

UC San Diego

UC San Diego Previously Published Works

Title

Cystinosis: From the gene identification to the first gene therapy clinical trial

Permalink

<https://escholarship.org/uc/item/75p0b59j>

Journal

Médecine/sciences, 39(3)

ISSN

0767-0974

Author

Cherqui, Stéphanie

Publication Date

2023-03-01

DOI

10.1051/medsci/2023025

Peer reviewed

Cystinose

De la découverte du gène aux premiers essais de thérapie génique

Stéphanie Cherqui

► La cystinose est une maladie métabolique autosomique récessive caractérisée par une accumulation lysosomale de cystine dans toutes les cellules de l'organisme. La cystinose infantile débute dans la petite enfance par un syndrome de Fanconi et aboutit à une détérioration progressive de la fonction de la plupart des organes, y compris les reins, les yeux, la thyroïde, les muscles et le pancréas, et finit par entraîner une mort prématurée. Le traitement par la cystéamine ne permet que de retarder la progression de la maladie. Afin de développer une approche de thérapie génique pour la cystinose, un modèle murin qui présente les principales complications de la maladie a été développé grâce à l'identification du gène *CTNS*, dont le produit, la cystinosine, est un co-transporteur de cystine-protons. Cette revue décrit les étapes allant de la découverte du gène à la thérapie génique pour la cystinose, qui a permis de traiter six patients jusqu'à présent. ◀



Department of Pediatrics,
Division of Genetics, University
of California, San Diego, La Jolla,
California, États-Unis.
scherqui@ucsd.edu

par un syndrome de Toni-Debré-Fanconi, qui se caractérise par une tubulopathie proximale et un retard de croissance [3]. La cystinose est d'ailleurs la cause la plus fréquente de ce syndrome représentant 20 % des patients atteints de tubulopathie proximale héréditaire [4]. Les patients évoluent vers une insuffisance rénale terminale à différents âges, de l'adolescence à l'adulte jeune. Les manifestations cliniques extra-rénales incluent une atteinte oculaire, liée à l'accumulation de cristaux de cystine dans la cornée entraînant une photophobie, un diabète, une hypothyroïdie, des atteintes neurologique et osseuse, une myopathie vacuolaire distale, une insuffisance respiratoire et des troubles de la déglutition [5]. La forme juvénile débute vers l'âge de 12-15 ans par une atteinte rénale qui évolue vers une insuffisance rénale terminale [6]. La forme oculaire, comme son nom l'indique, se caractérise exclusivement par une atteinte oculaire [7].

Le traitement de la cystinose repose sur la cystéamine, qui permet le clivage de la cystine et la formation d'un complexe cystéine-cystéamine, et de la cystéine, qui peuvent alors facilement sortir des lysosomes [8]. Si ce traitement est instauré précocement et à fortes doses, il permet de retarder l'évolution de la maladie. Cependant, il doit être pris régulièrement toutes les 6 ou 12 heures, et présente de nombreux effets secondaires qui rendent son administration difficile [9, 10]. Chaque symptôme étant traité individuellement, les enfants doivent prendre des dizaines de médicaments, plusieurs fois par jour. Lorsqu'ils atteignent le stade d'insuffisance rénale, ils ont alors recours à la dialyse et la transplantation rénale.

Identification du gène impliqué dans la cystinose

Le locus qui a été rendu responsable de la cystinose a été identifié sur le bras court du chromosome 17, en 1995, grâce à l'identification

Vignette (© iStock).

► La cystinose est une maladie héréditaire de transmission autosomique récessive dont l'incidence annuelle est estimée à 1/100 000 à 1/200 000 naissances [1]. La cystinose fait partie des maladies de surcharge lysosomale et est caractérisée par une accumulation de cystine, un dimère de cystéine, dans les lysosomes de tous les organes, liée à un défaut de transport de la cystine à travers la paroi lysosomale [2]. La cystine libre est normalement transportée à travers la membrane lysosomale vers le cytosol où elle est réutilisée par la cellule après sa réduction en cystéine. Au cours de la cystinose, la cystine est stockée dans les lysosomes et tend à former des cristaux [3]. Il existe trois formes cliniques de la maladie : la forme infantile, la forme juvénile et la forme oculaire. La forme la plus grave et la plus fréquente est la forme infantile qui débute vers l'âge de 6 à 8 mois

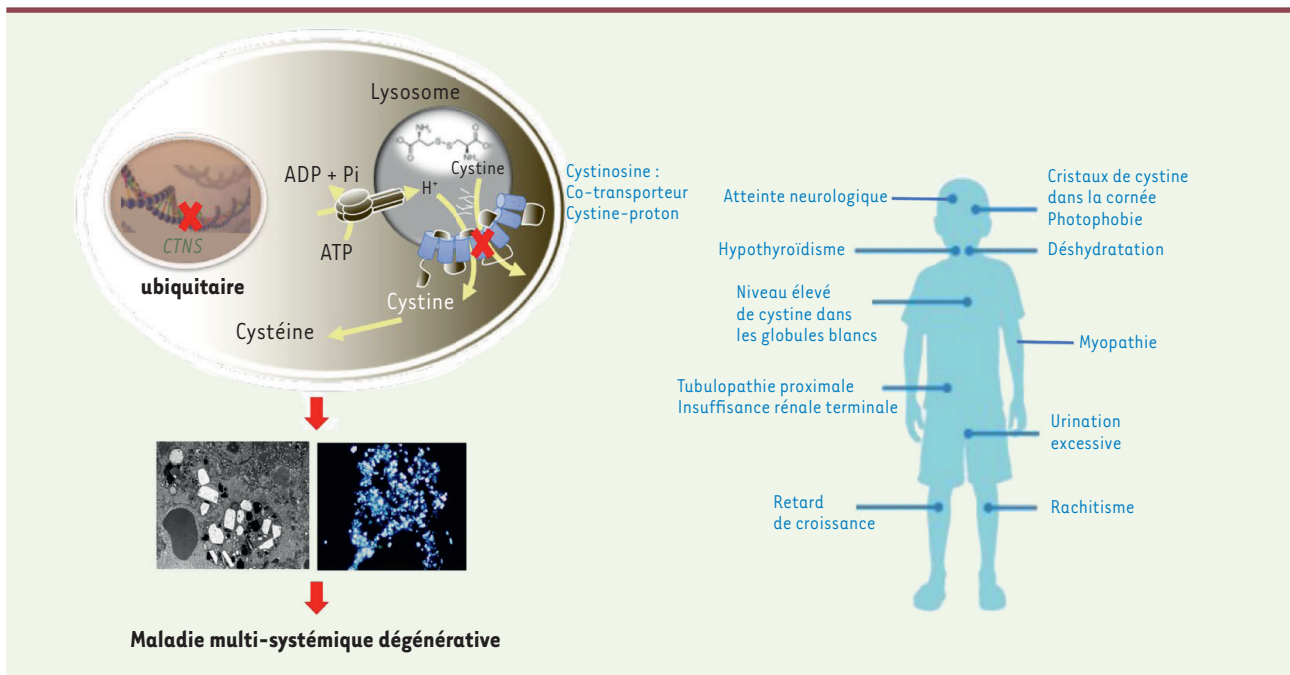


Figure 1. Physiopathologie de la cystinose. La cystinose est une maladie héréditaire monogénique causée par des mutations ou des délétions dans le gène *CTNS* qui est exprimé de façon ubiquitaire. Ce gène code une protéine lysosomale à sept domaines transmembranaires, un co-transporteur de cystine et de protons. Chez les patients présentant une cystinose, il y a une accumulation de cystine dans tous les tissus, entraînant une maladie multi-systémique.

de délétions dans cette région [11]. Par des approches associant *exon-trapping*¹, clonage positionnel et séquençage génomique, un nouveau gène a été identifié dans l'intervalle minimum de délétion. La découverte de mutations ponctuelles inactivatrices de ce gène chez des patients présentant une cystinose a permis d'identifier ce gène comme le gène responsable de la cystinose [12]. Ce gène, dénommé *CTNS*, couvre une région de 23 kilobases (kb), comporte 12 exons et est à l'origine d'un transcrit de 2,6 kb exprimé dans tous les organes testés (Figure 1). *CTNS* code une protéine de 367 acides aminés, la cystinosine, qui possède sept domaines transmembranaires, un signal potentiel d'adressage au lysosome en C-terminal (GY-XX-résidu hydrophobe) et sept sites potentiels de glycosylation, en N-terminal. L'ensemble de ces éléments permettait de prédire que la cystinosine était une protéine de la membrane lysosomale, ce qui était compatible avec la fonction attendue.

Caractérisation de la cystinosine

En utilisant des constructions contenant le gène *CTNS* fusionné avec l'ADNc codant la GFP (*green fluorescent protein*), transfectées dans des cellules rénales, il a été possible par microscopie confocale de montrer que la cystinosine était effectivement une protéine lysosomale [13]. La délétion du signal d'adressage lysosomal potentiel

de la cystinosine (GY-DQ-L), situé à son extrémité C-terminale, induisant la redirection partielle de la protéine vers la membrane plasmique, prouvait que ce motif était impliqué dans l'adressage de la cystinosine au lysosome. Un second signal d'adressage lysosomal a également été identifié au niveau de la troisième boucle cytoplasmique de la cystinosine. Ces travaux ont permis de montrer que la cystinosine était bien une protéine membranaire du lysosome et que son transport vers le lysosome était réalisé grâce à l'intervention de deux systèmes d'adressage lysosomal, dont l'un était un nouveau signal, qui, pour la première fois, avait été localisé dans une boucle cytoplasmique et non dans l'extrémité C-terminale de la protéine [13].

En utilisant un système cellulaire *in vitro* et de la cystine marquée avec un radio-élément, il a ensuite été montré que la cystinosine était bien un transporteur de cystine, tout particulièrement un symporteur cystine-proton permettant l'export de la cystine hors des lysosomes (Figure 1) [14]. La cystinosine semblait ainsi appartenir à une nouvelle famille de transporteurs à sept domaines transmembranaires, qui sont des symporteurs substrat-proton et qui présentent une taille similaire (entre 300 et 400 acides aminés), une topologie prédite identique (sept domaines transmembranaires) et des motifs répétés conservés, incluant la séquence PQ (proline-

¹ Le piégeage d'exons est une technique de biologie moléculaire permettant d'identifier des exons potentiels dans un fragment d'ADN eucaryote.

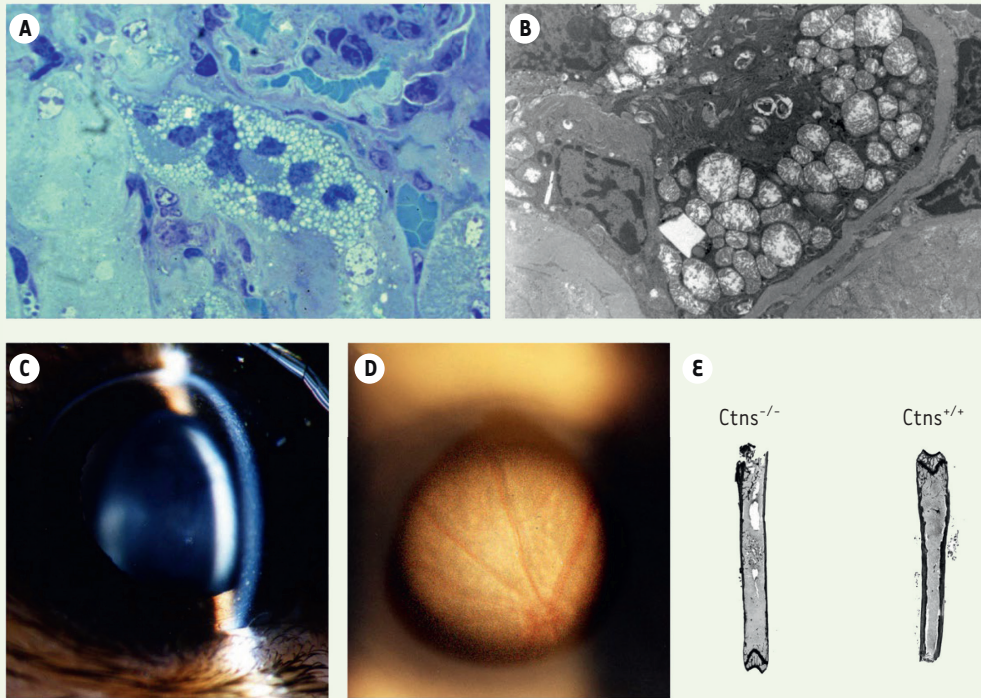


Figure 2. Phénotype des souris $Ctns^{-/-}$ représentant un modèle de cystinose. (A, B) Sections histologiques de rein de souris $Ctns^{-/-}$ de huit mois. Coupe semi-fine (A) et microscopie électronique (B) montrant des mitochondries géantes et des cristaux de cystine dans des cellules tubulaires proximales. (C, D) Atteinte oculaire des souris $Ctns^{-/-}$. (C) Des cristaux de cystine sont observés dans la cornée par lampe à fente. (D) Des taches de dépigmentation sont présentes au niveau de la rétine. (E) Atteinte osseuse des souris $Ctns^{-/-}$. Les os des souris $Ctns^{-/-}$ sont déminéralisés, avec une ostéoporose caractérisée par un amincissement de la diaphyse (selon [34]).

glutamine), situés dans le premier domaine transmembranaire et dans la troisième boucle cytoplasmique [15].

Corrélations génotype/phénotype

Les études de localisation subcellulaire de la cystinosine et du transport de cystine par la cystinosine ont permis d'étudier les conséquences des différentes mutations faux-sens et de types insertions/délétions en phase retrouvées chez les patients présentant trois différentes formes de cystinose (31 mutations) [16]. Grâce à ces études, il a pu être montré que les mutations retrouvées chez les patients présentant une forme infantile de cystinose avaient pour conséquence, dans la majorité des cas, d'abolir totalement le transport de cystine par la cystinosine. En revanche, pour les mutations détectées chez les patients présentant une cystinose juvénile ou oculaire, une simple diminution du transport de cystine a été observée. Grâce à ces études fonctionnelles de la cystinosine, il est ainsi possible de prévoir la gravité d'une nouvelle mutation détectée chez un patient. Notons que la mutation la plus fréquente dans la cystinose est la délétion de 57 kb qui élimine non seulement le gène *CTNS* mais aussi le gène *SHPK* (*sedoheptulokinase* ou *CARKL*, pour *carbohydrate kinase-like protein*) [17]. Cette mutation est trouvée chez 60 % des patients d'origine européenne [18].

Création d'un modèle murin de la cystinose

Afin de produire un modèle murin de cystinose, le gène *Ctns* homologue murin du gène humain a été cloné et caractérisé [19]. *Ctns* est composé de dix exons et code une protéine de 367 acides aminés qui présente 92,6 % de similitude avec la cystinosine.

Le gène *Ctns* a donc été invalidé dans des cellules embryonnaires murines et des souris $Ctns^{-/-}$ sur un fond génétique 129sv/C57Bl/6 ont été fabriquées [34]. Ces souris se reproduisent selon un ratio mendélien normal et ont une croissance, un développement et une fertilité normaux. Les souris $Ctns^{-/-}$ accumulent significativement la cystine dans tous les organes testés, à des taux comparables à ceux observés chez les patients cystinotiques, le ratio d'accumulation entre les souris $Ctns^{-/-}$ et $Ctns^{+/+}$ augmentant avec l'âge. Des cristaux de cystine sont observés dans la plupart des organes. Cependant, malgré l'importance de l'accumulation de cystine dans le rein et la présence de cristaux et de mitochondries « géantes » (Figure 2), les souris $Ctns^{-/-}$ ne développent pas de tubulopathie ni d'insuffisance

rénale. En revanche, ces souris présentent des anomalies oculaires très similaires à celles retrouvées chez les enfants présentant une cystinose avec des dépôts cornéens de cystine, des taches de dépigmentation dans la rétine (Figure 2), et des électrorétinogrammes plats ou « supernormaux », qui seraient dus à la réfraction de la lumière sur les cristaux de cystine [20]. Les souris *Ctns*^{-/-} présentent également une déminéralisation osseuse avec déformation des os longs, ainsi que des anomalies musculaires (Figure 2). Enfin, ces souris présentent des troubles du comportement dans un environnement dit d'exploration, traduisant des troubles neurologiques ou visuels.

Par la suite, le groupe de Corinne Antignac (hôpital Necker-Enfants malades) a généré des souris *Ctns*^{-/-} sur un autre fond génétique, le fond homozygote C57Bl/6J, par croisements répétés des souris du modèle original 129sv/C57Bl/6 avec des souris C57Bl/6J. Ces souris *Ctns*^{-/-} présentent une tubulopathie proximale dès l'âge de deux mois, et une maladie rénale chronique évoluant vers une insuffisance rénale terminale [21]. Ces travaux illustrent l'importance des fonds génétiques des souris utilisées, qui peuvent influencer considérablement le phénotype des animaux modifiés génétiquement. Ces souris invalidées pour le gène *Ctns* représentent donc un bon modèle animal de la cystinose et s'avèrent ainsi être un outil indispensable pour développer de nouvelles thérapeutiques mieux tolérées et plus efficaces que les traitements disponibles.

Développement d'un nouveau traitement pour la cystinose

En raison de la nature multi-systémique de la cystinose et de tous les médicaments nécessaires pour compenser l'absence de cystinosine, une approche de thérapie génique a été envisagée pour cette maladie. Cependant, comme le gène *CTNS* est exprimé par tous les tissus, l'approche de thérapie génique de cette maladie était particulièrement difficile. Cela est particulièrement vrai puisque la cystinosine est une protéine transmembranaire lysosomale, et n'est donc pas sécrétée. Un « véhicule » capable de transporter la protéine vers tous les tissus était ainsi nécessaire. Les cellules souches de la moelle osseuse sont alors apparues comme de bons candidats.

Études précliniques : impact des cellules souches de la moelle osseuse sur la cystinose

Deux types de cellule souches sont présentes dans la moelle osseuse : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ces cellules se distinguent par leur potentiel à produire différents types cellulaires. En effectuant des transplantations syngéniques de CSH et de CSM provenant de souris sauvages transgéniques exprimant la GFP, ces deux types cellulaires ont été testés dans les souris *Ctns*^{-/-}. Ces cellules souches expriment un gène *Ctns* fonctionnel mais aussi le gène rapporteur codant la GFP, ce qui permet de suivre par fluorescence les cellules après transplantation [22]. Ces cellules souches de souris *Ctns*^{-/-} ont été transplantées à des souris à l'âge de deux mois, après irradiation de ces dernières afin de détruire les cellules souches endogènes. Les cellules souches transplantées devaient reconstituer la moelle dans laquelle elles

allaient résider et se multiplier. Des souris *Ctns*^{-/-}, utilisées comme contrôle, ont été transplantées avec des cellules souches isolées de souris *Ctns*^{-/-}. Analysées quatre mois après la transplantation, cette dernière expérience a montré que les CSM n'avaient pas intégré efficacement les organes et n'avaient qu'un effet bénéfique provisoire sur la teneur en cystine des tissus et sur la fonction rénale. Cela est en fait en accord avec nos connaissances actuelles des CSM : ces cellules n'intègrent pas de façon stable les tissus et n'ont qu'un effet bénéfique transitoire [22]. En revanche, chez les souris traitées avec les CSH exprimant *Ctns*, la teneur en cystine des différents organes a pu être réduite. La microscopie confocale et les PCR (*polymerase chain reaction*) quantitatives (qPCR) ont révélé la présence d'une grande quantité de cellules dérivées de la moelle osseuse dans tous les organes testés (Figure 3). La progression naturelle des anomalies rénales et le dépôt de cristaux de cystine sur la cornée ont été significativement réduits chez les souris traitées, quatre mois après transplantation.

Effet à long terme de la transplantation de CSH exprimant un gène *Ctns*

Une question était, ensuite, de déterminer si la transplantation de cellules souches hématopoïétiques exprimant le gène fonctionnel *Ctns* pouvait avoir un effet thérapeutique à long terme chez les souris cystinotiques. Les souris ont donc été examinées 7 à 15 mois après la transplantation [23] et il a été montré que la teneur en cystine était effectivement diminuée de manière significative dans tous les tissus (entre 54 % dans les reins jusqu'à 96,5 % dans le foie). Les CSH transplantées exprimant *Ctns* se sont également révélées être capables de fournir une protection à long terme des reins des souris *Ctns*^{-/-} (Figure 3). Toutefois, l'efficacité du traitement dépend de la quantité de cellules souches exprimant *Ctns* dans la moelle osseuse. En effet, plus le nombre de cellules exprimant *Ctns* est élevé dans la moelle osseuse, plus la quantité de cellules exprimant *Ctns* est élevée dans le rein, et plus la fonction rénale est préservée (un taux supérieur à 50 % de CSH exprimant *Ctns* est nécessaire). Ces résultats ont donc suggéré qu'il est important d'obtenir un nombre élevé de cellules exprimant le gène *Ctns* chez les patients pour obtenir un traitement optimal de la cystinose, et surtout une préservation des reins. Les cristaux de cystine, abondants dans les reins des souris *Ctns*^{-/-} non traitées, ont par ailleurs significativement diminué chez les souris transplantées (Figure 3). Ces résultats prouvent donc que le traitement est stable et efficace pendant toute la vie de la souris.

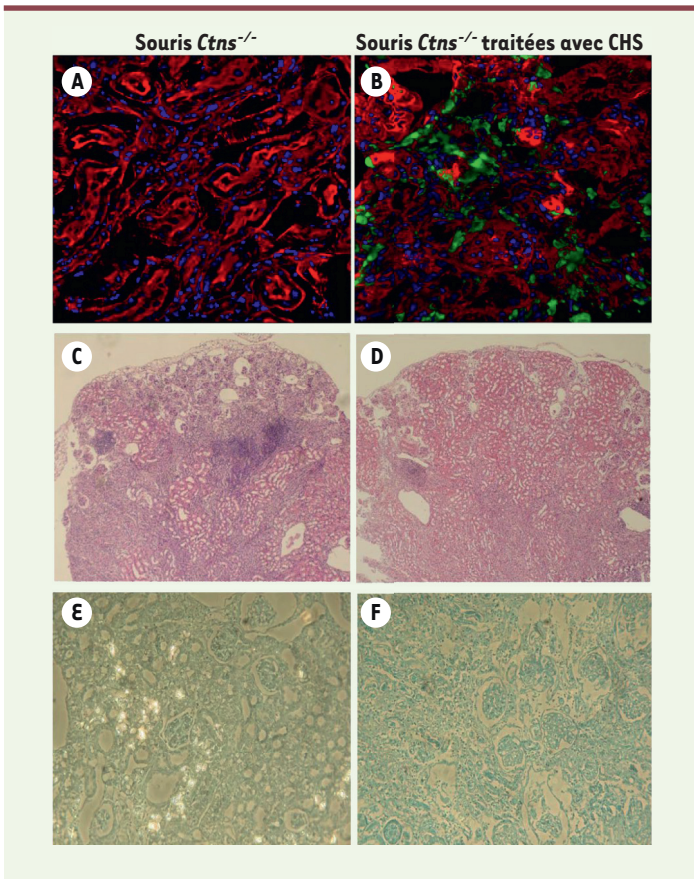


Figure 3. Efficacité d'intégration des cellules dérivées de la moelle osseuse dans les tissus. (A, B) Photos de microscopie confocale de rein de souris *Ctns*^{-/-} non traitées (A) ou traitées avec des CSH sauvages exprimant la GFP (*green fluorescent protein*) (B). Les cellules dérivées de la moelle osseuse sont colorées en vert, les noyaux cellulaires en bleu et les tubes proximaux en rouge [22]. (C, D) Photos d'histologie de souris *Ctns*^{-/-} à l'âge de 15-17 mois non traitées (C) ou traitées avec des CSH sauvages plus d'un an après transplantation (D), montrant les nombreuses anomalies rénales chez les souris *Ctns*^{-/-}, qui ne sont que focales chez les souris traitées (d'après [23]). (E, F) Photos d'histologie montrant les cristaux de cystine abondants dans les reins de souris *Ctns*^{-/-} contrôle (E) et peu nombreux dans les reins de souris *Ctns*^{-/-} traitées avec des CSH sauvages (F) (d'après [23]).

La greffe de CSH saines a également permis la préservation à long terme des yeux chez les souris *Ctns*^{-/-} [27]. Chez les souris traitées, de nombreuses cellules exprimant la GFP, dérivées de la moelle osseuse ont été détectées dans la cornée, mais également dans la sclérotique, le corps ciliaire, la rétine, la choroïde et le cristallin. Pour visualiser et quantifier les cristaux de cystine dans la cornée, un microscope confocal particulier a été utilisé pour explorer des souris vivantes. Là encore, un traitement efficace semblait dépendre du nombre de CSH exprimant le gène *Ctns* dans la moelle osseuse. Un an après la transplantation, alors que les souris *Ctns*^{-/-} avec un faible taux de prise de greffe (moins de 50 %) présentaient une réduction partielle du nombre de cristaux dans la cornée, les souris ayant des nombres élevés de prise

de greffe (plus de 50 %) présentaient quant à elles une réduction presque complète des cristaux de la couche épithéliale au stroma moyen [27]. De plus, ces souris *Ctns*^{-/-} traitées par transplantation de CSH présentent une épaisseur, une structure cornéennes, et une pression intraoculaire normales. Ces travaux suggèrent donc que ce type d'approche thérapeutique pourrait permettre aux patients présentant une cystinose d'arrêter le traitement par gouttes oculaires de cystéamine.

L'impact de la transplantation des CSH saines sur la thyroïde a également été examiné chez les souris *Ctns*^{-/-}, sachant que les patients présentant une cystinose développent une hypothyroïdie [26]. Pierre Courtoy (Institut de Duve, université catholique de Louvain, Belgique) a montré que la fonction et la structure de la thyroïde des souris *Ctns*^{-/-} étaient anormales, présentant une élévation de l'hormone thyroïdienne thyroïdostimuline (TSH) et une hypertrophie des thyrocytes, une hyperplasie, et une prolifération vasculaire [17]. Les souris *Ctns*^{-/-} traitées par greffe de CSH présentent, en revanche, une histologie quasiment normale et une normalisation des valeurs de cystine et de TSH [26].

Mécanisme d'action des CSH pour la préservation des tissus, notamment le rein

L'étendue de l'efficacité des cellules souches hématopoïétiques pour préserver les tissus chez les souris présentant une cystinose était donc surprenante, d'autant plus que la cystinosine est une protéine lysosomale transmembranaire, donc non sécrétée. Dans les différents tissus, *in vivo*, les CSH se différencient en macrophages. *In vitro*, des co-cultures réalisées en utilisant des macrophages exprimant le gène *Ctns* et la GFP et des fibroblastes dépourvus du gène *Ctns*, ont révélé des niveaux de cystine diminués de plus de 75 % dans les fibroblastes lorsque les deux populations sont physiquement en contact, contrairement à ce qui est observé lorsque les cellules des deux types sont séparées par des membranes poreuses ne laissant passer que les microvésicules [24, 25]. Ces résultats montraient ainsi qu'un transfert de la cystinosine des macrophages aux cellules cystinotiques, pouvait se produire, même s'il s'agit d'une protéine transmembranaire lysosomale, et que le contact direct entre cellules est nécessaire à ce transfert. Les macrophages étendent de longues extensions membranaires, appelées *tunneling nano-tubes* (TNT) qui peuvent, en fait, assurer le transfert de lysosomes contenant la cystinosine, jusqu'aux fibroblastes *Ctns*^{-/-}. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*. Les macrophages dérivés des CSH exprimant la GFP produisent des TNT qui sont capables de traverser la membrane basale des tubes proximaux dans les reins

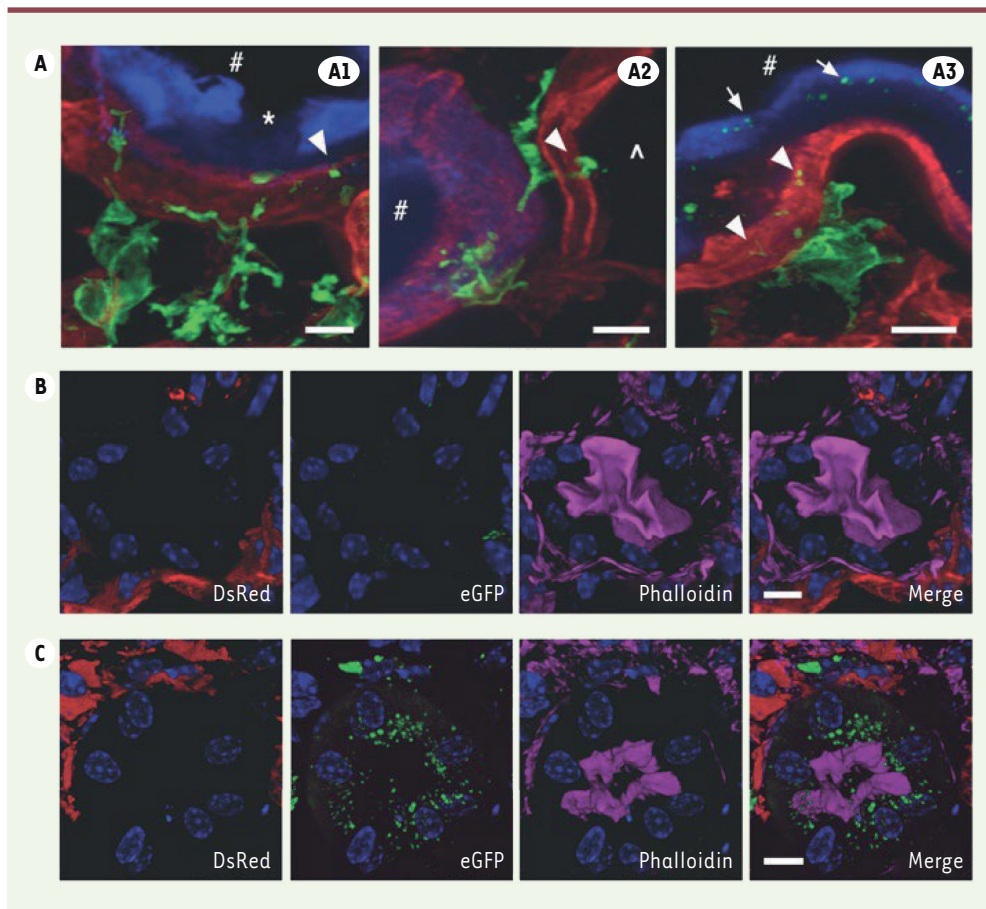


Figure 4. Transfert effectué par l'intermédiaire des « tunneling nanotubes » (TNT) in vivo et étude du rein. (A) Images de microscopie confocale de rein de souris *Cttns*^{-/-} âgées de huit mois, six mois après la transplantation avec des CSH saines exprimant la GFP (*green fluorescent protein*). Les cellules tubulaires proximales (CTP) sont marquées par la lectine *Lotus Tetragonobus* (bleu). La laminine apparaît en rouge. (A1, A2, A3) Les macrophages dérivés des CSH exprimant la GFP (vert) ont de nombreux TNT capables de traverser la membrane basale des CTP (pointes de flèches). (*): CTP apoptotique. (B, C) Images de microscopie confocale de rein de souris *Cttns*^{-/-} transplantées avec des CSH rouges DsRed-*Cttns*^{-/-} (contrôle, B) ou des CSH rouges DsRed-*Cttns*^{-/-} trans-

duites avec un vecteur lentiviral exprimant la cystinosine-GFP (C). Des lysosomes contenant la cystinosine-GFP sont présents dans les macrophages rouges dérivés des CSH mais aussi dans le cytoplasme des CTP, mettant en évidence un transfert de la cystinosine-GFP via les TNT (C). (B, C) Les noyaux sont colorés en bleu (DAPI). Barres d'échelle : 5 µm (A), 10 µm (B, C) (selon [25]).

des souris *Cttns*^{-/-} et transférer alors les lysosomes contenant la cystinosine associée à la GFP aux cellules tubulaires proximales (CTP) (Figure 4), permettant leur préservation. Un mécanisme thérapeutique similaire affectant les CSH dans la cornée et la thyroïde a été observé chez les souris *Cttns*^{-/-} [26, 27].

Ce mécanisme a été à l'origine d'une préoccupation majeure pour l'application clinique de la transplantation de CSH chez les patients homozygotes pour la délétion de 57 kb. En effet, cette délétion élimine non seulement le gène *CTNS* mais également le gène *SHPK* qui code la sédopheptulose kinase, une enzyme métabolique pouvant influencer la polarisation des macrophages [28]. Pour étudier si l'absence de *SHPK* pouvait avoir un impact négatif sur l'efficacité des CSH transplantées à se différencier en macrophages dans les tissus, un modèle murin déficient pour *Shpk* et *Cttns*, dans lequel des CSH de souris *Shpk*^{-/-} sont transplantées, a été développé [29]. Dans ce modèle, la transplantation des CSH *Shpk*^{-/-} a toujours un bénéfice thérapeutique pour la cystinose, évalué par la réduction des taux de cystine dans les tissus, la restauration de l'expression de *Cttns* et la préservation de la morphologie rénale chez les souris *Cttns*^{-/-} transplantées.

L'ensemble de ces travaux suggèrent ainsi qu'une transplantation de CSH exprimant un gène *CTNS* fonctionnel pourrait permettre d'éviter le développement des différentes complications chez les patients présentant une cystinose, et militent en faveur d'un recrutement de patients homozygotes pour la délétion de 57 kb dans un essai clinique.

Transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées pour exprimer le gène *CTNS*

Les transplantations allogéniques de CSH sont à l'origine d'un taux élevé de mortalité, en raison des risques de rejet et de la réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Une transplantation allogénique de CSH a été réalisée chez un patient de 16 ans atteint de cystinose [30]. Ce patient a développé une GVH aiguë qui est devenue chronique. Il est décédé 35 mois après la

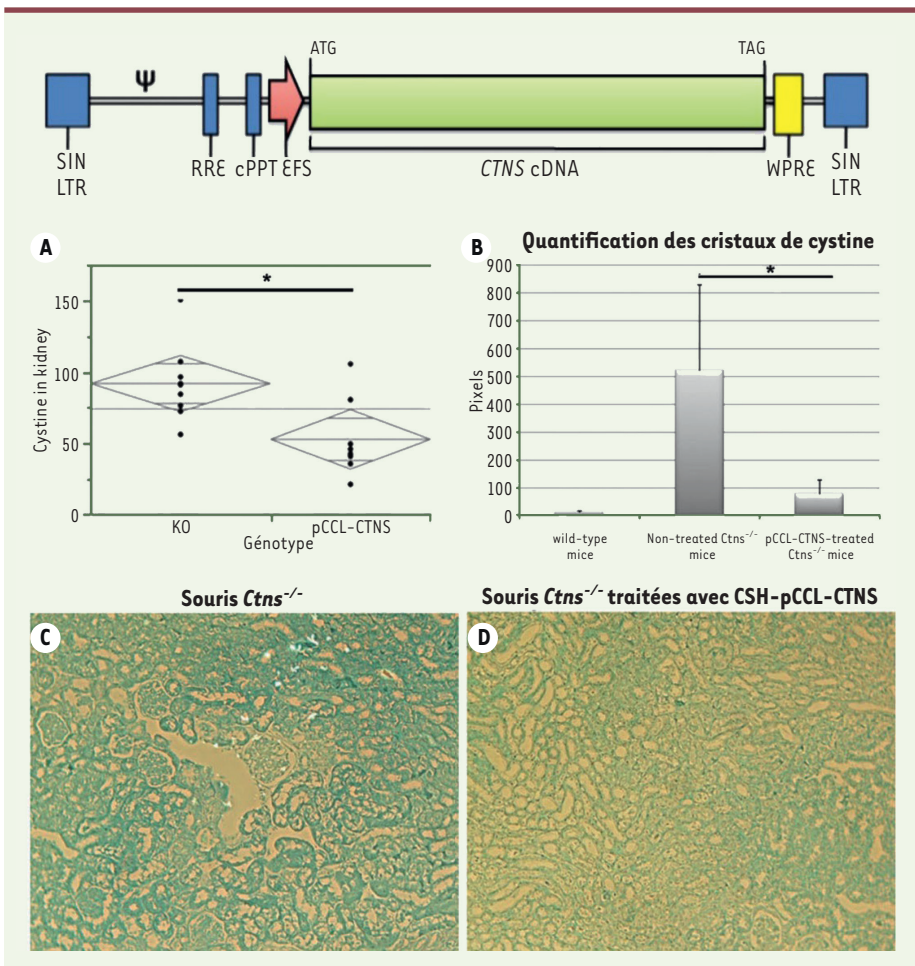


Figure 5. Cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées avec le vecteur lentiviral pCCL-CTNS. Panneau du haut : structure du vecteur lentiviral pCCL-CTNS. SIN-LTR : *self-inactivating long terminal repeat* ; Ψ : *Psi sequence* ; RRE : *rev responsive element* ; cPPT : *central polypurine tract* ; EFS : *elongation factor 1 α short* ; CTNS cDNA : CTNS ADNc humain ; WPRE : *woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element*. **A.** Taux de cystine dans les reins de souris *Ctns*^{-/-} mâles non traitées (KO) ou traitées avec des CSH *Ctns*^{-/-} génétiquement modifiées avec pCCL-CTNS huit mois après transplantation (pCCL-CTNS), montrant une diminution significative du taux de cystine chez les souris traitées. **B.** L'histogramme représente la quantification des cristaux de cystine sur des coupes histologiques de rein de souris sauvages, *Ctns*^{-/-} non traitées (C), ou traitées avec des CSH *Ctns*^{-/-} génétiquement modifiées avec pCCL-CTNS (D) ; **P* < 0,05 (selon [32]).

transplantation. Malgré ce dénouement tragique, il a pourtant été observé une amélioration de sa fonction rénale, de sa photophobie et une diminution des cristaux de cystine dans des biopsies gastriques. La stratégie pour le traitement de la cystinose est donc désormais de développer une transplantation non plus allogénique mais de cellules autologues, c'est-à-dire la transplantation de cellules souches isolées du patient, cellules qui seront modifiées génétiquement *ex vivo* afin de leur faire exprimer un gène *CTNS* fonctionnel. Cette procédure présente beaucoup moins de risque que la transplantation allogénique. Afin d'introduire un gène fonctionnel dans les cellules souches hématopoïétiques, un vecteur lentiviral est utilisé. Il s'agit d'un virus-vecteur dérivé du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui permet une infection efficace et stable des cellules souches ; ce vecteur est déjà utilisé pour la vectorisation d'autres gènes dans différents essais cliniques [31].

Études précliniques

Un vecteur lentiviral exprimant le gène humain *CTNS* (pCCL-CTNS) a été produit pour les études précliniques qui ont été réalisées chez la souris (Figure 5). Des CSH isolées de souris *Ctns*^{-/-} ont été infectées avec ce vecteur puis transplantées chez des souris *Ctns*^{-/-}. Ces souris ont été

analysées quatre et huit mois après transplantation. Une amélioration de la fonction rénale a été observée chez les souris traitées avec les cellules souches modifiées par le vecteur lentiviral exprimant *CTNS*, de même qu'une diminution significative du niveau de cystine et des cristaux de cystine dans le rein, comparé aux souris *Ctns*^{-/-} non traitées (Figure 5) [32].

Dans la perspective d'un essai clinique, des études de pharmacologie/toxicologie, et le développement de la production des cellules souches génétiquement modifiées à grande échelle en utilisant une préparation lentivirale pouvant être utilisée en clinique, ont été réalisés. Les études pharmacologiques et toxicologiques ont été effectuées avec des souris *Ctns*^{-/-}, afin de déterminer l'impact clinique, biochimique et histologique des CSH génétiquement modifiées ainsi que le nombre de copies vectorielles (VCN ; représentant la moyenne des copies de vecteur par cellule) dans le sang, la moelle osseuse et les cellules hématopoïétiques, et par la caractérisation des sites d'intégration du vecteur chez chaque souris transplantée. Ces études ont montré un

bénéfice thérapeutique des CSH modifiées *ex vivo* avec le vecteur et son innocuité. Un protocole pour la modification génétique des cellules humaines CD34⁺ a été optimisé. Il a été transféré à la plateforme permettant la production des cellules pour une utilisation clinique.

Essai clinique de phase I/II (voir Encadré)

Sur la base des résultats précliniques obtenus, une demande a été soumise à la FDA (*Food and Drug Administration*) pour des essais utilisant les CSH autologues CD34⁺ génétiquement modifiées avec le vecteur pCCL-CTNS pour le traitement de la cystinose (CTNS-RD-04). Cette demande a été acceptée pour un essai clinique de phase I/II, le 19 décembre 2018. L'essai a débuté en juillet 2019 après avoir reçu un financement du *California Institute of Regenerative Medicine* (CIRM), de la *Cystinosis Research Foundation* et des *National Institutes of Health* (NIH). Un total de six patients devait être enrôlés, échelonné par cohorte de deux patients. Les objectifs principaux de l'essai clinique consistent à évaluer l'innocuité ainsi que l'efficacité du protocole CTNS-RD-04. L'impact du traitement par le vecteur sera testé en mesurant les niveaux de cystine dans le sang et le nombre de cristaux de cystine dans différents tissus, ainsi qu'en suivant l'évolution des complications cliniques associées à la cystinose, y compris la fonction rénale, la vision, la force musculaire, la fonction respiratoire, la densité osseuse, la fonction endocrinienne et la qualité de vie. Afin de disposer d'un outil non invasif pour visualiser et quantifier les cristaux de cystine dans la peau, une nouvelle méthode utilisant la microscopie confocale intradermique et un logiciel d'imagerie avancé a été développée.

Six patients présentant une cystinose ont été transplantés, le premier patient ayant été infusé le 7 octobre 2019. L'évaluation des résultats chez chaque patient est en cours. Un partenariat a été établi avec la société de biotechnologie de thérapie génique, *AVROBIO, Inc*, pour la prochaine phase de ces essais cliniques.

Conclusion

Le traitement de la cystinose est lourd et pénible et retarde seulement l'évolution de la maladie. Dans cette revue, nous avons décrit les étapes allant de la découverte du gène à la thérapie génique pour traiter la cystinose, en passant par la caractérisation de la fonction de la protéine et la génération d'un modèle murin. Le transfert des études précliniques à un essai clinique a demandé d'importants investissements matériels, humains et financiers, et de nombreuses années. La transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées pour exprimer le gène *CTNS* représente une nouvelle approche thérapeutique prometteuse pour traiter la cystinose. Cette approche pourrait potentiellement traiter la plupart des complications associées à cette maladie. L'essai clinique en cours évaluera son potentiel chez les patients. ♦

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont reçu le financement de la *Cystinosis Research Foundation*, des *National Institutes of Health* (NIH) R01-DK090058 and R01-NS108965, et du *California Institute of Regenerative Medicine* (CIRM, CLIN-09230 and CLIN2-11478).

Essai clinique

Les critères d'inclusion de l'essai clinique comprennent un diagnostic de cystinose infantile, un débit de filtration glomérulaire > 15 mL/min/1,73 m², une fonction thyroïdienne adéquate (TSH : 0,27-4,2 mUI/L et T4 < 2 × LSN mcg/dL), et une fonction respiratoire adéquate (FEV1 > 50 %). Pour les patients ayant reçu une greffe de rein auparavant, une année post-greffe est requise pour pouvoir participer à l'essai. Les cellules souches du sang périphérique sont isolées après mobilisation par les facteurs de stimulation G-CSF et plerixafor, suivie par une aphérèse ; la combinaison G-CSF/plerixafor améliore non seulement la quantité de cellules mobilisées mais aussi le nombre de cellules souches primitives [33], cette combinaison est donc préférentiellement choisie dans les protocoles de thérapie génique. Les cellules CD34⁺ sont isolées, transduites à l'aide du vecteur lentiviral pCCL-CTNS et congelées pendant la caractérisation du produit cellulaire. Si toutes les conditions d'acceptabilités du produit sont remplies, CTNS-RD-04 est alors perfusé par voie intraveineuse à la dose minimale de 3 × 10⁶ cellules CD34⁺/kg après chimiothérapie avec l'agent busulfan, qui n'est pas néphro-toxique, une propriété particulièrement importante dans le cas des patients présentant une cystinose. Les patients interrompent le traitement par cystéamine orale deux semaines avant la chimiothérapie et les gouttes oculaires de cystéamine un mois après la perfusion de CTNS-RD-04.

SUMMARY

Cystinosis: From the gene identification to the first gene therapy clinical trial

Cystinosis is an autosomal recessive metabolic disease characterized by lysosomal accumulation of cystine in all the cells of the body. Infantile cystinosis begins in infancy by a renal Fanconi syndrome and eventually leads to multi-organ failure, including the kidney, eye, thyroid, muscle, and pancreas, eventually causing premature death in early adulthood. The current treatment is the drug cysteamine that only delays the progression of the disease. We identified the gene involved, *CTNS*, and showed that the encoded protein, cystinosin, is a proton-driven cystine transporter. We generated a mouse model of cystinosis, the *Ctns*^{-/-} mice, that recapitulates the main disease complications. The goal was next to develop a gene therapy approach for cystinosis. We used bone marrow stem cells as a vehicle to bring the healthy *CTNS* gene to tissues, and we showed that wild-type hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) transplantation led to abundant tissue integration of bone marrow-derived cells, significant decrease of tissue cystine accumulation and long-term kidney,

eye and thyroid preservation. We then developed an autologous transplantation approach of HSPCs modified *ex vivo* using a lentiviral vector to introduce a functional *CTNS* cDNA, and showed its efficacy in *Ctns*^{-/-} mice. We conducted the pharmacology/toxicology studies, developed the manufacturing process using human CD34⁺ cells, and design the clinical trial. We received Food and Drug Administration (FDA)-clearance to start a phase 1/2 clinical trial for cystinosis in December 2018. Six patients have been treated so far. In this review, we describe the path to go from the gene to a gene therapy approach for cystinosis. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Stéphanie Cherqui est co-inventeur d'un brevet soumis, intitulé « Methods of treating lysosomal disorders » (#20378-101530), et est co-fondatrice, actionnaire et membre du conseil scientifique et du conseil d'administration de Papillon Therapeutics Inc. Stéphanie Cherqui est consultante pour AVROBIO, Inc. et reçoit une rémunération pour ses services. Elle est également membre du comité d'évaluation scientifique et du conseil d'administration de la Cystinosis Research Foundation. Les termes de cet accord ont été examinés et approuvés par l'Université de Californie à San Diego.

RÉFÉRENCES

- Levy M, Feingold J. Estimating prevalence in single-gene kidney diseases progressing to renal failure. *Kidney Int* 2000 ; 58 : 925-43.
- Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 111-21.
- Gahl WA, Schneider JA, Aula P. Lysosomal transport disorders : cystinosis and sialic acid storage disorders. In : *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. eds Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 7th ed. 1995 : 3763-97.
- Haffner D, Weinfurth A, Manz F, et al. Long-term outcome of paediatric patients with hereditary tubular disorders. *Nephron* 1999 ; 83 : 250-60.
- Lemire J, Kaplan BS. The various renal manifestations of the nephropathic form of cystinosis. *Am J Nephrol* 1984 ; 4 : 81-5.
- Langman CB, Moore ES, Thoene JG, Schneider JA. Renal failure in a sibship with late-onset cystinosis. *J Pediatr* 1985 ; 107 : 755-60.
- Lietman PS, Frazier PD, Wong VG, et al. Adult cystinosis-a benign disorder. *Am J Med* 1966 ; 40 : 511-7.
- Gahl WA, Reed GF, Thoene JG, et al. Cysteamine therapy for children with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med* 1987 ; 316 : 971-7.
- Dohil R, Fidler M, Gangotri JA, et al. Twice-daily cysteamine bitartrate therapy for children with cystinosis. *J Pediatr* 2010 ; 156 : 71-5 e1-3.
- Schneider JA. Approval of cysteamine for patients with cystinosis. *Pediatr Nephrol* 1995 ; 9 : 254.
- The Cystinosis Collaborative Research Group. Linkage of the gene for cystinosis to markers on the short arm of chromosome 17. *Nat Genet* 1995 ; 10 : 246-8.
- Town M, Jean G, Cherqui S, et al. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 1998 ; 18 : 319-24.
- Cherqui S, Kalatzis V, Trugnan G, Antignac C. The targeting of cystinosis to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 13314-21.
- Kalatzis V, Cherqui S, Antignac C, Gasnier B. Cystinosis, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *Embo J* 2001 ; 20 : 5940-9.
- Zhai Y, Heijne WH, Smith DW, Saier MH, Jr. Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi : structural and functional predictions for a putative fungal chaperone protein. *Biochim Biophys Acta* 2001 ; 1511 : 206-23.
- Kalatzis V, Nevo N, Cherqui S, et al. Molecular pathogenesis of cystinosis : effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Hum Mol Genet* 2004 ; 13 : 1361-71.
- Gaïde Chevronnay HP, Janssens V, Van Der Smissen P, et al. A mouse model suggests two mechanisms for thyroid alterations in infantile cystinosis: decreased thyroglobulin synthesis due to endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response and impaired lysosomal processing. *Endocrinology* 2015 ; 156 : 2349-64.
- Forestier L, Jean G, Attard M, et al. Molecular characterization of CTNS deletions in nephropathic cystinosis : development of a PCR-based detection assay. *Am J Hum Genet* 1999 ; 65 : 353-9.
- Cherqui S, Kalatzis V, Forestier L, et al. Identification and characterization of the murine homologue of the gene responsible for cystinosis, Ctns. *BMC Genomics* 2000 ; 1 : 2.
- Dufier JL, Dhermy P, Gubler MC, et al. Ocular changes in long-term evolution of infantile cystinosis. *Ophthalmic Paediatr Genet* 1987 ; 8 : 131-7.
- Nevo N, Chol M, Bailleux A, et al. Renal phenotype of the cystinosis mouse model is dependent upon genetic background. *Nephrol Dial Transplant* 2010 ; 25 : 1059-66.
- Syres K, Harrison F, Tadlock M, et al. Successful treatment of the murine model of cystinosis using bone marrow cell transplantation. *Blood* 2009 ; 114 : 2542-52.
- Yeagy BA, Harrison F, Gubler MC, et al. Kidney preservation by bone marrow cell transplantation in hereditary nephropathy. *Kidney Int* 2011 ; 79 : 1198-206.
- Goodman S, Naphade S, Khan M, et al. Macrophage polarization impacts tunneling nanotube formation and intercellular organelle trafficking. *Sci Rep* 2019 ; 9 : 14529.
- Naphade S, Sharma J, Gaïde Chevronnay HP, et al. Brief reports : lysosomal cross-correction by hematopoietic stem cell-derived macrophages via tunneling nanotubes. *Stem Cells* 2015 ; 33 : 301-9.
- Gaïde Chevronnay HP, Janssens V, Van Der Smissen P, et al. Hematopoietic Stem Cells Transplantation Can Normalize Thyroid Function in a Cystinosis Mouse Model. *Endocrinology* 2016 ; 157 : 1363-71.
- Rocca CJ, Kreymerman A, Ur SN, et al. Treatment of Inherited Eye Defects by Systemic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015 ; 56 : 7214-23.
- Haschemi A, Kosma P, Gille L, et al. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab* 2012 ; 15 : 813-26.
- Goodman S, Khan M, Sharma J, et al. Deficiency of the sedoheptulose kinase (Shpk) does not alter the ability of hematopoietic stem cells to rescue cystinosis in the mouse model. *Mol Genet Metab* 2021 ; 134 : 309-16.
- Elmonem MA, Veys K, Oliveira Arcolino F, et al. Allogeneic HSCT transfers wild-type cystinosin to nonhematological epithelial cells in cystinosis : First human report. *Am J Transplant* 2018 ; 18 : 2823-8.
- Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 2009 ; 326 : 818-23.
- Harrison F, Yeagy BA, Rocca CJ, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy for the multisystemic lysosomal storage disorder cystinosis. *Mol Ther* 2013 ; 21 : 433-44.
- Yannaki E, Karponi G, Zervou F, et al. Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy : superior mobilization by the combination of granulocyte-colony stimulating factor plus plerixafor in patients with beta-thalassemia major. *Hum Gene Ther* 2013 ; 24 : 852-60.
- Cherqui S, Sevin C, Hamard G, et al. Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 7622-32.

TIRÉS À PART

S. Cherqui

The advertisement features a collage of scientific images including a brain scan, a microscope view of cells, and a molecular model. The text includes the journal logo 'm/s médecine/sciences', the date 'DÉCEMBRE 2022', and the website 'www.edp-science.org'. A prominent headline reads 'Abonnez-vous à médecine/sciences'. At the bottom, it states 'Bulletin d'abonnement page 302 dans ce numéro de m/s'.