

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive mortelle causée par des mutations dans le gène Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, CFTR, (ABCC7). Reconnue dès 1938 par Dorothy Hansine Andersen, l'entité clinique de fibrose kystique du pancréas n'a été reliée au gène CFTR et à sa mutation la plus fréquente, Phe508del, que en 1989 par Francis Collins, Lap-Chee Tsui and John R Riordan.

Synthèse de la protéine

La protéine CFTR est exprimée à la membrane apicale des épithelia. Elle est codée par le gène CFTR (ABCC7), situé sur le chromosome 7 (7q31.2) et composé de 27 exons (1). Cette glycoprotéine comporte 1480 acides aminés et a un poids moléculaire de ~170kDa (2).

A l'instar des autres membres de la famille des ATP-Binding Cassette (ABC) protéines, elle présente 2 domaines transmembranaires (MSDs), chacun composé de 6 hélices, qui délimitent un pore transmembranaire; 2 domaines intracytoplasmiques (NBD1 et NBD2) reliés aux TMDs par 4 boucles intracellulaires (de CL1 à CL4) et capables de fixer l'ATP.

A cet égard, le 508ème acide aminé joue un rôle crucial car il est localisé sur NBD1 à l'interface avec la première et la 4ème boucle cytoplasmique (CL4, CL1). De même, NBD2 interagit avec CL2 et CL3.

Ces interfaces relaient les changements de conformation induits par la liaison de l'ATP aux NBDs et permettent ainsi l'ouverture du canal. L'hydrolyse de l'ATP favorise le retour à la conformation de repos fermé.

CFTR est la seule ABC protéine à comporter un domaine dit Regulator (R) intracellulaire. Ce dernier contient des résidus serine susceptibles d'être phosphorylés par la protéine kinase A et la protéine kinase C, elles mêmes régulées par l'adénosine cyclique monophosphate (AMPc). La phosphorylation de R est indispensable pour l'ouverture du pore. R est un domaine très spécifique car sa grande richesse en acides aminés le rend peu structuré et susceptible d'interagir avec différentes régions de la protéine.

CFTR subit une maturation complexe dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (ER) (Figure 2). Les différents domaines s'y assemblent par des interactions interdomaine comme les pièces d'un puzzle, vraisemblablement assistés par des protéines chaperones.

La biogenèse de CFTR est inefficace, 60 à 80% de la protéine est spontanément dégradée par le système ER-associated dégradation (ERAD) via la voie du système protéasome. Un petit pourcentage

de protéine atteint donc l'appareil de Golgi où elle est transformée en une glycoprotéine complexe. Le routage à la membrane apicale est modulé par l'interaction entre la séquence C terminale (DTRL) de CFTR avec des protéines contenant des domaines PDZs, notamment CAL (CFTR-associated ligand) et Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (NHERF). CAL favorise la rétention de CFTR dans la cellule alors que NHERF inhibe l'association de CAL avec CFTR de façon compétitive et favorise ainsi son accession à la membrane. 10% de CFTR est internalisée chaque minute par endocytose pour être ensuite recyclé à la membrane (6).

Fonctions de CFTR

CFTR joue un rôle fondamental dans le transport transépithélial de fluides et d'électrolytes. Les domaines transmembranaires forment un pore électif qui transporte les anions selon leur potentiel électrochimique (2). CFTR transporte principalement du Chlorure (Cl⁻) et du bicarbonate (HCO₃⁻), mais est aussi perméant à d'autres anions comme I⁻, Br⁻, F⁻, et des molécules organiques comme le glutathion ou l'ATP. Ceci explique pourquoi CFTR sécrète du Cl⁻ et HCO₃⁻ dans l'intestin et les voies aériennes alors que c'est l'inverse dans l'épithélium sudoral. De façon remarquable la sélectivité peut permuter d'une conformation perméable au Cl⁻ à une conformation perméable au HCO₃.

CFTR régule également d'autres canaux. CFTR inhibe le canal ENaC et de ce fait limite la réabsorption de Na⁺ dans les voies respiratoires (8), à l'inverse de l'épithélium sudoral où cette inhibition tonique n'a pas été démontrée. CFTR active d'autres voies de transport du Cl⁻ et de part son interaction avec d'autres transporteurs pourrait aussi activer de façon directe ou indirecte des échangeurs anioniques notamment Cl⁻/HCO₃⁻. Ainsi l'absence de CFTR se traduit par un défaut de régulation du volume du liquide de surface épithélial mais également par un défaut de régulation du pH local.

CFTR est impliqué dans de multiples autres fonctions épithéliales. Son absence est associée à une colonisation bactérienne précoce des voies aériennes, possiblement du fait d'un défaut de bactéricidie locale induite par une régulation anormale du pH. La colonisation bactérienne déclenche ensuite un état inflammatoire exacerbé, un recrutement excessif de neutrophiles dans les voies respiratoires et un stress oxydatif accru favorisant un défaut d'autophagie (10). Enfin CFTR semble être une protéine multifonctionnelle dont l'absence affecte bien d'autres fonctions cellulaires fondamentales. En particulier la machinerie concernant le repliement cellulaire serait affectée générant ainsi une perturbation de nombreux mécanismes de signalisation cellulaire.

Classification des mutations de CFTR et rationel pour une thérapie spécifique

Plus de 2000 mutations ont été décrites à ce jour. Les conséquences sur la fonction ont été analysées pour une minorité d'entre elles. Le programme CFTR2 vise à caractériser les conséquences fonctionnelles des mutations. A ce jour, environ 200 mutations ont été caractérisées.

On peut regrouper les mutations du gène CFTR en mutations faux sens (40%), de décalage du cadre de lecture (16%), des défauts d'épissage (12%), des mutations non-sens (8%), de grandes insertions/délétions (3%), des mutations dans le promoteur (0.8%), enfin des variations de séquences dont on ne peut prédire le caractère pathogène (14%).

La plus fréquente est la délétion du 508eme acide amine.p.Phe508del, F508del. Elle affecte 70% des allèles dans la population caucasienne avec un gradient décroissant nord sud. 20 autres mutations seulement touchent plus de 0.1% des allèles.

Elles peuvent être regroupées en 5 classes selon leur mécanisme :

- défaut de production (classe I),
- défaut de maturation (classe II),
- défaut d'activation (classe III),
- défaut de conduction (classe IV)
- défaut de conduction et taux de protéine fonctionnelle réduit (classe V),
- endocytose excessive (Classe VI).

Les mutations de Classe I, II and III sont associées à des formes sévères alors que les classes IV, V et VI sont associées à un phénotype modéré.

On estime que la restauration de 30% de protéine à la membrane suffit pour diminuer de façon significative les symptômes. Une augmentation de 10% de CFTR prédit une augmentation de fonction de 12% et une diminution de 40mEq/l du Cl⁻ sudoral.

Les thérapies protéiques visent à corriger les anomalies protéiques liées aux mutations et ciblent ainsi l'origine même de la maladie. En 1998, c'est l'idée fondatrice de l'association "Mucoviscidose : ABCF" et leur mise au point résulte d'une politique de développement particulièrement remarquable initiée en 1998 par l'association nord-américaine de mucoviscidose.

THERAPIES VISANT LA CLASSE I: thérapies anti non-sens

Les mutations de classe I induisent l'absence de fabrication totale ou partielle de la protéine. Elles regroupent des mutations non-sens caractérisées par la présence d'un codon stop prématuré (PTC) -UAA, UAG or UGA- et des décalages du cadre de lecture ou des mutations au site invariant d'épissage introduisant un PTC. Dans la grande majorité des cas, le système du Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) dégrade l'ARN messager porteur du PTC (12). Dans le cas où ce mécanisme est outrepassé, la synthèse ribosomale est stoppée au PTC et la protéine « tronquée » est rapidement éliminée.

Cependant certaines molécules peuvent court-circuiter ce signal stop. Dans ce cas, un acide aminé est inséré et s'il n'affecte pas la structure de la protéine, celle-ci est alors fonctionnelle. Cette thérapie anti non-sens est basée en quelque sorte sur l'induction d'une infidélité de lecture et si un nombre suffisant de PTC sont court-circuités ceci peut aboutir à une restauration de la fonction à l'échelle du tissu et de l'organisme.

Les molécules les plus reconnues à cet égard sont les aminoglycosides. Leur application topique au niveau du nez a été associée à une restauration fonctionnelle. La gentamycine intraveineuse a démontré des résultats similaires et surtout une normalisation du test de la sueur et une amélioration de l'état respiratoire sans corrélation avec le statut infectieux.

Ataluren produit par PTC Therapeutics, Inc. a été identifié après criblage de plus de 800,000 molécules. Des essais de phase II ont montré une normalisation de la fonction de la protéine pour plus d'un tiers des patients. Ceci est corroboré par une autre étude démontrant une corrélation entre le niveau de transcrits (échappant au NMD) et la réponse fonctionnelle. Un essai international versus placebo de phase III a été entrepris dans 11 pays. Les patients ayant le plus bénéficié de ce traitement sont les patients sans traitement par aminoglycosides inhalés pendant l'étude. Les patients sous Ataluren stabilisent leur VEMS (-0.2%) alors que les patients traités par placebo se dégradent (-6.9%; $p=0.04$). Ceci pourrait être relié à un antagonisme compétitif entre la molécule d'Ataluren et les aminosides. Malheureusement un deuxième essai international incluant 200 patients (versus placebo) n'a pas confirmé cet effet et le développement de la molécule est interrompu pour la mucoviscidose. D'autres molécules sont à l'étude dans différents laboratoires.

THERAPIES VISANT LA CLASSE II: corriger les défauts de maturation protéique

Les mutations de classe II sont associées à un défaut de maturation. La mutation la plus prévalente, F508del, est caractérisée par une dégradation de près de 100% de la protéine nouvellement synthétisée. Du fait d'un repliement anormal, cette protéine est dégradée par la voie du protéasome (4). Dans ce cas, la protéine n'est pas retrouvée à la membrane. Si elle y parvient, elle est rapidement éliminée de la membrane plasmique selon un mécanisme d'ubiquitination périphérique.

F508del est caractérisée par une instabilité énergétique et dynamique du domaine NBD1 et l'altération de l'assemblage entre NBD1 et MSD1/MSD2, via la 4ème boucle cytoplasmique (CL4). De ce fait, elle déstabilise aussi la conformation de MSD1, MSD2 et NBD2. Pour corriger F508del, il faut donc à la fois restaurer l'anomalie thermodynamique mais aussi la stabilité de l'interface de NBD1 avec les MSDs.

Des thérapies dites correctrices permettent de restaurer l'expression à la membrane. De nombreuses compagnies maintenant ont des molécules en développement cliniques (Vertex, Galapagos, Proteostasis...). Celle qui a subi le développement clinique le plus poussé est VX-809 (nom commercial Lumacaftor, produite par Vertex Pharmaceuticals). In vitro, sur des cultures primaires épithéliales, cette molécule restaure jusqu'à 15% de la fonction de CFTR (20,21). VX-809 restaurerait l'interaction entre NBD1 et la 4ème boucle intracellulaire et détermine ainsi un repliement adéquat. Malheureusement les essais cliniques utilisant VX-609 en monothérapie ne se sont pas révélés efficaces.

Le problème le plus crucial est que tous ces correcteurs ont un effet plafond et restaurent au maximum 10 à 16% de la fonction. Le défi est maintenant de concevoir les molécules à partir de l'anomalie moléculaire et capables de compléter la structure anormale.

THÉRAPIES VISANT LA CLASSE III : potentialiser la régulation du canal CFTR

Les mutations de classe III sont fréquemment localisées dans le domaine NBD1 et NBD2 et affectent l'ouverture du pore. G551D en est l'exemple le plus fréquent. Elle affecte 1 patient sur 25. Elle est située à un point crucial de l'interface entre NBD1 et NBD2 et abolit l'ouverture du pore ATP dépendant.

La thérapie vise ici non plus le métabolisme protéique car la protéine est présente à la membrane mais à potentialiser l'ouverture du canal. La molécule la plus remarquable à ce jour est VX-770, Ivacaftor (Kalydeco, produite par Vertex Pharmaceuticals). Ivacaftor restaure l'ouverture du pore de CFTR-G551D à un niveau identique à celui de protéine sauvage. Une première étude de phase II a montré une efficacité clinique remarquable en terme fonctionnel respiratoire et une amélioration du test de la sueur. Surtout, l'étude de phase III randomisée versus placebo sur 48 semaines a confirmé cette efficacité à la fois chez des adultes et des enfants de plus de 12 ans ayant un VEMS entre 40 et 90% (Etude STRIVE) et des enfants de 6 à 12 ans ayant un VEMS entre 40–105% (Etude ENVISION). Dès le 15^{ème} jour, le VEMS est augmenté de 10.6% dans le groupe traité par rapport au groupe placebo, amélioration qui se maintient pendant tout le traitement ($p < 0.001$). Près des 2 tiers des patients bénéficient d'une augmentation de 5% de leur VEMS. Un point très intéressant est que l'amélioration a touché de façon équivalente les patients quel que soit leur degré d'atteinte pulmonaire. A l'instar de l'amélioration fonctionnelle respiratoire, le risqué d'exacerbations infectieuses a diminué de 55% ($p = 0.001$) et les patients ont pris en moyenne 2.7 kg. Ce dernier résultat n'a pas une explication univoque. En effet, il peut résulter à la fois d'une diminution du catabolisme du fait de l'amélioration respiratoire mais également d'un effet direct sur le tube digestif et la restauration de la fonction pancréatique. La restauration fonctionnelle est confirmée puisque le chlorure sudoral est diminué de 48 mmol/l en comparaison au placebo. Cet effet est constaté dès le quinzième jour et se maintient tout au long de l'étude. Cependant l'absence de corrélation entre la fonction respiratoire et le test de la sueur suggère que d'autres facteurs sont impliqués, notamment l'environnement et les gènes modificateurs.

Ce bénéfice clinique est confirmé par 2 études ouvertes, l'une réalisée par le passage des patients sous placebo au traitement (étude PERSIST), l'autre, en cours où plus de 1000 patients de plus de 6 ans bénéficient du traitement de la molécule désormais disponible sur le marché et sont suivis de façon prospective (Etude GOAL). Cette dernière reproduit les résultats de la phase III, avec une amélioration fonctionnelle du VEMS de 83% à 90%, et une diminution du Cl-sudoral de 105 à 55 mEq/L. Surtout un résultat exceptionnel, à confirmer toutefois, est la diminution de la fréquence des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* de 35% (OR : 0.65 (0.54-0.79)) , principal facteur péjoratif en terme

de survie. Des explorations complémentaires plus spécifiques ont été réalisées dans des sous-groupes de l'étude GOAL. Au plan digestif, le traitement par Ivacaftor est associé à une augmentation du pH intestinal. Ceci pourrait être rapporté à une activité spécifique sur l'épithélium pancréatique qui verrait sa fonction se restaurer. Si c'est le cas, ceci bouleverse le dogme selon lequel le pancréas exocrine est définitivement détruit chez les patients insuffisants pancréatiques. Ceci pourrait aussi expliquer l'effet bénéfique sur la nutrition et les symptômes digestifs. Une étude isotopique de la clairance Muco-Ciliaire montre un doublement en 1 mois, en corrélation avec l'amélioration du VEMS, mais sans modification des paramètres inflammatoires des sécrétions bronchiques (IL6, elastase IL8 SLP1 A1AT IL1-beta). Enfin, une étude spécifique chez les enfants de 2-5 ans démontre également une amélioration significative du VEMS (+11% J15 et +7% à J28) et du FEF25-75 (+15% à J 15, +29% à J29) et de l'index de clairance pulmonaire.

Ces résultats remarquables réalisent une preuve de concept. Ils démontrent pour la première fois qu'une transformation moléculaire, au cœur de la cellule, peut se traduire en un bénéfice clinique qui améliore la qualité de vie quotidienne et probablement va transformer la survie des patients. Ceci a permis le développement clinique de la molécule en un temps record puisque la molécule a été mise sur le marché en à peine 1 an après les résultats de la phase 3. Ceci laisse entrevoir le potentiel thérapeutique de telles molécules si elles sont prescrites précocement.

Ivacaftor augmente également la probabilité d'ouverture de tous les mutants présents à la membrane avec une fonction résiduelle, notamment les mutations de classe 3, la protéine F508del et les mutations de classe IV. Son effet a été évalué chez 39 patients de plus de 6 ans ayant plus de 40% de VEMS et porteurs d'une mutation de classe III autre que G551D (KONNECTION study). Il s'agit d'une étude en cross over versus placebo comprenant 2 phases de 8 semaines. La comparaison des critères entre la phase de traitement et la phase placebo montre une amélioration de 10.7% de VEMS, et du BMI de + 0.66 Z-Score et une diminution de 49 mEq/L de Cl⁻ sudoral ainsi qu'une amélioration très significative du score de qualité de vie. Elle est complétée par l'étude KIWI chez les 2 à 5 ans montrant une amélioration de la fonction pancréatique. Ceci a débouché sur la mise sur le marché d'Ivacaftor (KalydecoR) pour les patients de plus de 3 ans ayant ces mutations (au nombre de 8 en France).

F508del, si elle accède à la membrane présente également des anomalies d'ouverture du pore. Ainsi l'adjonction de Ivacaftor potentialise des molécules correctrices comme Lumacaftor. Cette association démontre un bénéfice in vitro en termes de sécrétion de fluides. C'est la base d'un essai combiné associant un traitement potentiateur (Ivacaftor) et correcteur (Lumacaftor). Une étude de phase II sur 28 jours sur 32 patients a confirmé l'effet in vitro en démontrant une amélioration significative du VEMS de 9% ; 25 malades ont eu des améliorations de plus de 10% de leur VEMS et 55% de plus de 5%. Le test de la sueur

s'améliore également mais à une moindre échelle (36). Ceci a été suivi de la mise en place de 2 essais de phase III (Traffic et Transport incluant plus de 1000 patients) avec ensuite un passage en ouvert sur 96 semaines.

Les essais cliniques, qui combinent l'association Ivacaftor-Lumacaftor montrent une amélioration de la fonction respiratoire de l'ordre de 5% et pour environ 25% des patients de plus de 10%, ce qui est réellement un clair bénéfice. Ceci est associé à une prise de poids. Ceci a débouché sur une autorisation de mise sur le marché en Allemagne France et USA pour les patients homozygotes de plus de 12 ans et plus récemment pour les plus de 6 ans aux USA (Orkambi®). Un composé adapté moins sensible aux inducteurs du CYP3A, VX-661a montré les mêmes résultats et semble associé à une pharmacocinétique plus favorable. On manque encore d'un traitement efficace pour les hétérozygotes, une étude combinant Ivacaftor et Lumacaftor n'ayant pas démontré de bénéfice possiblement du fait de posologies insuffisantes.

THERAPIES VISANT LA CLASSE IV: normaliser la conduction du canal

Les mutations de classe IV sont localisées pour la plupart dans les domaines membranaires qui forment le pore. Elles sont caractérisées par une fonction résiduelle et un phénotype clinique plus modéré, notamment souvent une insuffisance pancréatique.

De ce fait les thérapies potentiatrices comme VX-770 peuvent être efficaces. R117H est in vitro une des mutations les plus « répondeuse ». Elle conserve un transport résiduel de Cl⁻ et HCO₃⁻ de 25%. Un essai versus placebo sur 24 semaines suivi d'un passage en ouvert est en cours chez des patients âgés de plus de 6 ans porteurs de R117H et ayant un test de la sueur > 60 mmol/l et un VEMS entre 40 et 90% (Etude KONDUKT). Pour les autres mutations plus rares, un profil d'étude plus adapté à ces patients (N=1) est prévu.

THERAPIES VISANT LA CLASSE V : restaurer une quantité suffisante de protéine CFTR fonctionnelle

La plupart de ces mutations affectent l'épissage du pre-ARN messenger. Elles peuvent induire une exclusion partielle mais parfois également permettre la production d'un ARN-messenger normal. Ainsi, ce processus d'épissage peut aboutir soit à une réduction de la quantité de protéine (mutation de classe V) soit générer une nouvelle séquence exonique souvent associée à des mutations non-sens ou faux sens (reclassement en mutation de classe I). Dans la mesure où l'analyse des transcrits est rare, il est vraisemblable que ces mutations sont sous estimées.

Les mutations de classe V pour la plupart, gardent une fonction résiduelle. C'est le cas de 3849+10kbC>T, une mutation ponctuelle dans l'intron 19, qui réduit l'efficacité de l'épissage à 8% du taux normal et est associée à un phénotype clinique très modéré et un test de la sueur normal. Un autre exemple est le polymorphisme du site accepteur d'épissage de l'exon 8 (Poly-T tract) caractérisé par la présence de 5, 7 ou 9 thymidines (5T, 7T or 9T). Seul le polymorphisme 5T affecte l'épissage et empêche la transcription normale pour 60 à 90% des ARNm, et est dès lors associé à l'absence de l'exon 9. Si de plus, la région adjacente possède 12 ou 13 TG ce phénomène est amplifié. Ce polymorphisme, s'il est en cis de la mutation R117H module les conséquences phénotypiques de cette dernière. Ainsi on estime que [R117H;7T]+[F508del] est exceptionnellement associé avec un phénotype de mucoviscidose (0.03%) alors que [R117H;5T]+[F508del] peut être retrouvé chez des patients présentant un phénotype classique (39). Les mutations de classe V peuvent être ciblées par des inhibiteurs NMD ou des modulateurs d'épissage comme les oligonucléotides antisens. Ivacaftor peut également améliorer la fonction protéique si celle-ci accède à la membrane. Cependant l'impossibilité de prédire l'épissage à partir des modèles cellulaires, spécifiques d'organe, rend cette approche thérapeutique très difficile.

FUTURE STRATEGIE : Approches thérapeutiques combinées

La meilleure compréhension des mécanismes des mutations a permis d'envisager des cibles génétiques précises. Un grand nombre de patients vont désormais pouvoir bénéficier de cette approche spécifique. Si on additionne les homozygotes F508del (48% des patients), les patients hétérozygotes F508del (40%) et les sujets porteurs d'au moins une copie de R117H ou G551D (5.1%), plus de 90% des patients sont accessibles à de telles thérapies !

A ceci s'ajoute des thérapies très prometteuses visant à corriger l'ARN messenger directement (essai PROQR) dont on attend impatientement les prochains développements.

Cette stratégie trace un nouvel axe thérapeutique personnalisé en fonction de la mutation du patient et réalise un progrès considérable. Les résultats remarquables de l'essai avec Ivacaftor sur les patients porteurs de la mutation G551D démontrent pour la première fois qu'un mécanisme correcteur d'une anomalie moléculaire peut résulter en amélioration clinique remarquable et très vraisemblablement un bénéfice en termes de survie. Grâce à cette preuve de concept, une nouvelle ère thérapeutique s'ouvre désormais. Pour la première fois, le rêve de prescrire un traitement "prés-symptomatique", court-circuitant les anomalies induites par les mutations et empêchant ainsi tout signe de la maladie, peut être envisagé. Pour la première fois, on peut oser rêver que la mucoviscidose ne soit plus qu'un risque génétique et pas une maladie mortelle.