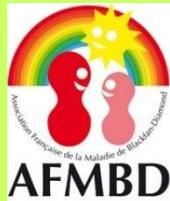




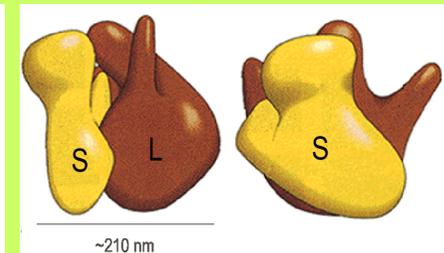
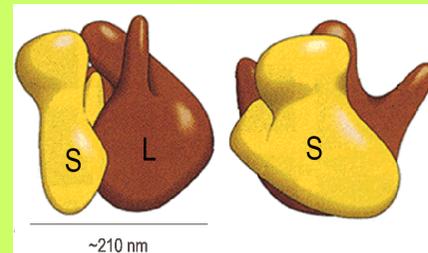
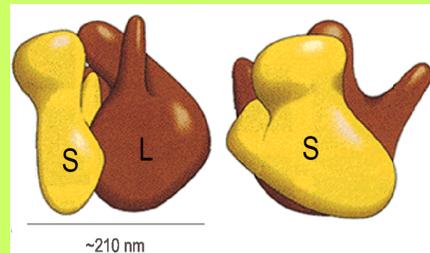
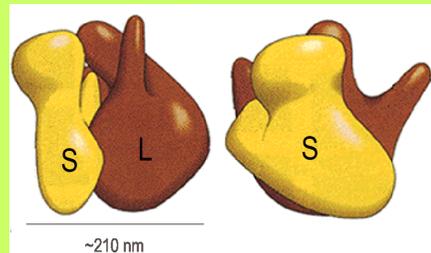
Anémie de Blackfan-Diamond

Actualités



Réunion de l'AFMBD. 21 octobre 2019

T. Leblanc



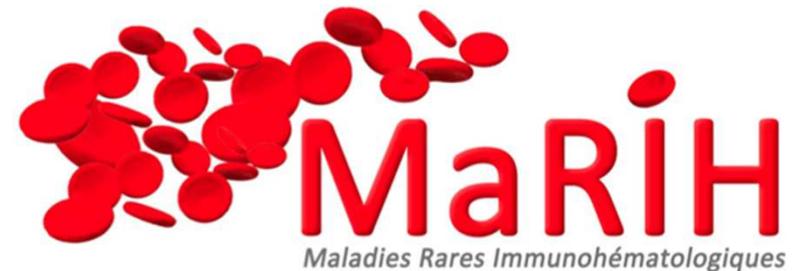
ABD: une maladie rare

☞ un CRMR: renouvelé en 2017

ABD ajoutée à ce centre



☞ Une filière maladies-rares:



OFABD



Pour mémoire: cohorte mise en place par Gil Tchernia en 1996

OFBAD: observatoire agréé par la CNIL

323 patients enregistrés

NB: 166 patients de plus de 18 ans



Nombre d'ADN reçus par an : \pm 20-25

Corrélation phénotype/génotype: analyses en cours avec l'équipe du Pr. Corinne Alberti

2017:
758.000
naissances par an
⇒ < 10 pts ABD

Nouveau registre: RIME

Doublon...

Mais:

- 1) Moyens financiers +++
- 2) OFABD conçu uniquement pour un objectif précis: étude de corrélation génotype/phénotype
- 3) Intérêt pour les aspects transversaux et les études communes

Revue de la littérature

Oct. 2018 ▶ Oct. 2018:  24 articles publiés

Revues : 7

Articles cliniques & génétiques : 6

Régistre (Japon)

Reversion

Patients RPL15

Cardiopathies

Risque de cancer

Atteinte pancréas (1pt)

(+ 2 case reports cliniques & 1 génétique)

Articles biologie clinique : 1

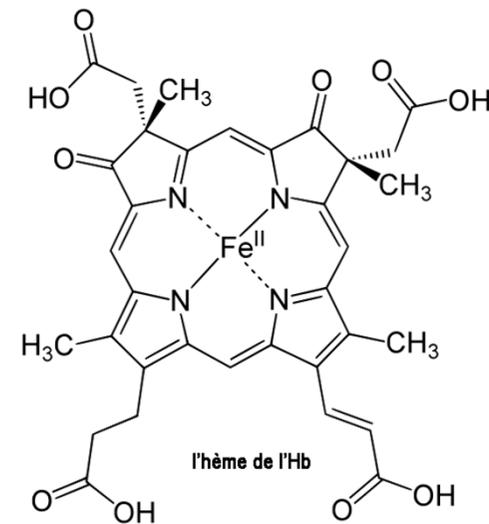
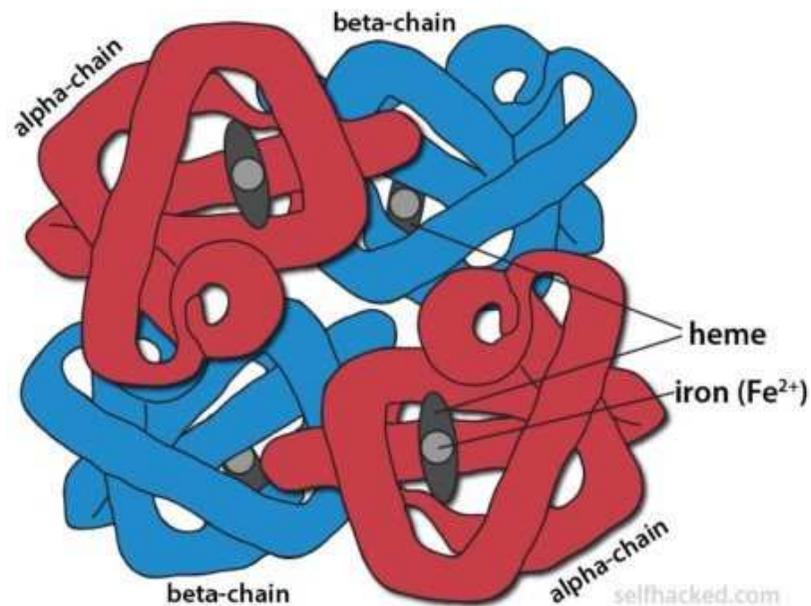
Articles scientifiques & modèles animaux : 3

Aspects thérapeutiques : 1 (*recherche*)

Regulation of globin-heme balance in Diamond-Blackfan anemia by HSP70/GATA1

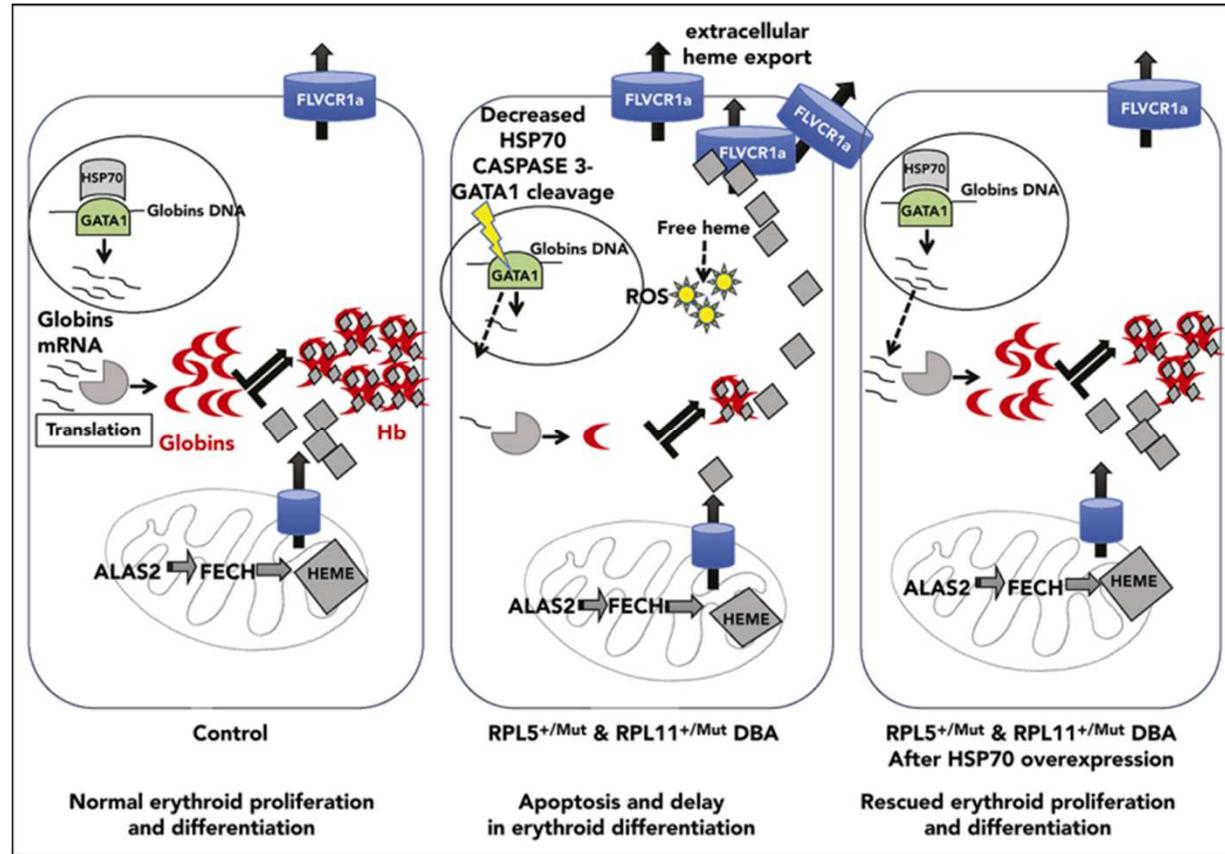
Sarah Rio,^{1,3,*} Marc Gastou,^{3,5,*} Narjesse Karboul,^{1,3} Raphaël Derman,^{1,5} Thunwarat Suriyun,⁶ Hana Manceau,^{1,3,5} Thierry Leblanc,⁷ Jamel El Benna,^{1,5} Caroline Schmitt,^{1,3,5,8} Slim Azouzi,^{3,5,9} Jérôme Larghéro,^{5,10,11} Zoubida Karim,^{1,3,5} Alejandra Macias-Garcia,¹² Jane-Jane Chen,¹² Olivier Hermine,^{2,3,6} Geneviève Courtois,^{2,3,6} Hervé Puy,^{1,3,5} Laurent Gouya,^{1,3,5,8} Narla Mohandas,¹³ and Lydie Da Costa^{1,3,5,9,14}

Synthèse de l'hémoglobine implique une synthèse équilibrée des 2 types de chaînes, α & β globine, et de l'hème



(Blood 2019)

Modèle proposé



Défaut de synthèse d'Hb avec excès relatif d'hème

⇒ production excessive de radicaux libres

⇒ blocage de différenciation et mort cellulaire (apoptose)

RESEARCH LETTER

Increased Prevalence of Congenital Heart Disease in Children With Diamond Blackfan Anemia Suggests Unrecognized Diamond Blackfan Anemia as a Cause of Congenital Heart Disease in the General Population
A Report of the Diamond Blackfan Anemia Registry

102 enfants avec cardiopathie

(âge > 6 mois, pas de syndrome connu, pas d'ATCD de transfusion)

Mesure de l'ADAe : 5 pts avec ADAe élevée

(tous ont VGM normal; 1 anémie modérée)

👉 1 pt avec mutation *RPS24*

Increased risk of colon cancer and osteogenic sarcoma in DBA running head: neoplasia in DBA

DBAR: N = 702

Même analyse qu'en 2012 avec 94 pts en plus et un suivi augmenté de 2198 pts/années

34 cancers chez pts non greffés

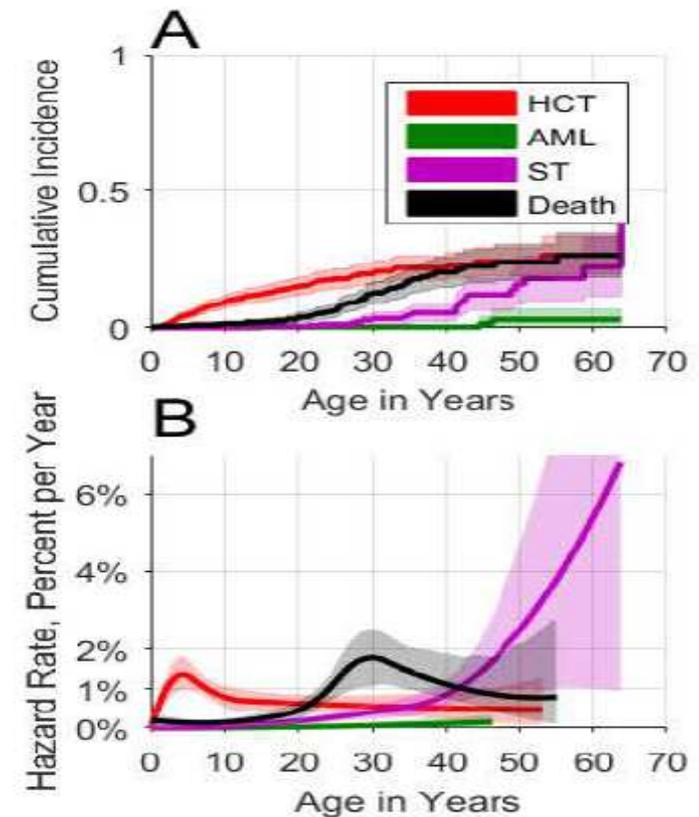
Age médian au 1^{er} cancer:

👉 **35 ans [11-70]**

Incidence cumulée à 45 ans:

👉 **13,7%**

(Vlachos & al, Blood 2018)



Cancer Diagnosis	No.	O/E ratio (95% CI)	Mutated gene	Median Age at first cancer dx, years (range)
All cancer	28	4.8 (3.2-6.9)	-	35 (11-70)
<i>Gastrointestinal Cancer</i>				
Colon carcinoma	7	44.7 (18.0-92.1)*	RPS19 (2; 5 unknown)	41 (28-51) (also one of the genetically unknown patients had breast cancer)
Gastro-esophageal cancer	1	28.2 (0.7-157.0)	RPS17	28
Esophageal cancer	1	64.6 (1.6-359.7)	RPL5	69 (patient previously had melanoma)
<i>Sarcoma</i>				
Osteogenic sarcoma	4	42.4 (11.6-108.7)	All unknown	18 (11-34)
Soft tissue sarcoma	1	6.6 (0.2-36.9)	Unknown	30
<i>Genitourinary Cancer</i>				
Testicular cancer	1	4.0 (0.1-22.2)	RPL35A	42
Uterine cancer	1	0 (0-24.1)	RPS19	64
Cervical cancer	1	7.1 (0.2-39.3)	RPS19	27
Squamous cell carcinoma (vaginal)	1	172.4 (4.4-960.3)	RPL11	41
<i>Skin Cancer</i>				
Melanoma	1	2.0 (0.1-11.0)	RPL5	50 (patient later had esophageal cancer)
Squamous cell carcinoma (oral)	1	9.1 (0.2-50.7)	RPL11	59
<i>Other Cancer</i>				
Breast cancer	2	2.1 (0.3-7.6)	RPS19 (1; 1 unknown)	34, 43 (patient later had colon cancer)
Lung cancer	1	9.4 (1.1-33.8)	RPS19	49
Choroid meningioma of the lung	1	Included in lung cancer above	RPS19	21
<i>Hematologic Cancer</i>				
Non-Hodgkin lymphoma	1	3.3 (0.1-19.0)	RPL5	41
AML	3	28.8 (5.9-84.0)	RPL35A (2; 1 unknown)	44 (15-46)
<i>Myelodysplastic syndrome</i>				
MDS	8	352.1 (152.0-693.8)	RPL35A(2), GATA1 (1) (5 unknown)	26 (2-53)
<i>Skin Cancer excluded from analysis</i>				
Basal cell carcinoma	3	Not available	All unknown	54 (29-54)
Squamous cell carcinoma	3	Not available	RPL11 (1; 2 unknown)	54 (50-54)
<i>Post-Transplant Cancer excluded from analysis</i>				
Colorectal Carcinoma	2	346.9 (42.0-1253.0)	Both unknown	19, 29
Osteosarcoma	1	257.8 (6.5-1436.2)	Unknown	4
Lung cancer	1	468.3 (11.9-2609.4)	RPL11 (also heavy smoker)	43
Wilms tumor	1	228.6 (5.8-1273.4)	RPL35A (gene in unrelated duplicated area [8q24.1] is a putative Wilms tumor-associated proto-oncogene [NOV])	8

Commentaires (1)

2^{ème} étude qui va dans le même sens mais même cohorte et mêmes auteurs

Pas de recommandation particulière de suivi établies à ce jour mais...

Au minimum:

- suivre +++ les recommandations faites à la population générale

Ex: colon: fibres, peu de viande, Hémocult

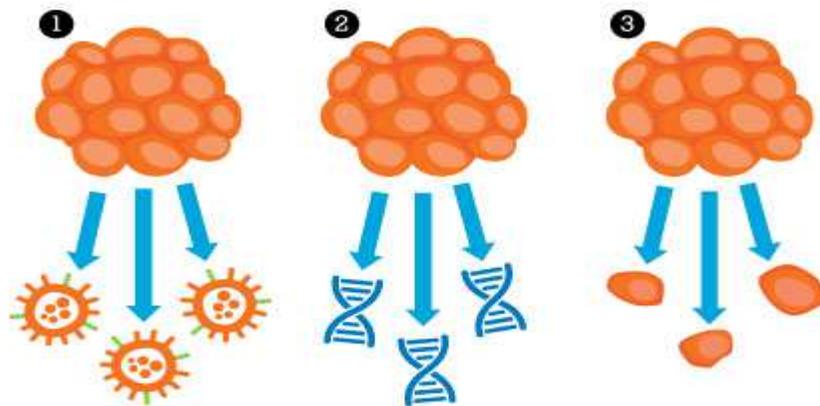


Commentaires (2)

A ce jour: pas de dépistage validé donc pas de dépistage systématique recommandé mais...

Exception: SMD/LAM & myélogrammes séquentiels?

Avenir: biopsies liquides



Que recherche-t-on lors d'une biopsie liquide?

1. Des cellules cancéreuses qui se détachent des tumeurs et se retrouvent dans le sang (**cellules tumorales circulantes**).
2. Des fragments de matériel génétique cancéreux qui se détachent des tumeurs et se retrouvent dans le sang (**ADN tumoral circulant**).
3. Des portions de cellules cancéreuses qui s'échappent et circulent dans le sang (**exosomes**).

(<http://www.cancer.ca/>)

Commentaires (3)

En cours de discussion: pratique de coloscopies systématiques comme pour les pts issus de famille avec risque de cancer colique

Auquel cas: à partir de 25 ans et tous les 2 ans...

A discuter au minimum en fonction des ATCD familiaux

Traitement de l'ABD

Transfusions & corticoïdes

Greffe de CSH

Approches alternatives & futures:

- **Leucine**
- **Screening systématique de petites molécules**
- **Thérapie génique**



Greffe dans l'ABD

Expérience Franco-Allemande

Role of hematopoietic stem cell transplantation in therapy of children and adolescents with Diamond Blackfan anemia: a report from the German DBA registry and the French HSCT registry

Brigitte Strahm¹, Felicia Loewecke¹, Charlotte Niemeyer¹,
Michael Albert², Peter Bader³, Birgit Burkhardt⁴, Lydie Dacosta⁵,
Alexandra Fischer¹, Tayfun Güngör⁶, Bernd Gruhn⁷, Ina
Hainmann⁸, Friedrich Kapp¹, Peter Lang⁹, Ingo Müller¹⁰, Ansgar
Schulz¹¹, Amina Szvetnik¹, Marcin Wlodarski¹, Peter Noellke¹,
Thierry Leblanc⁵, Jean Hugues Dalle⁵

(soumis à Hematologica)

Cohorte de pts greffés

1985-2017

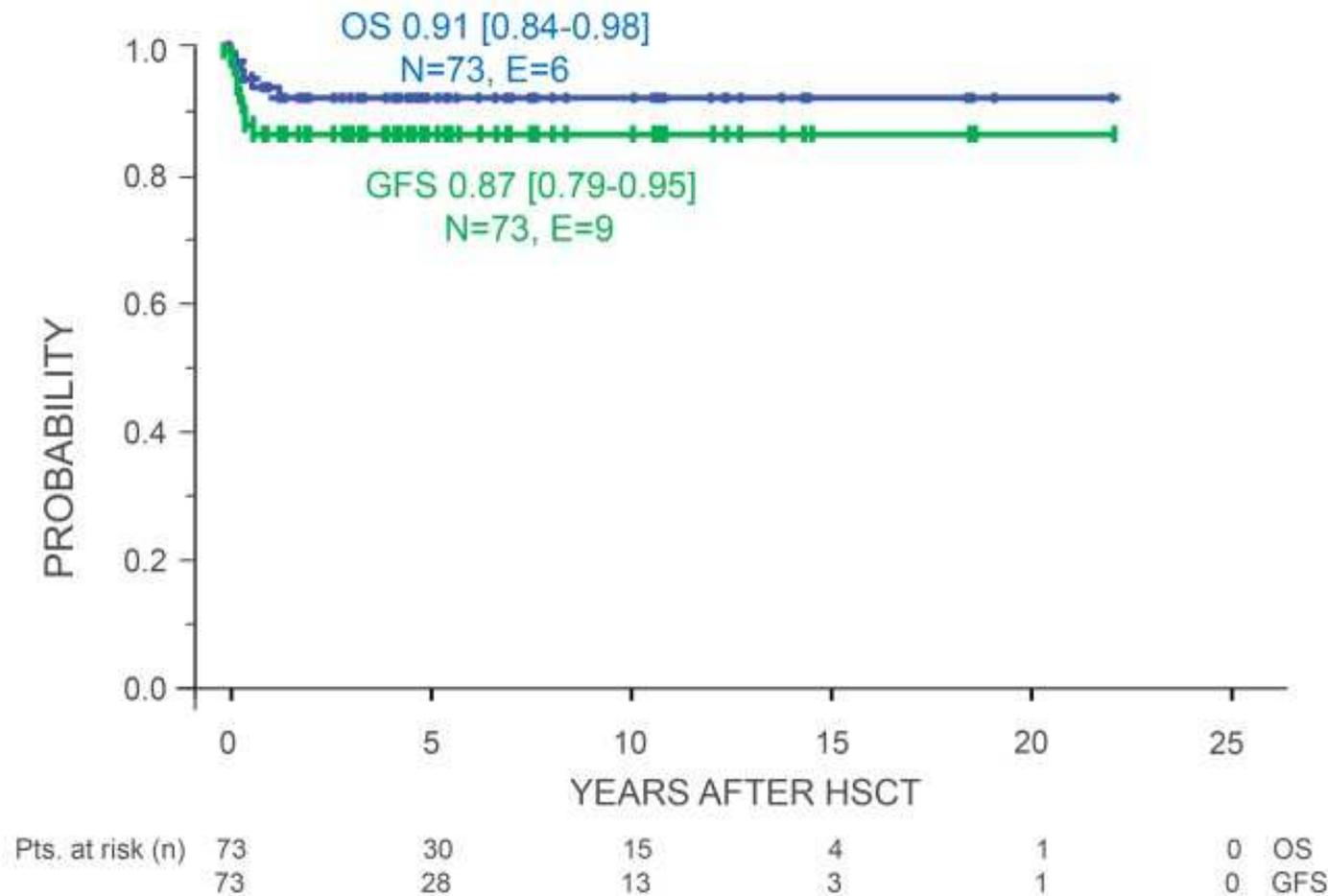
73 pts DBA: 48 allemands & 25 français

Age médian à la greffe: 5,7 ans [0,9-17,3]

Greffes:

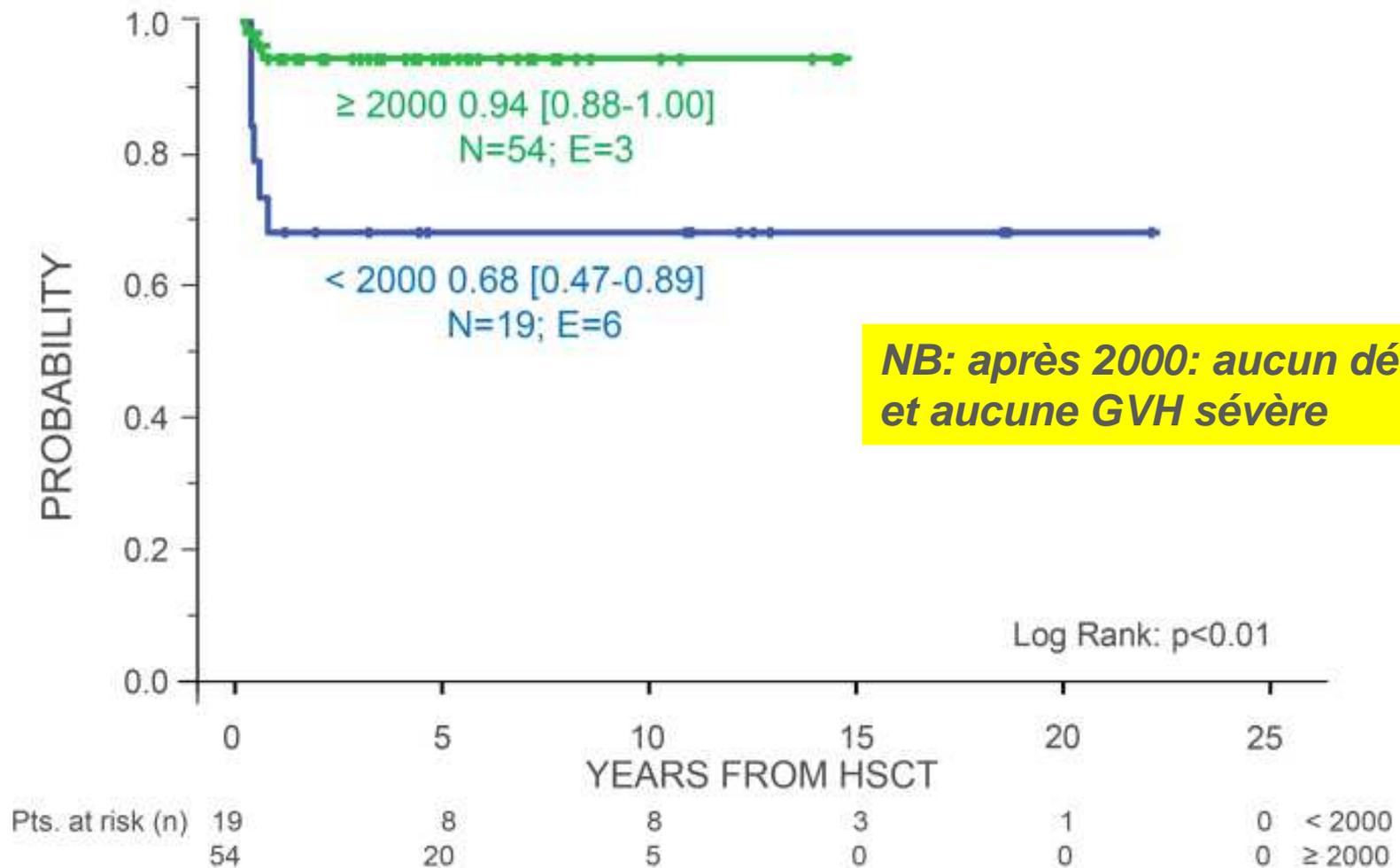
- **62% avec un donneur de la fratrie**
- **74% après 2000**
- **ICT pour 3 pts seulement**

Probabilité de survie & de survie sans GVH chronique



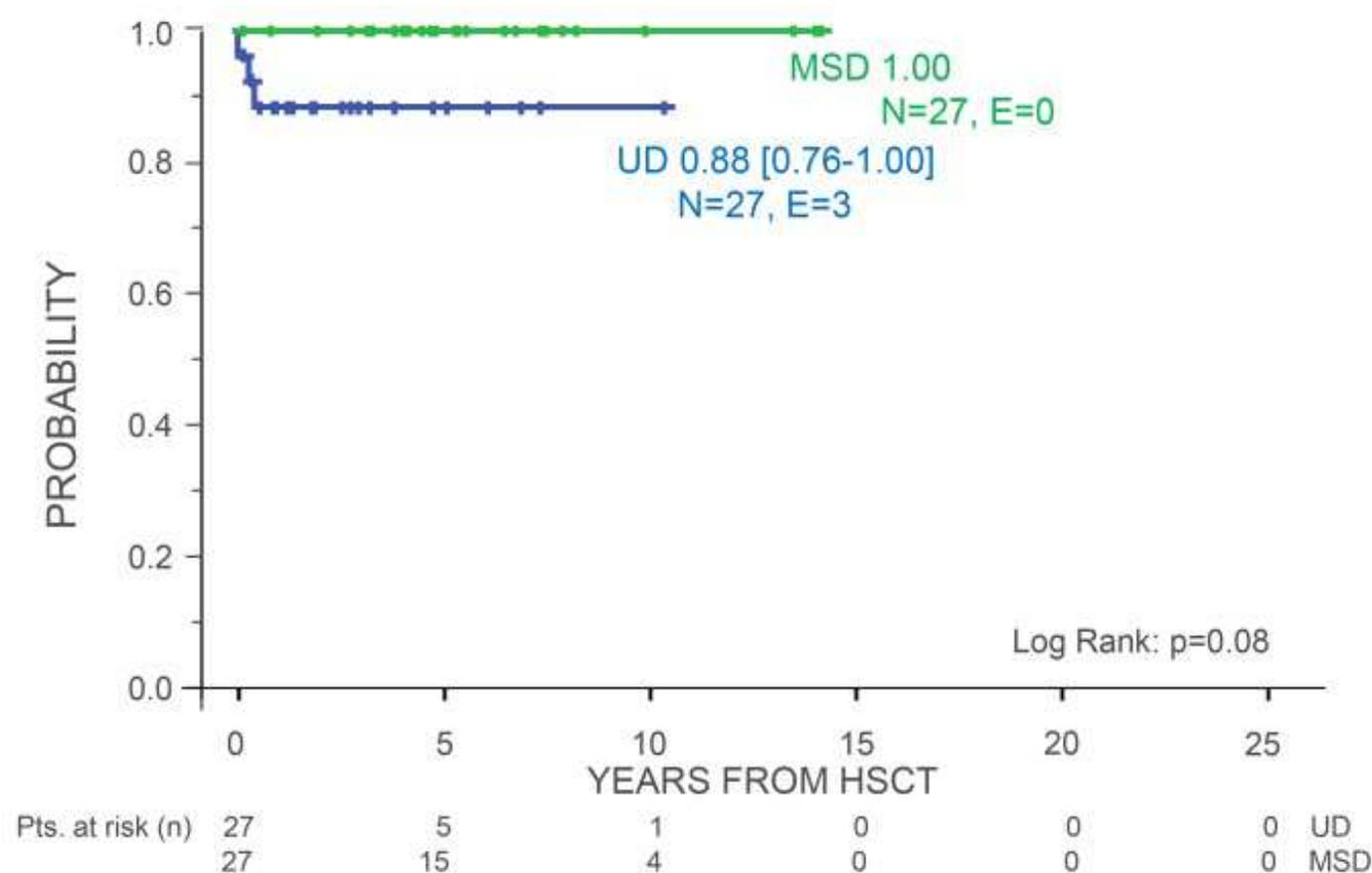
Ensemble de la cohorte; survie et survie sans échec de greffe

Probabilité de survie sans GVHc (2) selon période de greffe



**NB: après 2000: aucun décès
et aucune GVH sévère**

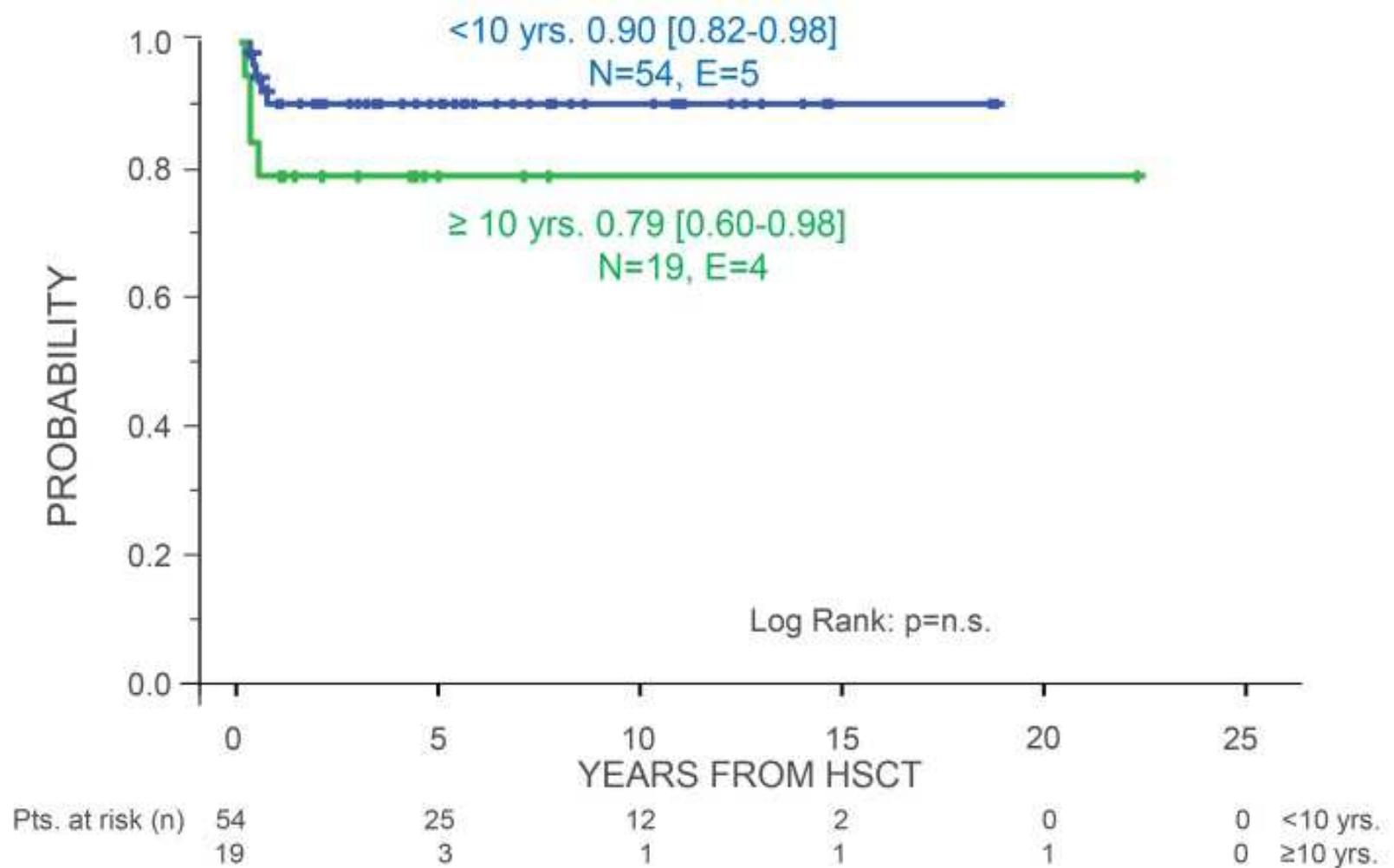
Probabilité de survie (3) selon type de donneur



MSD: fratrie (match sibling donor)

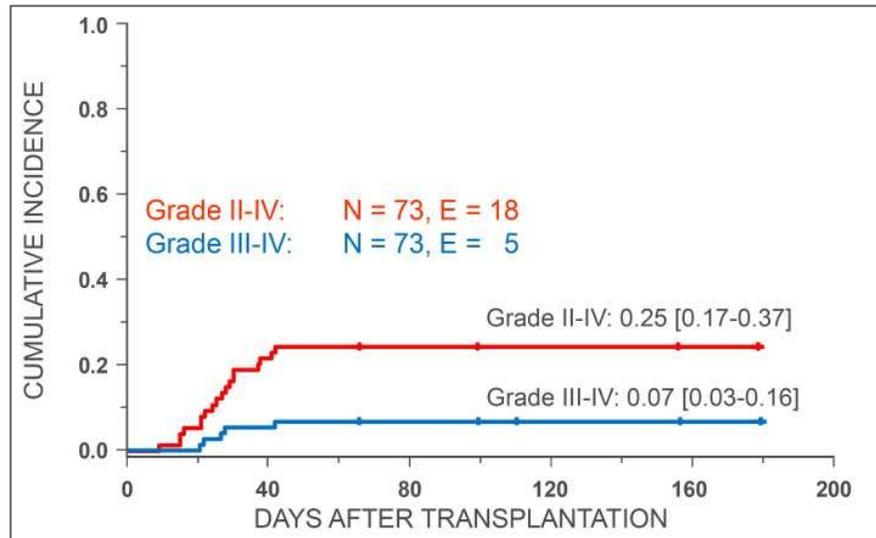
UD: unrelated donor

Probabilité de survie (4) selon l'âge à le greffe

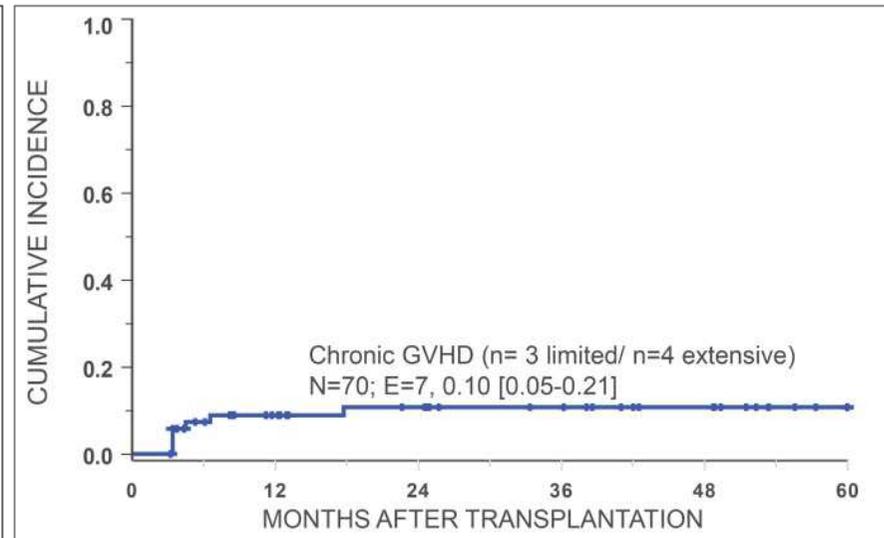


Cumulative incidence of acute (A) and chronic (B) GvHD following HSCT in pts with DBA

A



B



ABD & allogreffe de moelle (1)

Résultats confirmant les recommandations actuelles de greffe chez l'enfant:

- Greffer tôt: avant 5 ans voire avant 3 ans
- **Indications:**
 - Pts non corticosensibles (*corticorésistance primaire, corticodépendance à forte dose*)
 - Neutropénie sévère associée
 - Surcharge en fer non contrôlable ou toxicité des chélateurs

Donneurs: géno- ou phéno-identiques

ABD & allogreffe de moelle (2)

Quid des pts plus âgés (adolescents, adultes)?

👉 indications beaucoup plus restreintes:

- Pancytopenie
- Evolutions clonales: myélodysplasies, leucémies

Nouvelles pistes thérapeutiques?

Screening systématique de petites molécules

Thérapie génique



: 53 études enregistrées:

☞ 6 essais thérapeutiques:

- leucine (2) *(hors greffe)*
- sotatercept
- **trifluoperazine**
- autres (2)

Screening systématique

Enfin possible car il existe des modèles *in vitro* & animaux (zebrafish +++)

Avantage: pas d'*a priori*

Inconvénients:

- Composé actif *in vitro*: quid *in vivo*?
- molécules testées peuvent être très loin des qualités d'un médicament: longue période de mise au point avant le stade des essais cliniques

Pistes actuelles:

- US: activateur de l'autophagie & trifluoperazine
- Australie: stabilisateurs de *TP53*
- Suède: CDK8 inhibitors



Trifluoperazine

Using the RP deficient zebrafish embryo model, high throughput drug screens have demonstrated a strong hematologic response to several calmodulin inhibitors.

One of these chemicals is trifluoperazine (TFP). TFP treatment of a mouse model of DBA also increased the red blood cell count and the Hb levels in the mice.

TFP is a FDA-approved typical antipsychotic agent that has been available since 1958 with a well-known safety profile. In the United States, TFP is approved for the short-term treatment of generalized non-psychotic anxiety; treatment or prevention of nausea and vomiting of various causes; and, management of psychotic disorders.

(Clinicaltrial.gov web site)

Critères d'inclusion

- Men and women age: 18 years and <65 years of age.
- Weight: ≥ 45 kilograms
- DBA diagnosed according to the DBA criteria (Vlachos, 2008)
- RBC transfusion-dependence (defined as 2 units packed RBCs per 28 days averaged over 84 days [12 weeks] prior to study entry)
- Calculated creatinine clearance > 30 mL/min
- Karnofsky performance status scale score ≥ 70

.../...

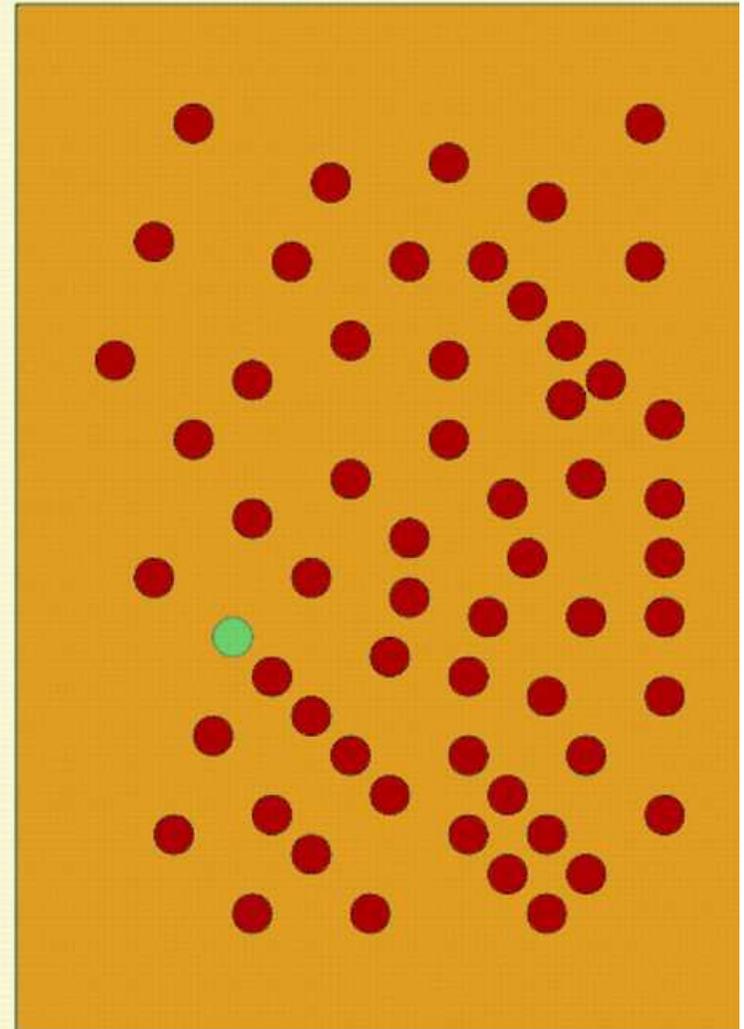
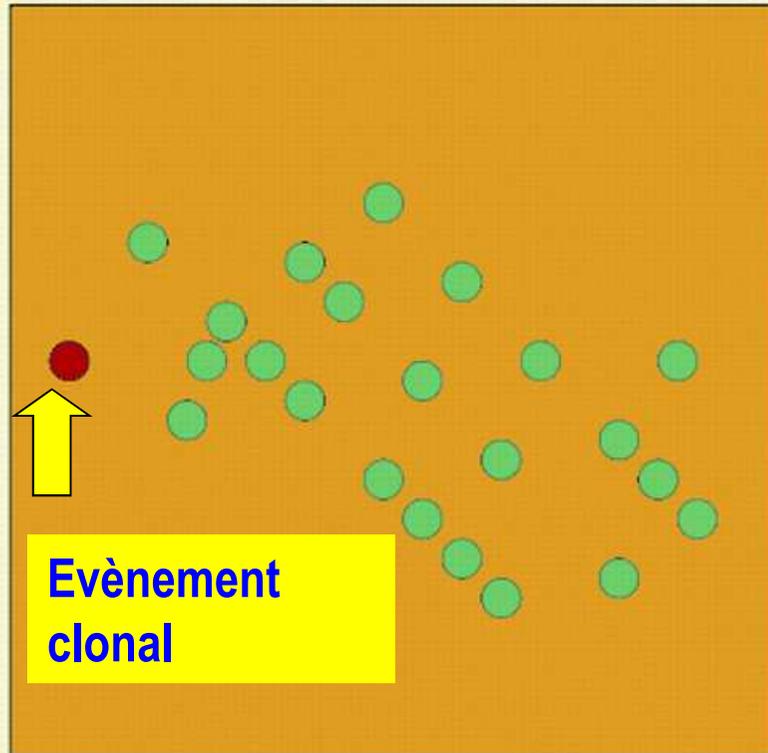
Mosaïcisme somatique & ABD

Rares cas publiés avec démonstration d'une réversion génétique: preuve du concept

Thérapie génique dans l'ABD:

- Travaux en cours et publiés dans des modèles animaux**
- Aucun essai clinique chez l'homme**

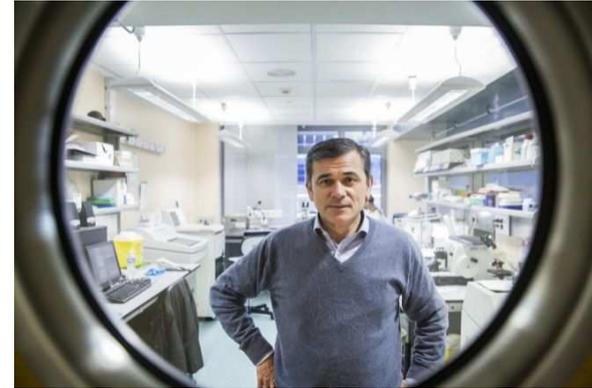
Mise en place d'un mosaïcisme somatique



*Suppose un avantage prolifératif pour cellule corrigée
Possibilité de persistance de cellules non corrigées*

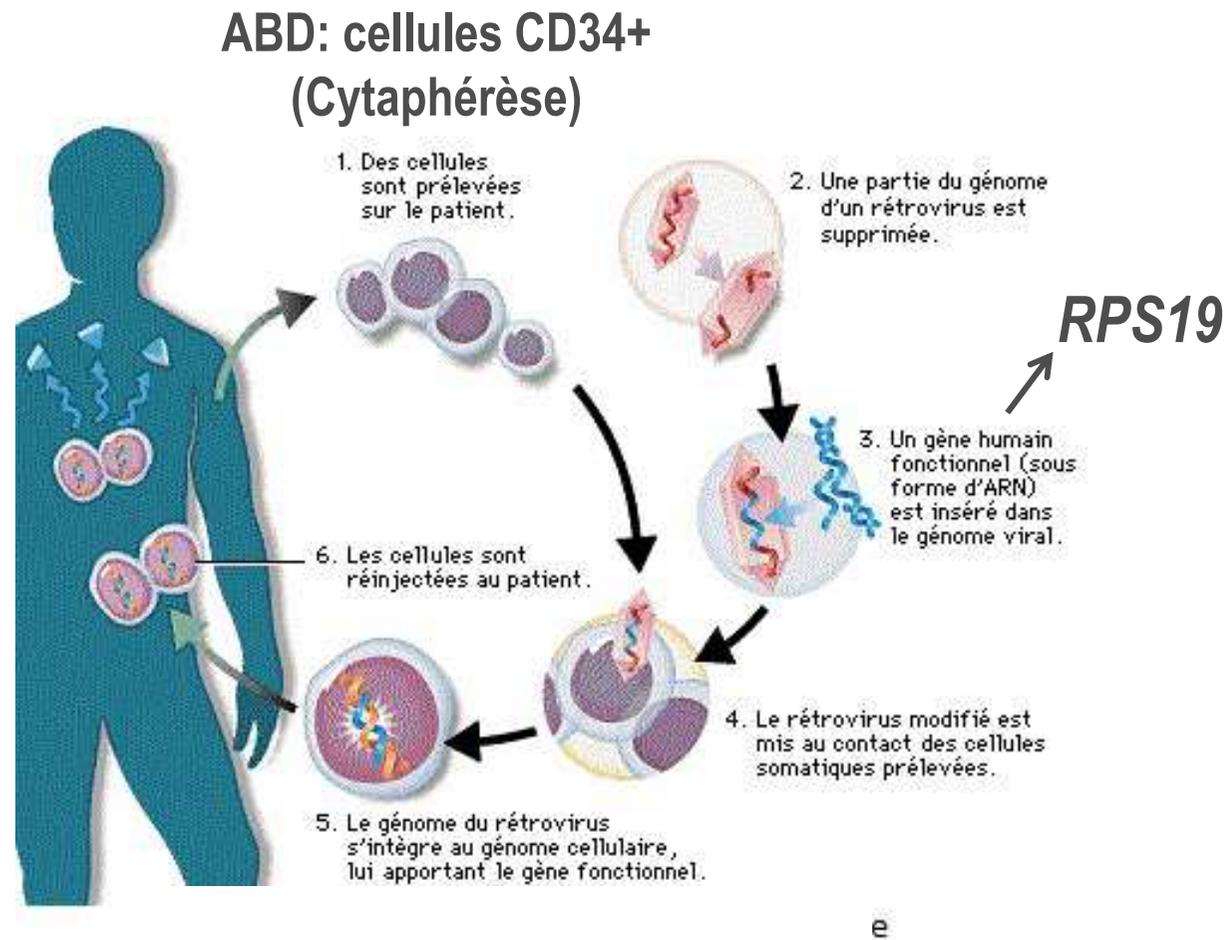
Thérapie génique

**Collaboration en cours avec
Juan A. Buren (Madrid)**



**A traité les premiers patients atteints
d'anémie de Fanconi par thérapie génique
(gène *FANCA*)**

Thérapie génique: principes

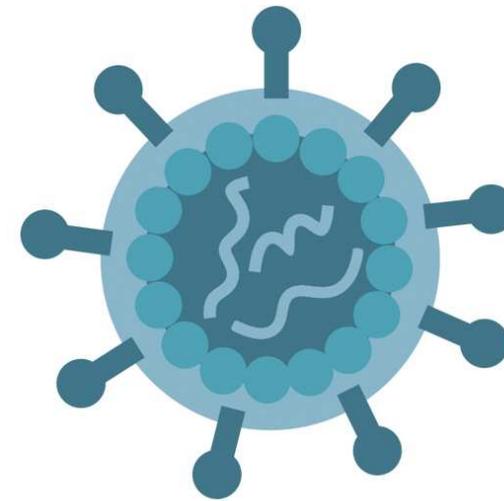
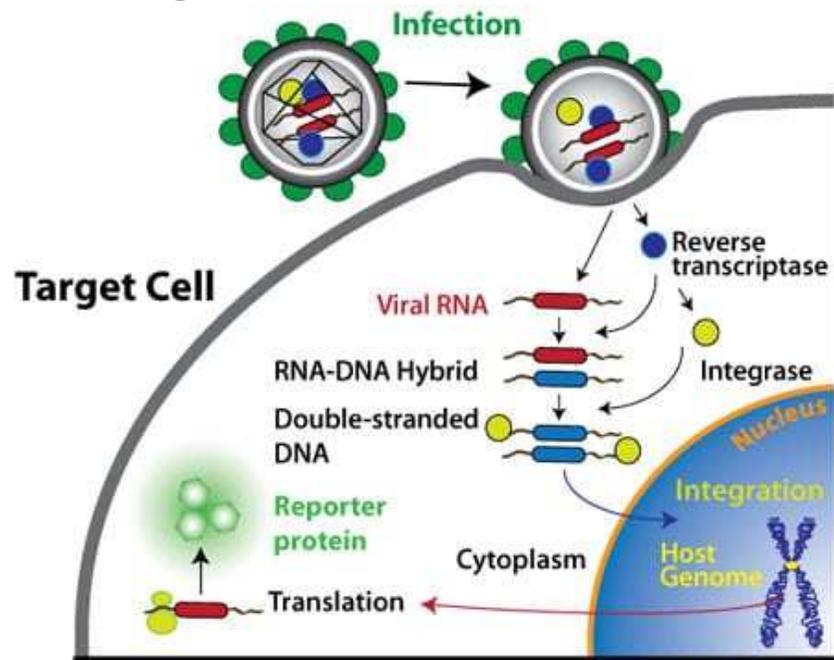


Lentivirus

Virus enveloppés, à ARN
(famille des *Retroviridae*)

80 à 100 nm

S'intègrent à l'ADN de la cellule:



👉 1^{ères} étapes: pré-cliniques: construire & valider le vecteur



Fancolen-1



LETTERS

<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0550-z>

**nature
medicine**

Successful engraftment of gene-corrected hematopoietic stem cells in non-conditioned patients with Fanconi anemia

(Septembre 2019)

Patients inclus

Patient ID	Cryopr. CD34 ⁺ cells	Screening visit	Age (years)	Hb (g/dL)	Neutroph/ μ L	Platelets/ μ L	BM CD34 ⁺ cells/ μ L	BM CD34 ⁺ /CD38 ⁺ cells/ μ L	CFCs/ μ L	CFCs Surv. to MMC (10 nM)	% aberrant T cells (DEB test)
FA-02002	Yes	HSC Collection	3.4	12.7	2,400	84,000	545.8	13.26	13.87	0.0 %	80%
		HSC Gene therapy	5.2	10.5	1,600	29,000	135.0	12.29	2.81	0.1 %	86%
FA-02004	Yes	HSC Collection	5.9	12.3	1,000	68,000	35.3	1.56	2.70	3.9 %	66%
		HSC Gene therapy	7.6	10.8	900	46,000	25.1	0.99	0.80	0.0 %	80%
FA-02005	No	HSC Collection/ Gene Therapy	4.0	12.5	1,680	38,000	276.1	0.39	5.25	0.0 %	74%
FA-02006	No	HSC Collection/ Gene Therapy	6.6	11.3	760	79,000	34.1	3.15	5.05	0.0 %	64%

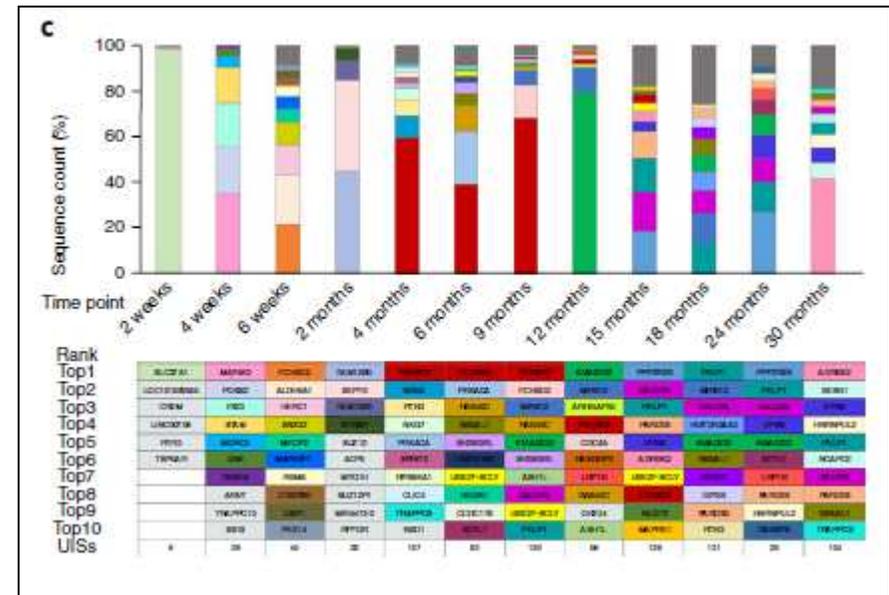
Pour être traités: au moins 1 critère d'aplasie débutante: Hb < 8g, PNN < 750 (\Rightarrow 1000) ou plaquettes < 30.000 (\Rightarrow < 50.000)

Sites d'intégration

Pas de site d'intégration préférentiel
(en particulier pour des oncogènes:
comme *LMO2*, *CCND2*, *MECOM*)

Profil oligoclonal s'enrichissant
progressivement sans dominance
clonale

*NB: parfois site d'intégration restreint à une
seule lignée...*



Correction phénotypique *in vivo*: NFS

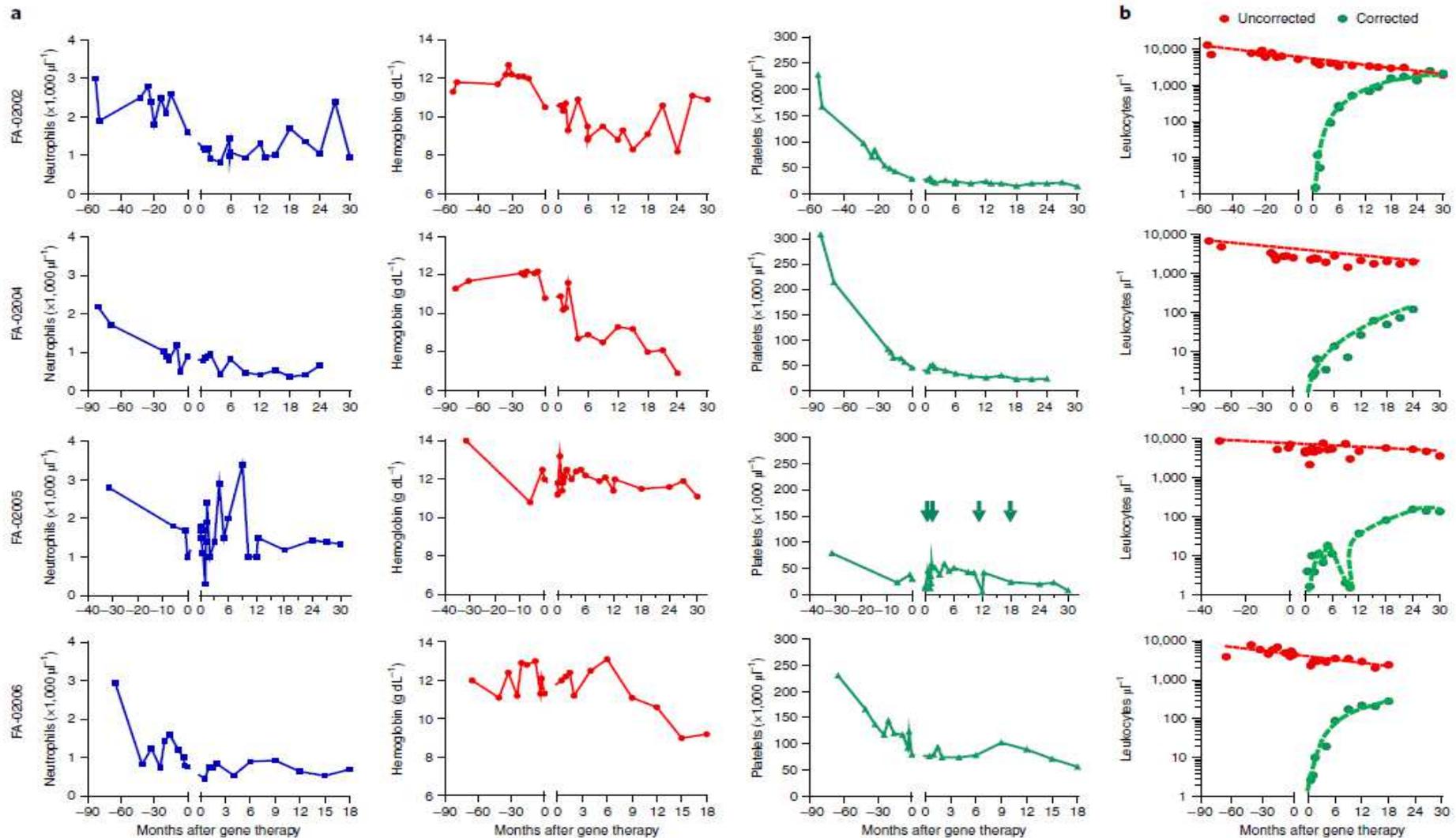


Fig. 4 | PB cell counts in patients with FA before and after gene therapy. a, Evolution of neutrophils (left; blue), hemoglobin levels (middle; red) and platelets (right; green) in PB of patients with FA before and after gene therapy. Green arrows indicate the administration of prophylactic platelet transfusions. **b,** Kinetics of uncorrected (red) and corrected leukocytes (green) in the PB of patients with FA before and after gene therapy.

Thérapie génique pour l'anémie de Fanconi

EN FAVEUR

Bonne évolution hématologique des patients révertants

Absence de conditionnement +++:

- Risque toxique limité
- Ne compromet pas l'avenir
- Pas d'augmentation de risque de tumeurs solides (*pas de conditionnement, pas de GVHc*)

CONTRE

Approche expérimentale

Quid du risque d'évolution leucémique?

Mêmes remarques pour l'anémie de Blackfan-Diamond !

Thérapie génique pour l'ABD

Comparaison avec l'AF (1)

Génétique: *FANCA*: 70% versus *RPS19*: 25%

NB: problème du niveau d'expression?

Prélèvement de CD34 (cellules à corriger) *a priori*
beaucoup plus facile +++

👉 Possibilité de traiter enfants plus âgés voire adultes?

On a le temps d'attendre la « prise » ...!

Instabilité génétique plus faible

Thérapie génique pour l'ABD

Comparaison avec l'AF (2)

Insuffisances de la thérapie génique:

- Ne corrigera « que » l'anémie et les besoins transfusionnels
- Risque leucémique (plus faible ABD que AF) *a priori* non supprimé (à la différence de l'allogreffe); idem pour le développement d'un déficit immunitaire B

Thérapie génique & ABD

Globalement:

- parait plus facile pour certains points avec possibilité clinique d'attendre plus longtemps
- aspect spécifique néanmoins à explorer:
 - niveau d'expression de la protéine
 - impact plus fort de la variabilité génétique?

Etude pré-clinique en cours avec l'équipe de Madrid.

Importance d'analyses sur prélèvement médullaire +++

Thérapie génique: comment?

1^{ère} étape: recueillir des cellules souches hématopoïétiques

Suppose une stimulation de la moelle pendant quelques Jours avec du G-CSF puis du plerixafor

Facteurs de croissance hématopoïétiques (1): G-CSF

Récepteur au G-CSF: lignée granuleuse ++

1966: découverte du G-CSF

1986: gène cloné

1987: 1^{ers} essais cliniques

DCI: filgastrim, pegfilgastril, lenogastrim

Large utilisation en clinique:

- Neutropénie post chimiothérapie
- Mobilisation de CSH (autogreffe, allogreffe, donneurs de PNN)
- Neutropénie constitutionnelles

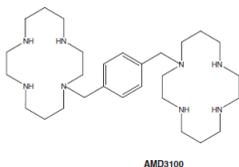
Posologie variable selon indication:

- don de CSH allogéniques: 7,5 à 10 µg/kg/j en 1 à 2 fois pour 4 à 5 jours
- Pts AF: doses de 16 à 32 µg/kg/j déjà utilisées

Associé à un risque augmenté de LAM dans certaines indications:
dose cumulée et durée d'exposition

Facteurs de croissance hématopoïétiques (2)

Plerixaflor (AMD3100)



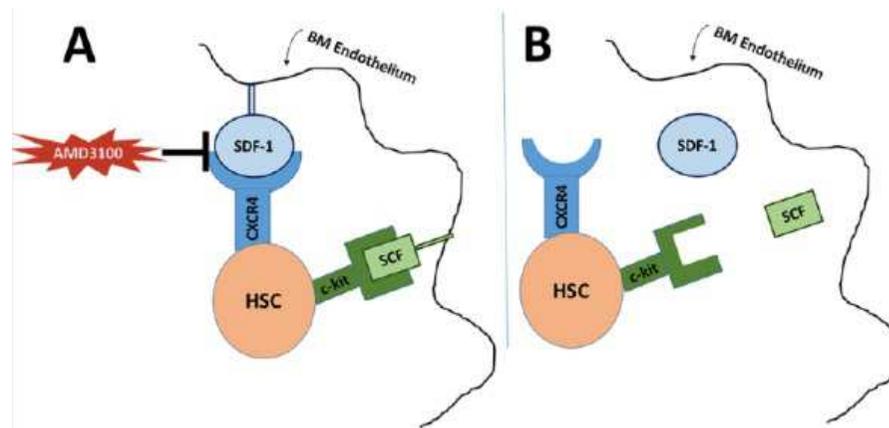
Antagoniste du récepteur (CXCR4) au SDF-1

Molécule beaucoup plus récente:

- Effet sur la mobilisation CSH: 2005
- FDA approval il y a 10 ans

Utilisation : mobilisation de CSH en association avec le G-CSF (AMM pour les autogreffes); ou au VIAGRA; ou au CXCR2 agoniste

: autres: infection VIH (forme orale), WHIM syndrome, syndrome hépato pulmonaire, cancérologie...



Posologie: 240 µg/kg/j (max 280)
En règle 1 à 4 doses (AMM)
& jusqu'à 7 doses

Thérapie génique: comment?

2^{ème} étape: corriger les cellules *in vitro* par transduction des cellules par un vecteur viral: ici un lentivirus qui apporte le gène manquant

3^{ème} étape: réinjecter ces cellules au pt

Thérapie génique: quand?

Equipe très motivée

Nécessité de boucler les études pré-cliniques:
étude *in vitro*, modèles animaux

Expérience & succès dans l'AF: avantages
majeurs

Premier essai d'ici 5 ans? Gène: *RPS19*

Génétique de l'ABD

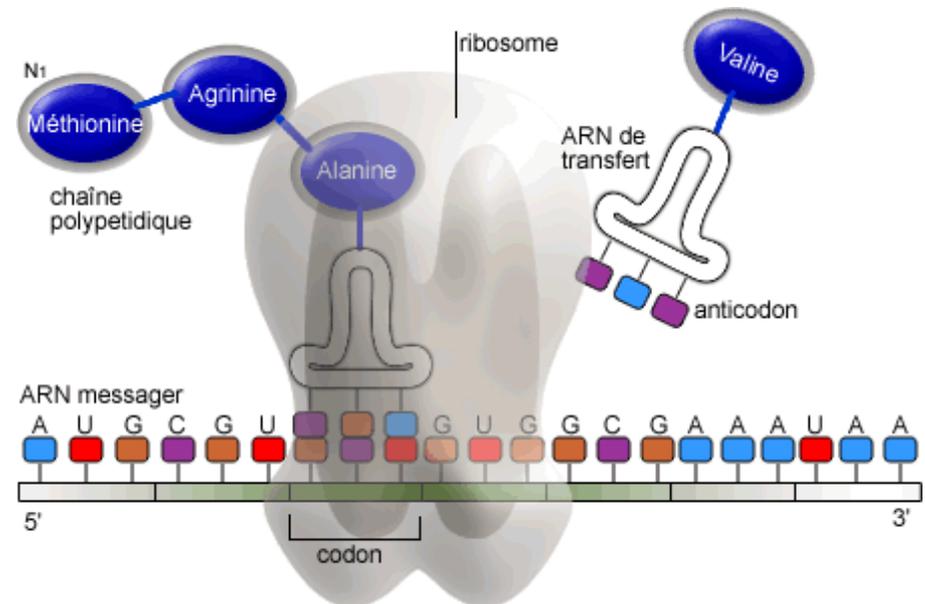
Maladie autosomique dominante

- ⇒ **cas lié au sexe**: mutations de *GATA-1* & de *TSR2*
- ⇒ pénétrance variable: phénotype silencieux (*porteur sain de la mutation*)
- ⇒ anticipation?

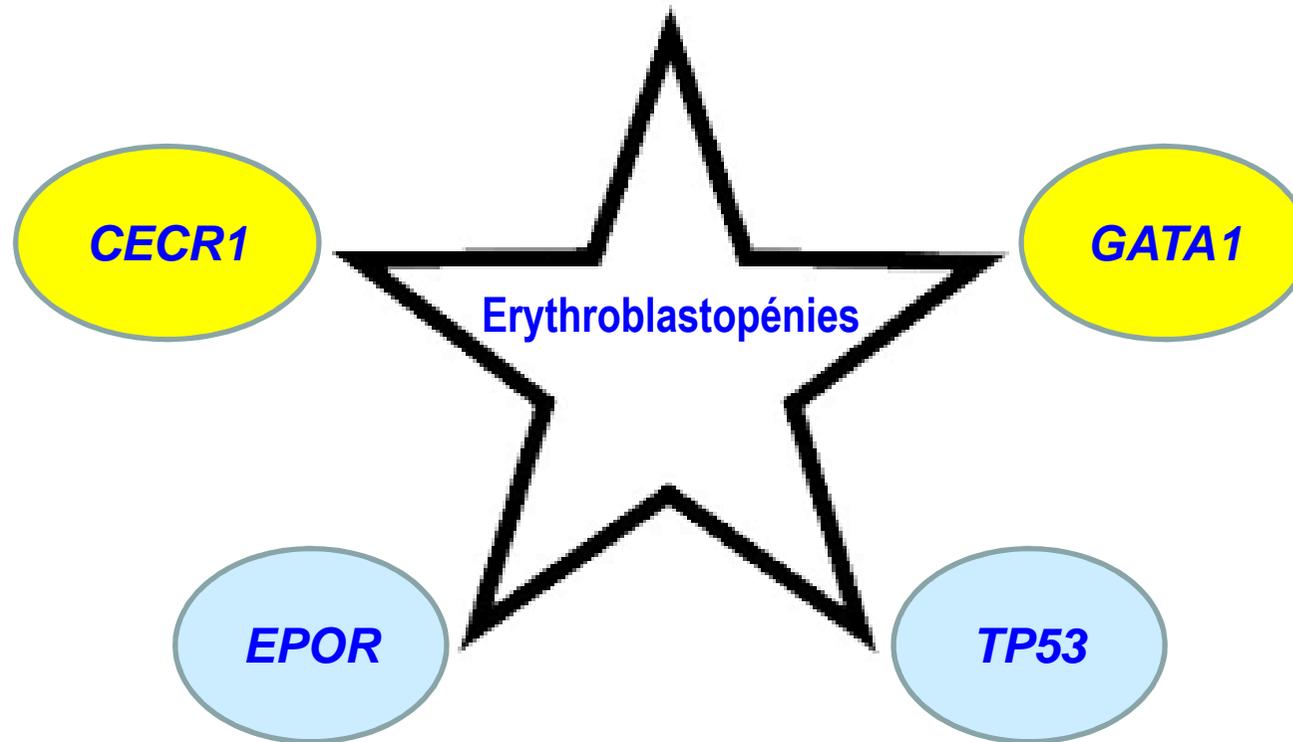
Gènes codant pour des PR

- ⇒ + *TSR2*
- ⇒ ± *GATA-1*
- ⇒ ± *CECR1*

Actuellement: 20 gènes



ABD
Gènes RP



*NB: 2 cas connus
(même famille)*

*NB: 2 cas connus
(non apparentés)*

Génétique: progrès continus mais reste un processus multi-étapes

1. **Sanger classique:** pour *RPS19*

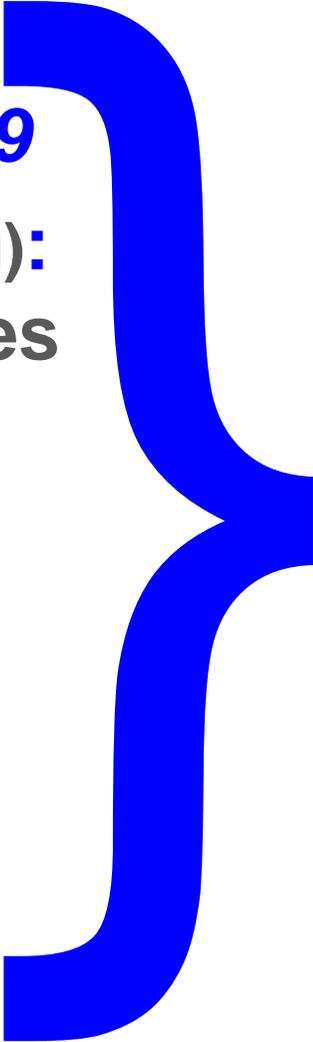
2. **NGS** (Next Generation Sequencing):
séquence en un temps de tous les
gènes ABD connus

"simple" & rapide

+ possibilité d'identifier des
mutations sur plus d'un gène

3. **CGH-array:** recherches de
délétions (10 à 20%)

4. **Exome en trio**



70% des pts

Sur la population enregistrée dans l'observatoire OFABD

N = 327

- Analyses génétiques finalisées: 190 (58%)
- Analyses en cours : 105 (32%)
- ADN épuisé : 11 (3%)
- Pas d'ADN en banque : 21 (7%)

(Courtoisie Lydie DA COSTA)

Genotypes identifiés

<i>RPS19</i>	: 42%	(27%)
<i>RPL5</i>	: 18%	(11%)
<i>RPS26</i>	: 15%	(10%)
<i>RPL11</i>	: 10%	(6%)
Délétions	: 6%	
<i>RPL35a</i>	: 3%	
Autres gènes RP	: 1 à 2%	

(Courtoisie Lydie DA COSTA)

The genetic landscape of DBA

Consortium international

N = 472 pts DBA

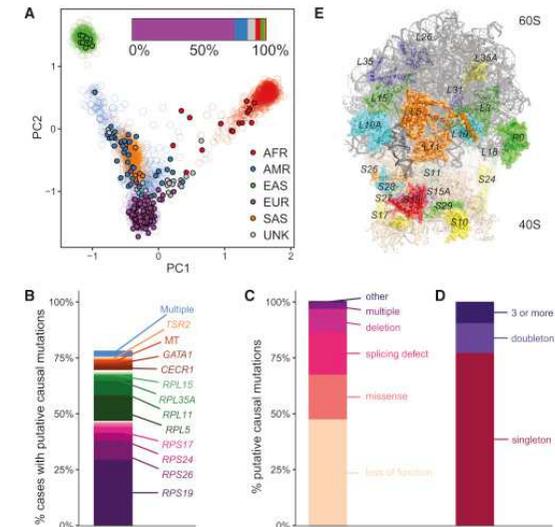
Etude par WES : 78% de variants rares prédits pathogènes dans 19 gènes connus:

- mutations ponctuelles +++
- 31 délétions

: mutations dans 7 nouveaux RP gènes

: mutations dans les gènes impliqués

dans les phénocopies: *CECR1* (9)



(Am J Human Genet, 2018)

Diagnostic génétique

Processus encore lourd & long: être patient!

Pour les parents & patients:

- Bien comprendre que le diagnostic d'ABD N'EST PAS GENETIQUE
- Connaître le gène ne va pas modifier la prise en charge de l'enfant
NB: exception: choix d'un donneur de CSH dans la fratrie (et thérapie génique dans l'avenir...)
- Connaître la mutation est en revanche indispensable pour les DPI & DPN...

Vieillir avec une ABD

Peu de données cliniques disponibles et peu de connaissances

A ce jour pas de nouvelle atteinte rapportée

Suivi dominé par le dépistage et le suivi des complications hématologiques, immunologiques & cancérologiques

Risque de déficit immunitaire B

Commun aux IBMF pour les pts non greffés

Dépistage: dosage pondéral des immunoglobulines (Ig G, A, M) 1/an

Mesures thérapeutiques : prévention et traitement actif des infections

☞ ***Vaccination contre les pneumocoques & les méningocoques***

: si infections fréquentes: possibilité de substitution par immunoglobulines (voie IV ou SC)

Evolution hématologiques

Atteinte des autres lignées: neutropénie,
thrombopénie

☞ *Fréquentes mais rarement cliniques*

« Rechute » ou perte de réponse aux cortico ides

☞ *Semble assez fréquent pour des pts d'âge mur (40/50 ans). Retour aux transfusions...*

Evolution clonale: SMD ou LAM

☞ *Suivi des NFS: +++ taux de plaquettes. Dépistage par myélogrammes? Avenir: suivi NGS dans le sang.*

Conclusion

Pas de nouveau gène: il reste 30% de pts sans diagnostic génétique

Tournant de l'année: la mise en place dans un future proche de nouvelles approches thérapeutiques paraît possible:

- **Petites molécules identifiées par une approche de screening systématique**
- **Thérapie génique dont la faisabilité vient d'être démontrée dans l'AF et pour laquelle l'ABD serait, peut être, un modèle encore meilleur**



Merci pour votre attention