Réseau Muco Ouest
Soins - Recherche - Santé publique

Réunion Médicale
16 mars 2021

Mucoviscidose, affections liées à CFTR et difficultés diagnostiques

E. Girodon-Boulandet
Génétique et Biologie Moléculaires, Hôpital Cochin
emmanuelle.girodon@aphp.fr

I. Sermet-Gaudelus
Institut Necker Enfants Malades/INSERM U1151
Centre de Référence Maladies Rares :
Mucoviscidose et affections liées à CFTR
isabelle.sermet@aphp.fr

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
AP-HP.Centre-Université de Paris

Hôpital Cochin Port-Royal AP-HP

INEM INSTITUT NECKER ENFANTS MALADES
CENTRE DE MÉDECINE MOLÉCULAIRE

CRCM
Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose
Hôpital Necker-Enfants Malades

Sommaire

- Critères de diagnostic et génotypes (EG)
  - Mucoviscidose
  - CFTR-RD
  - CFSPID
  - Difficultés diagnostiques
- Outils du diagnostic et stratégies
  - Outils du diagnostic génétique (EG)
  - Outils d'explorations fonctionnelles in vivo et ex vivo (IS)
  - Outils d'explorations in vitro (minigènes pour l'épissage, maturation et transport de Cl- pour la protéine, cultures primaires) (IS/EG)
  - Arbre décisionnel (IS)
- Conclusions / Perspectives (EG)

Critères de diagnostic : mucoviscidose

SUPPLEMENT 2017 www.jpeds.com • THE JOURNAL OF PEDIATRICS

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

Philip M. Farrell, MD, PhD[1], Terry B. White, PhD[2], Clement L. Ren, MD[3], Sarah E. Hempstead, MS[2], Frank Accurso, MD[4], Nico Derichs, MD[5], Michelle Howenstine, MD[3], Susanna A. McColley, MD[6], Michael Rock, MD[1], Margaret Rosenfeld, MD, MPH[7], Isabelle Sermet-Gaudelus, MD, PhD[8], Kevin W. Southern, MBChB, PhD[9], Bruce C. Marshall, MD[2], and Patrick R. Sosnay, MD[10]

At least one phenotypic feature suggestive of CF

or Family history of CF in siblings

or Immunoreactive trypsin > cut off (newborn screening)

AND

Positive sweat test

or 2 CF-causing variants

or physiologic testing demonstrating CFTR dysfunction

Critères de diagnostic : affections liées à CFTR

ELSEVIER

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

Journal of Cystic Fibrosis
www.elsevier.com/locate/jcf

2011

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. Tzetis[i], M. Wilschanski[j], C. Bareil[b], D. Bilton[k], C. Castellani[l], H. Cuppens[m], G.R. Cutting[n], 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. Stuhrmann[ab], E. Tullis[ac], J. Zielenski[ad], P.F. Pignatti[a], C. Ferec[ae,*]

A **clinical** entity associated with **CFTR dysfunction** that **does not fulfil** the diagnostic criteria of CF

- TS: Cl- < 60 mmol/L
- au plus 1 variant CF

⚠ ≠ CF atypique, non-classique, modérée

SUPPLEMENT *2017* www.jpeds.com • THE JOURNAL OF PEDIATRICS

Diagnosis of Cystic Fibrosis in Nonscreened Populations

Patrick R. Sosnay, MD[1], Terry B. White, PhD[2], Philip M. Farrell, MD, PhD[3], Clement L. Ren, MD[4], Nico Derichs, MD[5], Michelle S. Howenstine, MD[4], Jerry A. Nick, MD[6], and Kris De Boeck, MD[7]

→ "The diagnosis of CFTR-related disorders has been defined as a monosymptomatic clinical entity…"

The Lancet Respiratory Medicine Commission

2020

The future of cystic fibrosis care: a global perspective

Scott C Bell, Marcus A Mall, Hector Gutierrez, Milan Macek, Susan Madge, Jane C Davies, Pierre-Régis Burgel, Elizabeth Tullis, Claudio Castaños, Carlo Castellani, Catherine A Byrnes, Fiona Cathcart, Sanjay H Chotirmall, Rebecca Cosgriff, Irmgard Eichler, Isabelle Fajac, Christopher H Goss, Pavel Drevinek, Philip M Farrell, Anna M Gravelle, Trudy Havermans, Nicole Mayer-Hamblett, Nataliya Kashirskaya, Eitan Kerem, Joseph L Mathew, Edward F McKone, Lutz Naehrlich, Samya Z Nasr, Gabriela R Oates, Ciaran O'Neill, Ulrike Pypops, Karen S Raraigh, Steven M Rowe, Kevin W Southern, Sheila Sivam, Anne L Stephenson, Marco Zampoli, Felix Ratjen**

→ "CFTR-related disorders, often with single or multiple organ involvement…"

Critères de diagnostic : CRMS/CFSPID (formes non conclues au dépistage néonatal)

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

Philip M. Farrell, MD, PhD[1], Terry B. White, PhD[2], Clement L. Ren, MD[3], Sarah E. Hempstead, MS[2], Frank Accurso, MD[4], Nico Derichs, MD[5], Michelle Howenstine, MD[3], Susanna A. McColley, MD[6], Michael Rock, MD[1], Margaret Rosenfeld, MD, MPH[7], Isabelle Sermet-Gaudelus, MD, PhD[8], Kevin W. Southern, MBChB, PhD[9], Bruce C. Marshall, MD[2], and Patrick R. Sosnay, MD[10]

Farrell, J Pediatr 2017

Short Communication

Inconclusive diagnosis after a positive newborn bloodspot screening result for cystic fibrosis; clarification of the harmonised international definition

K.W. Southern[a,*], J. Barben[b], S. Gartner[c], A. Munck[d], C. Castellani[e], S.J. Mayell[f], J.C. Davies[g], V. Winters[a], J. Murphy[a], D. Salinas[h], S.A. McColley[i], C.L. Ren[j], P.M. Farrell[k]

Southern, J Cyst Fibros 2019

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,*,b], 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. Deneuville[j], N. Remus[k], T. Nguyen-Khoa[a], C. Raynal[l], M. Roussey[m], E. Girodon[n]

Sermet-Gaudelus, Arch Pediatr 2017

Dépistage néonatal positif

Et

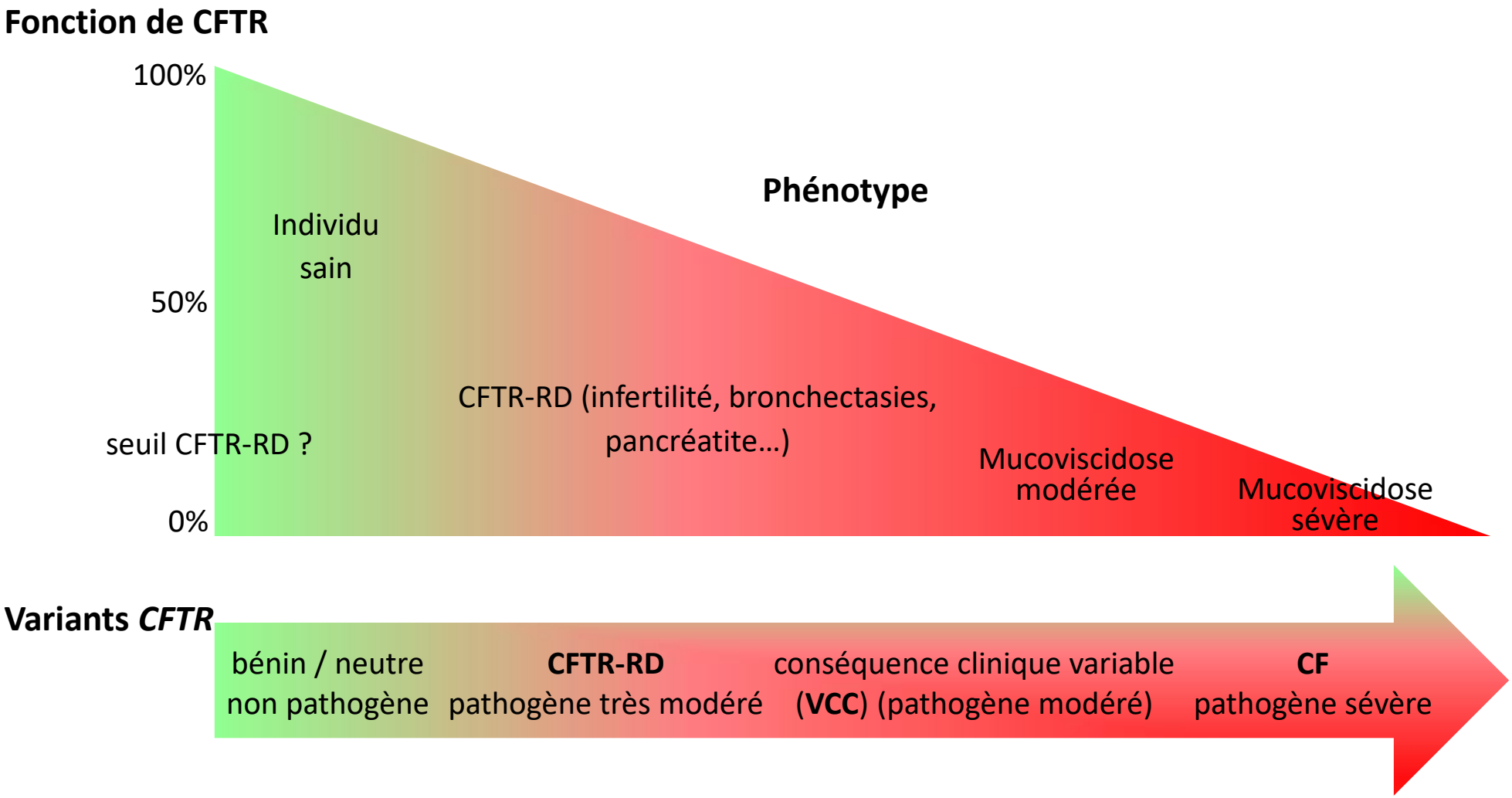
TS: Cl- < 30 mmol/L + 2 variants dont au moins 1 de signification clinique incertaine (VUS)

ou

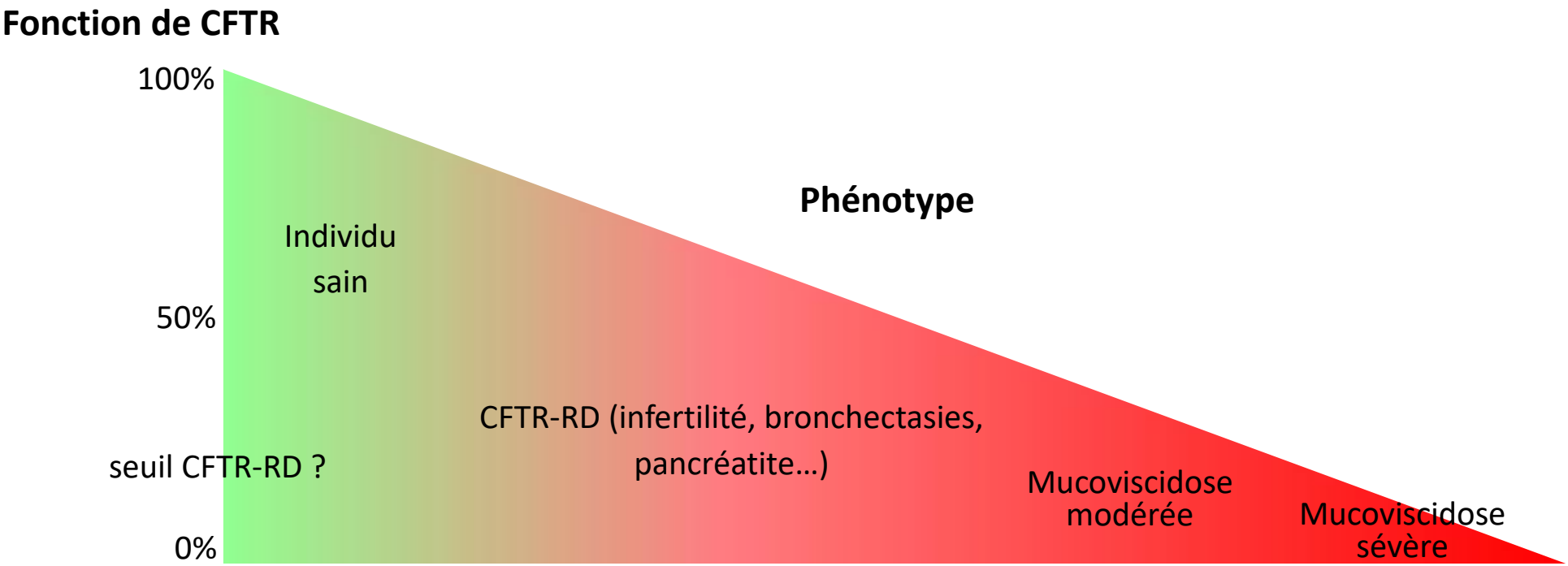
TS: Cl- 30 à 59 mmol/L + 0-1 variant CF

Pas de symptôme !

Critères de diagnostic et génotypes



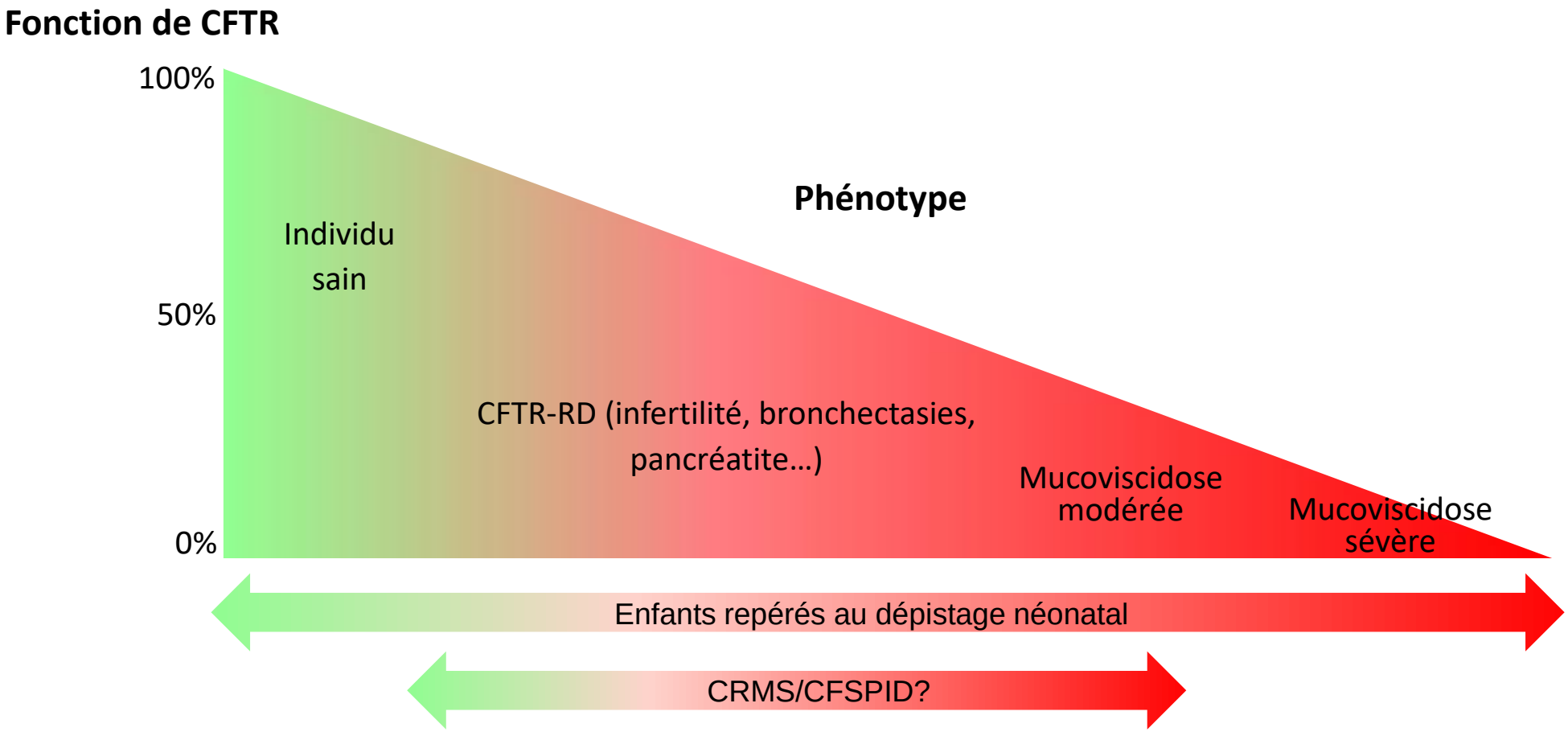
Critères de diagnostic et génotypes



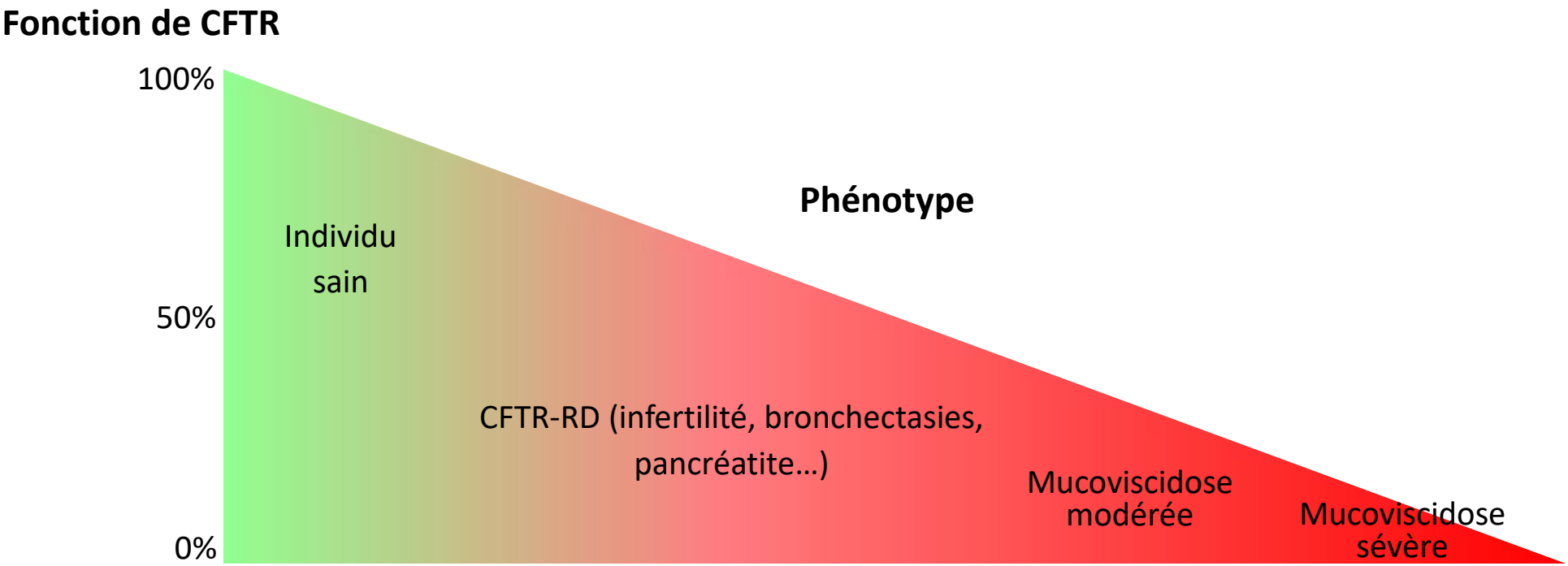
Fonction de CFTR	Normale	Détectable	Détectable	Nulle ou quasi-nulle
Allèle 1	CF	CF	CF	CF
Allèle 2	Non pathogène	CFTR-RD ou VCC	CF ou VCC	CF

Autres combinaisons : 2 VCC, VCC+CFTR-RD

Critères de diagnostic



Critères de diagnostic et génotypes



Fonction de CFTR	Normale	Détectable	Détectable	Nulle ou quasi-nulle
Allèle 1	CF	CF	CF	CF
Allèle 2	Non pathogène	CFTR-RD ou à conséquence clinique variable (VCC)	CF ou VCC	CF

VUS

Difficultés diagnostiques

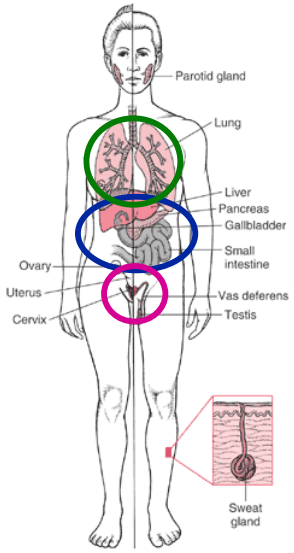
Objectifs : 1) Repérer les patients atteints de mucoviscidose :
- réduction de l'espérance de vie (≠ CFTR-RD)
- prise en charge adaptée
- conseil génétique adapté

2) Repérer les patients avec une affection liée à CFTR à risque d'évoluer vers une mucoviscidose

1) Dysfonction de CFTR avérée ou probable ➔ diagnostic de CF ou de CFTR-RD ?
2) Nouveau-né CRMS/CFSPID ➔ évolution vers CF ?
3) Patient CFTR-RD ➔ évolution vers CF ?
4) Dysfonction de CFTR, phénotype clair mais génotype incomplet ➔ variants rares ? Risque de remise en cause du diagnostic
5) Discordances
   - Génotype - phénotype
   - Tests électrophysiologiques : TS, dpn, ICM, évaporimétrie
     - Facteurs de variations du TS, limites des explorations fonctionnelles
     - Nb de DDB à TS intermédiaire sans variant identifié
   - Génotype - TS
6) Pas de diagnostic confirmé, diagnostic incertain, 1 seul variant CFTR-RD et TS intermédiaire

Illustrations

1. Entité clinique



2. Dysfonction de CFTR

Atteinte multi-organe
+
jeune âge
+
ST 50-59 mmol/l

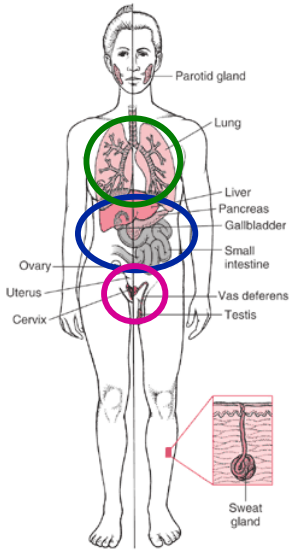
➔ **Suivi comme un patient CF**

➔ **Le diagnostic peut évoluer CFTR-RD > CF**

➔ **Diagnostic et suivi adaptés au patient**

Illustrations

1. Entité clinique



2. Dysfonction de CFTR

ABCD
+
TS >60 mmol/l

+

Evaluation clinique normale

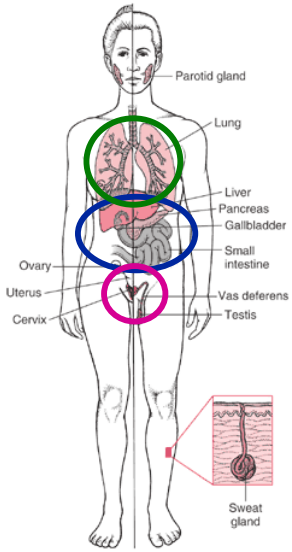
➔ **Diagnostic : CF**

➔ **Evaluation clinique**

➔ **Non pris en charge comme un patient CF**

Illustrations

1. Entité clinique



2. Dysfonction de CFTR

ABCD
+
TS 40 mmol/l

+

DDB, pancréatite aiguë

➔ **Diagnostic: CFTR-RD**

➔ **Evaluation clinique**

➔ **Pris en charge comme un patient CF**

Outils du diagnostic et stratégies

- **Outils du diagnostic génétique**
- Outils d'explorations fonctionnelles in vivo et ex vivo
- Outils d'explorations in vitro
- Arbre décisionnel

Diagnostic génétique : recherche de variants fréquents et rares

Pvt sanguin

Recherche de variants fréquents

trousse 51 variants

Sensibilité : Irlande 93% ; **France 90%**

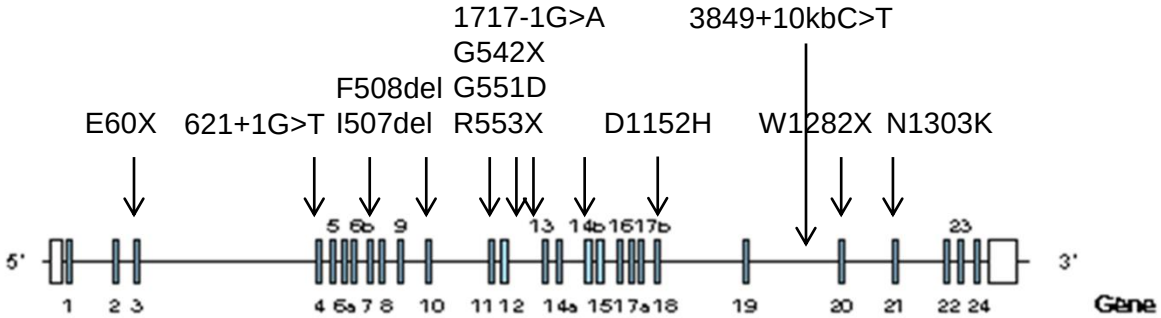
Afrique du Nord 73% ; Turquie 49%

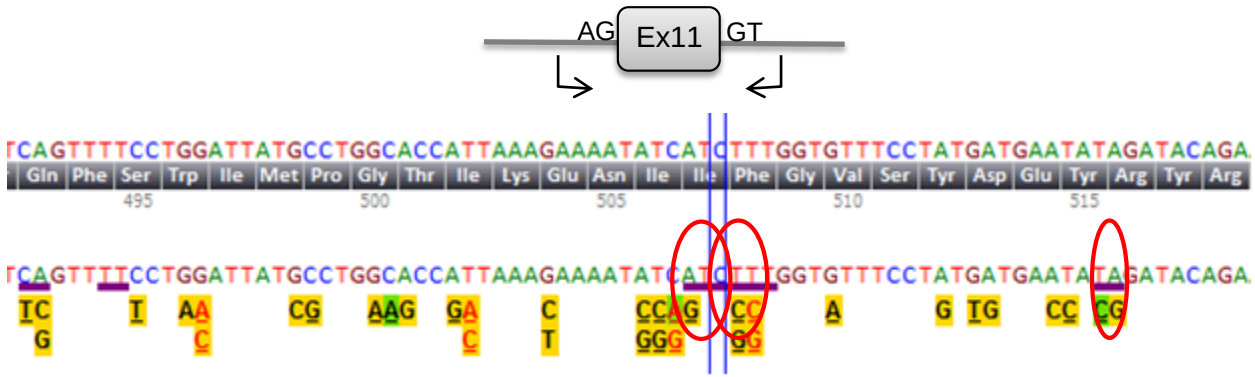
< 3 semaines

Recherche de variants rares

Séquençage / NGS **99%**

< 3 mois





Un résultat négatif n'élimine pas la présence d'un variant pathogène

Diagnostic génétique : recherche de variants fréquents et rares

Pvt sanguin

Recherche de variants fréquents

trousse 51 variants

Sensibilité : Irlande 93% ; **France** **90%**

Afrique du Nord 73% ; Turquie 49%

< 3 semaines

Recherche de variants rares

Séquençage / NGS **99%**

< 3 mois

2 mut	1 mut	0 mut
81%	18%	1%
98%	1,99%	0,01%

Un résultat négatif n'élimine pas la présence d'un variant pathogène

Diagnostic génétique : recherche de variants fréquents et rares

Pvt sanguin

Recherche de variants fréquents

Recherche de variants rares

Affections liées à CFTR : étude complète

	1-2 variants	2 variants
Infertilités par absence des canaux déférents *(Ratbi, Hum Reprod 2007)*	95%	**82%**
Bronchectasies *(Bombieri, J Cyst Fibros 2011)*	10-50%	**5-20%**
Pancréatites idiopathiques *(Masson, PLoS One 2013)*	24%	**4,2%**

Un résultat négatif n'élimine pas la présence d'un variant pathogène

Diagnostic génétique : Etude de l'ARN messager *CFTR*

Pvt sanguin

Cellules nasales

Recherche ciblée de variants fréquents

trousse 51 variants

Sensibilité : Irlande 93% ; **France** **90%**

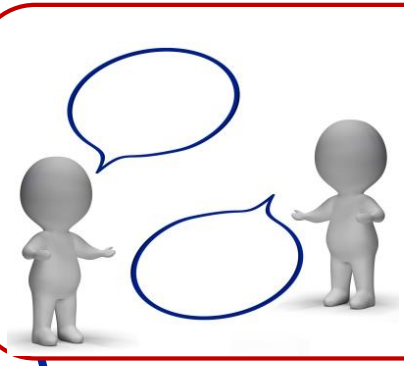
Afrique du Nord 73% ; Turquie 49%

< 3 semaines

Recherche de variants rares / NGS

99%

< 3 mois



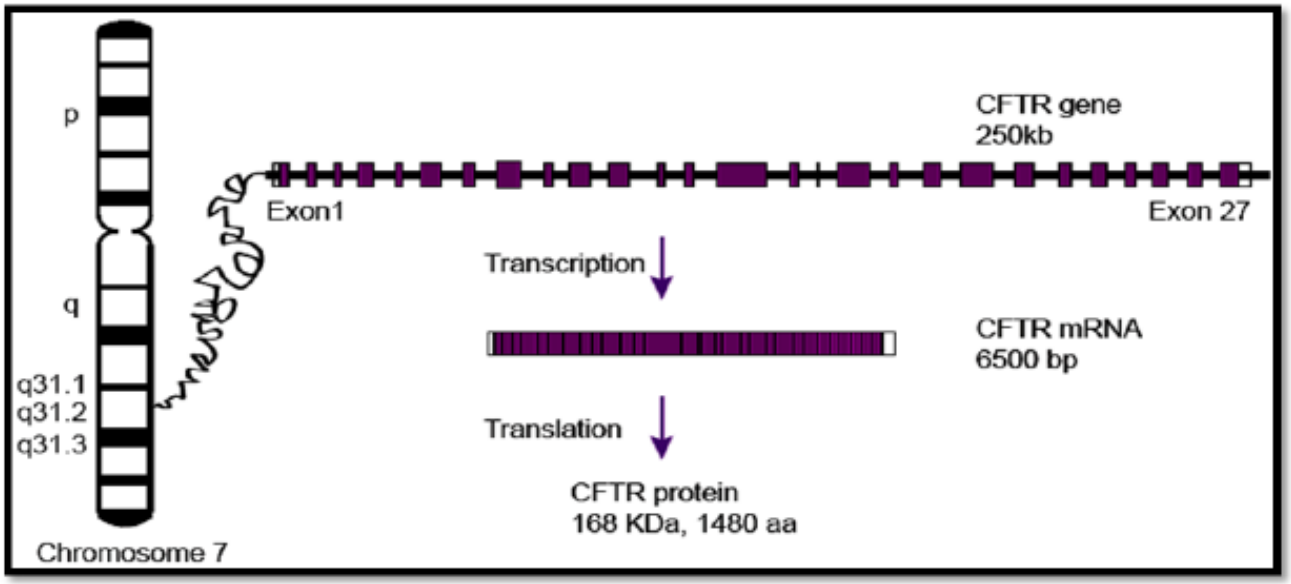
Discussion clinico-biologique

Etude des ARN messagers

6 mois – 1 an

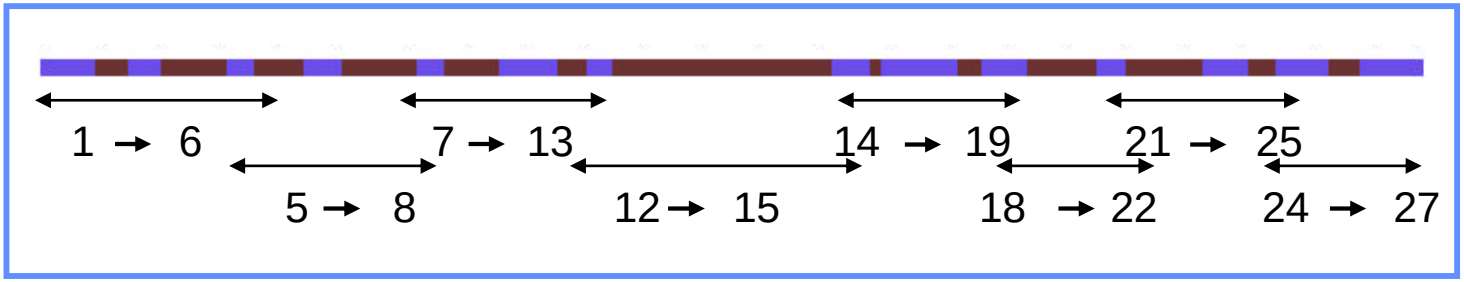
Un résultat négatif n'élimine pas la présence d'un variant pathogène

Diagnostic génétique : Etude de l'ARN messager *CFTR*



ADN des leucocytes
27 fragments

ARN messager des cellules épithéliales exprimant CFTR
8 fragments

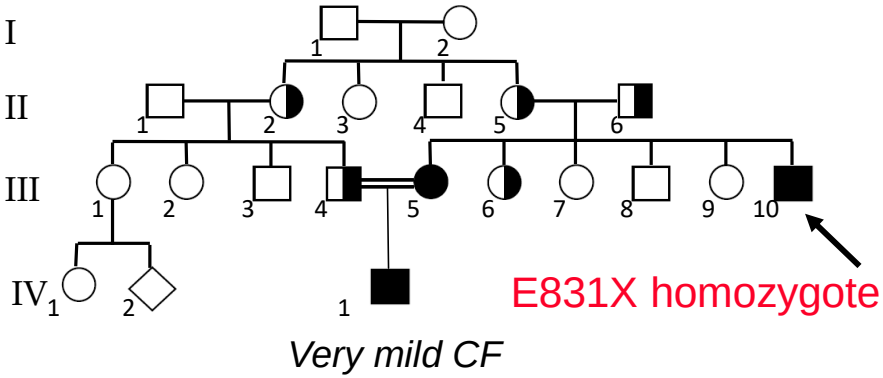


Recherche d'un transcrit anormal (plus long ou plus court)

Confirmation de l'impact d'un variant sur l'épissage

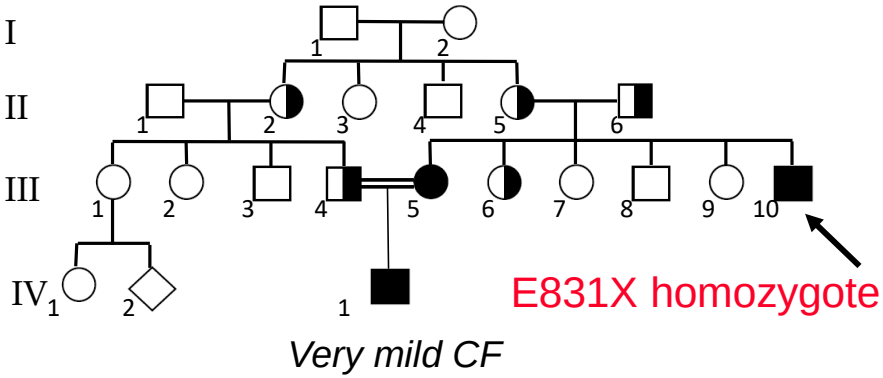
Identification d'un variant rare intronique « enfoui »

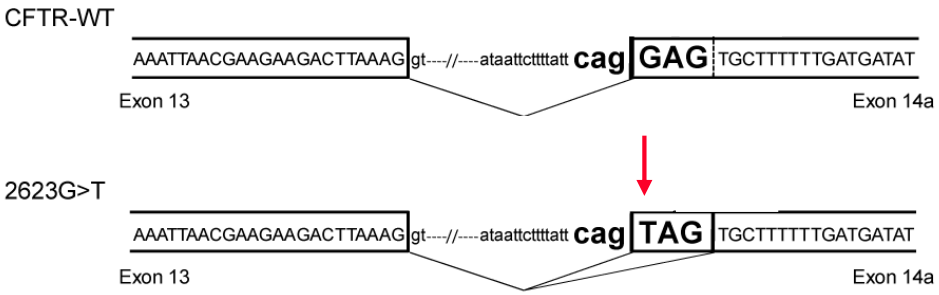
Diagnostic génétique : Etude de l'ARN messager *CFTR*

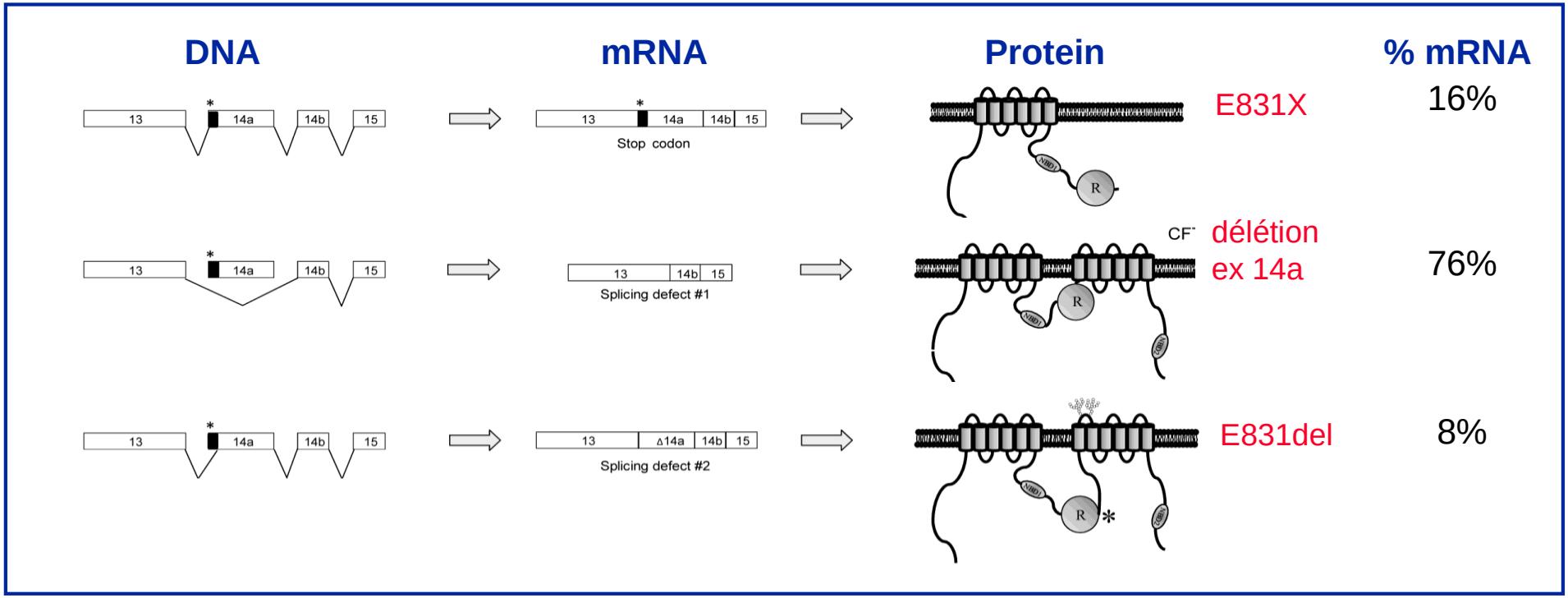


➔ ***Discordance génotype-phénotype***

Diagnostic génétique : Etude de l'ARN messager *CFTR*







Hinzpeter et al, PLoS Genet 2010

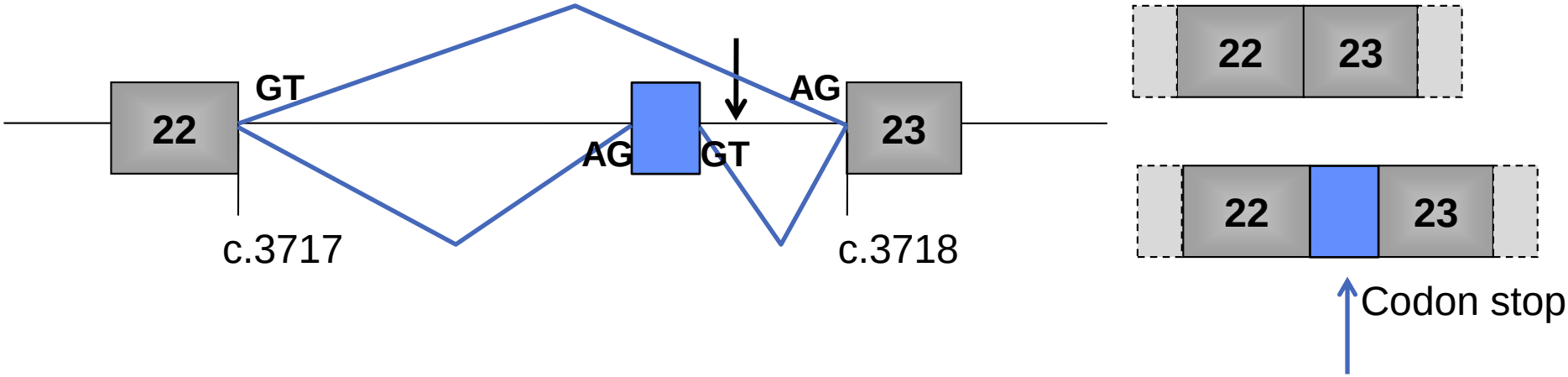
Diagnostic génétique : Etude de l'ARN messager *CFTR*

Recherche de variants introniques « enfouis » altérant l'épissage

Diagnostic génétique : Etude de l'ARN messager *CFTR*

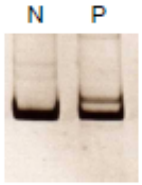
Recherche de variants introniques « enfouis » altérant l'épissage

Ex : c.3718-2477C>T (**3849+10kbC>T**), c.1680-886A>G (**1811+1,6kbA>G**)



Ex : **c.870-1113_870-1110delGAAT** identifiée chez 17 patients au **phénotype variable**

Costa et al. J Cyst Fibros 2011

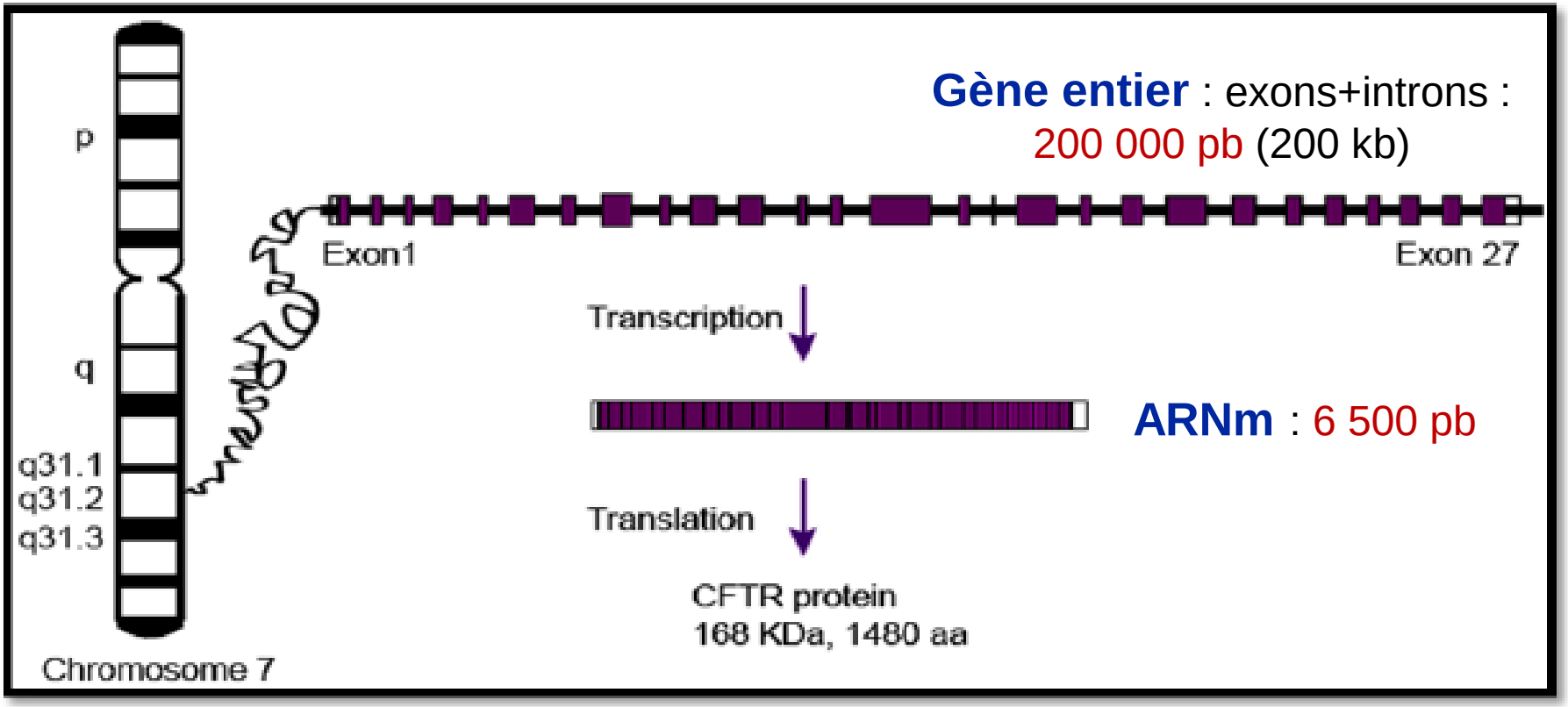


→ Insertion d'une séquence dans l'ARN messager ➡ Identification par séquençage

→ Intégration au screening en diagnostic

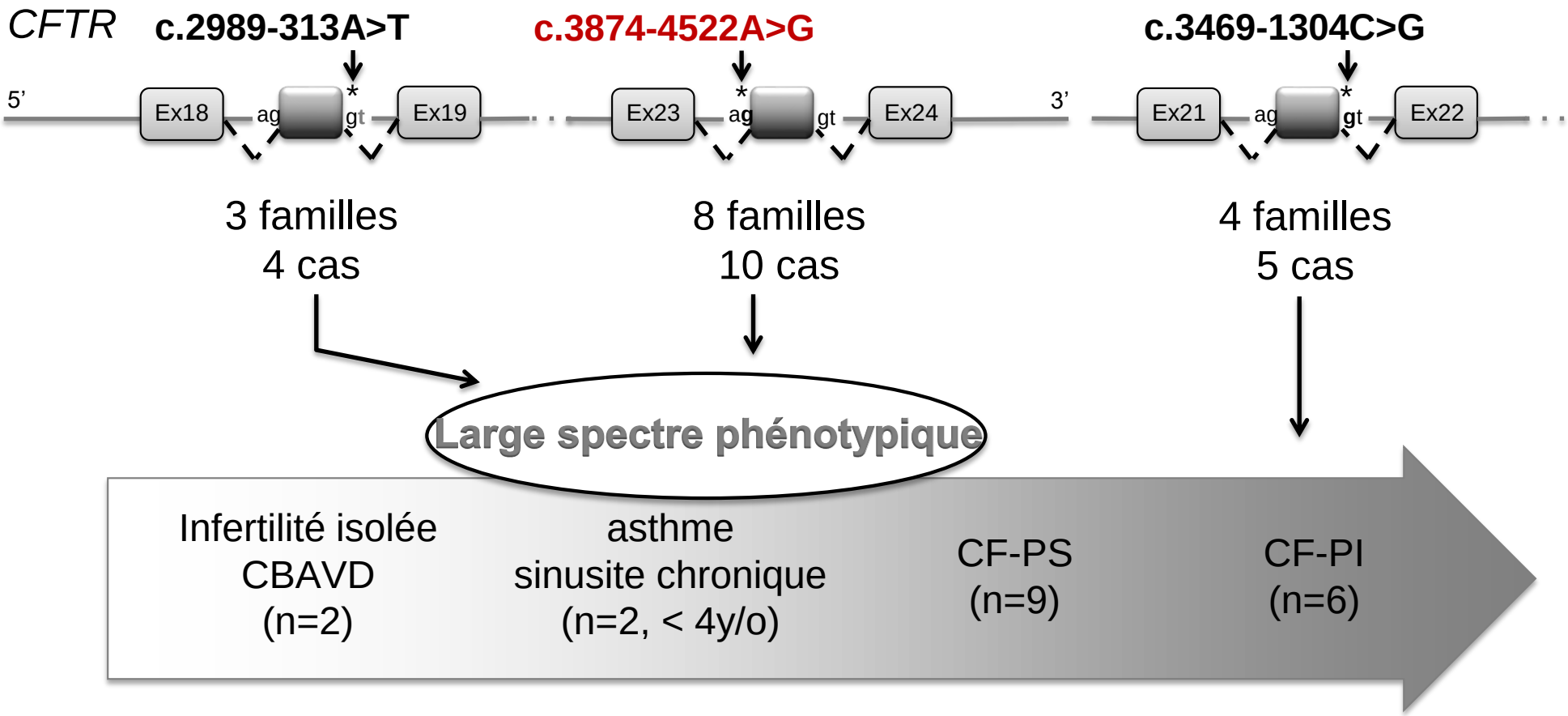
Diagnostic génétique : Etude du gène *CFTR* entier

Recherche de variants introniques « enfouis » altérant l'épissage



Projet collaboratif 3 laboratoires de référence, financé par VLM

Diagnostic génétique : Etude du gène *CFTR* entier



Bonini J, Varilh J et al. Genet. Med. 2015
Bergougnoux et al. J Cyst Fibros 2019

→ Intégration au screening en diagnostic

Diagnostic génétique : Etude du gène *CFTR* entier

- Dépistage néonatal positif, TS discordants dont un positif à 77mEq/L.
- Asthme, toux chronique, expectorations

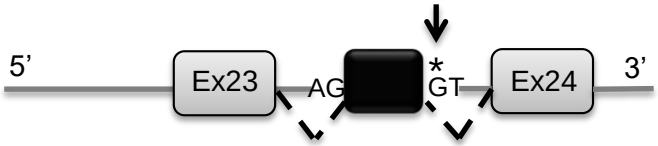
- Dépistage néonatal négatif, TS négatif à 16 mEq/L
- Asthme persistant, retard staturo-pondéral

- Dépistage néonatal positif, TS à 31 mEq/L contrôlé négatif à 22mEq/L
- Asthme, stéatorrhée

2007	Kit dépistage	0 mutation
2008	Variants rares *CFTR*	c.1798A>G (R600G) hétérozygote
2012	Etude ARNm sur cellules nasales	pas de transcrit aberrant détecté
2017	Recherche ciblée variants introniques	**c.3874-4522A>G** hétérozygote
2018	Etude ARNm sur cellules nasales	pseudo-exon chez les 3 enfants **Diagnostic de mucoviscidose/ affection liée à CFTR ??? chez les 2 garçons**

➔ ***Pas de diagnostic confirmé***
Enfant perdu de vue

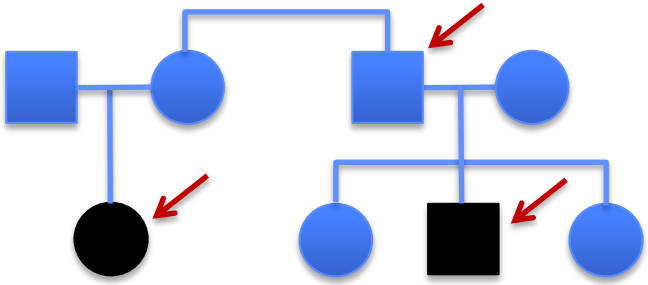
➔ ***Rappel de la famille***



➔ **Suivi en CRCM**

Diagnostic génétique : Etude du gène *CFTR* entier

- *Diag **à 20 ans : sinusite chronique***
- *DDB*
- *Insuffisance pancréatique*
- *Intolérance au glucose*
- *TS : 90 mmol/L*



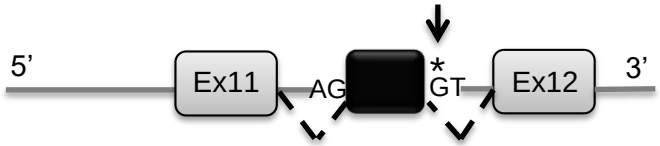
- *Dépistage néonatal négatif*
- *Diag **à 8 ans** sur **déshydratation***
- *Encombrements bronchiques dans la petite enfance*
- *Pancréatite aiguë*
- *Episodes de déshydratation*
- *TS : 90 mmol/L*

RIN. Lau. (1993) MAR. Enz. (2008)

Kit mut fréq.	F508del hétérozygote	Aucune mutation
NGS CFTR	**F508del** hétérozygote	**I506T** hétérozygote
Etude ARNm sur cellules nasales	seul le transcrit porteur de F508del est détecté → suspicion d'un 2e transcrit instable	

Envoi au laboratoire de Montpellier d'échantillons de patients porteurs d'un seul variant identifié après étude approfondie

c.1585-9412A>G



Costantino et al., J Cyst Fibros 2010

Diagnostic génétique : ARNm *vs* gène *CFTR* entier

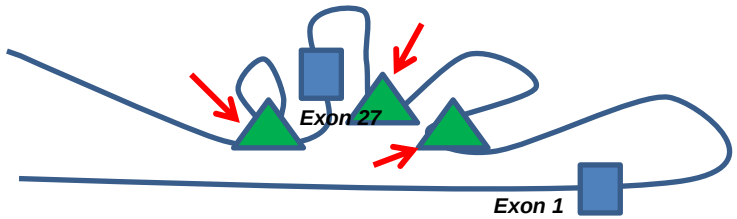
❑ **Etude ARN messager**	***vs*** **gène entier**
Nouveau prélèvement (réévaluation clinique)	Pas de nouveau pvt
Délai : 6 mois-1 an	Délai ?… qq années pour les variants inconnus
Conséquence fonctionnelle : transcrits aberrants	Explorations longues, incluant l'étude de l'ARNm des patients
Transcrits instables (NMD, codons stop) → Modifier le protocole	

❑ **Evaluation clinique +++, dialogue avec le(s) laboratoire(s)**

❑ **Place des explorations fonctionnelles pour confirmer la dysfonction de CFTR**
Ddp nasale, évaporimétrie, CCC sur biospsie rectale, cultures primaires de cellules nasales

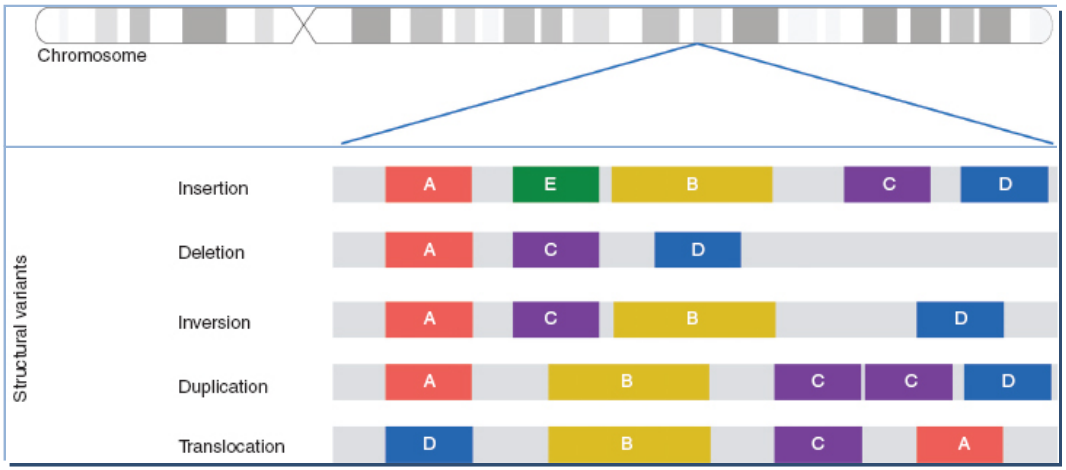
Perspectives : Variants structuraux impliquant *CFTR*

❑ **Projet VLM multicentrique :** 3 laboratoires de génétique de référence, collaboration avec Y. Fichou (Brest)



Bienvenu, Arch Ped 2020

- 10 patients CF (TS pos ou ddp nasal anormale) avec 1 seul variant CF
- Réévaluation clinique
- Étude familiale envisageable



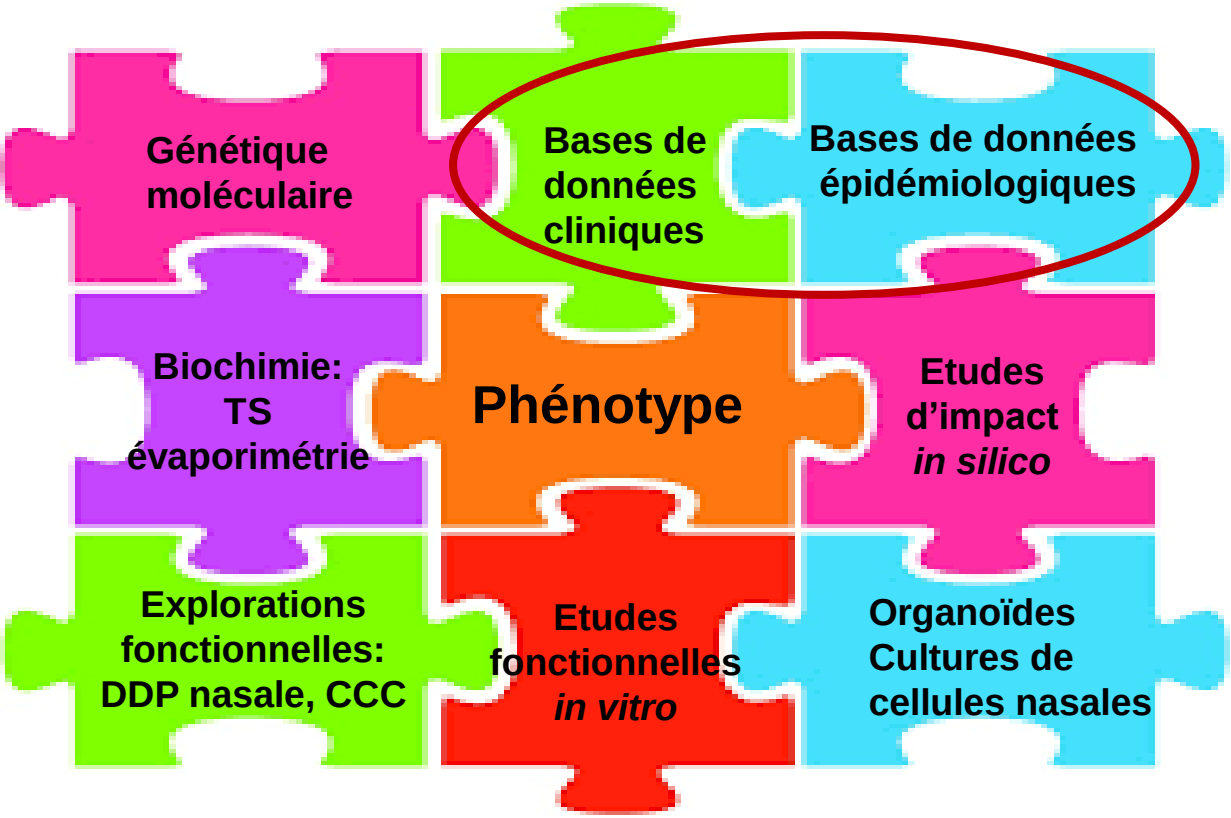
Neupsy Key, from Rahim NG et al., Genome Biol. 2008

Diagnostic génétique : Interprétation des variants

Richards et al., Genet Med 2015 ;
Amendola et al., Am J Hum Genet 2016

http://www.anpgm.fr/

Liste des arguments à prendre en compte pour l'interprétation des variants



- Classe 1 : Variant bénin
- Classe 2 : Variant probablement bénin
- Classe 3 : Variant de signification inconnue
- Classe 4 : Variant probablement pathogène
- Classe 5 : Variant pathogène

CF **CFTR-RD**

Attention ! Un variant peut être classé différemment selon la situation clinique

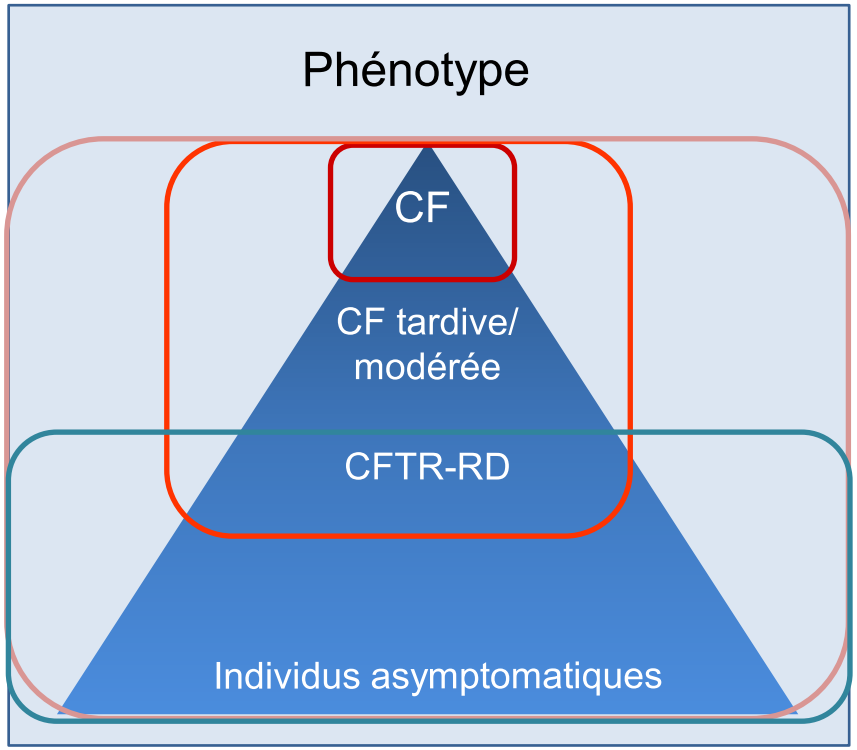
➔ **Nombreux liens à partir de CFTR2 et de CFTR-France**

Interprétation des variants : pénétrance

Pénétrance

$$\frac{\text{Nb de patients porteurs d'un génotype exprimant un certain phénotype}}{\text{Nb total de patients porteurs du même génotype}}$$

➔ Le phénotype doit être défini.



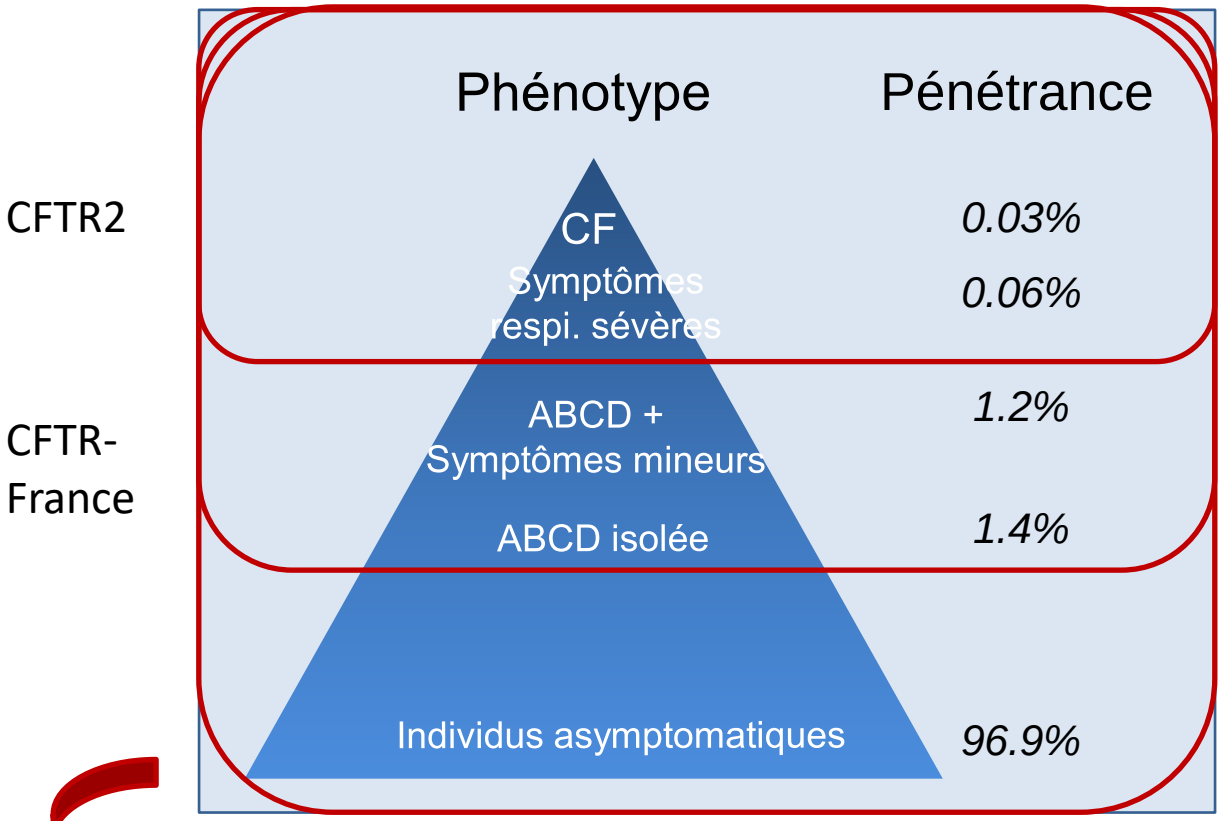
CF: 100%

CF: incomplète
CF/CFTR-RD: 100%
(VCC variant)

CF/CFTR-RD : très faible

CF: 0
CFTR-RD: faible/très faible

Interprétation des variants : pénétrance



R117H;T7 / F508del

Thauvin-Robinet.
J Med Genet 2009

R117H;T7 reclassé comme variant CFTR-RD avec pénétrance faible
Implication pour le conseil génétique (DPN, détection des porteurs)

Interprétation des variants : pénétrance

❑ Méthodes

Boussaroque, Audrézet et al., J Cyst Fibros 2020

- 15 variants *CFTR* : 5 fréquents CF + 10 classés VCC ou CFTR-RD
- Comparaison des fréquences alléliques dans CFTR2 et la population générale

- gnomAD
- données de la population française

CFTR2 Clinical and Functional Translation of CFTR

➢ **Les variants plus fréquents dans la population générale que chez les patients CF sont considérés non CF.**

- Estimation de la probabilité de détection au DNN

données 2002-2017

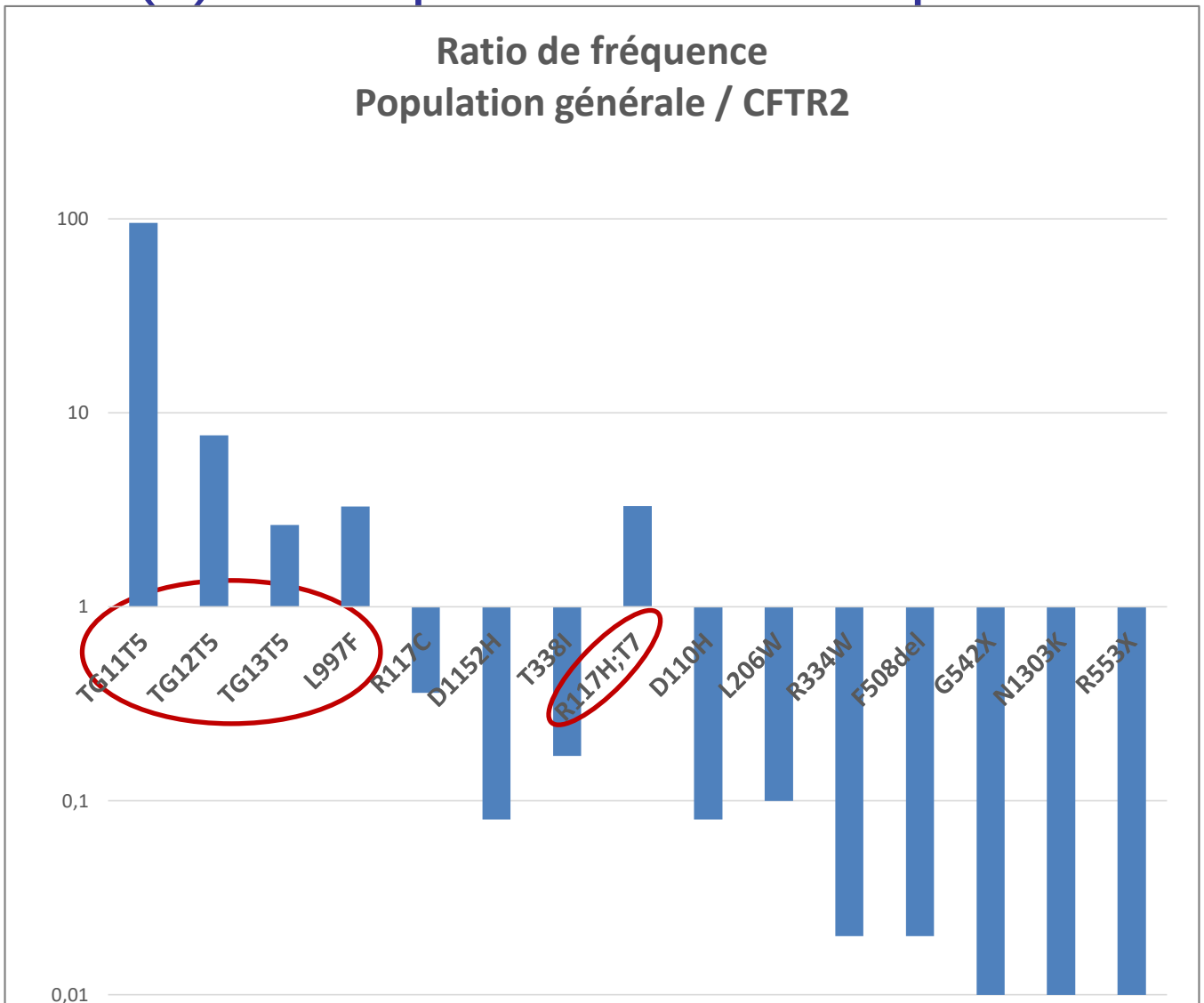
Société Française de Dépistage Néonatal

$$= \frac{\text{Nb de NN } \underline{\textbf{détectés au DNN}} \text{ porteurs d'un génotype donné}}{\text{Nb de NN } \underline{\textbf{attendus}} \text{ porteurs du même génotype}}$$

2 x fréquence allélique variant x fréquence allélique F508del x Nb NN

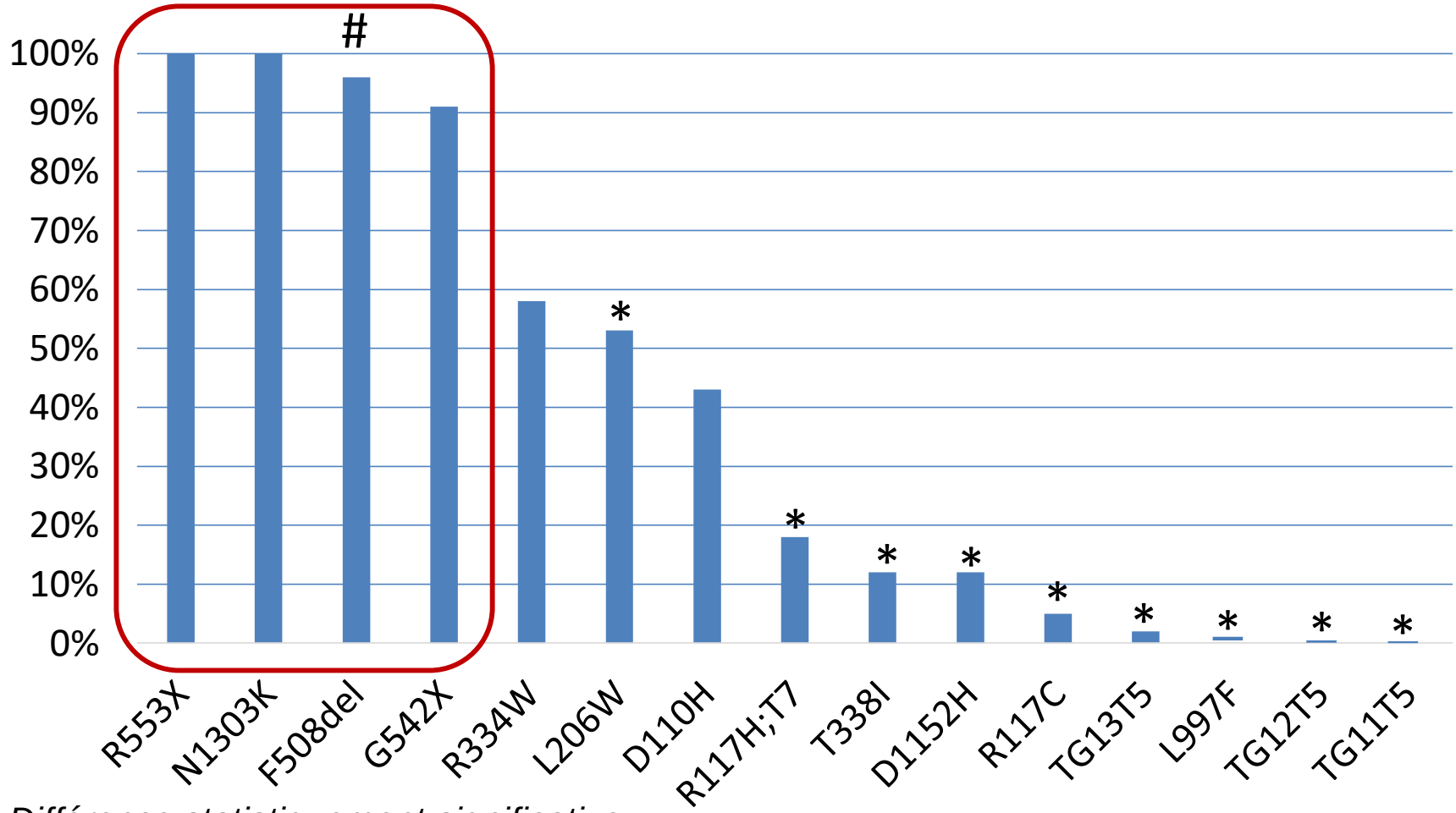
Interprétation des variants : pénétrance

- Résultats (1) : Comparaison des fréquences alléliques



Interprétation des variants : pénétrance

❑ Résultats (2) : probabilité de détection au DNN

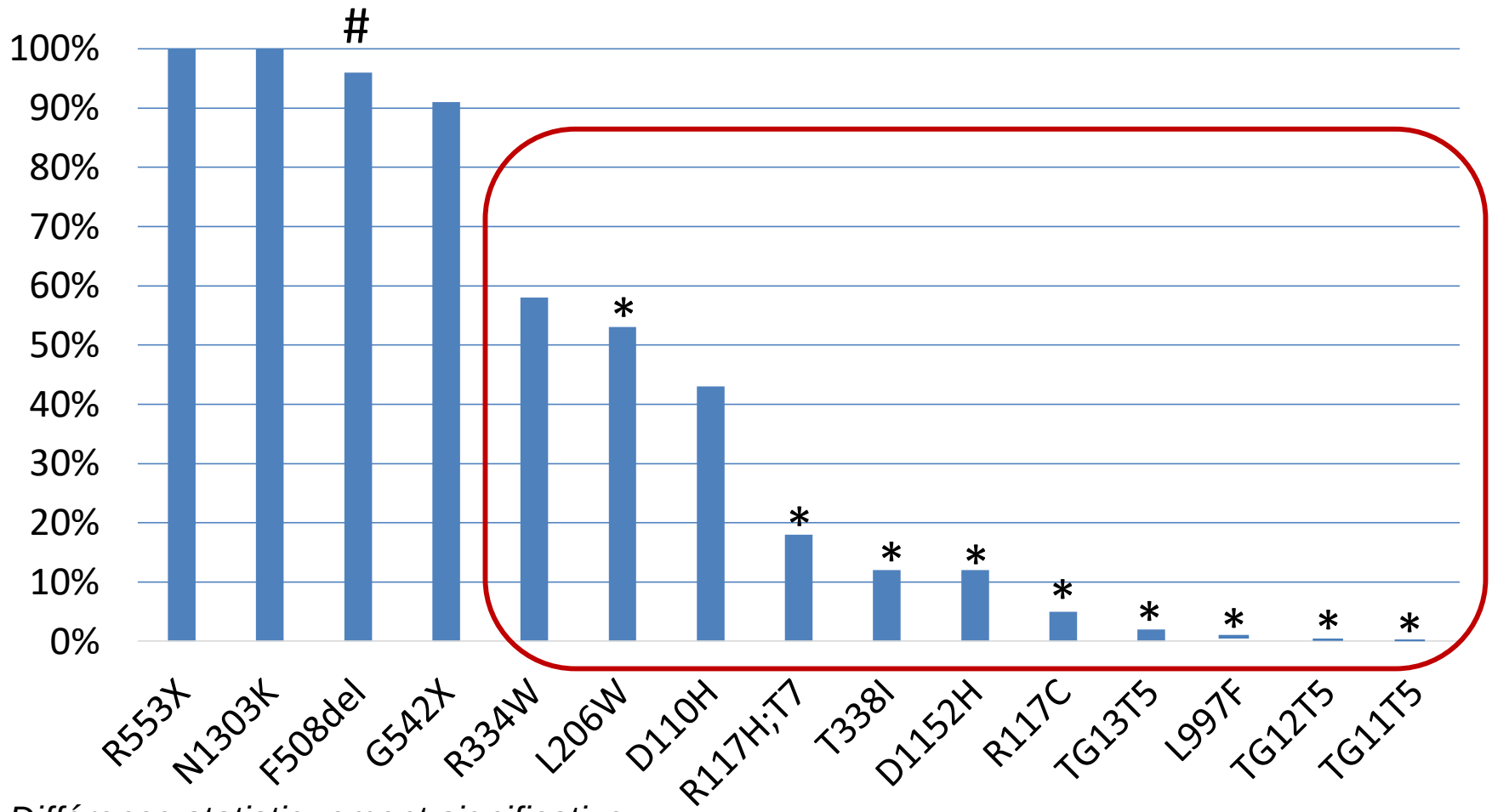


** Différence statistiquement significative*

 # Ratio corrigé à 95,59% en prenant en compte les IMG après diagnostic prénatal

Interprétation des variants : pénétrance

❑ Résultats (2) : probabilité de détection au DNN



** Différence statistiquement significative*

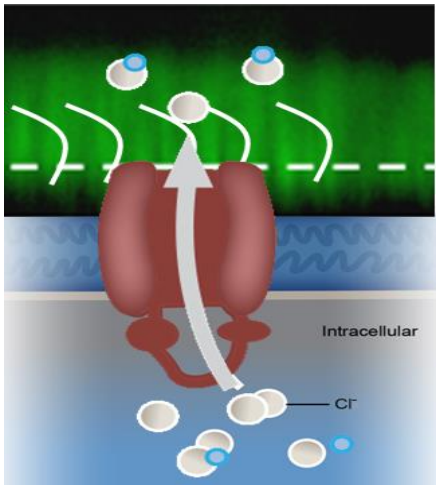
 # Ratio corrigé à 95,59% en prenant en compte les IMG après diagnostic prénatal

Outils du diagnostic et stratégies

- Outils du diagnostic génétique
- **Outils d'explorations fonctionnelles in vivo et ex vivo**
- Outils d'explorations in vitro
- Arbre décisionnel

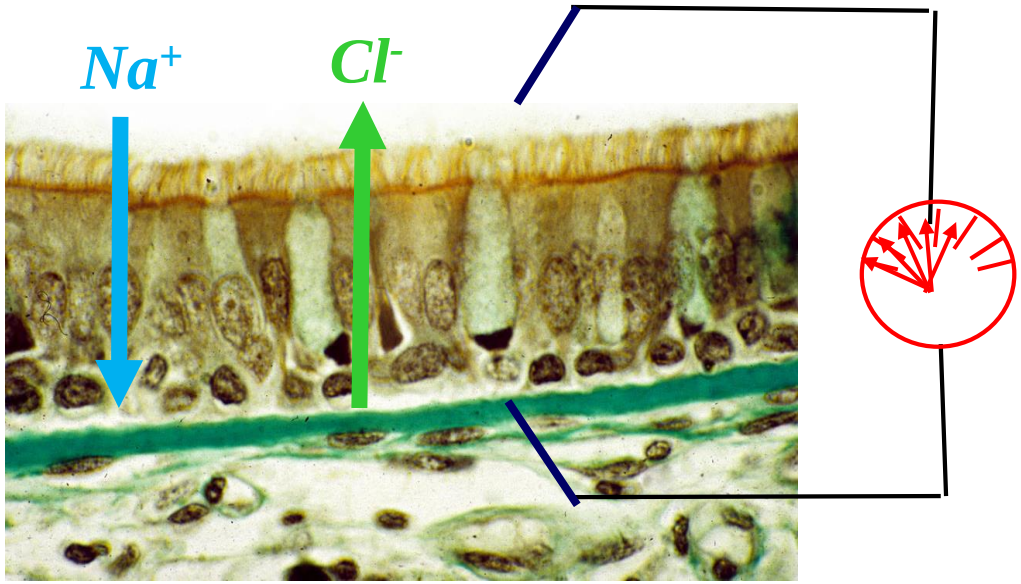
(Dys)fonction (re)liée à CFTR

CFTR un canal anionique (Cl^-)

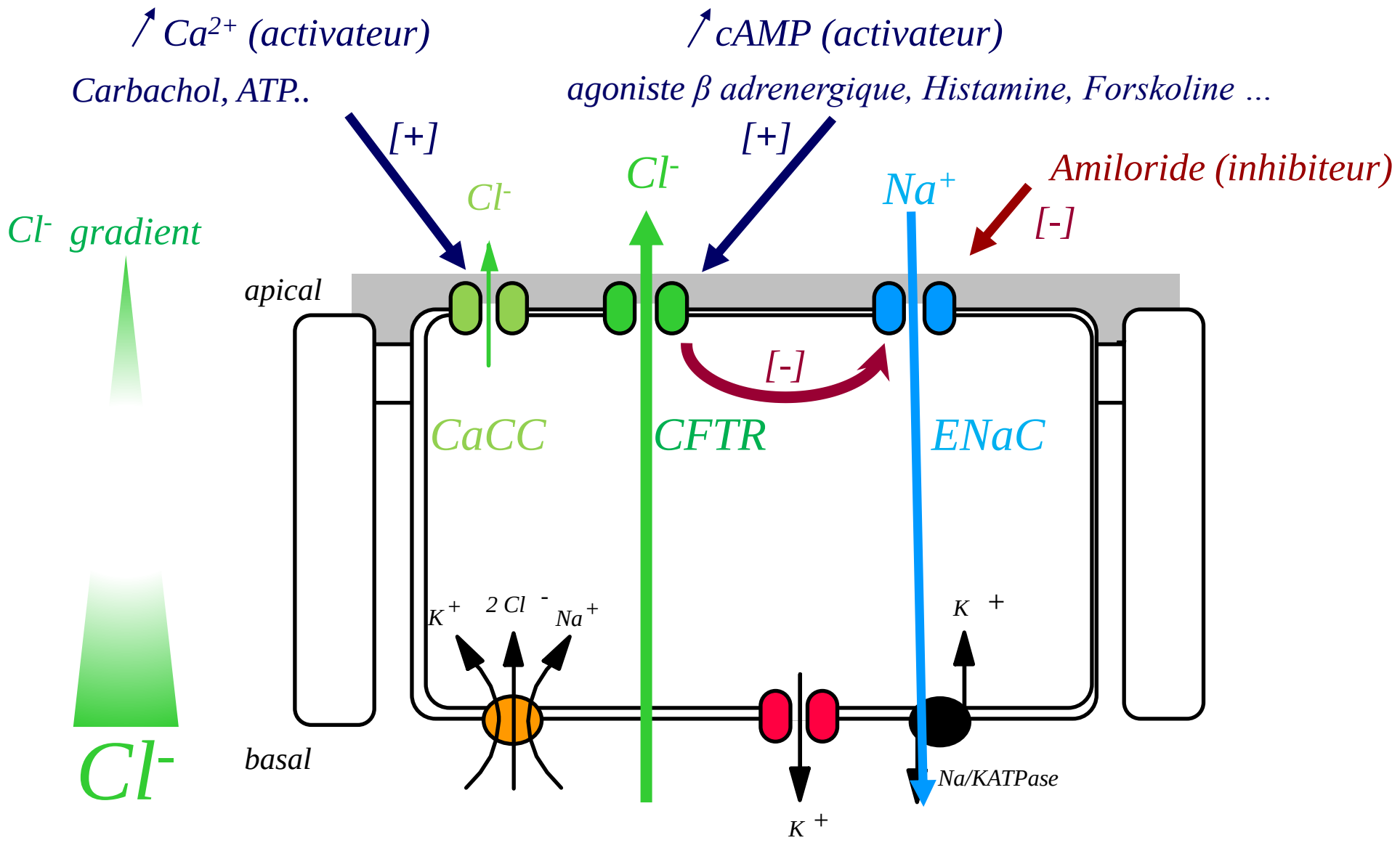


À la membrane apicale

Mesure du flux transépithélial
Activation/inhibition de CFTR

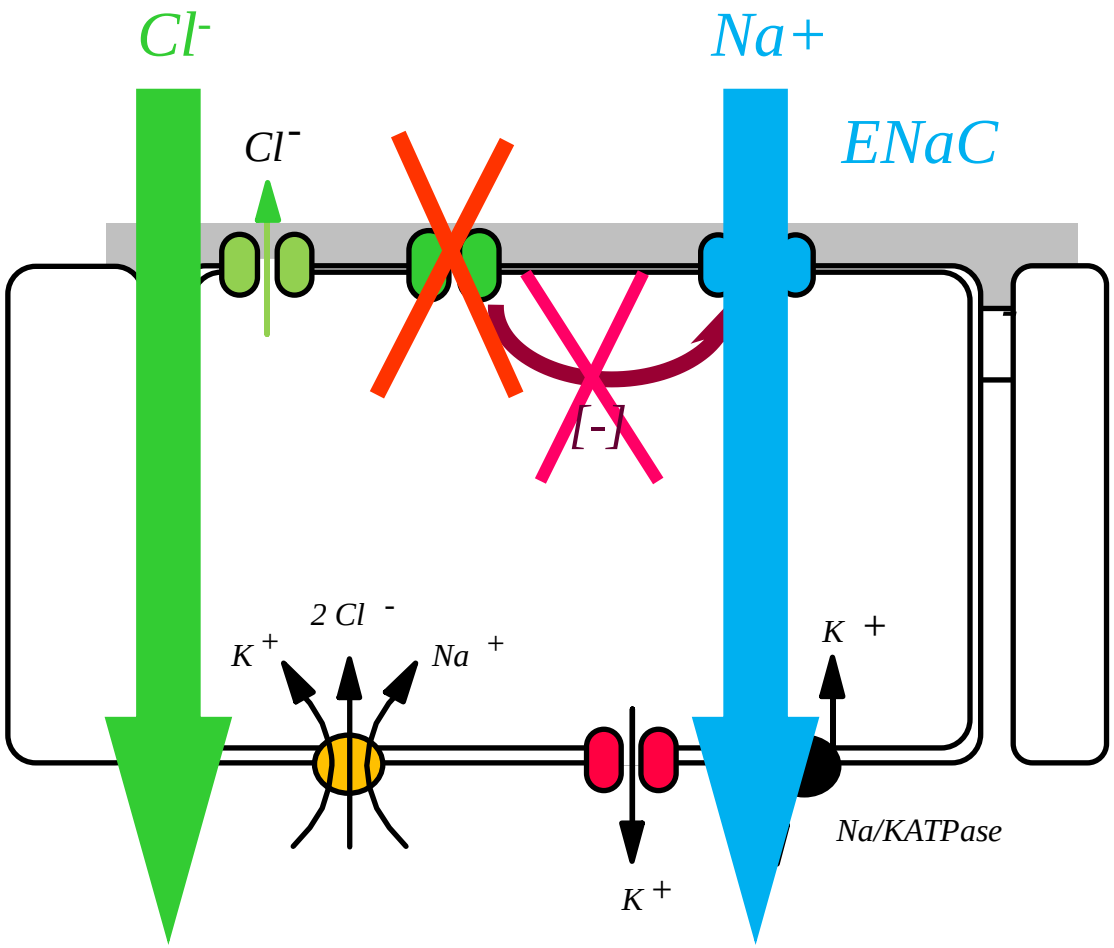


Physiologie du transport ionique trans épithélial

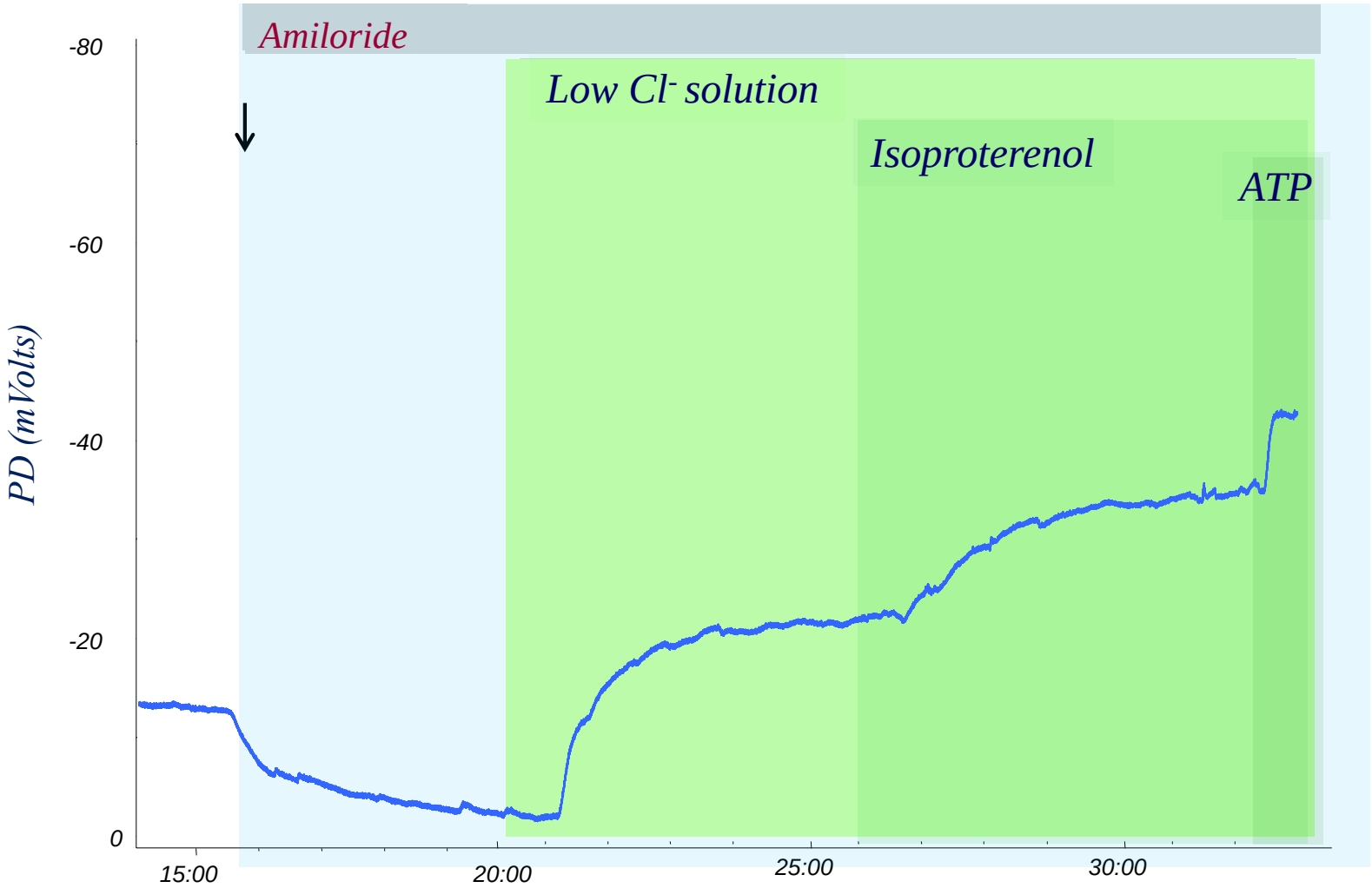


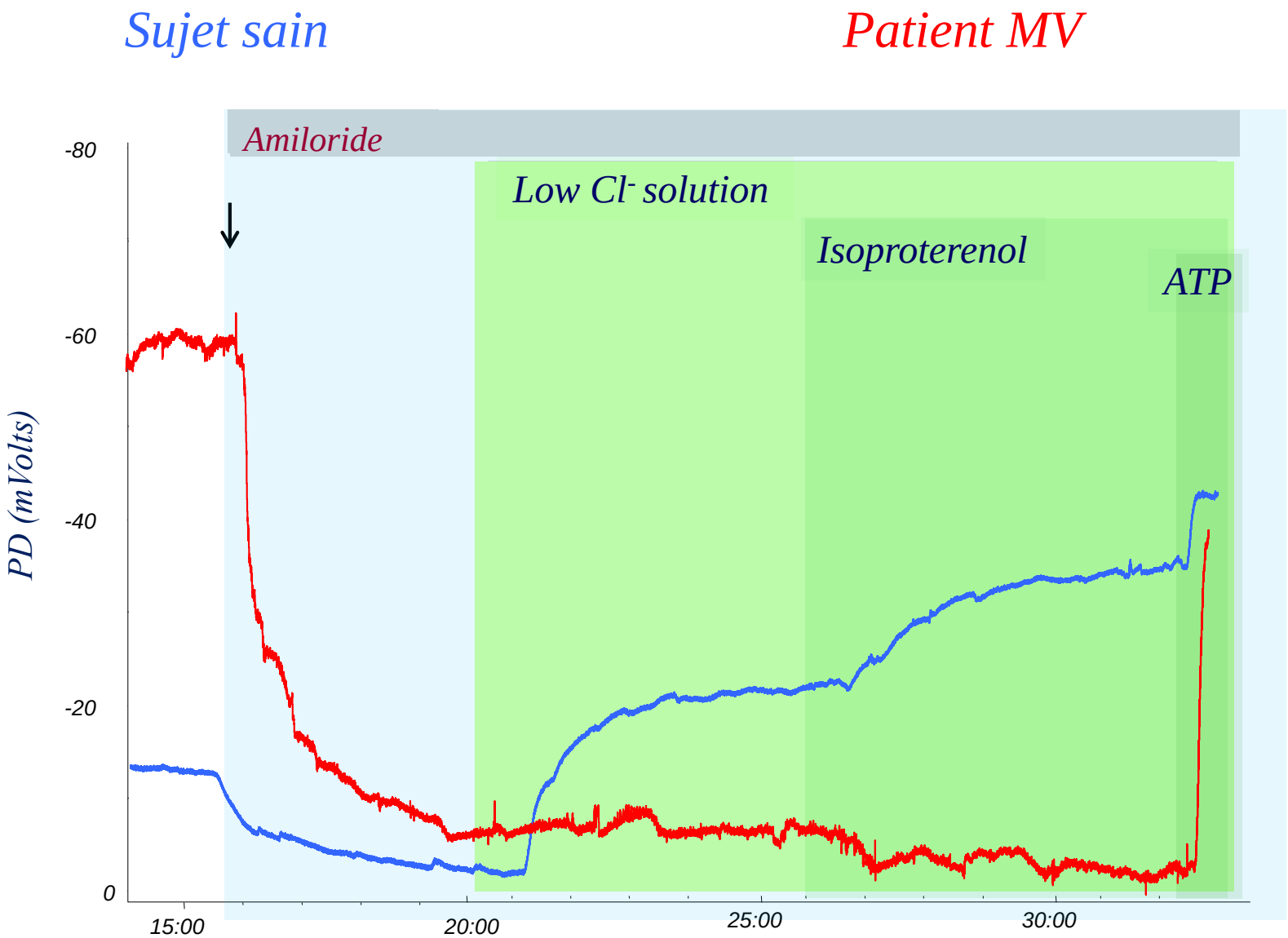
CFTR : Dysfonction/absence

ENaC: hyperactivation



Sujet sain

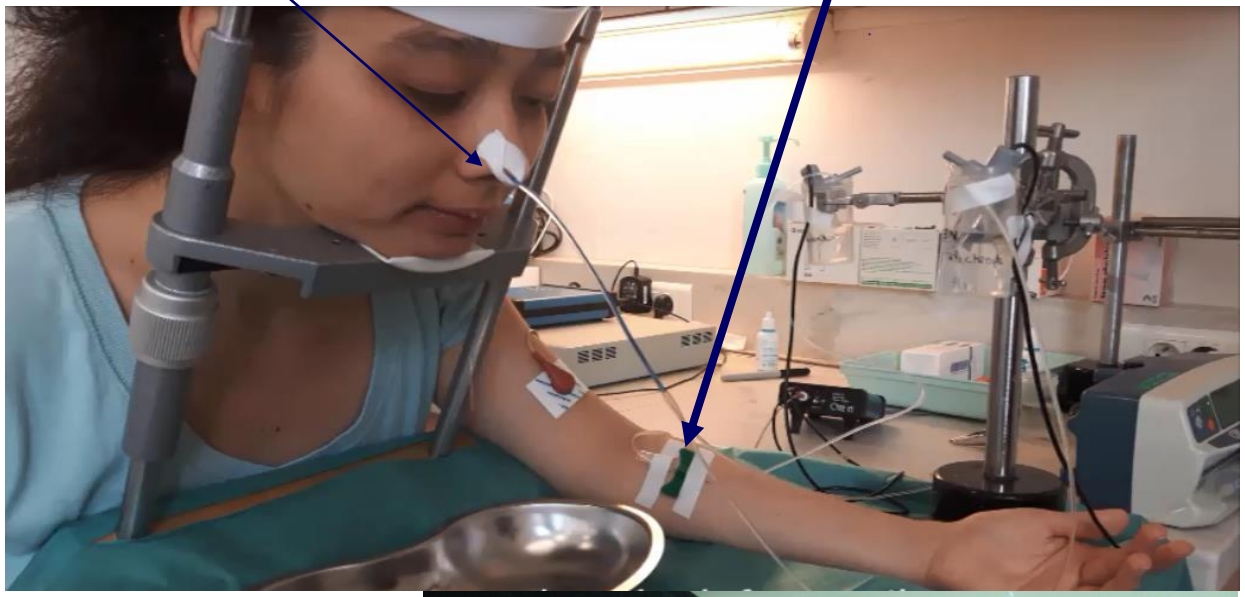

Amiloride
Low Cl- solution
Isoproterenol
ATP
PD (mVolts)
-80
-60
-40
-20
0
15:00
20:00
25:00
30:00

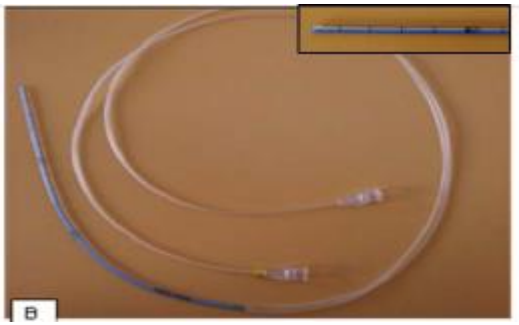

Sujet sain
Patient MV
Amiloride
Low Cl- solution
Isoproterenol
ATP
PD (mVolts)
-80
-60
-40
-20
0
15:00
20:00
25:00
30:00

Différence de potentiel nasal

Electrode de mesure

Electrode de référence





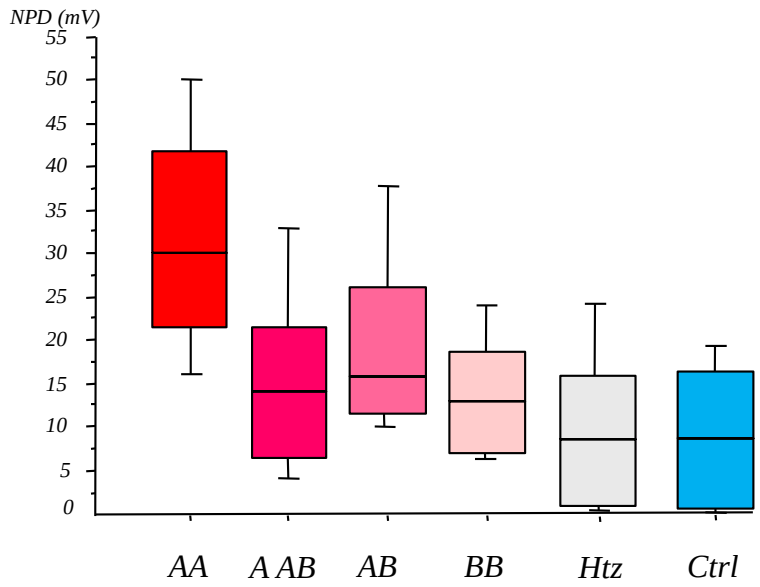
www/CTN-TDN Sops

Continuum de la dysfonction de transport ionique

A: CF causing; B: CFTR related disorder; D: inconnu

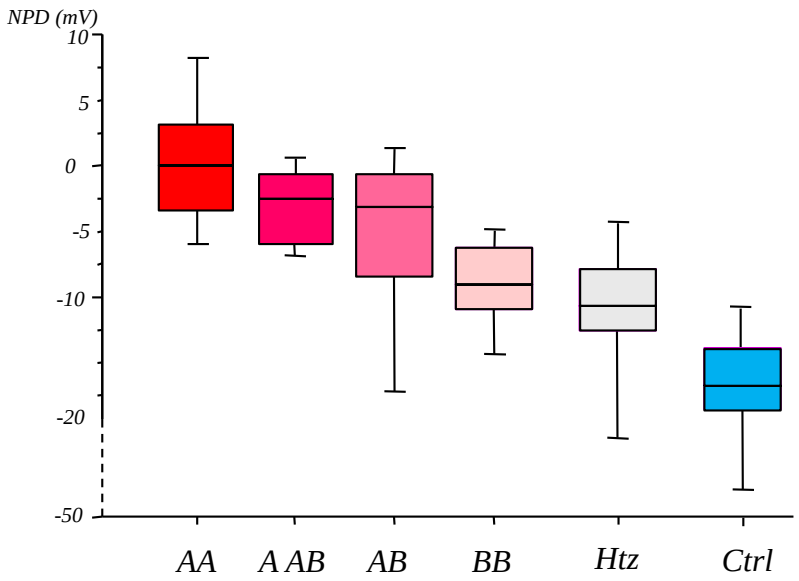
Castellani et al. J Cyst Fbr 2008

Na^+ Transport



Normal

Cl^- Transport



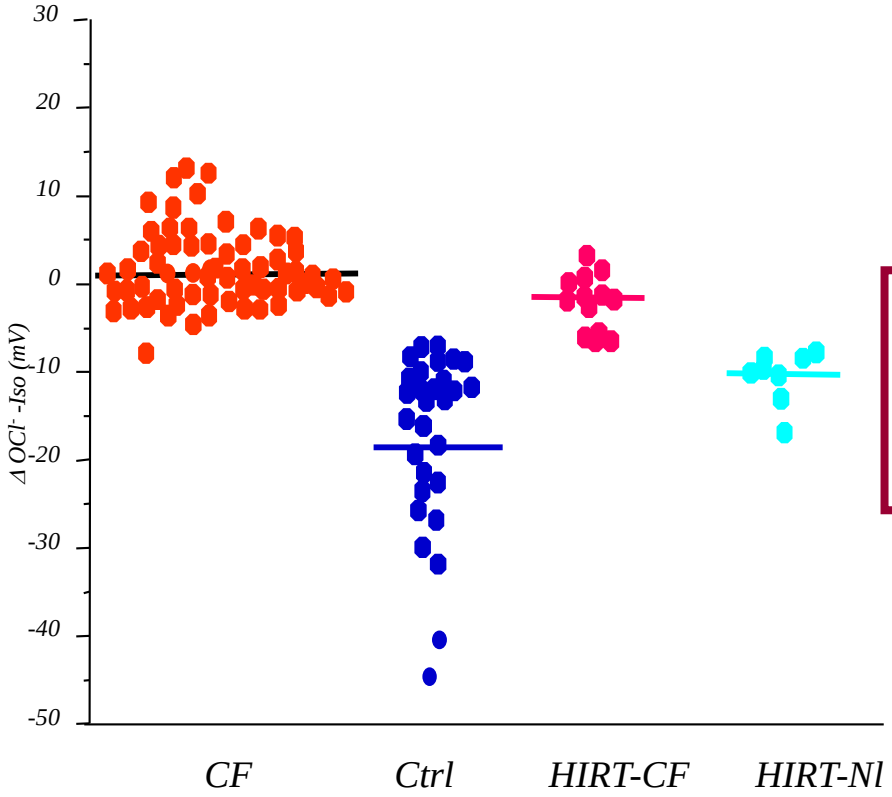
- *A-A CF causing mutations (n=255)*
- *A-AB large spectrum mutation (VCC) (n=30)*
- *A-B CFTR related disorders (n=33)*
- *B-B CFTR related disorders (n=15)*
- *Heterozygotes (n=40)*
- *Ctrl (n=44)*

Necker parisian cohort

Enfants non conclus du dépistage néonatal
Analyse en NPD

11/13 avec un test anormal

Avaient 2 Mutations CFTR à l'analyse génétique extensive



CFTR genotypes	Diagnosis score >0.27 (8 patients)	Diagnosis score ≤0.27 (13 patients)
A/A	0	F508del/621+3A→G F508del/Q1291R
A/AB	F508del/R347H F508del/R117H;T7	W846X/R117C n=2 F508del/R1070W 2183AA→G/L206W F508del/3272-26A→G F508del/R117H;T7; n=4
A/D	0	F508del/R933G G551D/R352Q
B/D	G622D/3849+45G→A	0
A/0	F508del/0 n=2	0
0/0	3	0

Ces enfants développent des signes compatibles avec la MV dans les 3 ans

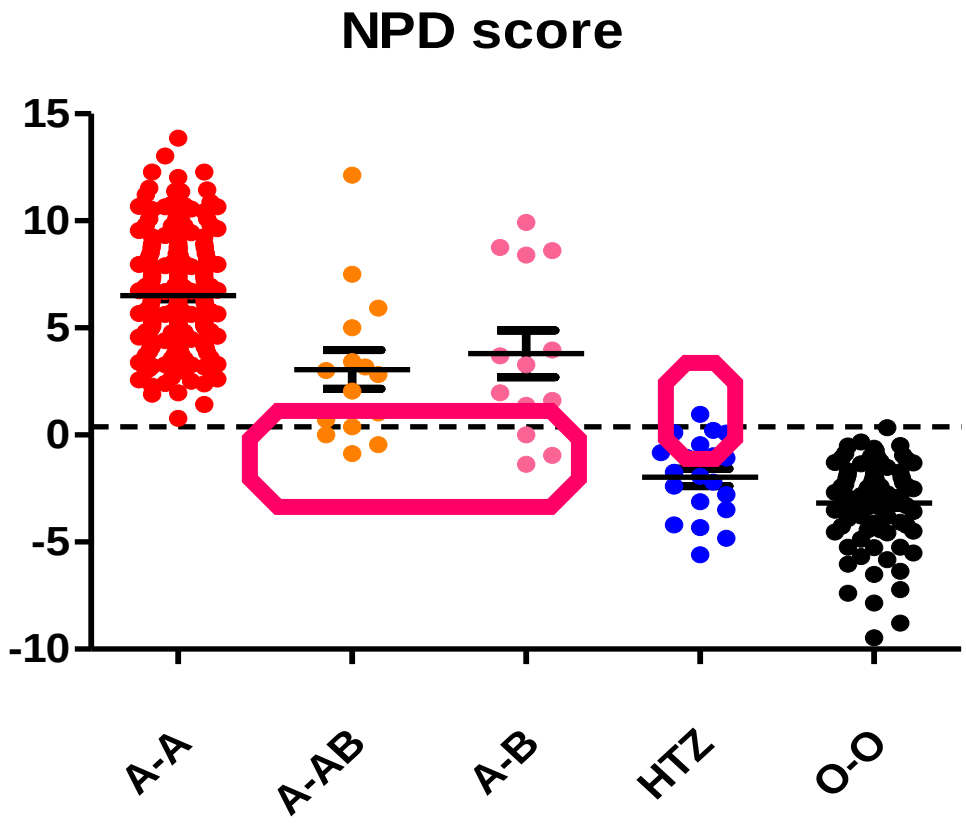
Table 2 Clinical characteristics of children with hypertrypsinaemia (HIRT) at birth and at follow-up according to the diagnostic score cut-off

	HIRT-NI (8)	HIRT-CF (13)	
At follow-up			
Age (years)	3.4 (3)	4.1 (1.4)	0.88
Sweat test >60 mmol/l	0/5	6/9	0.03
Sweat Cl^- (mmol/l)	18 (14.5); n=5	64 (36); n=9	0.004
Recurrent lower tract infection*	0/8	8/13	0.007
Chronic *P aeruginosa*	0/8	1/13	0.9
Chronic *S aureus*	0/8	3/13	0.25
Transient isolation of *P aeruginosa*	0/8	2/13	0.5
Transient isolation of *S aureus*	3/8	4/13	0.9
Airway obstruction	1/8	4/13	0.6
Bronchiectasis	0/8	3/13	0.25
BMI Z-score	−1.2 (1.6)	0 (2)	0.04
Pancreatic insufficiency	0/8	1/13	0.99
Alternative diagnosis	6/8	0/13	0.0005

« CF likely » : 9/13 have a CF-like pulmonary disease; 6/9 have a sweat test > 60 mM/L
« CF unlikely »: 6/8 have an alternative diagnosis; 6/6 have a sweat test <40 mM/L

Sermet-Gaudelus et al. Thorax 2010

Score DDP

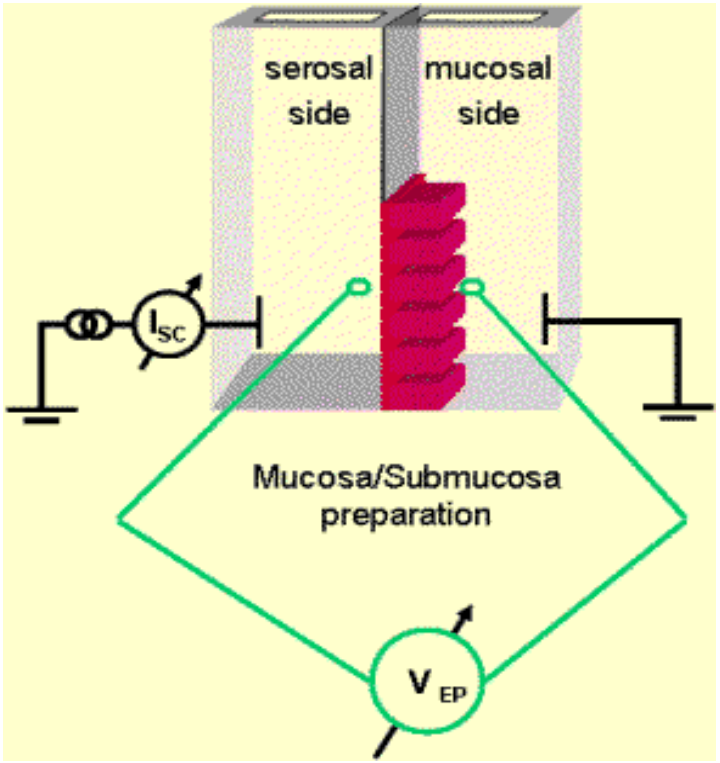


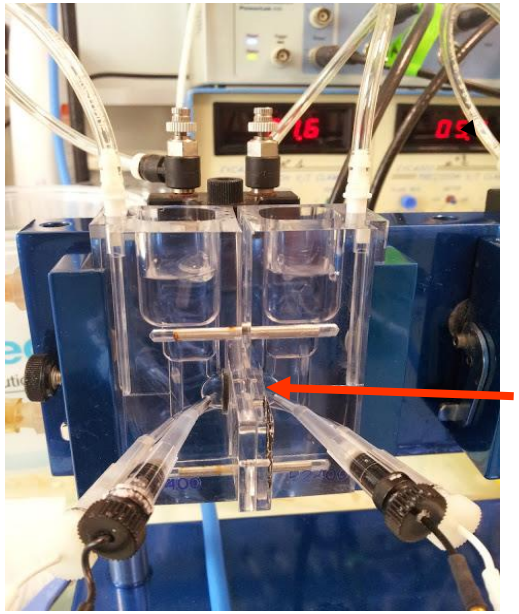
Cut-off CF: ≥0.39

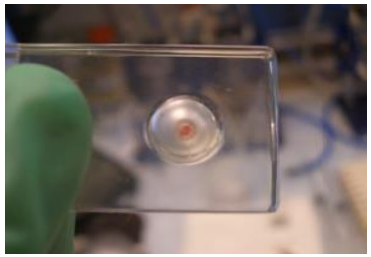
se 97.6%; sp 100%

Courant de court circuit sur biopsie rectale

Tissu natif, pas d'infection, isolé de l'environnement exprimant fortement CFTR
Enfant non coopérant, indolore



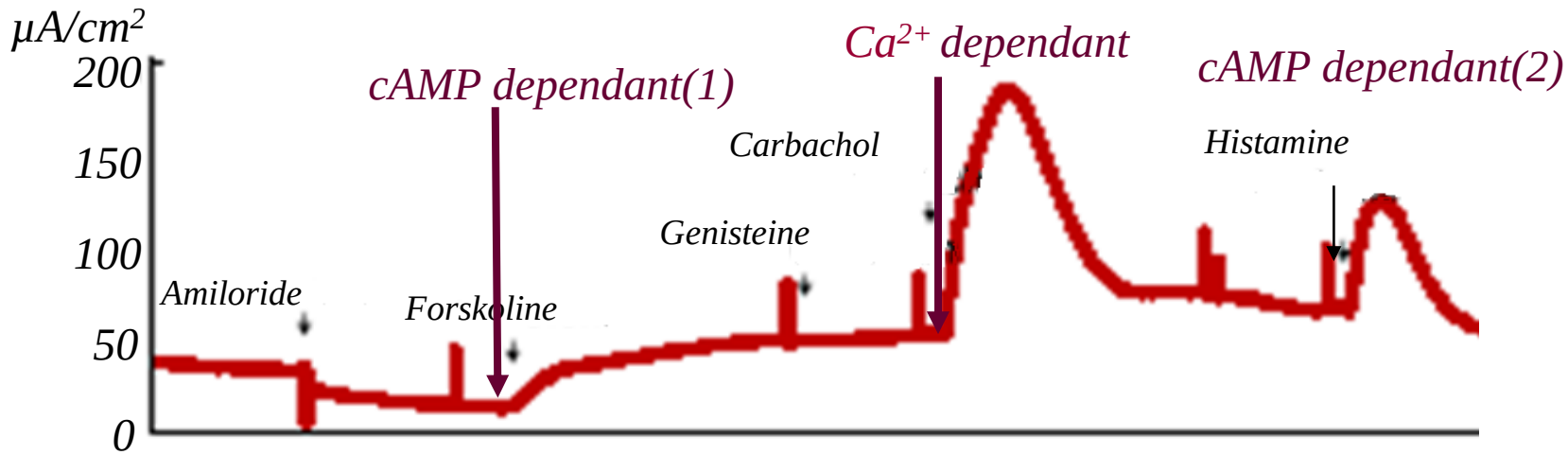




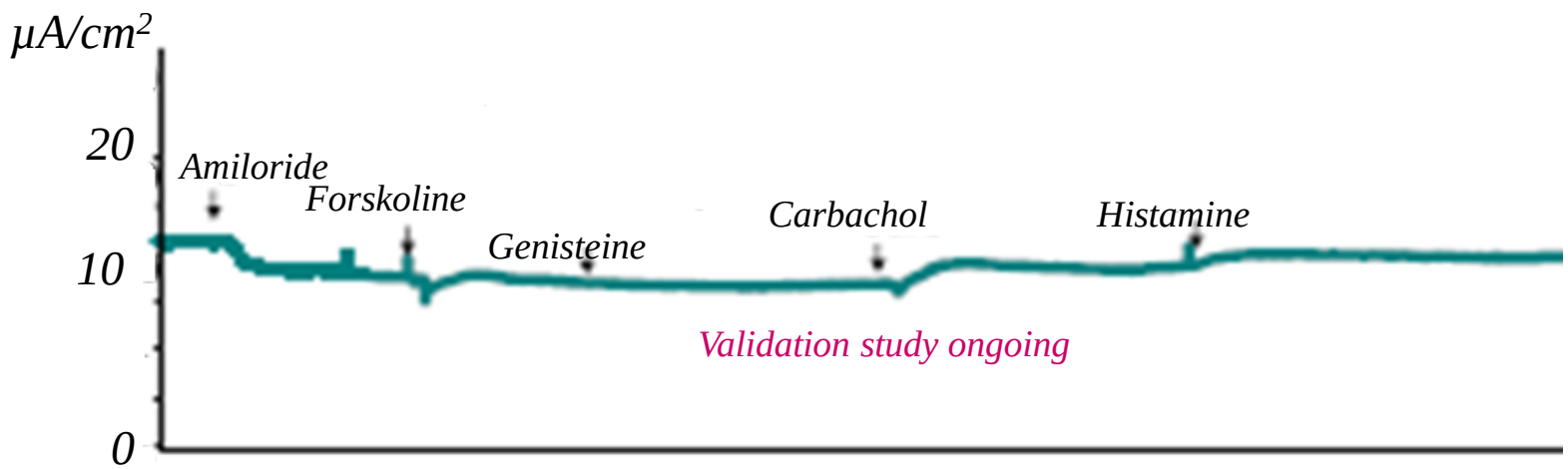
www/ECFS/CTN/SOPs

CFTR le transporteur dominant de Cl- au niveau intestinal

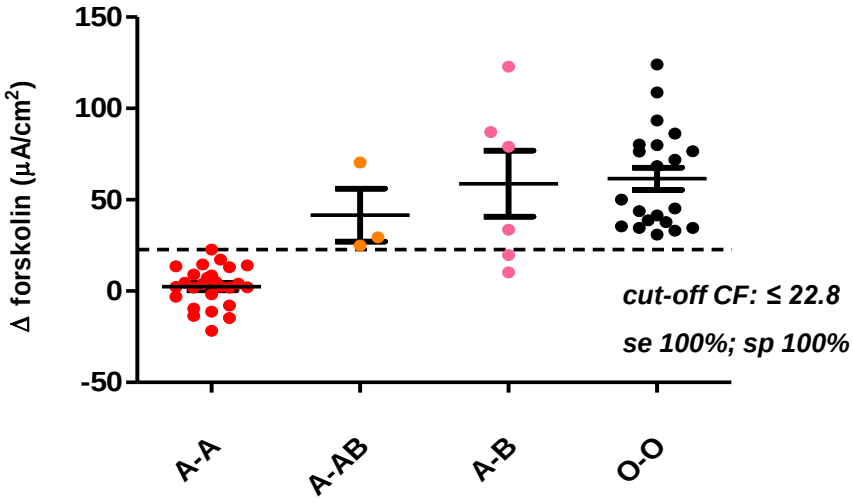
Sujet sain

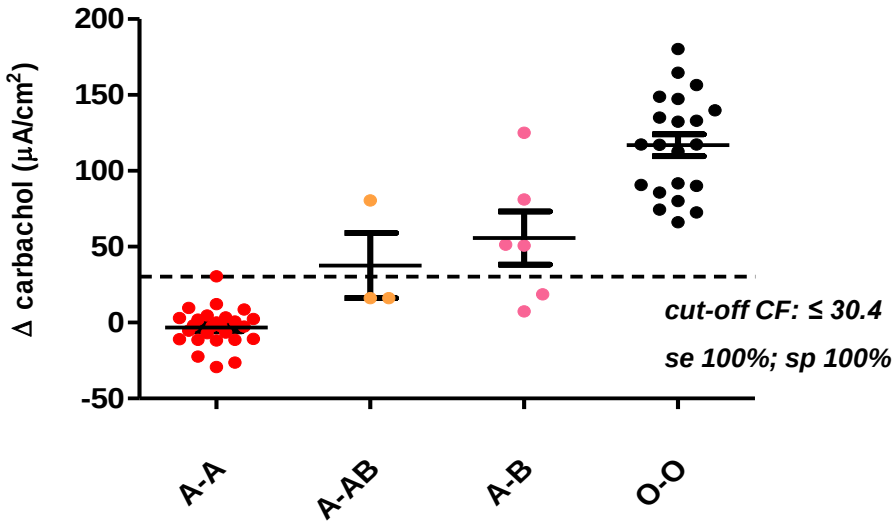


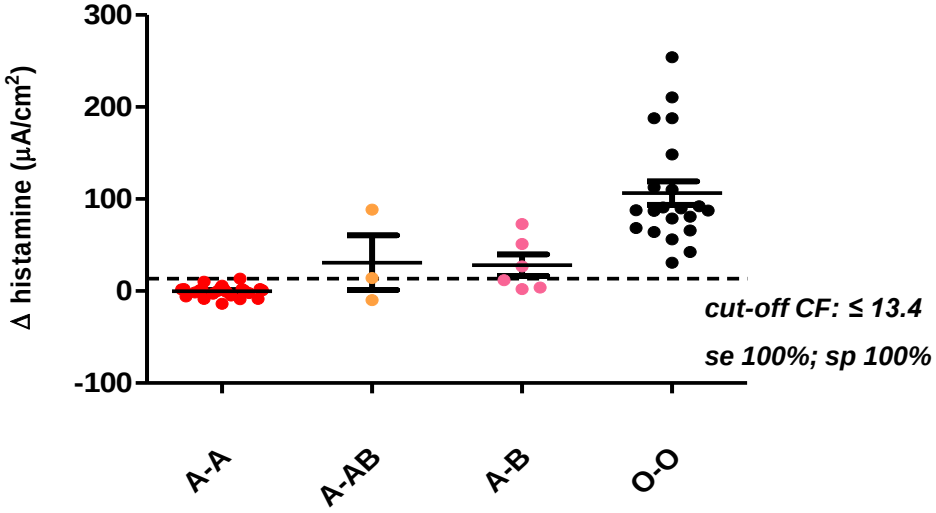
Sujet MV



Continuum de la dysfonction de transport ionique







A-A n= 26

A-AB n= 3

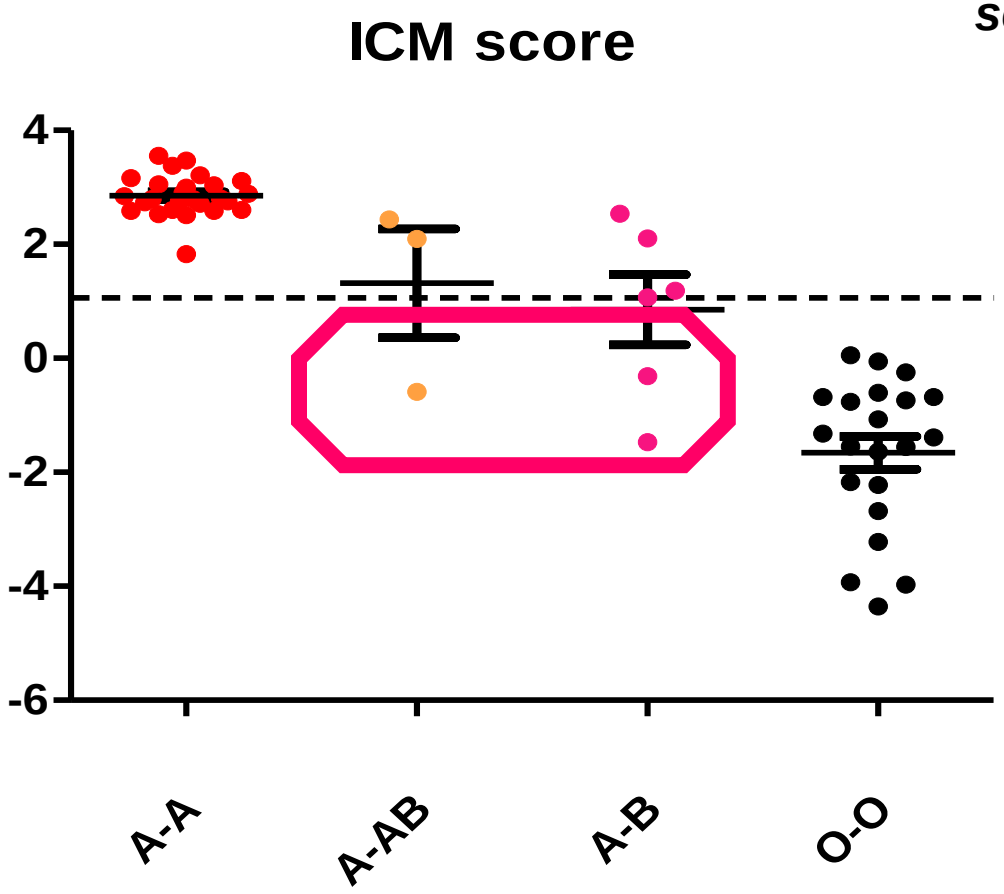
A-B n= 6

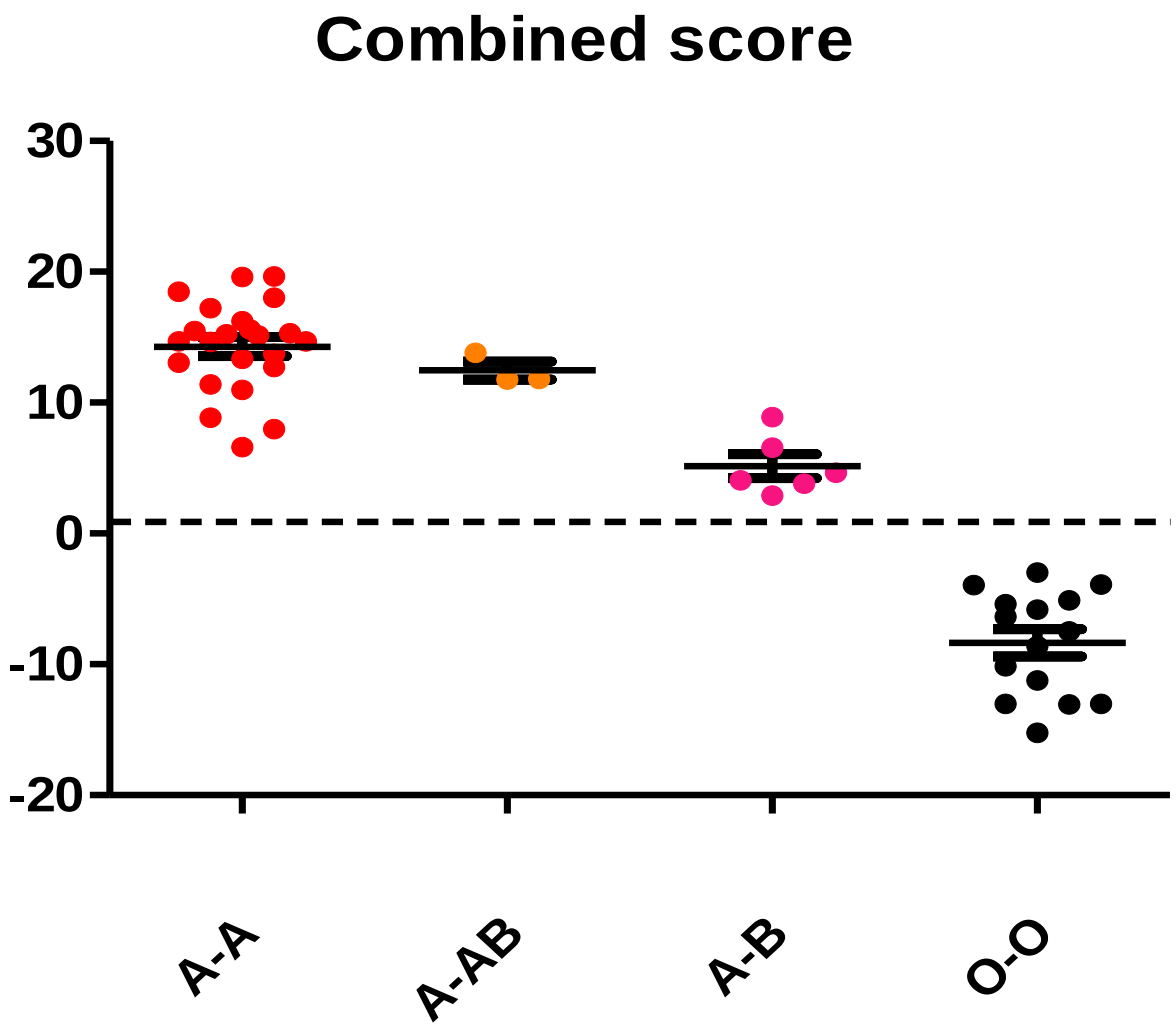
O-O n= 21

Score ICM

cut-off CF: ≥1.06

se 94.3%; sp 100%



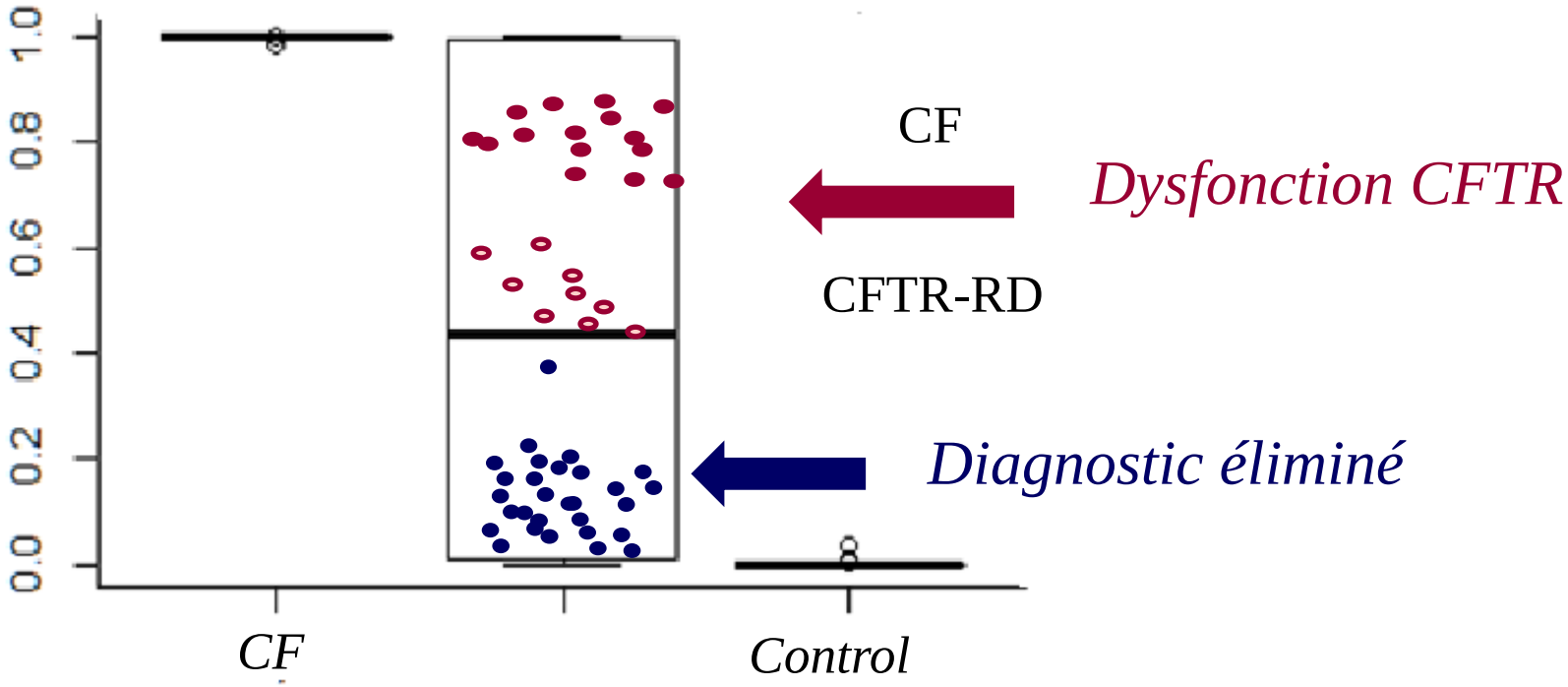


Cut-off CF: ≥0.90

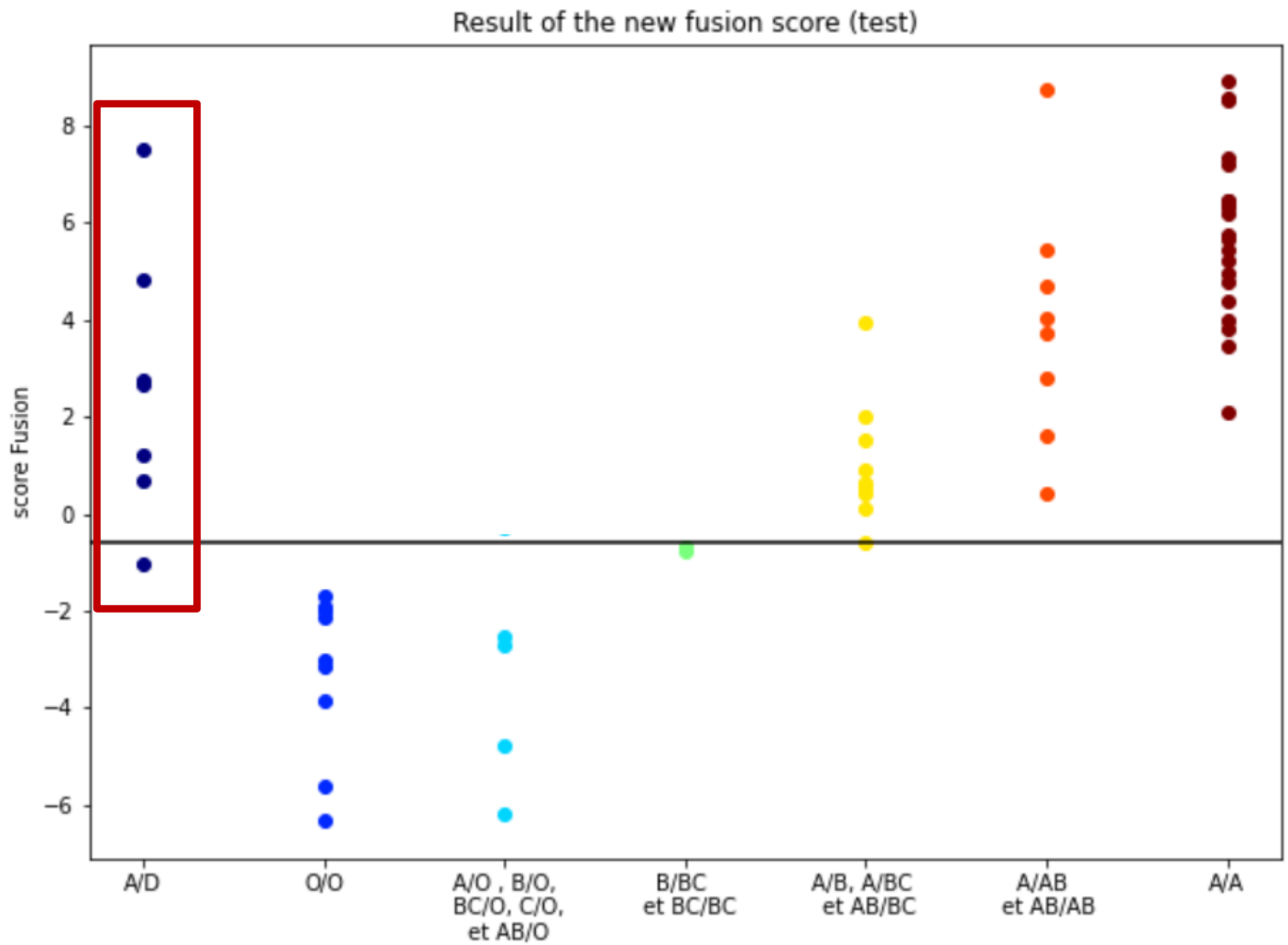
se 100%; sp 100%

Fonction CFTR

Risque de développer des atteintes cliniques CF/CFTR-RD

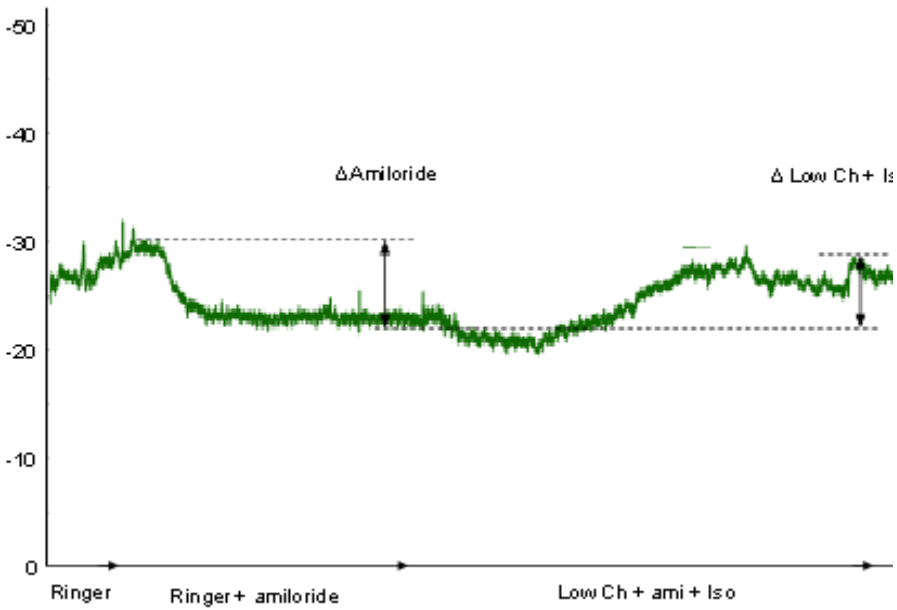


Cas indéterminés

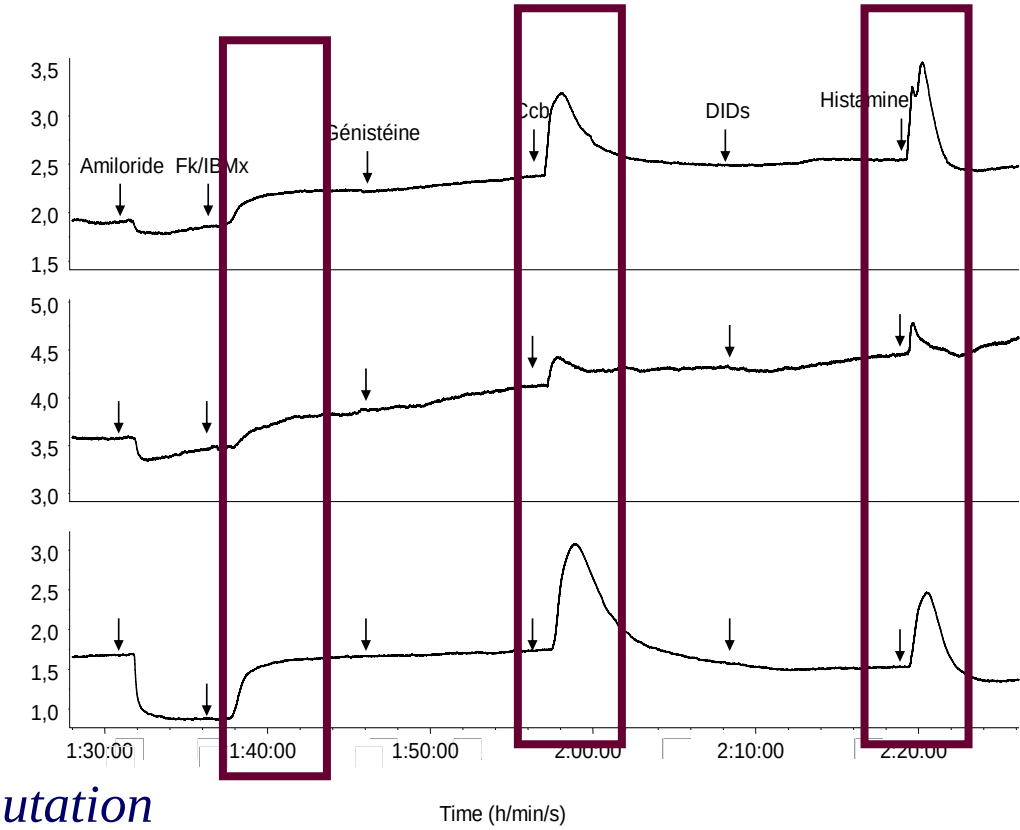

Result of the new fusion score (test)
score Fusion
8
6
4
2
0
−2
−4
−6
A/D
O/O
A/O , B/O,
BC/O, C/O,
et AB/O
B/BC
et BC/BC
A/B, A/BC
et AB/BC
A/AB
et AB/AB
A/A
Sain
Htz
Tg11T5
CFTR-RD
VCC
CF

(1) Eliminer le diagnostic

« Intermediate » NPD



Normal ICM

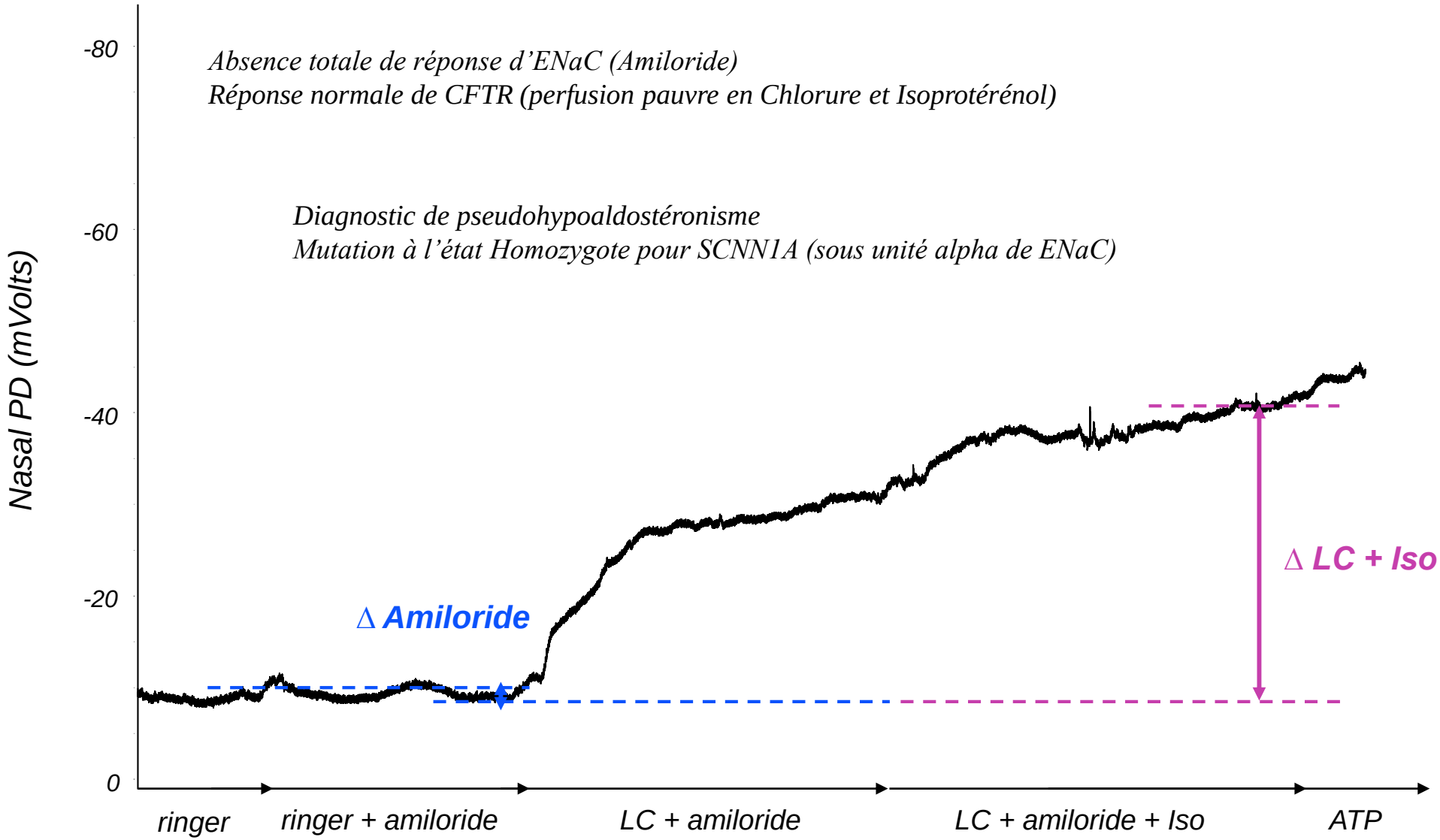


Pas de mutation

Test de la sueur: 36, 38, 40 mM/L

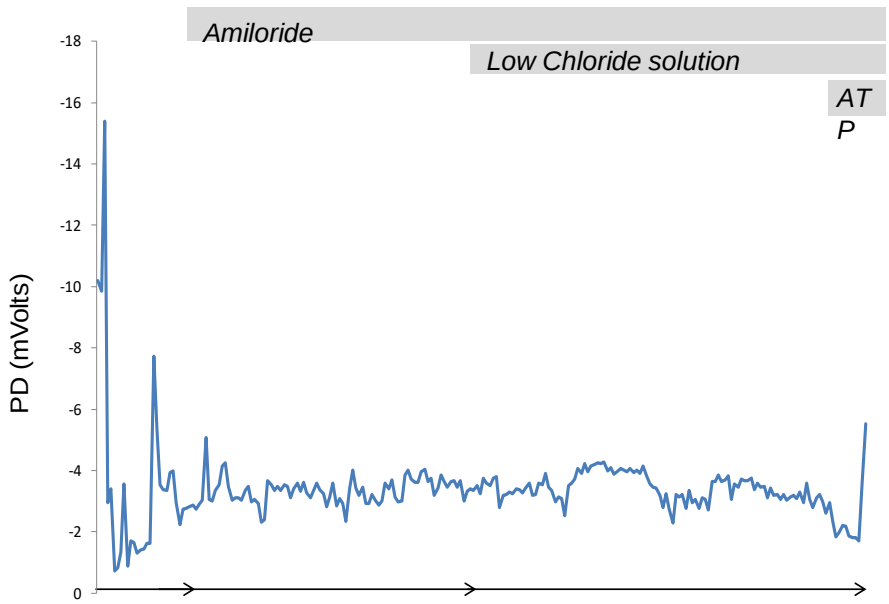
IPEX syndrom !

ddp nasale le 12/03/2018
Narine droite

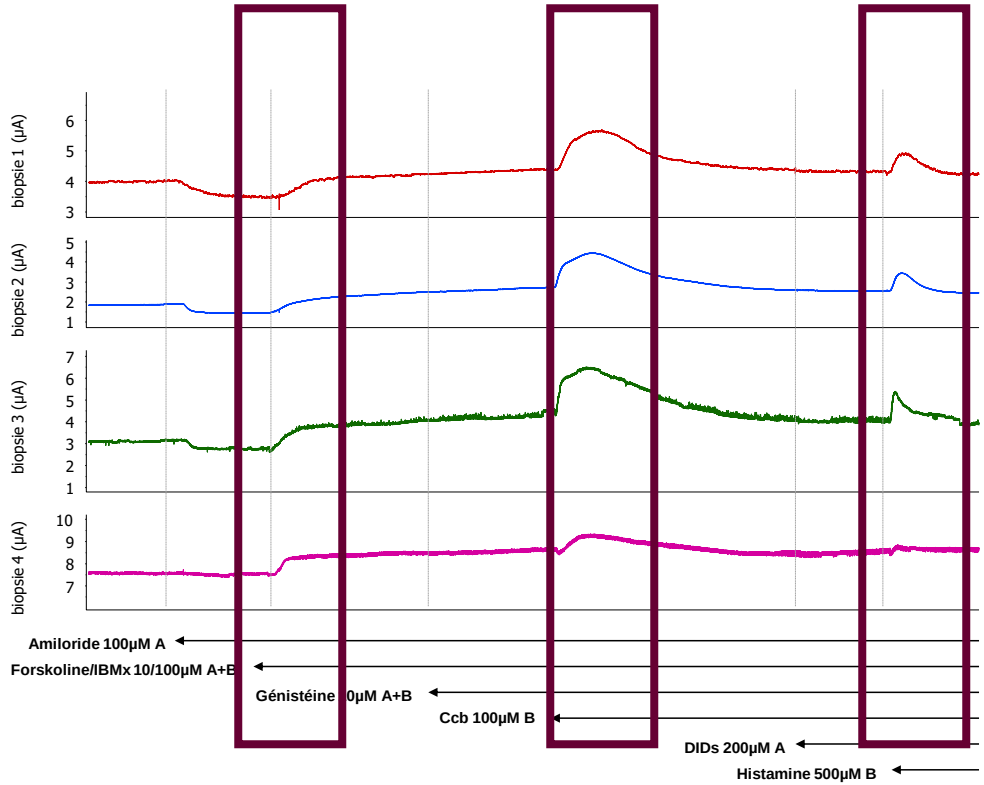


(2) Dysfonction CFTR

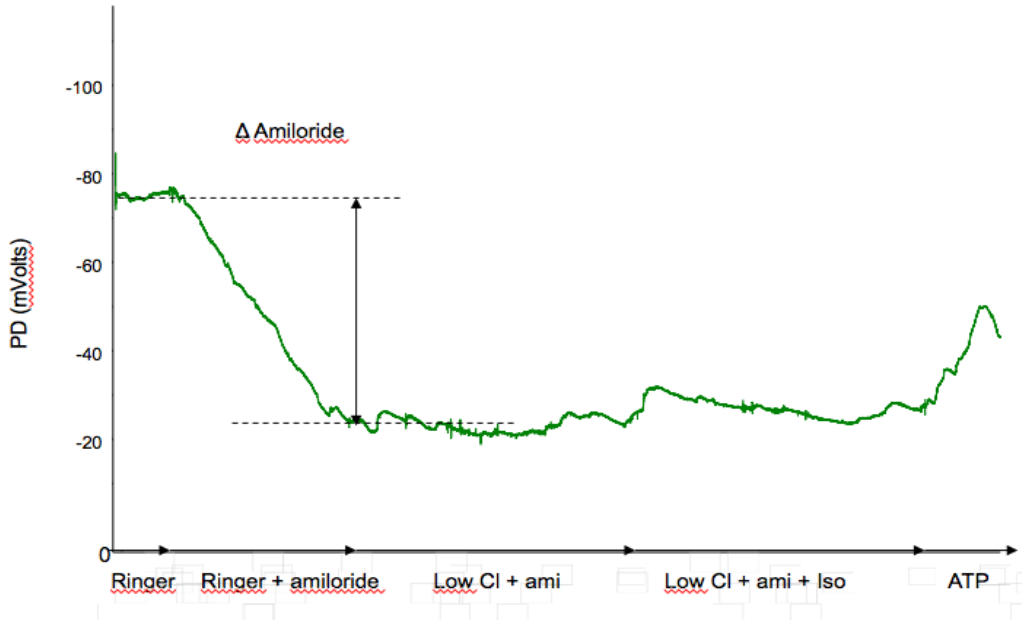
NPD not interpretable

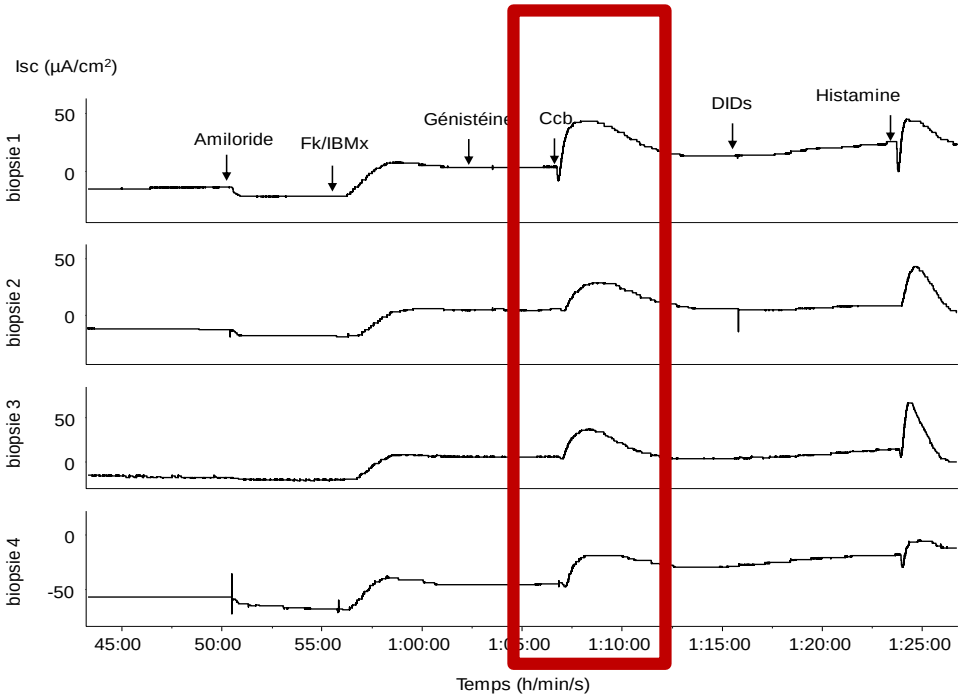


Abormal ICM



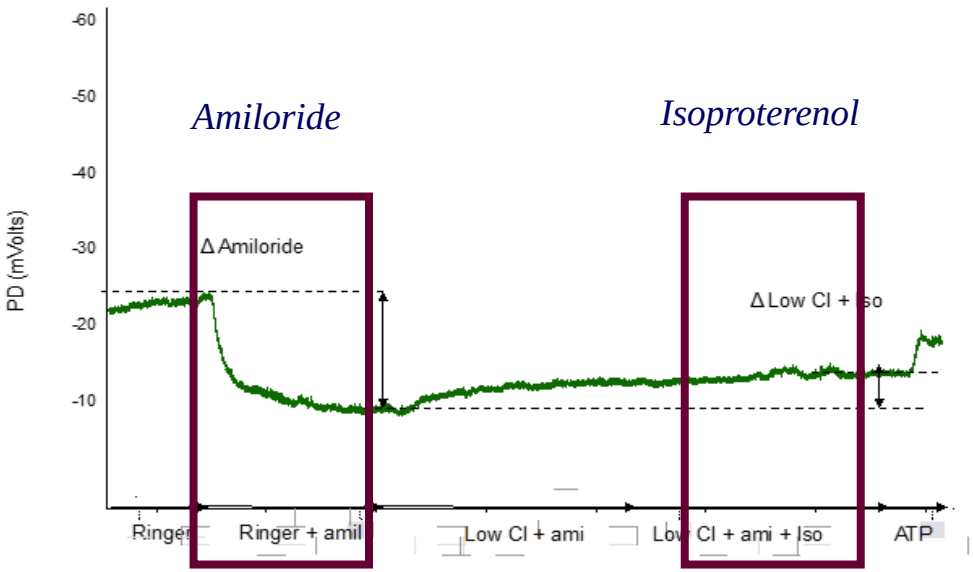
R334W (pArg334Trp)/M1028R (p.Met1028Arg)
Test de la sueur: 40,34,40,50,48 mM/L

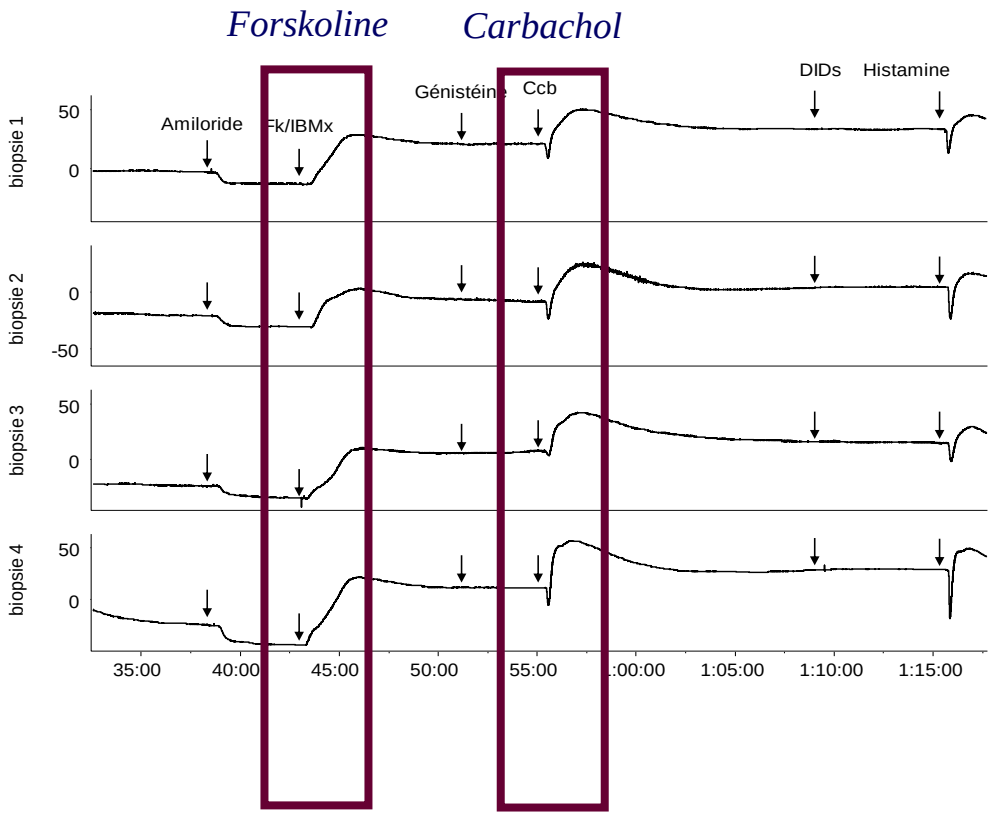




F508Del/c.1585-9412A>G

Mutation intronique enfouie



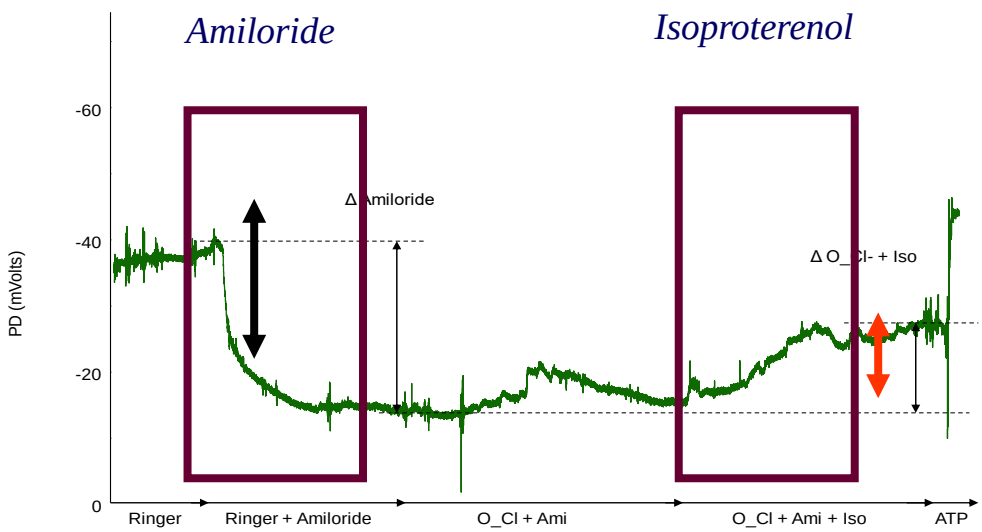


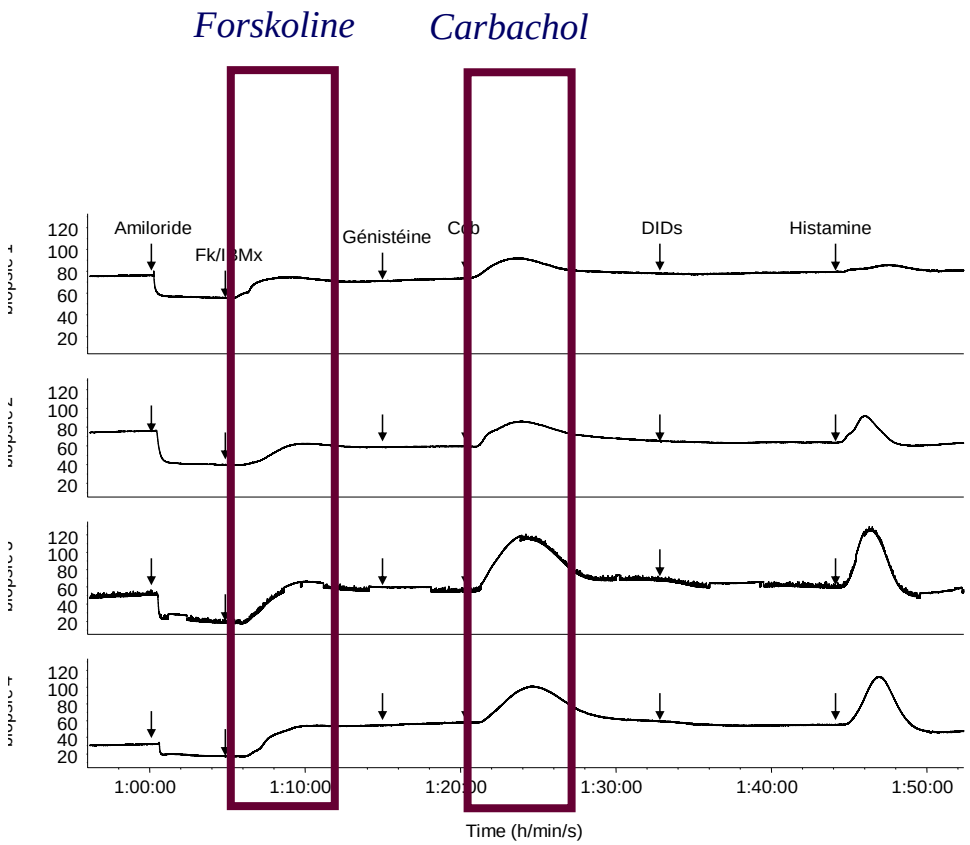
1717-1G>A/c.3874-4522A>G

TS : 52, DDBs

Dysfonction partielle de CFTR

(3) Variants inconnus



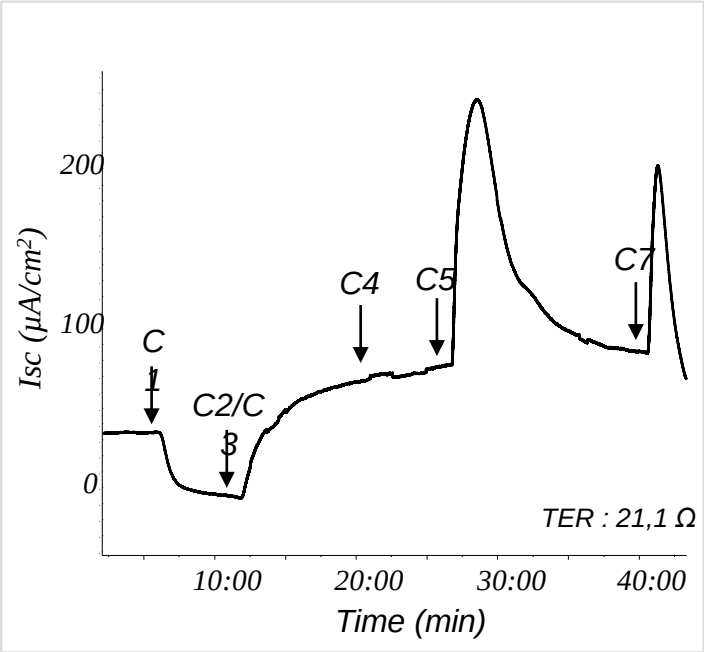


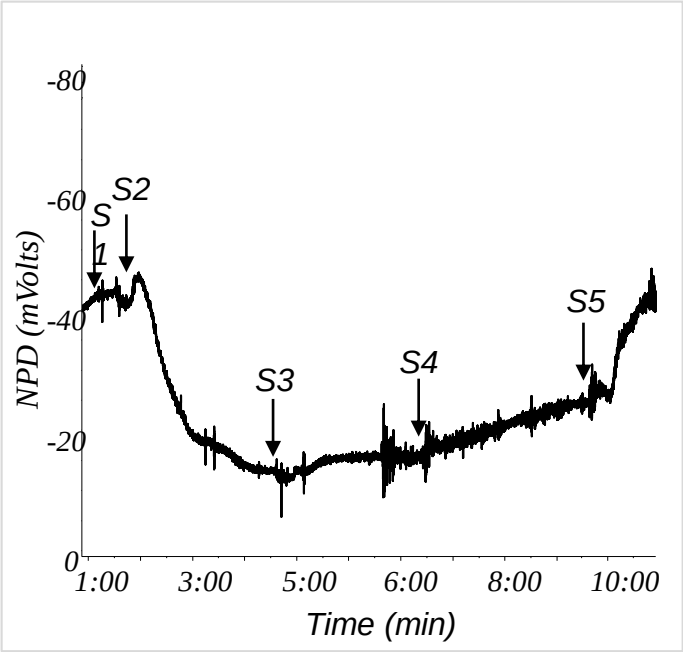
F508del/F1099L

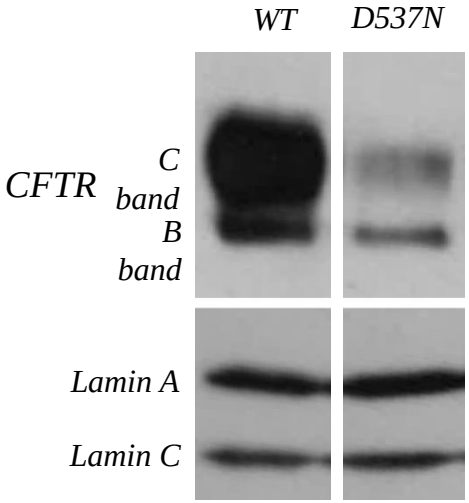
TS normal, Polypose

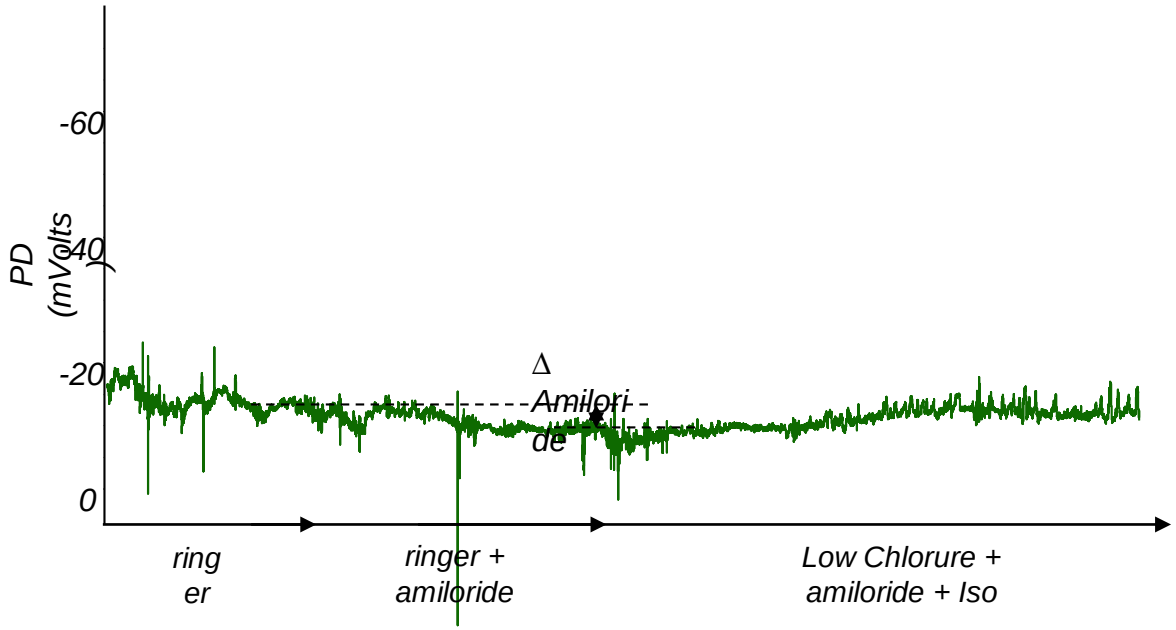
Dysfonction partielle de CFTR

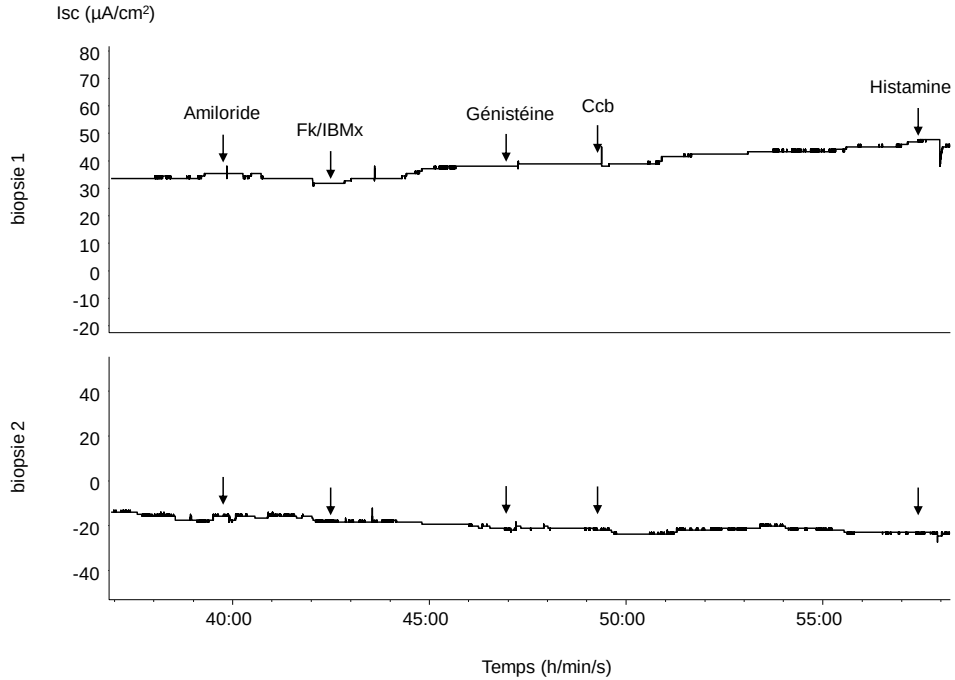
F508del/D537N (c.1609G>A)





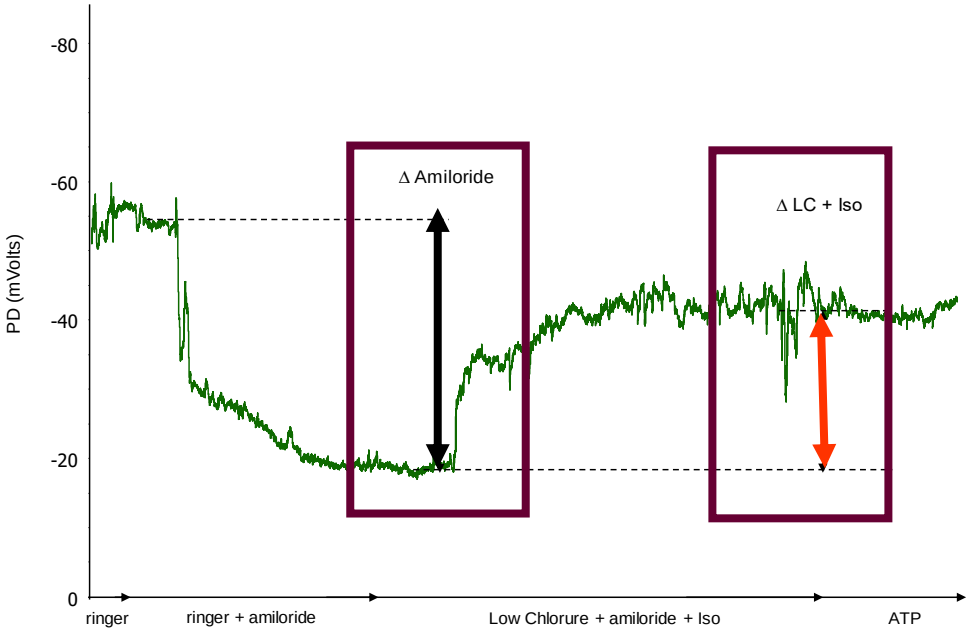


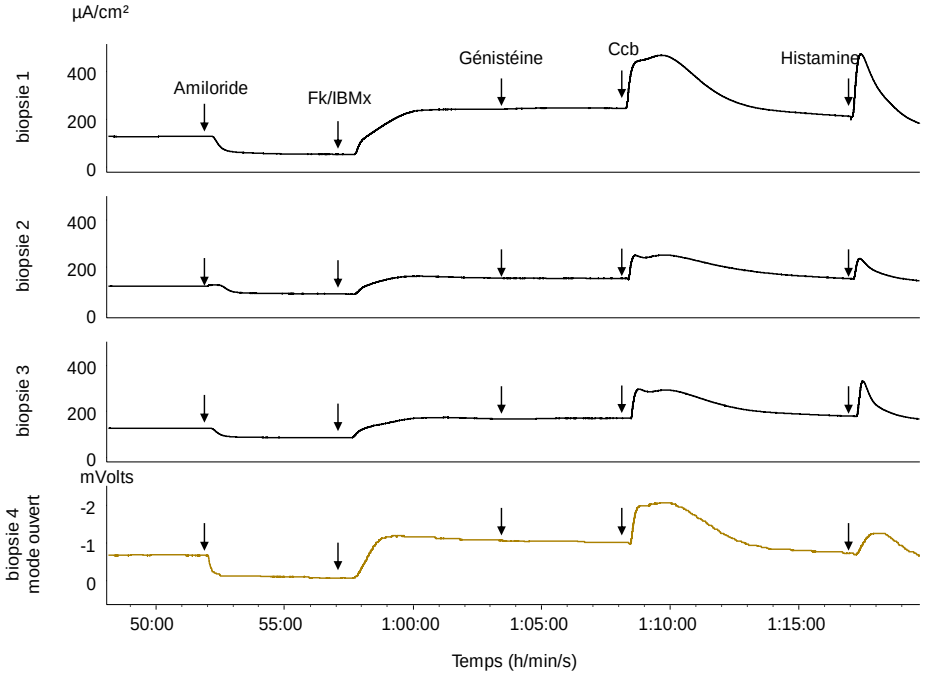

PD (mVolts)
-60
-40
-20
0
Δ
Amilori-
de
ring
er
ringer +
amiloride
Low Chlorure +
amiloride + Iso


Isc (µA/cm²)
biopsie 1
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
Amiloride
Fk/IBMx
Génistéine
Ccb
Histamine
biopsie 2
40
20
0
-20
-40
40:00
45:00
50:00
55:00
Temps (h/min/s)

F508del / Y1014C

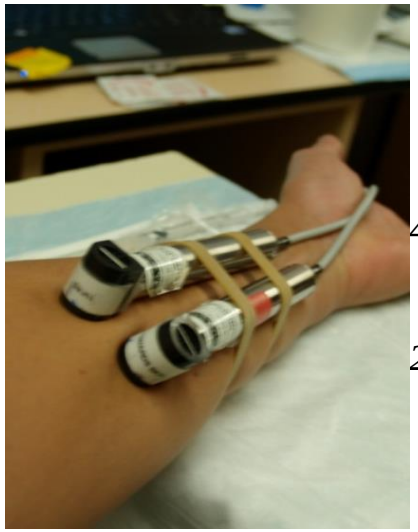
Dépistage néonatal
TIR : 85µg/L
F508del hétérozygote
TS intermédiaires, contrôlé négatif

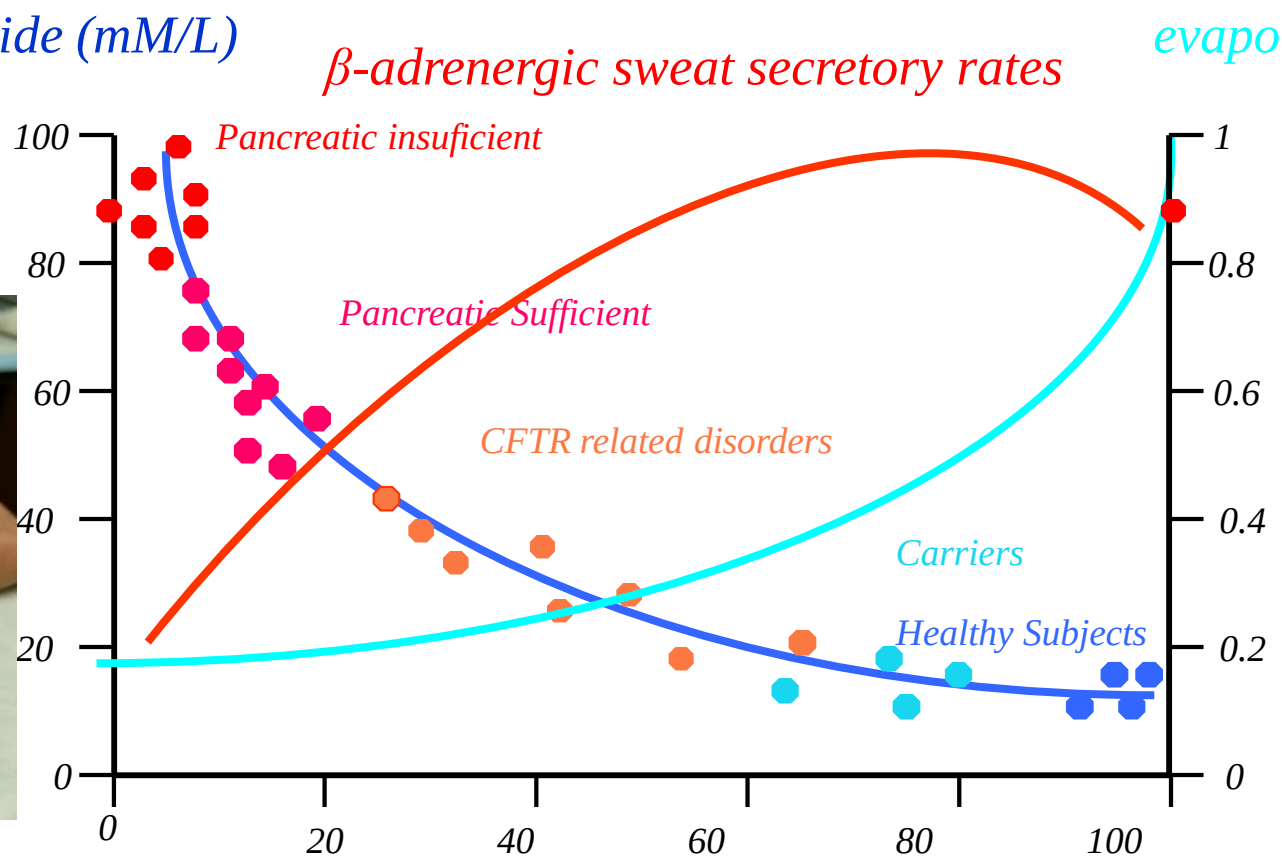


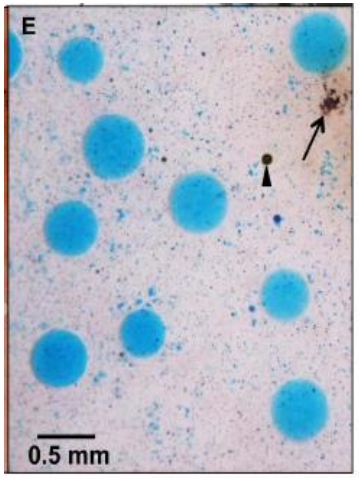


➔ Bilan pas en faveur d'un effet CF
➔ Mutation hyperactivatrice d'ENaC ou dysfonction de CFTR avec activité résiduelle ?
➔ Explorations à poursuivre (gènes de l'ENaC) et compléter + tard (évaporimétrie, cultures primaires de cellules nasales)

Sécrétion de sueur béta-adrénergique







Bioelectric potential
Evaporimeter

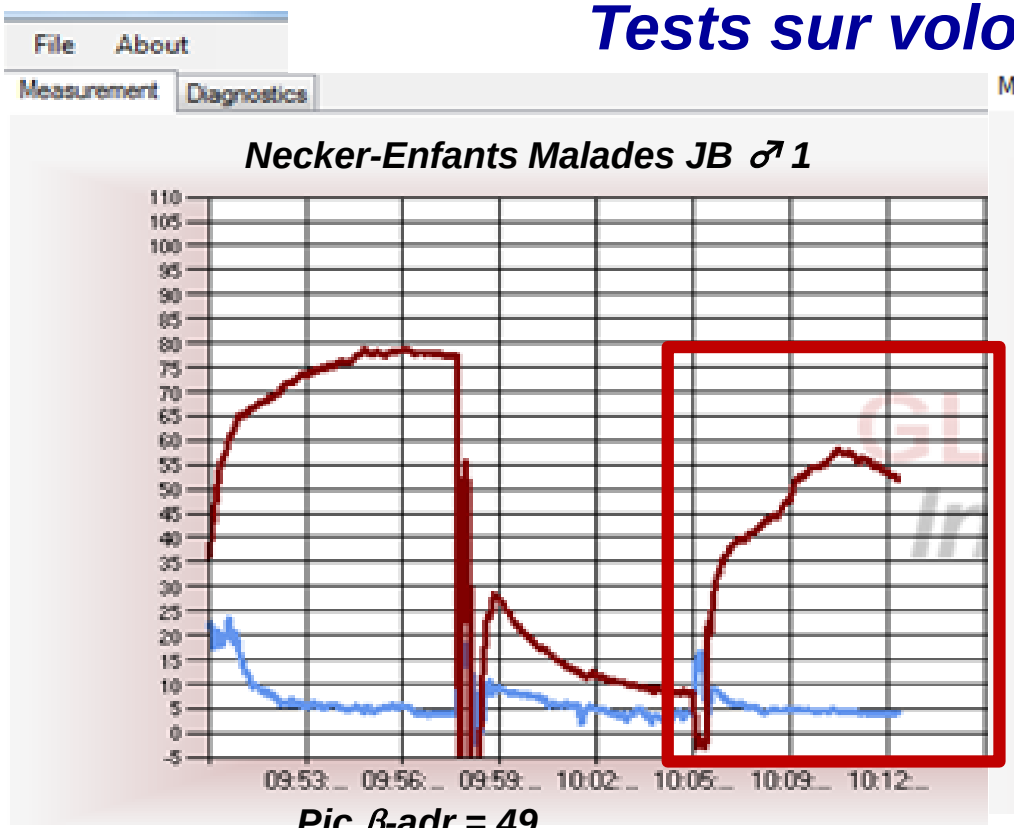
Sweat volume
Secretion rate

Adapted from Quinton and Gonska, AJRCCM 2012

Gonska et al. Thorax 2009, AJRCCM 2012

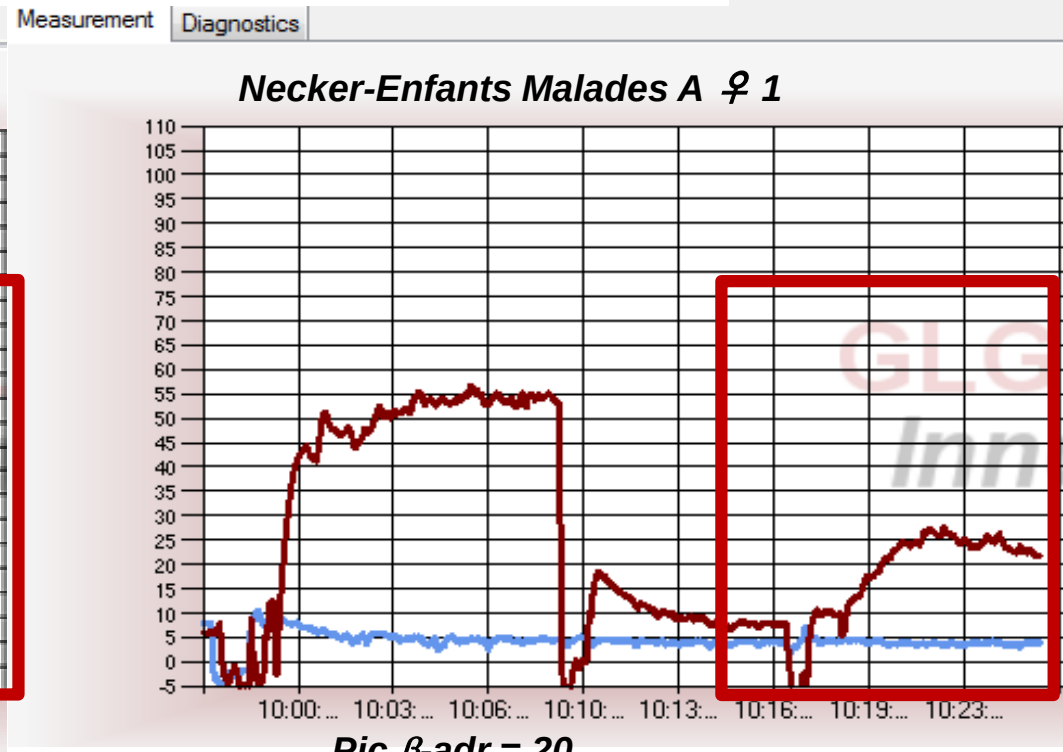
Wine et al. Plos One 2013

Tests sur volontaires sains



Pic β-adr = 49

Rapport β-adr/chol = 0,7

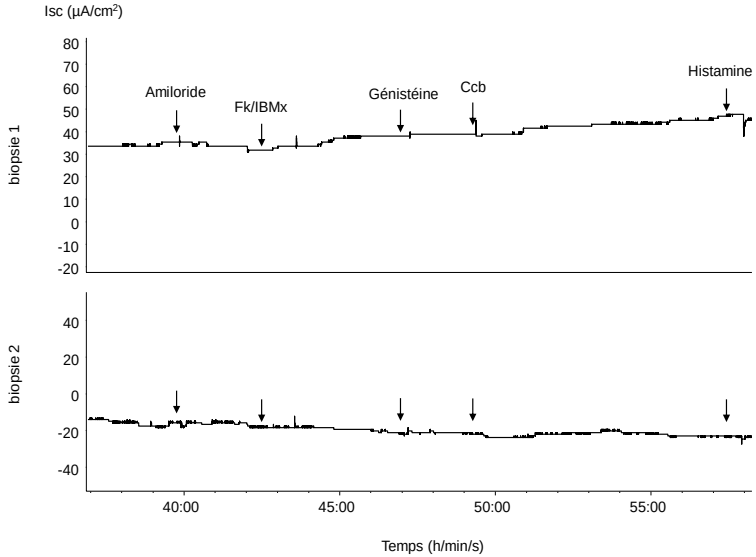


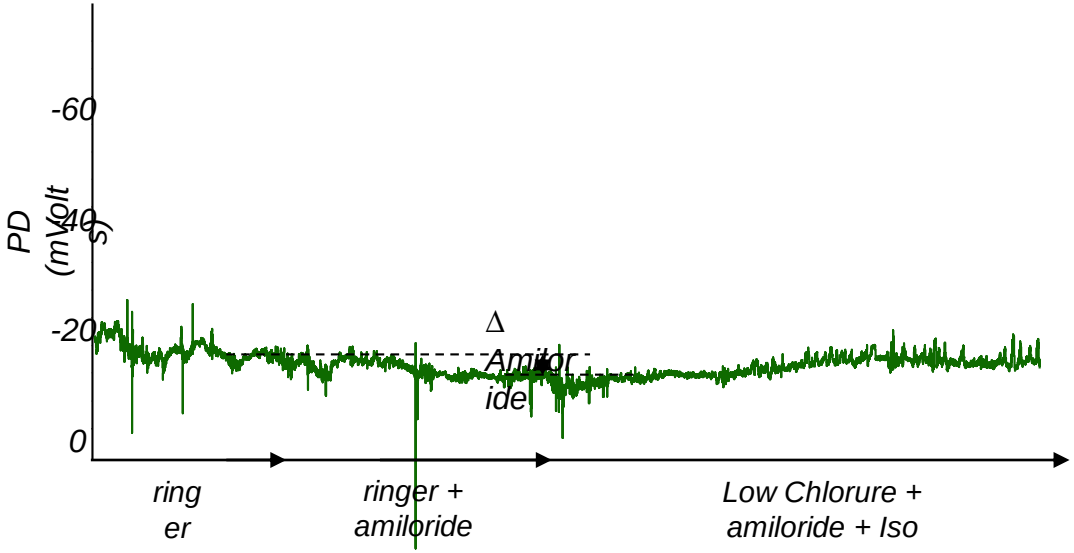
Pic β-adr = 20

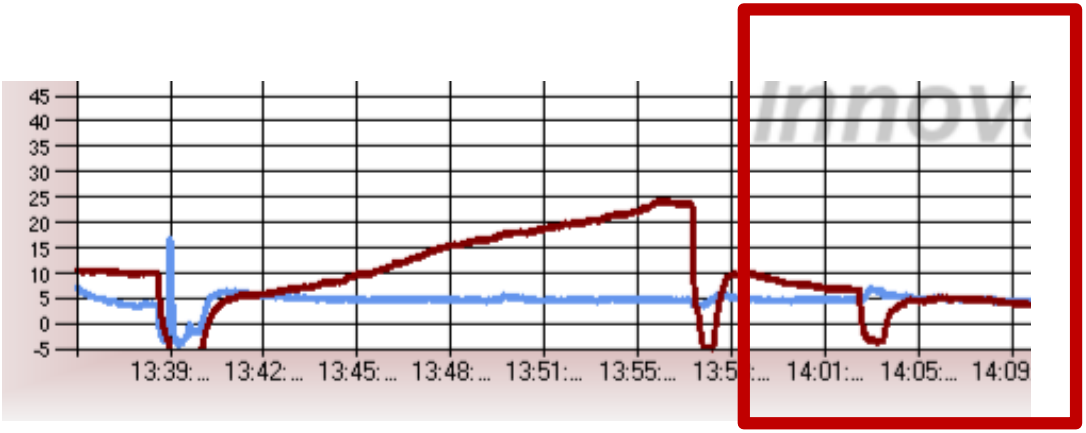
Rapport β-adr/chol = 0,4

	Non CF		Htz		CF	
	Pic β-adr	β-adr/chol	Pic β-adr	β-adr/chol	Pic β-adr	β-adr/chol
♂	50 - 90	0,8 (0,7-0,9)	30 - 60	0,6 (0,5 – 0,7)	< 4,5	0
♀	30 - 60	0,8 (0,7 - 0,9)	12 - 30	0,3 (0,3 - 0,4)	< 4,5	0

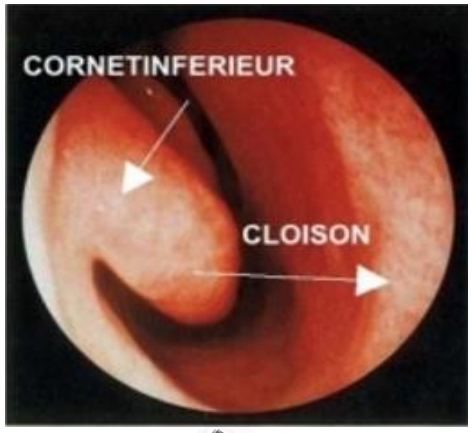
Quinton et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med 2012


Isc (µA/cm²)
Amiloride
Fk/IBMx
Génistéine
Ccb
Histamine
biopsie 1
biopsie 2
40:00
45:00
50:00
55:00
Temps (h/min/s)


PD (mVolts)
-60
-40
-20
0
Δ
Amilor-ide
ring er
ringer + amiloride
Low Chlorure + amiloride + Iso


13:39:...
13:42:...
13:45:...
13:48:...
13:51:...
13:55:...
14:01:...
14:05:...
14:09

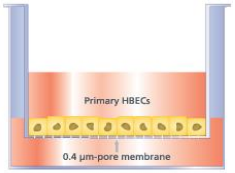
Cultures primaires à partir de frottis nasal

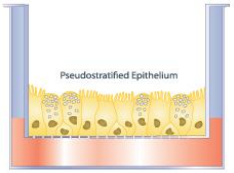


Expansion
conditional reprogramming

Seeding
collagen coated filters
Submerged cultures

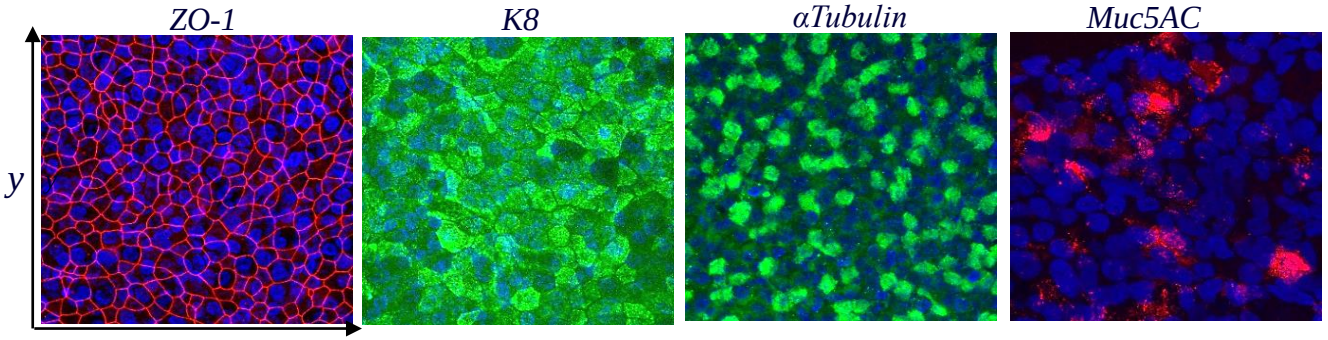
Differentiation
Air-liquid interface cultures

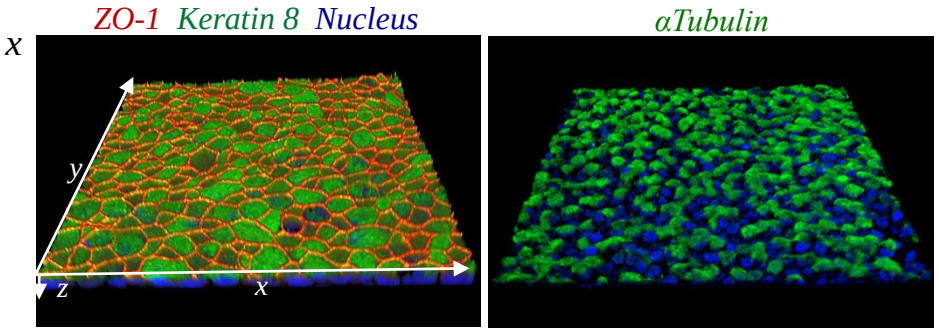




Suprynowicz et al. PNAS 2012

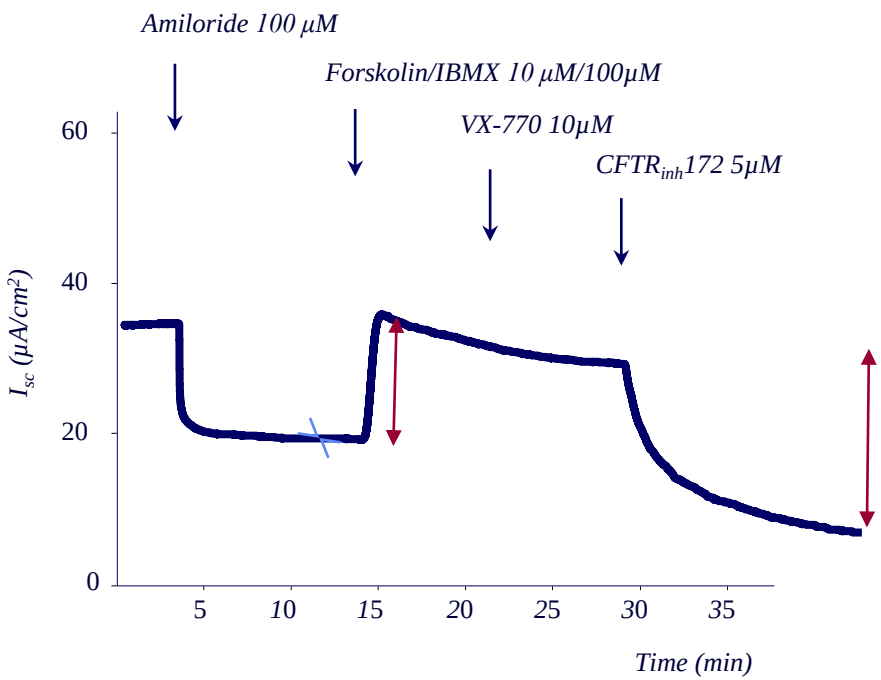
Simplicité, anesthésie locale xylocaine
Répétable, envoi à température ambiante





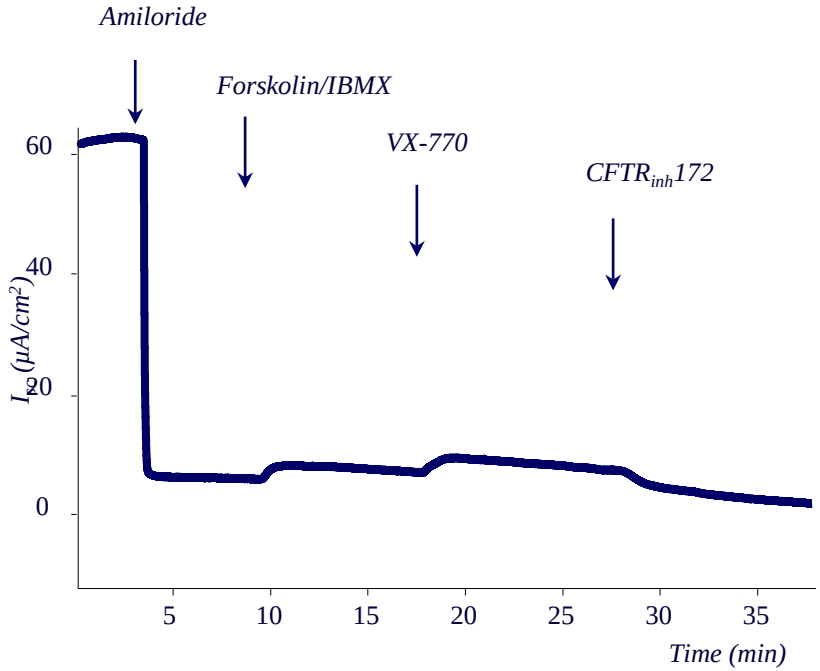
Pranke et al. Scientif Report 2017

Sujet sain



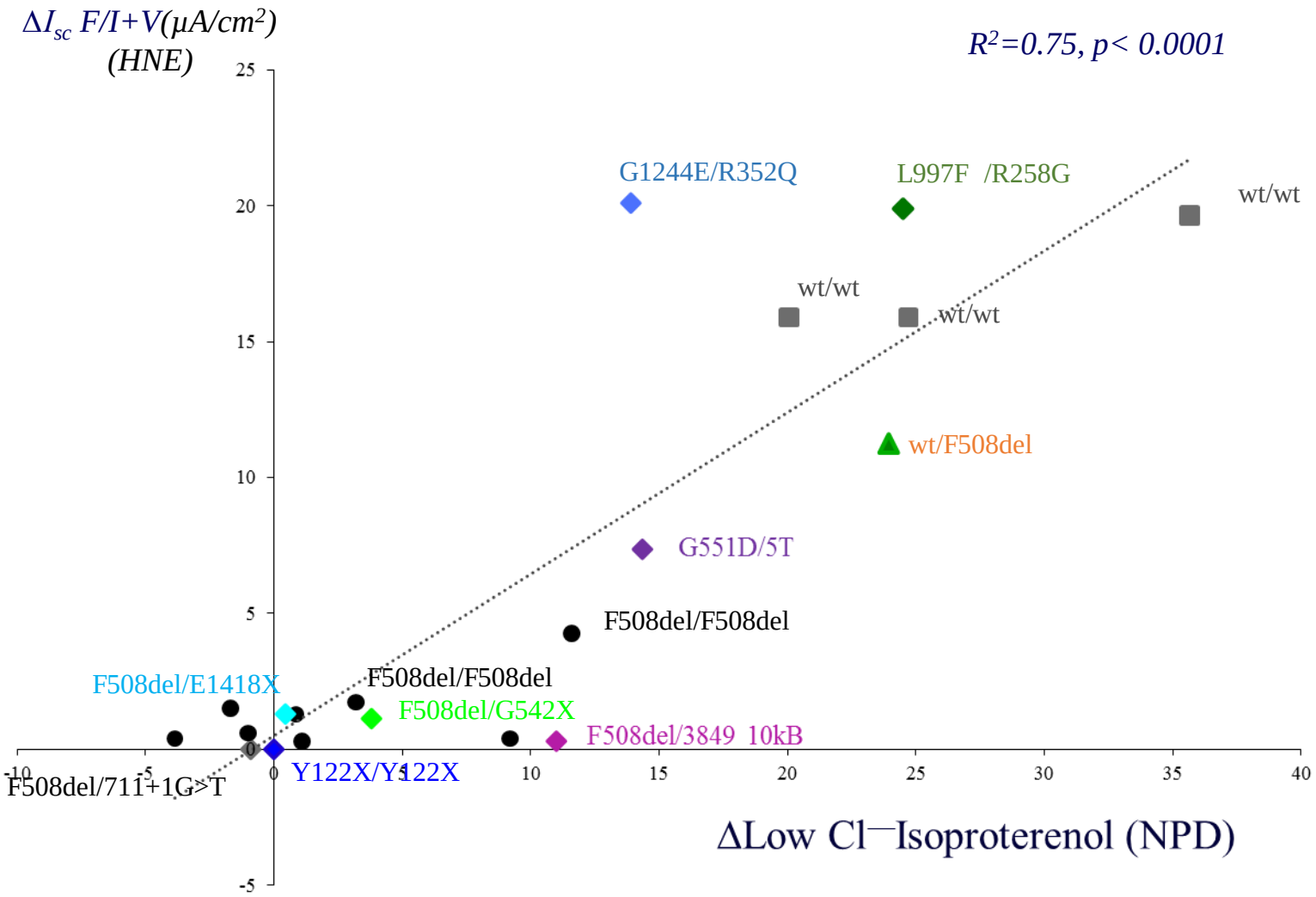
Healthy control

Sujet MV



F508del/F508del

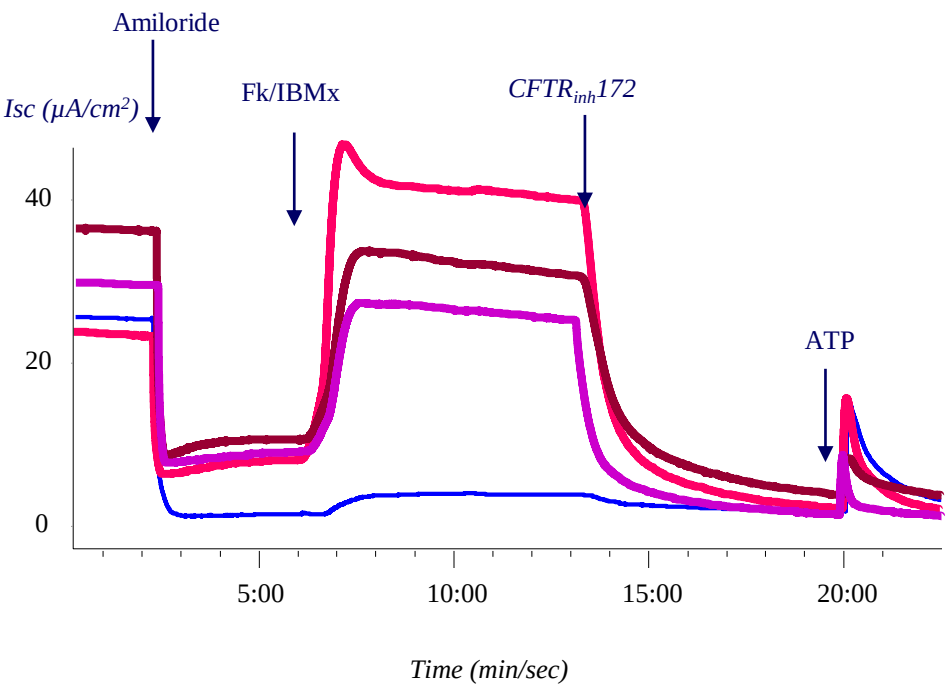
Correlation avec le niveau de fonction de CFTR en DDP



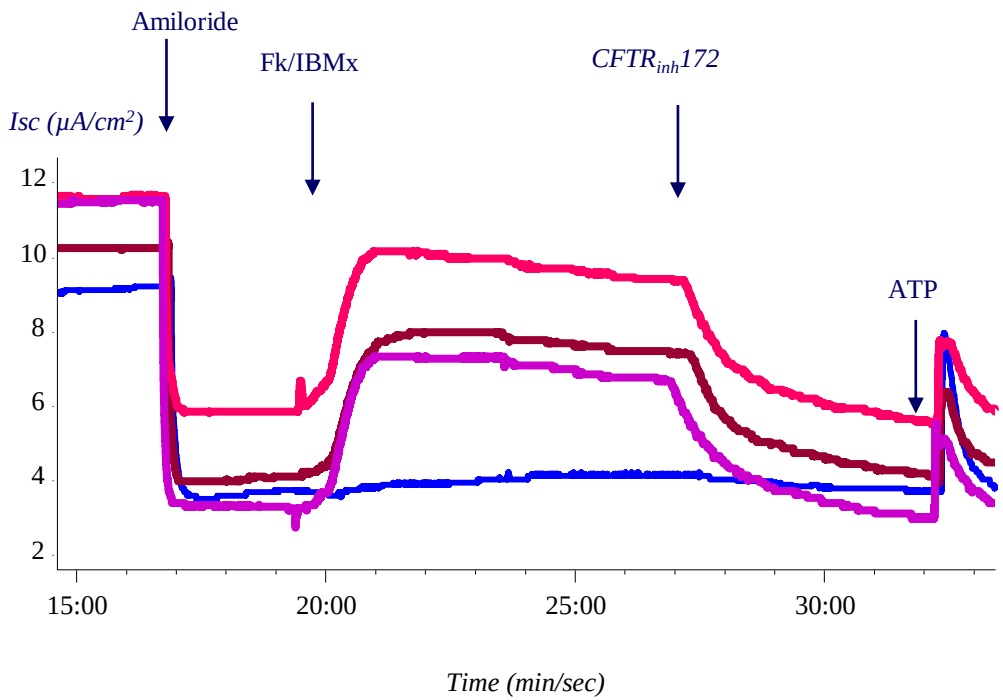
Pranke et al. Scientif Report 2017

Antisense oligonucleotide on Splice variant/3849+10kb C>T

3849+10kb C>T/3849+10kb C>T



3849+10kb C>T/W1282X



Scramble oligonucleotide

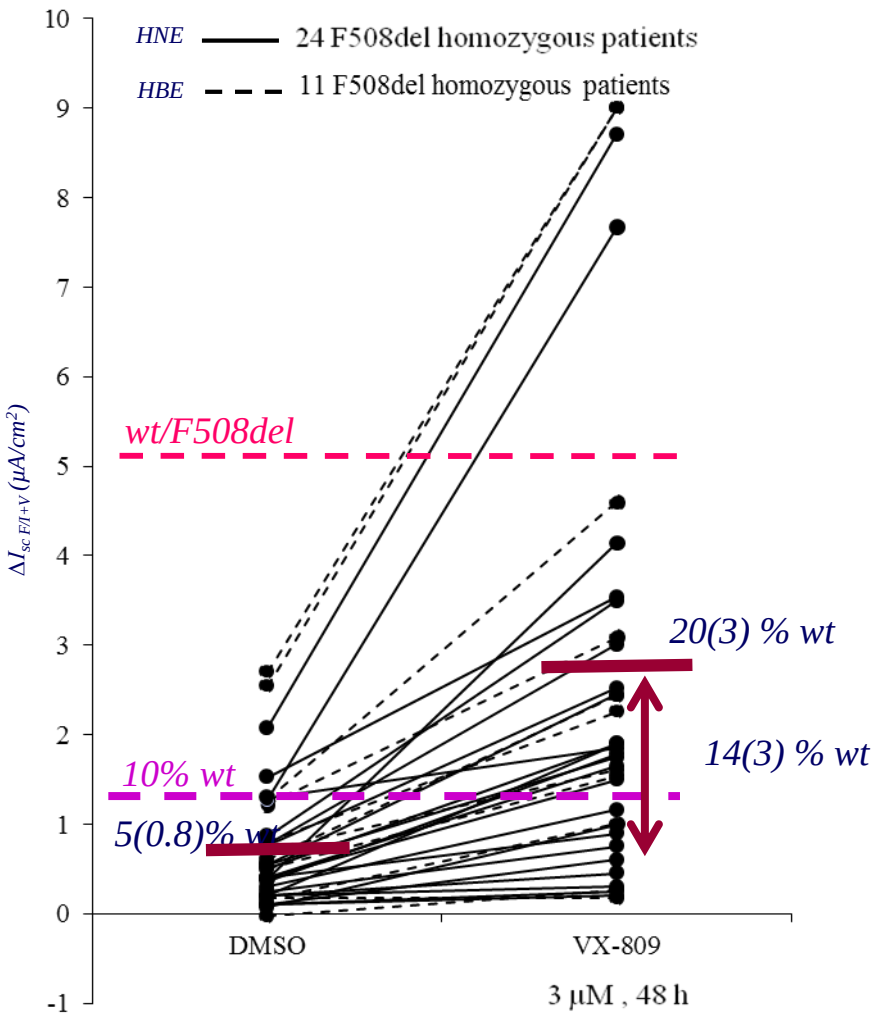
Antisense ASO X

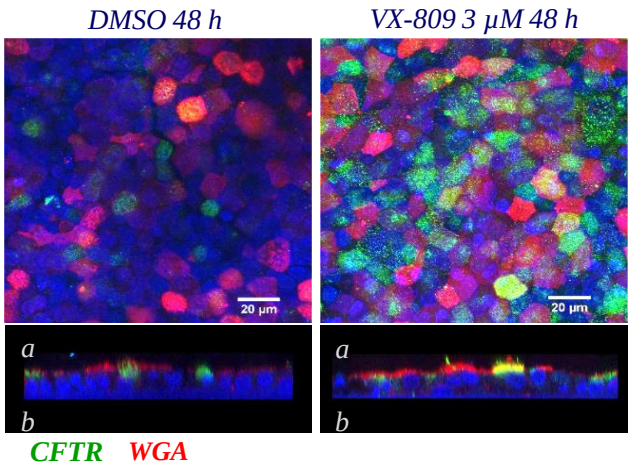
Antisense ASO Y

Antisense ASO Z

B Kerem, Hebrew University-SpliSense,

Correction par les modulateurs



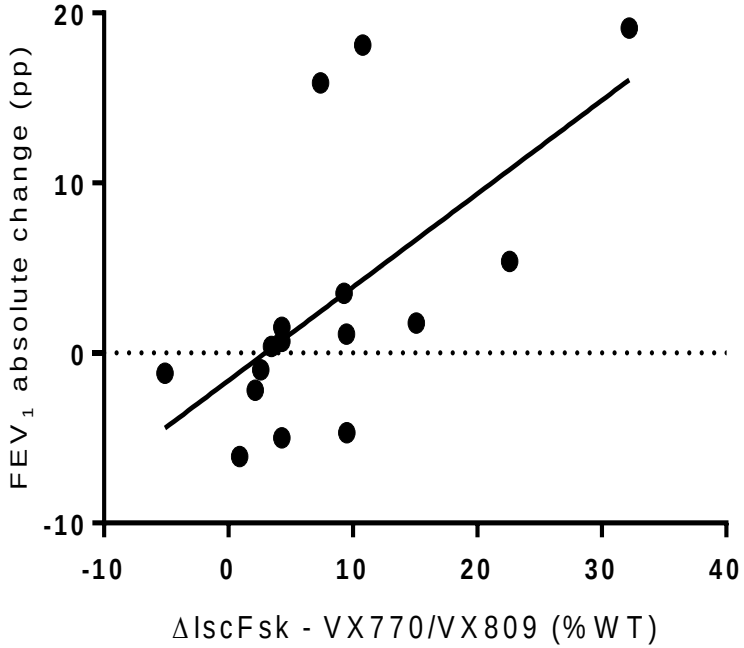


Variability in the level of correction

Pranke et al. Scientific Report 2017

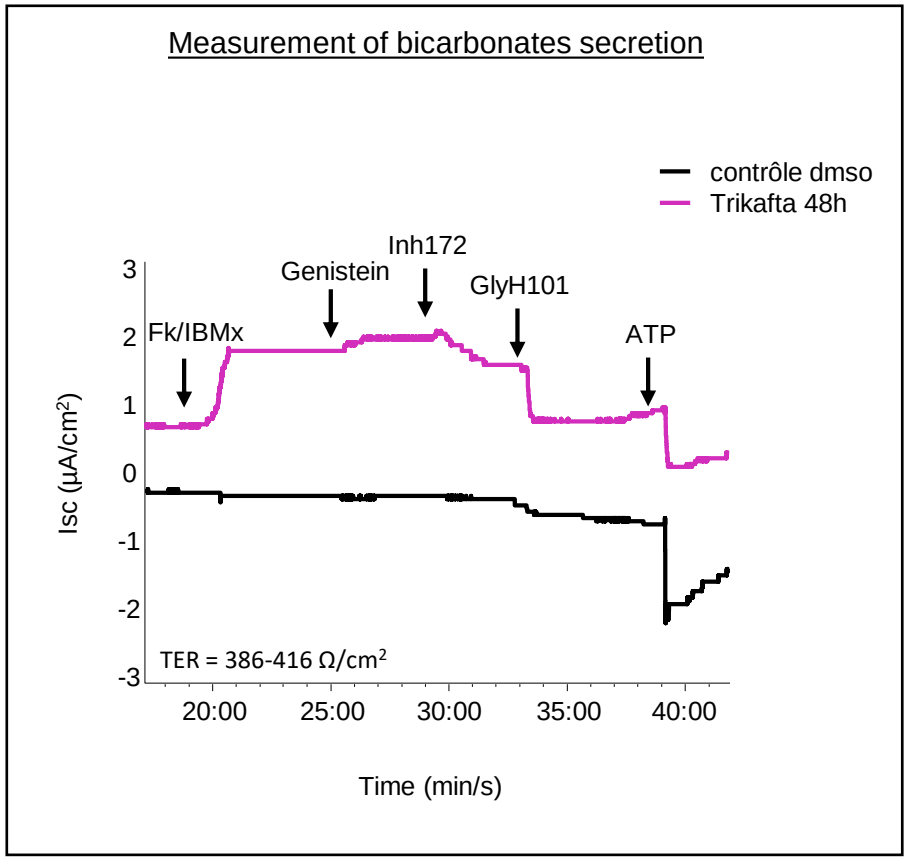
Corrélation de la correction du transport de chlorure par modulateurs de CFTR à l'évolution du VEMS à 6 mois

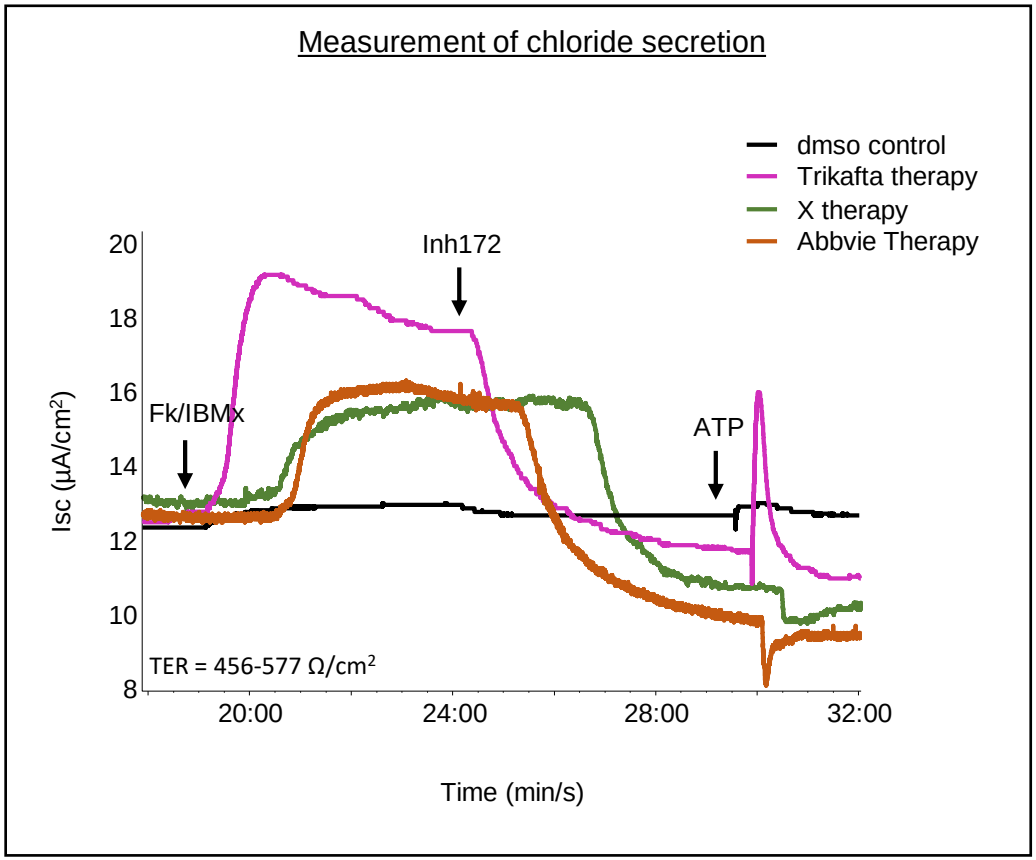
Résultats préliminaires



Spearman, r = 0.71
P-value 0.01
N = 16

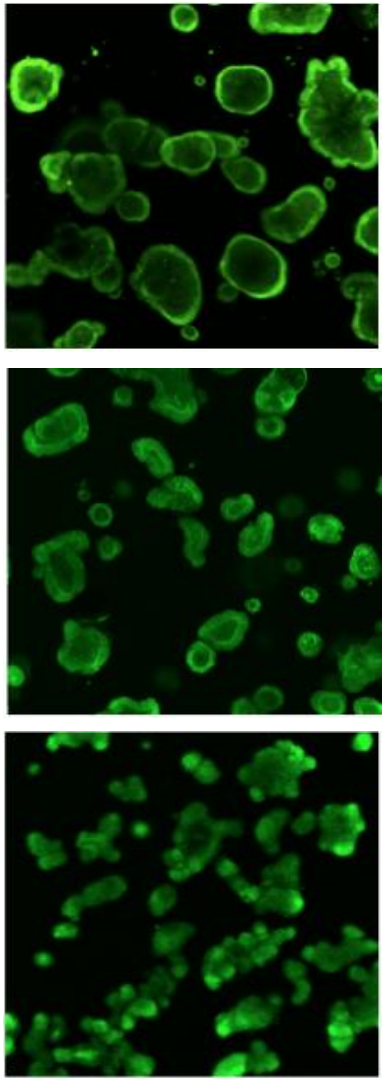
CF Nasal primary cells (F508del/G91R), 19-20 days in Air-Liquid Interface





Intestinal organoids
Quantitatively reflect in vivo CFTR function

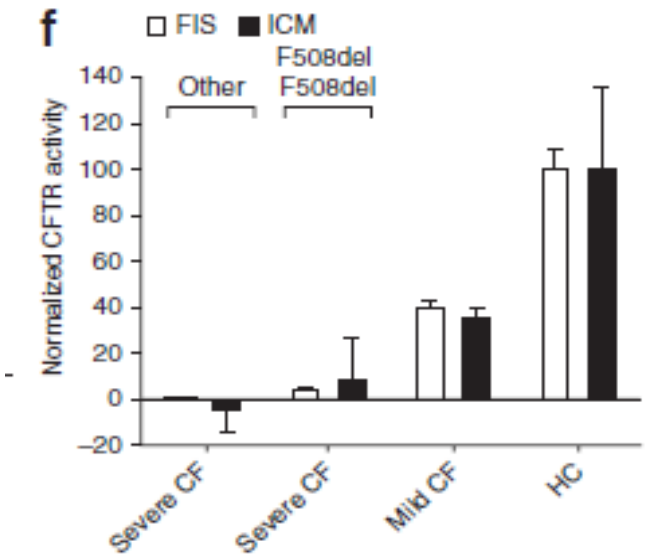
Forskoline induced swelling

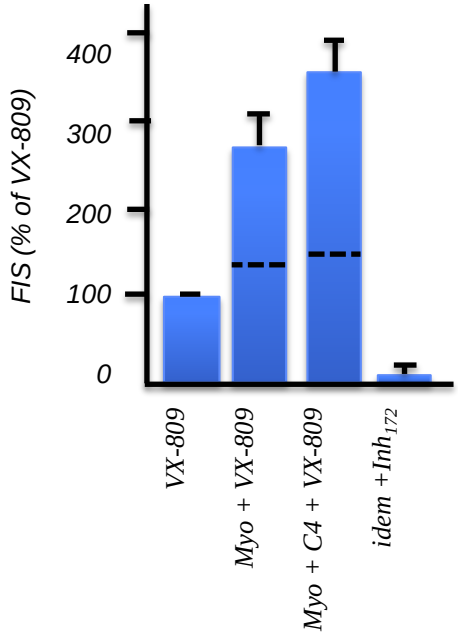


Control

Mild CF

Severe CF





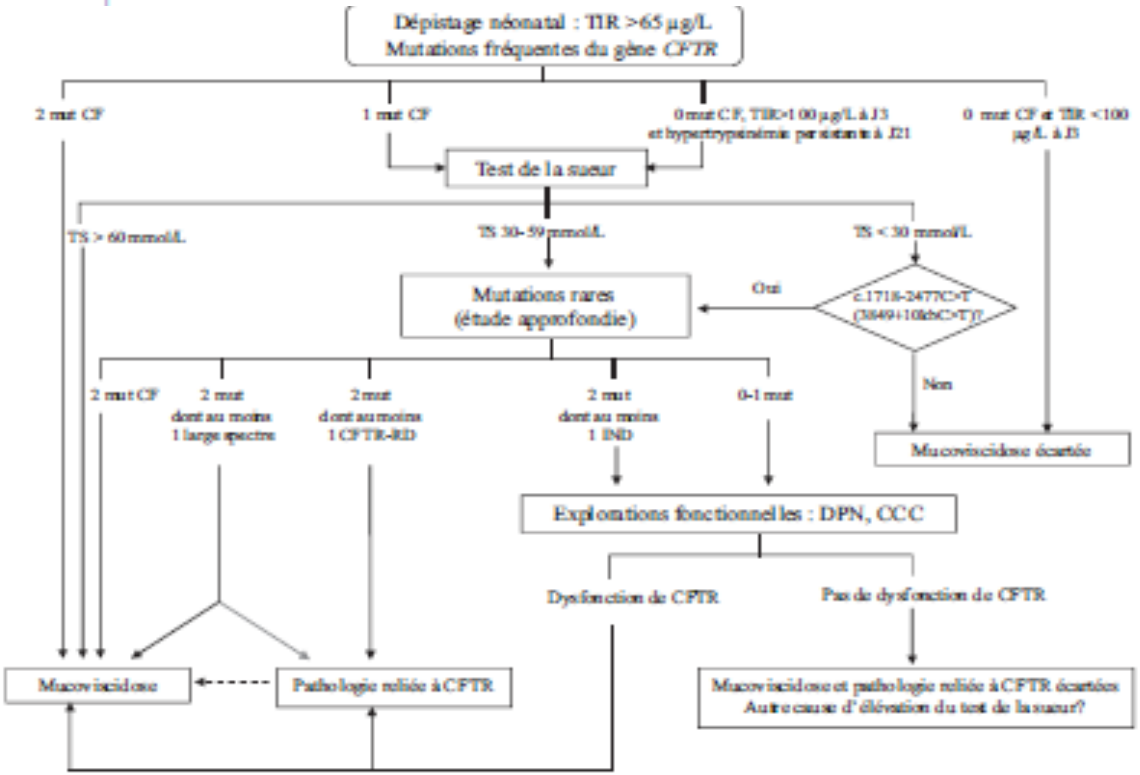
Okiyoneda et al.
Nat. Chem Biol 2013

Dekkers JF et al. Nat Med 2013

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,*,b], 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. Deneuville[j], N. Remus[k], T. Nguyen-Khoa[a], C. Raynal[l], M. Roussey[m], E. Girodon[n]

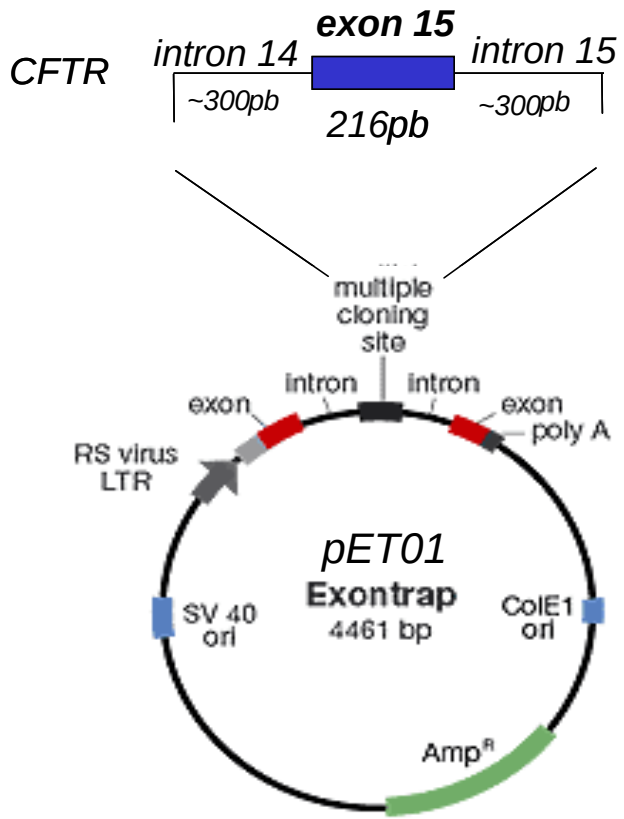


Sermet-Gaudelus et al. Arch Pediatr 2017

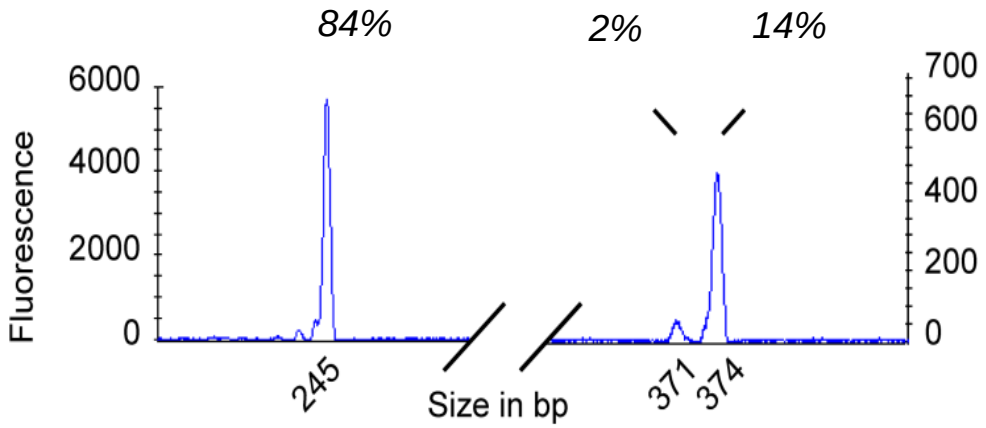
Outils du diagnostic et stratégies

- Outils du diagnostic génétique
- Outils d'explorations fonctionnelles in vivo et ex vivo
- **Outils d'explorations in vitro**
- Arbre décisionnel

Impact sur l'épissage in vitro : minigenes



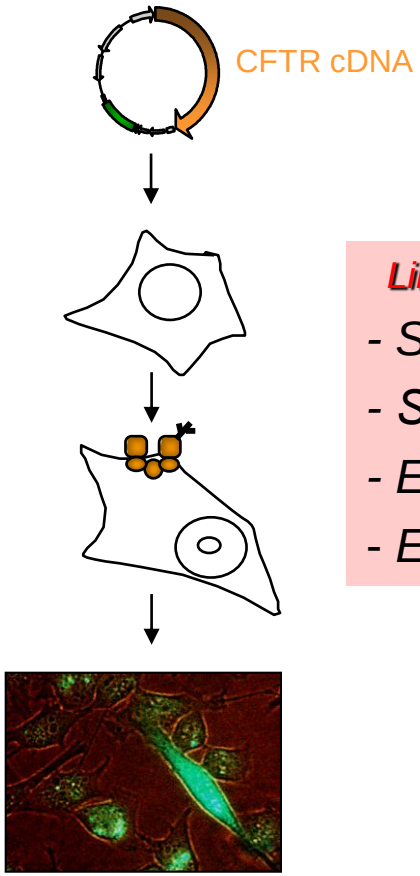
c.2491G>T (E831X)



Limites

- Système *in vitro*
- Surexpression de la sequence d'intérêt
- Discordances entre lignées cellulaires
- Non prise en compte d'allèles complexes
- Non prise en compte du phénomène NMD

Impact sur la protéine in vitro



ADNc CFTR dans un plasmide

Limites

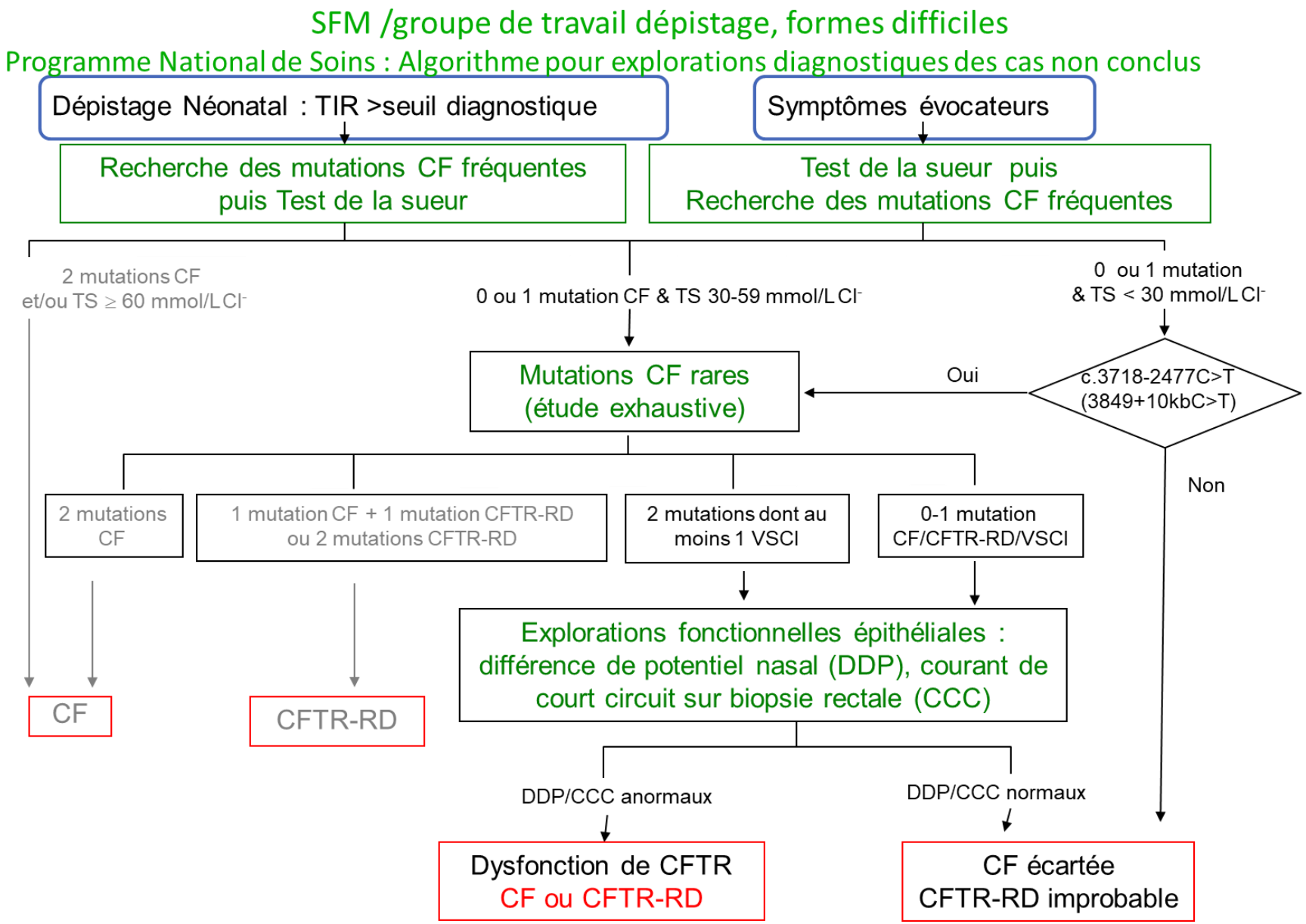
- *Système in vitro*
- *Système cellulaire particulier, différent d'une étude à l'autre*
- *Etude ne tenant pas compte du fond génétique*
- *Etude de la maturation et de la fonction canal chlorure seulement*

Détection de la protéine CFTR

Etude de la synthèse et de la maturation de CFTR

Etude de la fonction canal Cl-

Arbre décisionnel



Conclusions - Perspectives

- **Développement des outils d'exploration fonctionnelle**
  - Évaporimétrie
  - Organoïdes
  - Cultures primaires de cellules nasales

- **Développement des outils du diagnostic génétique**
  - Variants structuraux
  - Panels de gènes : *SCNN1* (ENaC), *SLC26A9*, autres transporteurs…

- **Ouverture d'un registre sur les formes atypiques avec VLM**

- **Réflexion sur des préindications PFMG2025 pour analyse pangénomique : Pancréatites, DDB, IP**