a permis aux patientes de diminuer ou d'arrêter complètement la photothérapie, au moins transitoirement.

Surtout, les patientes n'avaient pas présenté d'effet indésirable majeur significatif. En effet, ces deux premières cohortes semblent démontrer, pour le moment, une bonne tolérance du médicament chez les 5 patientes traitées, et un effet-dose qui sera à confirmer. Dans la 1^{ère} cohorte, les cliniciens ont observé que l'effet thérapeutique était transitoire, puisque à la 16^{ème} semaine post-administration les deux patientes ont été obligées de reprendre le traitement par photothérapie. A la semaine 24, dans la 2^{ème} cohorte, les patientes présentent toujours des taux de bilirubine bas et stables, sans avoir recours à la photothérapie.(100)

Cependant, ce ne sont que des résultats préliminaires et la prudence est de mise concernant l'efficacité au long-terme de ce potentiel futur médicament, puisque les premières patientes ont été traitées il y a moins de quatre ans. Les chercheurs du Généthon travaillent sur l'immunomodulation afin de maintenir un effet sur le long terme pour les futurs patients traités.

L'abstract présenté à l'ESPGHAN en 2022, indique la dose de la 2^{ème} cohorte rétablirait l'expression hépatique de l'UGT1A1 à des niveaux permettant un arrêt de la photothérapie.(100) Cette dose est la dose maximale tolérée qui pourrait être utilisée pour la phase confirmatoire.

En ligne avec le paragraphe sur le design souvent choisi dans les essais cliniques de maladies rares, les données d'efficacité sont souvent limitées pour les mêmes raisons : le manque de patients traités. En effet, l'analyse statistique est très compliquée lorsqu'il n'y a pas beaucoup de patients traités, puisqu'il y a moins de données disponibles. Cependant, il faut toujours analyser le bénéfice-risque pour comprendre les enjeux de la pathologie en question. Pour le moment, le bénéfice-risque de ce traitement est favorable à la poursuite de l'essai.

Conclusion

A travers cette thèse, nous avons pu retracer l'histoire de cette maladie, comprendre les traitements actuels, et les enjeux des nouvelles thérapies, alliant espoirs de guérison et émotions négatives liés aux risques pour les patients.

L'impact de cette pathologie sur l'entourage est très marqué, car il y a un retentissement sur le cercle proche des patients, d'un point de vue social et médical. Cependant, l'administration d'un traitement innovant chez des personnes malades est réglementé et doit être surveillé. Nous avons vu les principaux risques de la thérapie génique notamment hépatiques, immunologiques et neurologiques. Le caractère potentiellement mortel de cette pathologie (particulièrement la forme du syndrome de type I) et l'inexistence d'alternative thérapeutique connue à ce jour impacte positivement la balance bénéfice-risque de ce traitement par thérapie génique dans cette pathologie.

La première patiente a été traitée par le GNT0003 en 2018 pour cet essai clinique CareCN. Nous n'avons pas encore assez de recul nécessaire pour assurer qu'il est suffisamment sûr au long-terme. Les données récoltées sont positives et permettent de croire qu'il est possible qu'un jour un tel traitement soit autorisé à être mis sur le marché international. Les résultats des autres patients sont également encourageants et permettent à l'étude de se poursuivre actuellement.

Les médicaments de thérapie innovante, comme les traitements de thérapie génique sont surveillés de près pendant au moins cinq ans, et généralement jusqu'à quinze ans afin d'avoir un recul nécessaire sur les effets au long-terme. L'émergence de nouveaux traitements par thérapie génique permet aux autorités compétentes de mieux encadrer les essais cliniques et d'acquérir de nouvelles connaissances sur le sujet, afin de découvrir de nouvelles méthodes de surveillance de ces essais et futurs médicaments. Nous pouvons croire qu'une standardisation des pratiques est possible d'ici quelques années, ou décennies, comme dans les essais cliniques de pathologies fréquentes.

Le syndrome de Crigler-Najjar est mis en lumière grâce à l'association de patients AFCN (L'Association Française de Crigler-Najjar) depuis 2003, portée par le Téléthon et les chercheurs du Généthon depuis des années. Aujourd'hui l'étude clinique CareCN en cours sur le territoire international permet à une grande partie de la population atteinte du syndrome CN d'en bénéficier. Cependant, il ne faut pas oublier qu'il existe d'autres maladies potentiellement autant handicapantes, voire plus handicapantes et/ou mortelles dans le monde entier. Nous pensons notamment aux maladies génétiques et aux maladies du foie. De nombreux malades atteints de pathologies rares et mortelles vivent dans l'espoir de résultats pour cet essai clinique. En effet, toute avancée scientifique dans une pathologie est un pas de plus vers de nouvelles connaissances scientifiques et médicales. Nous pouvons imaginer que si ce traitement s'avère efficace pour traiter cette pathologie, il pourrait à l'avenir peut-être convenir pour d'autres maladies impliquant des mutations génétiques similaires, d'autres pathologies touchant le foie, mais également aider à soigner des mécanismes physiologiques altérant la qualité de vie des patients.

Enfin, la dynamique des médicaments de thérapie innovante, notamment leur prix très élevé face à leurs incertitudes, questionne sur la capacité du système d'assurance maladie à maintenir un accès à ces thérapies innovantes, à tous les patients afin de conserver l'égalité des chances, particulièrement en France.

Bibliographie

1. Kivlahan C, James EJ. The natural history of neonatal jaundice. *Pediatrics*. sept 1984;74(3):364-70.
2. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med*. 22 févr 2001;344(8):581-90.
3. Woodgate P, Jardine LA. Neonatal jaundice. *BMJ Clin Evid*. 15 sept 2011;2011:0319.
4. Thoguluva Chandrasekar V, Faust TW, John S. Gilbert Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cité 4 oct 2022]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470200/>
5. Ebrahimi A, Rahim F. Crigler-Najjar Syndrome: Current Perspectives and the Application of Clinical Genetics. *Endocr Metab Immune Disord - Drug Targets*. 2 avr 2018;18(3):201-11.
6. Bhandari J, Thada PK, Yadav D. Crigler Najjar Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cité 6 juill 2022]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562171/>
7. Petit FM. Aspects moléculaires des maladies rares du métabolisme hépatique : à propos de la maladie de Crigler-Najjar [Internet] [Thèse de Doctorat]. Ecole doctorale chimie biologie, Université de NantesITE DE NANTES; 2008 [cité 6 juill 2022]. Disponible sur: https://crigler-najjar.fr/wp-content/uploads/sites/4/2020/08/these_petit.pdf
8. WS Lee, Patrick McKiernan, Susan Beath, Mary Preece, D Baty, Deirdre Kelly, B Burchell, DJ Clarke. Bile Bilirubin Pigment Analysis in Disorders of Bilirubin Metabolism in Early Infancy. 1 Jul 2001. :5 (38-42).
9. Kahn A. Thérapie génique d'une épidermolyse bulleuse jonctionnelle. *médecine/sciences*. janv 2007;23(1):109-10.
10. Chand D, Mohr F, McMillan H, Tukov FF, Montgomery K, Kleyn A, et al. Hepatotoxicity following administration of onasemnogene abeparvovec (AVXS-101) for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Hepatol*. mars 2021;74(3):560-6.
11. Crigler JF, Najjar VA. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics*. août 1952;10(2):169-80.
12. Wagner KH, Shiels RG, Lang CA, Seyed Khoei N, Bulmer AC. Diagnostic criteria and contributors to Gilbert's syndrome. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 17 févr 2018;55(2):129-39.
13. Kumar P, Sasmal G, Gupta S, Saxena R, Kohli S. Crigler Najjar Syndrome Type 2 (CNS Type 2): An Unwonted Cause of Jaundice in Adults. *J Clin Diagn Res JCDR*. juill 2017;11(7):OD05-6.
14. Al-Shurafa HA, Bassas AF, Broering DC, Rogiers XG, Wali SH, Burdelski MM. Management of Crigler-Najjar Syndrome type I. *Saudi Med J*. juin 2001;22(6):486-9.

15. Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ezzer JB, Levi AJ. Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am J Med.* sept 1969;47(3):395-409.
16. Gollan JL, Huang SN, Billing B, Sherlock S. Prolonged Survival in Three Brothers with Severe Type 2 Crigler-Najjar Syndrome. *Gastroenterology.* juin 1975;68(6):1543-55.
17. Sun L, Li M, Zhang L, Teng X, Chen X, Zhou X, et al. Differences in UGT1A1 gene mutations and pathological liver changes between Chinese patients with Gilbert syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. *Medicine (Baltimore).* nov 2017;96(45):e8620.
18. Strauss KA, Robinson DL, Vreman HJ, Puffenberger EG, Hart G, Morton DH. Management of hyperbilirubinemia and prevention of kernicterus in 20 patients with Crigler-Najjar disease. *Eur J Pediatr.* mai 2006;165(5):306-19.
19. Sinaasappel M, Jansen PL. The differential diagnosis of Crigler-Najjar disease, types 1 and 2, by bile pigment analysis. *Gastroenterology.* mars 1991;100(3):783-9.
20. Myara A. Hyperbilirubinémies néonatales. *Bio Trib Mag.* mai 2006;18(1):44-6.
21. Ardakani SB, Dana VG, Ziaee V, Ashtiani MTH, Djavaid GE, Alijani M. Bilirubin/Albumin Ratio for Predicting Acute Bilirubin-induced Neurologic Dysfunction. *Iran J Pediatr.* mars 2011;21(1):28-32.
22. Brodersen R. Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid. *J Biol Chem.* 10 avr 1979;254(7):2364-9.
23. Phillips J, Henderson AC. Hemolytic Anemia: Evaluation and Differential Diagnosis. *Am Fam Physician.* 15 sept 2018;98(6):354-61.
24. van der Veere CN, Sinaasappel M, McDonagh AF, Rosenthal P, Labrune P, Odièvre M, et al. Current therapy for Crigler-Najjar syndrome type 1: Report of a world registry: Current therapy for Crigler-Najjar syndrome type 1: Report of a world registry. *Hepatology.* août 1996;24(2):311-5.
25. Rozga J, Piątek T, Małkowski P. Human albumin: old, new, and emerging applications. *Ann Transplant.* 10 mai 2013;18:205-17.
26. Hansen TWR, Wong RJ, Stevenson DK. Molecular Physiology and Pathophysiology of Bilirubin Handling by the Blood, Liver, Intestine, and Brain in the Newborn. *Physiol Rev.* 1 juill 2020;100(3):1291-346.
27. Vilca-Melendez H. Paediatric liver transplantation: the surgical view. *Postgrad Med J.* 1 oct 2004;80(948):571-6.
28. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med.* 14 mai 1998;338(20):1422-6.

29. Cascorbi I. The Pharmacogenetics of Immune-Modulating Therapy. In: *Advances in Pharmacology* [Internet]. Elsevier; 2018 [cité 18 août 2022]. p. 275-96. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1054358918300164>
30. BASE DE DONNÉES PUBLIQUE DES MÉDICAMENTS [Internet]. 2022 [cité 3 août 2022]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/>
31. Renders L, Frisman M, Ufer M, Mosyagin I, Haenisch S, Ott U, et al. CYP3A5 Genotype Markedly Influences the Pharmacokinetics of Tacrolimus and Sirolimus in Kidney Transplant Recipients. *Clin Pharmacol Ther.* févr 2007;81(2):228-34.
32. Debette-Gratien M, Woillard JB, Picard N, Sebah M, Loustaud-Ratti V, Sautereau D, et al. Influence of Donor and Recipient CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 Genotypes on Clinical Outcomes and Nephrotoxicity in Liver Transplant Recipients. *Transplantation.* oct 2016;100(10):2129-37.
33. Legendre C, Zuber J, Anglicheau D, Le Quintrec M, Martinez F, Mamzer-Bruneel MF, et al. Immunosuppression en transplantation rénale. *Ann Urol.* déc 2007;41(6):276-84.
34. Schröder H, Junge N, Herden U, Deutschmann A, Weidemann SA, Krebs-Schmitt D, et al. Outcome of liver transplantation and prevalence of liver fibrosis in Crigler-Najjar syndrome. *Clin Transplant* [Internet]. avr 2021 [cité 10 août 2022];35(4). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ctr.14219>
35. M. Pacifici G. Clinical Pharmacology of Phenobarbital in Neonates: Effects, Metabolism and Pharmacokinetics. *Curr Pediatr Rev.* 4 janv 2016;12(1):48-54.
36. Sugatani J. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology.* mai 2001;33(5):1232-8.
37. Czekaj P. Phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 genes. *Acta Biochim Pol.* 31 déc 2000;47(4):1093-105.
38. Borden AR, Satrom KM, Wratkowski P, George TN, Adkisson CA, Vreman HJ, et al. Variation in the Phototherapy Practices and Irradiance of Devices in a Major Metropolitan Area. *Neonatology.* 2018;113(3):269-74.
39. Barré D. La photothérapie. *ITBM-RBM News.* avr 2002;23(2):11-20.
40. Tu ZH, Shang DS, Jiang JC, Zhang W, Zhang M, Wang WL, et al. Liver transplantation in Crigler-Najjar syndrome type I disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* oct 2012;11(5):545-8.
41. Faulhaber F, Procianoy R, Silveira R. Side Effects of Phototherapy on Neonates. *Am J Perinatol.* févr 2019;36(03):252-7.
42. Ennever JF, Costarino AT, Polin RA, Speck WT. Rapid clearance of a structural isomer of bilirubin during phototherapy. *J Clin Invest.* 1 juin 1987;79(6):1674-8.
43. Tan KL. Phototherapy for neonatal jaundice. *Clin Perinatol.* sept 1991;18(3):423-39.

44. Suils H. Grossesse chez une patiente atteinte de la maladie de Crigler-Najjar. A propos d'une observation clinique. [Internet] [Thèse de Doctorat en Médecine]. Université René Descartes (Paris 5); 2006 [cité 7 oct 2022]. Disponible sur: https://crigler-najjar.fr/wp-content/uploads/sites/4/2020/07/these_crigler-najjar.pdf
45. Yahia S, Shabaan AE, Gouida M, El-Ghanam D, Eldeglä H, El-Bakary A, et al. Influence of hyperbilirubinemia and phototherapy on markers of genotoxicity and apoptosis in full-term infants. *Eur J Pediatr.* avr 2015;174(4):459-64.
46. Soulié JC, Larsen M, Andreu G, Berry M, Gabai A, Galiay JC, et al. Étude rétrospective de l'exsanguinotransfusion du nouveau-né au moyen de sang reconstitué. Bilan de 60 échanges. *Transfus Clin Biol.* juin 1999;6(3):166-73.
47. Muchowski KE. Evaluation and treatment of neonatal hyperbilirubinemia. *Am Fam Physician.* 1 juin 2014;89(11):873-8.
48. Flageul M. Mise au point d'une thérapie génique de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 par des AVV 8 recombinants [Internet] [Thèse de Doctorat en biologie, médecine, santé. Spécialité : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique]. Université de Nantes; 2009 [cité 7 oct 2022]. Disponible sur: https://crigler-najjar.fr/wp-content/uploads/sites/4/2020/10/these_flageul_maude_these_et_resume.pdf
49. Ronzitti G, Bortolussi G, van Dijk R, Collaud F, Charles S, Leborgne C, et al. A translationally optimized AAV-UGT1A1 vector drives safe and long-lasting correction of Crigler-Najjar syndrome. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2016;3:16049.
50. Gruntman AM, Flotte TR. The rapidly evolving state of gene therapy. *FASEB J.* avr 2018;32(4):1733-40.
51. Haute Autorité de Santé. Plan d'action pour l'évaluation des médicaments innovants [Internet]. [cité 19 oct 2022] p. 7. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2020-01/plan_daction_pour_les_medicaments_innovants_27.01.2020.pdf
52. Gonçalves GAR, Paiva R de MA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein São Paulo.* sept 2017;15(3):369-75.
53. Esteve. Application de la thérapie génique dans l'hyperoxalurie primitive de type 1 : utilisation des technologies TALENs et CRISPR/Cas [Internet] [Thèse de Doctorat en Pharmacie]. [6 Novembre 2015]: Université de Poitiers; Poitiers [cité 7 oct 2022]. Disponible sur: <http://petille.univ-poitiers.fr/notice/view/52382>
54. Ocana-Santero G, Díaz-Nido J, Herranz-Martín S. Future Prospects of Gene Therapy for Friedreich's Ataxia. *Int J Mol Sci.* 11 févr 2021;22(4):1815.
55. Masat E, Pavani G, Mingozzi F. Humoral immunity to AAV vectors in gene therapy: challenges and potential solutions. *Discov Med.* juin 2013;15(85):379-89.
56. Sabatino DE, Bushman FD, Chandler RJ, Crystal RG, Davidson BL, Dolmetsch R, et al. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 3 août 2022;30(8):2646-63.

57. EMEA (Eur. Med. Agency). ICH considerations: general principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors. [Internet]. 2006 [cité 17 oct 2022]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002679.pdf
58. Clinical Trial Facilitation Group. Recommendations related to contraception and pregnancy testing in clinical trials. Version 1.1 [Internet]. 2020 sept [cité 17 oct 2022] p. 10. Disponible sur: https://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/01-About_HMA/Working_Groups/CTFG/2020_09_HMA_CTFG_Contraception_guidance_Version_1.1_updated.pdf
59. Goswami R, Subramanian G, Silayeva L, Newkirk I, Doctor D, Chawla K, et al. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Front Oncol.* 24 avr 2019;9:297.
60. South E, Cox E, Meader N, Woolacott N, Griffin S. Strimvelis® for Treating Severe Combined Immunodeficiency Caused by Adenosine Deaminase Deficiency: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Highly Specialised Technology Evaluation. *PharmacoEconomics - Open.* juin 2019;3(2):151-61.
61. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol Ther.* sept 2006;14(3):316-27.
62. Hinderer C, Katz N, Buza EL, Dyer C, Goode T, Bell P, et al. Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Hum Gene Ther.* mars 2018;29(3):285-98.
63. Friese J, Geitmann S, Holzwarth D, Müller N, Sassen R, Baur U, et al. Safety Monitoring of Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy with Onasemnogene Apeparvovec -A Single Centre Experience. *J Neuromuscul Dis.* 2021;8(2):209-16.
64. Ertl HCJ. Immunogenicity and toxicity of AAV gene therapy. *Front Immunol.* 12 août 2022;13:975803.
65. Wilson JM, Flotte TR. Moving Forward After Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy. *Hum Gene Ther.* 1 juill 2020;31(13-14):695-6.
66. Shieh PB, Bönnemann CG, Müller-Felber W, Blaschek A, Dowling JJ, Kuntz NL, et al. Re: “Moving Forward After Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy” by Wilson and Flotte. *Hum Gene Ther.* 1 août 2020;31(15-16):787-787.
67. Martino AT, Markusic DM. Immune Response Mechanisms against AAV Vectors in Animal Models. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* juin 2020;17:198-208.
68. Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, Wong NCW, Bartlett JS, Muruve DA. Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. *J Virol.* mai 2002;76(9):4580-90.
69. Bucher K, Rodríguez-Bocanegra E, Dauletbekov D, Fischer MD. Immune responses to retinal gene therapy using adeno-associated viral vectors - Implications for treatment success and safety. *Prog Retin Eye Res.* juill 2021;83:100915.

70. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 16 mars 2018;8:87-104.
71. Faust SM, Bell P, Cutler BJ, Ashley SN, Zhu Y, Rabinowitz JE, et al. CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J Clin Invest.* juill 2013;123(7):2994-3001.
72. Ferrand M, Galy A, Boisgerault F. A dystrophic muscle broadens the contribution and activation of immune cells reacting to rAAV gene transfer. *Gene Ther.* sept 2014;21(9):828-39.
73. George LA. No CpGs for AAVs? *Blood.* 11 févr 2021;137(6):721-3.
74. Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Shilling C, Lewis S, et al. Dystrophin Immunity in Duchenne's Muscular Dystrophy. *N Engl J Med.* 7 oct 2010;363(15):1429-37.
75. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* mars 2006;12(3):342-7.
76. Herzog RW, Arruda VR. Substantial immune suppression required in gene therapy for muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord NMD.* janv 2008;18(1):83-4.
77. Luo S, Hu D, Wang M, Zipfel PF, Hu Y. Complement in Hemolysis- and Thrombosis-Related Diseases. *Front Immunol.* 2020;11:1212.
78. Palma LMP, Eick RG, Dantas GC, Tino MK dos S, de Holanda MI, the Brazilian Thrombotic Microangiopathy and Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Study Group (aHUS Brazil). Atypical hemolytic uremic syndrome in Brazil: clinical presentation, genetic findings and outcomes of a case series in adults and children treated with eculizumab. *Clin Kidney J.* 2 avr 2021;14(4):1126-35.
79. Patriquin CJ, Pavenski K, Garland J, Girard LP, Isenring P. Complement-Amplifying Conditions in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Canadian Case Series. *Can J Kidney Health Dis.* janv 2022;9:205435812211002.
80. Deepa H. Chand. Cellular, Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee September 3, 2021 Meeting Presentation - Clinical Findings of Thrombotic Microangiopathy (TMA) [Internet]. 2021 sept [cité 13 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/media/151999/download>
81. Buscara L, Gross DA, Daniele N. Of rAAV and Men: From Genetic Neuromuscular Disorder Efficacy and Toxicity Preclinical Studies to Clinical Trials and Back. *J Pers Med.* 28 nov 2020;10(4):E258.
82. Fortunato F, Rossi R, Falzarano MS, Ferlini A. Innovative Therapeutic Approaches for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Clin Med.* 17 févr 2021;10(4):820.
83. Hordeaux J, Hinderer C, Goode T, Buza EL, Bell P, Calcedo R, et al. Toxicology Study of Intra-Cisterna Magna Adeno-Associated Virus 9 Expressing Iduronate-2-Sulfatase in Rhesus Macaques. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 21 sept 2018;10:68-78.

84. Li H, Malani N, Hamilton SR, Schlachterman A, Bussadori G, Edmonson SE, et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood*. 24 mars 2011;117(12):3311-9.
85. Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, Trivedi NS, Carrillo-Carrasco N, Senac JS, et al. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest*. févr 2015;125(2):870-80.
86. Donsante A, Miller DG, Li Y, Vogler C, Brunt EM, Russell DW, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science*. 27 juill 2007;317(5837):477.
87. Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin JH, Tamaoka A, Okada T, et al. rAAV8 and rAAV9-Mediated Long-Term Muscle Transduction with Tacrolimus (FK506) in Non-Human Primates. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 11 sept 2020;18:44-9.
88. Ferris D, Samakoses R, Block S, Lazcano-Ponce E, Restrepo J, Reisinger K, et al. Long-term study of a quadrivalent human papillomavirus vaccine. *Pediatrics*. 2014;134(3):e657-65.
89. Gao K, Li M, Zhong L, Su Q, Li J, Li S, et al. Empty Virions In AAV8 Vector Preparations Reduce Transduction Efficiency And May Cause Total Viral Particle Dose-Limiting Side-Effects. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2014;1(9):20139.
90. Diez Pascual C. Clinical Drug Trials: The Path to the Patient. In: Barreiro C, Barredo JL, éditeurs. *Antimicrobial Therapies* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021 [cité 22 août 2022]. p. 411-21. (Methods in Molecular Biology; vol. 2296). Disponible sur: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1358-0_24
91. Généthon. Résultats préliminaires d'un essai clinique pour le syndrome de Crigler-Najjar, une maladie rare du foie, présentés au congrès de l'ESGCT. 27 oct 2021; Disponible sur: <https://www.genethon.fr/resultats-preliminaires-dun-essai-clinique-pour-le-syndrome-de-crigler-najjar-une-maladie-rare-du-foie-presentes-au-congres-de-leasl/>
92. Généthon (ClinicalTrials.gov). Gene Therapy for Severe Crigler Najjar Syndrome (CareCN) [Internet]. [cité 22 août 2022]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03466463>
93. Aronson SJ, Veron P, Collaud F, Hubert A, Delahais V, Honnet G, et al. Prevalence and Relevance of Pre-Existing Anti-Adeno-Associated Virus Immunity in the Context of Gene Therapy for Crigler–Najjar Syndrome. *Hum Gene Ther*. 1 oct 2019;30(10):1297-305.
94. Meliani A, Boisgerault F, Hardet R, Marmier S, Collaud F, Ronzitti G, et al. Antigen-selective modulation of AAV immunogenicity with tolerogenic rapamycin nanoparticles enables successful vector re-administration. *Nat Commun*. déc 2018;9(1):4098.
95. Haute Autorité de Santé. Doctrine de la Commission de la Transparence : Principes d'évaluation de la CT relatifs aux médicaments en vue de leur accès au remboursement [Internet]. 2020 déc [cité 19 oct 2022] p. 29. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-10/doctrine_10102018.pdf

96. ANSM. Décision n° 2021-156 du 21/06/2021 - Création du Comité Français de la Pharmacopée « Produits biologiques et thérapies innovantes » à l'ANSM [Internet]. France; 2021 juin [cité 19 oct 2022] p. 1. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/actualites/decision-ndeg-2021-156-du-21-06-2021-creation-du-comite-francais-de-la-pharmacopee-produits-biologiques-et-therapies-innovantes-a-lansm>
97. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on follow-up of patients administered with gene therapy medicinal products [Internet]. 2009 oct [cité 21 oct 2022] p. 12. Report No.: EMEA/CHMP/GTWP/60436/2007. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-follow-patients-administered-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf
98. School Of Pharmacy, Career Point University, Hamirpur, Himachal Pradesh, INDIA 176041., Devi R, Devi A, School Of Pharmacy, Career Point University, Hamirpur, Himachal Pradesh, INDIA 176041., Kumar S, School Of Pharmacy, Career Point University, Hamirpur, Himachal Pradesh, INDIA 176041., et al. Good Clinical Practice in Pharmacovigilance. *Int J Adv Res.* 30 avr 2022;10(04):428-33.
99. European Commission. Guidelines on Good Clinical Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products [Internet]. 2019 oct [cité 21 oct 2022] p. 15. Disponible sur: https://health.ec.europa.eu/system/files/2019-10/atmp_guidelines_en_0.pdf
100. D'antiga L. Gene therapy for Crigler Najjar syndrome: results of the dose finding part of the CareCN, phase 1-2 clinical trial. 24 juin 2022;2.

RESUME DE LA THESE EN FRANCAIS

Le syndrome de Crigler-Najjar (CN) est une pathologie autosomique récessive extrêmement rare (environ une naissance sur un million). Il se développe très tôt dans les premiers jours de vie par un ictère cutanéomuqueux franc et persistant à bilirubine non-conjuguée. Ce syndrome est causé par une mutation génétique sur le gène UGT1A1, qui peut être total (type I) ou partiel (type II). La plus grosse problématique de ce syndrome reste la toxicité neurologique que l'accumulation de bilirubine peut engendrer. Actuellement, les seuls traitements existants sont des traitements symptomatiques dans le but de diminuer les symptômes et minimiser le risque de toxicité. Dans l'espoir de trouver une solution thérapeutique curative, les chercheurs du Généthon ont développé une thérapie génique à base d'AAV8 pour traiter ces patients. L'essai clinique CareCN est actuellement développé au niveau international et les premiers résultats sont encourageants. Néanmoins, le recul sur ces thérapies innovantes est trop faible et la prudence reste obligatoire. A l'aide d'une analyse bénéfice-risque, encadrée par les réglementations en vigueur, l'objectif est de comprendre les enjeux de la thérapie génique dans ce syndrome de Crigler-Najjar.

TITRE DE LA THESE EN ANGLAIS

Implementation and monitoring of gene therapy treatment in Crigler-Najjar syndrome

RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS

Crigler-Najjar syndrome (CN) is a rare recessive autosomal disease characterized by the mutation of the gene encoding for the hepatic uridine diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) enzyme. Depending on the enzyme activity, two types of the syndrome can be identified: the enzyme is totally absent (type I) or its activity is decreased (type II). The symptoms of this metabolic disorder start early in life by a cutaneous jaundice and eventually lead to severe unconjugated hyperbilirubinemia that can cause irreversible neurological injury and death. The only curative treatment is currently the liver transplantation. The other available treatments can only manage symptoms and their efficacy tends to decrease overtime. Genethon has developed a liver gene therapy with adeno-associated virus (AAV) vectors to treat the Crigler-Najjar patients in an international clinical trial. Based on the promising first results, serum bilirubin levels could be significantly reduced by the UGT1A1 transgene. However, a long-term follow-up is required by the competent authorities to fully assess the safety profile of the therapy. The purpose of this thesis is to display the risk-benefit balance at stake in the gene therapy of the Crigler-Najjar syndrome.

PROPOSITION DE MOTS-CLES

Thérapie génique ; Crigler-Najjar ; Essais cliniques ; Biotechnologies ; Pharmacovigilance ; Rapport bénéfice/risque ; Maladies rares ; Téléthon ; Généthon ; Associations de Patients