



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



AVANCÉES GÉNÉTIQUES

- Le diagnostic revisité : de la génétique à la dysfonction de CFTR (*E. Girodon & I. Sermet, Paris*)
 - La base de données CFTR-France en accès public : quelles informations par rapport à CFTR2 ? (*C. Raynal, Montpellier*)
 - Diagnostic prénatal sur signes d'appel échographiques, une porte d'entrée mal connue (*MP. Audrézet, Brest*)
-



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



I - LE DIAGNOSTIC REVISITÉ : DE LA GÉNÉTIQUE À LA DYSFONCTION DE CFTR

Emmanuelle Girodon, Isabelle Sermet





LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

**3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE**

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



Critères de diagnostic de la **mucoviscidose**

SUPPLEMENT

www.jpeds.com • THE JOURNAL OF PEDIATRICS



Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation

Philip M. Farrell, MD, PhD¹, Terry B. White, PhD², Clement L. Ren, MD³, Sarah E. Hempstead, MS², Frank Accurso, MD⁴, Nico Derichs, MD⁵, Michelle Howenstine, MD³, Susanna A. McColley, MD⁶, Michael Rock, MD¹, Margaret Rosenfeld, MD, MPH⁷, Isabelle Sermet-Gaudelus, MD, PhD⁸, Kevin W. Southern, MBChB, PhD⁹, Bruce C. Marshall, MD², and Patrick R. Sosnay, MD¹⁰

une ou plusieurs caractéristiques phénotypiques
ou antécédent familial de mucoviscidose dans la fratrie
ou **trypsine immunoréactive augmentée (dépistage néonatal)**

et

test de la sueur positif
ou **2 variants identifiés responsables de mucoviscidose**
ou anomalies de la différence de potentiel transépithélial nasal ou du courant de court-circuit chlorure



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



Critères du diagnostic biologique

- Test de la sueur
 - Mutations / variants du gène *CFTR*
 - Différence de potentiel transépithélial nasal
 - Courant de court-circuit chlorure sur biopsie rectale
 - + Évaporimétrie
-



**TOUS SOLIDAIRES
POUR VAINCRE!**

LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

**3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE**

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



Critères de diagnostic des CFTR-RD



Journal of Cystic Fibrosis Volume 10 Suppl 2 (2011) S86-S102



Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders

C. Bombieri^a, M. Claustres^b, K. De Boeck^c, N. Derichs^d, J. Dodge^e, E. Girodon^f, I. Sermet^g, M. Schwarz^h, M. Tzetzisⁱ, M. Wilschanski^j, C. Bareil^b, D. Bilton^k, C. Castellani^l, H. Cuppens^m, G.R. Cuttingⁿ, P. Dřevínek^o, P. Farrell^p, J.S. Elborn^q, K. Jarvi^r, B. Kerem^s, E. Kerem^t, M. Knowles^u, M. Macek Jr^v, A. Munck^w, D. Radojkovic^x, M. Seia^y, D.N. Sheppard^z, K.W. Southern^{aa}, M. Stuhmann^{ab}, E. Tullis^{ac}, J. Zielenski^{ad}, P.F. Pignatti^a, C. Ferec^{ac,*}

CFTR-RD : entité clinique associée à dysfonction de CFTR qui ne répond pas aux critères de diagnostic de la mucoviscidose

SUPPLEMENT www.jpeds.com • THE JOURNAL OF PEDIATRICS



Diagnosis of Cystic Fibrosis in Nonscreened Populations

Patrick R. Sosnay, MD¹, Terry B. White, PhD², Philip M. Farrell, MD, PhD³, Clement L. Ren, MD⁴, Nico Derichs, MD⁵, Michelle S. Howenstine, MD⁴, Jerry A. Nick, MD⁶, and Kris De Boeck, MD⁷

Table I. 2015 CF Foundation diagnosis consensus conference recommendations for nonscreened populations*

| Statement numbers* | Consensus statements |
|--------------------|--|
| 26 | The diagnosis of CFTR-related disorder has been defined as a monosymptomatic clinical entity (CBAVD/pancreatitis/bronchiectasis) associated with CFTR dysfunction that does not fulfill the diagnostic criteria for CF. |



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



Formes au diagnostic incertain au dépistage néonatal



Archives de Pédiatrie

Volume 24, Issue 4, April 2017, Pages 401-414



Recommandations

Recommandations pour la prise en charge et le suivi des nourrissons pour lesquels un diagnostic de mucoviscidose n'a pu être conclu après dépistage néonatal

Management of infants whose diagnosis is inconclusive at neonatal screening for cystic fibrosis

I. Sermet-Gaudelus ^{a, a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z}, J. Brouard ^c, M.-P. Audrézet ^d, L. Couderc Kohen ^e, L. Weiss ^f, N. Wizla ^g, S. Vrielynck ^h, K. LLerena ⁱ, M. Le Bourgeois ^a, E. Deneuveille ^j, N. Remus ^k, T. Nguyen-Khoa ^a, C. Raynal ^l, M. Roussey ^m, E. Girodon ⁿ

Evolution : CF ? CFTR-RD ?

- | | |
|---|--|
| 1 | On considère comme ayant un diagnostic incertain de mucoviscidose tout nourrisson hypertrypsiniémique, présentant un chlorure sudoral entre 30 et 59 mmol/L et au plus une seule mutation du gène CFTR associée à la mucoviscidose (Tableau 4). |
| 2 | On considère comme ayant un diagnostic incertain de mucoviscidose tout nourrisson hypertrypsiniémique présentant un chlorure sudoral inférieur à 60 mmol/L et porteur de 2 mutations du gène CFTR, dont au moins une est de pathogénicité indéterminée¹ . |



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

**3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE**

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



Formes au diagnostic incertain au dépistage néonatal



Archives de Pédiatrie
Volume 24, Issue 4, April 2017, Pages 401-414



Tableau 2

Situations où le diagnostic de mucoviscidose ne peut être éliminé.

| Test de la sueur | Premier allèle | Deuxième allèle |
|------------------|--------------------------|--|
| 30–59 mmol/L Cl | Aucune mutation détectée | Mutation CF large spectre CFTR-RD IND Aucune mutation détectée |
| < 60 mmol/L Cl | Mutation IND | Mutation CF large spectre CFTR-RD IND |

Mutations CF : mutations associées à une forme classique de la maladie ; mutations IND : mutations de pathogénicité indéterminée ; mutations CFTR-RD : mutations reliée à CFTR.



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

**3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE**

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



Pathologie liée à CFTR (CFTR-RD)

Mucoviscidose

ABCD

Pancréatites

**Dilatations des bronches
et atteintes ORL**

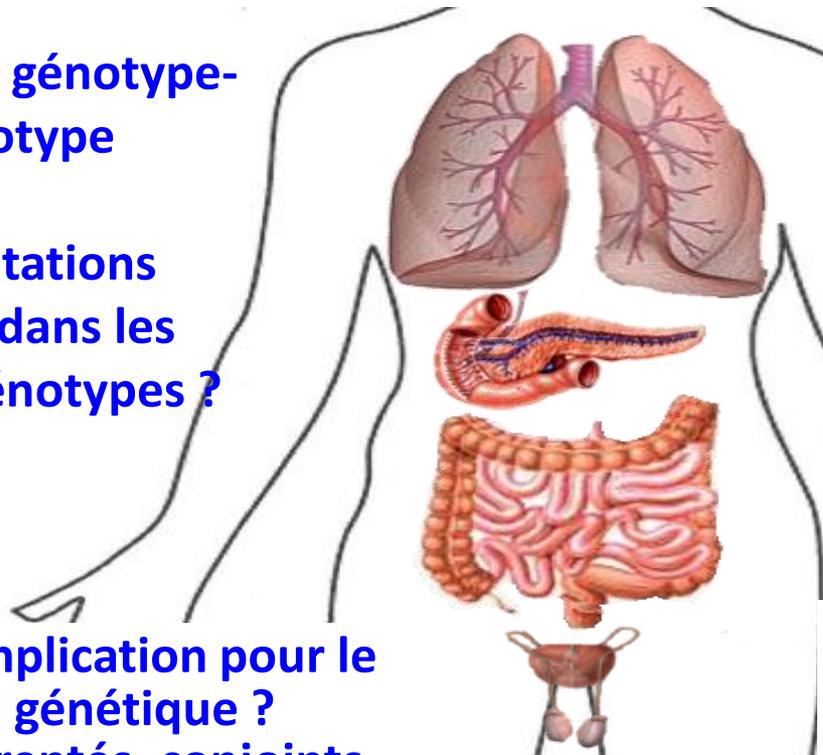
modérée / adulte

sévère

↑ Sévérité

➤ **Corrélation génotype-
phénotype**
=
quelles mutations
impliquées dans les
différents phénotypes ?

➤ **Quelle implication pour le
conseil génétique ?**
DPN, apparentés, conjoints



➤ **Etablir un diagnostic et
proposer un suivi adapté**

**Défi des formes au
diagnostic incertain au DNN**

➤ **Quel traitement
pharmacologique pour quelle
mutation ?**



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

vaincrelamuco.org

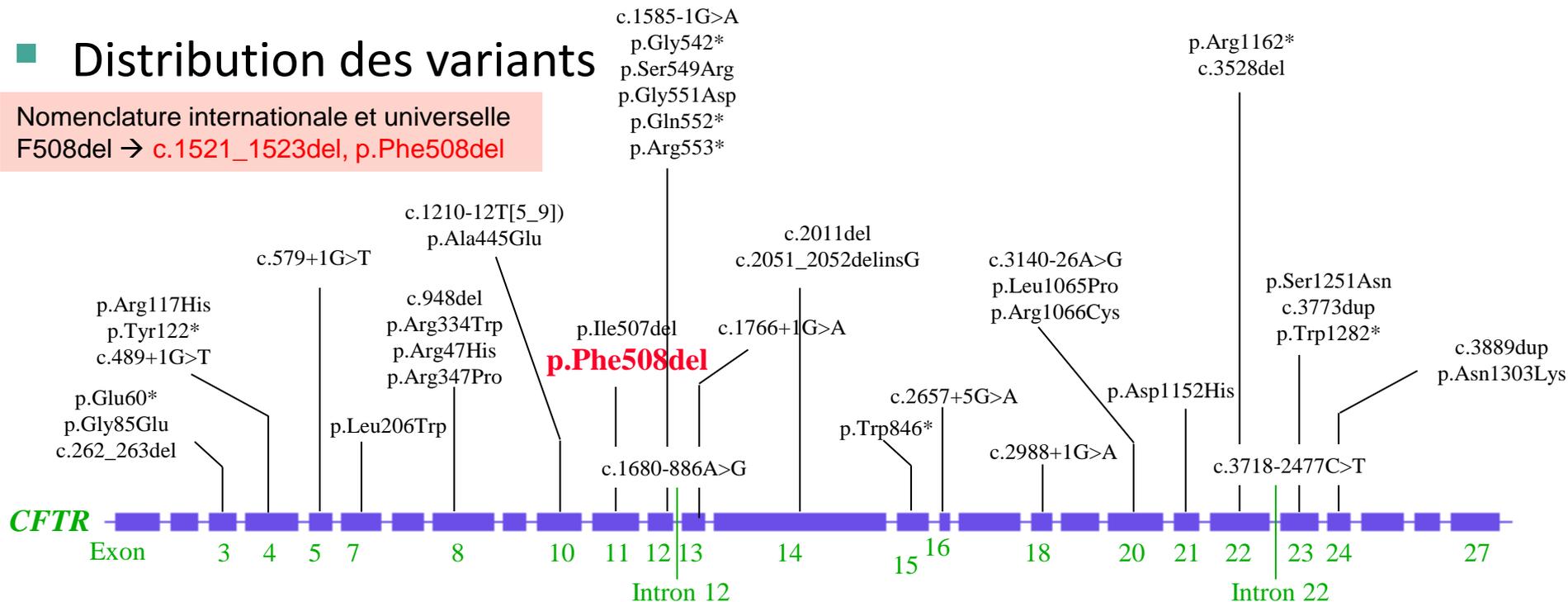
federation-crcm.org



Variants du gène *CFTR*

■ Distribution des variants

Nomenclature internationale et universelle
F508del → **c.1521_1523del, p.Phe508del**



- > **2000** variations de séquence (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)
- Tous types de variants ; variants **ponctuels ++** dont **faux-sens : 50%**
- 50 délétions / duplications de grande taille
- Distribution et fréquence variables selon les **origines géographiques / ethniques**



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

vaincrelamuco.org

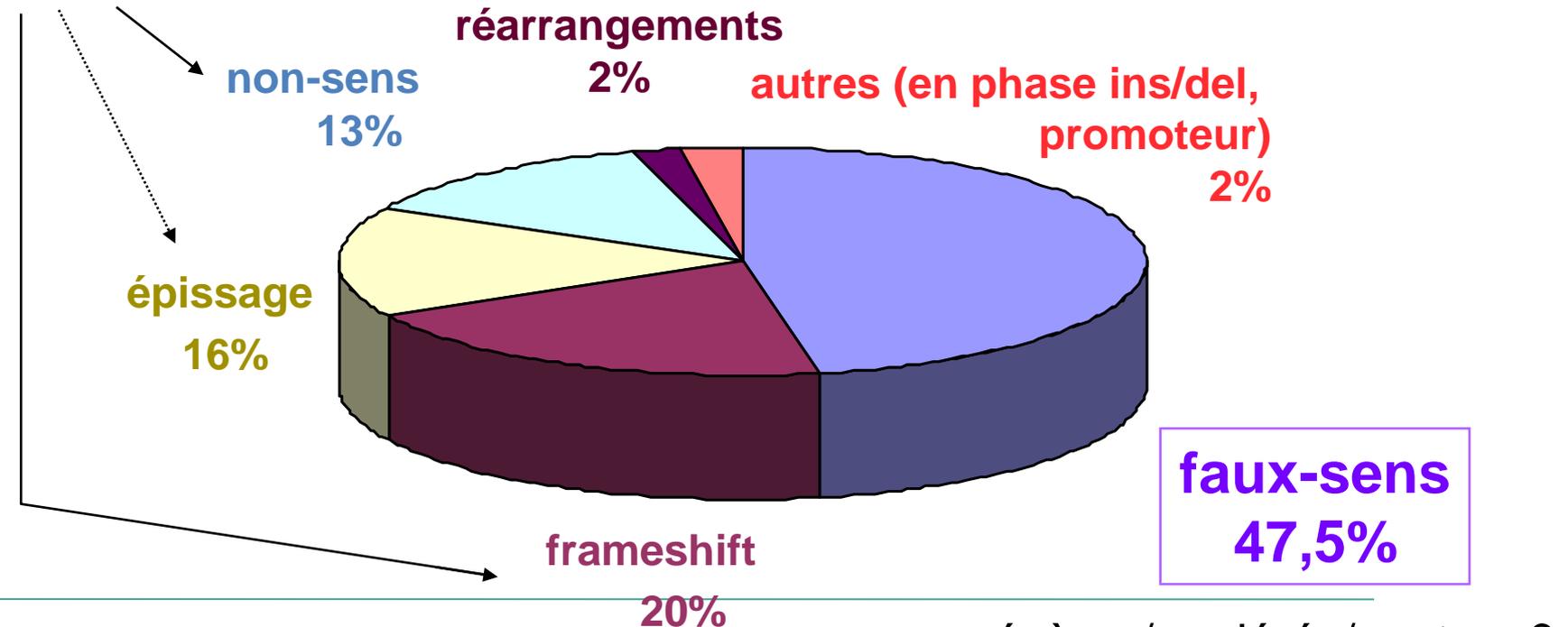
federation-crcm.org



Variants du gène *CFTR*

■ Types de variants

sévères



sévères/modérés/neutres ?



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

Classification phénotypique en trans d'un variant CF

Dequeker et al., 2009
Castellani et al., 2008

Phénotypes



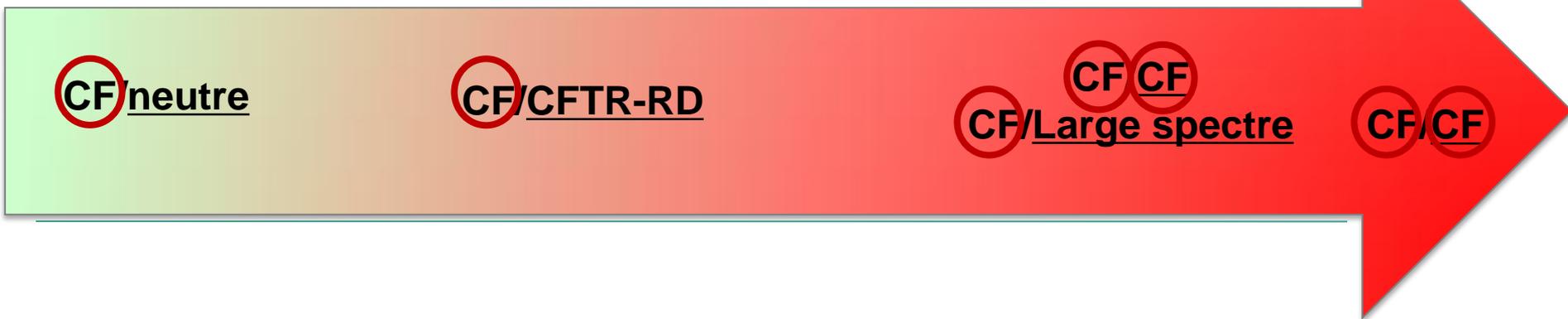
Variants



D Signification (clinique) inconnue

Variants rares

Génotypes





LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

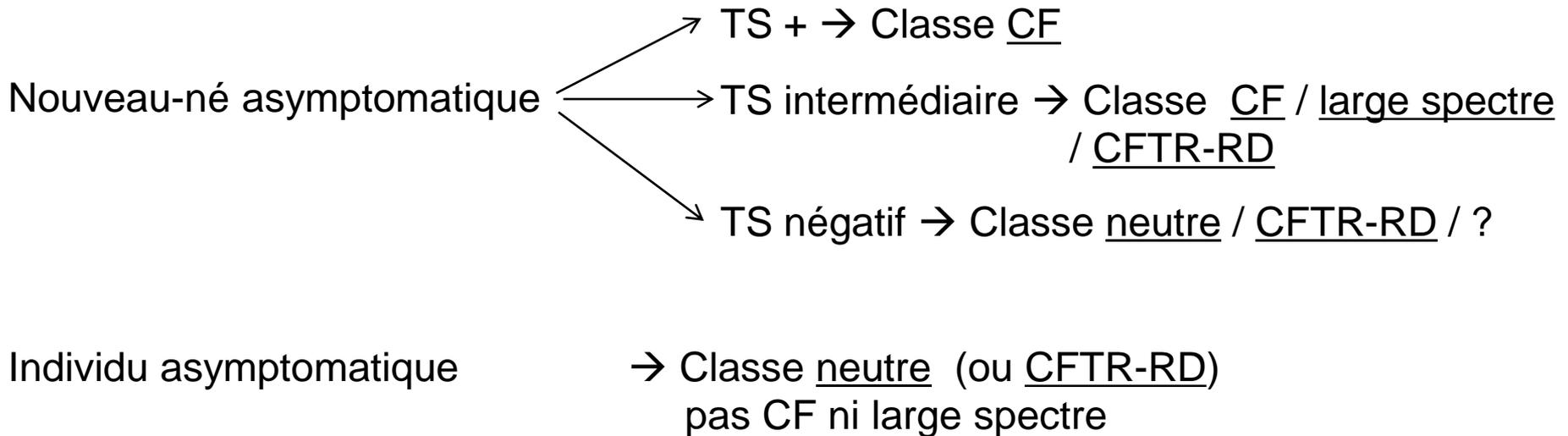
3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

Classification phénotypique en trans d'un variant CF

Dequeker et al., 2009

Castellani et al., 2008

Question : CF / D





LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

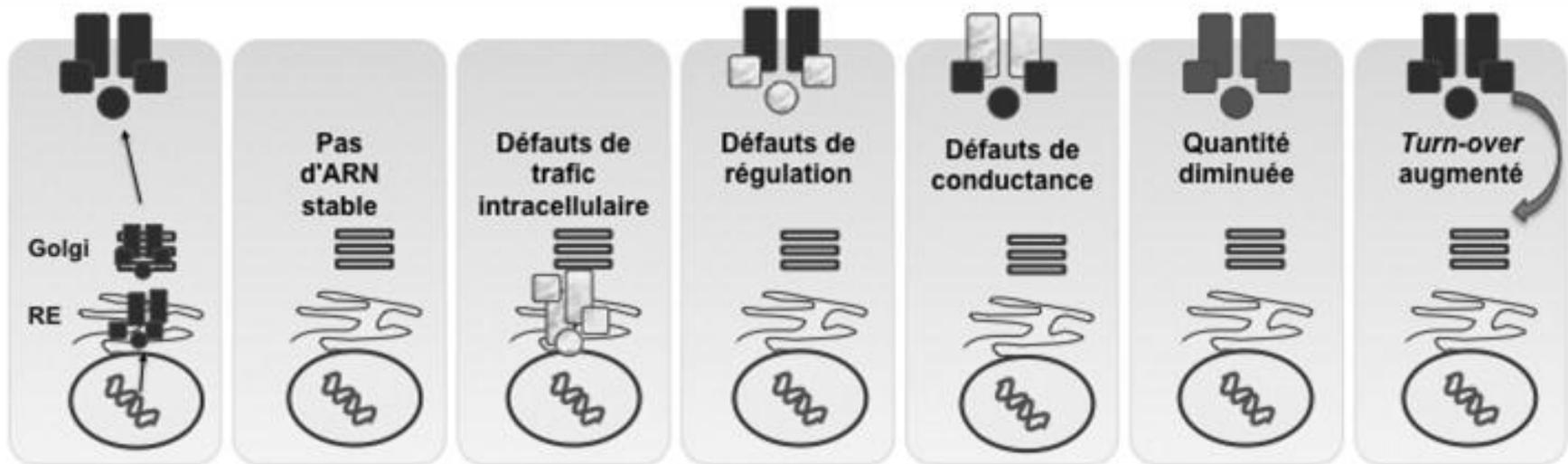
**3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE**

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



Classification fonctionnelle



Normal

Classe 1

Classe 2

Classe 3

Classe 4

Classe 5

Classe 6

W1282X
R553X
G542X

F508del
N1303K

G551D
G551S
G1349D

R117H
R334W
R347P

2789+5G→A
A455E

N287Y
4326delTC
4279insA

Pas de protéine CFTR
à la membrane apicale

Protéine CFTR
à la membrane apicale,
mais défectueuse

Peu de protéine CFTR
à la membrane apicale



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

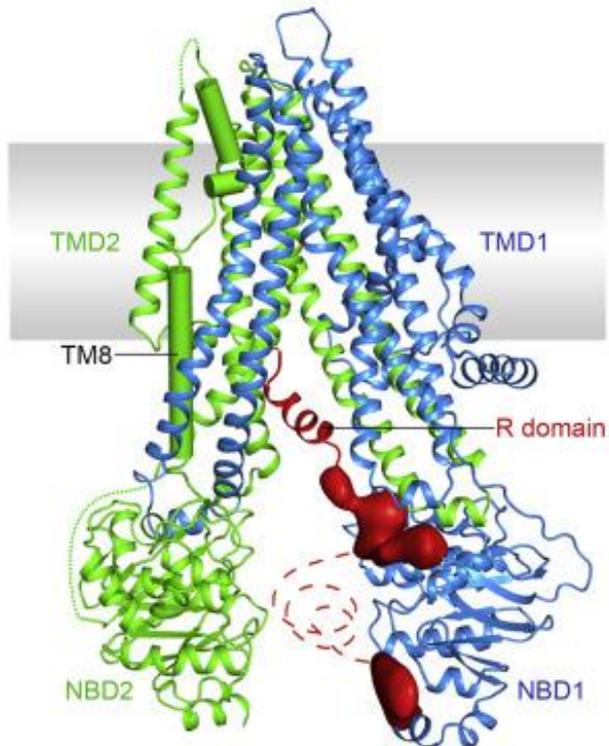
3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org

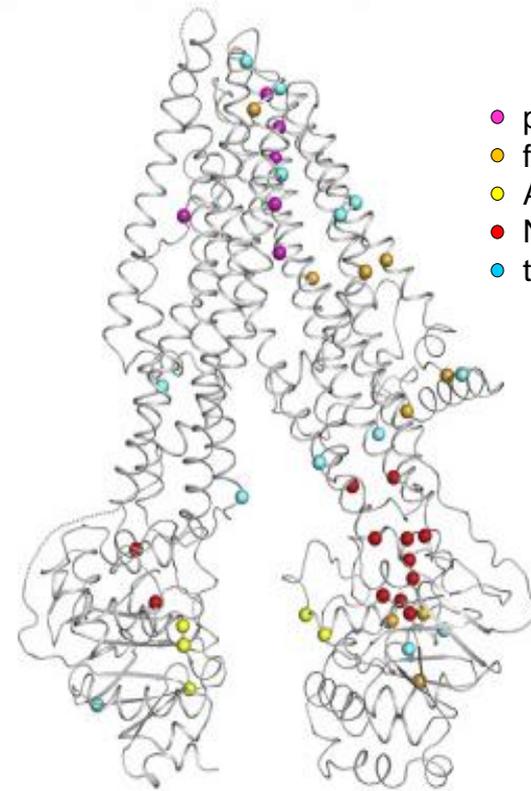


Classification fonctionnelle



Human CFTR

Liu, Cell 2017

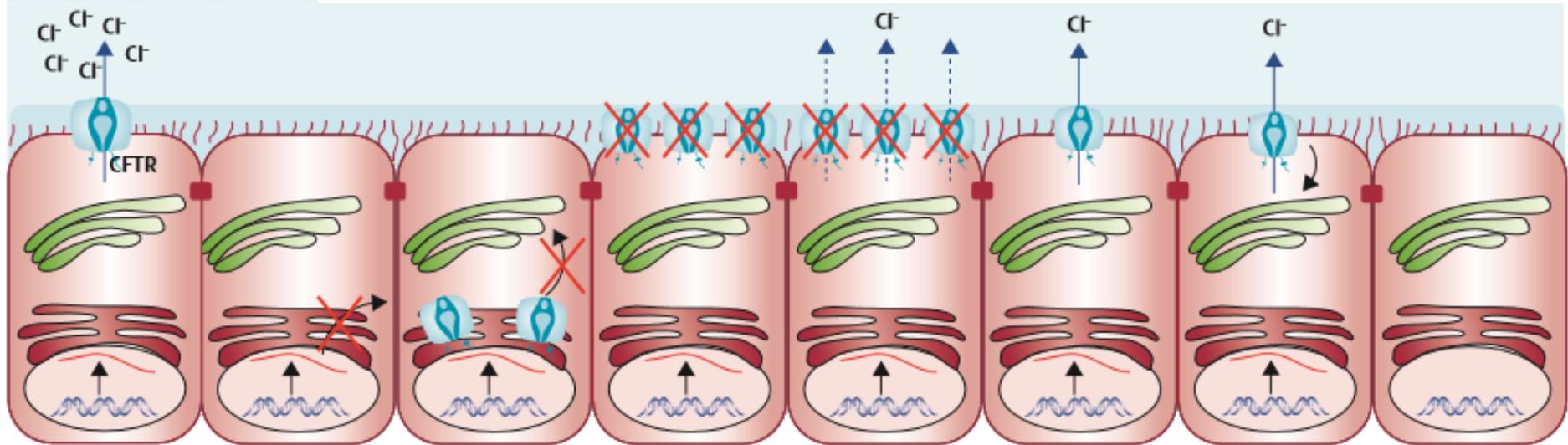


- pore construction
- folding
- ATPase site
- NBD/TMD interface
- to be determined

Zebrafish CFTR

Zhang, Cell 2017

Classification fonctionnelle axée thérapie



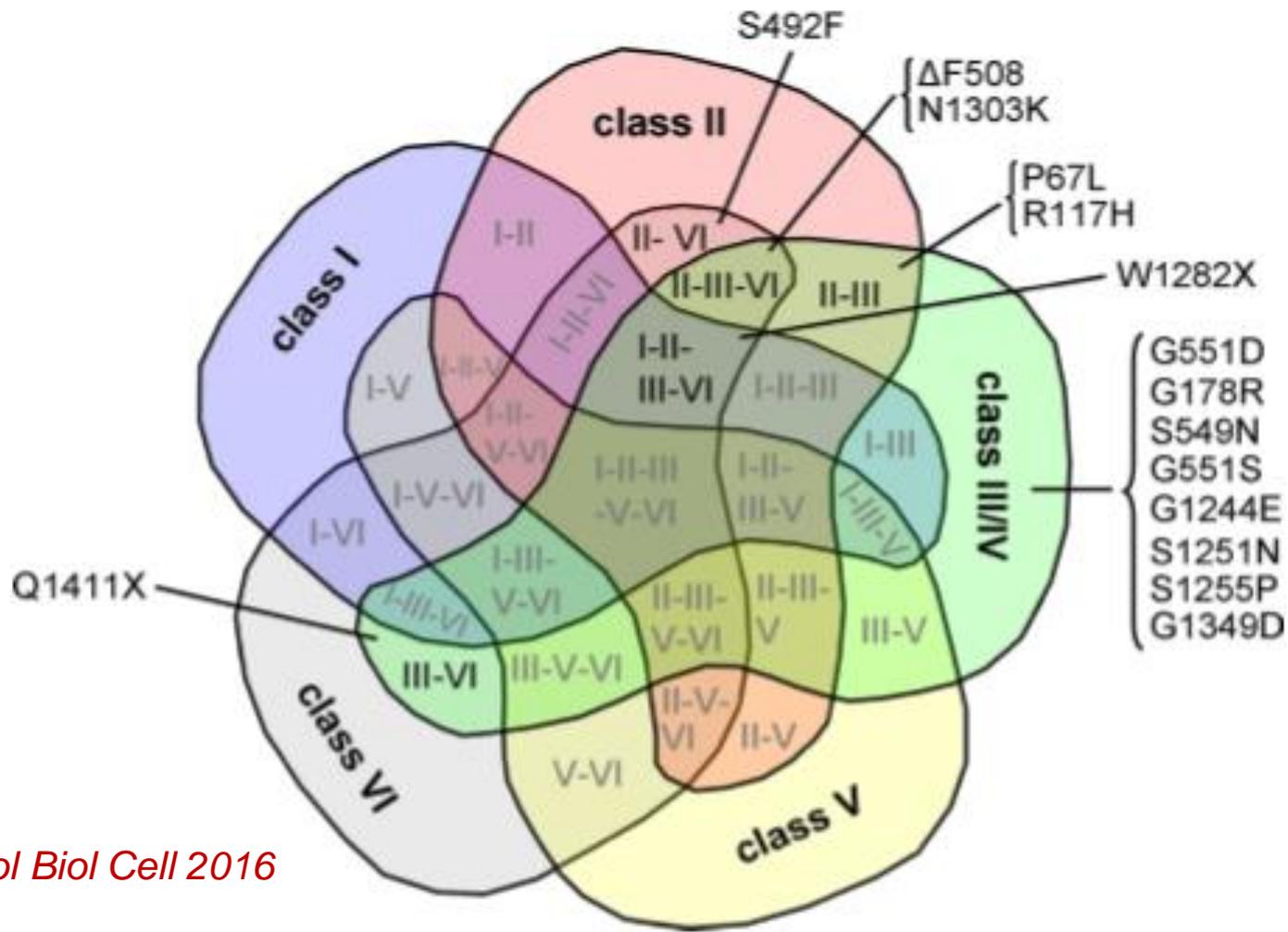
Wild-type CFTR

| | Class I | Class II | Class III | Class IV | Class V | Class VI | Class VII |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--|-------------------------|---------------------------|
| CFTR defect | No protein | No traffic | Impaired gating | Decreased conductance | Less protein | Less stable | No mRNA |
| Mutation examples | Gly542X, Trp1282X | Phe508del, Asn1303Lys, Ala561Glu | Gly551Asp, Ser549Arg, Gly1349Asp | Arg117His, Arg334Trp, Ala455Glu | Ala455Glu, 3272-26A→G, 3849+10 kg C→T | c. 120del23, rPhe508del | dele2,3(21 kb), 1717-1G→A |
| Corrective therapy | Rescue synthesis | Rescue traffic | Restore channel activity | Restore channel activity | Correct splicing | Promote stability | Unrescuable |
| Drug (approved) | Read-through compounds (no) | Correctors (yes) | Potentiators (yes) | Potentiators (no) | Antisense oligonucleotides, correctors, potentiators? (no) | Stabilisers (no) | Bypass therapies (no) |



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

**3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE**

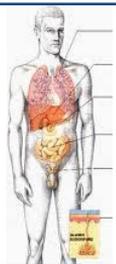


Veit et al. Mol Biol Cell 2016

FIGURE 2: Refined classification of CF mutations accounting for complex phenotypes of major CFTR cellular defects. The Venn diagram indicates all combinations of mutation classes with selected examples. Possible combinations without identified mutation are indicated in gray.

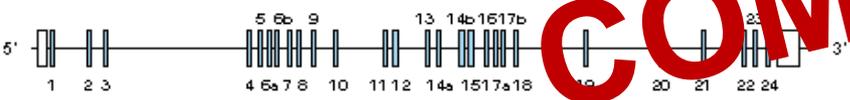
Evaluation du caractère pathogène des variants

Patients



- Observations cliniques
- Bases de données

Gène

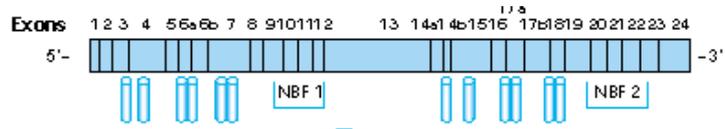


COMPLEXE!

- Mutations

- Nature des variants
- Données épidémiologiques

ARN messenger

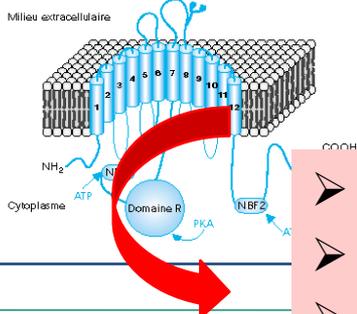


- Mutations

- *In vivo* : ARNm cellules nasales
- *In silico* : outils bioinformatiques
- *In vitro* : mini-gènes



Protéine



Ex vivo : tests électrophysiologiques, organoïdes

- *In silico* : outils bioinformatiques

In vitro : tests fonctionnels

- Mutation CF certaine / possible **A**
- Mutation CFTR-RD **B**
- Mutation (très probablement) non CF **C**
- Mutation de signification incertaine **D**



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

Reclassification d'un variant

■ Allèles complexes

- 25 entrées dans CFTR-France
- F508del : **21** allèles complexes (Vecchio-Pagan, Hum Genome Var 2016; Hinzpeter, Hum Mutat 2017; **11** dans CFTR-France)
- Attention au variant T5 !!!
- → nouveaux outils de détection

■ Evolution clinique

■ Observations cliniques

- Ex : D836Y, R31C, G622D
- Répertoire: CF + CFTR-RD + **individus asymptomatiques +++**

■ Données épidémiologiques (BD épidémio auparavant inexistantes) :

- R117H
- variants rares fréquent dans certaines populations

■ Explorations/études fonctionnelles

- Effet sur l'épissage → implication thérapeutique

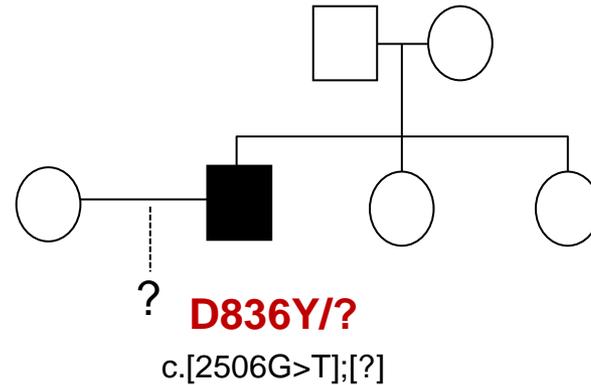


LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

Reclassification d'un variant

- Infertilité par AUCD
- Pas d'autre signe évocateur de mucoviscidose
- Demande de PMA



- **2012** : mutation rare, 1 patient CF → mutation classée CF (A)
 - **2015** : Conseil génétique chez les 2 sœurs → porteuses
Bilan refait sur la mutation (GenMucoFrance) :
 - Quelques observations CFTR-RD, souvent sans autre mutation identifiée
 - Quelques conjoints de patients ou de porteurs sains
 - **1 mère d'enfant CF hétérozygote composite pour D836Y et une grande délétion**
- **mutation reclassée non CF**, au maximum CFTR-RD (B)

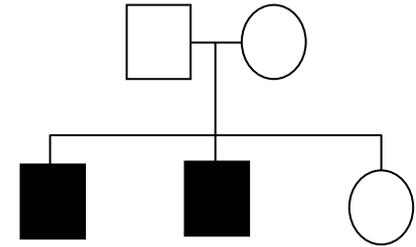


LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE

Diagnostic incertain

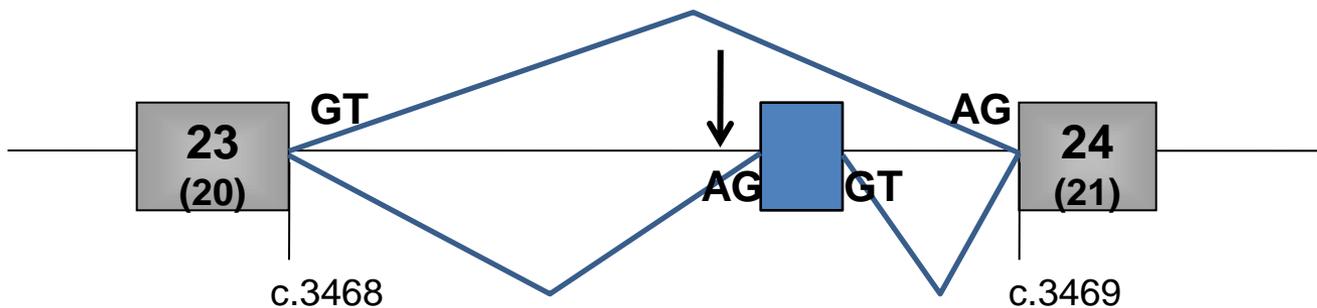
- Dépistage néonatal +
- Asthme du nourrisson
- TS discordants (un à 77 mEq/L)
- Etude approfondie : 1 mutation rare de signification incertaine



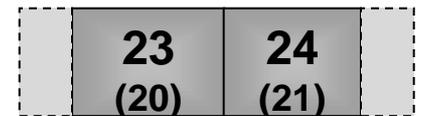
R600G/?

c.[1798G>A];[?]

- **2017** : Etude du gène complet chez des patients CF
→ identification de nouveaux variants



c.3469-4522A>G



↑ Codon stop

- Explorations fonctionnelles complémentaires
- Test de ce variant en diagnostic de routine



LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

**3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES
DE LA MUCOVISCIDOSE**

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



Perspectives

Analyses d'exome ou de génome

CFTR = gène « actionnable »

→ Découvertes incidentes

→ Diagnostic préconceptionnel des porteurs

Risque de surinterprétation ou de mauvaise interprétation

Ex : c.3154T>G, **F1052V**

- **ClinVar : pathogène**
- **CFTR2 : conséquences variables (CF ou pas 33 patients, 24% IP)**
- **CFTR-France : variant CFTR-RD**

- **Varsome : signification incertaine**
- **Alamut : résultats contrastés**
- **Cysma : en faveur d'un effet pathogène**

Patients carrying this variant:

| | |
|------------------------------------|---|
| TOTAL NUMBER OF PATIENTS | 7 |
| Asymptomatic compound heterozygote | 3 |
| CFTR-RD | 2 <ul style="list-style-type: none"> • CBAVD 1 • Pancreatitis 1 |
| Pending | 1 |
| Pending (NBS) | 1 |

Diagnostic de Mucoviscidose

Symptômes caractéristiques

Histoire familiale

Dépistage positif

ET

Cl⁻ sudoral ≥ 60 mmol/L OR

Identification d'une mutation pathogène sur chaque allèle

Défaut de cette définition

- Variabilité de l'atteinte
- Génotypes associés avec un test de la sueur intermédiaire (30–60 mmol/L)
- ~ 300 mutations analysées dans CFTR2 et plus de 2000 identifiées

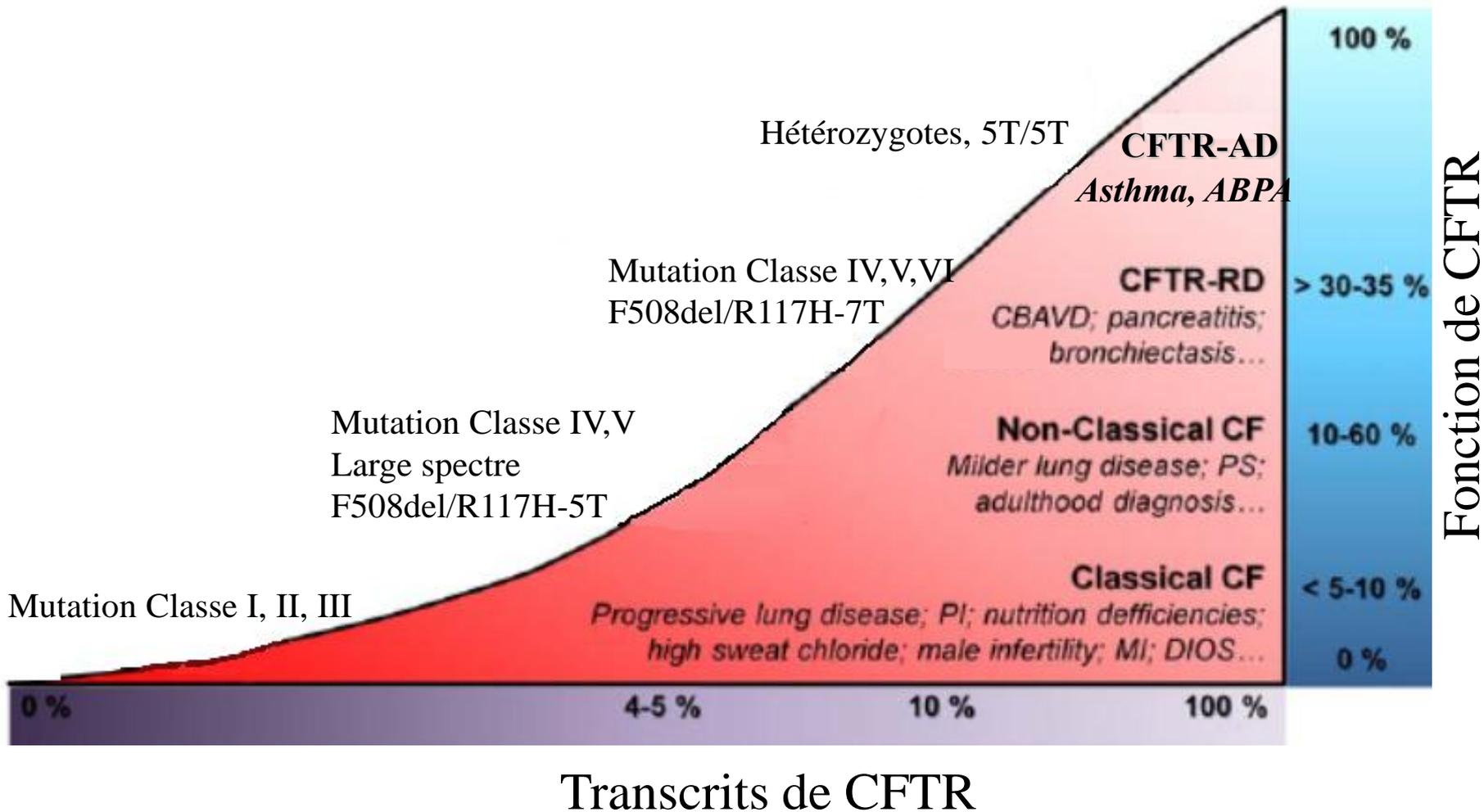
Biomarqueurs diagnostiques pour les cas non conclus

Cl^- sudoral < 60 mmol/L

Et

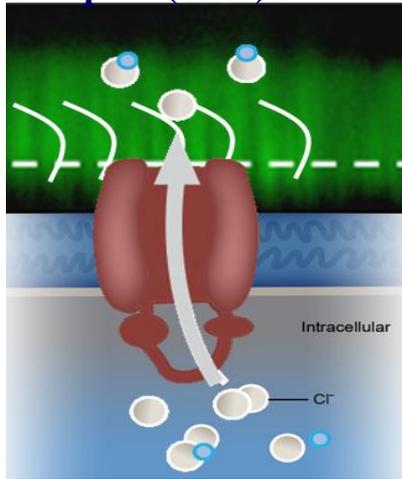
Absence de 2 mutations pathogènes

Le spectre diagnostique de la mucoviscidose

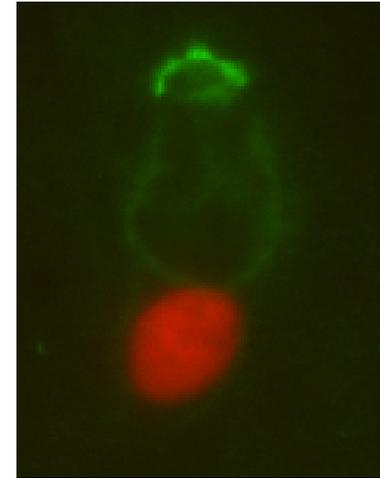


(dys)function épithéliale CFTR

CFTR est un canal anionique (Cl^-) channel

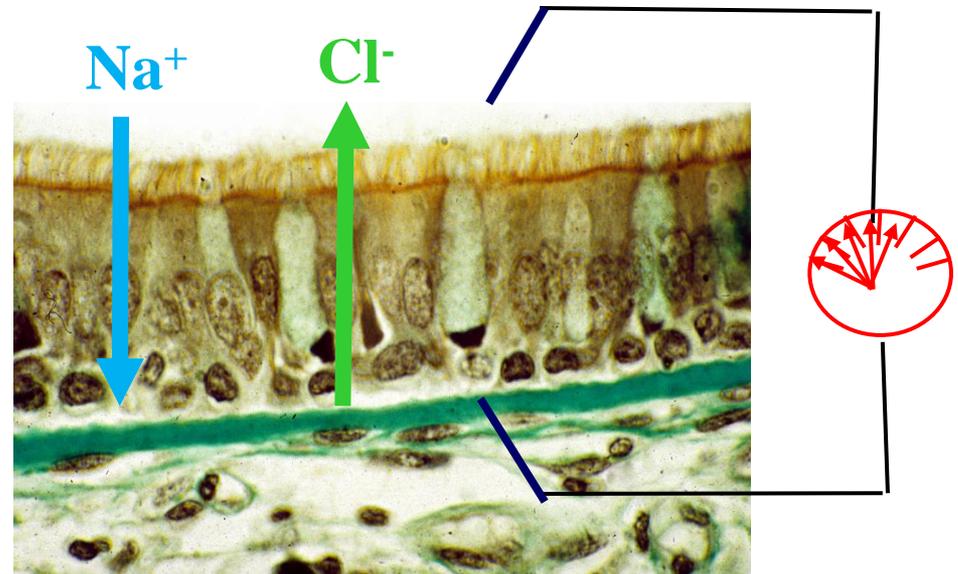


Localisé à la membrane apicale



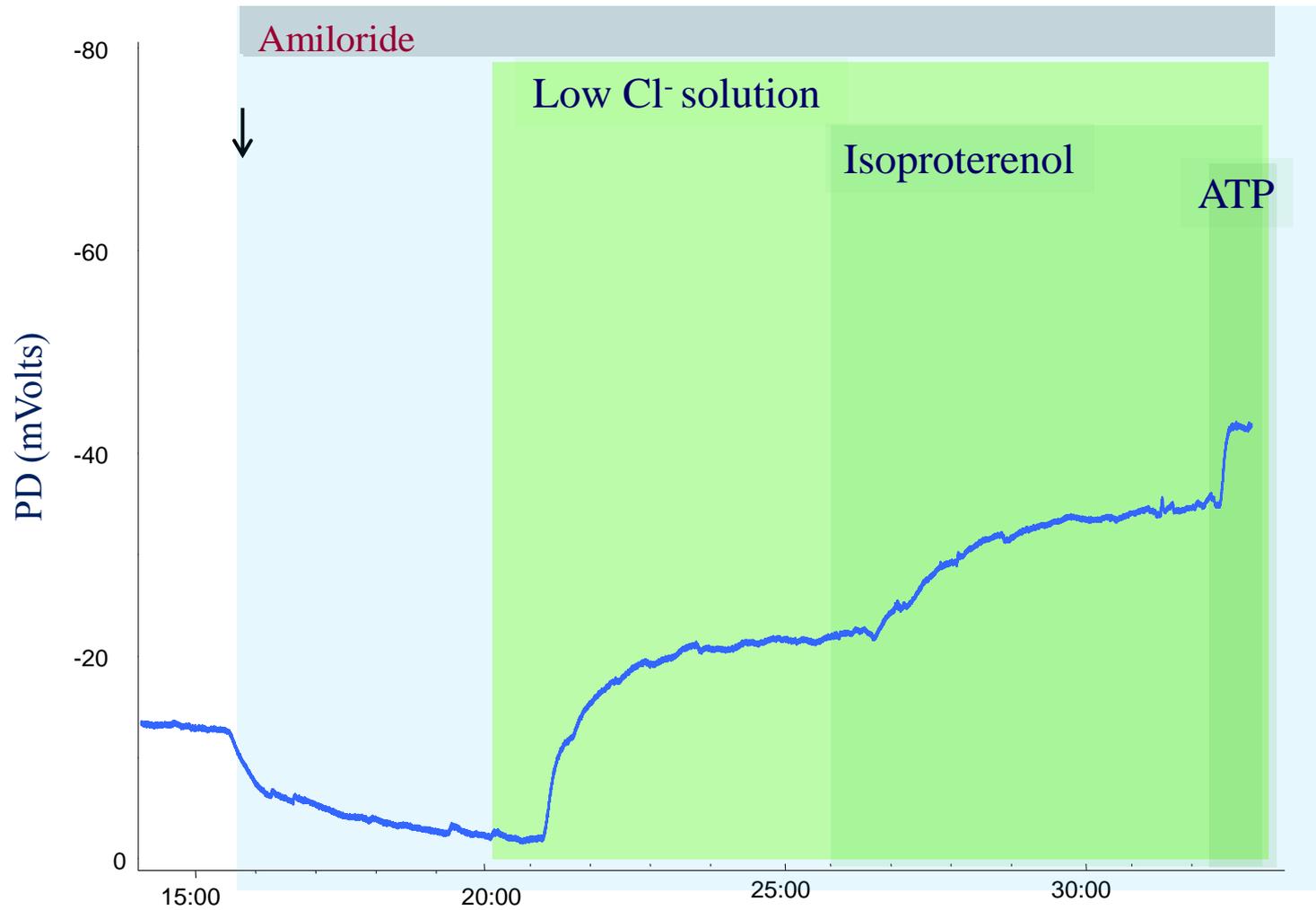
Différence de transport transépithéliale

Etude pharmacodynamique



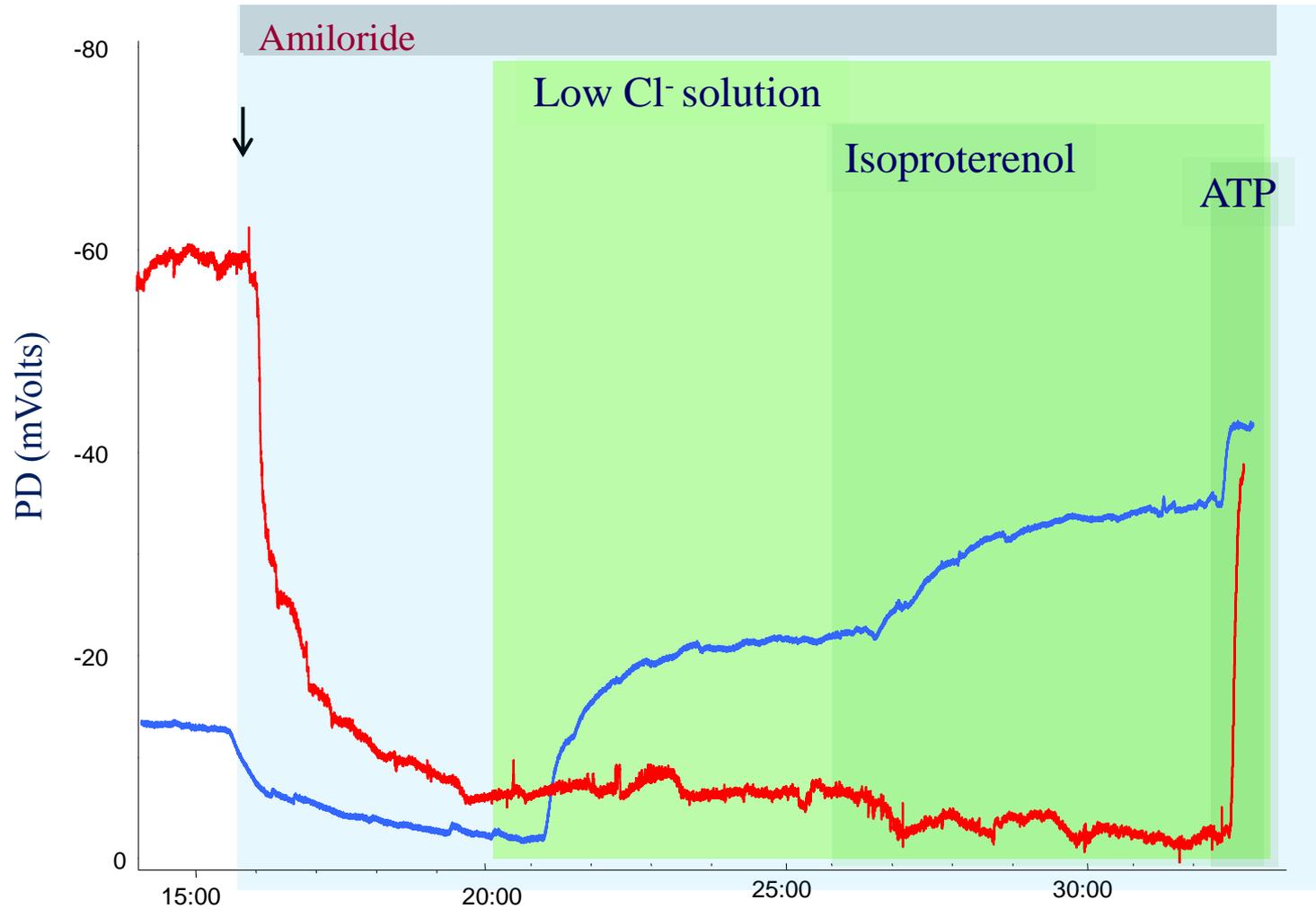
ENaC/CFTR

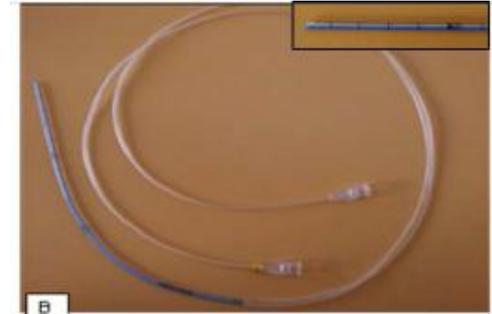
Non-CF subject



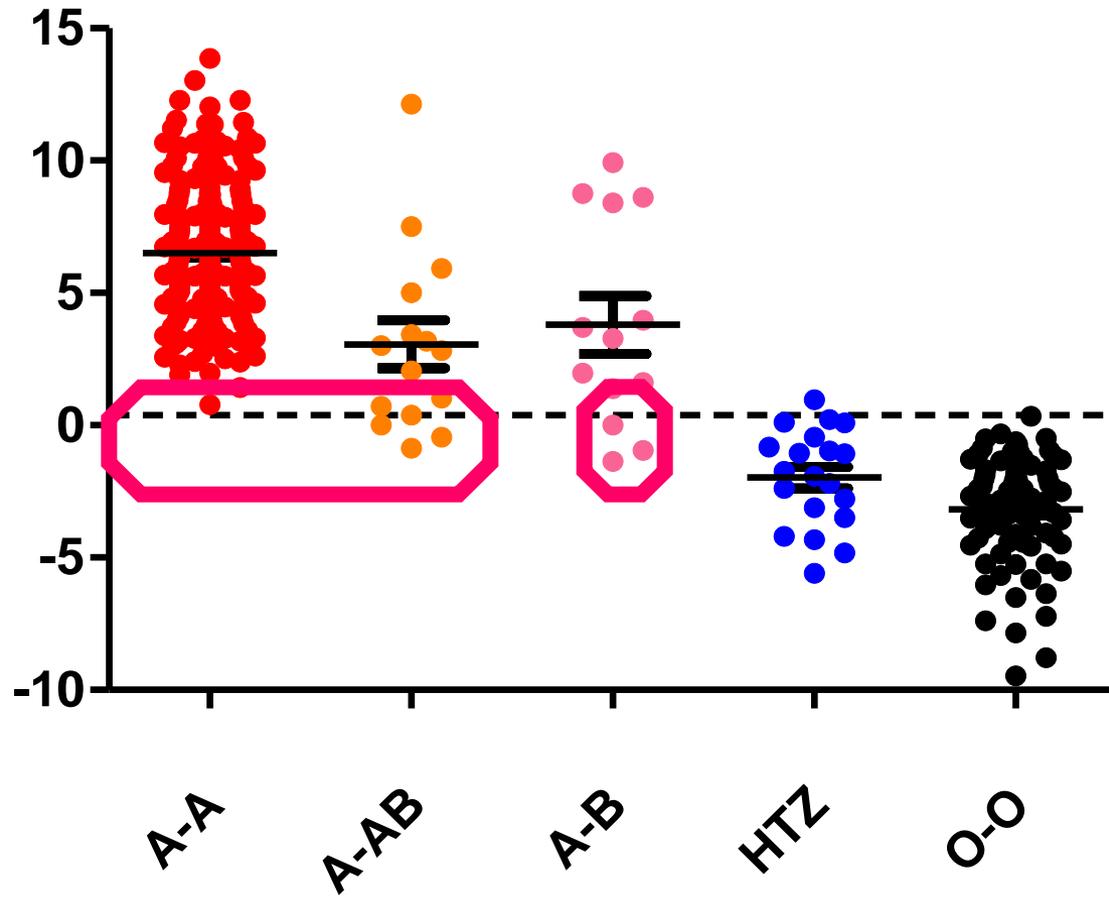
Sujet sain

Sujet malade



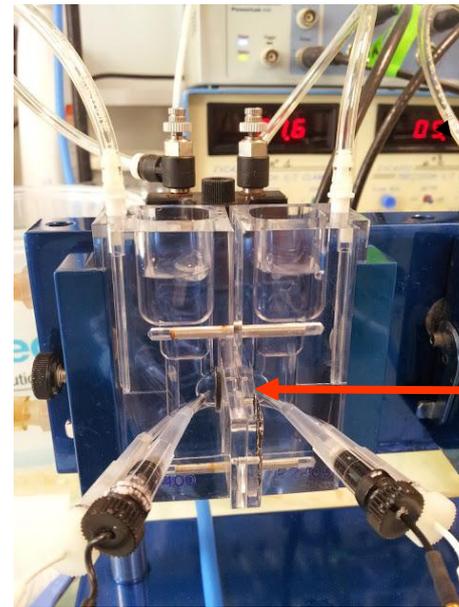
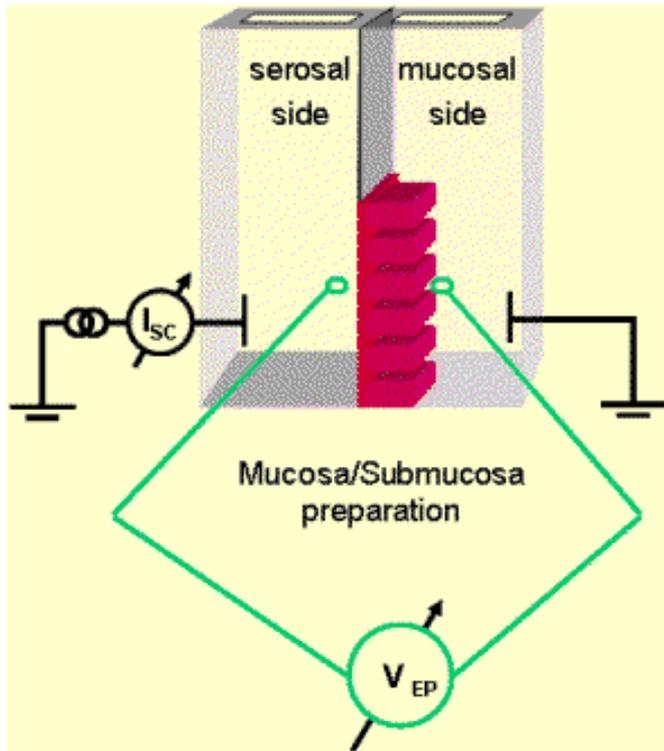


NPD score

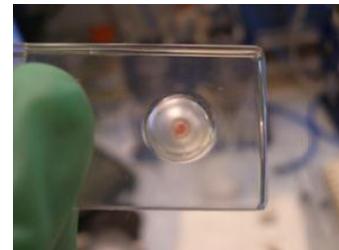


Courant de court circuit intestinal

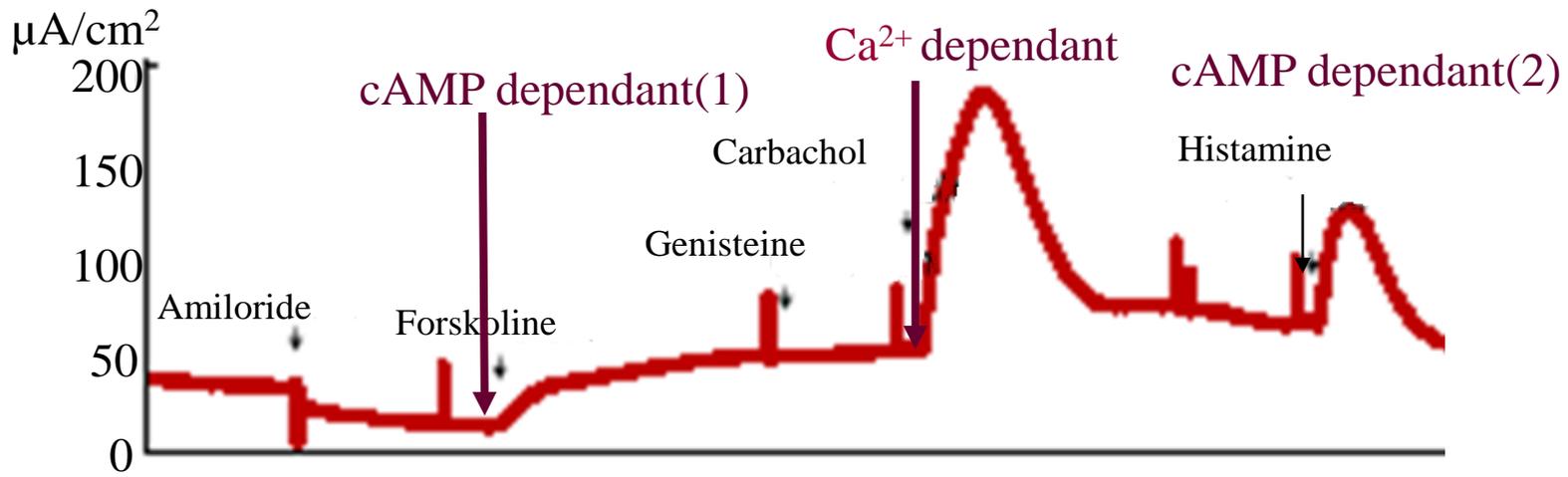
Tissu natif, dans un organe non infecté
Pas de coopération, indolore, sans danger



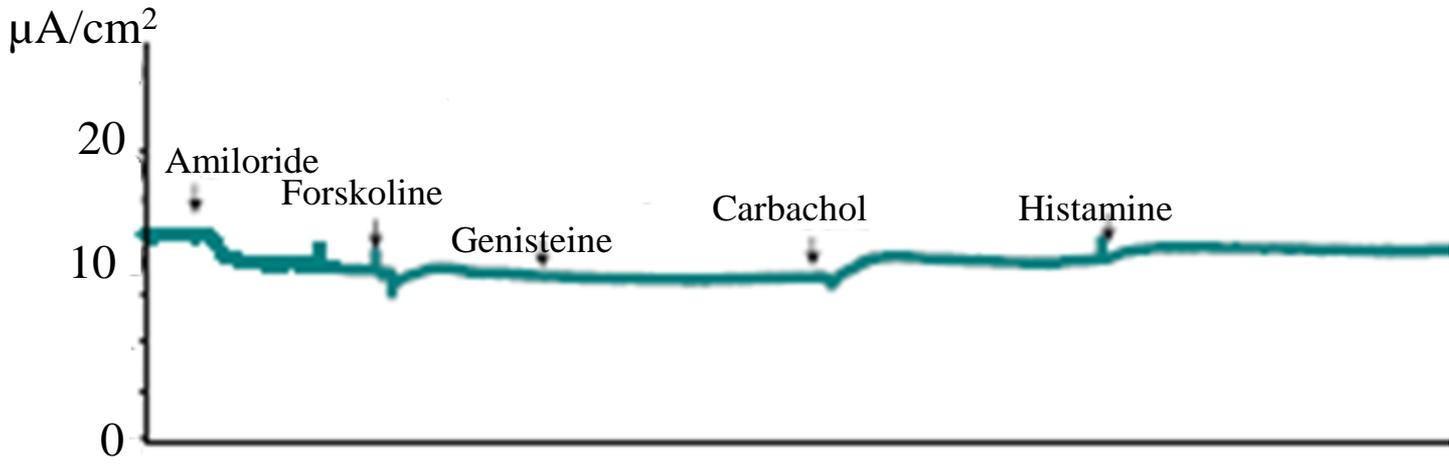
Epithélium



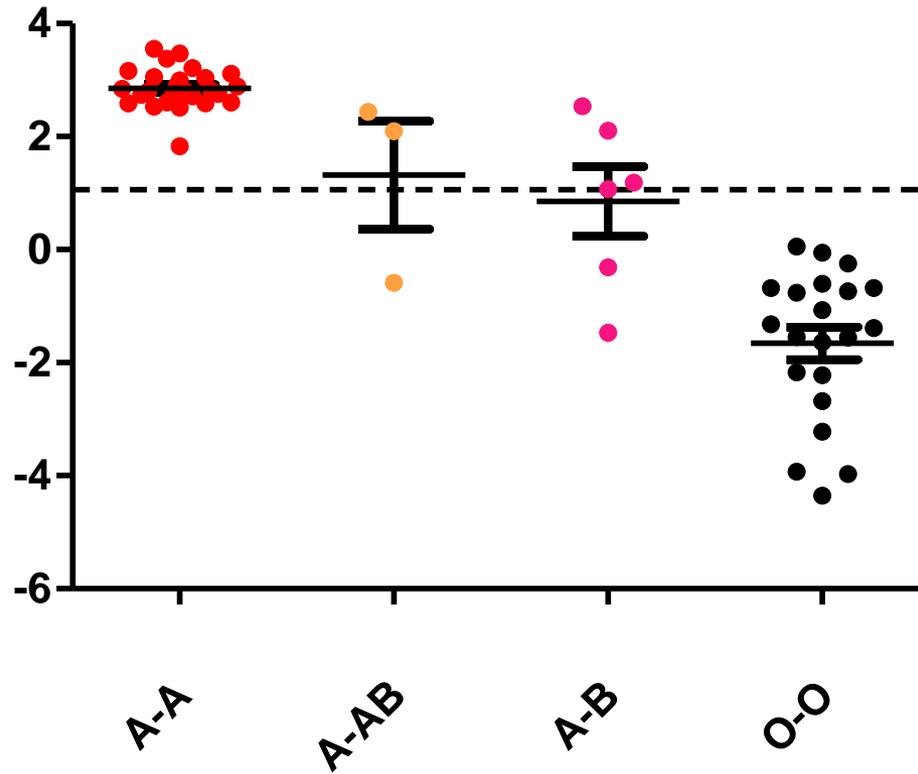
Sujet sain



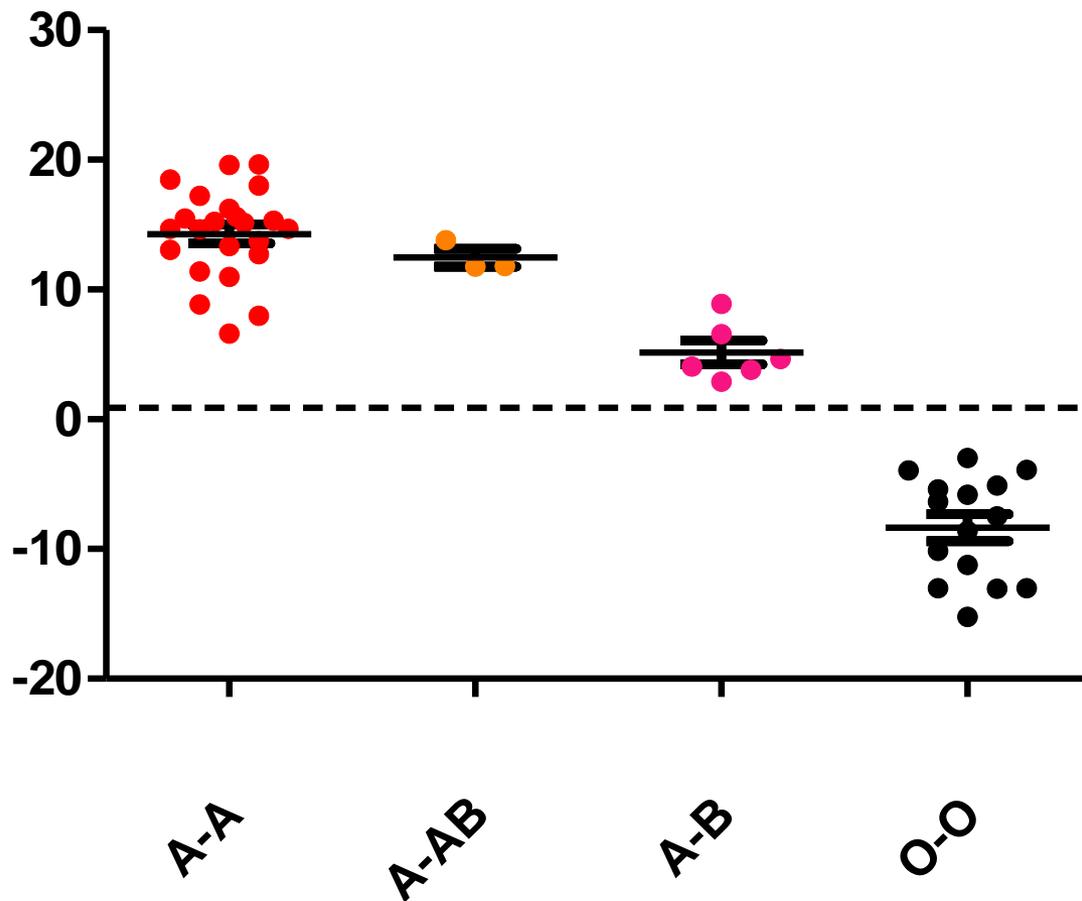
Mucoviscidose



ICM score



Combined score

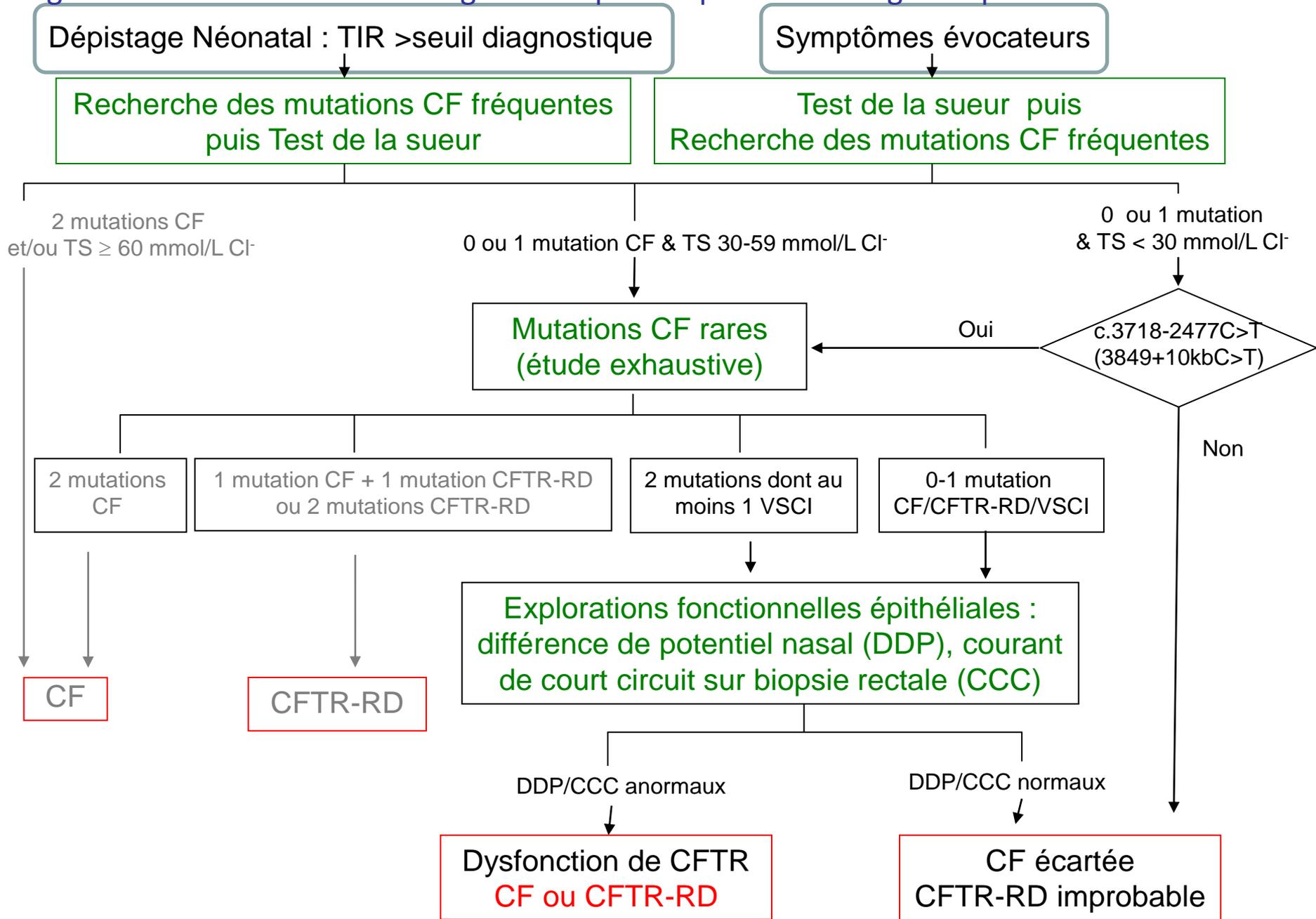


Cut-off CF: ≥ 0.90

se 100%; sp 100%

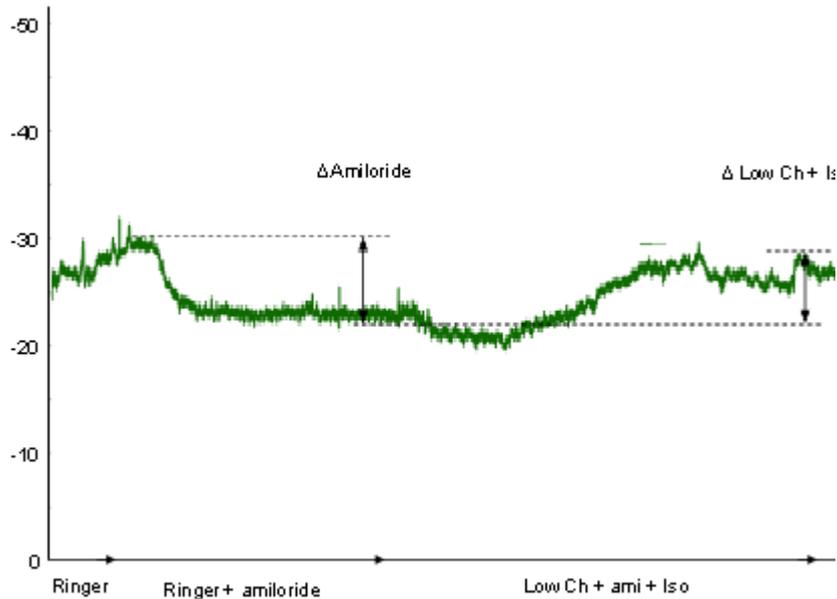
SFM /groupe de travail dépistage, formes difficiles

Programme National de Soins : Algorithme pour explorations diagnostiques des cas non conclus

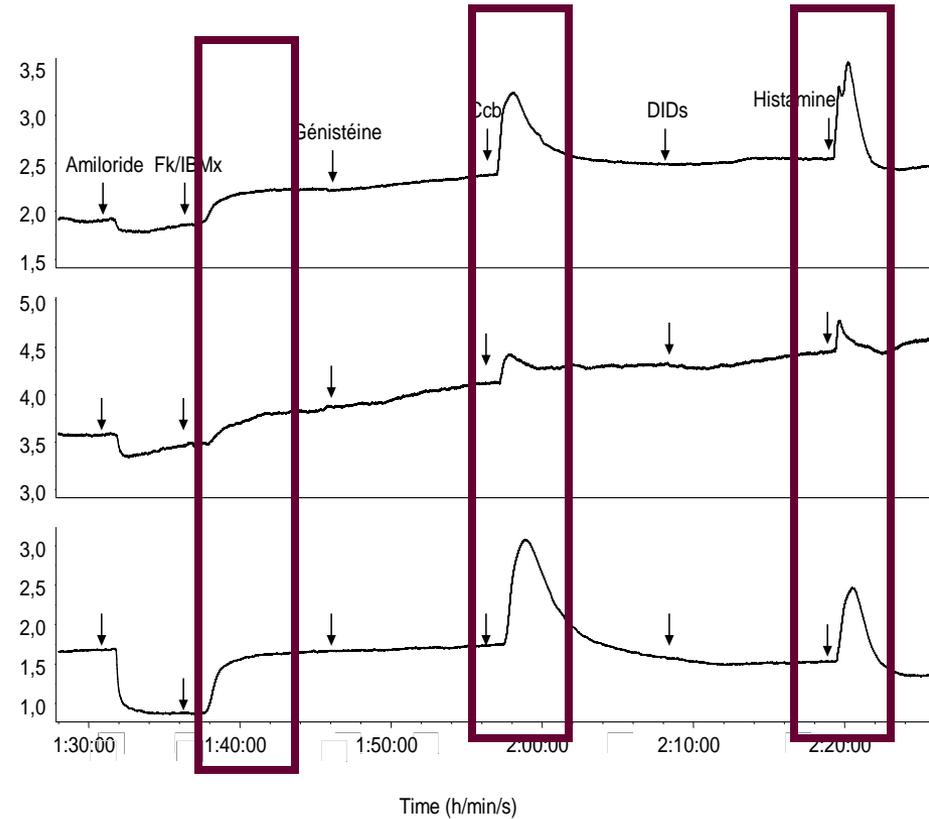


(1) Eliminer le diagnostic de MV

DPN « Intermediaire »



ICM Normal

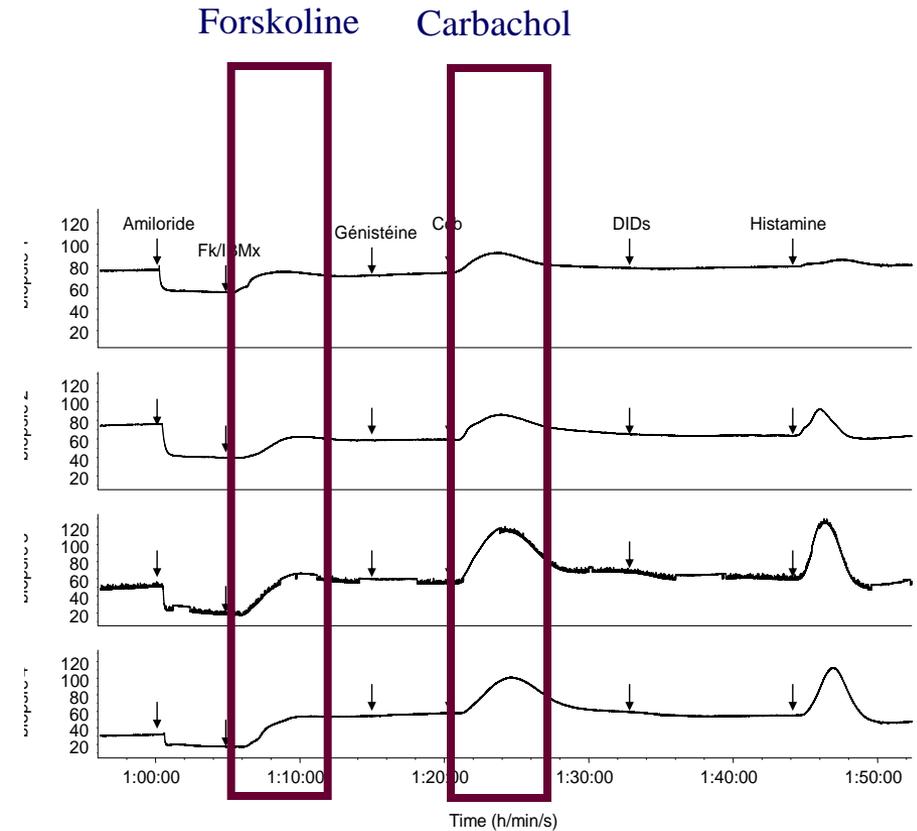
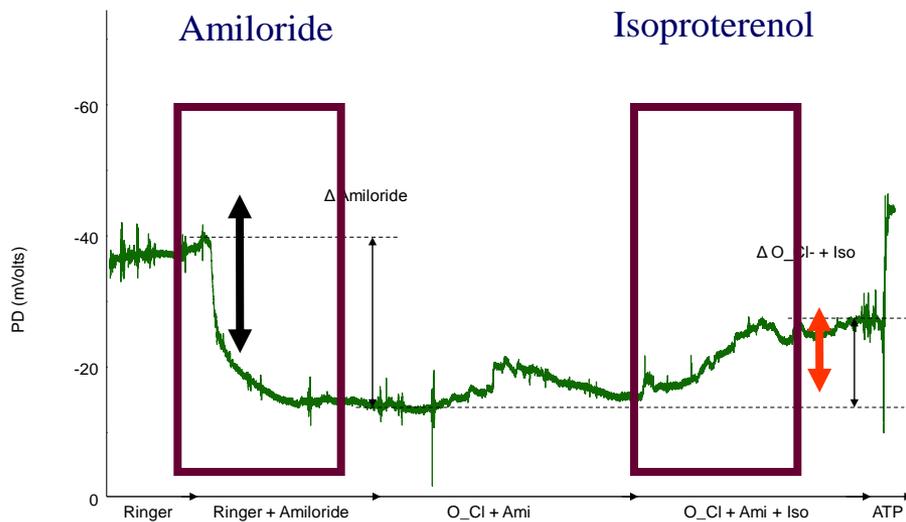


0 mutations

Sweat test: 36, 38, 40 mM/L

Suivi: IPEX syndrom !

(2) Caractériser des mutants inconnus

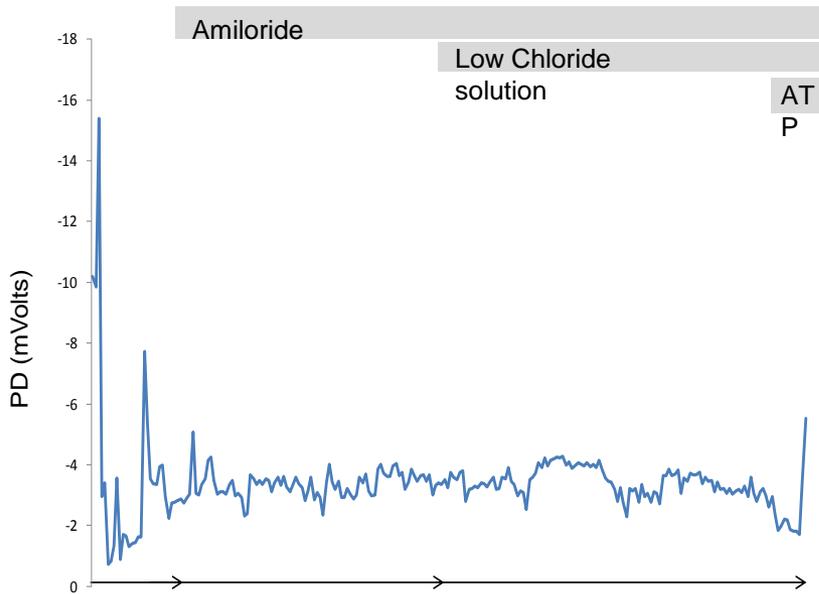


F508del/F1099L
TS Normal, Polypose

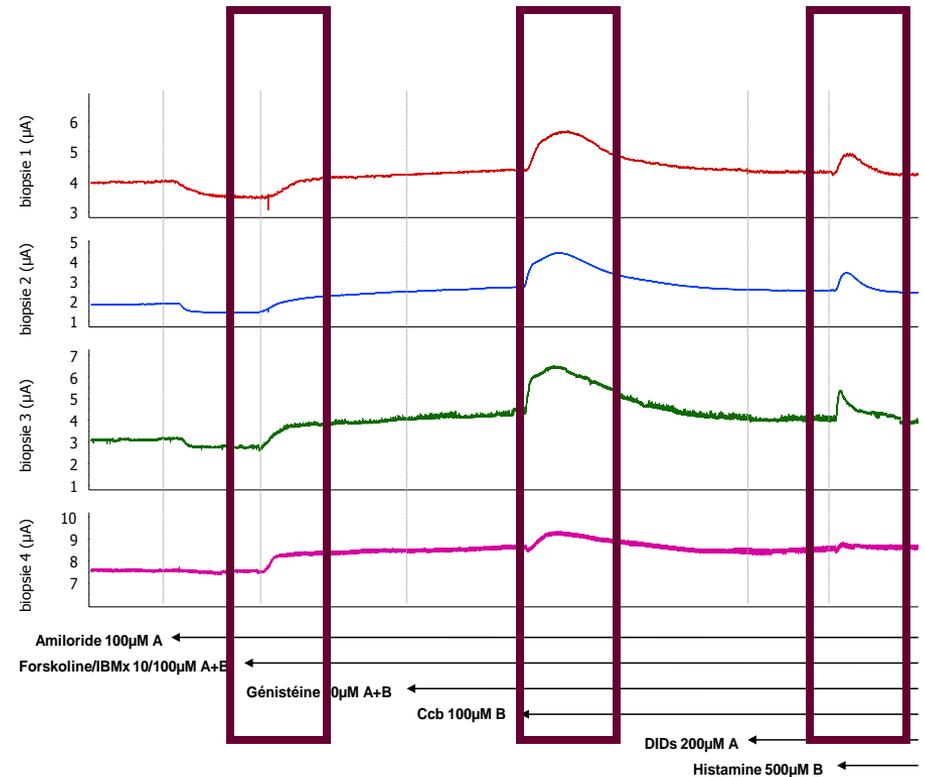
Dysfonction partielle de CFTR, respondeur à ivacaftor

(3) Orienter vers une MV

NPD pas interpretable



ICM anormal

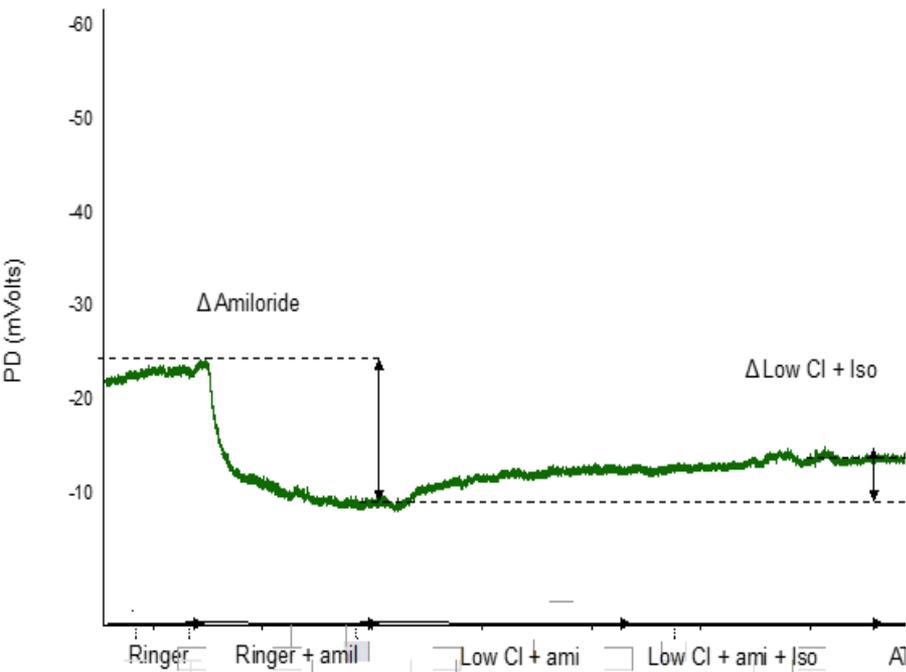


R334W (pArg334Trp)/M1028R (p.Met1028Arg)

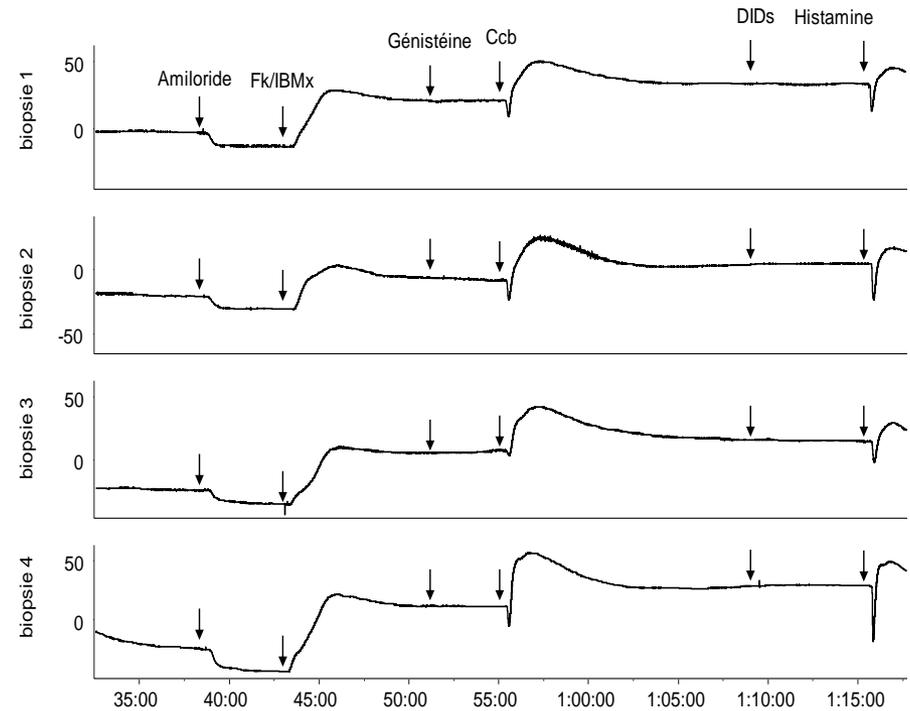
Test de la sueur: 40,34,40,50,48 mM/L

Genotype avec fonction résiduelle

NPD à la limite de la normale

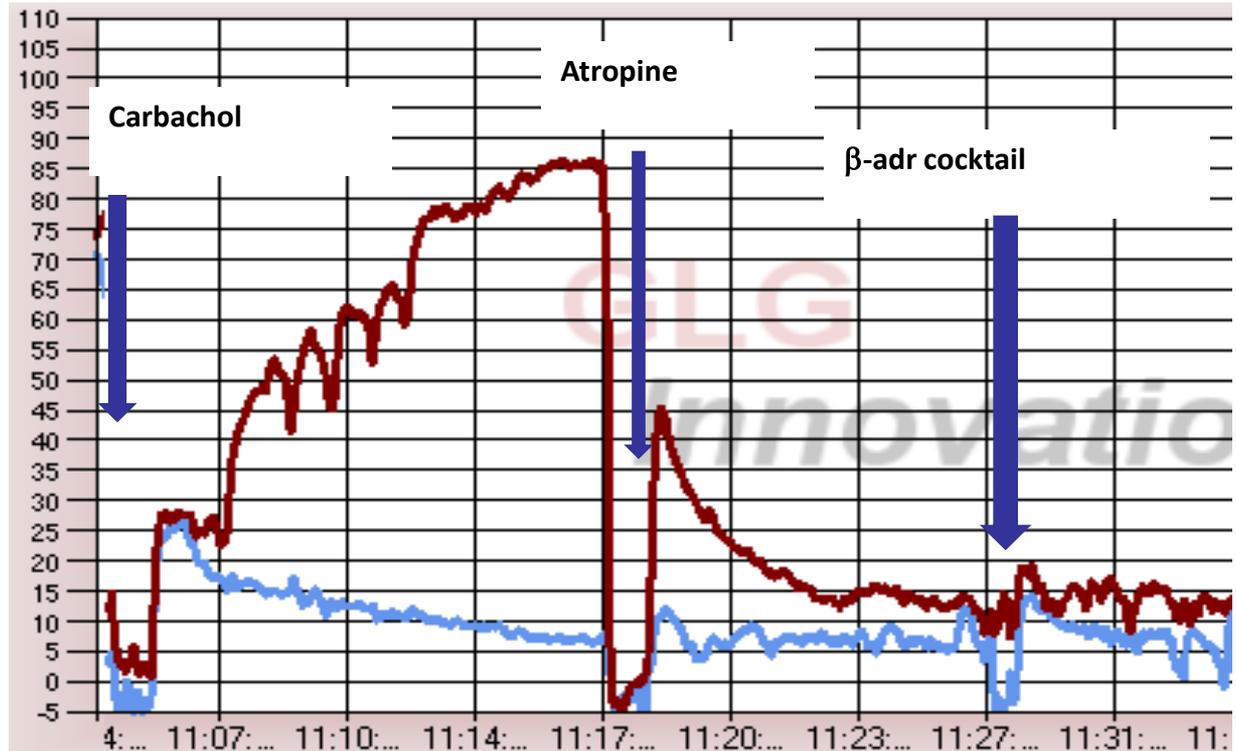


ICM anormal



1717 1G>A/c.3874-4522A>G
Test de la sueur: 40,34,40,50,48 mM/L

Sécrétion sudorale bêta-adrénergique





LYON
5-7 AVRIL 2018
CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES DE LA MUCOVISCIDOSE

vaincrelamuco.org

federation-crcm.org



**Génétique
moléculaire**

**Etudes
in silico**

**Etudes
fonctionnelles
*in vitro***

**Biochimie:
TS
évaporimétrie**

Phénotype

**Explorations
fonctionnelles:
DDP nasal, CCC**

Organoïdes

LYON

5-7 AVRIL 2018

CENTRE DES CONGRÈS

3^{ES} JOURNÉES FRANCOPHONES DE LA MUCOVISCIDOSE



TOUS SOLIDAIRES POUR VAINCRE !

Merci pour votre attention !