L'ingénierie des génomes : une clef de la biologie synthétique

David J.D. Sourdive
Vice Président Exécutif

Janvier 2013

Mise en garde

Cette communication contient explicitement ou implicitement des faits concernant Cellectis et son Business. Certains de ces faits impliquent certains risques connus ou non, des possibilités et d'autres facteurs, qui pourraient provoquer que les faits présents, les conditions financières, les performances ou les réussites de Cellectis, soient différents des résultats futurs, de la performance annoncée ou sous-entendue par des prospectives d'avenir.

Cellectis fournit cette communication à ce jour et n'entreprend pas d'actualiser les prospectives établies dans cette présentation suite à de nouveaux résultats, évènements futurs ou autres.

Sommaire

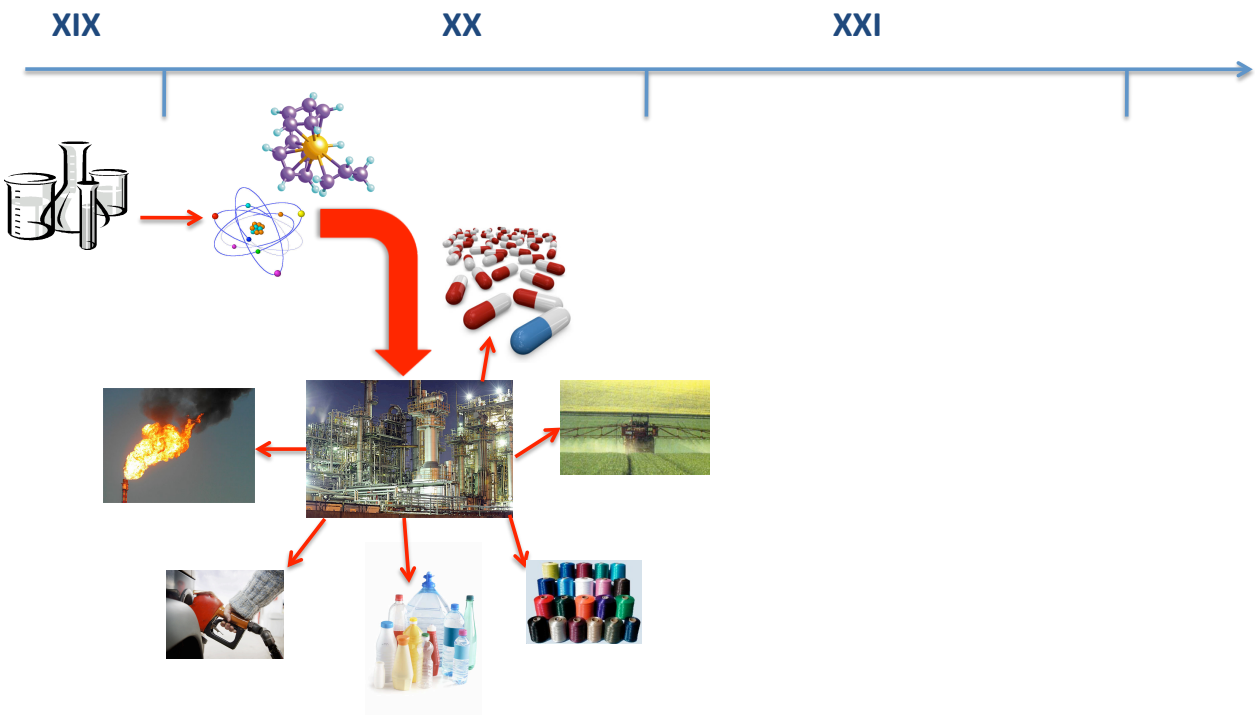
Perspective historique - le vivant : objet d'ingénieur

L'ingénierie des génomes : une rupture conceptuelle et industrielle

Potentiel industriel porté par la biologie synthétique

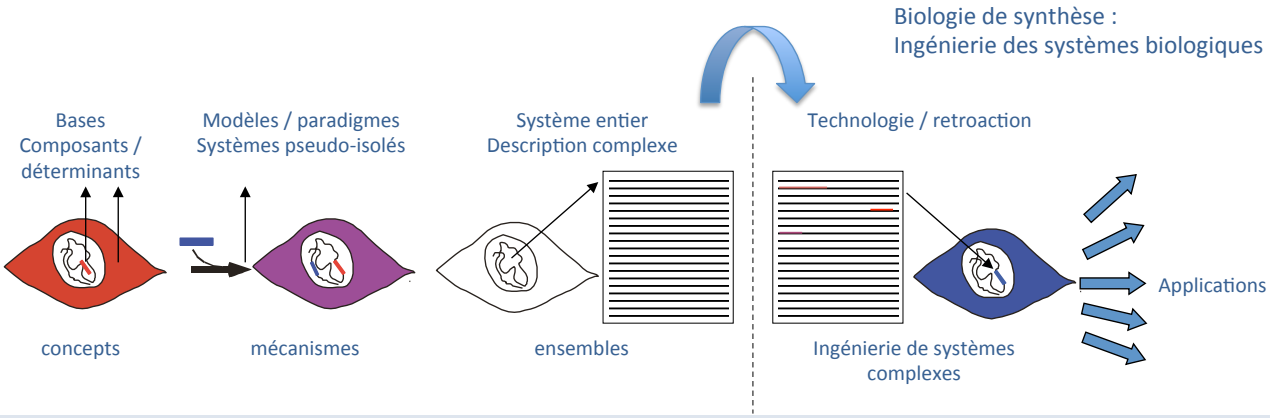
Saisir l'opportunité pour l'industrie, l'économie et la santé

Chimie au XXème siècle

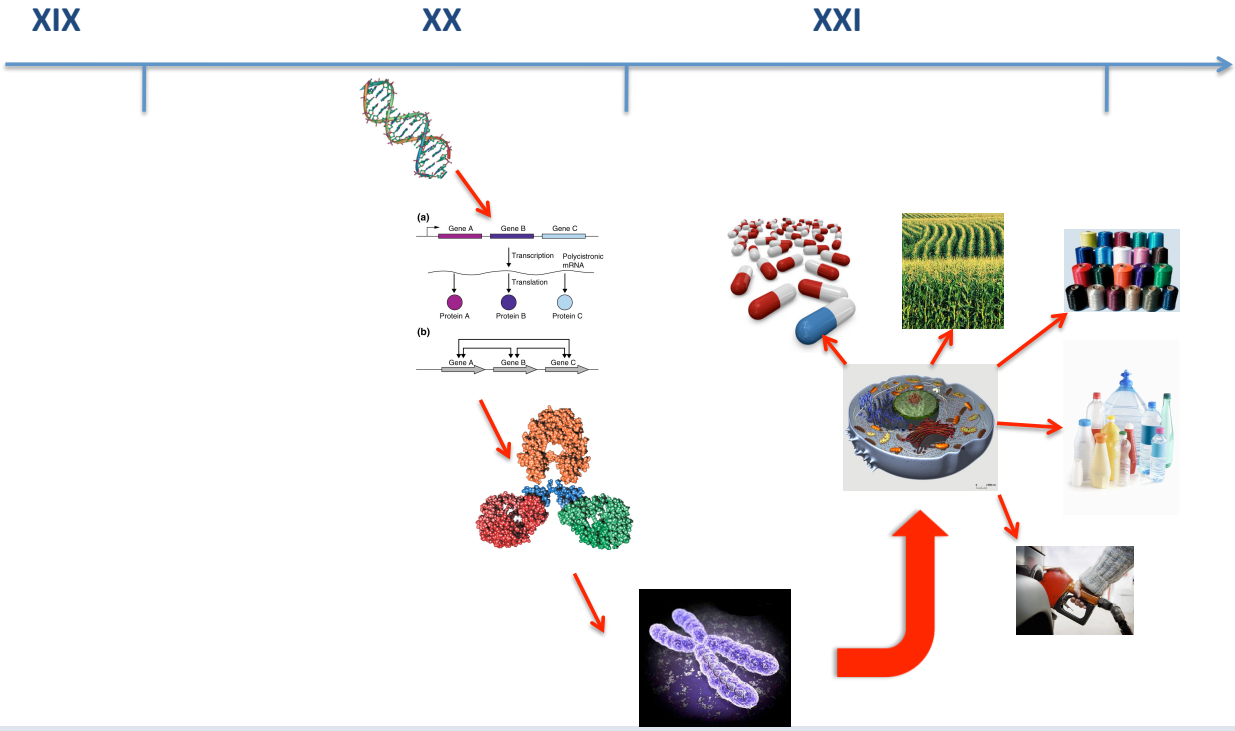


Point de bascule : le vivant est un objet d'ingénieur

- **Le vivant connaîtra au XXIè siècle ce que la chimie a connu au XXè.**
  - L'ingénierie à souhait des molécules a conduit à de nombreuses applications en: pharmacie, agro-chimie, cosmétique, matériaux, énergie, industries, transports, etc.
  - L'ingénierie rationnelle des génomes libère le potentiel industriel du vivant pour des applications en : médecine, pharmacie, cosmétique, matériaux, agriculture, énergie, environnement, etc.



La révolution à l'œuvre

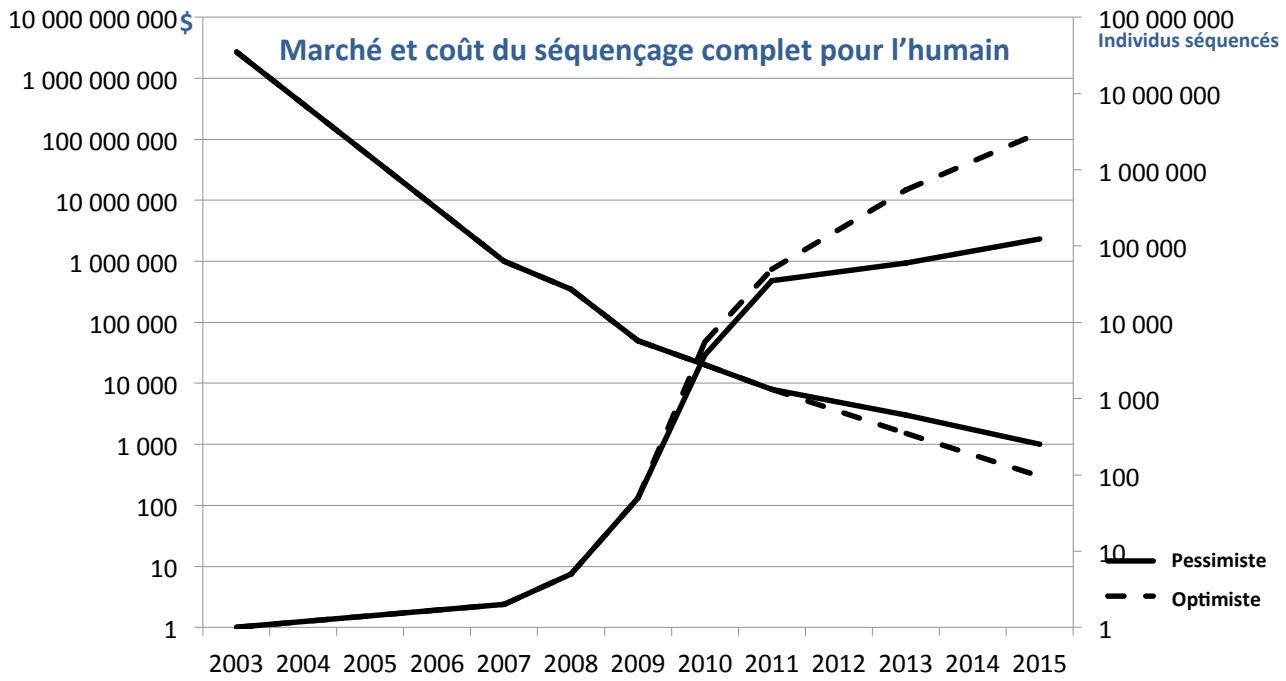


Une révolution accélérée sur 40 ans

La biologie de synthèse est le prolongement naturel d'une révolution récente mais structurante de l'économie mondiale : la biotechnologie

- balbutiements dans les années 1970 avec les premiers médicaments recombinants « bio-produits » (hormones, puis anticorps) : « ère de l'ADN et du gène »
- consolidation de la science dans les années 80-90 (séquençage complet du génome humain, « mécanisation » de la biologie) ;
- découverte du rôle et fonctionnement des méganucléases : premier pas dans l'ingénierie rationnelle des génomes
- appropriation par l'industrie des technologies fonctionnelle de la génomique rationnelle, etc
- pénétration exponentielle des biotechnologies dans tous les secteurs d'activité (60% des nouveaux médicaments en sont issus, agro-industrie, réparation humaine, médecine régénératrice etc.)

Abondance de l'information « brute »



Sources: Nature, Complete Genomics, Cellectis

Approche historique : ingénierie par transgénèse

1. Identifier un périmètre où quelques hypothèses pouvaient être vérifiées:
   - ✓ on peut y mimer le « mécanisme » tel qu'il est déployé par les ingénieurs dans d'autres disciplines
   - ✓ Sous-systèmes disjoints, interfaces claires et modélisables de façon satisfaisantes

2. modifier un élément génétique (par exemple un gène) en ayant un impact prévisible
   - ✓ Impact réduit sur un nombre limité d'autres gènes ou paramètres de l'organisme
   - ✓ système biologique équivalent à un « sac de gène »
   - ✓ stable à l'échelle de l'expérience

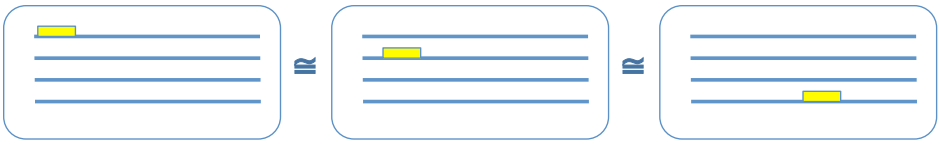
- ➢ Règne du transgène « autonome » qui, à lui seul, véhicule une propriété (une « fonction »)
- ➢ Approche par modélisation mécaniste avec des fonctions toujours plus explicites

Déploiement classique

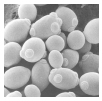
En première approximation:

i. **Espèces permissives** (aux hypothèses simplificatrices de séparabilité)

- peu d'effet positionnel : **un transgène ≅ un gène ≅ un déterminant génétique simple**
- permissive aux transgènes : peu d'extinction, de variégation, etc.
- aisément manipulables : haploïdes, propagation végétative permise, etc.



⇒ souvent microbiennes en premier lieu



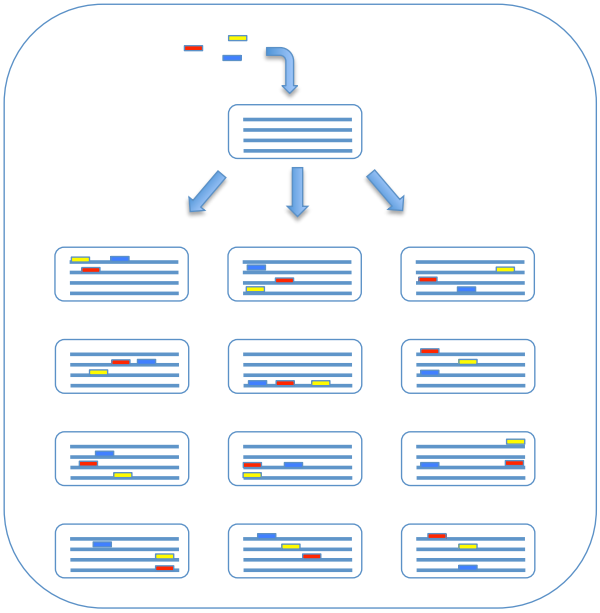
ii. Problématiques **interférant peu avec la physiologie**

- agissant plutôt sur la synthèse de métabolites (*a contrario* de la morphologie, etc.)
- relâchement de contrainte compétitive (cultures plutôt axéniques)

Premières approches de biologie synthétique

Dans le périmètre où
- les hypothèses sont à peu près vérifiées, et
- pour des problèmes bien posés,

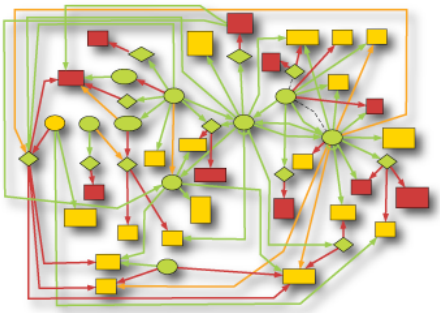
l'approche mécaniste fonctionne



Dépasser cette première génération

Dans la réalité et l'écrasante majorité des cas :
- un génome n'est **pas réductible** à un « sac de (trans)gènes »
- c'est un ensemble de lieux, organisés, finement régulés et qui ne sont pas équivalents
- il y a beaucoup **d'interactions croisées**

=> grande complexité et peu de formalisme pour le comprendre



Enjeux:
⇒ Passer du transgène à **l'ingénierie des génomes**
⇒ Comprendre comment un génome fonctionne **dans son ensemble**
⇒ Dépasser les quelques espèces « dociles » et embrasser **toutes les formes et espèces**

Sommaire

Perspective historique - le vivant : objet d'ingénieur

L'ingénierie des génomes : une rupture conceptuelle et industrielle

Potentiel industriel porté par la biologie synthétique

Saisir l'opportunité pour l'industrie, l'économie et la santé

Cellectis en bref

Société

- ✓ Pionnier mondial de l'ingénierie des génomes ; fondée en décembre 1999
- ✓ Cotée sur le marché Alternext à Paris depuis 2007 (ALCLS)

- ✓ 13 ans dans l'industrie des biotechnologies
- ✓ Leader européen de l'ingénierie cellulaire

- ✓ Principaux axes de développement : immunothérapie du cancer et médecine régénératrice
- ✓ Autres activités : outils et services industriels, agriculture biotechnologique

Organisation

- ✓ Groupe industriel de 220 personnes
  - ➢ Siège à Paris (France)
  - ➢ filiales à Evry, Göteborg, Boston et Saint Paul, Minnesota, Etats-Unis

Technologie

- ✓ Plateformes :
  - ➢ production d'outils d'ingénierie génomique (TALENs, méganucléases)
  - ➢ production, différentiation et ingénierie de cellules (de bio-production, modèles cellulaires, cellules souches ES & iPS, etc.)
  - ➢ ingénierie de cellules T de grade clinique (cible : immunothérapie du cancer)
  - ➢ production et différentiation de cellules souches de grade clinique pour la médecine régénératrice
- ✓ Plus de 400 brevets et demandes

Intégration du groupe autour de trois axes

cellectis

- Pilotage du groupe
- Plateforme de R&D
- Fonctions support

Outils & Services

Produits et réactifs de recherche
- TALENs & Meganucleases
- Biologie cellulaire
- Kits & services

Services pour l'industrie pharmaceutique
- Drug discovery
- Production recombinante
- Modèles physiologiques et pathologiques
- iPS engineering Hub (panels de patients)

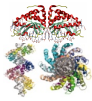
Thérapeutiques

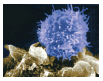
I- Médecine régénératrice
- **Diabète:** cellules β

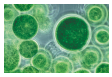
II- Plateforme de cellules T
- **Cancer**: immunothérapie LLC/lymphome, Glioblastome, NSCLC
- Transplantation de moelle osseuse

Biotech. Industrielle

- **Substituts au pétrole**
- **ingénierie végétale**





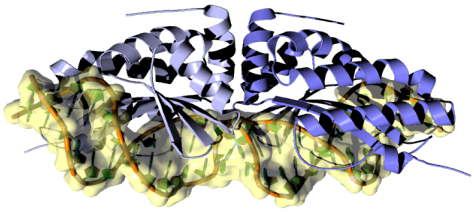


Technologie d'ingénierie des génomes

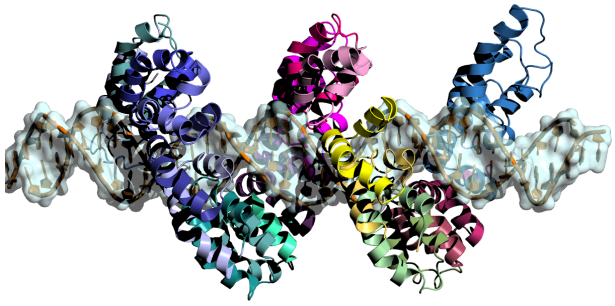
cellectis

Innovation: cibler n'importe quel site ou gène
dans n'importe quel génome
de n'importe quelle espèce

Meganucleases



TALEN™



Couper le chromosome en ciblant des séquences longues (donc uniques)
Approche industrielle, systématique et robuste (développement continu depuis 13 ans)

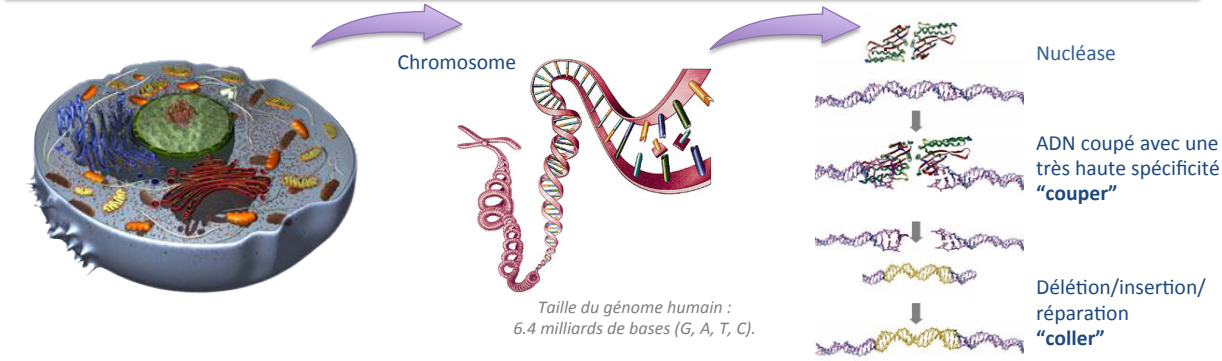
Ingénierie des génomes

- Les méganucléases sont des « ciseaux à ADN » existant naturellement chez certains organismes unicellulaires
- Les TALE sont des protéines se liant à l'ADN qui peuvent être couplées à une nucléase pour former des endonucléases spécifiques et efficaces, les TALEN

Ces 2 types de protéines:

- Coupent l'ADN à un site unique (motif de 12 à plus de 32 paires de base)
- Créent une ouverture dans l'ADN qui permet de provoquer une délétion de séquence, une insertion et/ou une réparation

Le Premier "couper-coller" d'ADN in vivo



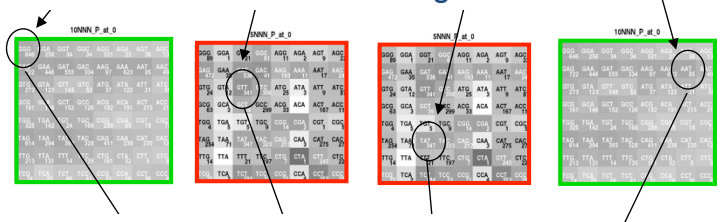
L'ingénierie des méganucléases permet de cibler des séquences choisies

① Sélection de la séquence-cible

5'-C G G G A C G T T G T A C A T A G T A T T G-3'
3'-G C C C T G C A A C A T G T A T C A T A A C-5'

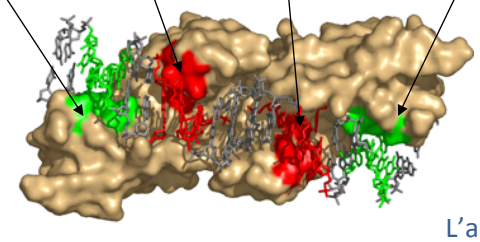
Groupes de paires de bases différant de la cible de la méganucléase initiale

② Sélection des modules de méganucléase



~50 000 modules
>10^{13} méganucléases possibles
(permettant de cibler pratiquement n'importe quel gène dans n'importe quel génome)

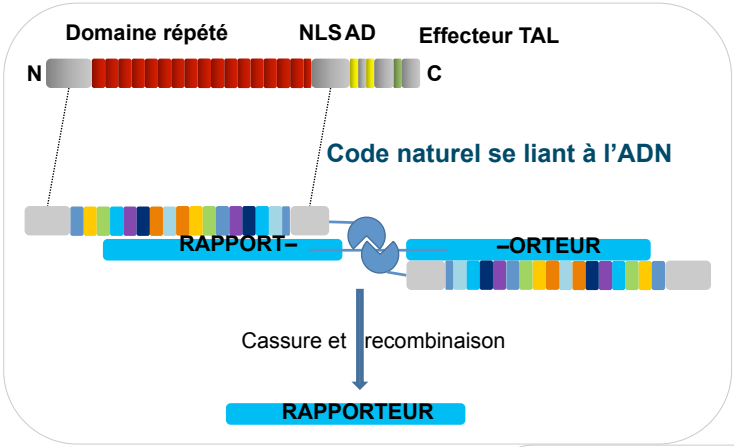
③ Ingénierie et test de la méganucléase



Screening in vivo fondé sur la spécificité et l'efficacité

L'approche a réduit un problème en 20^{40} en 4 x 64 problèmes en 20^{3} « parallélisables »

TALEN™ (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)



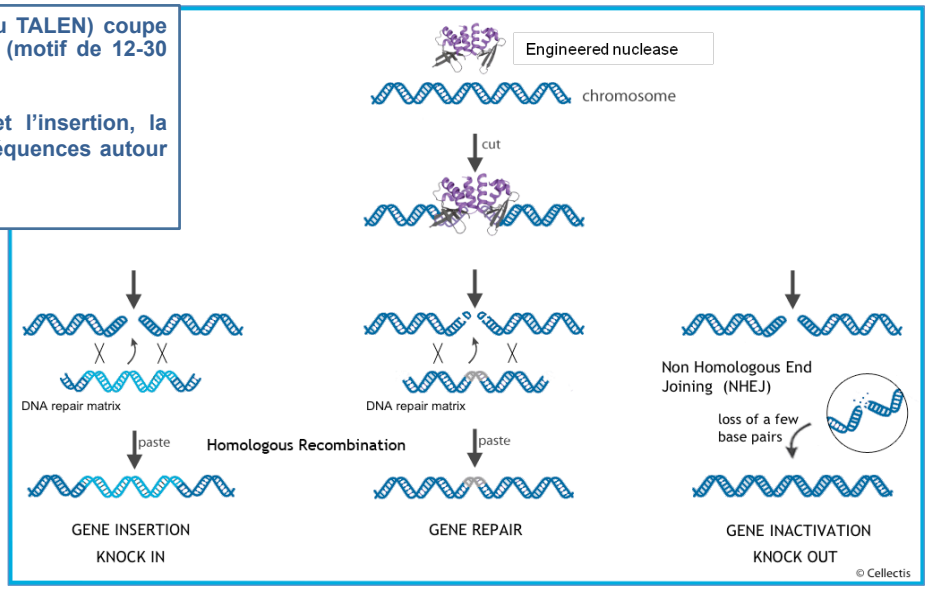
Molécules chimériques formées d'un squelette « TALE » fusionné à une tête catalytique

Ingénierie de la molécule

Ingénierie des génomes par nucléases

La nucléase (Meganuclease ou TALEN) coupe l'ADN en un site cible unique (motif de 12-30 paires de bases)

Ouvrir le chromosome permet l'insertion, la délétion ou la réparation de séquences autour du site de coupure



Dans un site sûr « SAFE HARBOR » pour la complémentation génique

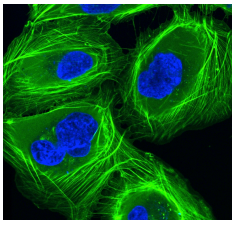
Au locus du gène cible

Spécifique d'un gène

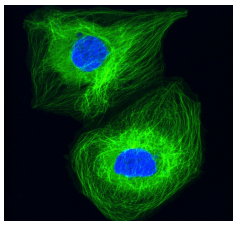
Exemples de ciblage génique

Mono (N-terminal in-frame) gene tagging of Actine and Tubuline using ACTB and TUBA1B TALEN™

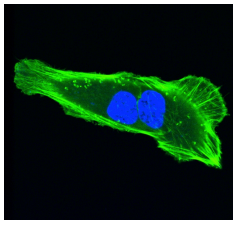
GFP-ACTB (U-2OS)



GFP-TUBA1B (U-2OS)

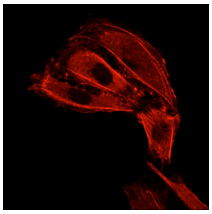


GFP-ACTB (HeLa)

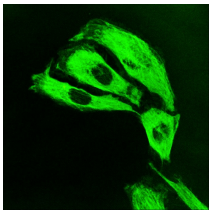


Double gene tagging ACTB and TUBA1B TALEN™

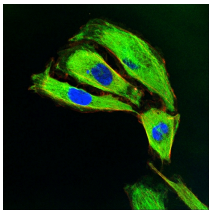
RFP-ACTB (U-2OS)



GFP-TUBA1B (U-2OS)

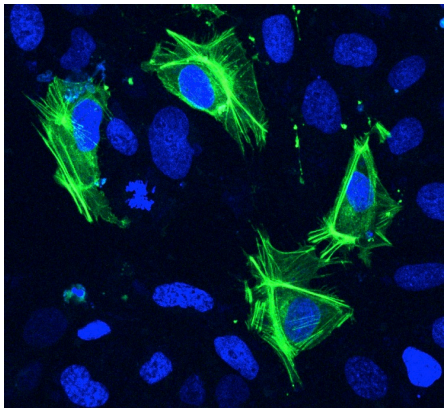


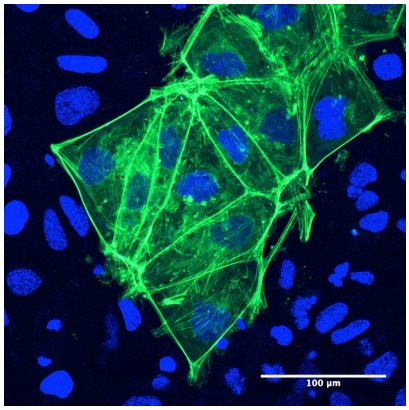
Merge



Ciblage en cellules souches

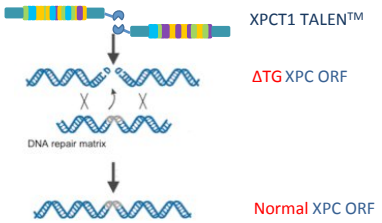
Mono gene tagging ACTB TALEN™



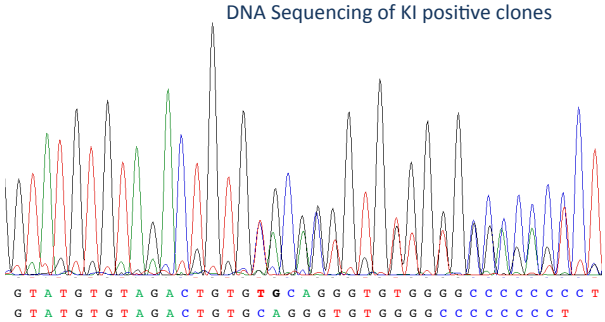


- ACTB and TUBA1 TALEN™ allows for highly efficient gene tagging in iPS cells, U-2OS or Hela cells

Correction de mutation en cellules de patients XPC



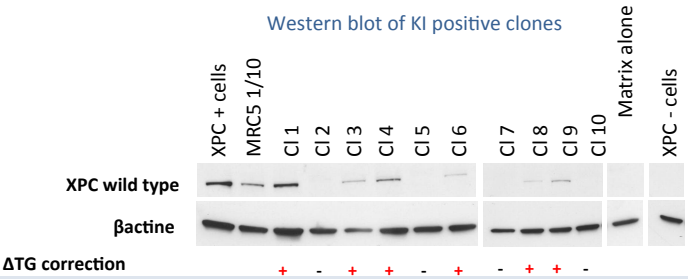
DNA Sequencing of KI positive clones



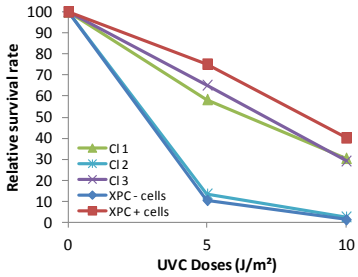
75 % des clones ont la correction TG

- TALEN™ : > 8% de cellules KI positive sans sélection
- La majorité de KI+ ont une correction de la délétion ΔTG
- La majorité de KI+ expriment la protéine XPC sauvage et sont résistants aux UVC

Western blot of KI positive clones

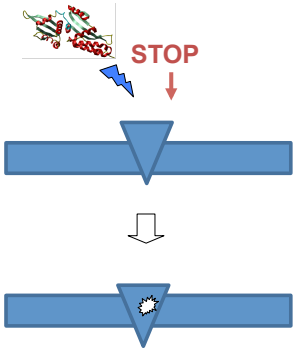


Résistance aux UVC

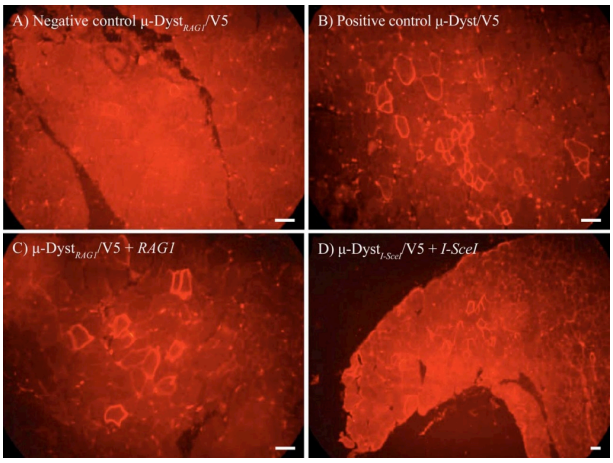


Chirurgie génomique *in vivo* par méganucléases (électroporées)

Mini-dystrophine du chien (frameshift)

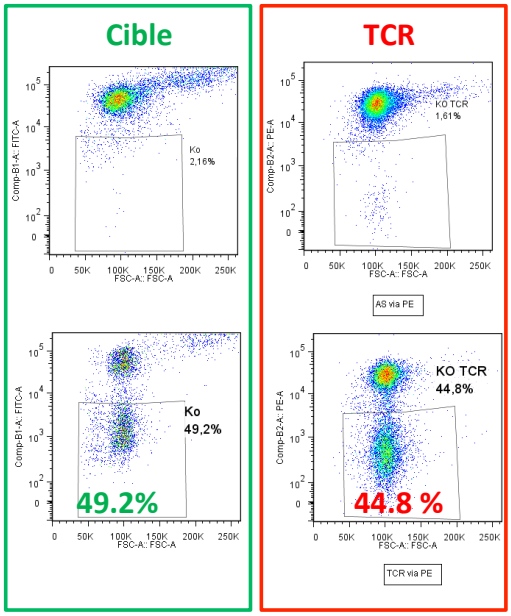


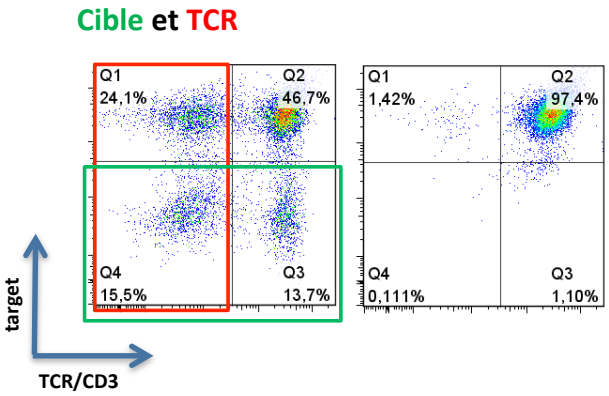
Indels
Rétablissent le cadre de lecture dans 1/3 cas



Gene Ther. 2010 Apr 15

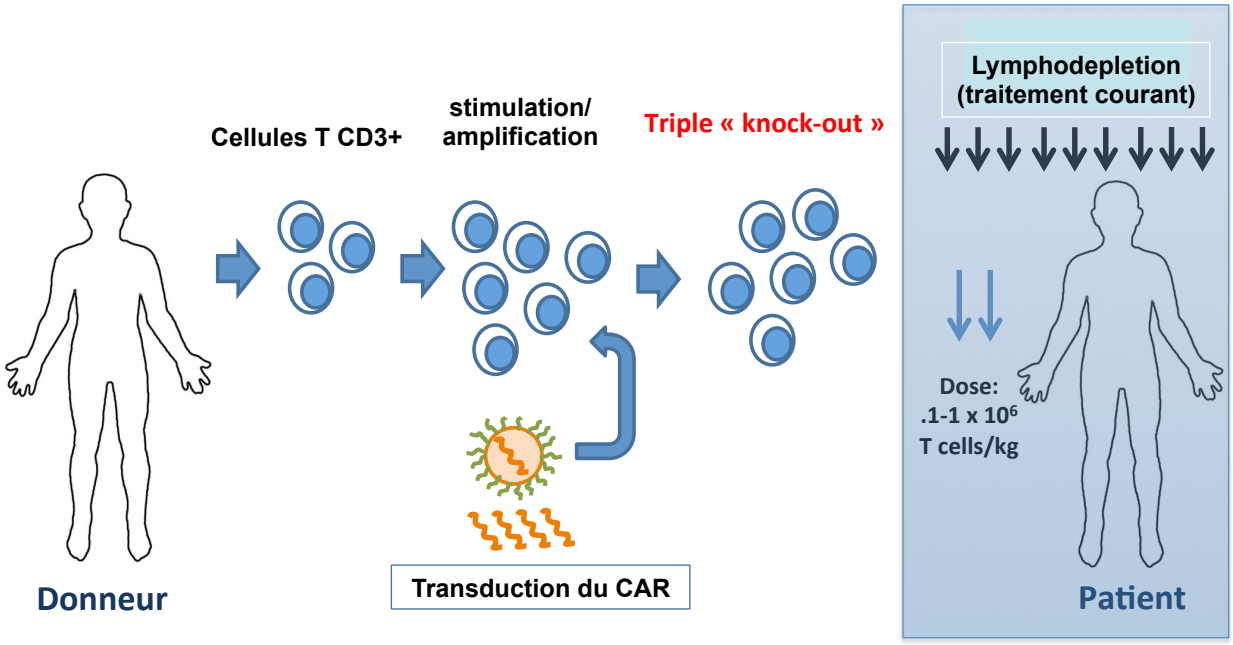
Triple disruption génique en lymphocytes T primaires humains





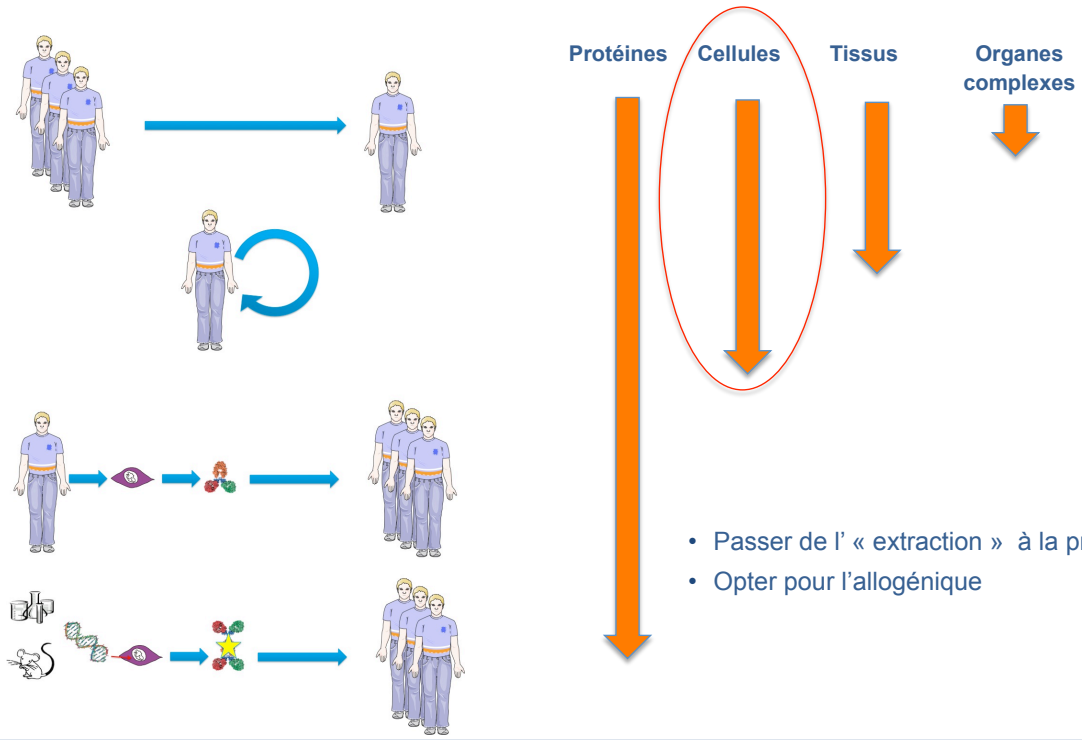
Electroporation d'ARN codant pour les nucléases : simple dose conduit à ~10-15% des cellules triple « knock-out »

Cellules T sur étagère



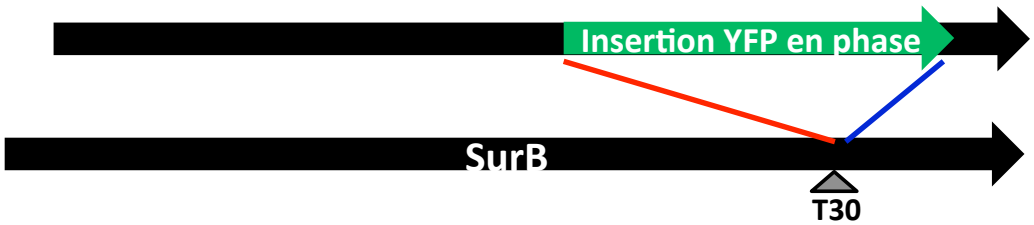
Lots manufacturés et validés, immédiatement disponibles

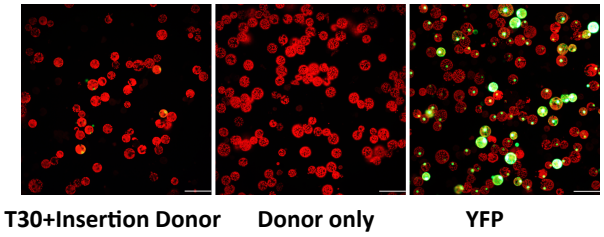
Avancement comparé: objets industriels, puis cliniques

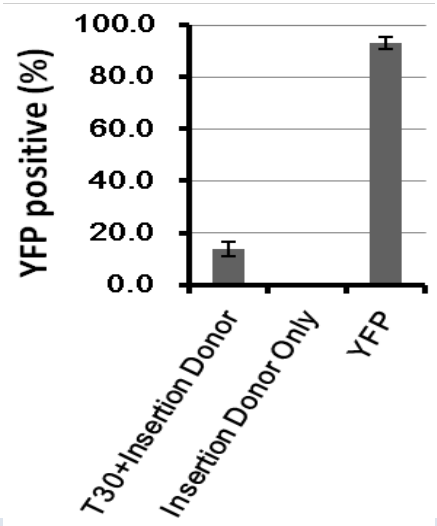


- Passer de l' « extraction » à la production
- Opter pour l'allogénique

Ciblage génique dans le tabac

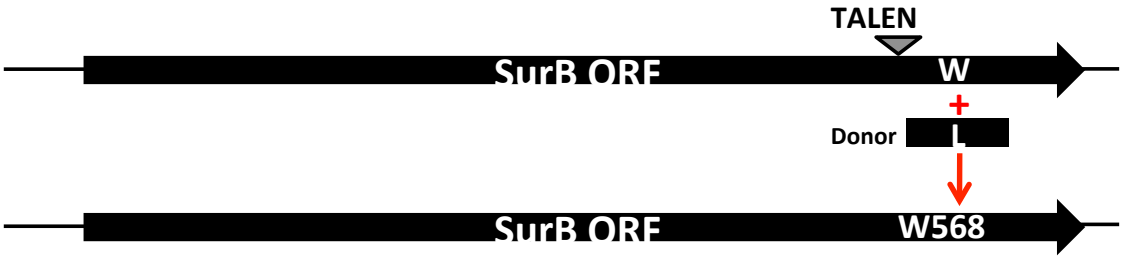


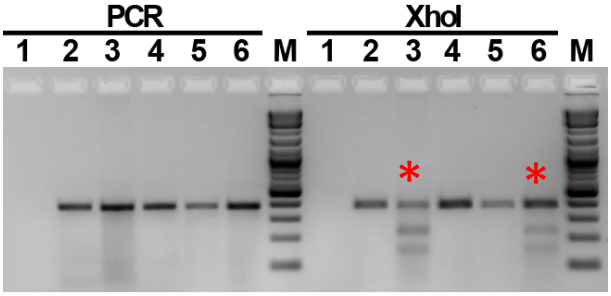


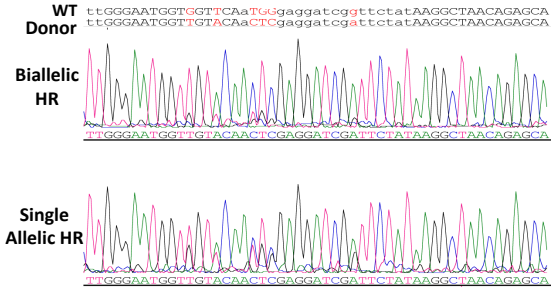


- 16% des cellules de tabac ont l'insertion ciblée

Modification allélique ciblée dans les végéntaux

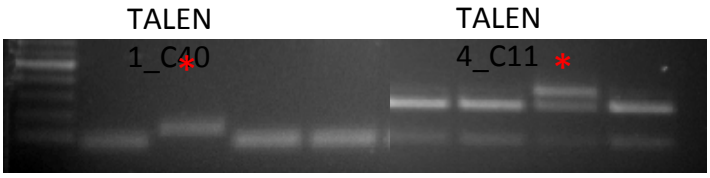




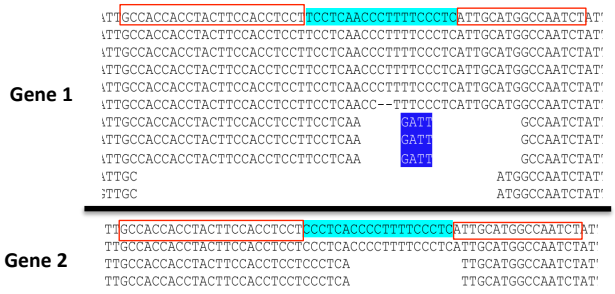


~10% des cellules transformées ont la modification allélique (sans sélection)

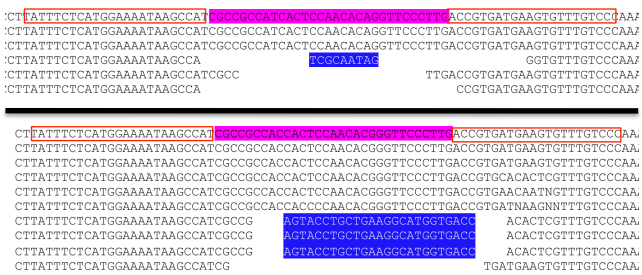
Inactivation génique dans le soja



TALEN 1_C40



TALEN 4_C11



De nombreux partenaires adoptent la technologie

Recherche amont	Outils de recherche	Outils de production	Thérapeutiques	Agrobiotech	Biotech industrielle
cnio Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas	AstraZeneca International	celonic	novo nordisk	BAYER	TOTAL
CRG	gsk GlaxoSmithKline	REGENERON PHARMACEUTICALS		BASF Corporation	
EMBL	MERCK	Shire	EFS	DUPONT	UNIVERSITEIT GENT
INSTITUT PASTEUR	REGENERON PHARMACEUTICALS	Lonza		PIONEER A DuPont Company	
		NOVARTIS			
istem	SERVIER	biogen idec Transforming Discovery into Care	Harvard Institute of Medicine	Groupe Limagrain	INSA TOULOUSE
			Centre d'Etude des Cellules Souches		
CIRA	BAYER		AFM	MONSANTO	
	Bristol-Myers Squibb		Children's Hospital Boston		
	Johnson & Johnson		UPMC SORBONNE UNIVERSITÉS	SES VANDERHAVE value through synergy	
	Pfizer Takeda MILLENNIUM THE TAKEDA ONCOLOGY COMPANY				

Sommaire

Perspective historique - le vivant : objet d'ingénieur

L'ingénierie des génomes : une rupture conceptuelle et industrielle

Potentiel industriel porté par la biologie synthétique

Saisir l'opportunité pour l'industrie, l'économie et la santé

Une révolution globale pour l'économie

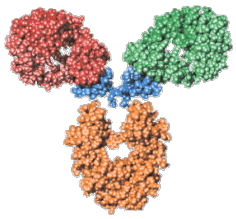
- ✓ un des grands gisements de croissance des années à venir ;
  - ✓ Le vivant fait autrement, et autre chose
- ✓ montée en gamme dans le médicament, l'industrie, l'énergie, …
  - ✓ Accès à la sophistication, au renouvelable et à l'efficience
- ✓ des millions d'emplois dans le monde à la clef
  - ✓ Des applications possibles sur un large spectre de domaines d'activité

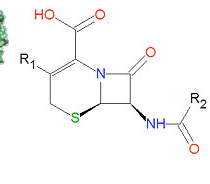
Opportunité pour une industrie durable dans l'économie de la connaissance

Le vivant sait très bien mettre en œuvre une chimie sophistiquée,

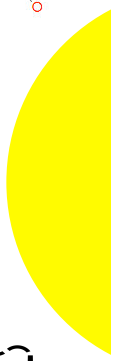
- à l'origine de produits élaborés (antibiotiques, autres médicaments, bio-polymères, etc.)
- de façon particulièrement économe et efficace.
- Le vivant transforme la matière et transpose l'énergie sous pratiquement toutes ses formes.
- Il est une ressource renouvelable et permet une industrie durable.

La matérialisation industrielle de ce potentiel passe par une <u>intelligence</u> des processus du vivant, une élucidation et une maîtrise de ses complexités





$4x10^{20}$ J/an



$N_2 + 3\ H_2 \rightarrow 2\ NH_3$

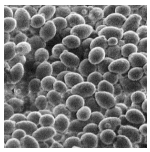
$N_2 + 8\ H^+$ (+ 16 ATP) → $2\ NH_3 + H_2$

Segmentation

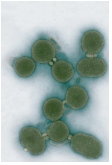
- On distingue :
  - ✓ Optimisation d'un gène
    travaux « *in vitro* » qui relèvent du génie enzymatique (Genencor, Novozymes, Berkley…), où l'on crée de nouvelles fonctionnalités chimiques isolables
  - ✓ Optimisation d'organismes
    travaux « *in vivo* » qui visent à l'élaboration de nouvelles souches vivantes, et qui relèvent, à proprement parlé, de la biologie de synthèse :
    - Optimisation de voies métaboliques (« groupes de gènes », dans l'organisme)
    - Optimisation de la physiologie (ingénierie plus vaste du génome)
  - ✓ Optimisation de groupes d'organismes
    travaux, encore émergents, « *in vivo* » pour des processus plus élaborés
    - Symbioses
    - micro-écosystèmes

La concurrence mondiale s'organise

- Historiquement **concentrées aux Etats-Unis**, les approches de biologie de synthèse ont accéléré leur développement sous l'impulsion du gouvernement fédéral (autour des substituts au pétrole) et autour de quelques axes:

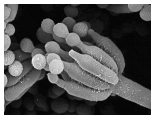


1. fondés sur des **organismes simples** : souches plate-forme. Pratiquement les seules à ne pas être de purs objet de laboratoire et ayant une chance de devenir de réels objets industriels sont quelques levures particulières (cf. Amyris, Bio-Amber, etc.)
   => *in fine* ont besoin d'ingénierie génomique et utilisent les **technologies françaises**



2. Ecriture d'un génome « simple » dans une cellule « receveuse » : Synthetic Genomics. Très spectaculaire, mais **tombe dans la complexité** d'un génome et de sa manipulation
   => *in fine* ont besoin d'ingénierie génomique et utilisent les **technologies françaises**

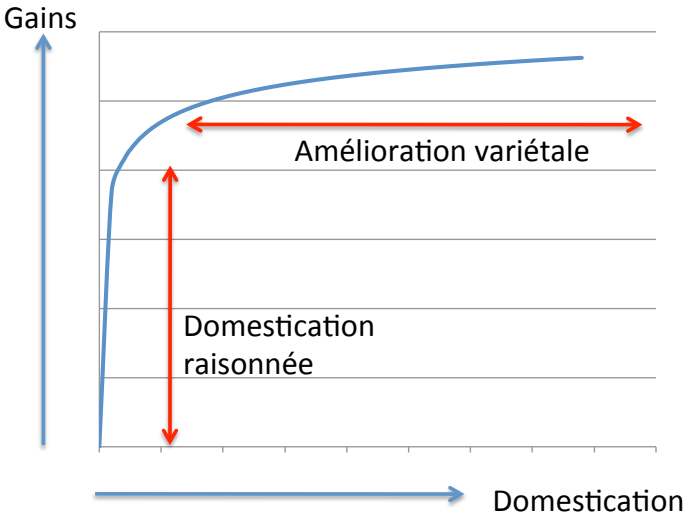
- En Europe, les travaux sont plutôt concentrés sur d'autres espèces pour des domaines différents (bactéries, champignons), en Allemagne, aux Pays-Bas et dans d'autres pays : DSM, Sandoz, Lonza, ….



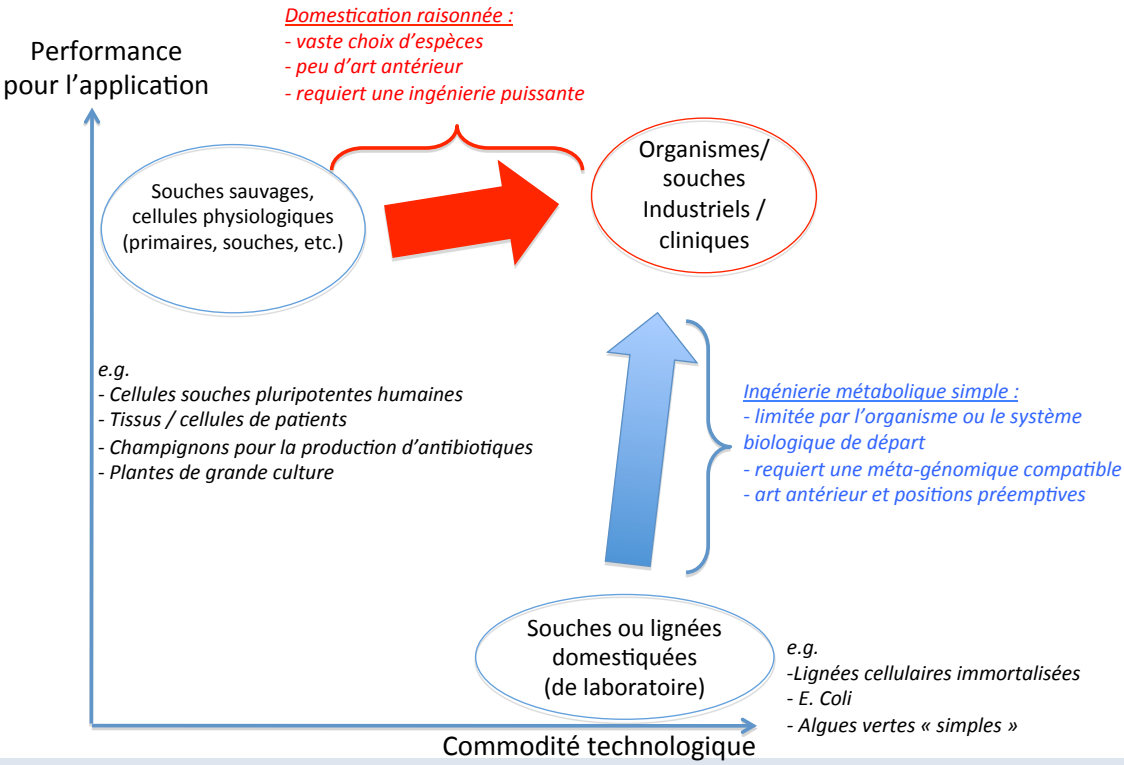
Rationnel: domestication raisonnée

5 000 ans de domestication

Teosinte : l'ancêtre | Maïs vers 1492 | Maïs hybride aujourd'hui



Tirer parti de milliards d'années d'évolution



Sommaire

Perspective historique - le vivant : objet d'ingénieur

L'ingénierie des génomes : une rupture conceptuelle et industrielle

Potentiel industriel porté par la biologie synthétique

Saisir l'opportunité pour l'industrie, l'économie et la santé

La France peut prendre une place importante dans cette révolution

✓ Quelques savoir faires privilégiés positionnent la France sur ce créneau :

1. La capacité à gérer la complexité (mathématique, modélisation, etc.),
2. La production historique d'ingénieurs de haut niveau (en mesure aujourd'hui de s'approprier le vivant),
3. Une position déjà établie dans l'ingénierie du vivant.

L'approche de ciblage, précis, robuste et maîtrisé est une révolution vis-à-vis de la transgénèse : sachons bien la différencier et l'accompagner (enjeu réglementaire).

L'opportunité peut être matérialisée sur plusieurs secteurs pour le bénéfice des patients, des industries, de l'agriculture et de notre économie en général.

La **France** peut prendre un **position de leader** sur le créneau « haut de gamme » : l'ingénierie la plus fine, la plus rigoureuse et la plus efficace des objets biologiques les plus pertinents (« vraies » cellules – de patients, souches, espèces de rente, etc.).

Saisir l'opportunité

La matérialisation de ce potentiel passe par un investissement vigoureux dans la filière

1. Conforter notre leadership là où nous avons établi des têtes de pont

2. Rapprocher les ingénieurs, les mathématiciens, etc. des problématiques biologiques
   - ⇒ ingénierie du gène,
   - ⇒ puis des voies métaboliques,
   - ⇒ puis de la physiologie,
   - ⇒ puis ingénierie symbiotique,
   - ⇒ puis, à terme, l'ingénierie de micro écosystèmes comportant des populations différentes d'organismes vivants

3. intégrer les approches dans un nombre limité d'entités industrielles fortes structurant la filière.

Comme tout domaine extrêmement novateur, le développement d'une industrie européenne de la biologie synthétique exige un volontarisme avéré :

- Organisation et financement de filières.
- Soutien aux acteurs via une politique volontaire.

Merci de votre attention

Alternext : ALCLS.PA

Cellectis SA
8, rue de la croix Jarry
75013 Paris
France

http://www.cellectis.com
investors@cellectis.com

Tel: +33 (0) 1 81 69 16 00
Fax: + 33 (0) 1 81 69 16 03