

BIO MED

LES JOURNÉES POUR L'AVENIR DE LA



2023

BIOLOGIE MÉDICALE

9 & 10 MARS 2023 • Palais des Congrès de Paris Porte Maillot



MUCOVISCIDOSE : NOUVELLES THÉRAPIES CIBLÉES ET EXPLORATIONS BIOLOGIQUES

Dr Michaela SEMERARO, Pédiatre, MCU-PH Centre d'Investigation Clinique INSERM CIC1419

Dr Thao NGUYEN-KHOA, PH Laboratoires de Biochimie & du Centre Régional de Dépistage Néonatal

Dr Mairead KELLY-AUBERT, PhD Institut Necker U1151

Hôpital Necker-Enfants malades, AP-HP Centre

Université Paris Cité



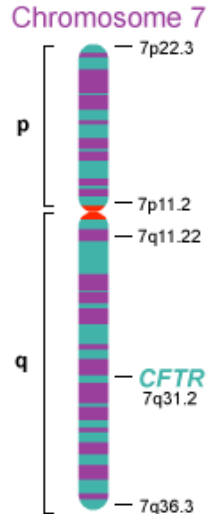
Les orateurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt dans le domaine



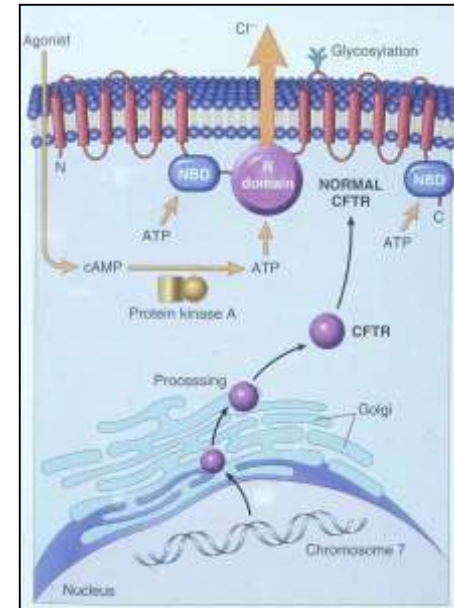
- 1. Dr SEMERARO : Mucoviscidose – Nouvelles thérapies ciblées**
- 2. Dr NGUYEN KHOA : Le test de la sueur : diagnostic et suivi des thérapies**
- 3. Dr NGUYEN-KHOA & KELLY-AUBERT : tests fonctionnels épithéliaux de CFTR**
pour préciser le diagnostic et dans le choix des thérapies protéiques
- 4. Dr NGUYEN-KHOA : Conclusions**

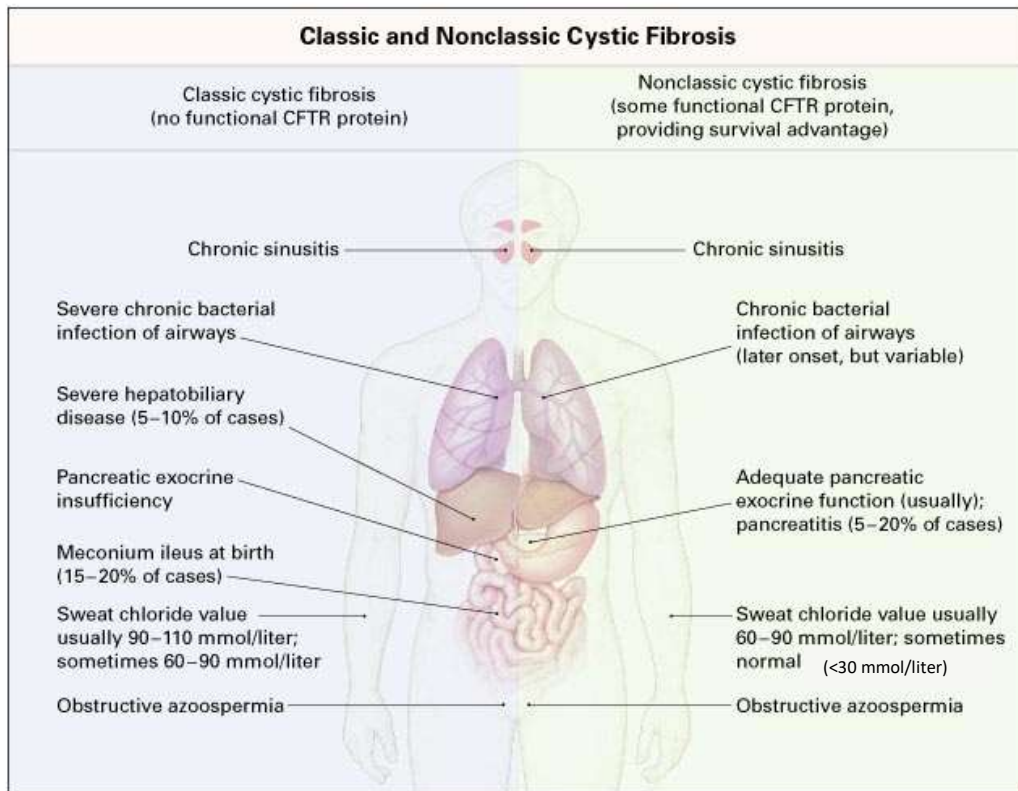


La mucoviscidose (MV) est causée par des mutations du gène régulateur de la conductance transmembranaire (CFTR) (locus : 7q31.2) qui code une protéine exprimée dans la membrane apicale des cellules épithéliales exocrines



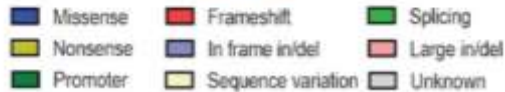
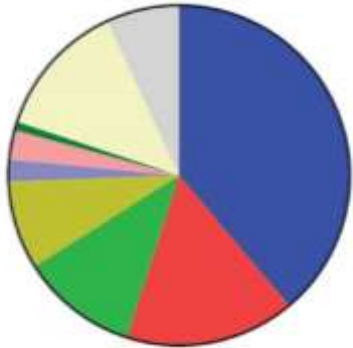
Le CFTR contrôle le mouvement des ions chlorures à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule





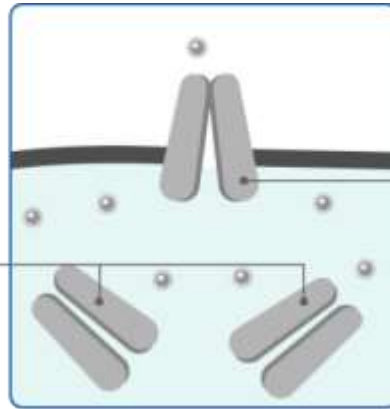


F CFTR gene variants – 2,075



- **2 075 variants du gène CFTR :**
 - mutations faux-sens (38,9 %) ;
 - splicing (11,1 %) ;
 - inframe (2,1 %) et large délétions ou insertions (2,8 %) ;
 - mutations du promoteur (0,9 %) et variants non pathogènes (13,0 %)
 - décalage de cadre (16,1 %) ;
 - non-sens mutations, (8,4 %) ;

Defect 1:
Fewer CFTR proteins get to the cell surface, where they are normally located.



Defect 2:
CFTR proteins don't open correctly if they do reach the cell surface.

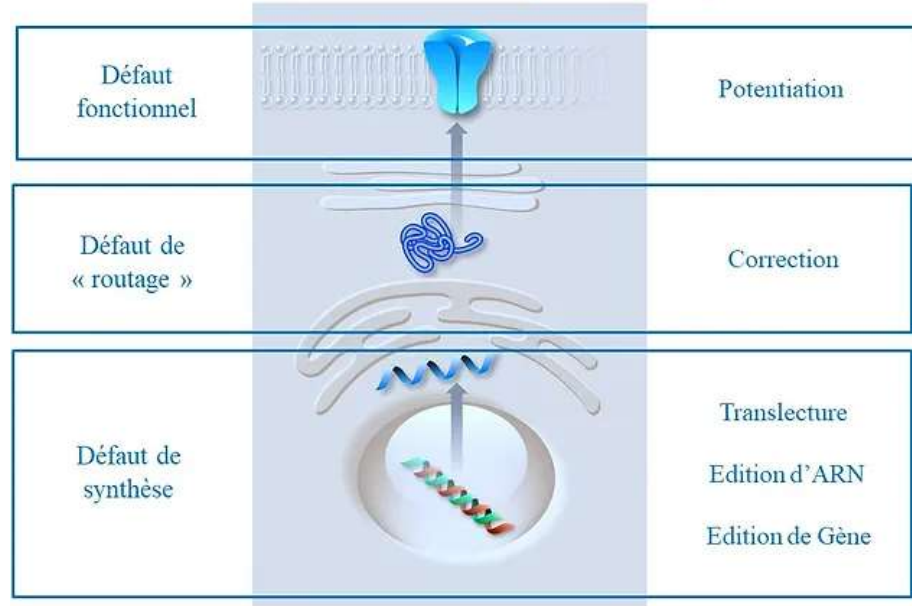
KEY





- Médicaments modulateurs CFTR : molécules « chaperonnes » capables de guider la protéine jusqu'à son insertion dans la membrane (effet correcteur) ou de l'activer (effet potentiateur)
- Thérapie de réparation d'ARNm : réparer l'ARNm du CFTR pour générer un transcrit WT-CFTR
- Translecture des codons (codon de terminaison prématurée): molécules visant à corriger l'apparition des codons stop
- Thérapie génique

Mutations de CFTR et stratégies thérapeutiques



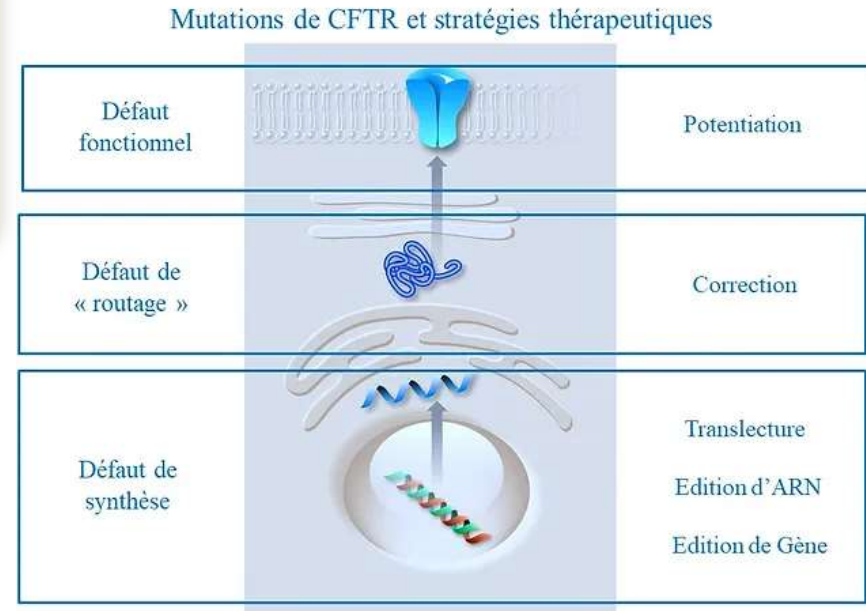


Médicaments modulateurs CFTR : molécules « chaperonnes » capables de guider la protéine jusqu'à son insertion dans la membrane (effet correcteur) ou de l'activer (effet potentiateur).

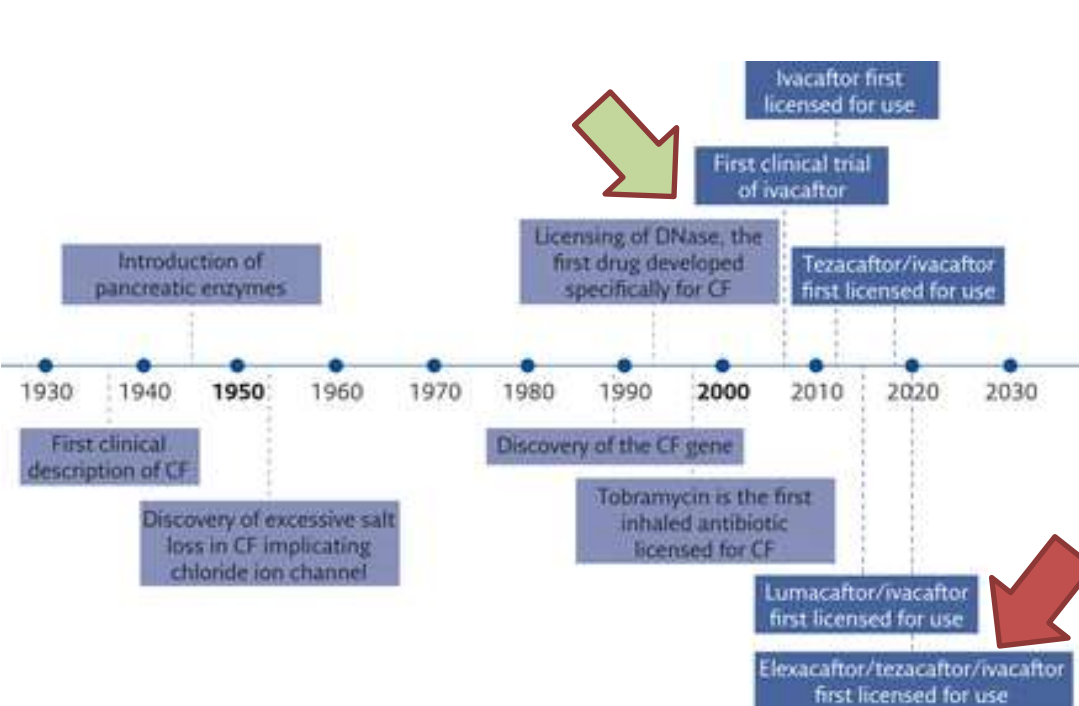
Thérapie de réparation d'ARNm : réparer l'ARNm du CFTR pour générer un transcrit WT-CFTR (Trials ongoing)

Translecture des codons (codon de terminaison prématurée): molécules visant à corriger l'apparition des codons stop. (CRISPR, BE)

Thérapie génique (pas d'essai concluant pour le moment; pb inflammation)



DE LA DÉCOUVERTE DE LA MUCOVISCIDOSE AU TRAITEMENT

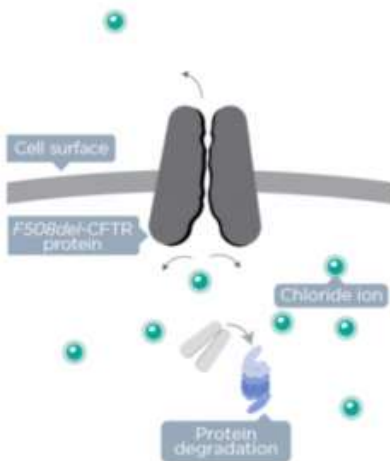


		France	USA
Kalydeco® AMM 2012 >12 ans G551D	Ivacaftor	>6 mois 9 mutations « gating »	>4 mois 97 mutations
Orkambi® AMM 2015 >12 ans F508del/F508del Extension 2018 >6 ans	Ivacaftor Lumacaftor	2019 : > 2 ans Ho F508del	> 4 mois Ho F508del
Symkevi® AMM 2018 >12 ans	Ivacaftor Tezacaftor	en cours évaluation pour >6 ans Ho F508del F508del/14 autres avec fonction résiduelle	>6 ans Ho F508del F508del/127 autres
Kaftrio® AMM 2019 >12 ans	Ivacaftor Tezacaftor Elexacaftor	en cours évaluation pour >6 ans au moins 1 F508del et avec les mutations des classes II, IV et V	>6 ans au moins 1 F508del

Daniel H. Tewkesbury, Rebecca C. Robey, Peter J. Barry
Breathe 2021 17: 210112; DOI: 10.1183/20734735.0112-2021

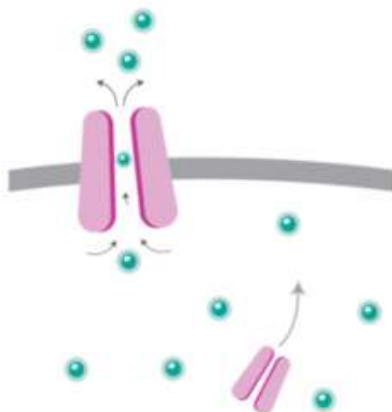


DEFECTIVE *F508del*-CFTR PROTEIN



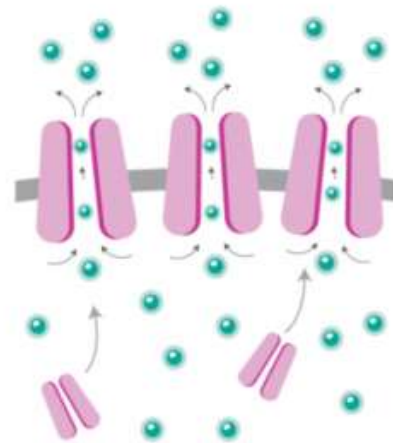
- Patients with an *F508del*-CFTR mutation have decreased CFTR activity at the cell surface²

TEZACAFTOR and IVACAFTOR



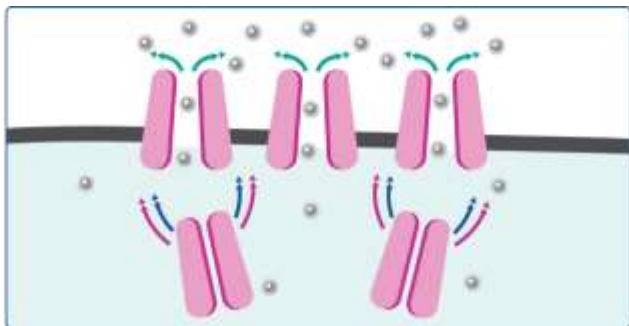
- Tezacaftor improves cellular processing and trafficking of *F508del*-CFTR proteins¹
- Ivacaftor potentiates the channel-open probability of CFTR proteins at the cell surface¹

ELEXACAFTOR, TEZACAFTOR, and IVACAFTOR



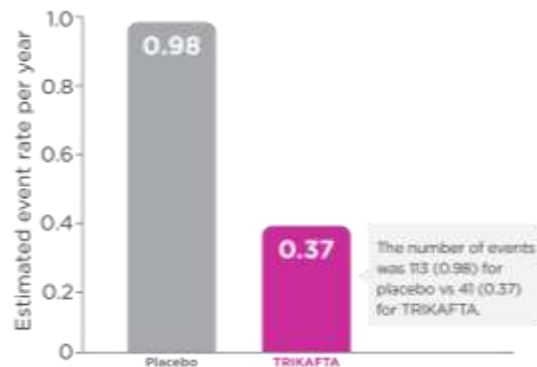
- Binding to a different site than tezacaftor, elexacaftor has an additive effect in improving cellular processing and trafficking of *F508del*-CFTR proteins¹

La révolution du TRIKAFTA



IVACAFTOR helps CFTR proteins stay open longer at the cell surface.

By binding to different places on CFTR proteins, **ELEXACAFTOR** and **TEZACAFTOR** work together to help more proteins reach the cell surface.





Les modulateurs CFTR (IVA, LUM/IVA, TEZ/IVA et ELX/TEZ/IVA) constituent une véritable amélioration dans la prise en charge des patients non seulement pour les personnes atteintes de mucoviscidose légère à sévère, mais même chez les personnes atteintes d'une maladie pulmonaire avancée

- Age de début?
- Stabilité de l'efficacité dans le temps?
- Toxicité à long terme?
- Evaluation et suivi de la réponse (« surrogate markers »)?



Test de la sueur : rappel de la physiologie de la glande sudoripare

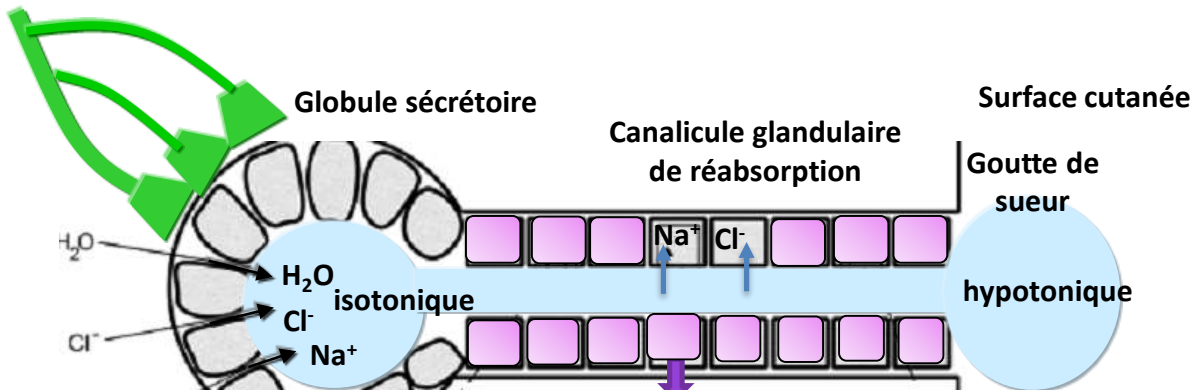
Voie cholinergique sécrétion

Cl⁻ Ca²⁺ dépendante,

Fonctionnelle

chez le sujet atteint de MV

Quinton PM. Physiology 2007;22:212-25

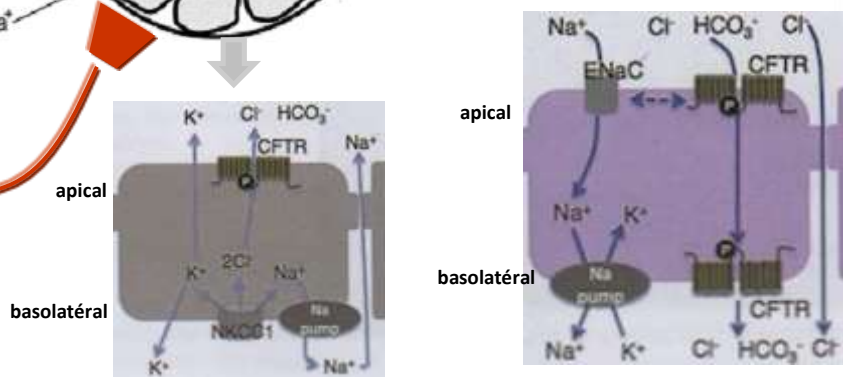


Voie adrénérique sécrétion

CFTR dépendant,

Non fonctionnelle

chez le sujet atteint de MV





Le test de la sueur consiste à mesurer la concentration sudorale en ions **chlorures** (Cl^-) ; peu invasif, standardisé, c'est le test biologique le plus sensible et le plus spécifique avec une VPP > 95% au seuil de 60 mmol/L Cl^-

Il est réalisé en 3 étapes :

- **iontophorèse à la pilocarpine** : 5 min
- **recueil de la sueur** grâce à un collecteur Macroduct® placé sur la zone stimulée par l'électrode rouge (anode) ; colorant bleu pour visualiser la sueur : 30 min
- **dosage des ions Cl^-** (en particulier par coulométrie)

Interprétation

Valeurs usuelles **quel que soit l'âge** < 30 mmol/L Cl^-

Valeurs pathologiques \geq 60 mmol/L Cl^-

Entre 30 et 59 mmol/L Cl^- , le diagnostic de MV ne peut être écarté

Variabilité analytique & biologique

même jour, BD vs BG : [-3,2 ; +3,6] mmol/L Cl^-

jour différent : [-18 ; +14] mmol/L Cl^-



Cirilli N *et al.* J Cyst Fibros 2022
Nguyen-Khoa T *et al.* Ann Biol Clin 2018
Vermeulen F *et al.* J Cyst Fibros 2017
De Boeck K *et al.* Eur Respir J 2013

HAS-PNDS Mucoviscidose 2017

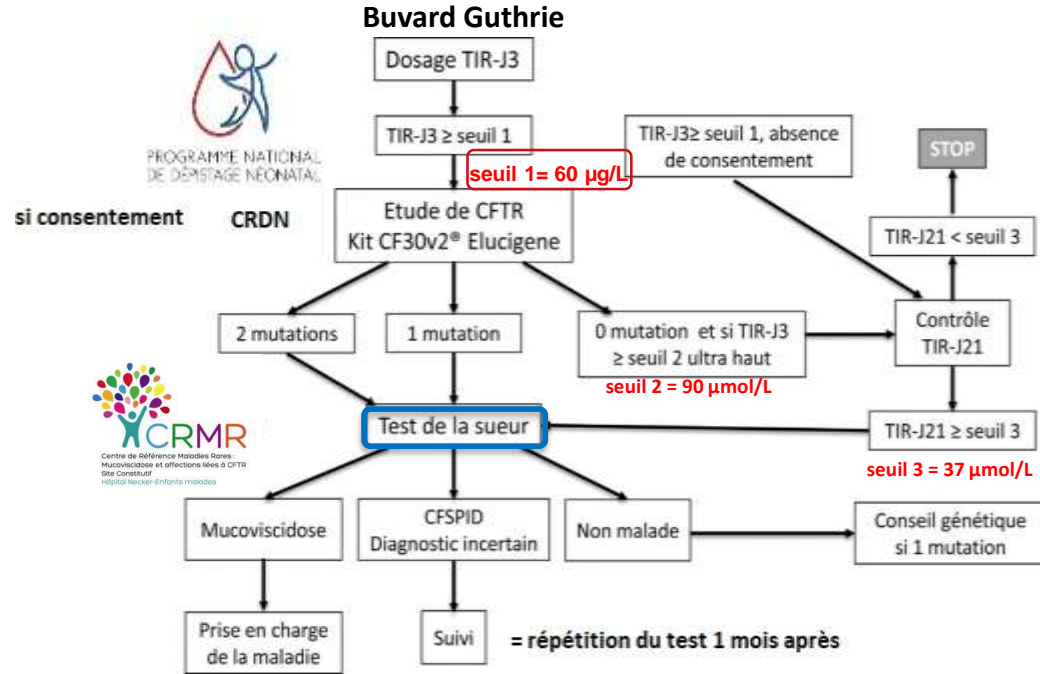
www.has-sante.fr

Le diagnostic de MV est confirmé :

- par un test de la sueur ≥ 60 mmol/L Cl⁻
- et /ou par l'identification de 2 mutations du gène *CFTR* associées à la MV chacune étant héritée d'un parent.

Stratégie de génétique moléculaire

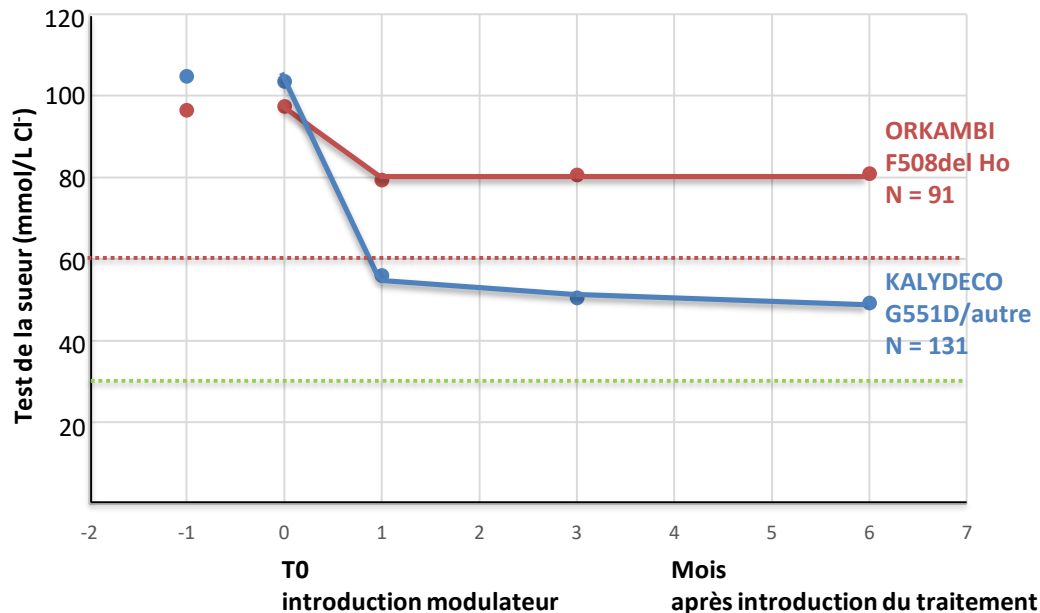
- **Dépistage néonatal à J3 (Guthrie)**
(50% des nouveaux cas déclarés dans l'année)
Sang séché : coffret Elucigene® CF30v2 (29 mutations)
- **Sur signes cliniques évocateurs dès la petite enfance et test de la sueur positif ou intermédiaire**
Sang total EDTA : CF-EU2v1 (51 mutations)
(avec 90% de sensibilité dans la population française)



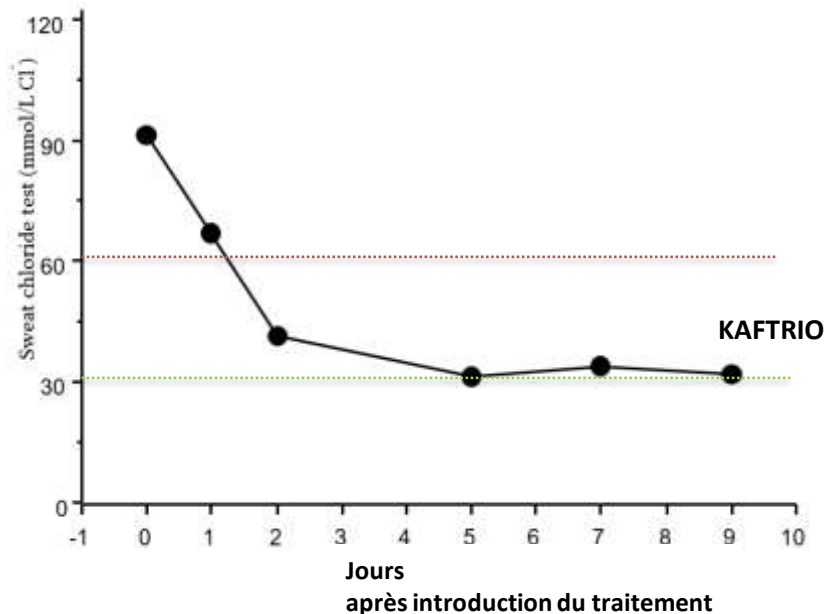


Test de la Sueur : biomarqueur robuste de l'efficacité des traitements modulateurs de CFTR

Zemanick E *et al.* J Cyst Fibros 2021



Sermet-Gaudelus I *et al.* J Pers Med 2021





Formes frontières depuis l'introduction de la mucoviscidose dans le dépistage néonatal en France

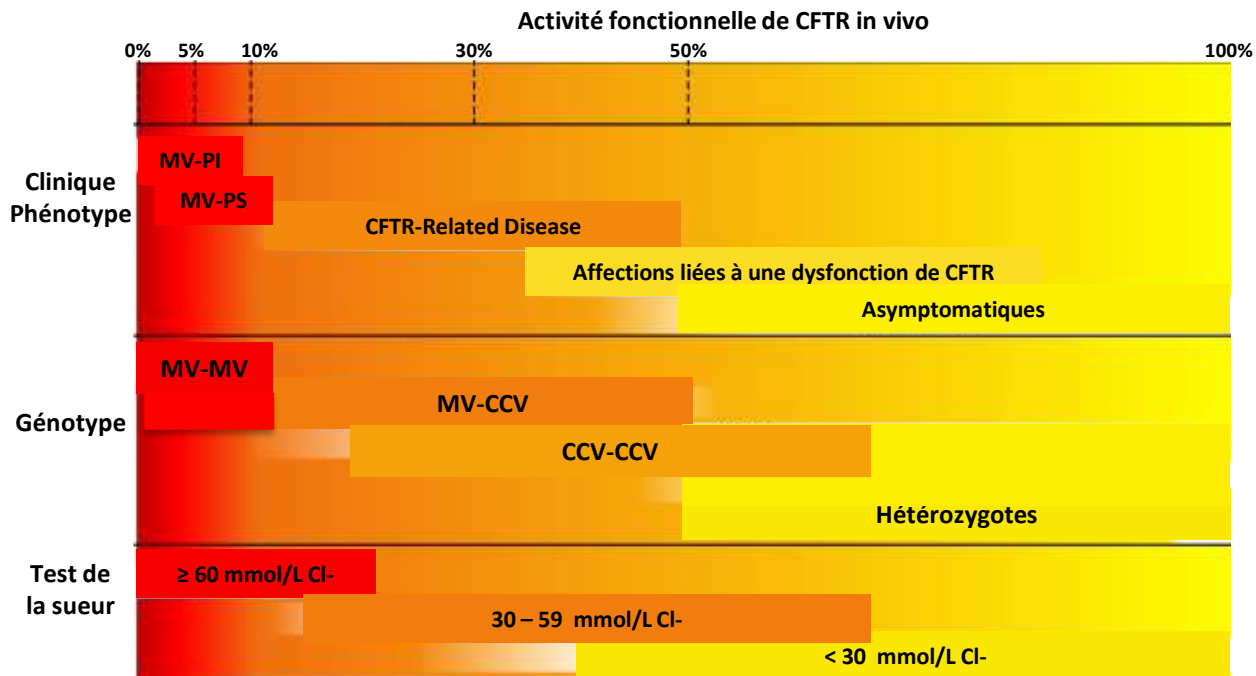
Bilan de quelques régions	Nb NNés testés	Nombre de nouveau-nés malades depuis 2002				
		Forme classique	Fréquence	Forme frontière	Total	fréquence
Ile de France	3 423 524	377	1 / 9 081	69	446	1 / 7 676
Auvergne Rhône Alpes	1 786 606	356	1 / 5 019	48	404	1 / 4 442
Hauts de France	1 501 825	302	1 / 4 973	46	348	1 / 4 316
PACA Corse	1 242 802	203	1 / 6 122	21	224	1 / 5 548
Occitanie	1 161 775	166	1 / 6 999	14	180	1 / 6 454
Grand Est	1 242 802	239	1 / 4 796	43	282	1 / 4 064
Bretagne	713 417	183	1 / 3 898	31	214	1 / 3 334
Métropole	14 803 507	2 491	1 / 5 943	354	2 845	1 / 5 203
Ile de la Réunion	277 088	70	1 / 3 958	5	75	1 / 3 695
Guadeloupe	79 104	4	1 / 19 776	1	5	1 / 15 821
Outre Mer	461 293	79	1 / 5 839	7	87	1 / 5 302
TOTAL	15 264 800	2 570	1 / 5 940	361	2 932	1 / 5 206



www.has-sante.fr HAS-PNDS Evaluation diagnostique et prise en charge des affections liées ou associées à CFTR. 2021

Le diagnostic d'AL-CFTR est évoqué devant la présence d'au moins un symptôme évocateur de MV

ET un TS entre [30 et 59] mmol/L Cl⁻ et au plus un variant du gène *CFTR* associé à la MV
ou un TS < 30 mmol/L Cl⁻ et 2 variants du gène *CFTR* dont au moins un n'est pas associé à la MV.



AL-CFTR

- Aspergillose BronchoPulmonaire allergique
- Cholangite Sclérosante primitive
- Absence Bilatérale des Canaux Déférents
- Pancréatite idiopathique
- Dilatation des Bronches
- Affections Rhinosinusiennes Chroniques
- Aquadermie Palmo-Plantaire Aquagénique

Mutations CFTR

MV : Mucoviscidose
CFTR-RD : CFTR-Related Disease
CCV : Conséquence Clinique Variable

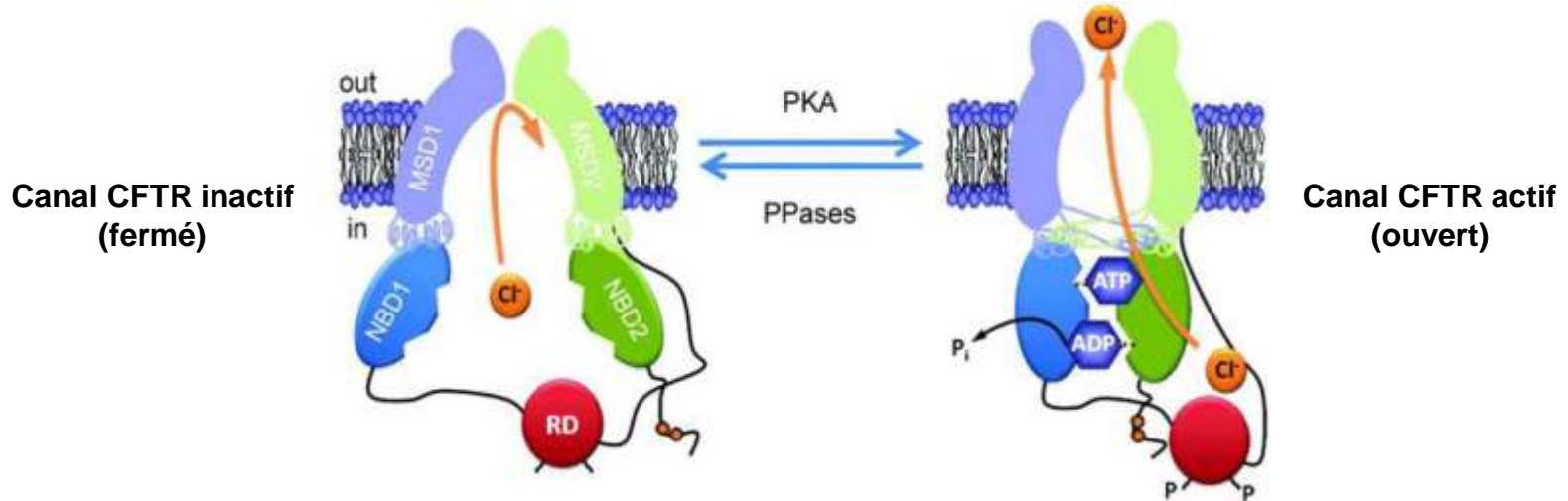
I. Sermet-Gaudelus, E. Girodon, F. Vermeulen et al.

Journal of Cystic Fibrosis 21 (2022) 922-936



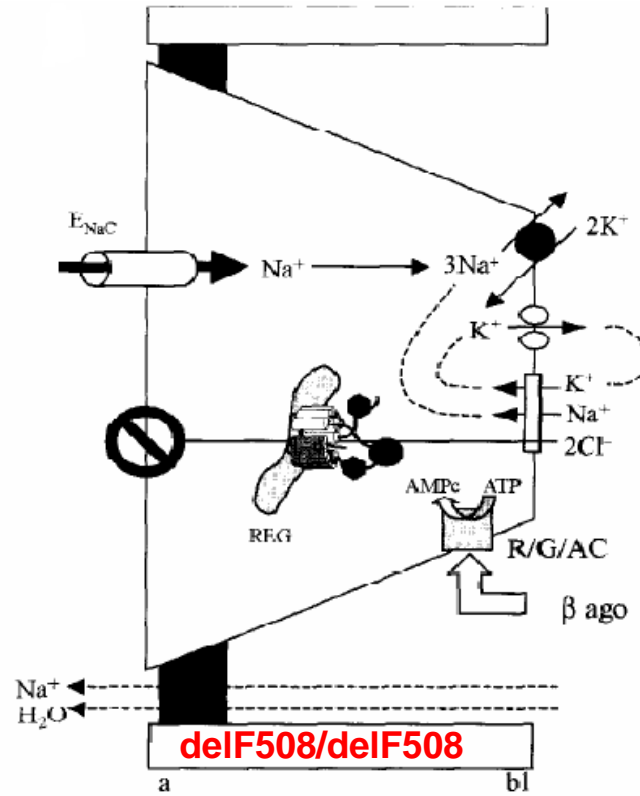
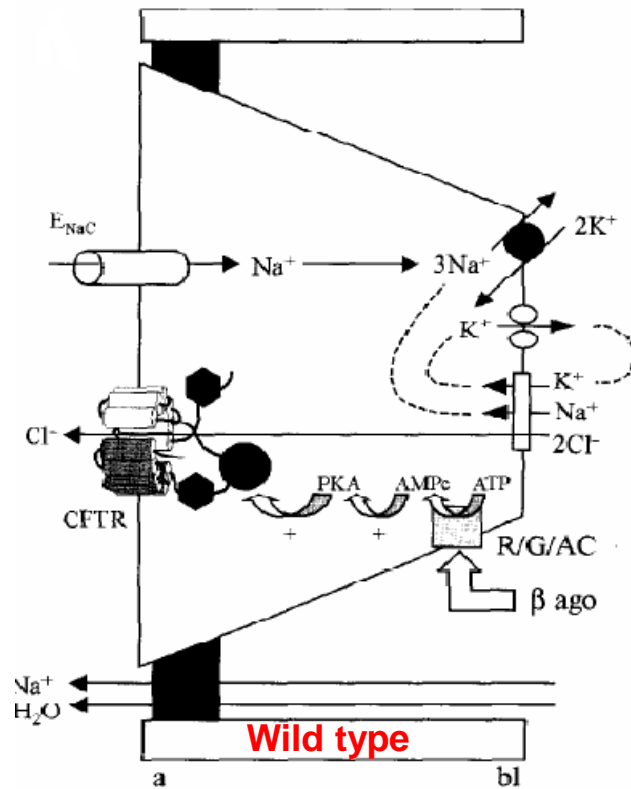
CFTR : protéine de la famille des ABC protéines, canal Cl^- AMPc dépendant

Hwang & Sheppard *J Physiol* 2009



2 étapes essentielles dans l'ouverture du canal

- la phosphorylation du domaine R;
- la liaison et l'hydrolyse de l'ATP sur les sites NBD.





Tests d'exploration *in-vivo*

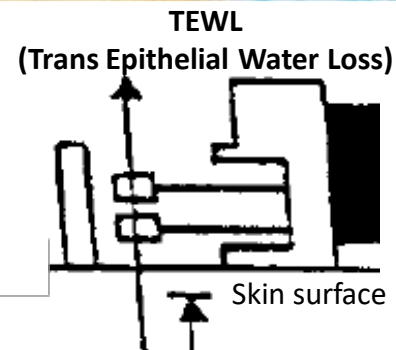
- Glande sudoripare : le test de sécrétion de sueur après stimulation bêta adrénérique
- Epithélium nasal : différence de potentiel nasal (DPN; *Nasal Potential Difference (NPD)*)

Tests d'exploration *ex-vivo*

- Epithélium nasal : frottis nasal pour études sur cultures cellulaires primaires
- Epithélium rectal
 - ✓ courant de court-circuit sur biopsie rectale (CCC; *Intestinal Current Measurement (ICM)*)
 - ✓ préparation d'organoïdes

Exploration *in vivo* de la glande sudoripare

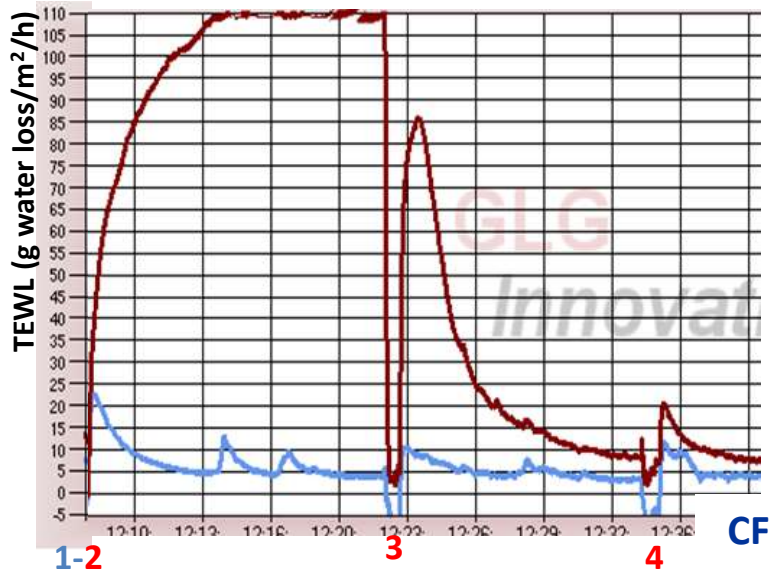
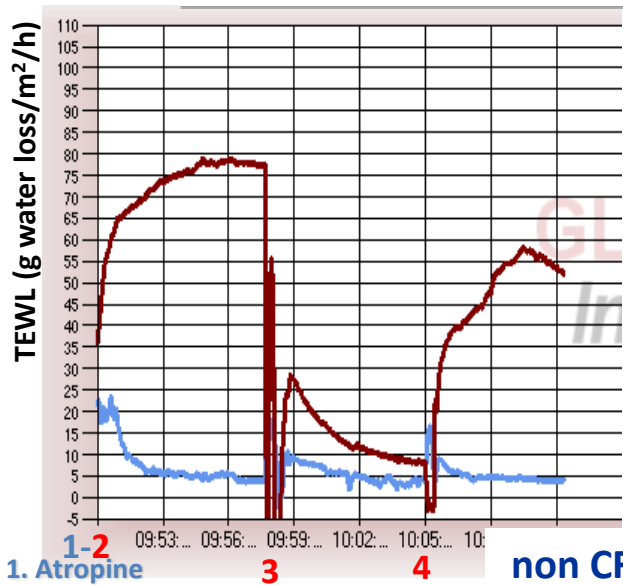
Principe : mesure du gradient de pression de vapeur d'eau (Nilsson).



2. Carbachol: réponse rapide et intense; habituellement entre 40 à 100 (~60).

3. Atropine: bloque la réponse cholinergique jusqu'à atteindre les valeurs de la sonde de référence.

4. Cocktail β -adr : la réponse est plus lente (activation CFTR).



Administration en SCut





Exploration *in vivo* de l'épithélium nasal : DPN



Limites :

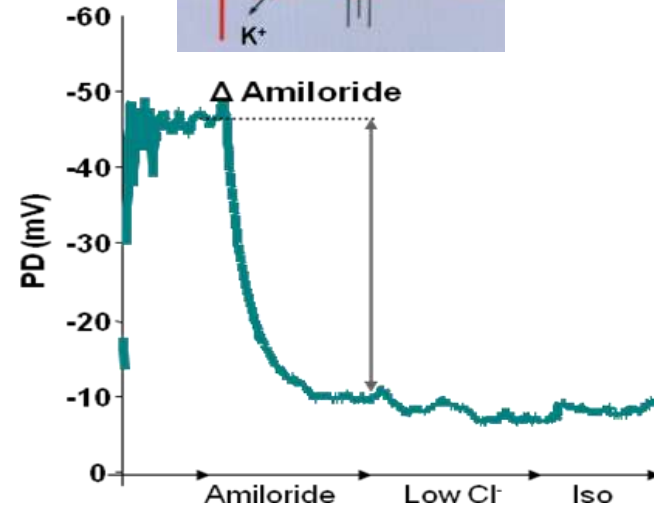
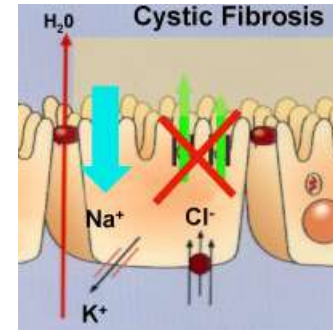
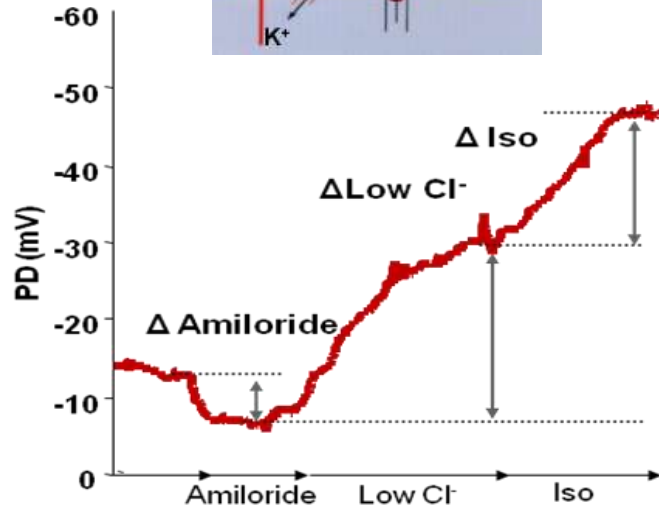
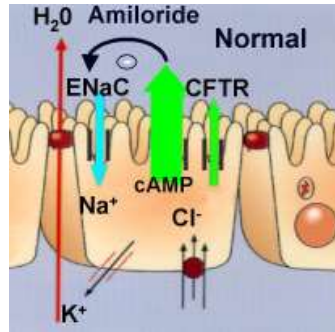
Coopération du patient

Nourrisson possible mais difficile (protocole raccourci)

Atteinte de la muqueuse nasale (rhinite, polypose nasale, etc..)

Sermet-Gaudelus I *et al.* Am J Respir Crit Care Med 2010

Solomon G *et al.* J Vis Exp 2018





Exploration *ex-vivo* de l'épithélium rectal

De Jonge J Cyst Fibros 2004

Derichs N Thorax 2010

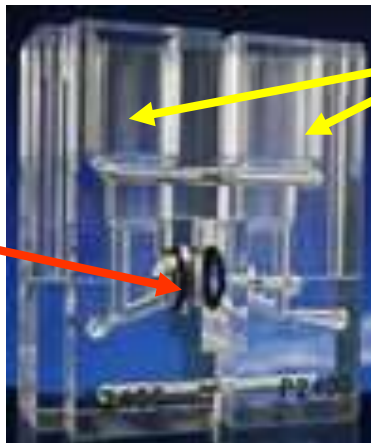
CTN-Diagnostic WG. SOP-ICM 2011

Biopsie rectale (réalisée en moins de 5 min)

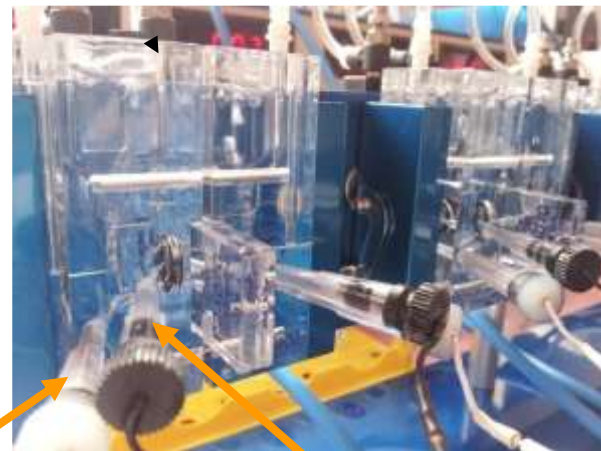
Après contrôle de l'hémostase



L'épithélium est
inséré entre deux
lames au niveau
d'un petit orifice
(1,5 mm de Ø)



solutions à 37° C



électrode qui applique le
courant de court-circuit

électrode de mesure

Limites :

Organisation locale pour conserver l'intégrité du tissu, analyse <2h après le prélèvement

Matériel coûteux, personnel très expert



Critères retenus

Non atteint de MV

Δ Forskoline (17 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$)

Δ Carbachol (37 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$)

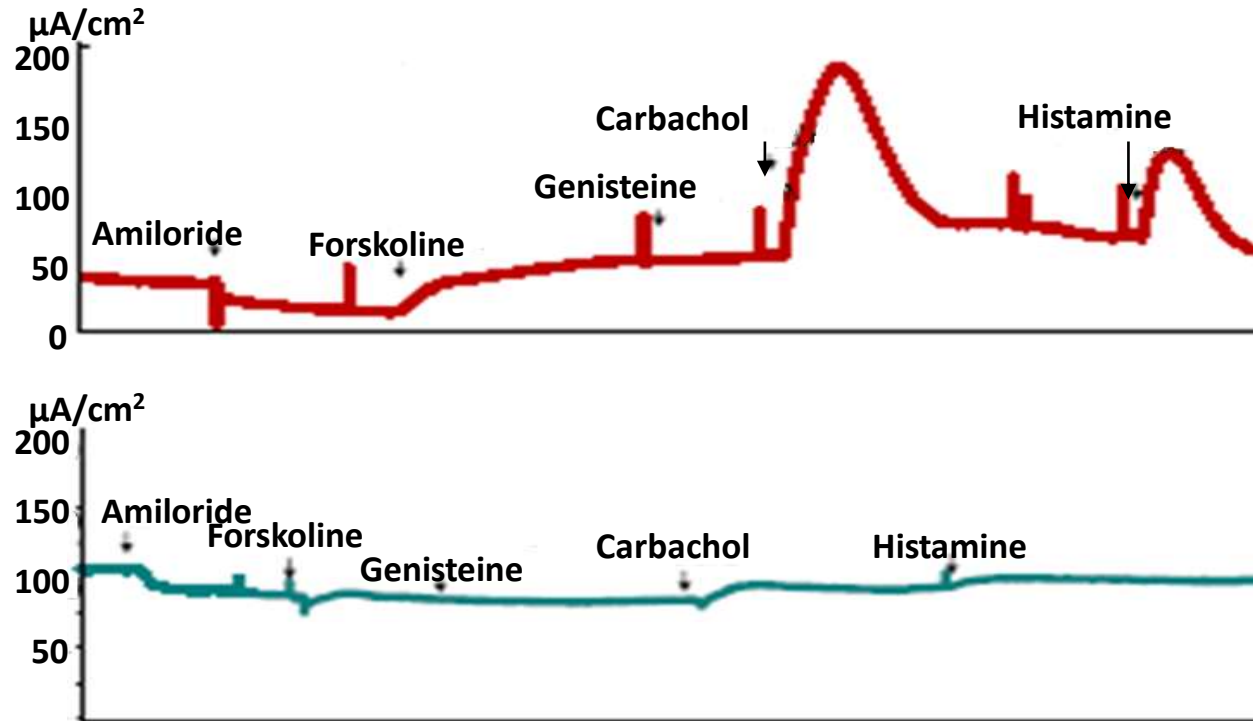
Δ Histamine (29 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$)

Atteint de MV

Δ Forskoline (10 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$)

Δ Carbachol (4 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$)

Δ Histamine (6 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$)



Forskoline : augmente AMPc intracellulaire (+ IBMX, inhibiteur non spécifique des Phosphodiésterases)

Génistéine : activateur de CFTR

Carbachol : agoniste cholinergique, active la sécrétion de Cl^- Ca^{2+} dépendante

Histamine : sécrétion globale de Cl^- *via* H1

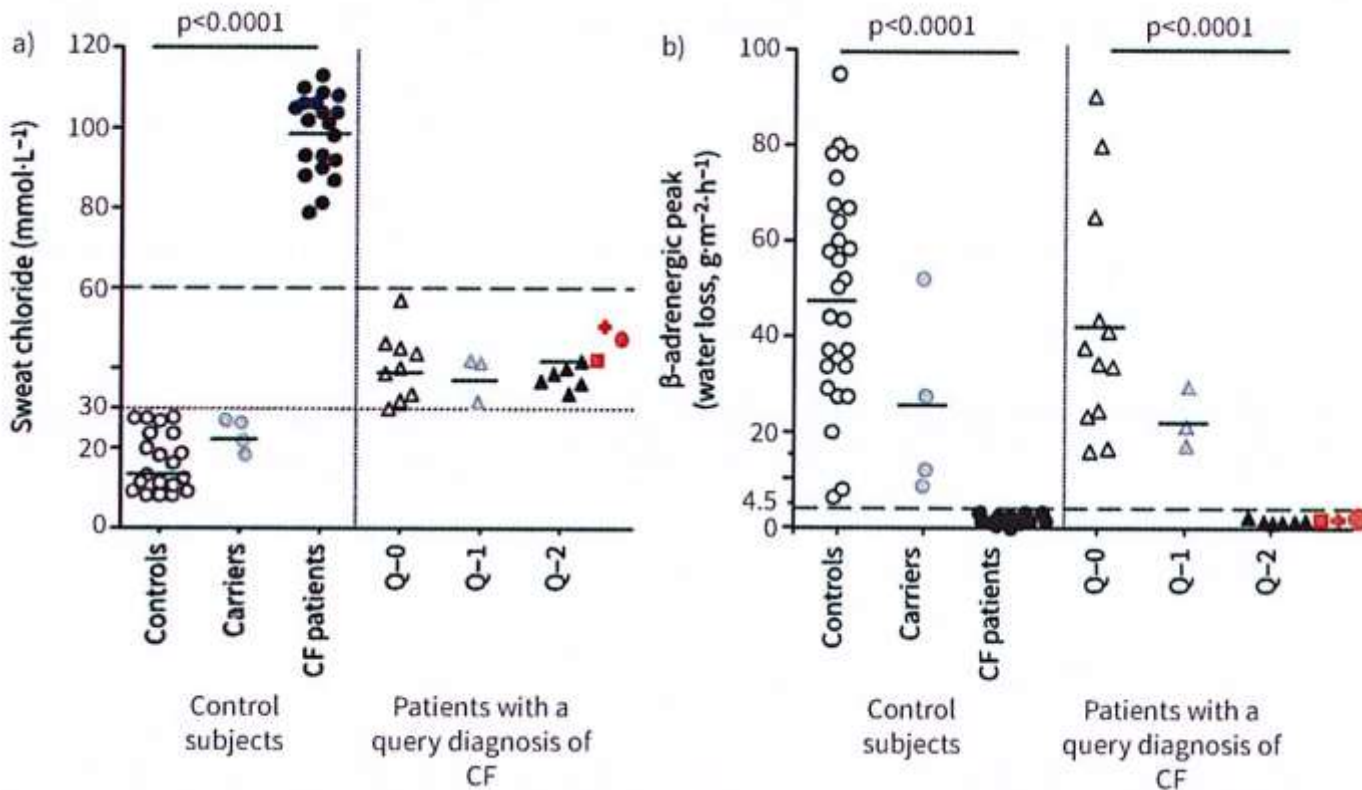


	avantages	inconvenients
Test de sécrétion de sueur β -adrénergique	Simple à réaliser Durant les 30 min de collection de sueur du TS Apprentissage rapide en 1-2 jours Faible coût VPP 100%	Administration des agents pharmacologiques par injections SCut (score de douleur ~1 à 3/10) Pas réalisé avant l'âge de 5 ans
DPN	Tissu identique à celui des voies respiratoires SOP : texte et vidéos Frottis nasal : cultures de cellules I ; biobanque	Coopération du patient (2x15 min) Qualité de l'épithélium nasal Matériels d'électrophysiologie coûteux Opérateur spécialisé, opérateur dépendant Grande variabilité intra-individuelle
CCC	Ne nécessite pas la coopération du patient pendant l'exploration SOP Utilisation d'agents pharmaco-logiques plus spécifiques de CFTR Préparation d'organoides : biobanque	Qualité et viabilité du tissu Matériels d'électrophysiologie coûteux Opérateur spécialisé



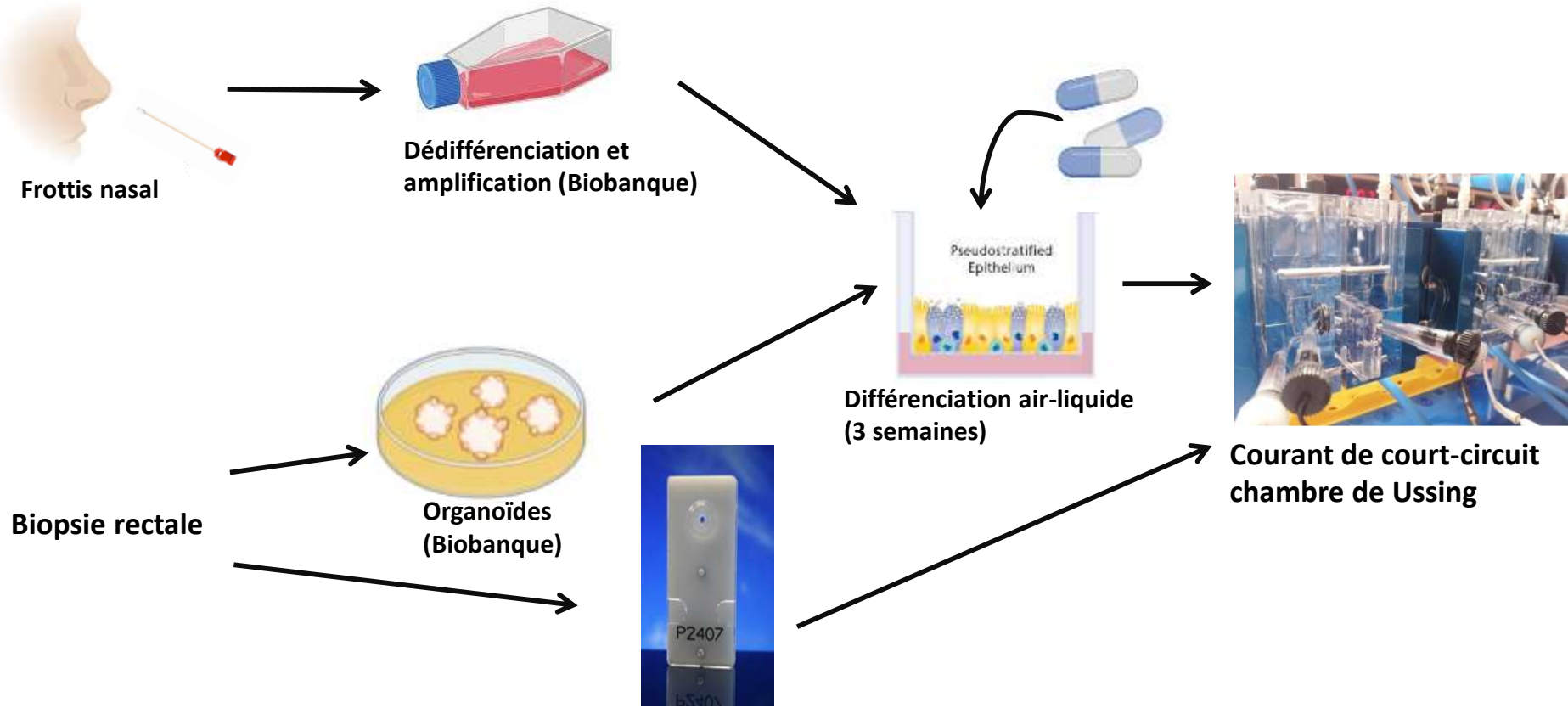
Préciser le diagnostic devant des formes frontières de MV

Nguyen-Khoa T *et al.* Eur Respir J 2022



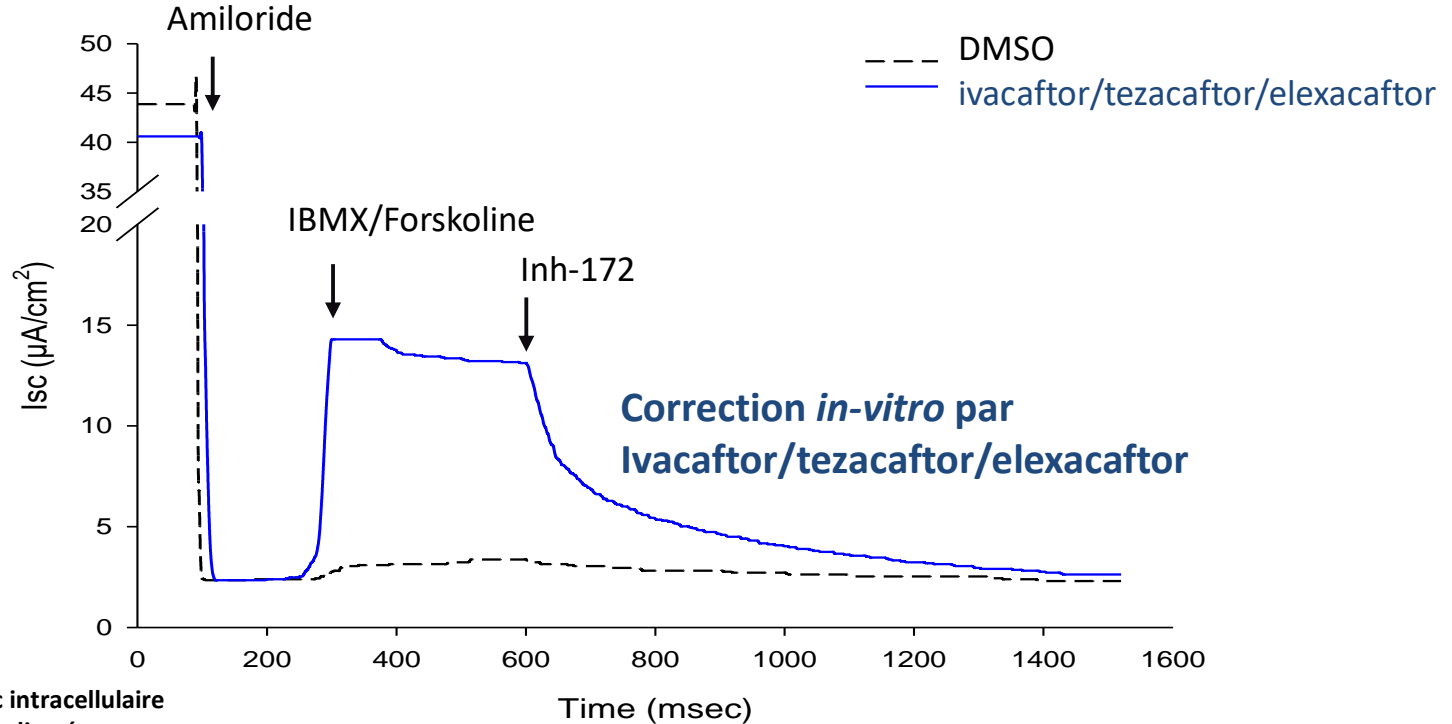


Evaluation de l'effet des traitements modulateurs de CFTR *in-vitro*





Courant de court-circuit : évaluation du traitement sur l'activité de CFTR *in-vitro*



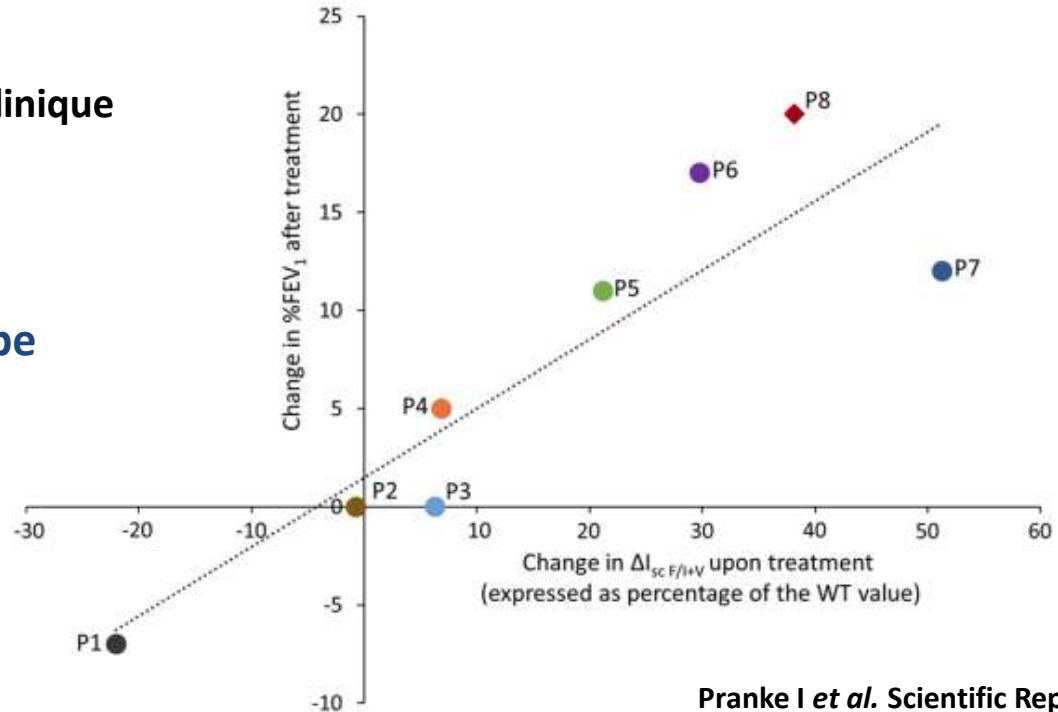
Forskoline : augmente l'AMPc intracellulaire
 IBMX : inhibiteur des Phosphodiésterases
 Inh-172 : inhibiteur de CFTR



Bonne corrélation entre les réponses
in vitro et *in vivo*.

Valeur prédictive de la réponse clinique

➔ Sélection du modulateur
par des tests *in vitro*
le mieux adapté au génotype





- **Bénéfice du Dépistage néonatal** de la MV
âge médian au diagnostic : 1,5 mois
- **Prise en charge symptomatique très précoce**
nutritionnelle et respiratoire.
- **Introduction précoce des thérapies protéiques adéquates**
pour les formes sévères de MV.
- **Evaluation de la fonction résiduelle de CFTR**
par les explorations fonctionnelles épithéliales afin
d'identifier les individus présentant une **forme à risque**
d'évoluer vers la forme classique de MV.
- **Introduction des traitements modulateurs les plus**
adaptés à la fonction résiduelle de CFTR.
- **Amélioration nette de la qualité de vie et de**
l'espérance de vie

Caractéristiques démographiques des patients MV Registre Français de la Mucoviscidose 2021

		2002 Avant DNN	2021 Après 20 ans de DNN
Malades vus dans l'année	N	4 111	7 418
Nouveaux cas dans l'année	N	215	144 (NN=91)
CF ≥ 18 ans	%	37	62 16% +40 ans
Taux de mortalité	‰	15,4	5,9



Centre de Référence Maladies Rares :
Mucoviscidose et affections liées à CFTR
Site Constitutif
Hôpital Necker-Enfants malades

Pr I Sermet-Gaudelus
Dr L Aoust
Dr F Chedevigne
Dr D Drummond
Dr S Kirilli
Dr M Mesbahi



PROGRAMME NATIONAL
DE DÉPISTAGE NÉONATAL



Biochimie Générale

Dr CH Cottart
Dr H Mammeri

Pharmacie Clinique

Dr J Schlatter
Dr C Cotteret
Dr A Schweitzer-Chaput

Hôpital Cochin

Génétique moléculaire

Dr E Girodon

Exploration Fonctionnelles

Pr I Fajac



U1151

Pr I Sermet-Gaudelus
Dr M Kelly-Aubert
A Hatton
E Dreano, PhD
I Pranke, PhD
A Hinzpeter, PhD
A Edelman, PhD

