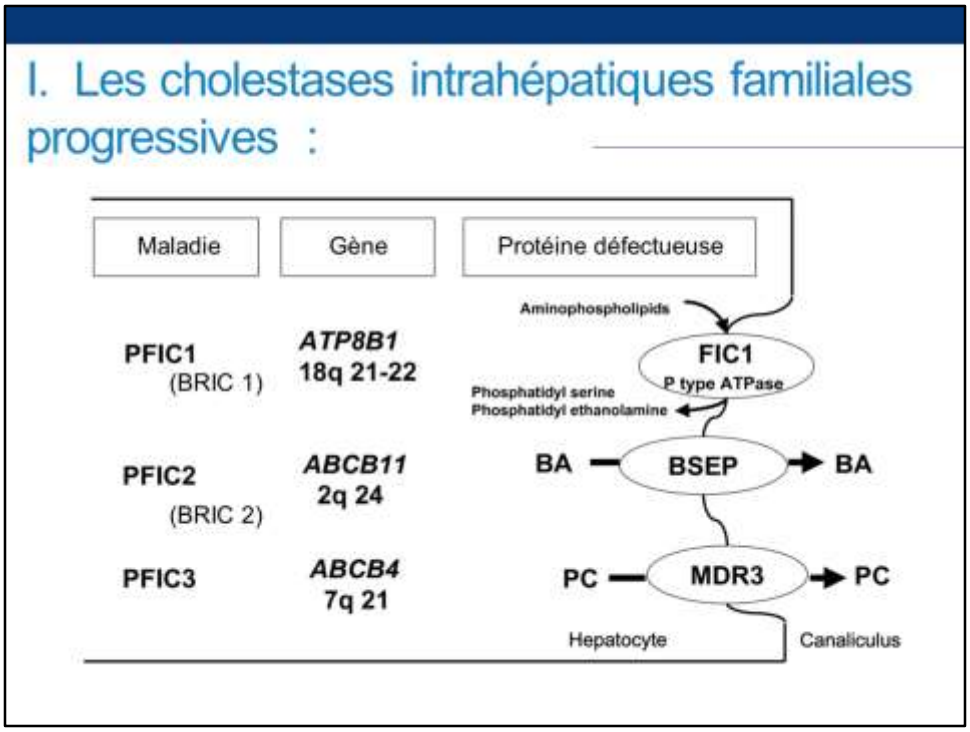
PHARMACOTHÉRAPIE CIBLEE DANS LES CHOLESTASES INTRAHÉPATIQUES FAMILIALES PROGRESSIVES

Marion ALMES
Interne de Pédiatrie

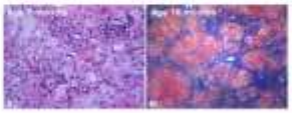
Hépatologie et Transplantation Hépatique Pédiatriques
CHU Bicêtre
Inserm U1174, Université Paris-Sud



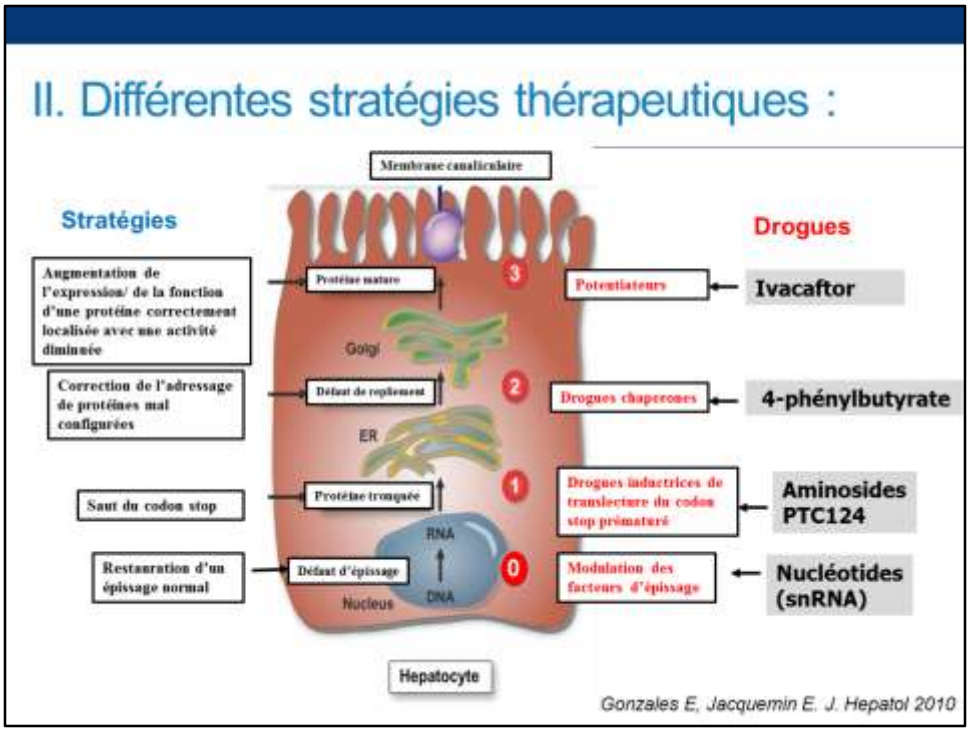
Les cholestases familiales intrahépatiques progressives (PFIC) sont un groupe de maladies autosomiques récessives dues à des déficits des différents transporteurs situés au pôle canaliculaire de l'hépatocyte qui entrainent une altération de la sécrétion biliaire (cholestase) (1).
La PFIC1/BRIC1 est due à des mutations du gène *ATB8B1* codant FIC1, une flippase responsable d'un enrichissement du feuillet interne de la membrane plasmique en aminophospholipides. Ces altérations de FIC1 altèrent le fonctionnement de BSEP, le transporteur des acides biliaires.
La PFIC2/BRIC2 est due à des mutations du gène *ABCB11* codant BSEP, le transporteur des acides biliaires de l'hépatocyte vers le canalicule biliaire.
La PFIC3 est due à des mutations du gène *ABCB4* codant pour la protéine MDR3, responsable de la sécrétion biliaire des phospholipides. Dans la bile, ces phospholipides s'organisent en micelles avec les acides biliaires et protègent ainsi l'épithélium biliaire de la toxicité intrinsèque de ces derniers.
D'autres phénotypes (BRIC, cholestases médicamenteuses, cholestases gravidiques, cholestases néonatales transitoires) sont associées à des mutations de ces gènes, mais ils ne seront pas détaillés dans cette présentation.

I. Les cholestases intrahépatiques familiales progressives :

Clinique : prurit, ictère, hépatomégalie, atteinte extra hépatique (PFIC1)
Biologie : GGT (normales dans PFIC1 et PFIC2), acides biliaires
Histologie : cholestase hépatocellulaire, fibrose/cirrhose, immunomarquage (MDR3, BSEP, FIC1)
Biologie moléculaire : NGS, Sanger
Traitement : AUDC, traitement symptomatique du prurit, dérivations biliaires, transplantation hépatique



Les PFIC sont des cholestases intrahépatiques sévères débutant dès les premiers mois de vie évoluant systématiquement vers la cirrhose et ses complications, notamment le carcinome hépatocellulaire (CHC).
A ce jour, les seuls traitements médicamenteux proposés aux patients sont symptomatiques (acide ursodésoxycholique, rifampicine, supplémentation en vitamines liposolubles). Des dérivations biliaires (drain nasobiliaire, dérivation chirurgicale interne ou externe) permettent parfois d'améliorer la symptomatologie (2).
Une transplantation hépatique est toutefois nécessaire à l'âge pédiatrique chez plus de la moitié des patients du fait de la sévérité de la cholestase, d'une décompensation de la cirrhose ou d'un CHC. Apres la transplantation, une exacerbation des manifestations extra hépatiques et des cas de stéatose sévère ont été rapportés chez les patients atteints de PFIC1. Chez les patients atteints de PFIC2, des cas d'allo-immunisation anti-BSEP sur le foie transplanté ont également été décrits (3).

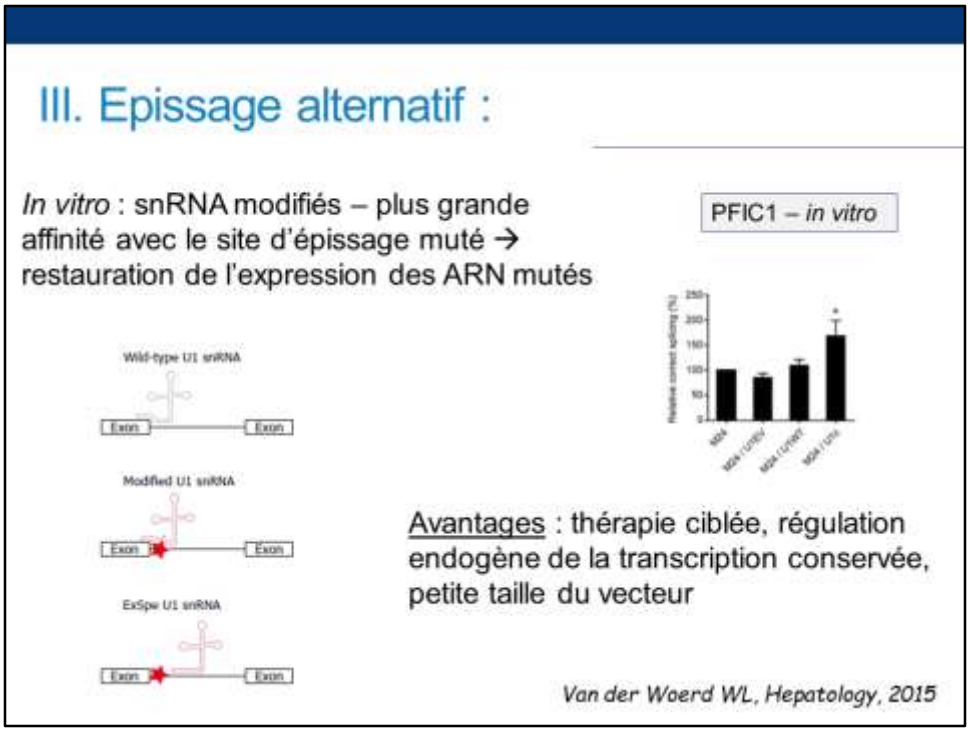


Plus récemment, l'avènement des techniques de biologie moléculaire et cellulaire ont conduit à de dichotomiser les mutations responsables des PFIC en 4 classes (classe 0 : mutation d'épissage, classe 1 : mutation non-sens, mutation faux-sens avec défaut de trafic (classe 2) ou de fonction (classe 3)). Sur la base de cette classification, une stratégie de pharmacothérapie ciblée « mutation spécifique » a pu être établie (4). Toutes les mutations évoquées dans ce topo sont des mutations identifiées directement chez des malades.

Certaines mutations génèrent un défaut d'épissage, altérant fortement l'ARN synthétisé alors instable et rapidement dégradé (classe 0). La pharmacothérapie ciblée vise à restaurer un épissage normal via l'utilisation de small nuclear RNA.
Les mutations non-sens conduisent à la formation d'une protéine tronquée, rapidement dégradée par la voie NMD (Non-sense Mediated Decay) (classe 1) : la stratégie consiste alors à induire une translecture du codon stop prématuré (aminosides, PTC124).
Certaines mutations faux sens (classe 2) altèrent le repliement des protéines empêchant leur adressage membranaire. Le but des traitements est alors d'augmenter leur expression membranaire via des drogues chaperones (correcteurs ou chaperone, comme le 4-phénylbutyrate).
Enfin, certaines mutations faux sens (3) sont responsables d'une altération seule fonction de la protéine (correctement adressée à la membrane) : les traitements spécifiques consistent alors à en potentialiser la fonctionnalité via des potentiateurs

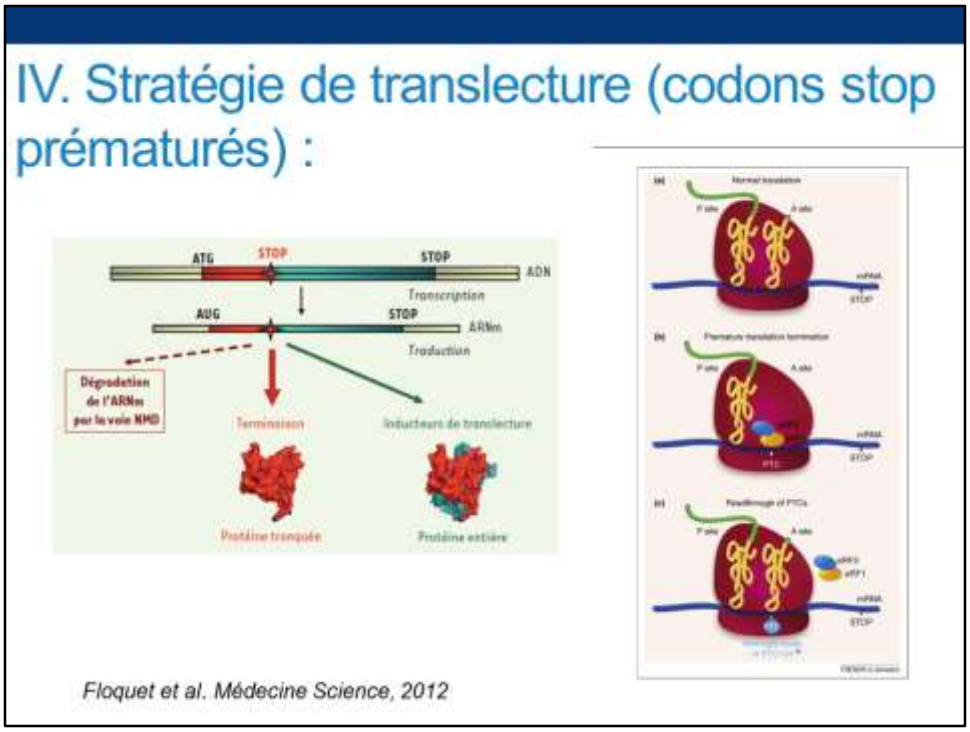
(tels que l'Ivacaftor).

D'autres thérapeutiques innovantes sont actuellement à l'essai, notamment des traitements ciblant les transporteurs des acides biliaires tout au long du cycle entérohépatique (inhibiteur de NTCP, inhibiteurs de ISBT) ainsi que les thérapies cellulaires et géniques.



En situation physiologique, le processus d'épissage est initié par la liaison d'un small nuclear RNA (snRNA U1) au niveau du site d'épissage de l'ARN pré-messager (SDS), par liaison spécifique aux trois derniers nucléotides d'un exon et aux six premiers nucléotides d'un intron. Les mutations interférant avec le SDS réduisent la complémentarité avec le snRNA U1 et perturbent le processus d'épissage.

PFIC1 - *in vitro* (lignées cellulaires) :
Des snRNA modifiés dont la séquence correspond au SDS muté permettent de restaurer un épissage normal de certains mutants d'*ATP8B1* (mutants U1c) par rapport aux cellules transfectées avec un vecteur vide (5).



En situation physiologique, la terminaison de la traduction a lieu lorsqu'un des codons-stop (UAA, UAG ou UGA) entre au niveau du site A du ribosome. A ce niveau, il est reconnu, non pas par un ARN de transport (ARNt, contrairement aux autres codons), mais par des facteurs de terminaison (eRF1 et eRF3). Le polypeptide est alors libéré.

Dans les maladies en lien avec des mutations non-sens, l'ARN synthétisé peut être rapidement dégradé par la voie NMD ou être traduit en une protéine tronquée. Le principe de translecture repose sur le fait que certaines drogues se fixent au niveau du site de décodage du ribosome, diminuant ainsi sa capacité à distinguer un ARNt correct (appariement codon-anticodon parfait) d'un ARNt «proche cognat» (2 appariements sur 3 avec le codon) : cet ARNt entre ainsi en « compétition » avec les facteurs de terminaison et permet la translecture du codon stop et la poursuite de la synthèse protéique.

IV. Stratégie de translecture (codons stop prématurés) :

Quelles drogues ?

- Aminoglycosides : G418, Gentamycine
- PTC124 (Ataluren)
- Nouvelles molécules issues de criblage de chimiothèques : CDX5...

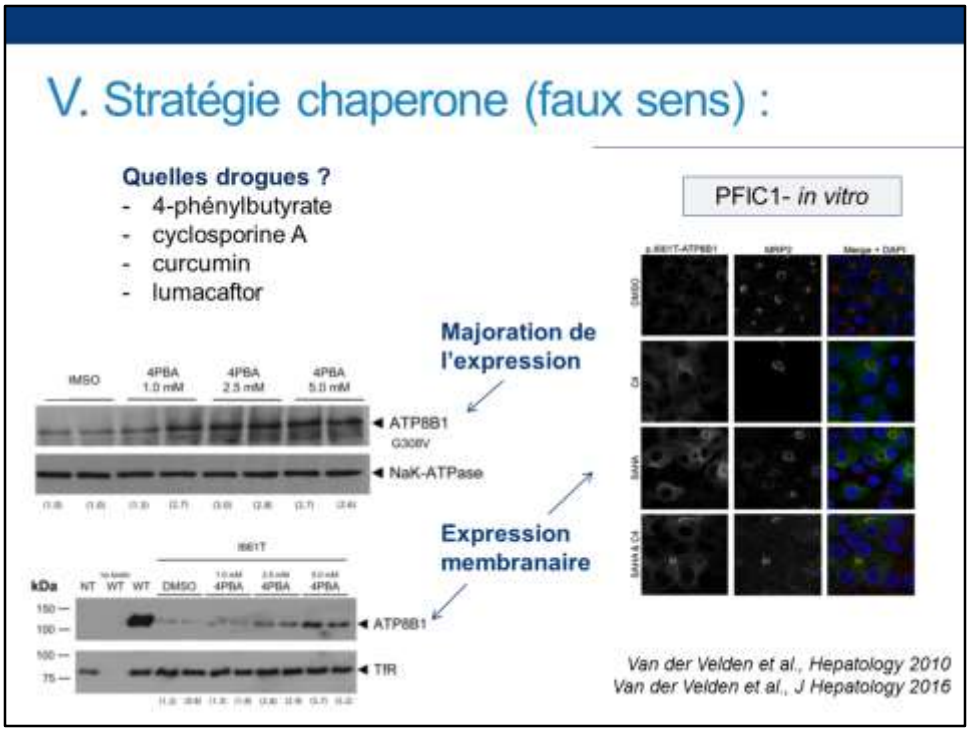
Applications chez les patients :

- Mucoviscidose (CFTR)
- Myopathie de Duchenne

PFIC ?

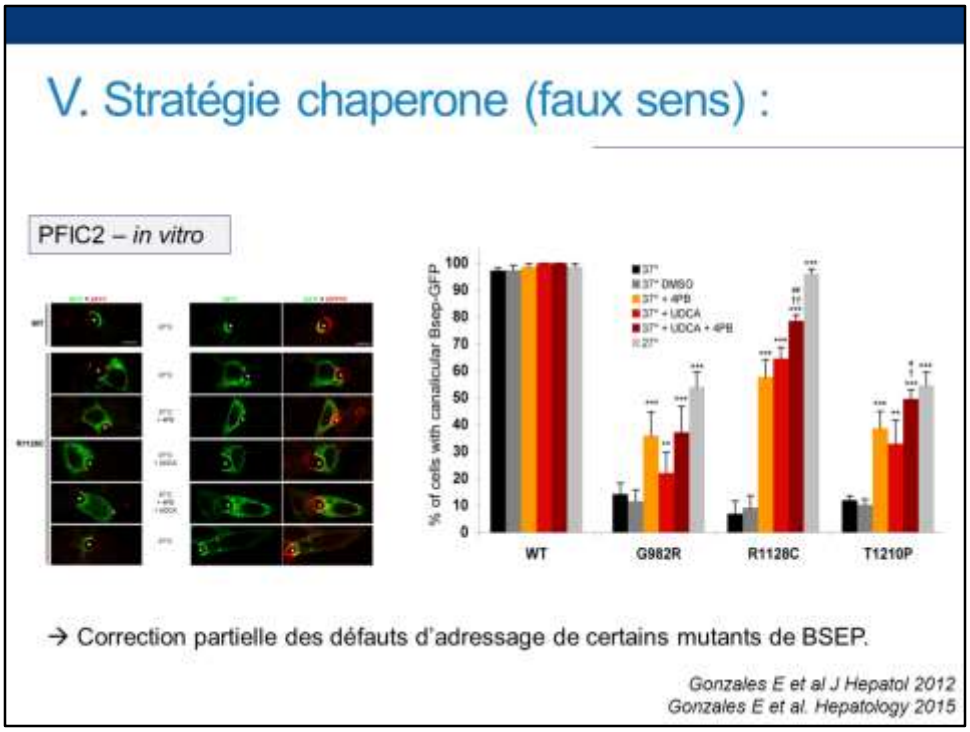
Alireza Baradaran-Heravi et al., Nucl Ac Res, 2016,
Sermet-Gaudelus I et al., BMC Med. 2007
Malik V et al,, Ann Neurol. 2010

Plusieurs types de drogues permettent une translecture des codons stops, notamment les aminosides et le PTC124. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* dans différentes maladies génétiques liées à des mutations non-sens sont actuellement en cours, avec des résultats prometteurs (7, 8, 9).
L'identification de nouvelles drogues plus efficaces et moins toxiques est actuellement un sujet d'investigation majeure, essentiellement par le biais de criblage de chimiothèque.

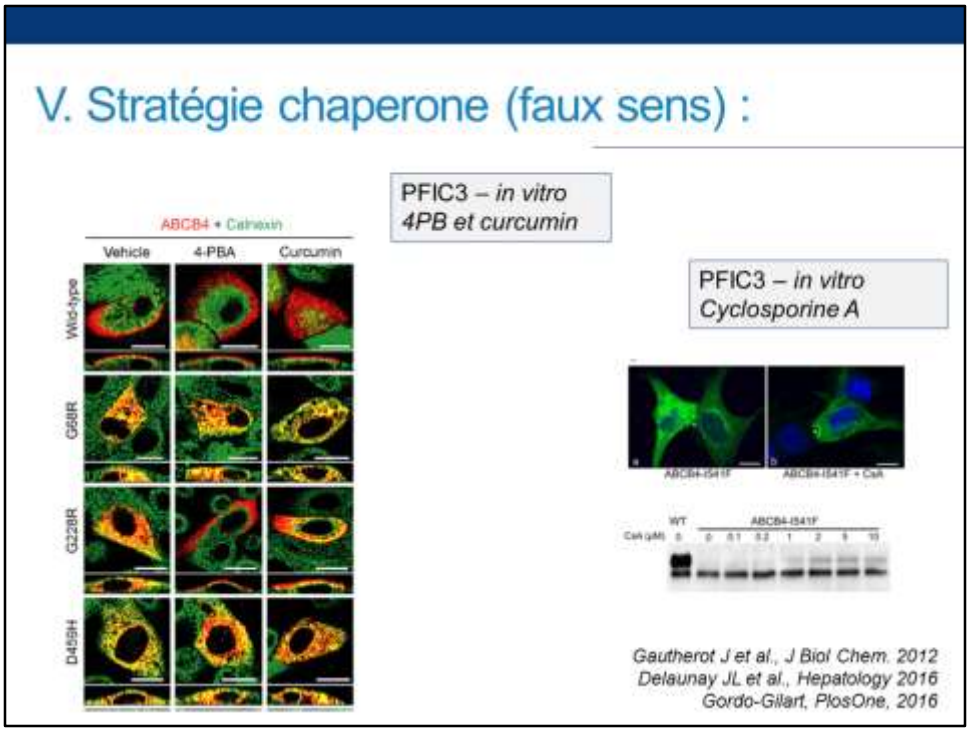


Les drogues chaperones permettent une correction des défauts de maturation ou d'adressage des protéines mutées, retenues dans le réticulum endoplasmique et secondairement dégradées par le protéasome.

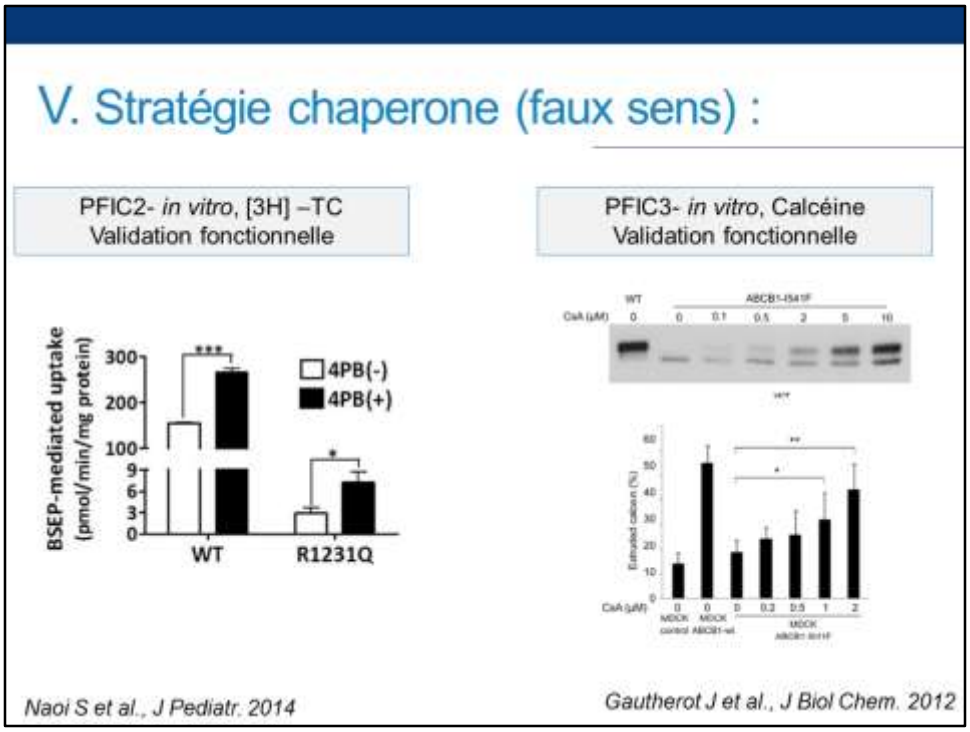
<u>PFIC 1 – *in vitro* </u>:
Le traitement par 4PB majore l'expression de la protéine FIC1 mutée évaluée par Western Blot (mutations faux sens).
Les données du Western Blot après biotinylation (procédé marquant les protéines de surface), ainsi que le marquage des mutants ATP8B1 en immunofluorescence permettent d'affirmer que l'adressage spécifique à la membrane a été augmenté (10, 11).



PFIC 2 – *in vitro* :
Les images d'immunofluorescence indirecte présentées ici montrent une augmentation du marquage canaliculaire d'un mutant BSEP après traitement par 4PB (12).
La quantification de l'expression des mutants montre un gain d'efficacité après bithérapie (4PB et acide ursodésoxycholique) (13).
Par ailleurs, il est à noter que le seul traitement par acide ursodésoxycholique permet également une augmentation de l'expression membranaire de BSEP, suggérant un effet chaperon de ce dernier.
Enfin, la culture des cellules à 27°C est la condition qui permet le meilleur effet chaperon mais paraît difficilement applicable en pratique clinique !

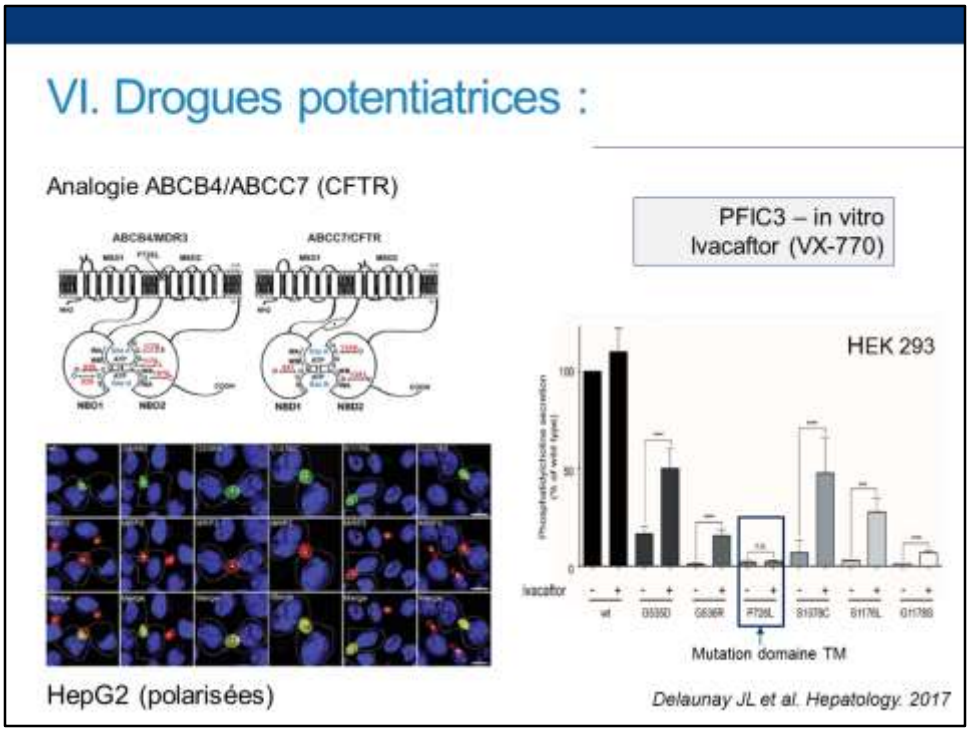


<u>PFIC3 – *in vitro* </u>:
Le traitement par ces trois chaperonnes (4PB, curcumin et cylcosporine) majore l'expression de la synthèse de tous les mutants ABCB4 testés (I514F, G228R, D459H et G68R).
Cependant, pour les mutants D459H et G68R, la protéine synthétisée reste intracytoplasmique (14, 15, 16).



PFIC 2 : L'absorption de Taurocholate tritié médiée par BSEP dans les cellules HEK293T) a augmenté de 1,6 et 2,0 fois, respectivement, après traitement par 4PB (différence d'absorption ATP-dépendante de [3H] -TC entre les cellules transfectées avec un plasmide WT ou mutant R1231Q) (17).

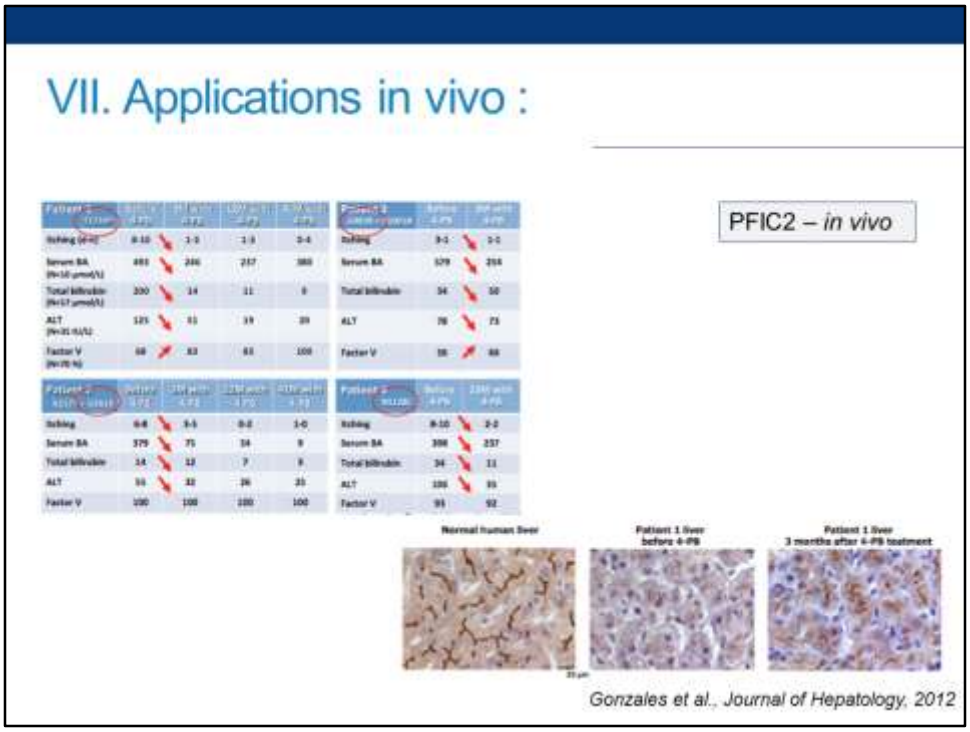
PFIC 3 : La calcéine est une protéine transportée par ABCB1 (homologue d'ABCB4) devenant fluorescente dans le cytoplasme. L'accumulation de calcéine fluorescente dans le cytoplasme est mesurée en présence et en l'absence de Vérapamil (inhibiteur d'ABCB1) dans les cellules traitées avec différentes concentrations de cyclosporine A. Le taux de transport a été calculé en faisant la différence entre le dosage de calcéine en présence et en l'absence de Vérapamil. Les cellules transfectées avec le mutant traitées par cyclosporine A transportent plus de calcéine que les cellules non traitées, de manière dose-dépendante (différence significative à partir de 2 microM), montrant la restauration de la fonctionnalité du mutant ABCB1 (14).



<u>PFIC 3 – in vitro :</u>

L'Ivacaftor (VX-770) est une drogue potentiatrice initialement étudiée dans la mucoviscidose. Elle restaure la fonction de certains variants CFTR correctement adressés au canalicule mais non fonctionnels lorsque la mutation est située sur le site de liaison à l'ATP (Nucloetid Binding Domain, NBD).

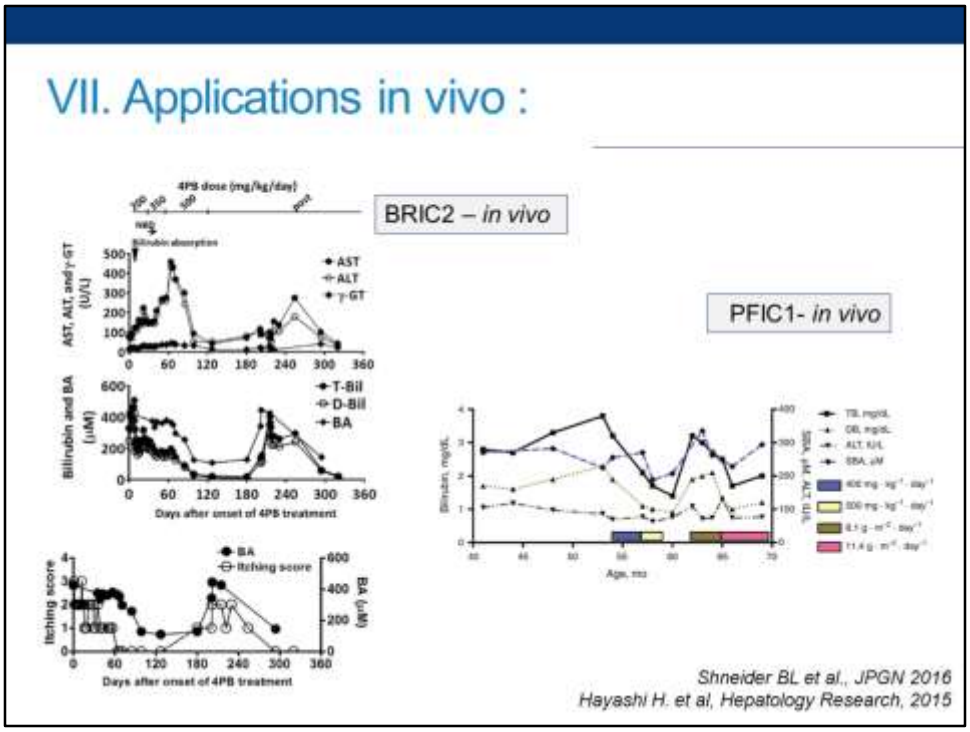
Le traitement par Ivacaftor induit une majoration de la sécrétion de phosphatidylcholine dans les vésicules membranaires issues de cellules transfectées avec des mutants ABCB4 pour laquelle la mutation est située dans un des 2 sites NMD (18).



<u>PFIC2 – *in vivo* :</u>

Le traitement par 4-phénylbutyrate permet une amélioration biologique de tous les facteurs clinico-biologiques étudiés (prurit, transaminases, acides biliaires circulants, bilirubine, facteur V) in vivo, chez les 4 patients présentant au moins une mutation faux-sens répondant au 4PB *in vitro*.

Par ailleurs, ces biopsies hépatiques effectuées chez une patiente avant et après traitement par 4PB montrent une restauration partielle de l'immunomarquage de BSEP (12).



<u>BRIC2 – *in vivo* </u>: Suivi biologique d'un adolescent atteint de BRIC 2 (un seul allèle ABCB11 muté D404G) traité par 4PB lors d'un accès cholestatique.
L'amélioration clinique et biologique a été obtenue à partir d'une posologie journalière de 500 mg/kg, sans effet secondaire apparent. Le patient a présenté une récidive des symptômes 1 mois et demi après l'arrêt du traitement par 4PB (19).

<u>*PFIC1-- in vivo* </u>: Suivi biologique d'un enfant atteint de PFIC1 traité par 4-phénlybutyrate (4PB).
Le 4PB a permis une amélioration de tous les paramètres biologiques, à l'exception du taux sanguin d'acides biliaires sériques. Le traitement par 4PB a été interrompu suite à des problèmes d'observance (à l'âge de 59 mois), puis remplacé par une galénique différente (glycérol butyrate) à 62 mois. Une nouvelle amélioration des paramètres clinico-biologiques a été constatée, permettant l'arrêt de la Rifampicine après 3 mois de traitement.
Cependant, 45 jours après l'arrêt de la Rifampicine, l'enfant a été hospitalisé devant une symptomatologie clinique et biologique d'hépatite aigue, possiblement en rapport avec une toxicité du glycérol butyrate (20).

Conclusion et perspectives

- Médecine personnalisée → stratégie à adapter selon classe de mutation
- Nécessité d'études *in vitro* de chaque mutation afin de tester l'efficacité des drogues les plus adaptées (potentiateurs, correcteurs…)
- Nouvelles drogues nécessaires (criblage de chimiothèques, repositionnement, chimie médicinale)
- Possibilité d'application de ces traitements aux autres phénotypes moins sévères des défauts de transports canaliculaires (BRIC, ICP...)
- Galénique à améliorer

Bibliographie :

(1) Jacquemin E et al., Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012
(2) Van Der Woerd et al., Wolrd J Gastroenterol, 2017
(3) Maggiore G. et al., J. Hepatol, 2010
(4) Gonzales E et al., J Hepatol, 2010
(5) Van der Woerd WL, Hepatology, 2015
(6) Floquet et al., Medecine Science, 2012
(7) Alireza Baradaran-Heravi et al., Nucl Ac Res, 2016
(8) Sermet-Gaudelus I, BMC Med. 2007
(9) Malik V et al, Ann Neurol. 2010
(10) Van der Velden et al., Hepatology 2010
(11) Van der Velden et al., J. Hepatol 2016
(12) Gonzales E et al., J Hepatol 2012
(13) Gonzales E et al., Hepatology 2015
(14) Gautherot J et al., J Biol Chem. 2012
(15) Delaunay JL et al., Hepatology 2016
(16) Gordo-Gilart, PlosOne, 2016
(17) Naoi S et al., J Pediatr. 2014
(18) Delaunay JL et al. Hepatology. 2017
(19) Hayashi H. et al, Hepatology Research, 2015

(20) Shneider BL et al., JPGN 2016