

2015

Essai pour la thérapie génique du cancer du pancréas

Explication du Dr. Pierre Cordelier suite à l'Article sur les espoirs ; cancer du pancréas.

" Nous travaillons depuis bientôt deux décennies sur des approches utilisant les gènes/l'ADN comme médicaments, autrement dit sur des stratégies de thérapie génique.

Plus particulièrement, nous utilisons dans le cadre du cancer du pancréas des gènes dits "suppresseurs de tumeurs", qui sont perdus au cours du processus cancéreux, et dont l'activité inhibe très fortement la progression cancéreuse, en combinaison avec des gènes qui rendent la chimiothérapie plus active. Il faut par la suite associer à ces gènes des "vecteurs" qui permettent leur entrée dans les cellules cancéreuses; dans notre cas, il s'agit de vecteurs chimiques "non viraux".

Le médicament (ADN + vecteur non viral) est administré par endoscopie dans la tumeur de patients qui ne sont pas éligibles pour la chirurgie. Nous avons mené un premier essai chez 22 patients de 2010 à 2012; cet essai clinique de phase I nous a permis de démontrer que cette approche est faisable et sûre, sans effets secondaires majeurs. Chez certains patients, la combinaison de la thérapie génique et de la chimiothérapie a permis une amélioration de leur état général. Nous avons également pu constater une augmentation de la survie des patients, et allons bientôt procéder à un essai clinique de phase II (efficacité sur 80 patients) afin de valider ces premières observations.

Du côté recherche, nous développons désormais d'autres approches basées sur des vecteurs "viraux" et sur des virus tueurs de tumeurs."
Dr Pierre Cordelier

Résumé par le Dr. Arnaud Boulling, des recherches en génétique réalisées à l'unité INSERM UMR1078 (Brest) pour l'année 2015.

Sur le plan diagnostique

- ⇒ Identification de nouveaux facteurs de risques sur les gènes
 - CEL (nouveau gène impliqué dans la pancréatite – travail collaboratif)
 - CTTC (1^{er} identification de mutations introniques de CTTC dans la pancréatite)
 - CASR (à confirmer)

A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis.

Fjeld K, Weiss FU, Lasher D, Rosendahl J, Chen JM, Johansson BB, Kirsten H, Ruffert C, Masson E, Steine SJ, Bugert P, Cnop M, Grützmann R, Mayerle J, Mössner J, Ringdal M, Schulz HU, Sendler M, Simon P, Sztromwasser P, Torsvik J, Scholz M, Tjora E, Férec C, Witt H, Lerch MM, Njølstad PR, Johansson S, Molven A.

Nat Genet. 2015 May;47(5):518-22.

Report of 2 CTRC Intronic Mutations Associated With Acute or Chronic Pancreatitis and Delineation of Their Pathogenic Molecular Mechanisms.

Masson E, Chen JM, Férec C.

Pancreas. 2015 Aug;44(6):999-1001.

Overrepresentation of Rare CASR Coding Variants in a Sample of Young French Patients With Idiopathic Chronic Pancreatitis.

Masson E, Chen JM, Férec C.

Pancreas. 2015 Aug;44(6):996-8.

⇒ **Confirmation des facteurs de risques communs identifiés par le groupe de Whitcomb (USA) à proximité des gènes PRSS1 et CLDN2 (travail collaboratif)**

Polymorphisms at PRSS1-PRSS2 and CLDN2-MORC4 loci associate with alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis in a European replication study.

Derikx MH, Kovacs P, Scholz M, Masson E, Chen JM, Ruffert C, Lichtner P, Te Morsche RH, Cavestro GM; PanEuropean Working group on Alcoholic Chronic Pancreatitis members and collaborators, Férec C, Drenth JP, Witt H, Rosendahl J.

Gut. 2015 Sep;64(9):1426-33.

Identification of a functional PRSS1 promoter variant in linkage disequilibrium with the chronic pancreatitis-protecting rs10273639.

Boulling A, Sato M, Masson E, Génin E, Chen JM, Férec C.

Gut. 2015 Aug 5. pii: gutjnl-2015-310254.

Sur le plan thérapeutique

- ⇒ Le projet de criblage pharmacologique sur modèle levure doit démarrer à la fin de l'année. Il a pour but d'identifier des molécules pouvant avoir un intérêt thérapeutique pour le traitement de la pancréatite chronique. Il s'effectuera dans le cadre d'une thèse.

Veille scientifique 2015 au sujet de la pancréatite héréditaire, par le Dr. Vinciane Rebours.

En 2015, des articles sont parus pour essayer de comprendre les mécanismes en cause au cours des pancréatites liées à des mutations génétiques. Un travail a notamment essayé de comprendre les modifications de fonctionnement liées aux mutations du gène CTRC, codant pour la

chymotrypsine C. La chymotrypsine C est une enzyme qui joue un rôle dans la digestion des protéines et des mutations entraînent un gain de fonction, c'est à dire une hyperactivation de cette enzyme.

Comme vous le savez, peu de traitements sont disponibles à ce jour et nous attendons avec impatience les résultats de l'essai EUROPAC2 sur l'effet au long cours des anti-oxydants pour limiter le nombre et l'intensité des crises douloureuses. Les inclusions sont terminées. 240 patients ont participé à cette étude et nous les remercions. Cet essai thérapeutique européen étudiait l'effet des traitements anti oxydants (vitamine C, Sélénium, bêta carotène...) ou à base de magnésium chez les patients ayant une pancréatite chronique héréditaire douloureuse. En attendant les résultats qui ne seront pas disponibles avant 15 mois, voici les données d'une méta-analyse parue cette année sur ce sujet. Une méta-analyse est la compilation de tous les résultats de plusieurs études qui traitent d'un même sujet. 8 études étaient compilées, soit 446 patients avec une pancréatite chronique alcoolique ou non alcoolique. 234 patients recevaient un traitement anti oxydant et 212 patients n'en recevaient pas. On notait une diminution significative des douleurs dans le groupe traité en comparaison avec les patients non traités (RR, 0.73; 95% CI, 0.58-0.91; P = 0.006). En faisant des analyses de sous-groupes, cette diminution était observée dans le groupe des pancréatites alcooliques et dans le groupe des pancréatites non alcooliques. Ce résultat est très encourageant car un traitement anti-oxydant est facile à prendre sans réel effet secondaire potentiel.

Une deuxième étude a analysé l'intérêt de traitement par endoscopie chez les enfants pour limiter les douleurs. 12 enfants ont participé à cette étude. Tous avaient une pancréatite héréditaire avec de multiples poussées douloureuses. Une analyse fine du pancréas était faite par IRM pour comprendre les lésions du pancréas qui pouvaient être à l'origine des douleurs, notamment des calcifications qui obstruent le canal principal du pancréas (canal de Wirsung). En cas d'obstruction du canal par des calcifications, une CPRE était faite, c'est à dire un examen sous anesthésie générale qui permet de rentrer dans le canal principal via les voies naturelles.

Une prothèse pancréatique était posée dans le canal principal pendant 12 mois (un tube en plastique) pour laisser ouvert le canal et permettre un meilleur écoulement des sécrétions pancréatiques. Après un suivi de 3 ans, tous les enfants traités n'avaient pas récidivé des douleurs et ils pouvaient tous suivre une activité quotidienne normale.

L'endoscopie est parfois une bonne alternative qui peut permettre de passer un cap. Cependant il faut bien poser l'indication et bien sélectionner les patients qui pourraient en tirer un bénéfice.

Il est important de se renseigner et d'être pris en charge dans un centre expert qui a l'expérience de cette maladie et de ce traitement.

Dr Vinciane Rebours,

Service de Gastroentérologie et Pancréatologie.
Hôpital BEAUJON, Clichy (92110). vinciane.rebours@aphp.fr

Référence

1/ *Antioxidant Therapy for Pain Reduction in Patients With Chronic Pancreatitis- A Systematic Review and Meta-analysis.* Tarun Rustagi and Basile Njei. *Pancreas* 2015;44: 812–818.

2/ *Therapeutic step-up strategy for management of hereditary pancreatitis in children.* Kargl S, Kienbauer M, Duba H, Schöfl, Pumberger. *J Pediatr Surg.* 2015 Apr;50(4):511-4.

2014

Concernant la PCH : Résumé des recherches actuelles du Dr. Arnaud Boulling (au 25/09/2014)

Depuis la découverte du premier gène impliqué dans la pancréatite chronique héréditaire en 1996, de nombreuses nouvelles mutations impliquées dans cette maladie ont été identifiées sur différents gènes (PRSS1 et SPINK1 en grande majorité). Toutefois, certains cas restent inexplicables, indiquant que toutes les mutations responsables ou favorisant le développement de la pancréatite chronique n'ont pas été identifiées à ce jour. Un constat expliquant en partie ce phénomène est que depuis près de 20 ans, tous les efforts destinés à identifier des mutations chez les malades se sont focalisés sur la « région codante » des gènes responsables de la maladie. Pourtant, on sait depuis plusieurs années que la région régulatrice appelée promoteur qui borde chacun de nos gènes, et qui en contrôle l'activité, est susceptible de contenir de nombreuses mutations (voir figure). Son étude est plus complexe, ce qui explique qu'aucune équipe n'ait fait l'effort de s'y intéresser. Depuis la fin de ma thèse et pendant mes années de recherche à l'étranger, j'ai eu l'occasion de mettre en place et développer certaines techniques d'études spécifiques de ces régions. Depuis mon retour dans le laboratoire du professeur Férec (début 2014), j'ai entamé l'identification et l'analyse fonctionnelle systématique de toutes les mutations localisées dans les promoteurs de plusieurs gènes impliqués

dans la pancréatite chronique. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus ont déjà permis d'identifier de nouvelles mutations impliquées dans cette maladie, ce qui va permettre d'en améliorer le diagnostic.

Le Soutien de **la recherche génétique**, le Dr Arnaud Boulling, , *INSERM U613 Génétique moléculaire et génétique épidémiologique* nous en parle :

ANALYSE FONCTIONNELLE DE VARIANTS DU GENE SPINK1 IMPLIQUES DANS LES PANCREATITES HEREDITAIRES

Depuis maintenant plusieurs années, il est démontré que les variations observées sur le gène *SPINK1* codant le peptide PSTI (Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor) sont associées avec les pancréatites chroniques héréditaires. Ces altérations sont connues pour entraîner une baisse de l'activité ou de l'expression de PSTI. Nous avons récemment déterminé les conséquences fonctionnelles de trois variants situés sur le peptide signal (p.L12F, p.L14P, p.L14R), ainsi que celles de sept variants situés sur le peptide mature de PSTI (p.N34S, p.G48E, p.D50E, p.Y54H, p.P55S, p.R65Q, p.R67C). Les effets des différents variants ont été caractérisés par des western blot réalisés sur le type sauvage et les variants de PSTI, exprimés dans les cellules CHO. L'expression de ces variants a également été évaluée en mesurant leur niveau de transcription par RT-PCR. Les altérations du peptide signal p.L14P et p.L14R entraînent une dégradation intracellulaire rapide de PSTI, empêchant ainsi sa sécrétion, tandis que p.L12F ne présente pas d'effet délétère. Les effets provoqués par les différents variants situés sur le peptide mature permettent de les classer en trois catégories. La première catégorie comprend les polymorphismes p.N34S et p.P55S, qui impliquent une conservation des propriétés physico-chimiques des acides aminés, et n'entraînent pas de réduction de l'expression de PSTI. La deuxième catégorie contient uniquement la mutation faux-sens p.R65Q, substituant un acide aminé chargé positivement par un acide aminé neutre, et causant une réduction d'environ 60% de l'expression de la protéine. La dernière catégorie regroupent les mutants p.G48E, p.D50E, p.Y54H et p.R67C, impliquant des changements de charge des acides aminés et causant une inhibition complète ou presque complète de la sécrétion de PSTI. Les quantités d'ARNm mesurées pour le type sauvage et les mutants sont similaires, ce qui exclut la possibilité que les variations d'expression observées résultent d'une réduction de la transcription ou d'une baisse de la stabilité de l'ARNm. A la lumière de ces observations, il semble donc que ces mutations faux-sens entraînent une baisse de sécrétion de PSTI en perturbant les mécanismes de transports cellulaires de ce peptide.

Travail de thèse financé par la région île de France, dans le cadre du projet PICRI en partenariat avec L'INSERM et l'Association des Pancréatites Chroniques Héritaires.

Bases génétiques des pancréatites héréditaires

Pour améliorer la compréhension des phénomènes impliqués dans les pancréatites héréditaires, nous avons cherché à comprendre le fonctionnement des anomalies génétiques provoquant cette maladie. Ce travail a porté sur le gène SPINK1, l'un des deux responsables de la pancréatite héréditaire. Il existe 10 anomalies possibles pour ce gène, dont une que nous avons récemment identifiée.

Pour analyser ces anomalies génétiques, nous avons utilisé des cultures de cellules *in vitro*, et procédé de la manière suivante :

- 1) A partir d'un peu d'ADN, nous avons reconstruit le gène malade pour pouvoir l'étudier.
- 2) Nous avons ensuite comparé le fonctionnement du gène sain et du gène malade :

Ainsi, cette étude a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les pancréatites chroniques héréditaires, en réalisant une analyse fonctionnelle des anomalies génétiques recensées sur le gène SPINK1.

Un tel travail a pour but non seulement de faire progresser les connaissances fondamentales portant sur cette maladie, mais également de permettre un diagnostic plus efficace des malades atteints de pancréatites chroniques héréditaires.

Ce travail a été présenté à un congrès international en génétique humaine : Boulling A., Le Maréchal C., Trouvé P., Raguénès O., Chen J-M. and Férec C. *Functional analysis of pancreatitis-associated missense mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene. (2007). European Society of Human Genetics Conference. 16 – 19 juin, Nice (France).*

L'objectif de notre recherche au sein de l'Unité Inserm U613 est de comprendre les mécanismes et tout particulièrement les mécanismes génétiques qui peuvent conduire à l'apparition d'une pancréatite chronique. **Il existe quelques très rares familles où la maladie pancréatique se transmet sur un mode héréditaire et notre travail dans ce domaine a débuté il y a 12 ans par la localisation du gène responsable de cette affection, le Trypsinogène cationique situé sur le chromosome 7.**

Notre recherche est aujourd'hui centrée, non seulement sur l'étude de ce gène (PRSS1) qui code pour la plus importante des enzymes du pancréas,

mais également sur son inhibiteur (SPINK1) et sur les autres gènes qui interviennent dans la survenue des pancréatites. A l'intérieur de la cellule pancréatique, sont synthétisées ces enzymes appelées protéases qui vont permettre la digestion des aliments dans le duodénum. Lorsque les enzymes pancréatiques sont synthétisées en excès dans le pancréas, cet excès peut conduire à la destruction des cellules pancréatiques et à l'apparition de crises de pancréatites aiguës qui peuvent évoluer vers la chronicité.

Nos travaux consistent à comprendre et à élucider les différents mécanismes qui peuvent rompre un délicat équilibre qui existe dans les cellules du pancréas, et à identifier les mécanismes génétiques qui peuvent détruire cet équilibre.

Dans ce contexte, nous avons identifié de nombreuses mutations au niveau de ces gènes et de cette région du génome. La compréhension de ces mécanismes doit nous conduire à diagnostiquer plus précocement la maladie, à mieux la prévenir et demain à traiter efficacement les pancréatites chroniques en particulier celles d'origine génétique.

Veille scientifique 2014 : Quelles sont les nouvelles données au sujet de la pancréatite héréditaire?

Comme tous les ans, de nombreux articles sont parus pour essayer de comprendre les mécanismes en cause au cours de la pancréatite héréditaire selon le type de mutation et du gène en cause, de comprendre les altérations entraînées par les mutations et leur répercussion sur le fonctionnement du pancréas, et notamment dans le fonctionnement des enzymes qui nous aident à digérer les graisses. D'un point de vue des traitements disponibles, comme vous le savez un essai thérapeutique européen est en cours pour l'étude des traitements anti oxydants (vitamine C, Sélénium, bêta carotène...) ou à base de magnésium chez les patients ayant une pancréatite chronique héréditaire douloureuse. Il se poursuit à l'hôpital Beaujon (Clichy, 92) et tous les patients souhaitant participer sont les bienvenus, cependant les inclusions seront bientôt closes car 230 patients / 240 patients prévus ont déjà participé. Il reste donc moins de 10 places pour les centres anglais, allemands et français. Le traitement est de 12 mois avec une visite trimestrielle de suivi pendant ces 12 mois. Nous avons encore besoin de vous.

Ce protocole a été mis en place en raison de résultats encourageants chez des groupes de patients présentant des douleurs rebelles. Une étude récente d'un groupe de chercheurs allemands a essayé de comprendre comment un régime enrichi en magnésium pouvait agir et faire diminuer l'inflammation du pancréas. (1) Au cours de la pancréatite héréditaire, les poussées de pancréatite sont dues à une activation des enzymes pancréatiques au sein du pancréas (au lieu de s'activer dans le tube digestif pour nous aider à digérer les graisses que nous avons mangées). Il existe ainsi un phénomène « d'autodigestion » du pancréas, c'est la pancréatite aiguë. Si nous plongeons dans la cellule, on constate que cette activation des enzymes est dépendante du taux de calcium relargué à partir des réserves situées

dans la cellule du pancréas. Quand on met un agent chimique qui capte l'excès de calcium, on constate qu'il existe moins d'activation des enzymes, donc moins de pancréatite. Le magnésium est un oligo élément qui naturellement peut remplacer le calcium dans la cellule. Mais contrairement au calcium, si le magnésium est en excès, il n'active pas les enzymes du pancréas. L'idée des chercheurs était donc de donner des repas enrichi en magnésium et d'analyser s'il pouvait remplacer le calcium en excès. Pour tester cette hypothèse, ils ont donné à des rats un régime enrichi en magnésium pendant 2 semaines puis ont provoqué des pancréatites expérimentales chez ces rats en leur injectant un produit toxique. Chez les rats qui avaient consommé beaucoup de magnésium, il a été constaté moins d'inflammation et d'anomalies de leur pancréas (en comparaison avec des rats nourris normalement). Pour aller plus loin, ils ont observé que chez des rats privés de magnésium dans leur alimentation, leur pancréas devenait inflammatoire, même pour des seuils d'enzymes qui ne sont normalement pas délétères. Cette étude, très intéressante, nous aide à comprendre comment une prise de magnésium pourrait limiter les crises douloureuses. Cela doit être prouvé chez l'homme et c'est pourquoi nous attendons avec impatience les résultats de l'essai EUROPAC 2 qui répondra à cette question.

Dr Vinciane Rebours, service de Gastroentérologie et Pancréatologie. Hôpital BEAUJON, Clichy (92110). vinciane.rebours@bjn.aphp.fr

Référence : 1/ Effect of magnesium supplementation and depletion on the onset and course of acute experimental pancreatitis. Schick, Scheiber, Mooren, O Ceyhan, Schnekenburger, Sandler, Schwaiger, Omercevic, van den Brandt, Fluhr, Domschke, Krüger, Mayerle, Lerch. *Gut* 2014;63:1469–1480.

2013

Veille scientifique 2013. Quelles sont les nouvelles données au sujet de la pancréatite héréditaire? Comme tous les ans, de nombreux articles sont parus pour essayer de comprendre les mécanismes en cause au cours de la pancréatite héréditaire selon le type de mutation et du gène en cause, de comprendre les altérations entraînées par les mutations et leur répercussion sur le fonctionnement du pancréas, et notamment dans le fonctionnement des enzymes qui nous aident à digérer les graisses. Depuis un an, les centres de recherche génétique se focalisent de plus en plus sur les

autres déterminants génétiques en cause au cours des pancréatites héréditaires ou non.

Le but est de comprendre pourquoi deux personnes exposées à un même toxique (l'alcool ou le tabac) ou à un même facteur de risque de pancréatite (hypertriglycémie, hypercalcémie) auront des réponses différentes à ces agressions. Ils cherchent ainsi des facteurs génétiques qui rendent plus sensibles le pancréas. En d'autres termes, prises isolément ces anomalies génétiques n'ont pas de répercussions mais couplées à un toxique, une variation anatomique, un état anormal de notre métabolisme calcique ou lipidique, elles déclenchent des poussées de pancréatite. Ces susceptibilités génétiques sont différentes des anomalies du gène PRSS1 dont les mutations à elles seules peuvent provoquer des pancréatites aiguës et une pancréatite chronique. Ainsi, des chercheurs hollandais ont analysé l'expression du gène ATP8B1 qui code pour une protéine très présente dans le pancréas normal et dont le rôle est de participer à l'organisation de la membrane des cellules pancréatiques. L'analyse a porté sur plus de 500 patients atteints de pancréatite chronique et plus de 1000 patients indemnes de toute maladie du pancréas. Au final, les variations du gène n'étaient pas plus fréquentes chez les patients porteurs d'une pancréatite chronique sans cause ou héréditaire. Même si cette étude ne montrait pas de lien positif, les recherches dans ce sens se multiplient.

Une étude allemande a permis de mettre en évidence des variations génétiques plus fréquentes du gène CPA1 chez les patients porteurs d'une pancréatite non alcoolique (3% versus 0,1% chez les patients sans maladie pancréatique). Ce gène code pour la protéine carboxypeptidase A1. De manière très intéressante, elle n'agit pas sur les enzymes du pancréas mais sur le système de défense du pancréas aux agressions.

D'un point de vue thérapeutique, la thérapie génique n'est pas encore disponible au cours des pancréatites héréditaires et les patients présentent depuis leur enfance des douleurs et des pancréatites aiguës le plus souvent invalidantes ayant de réelles répercussions sociales, scolaires et professionnelles.

Le but des traitements proposés est de soulager les patients par des antalgiques mais également exceptionnellement par des techniques endoscopiques, voire chirurgicales. L'objectif est de toujours préserver et épargner le pancréas.

Une équipe américaine a publié des résultats intéressants chez les enfants. Des gestes endoscopiques étaient réalisés chez les enfants permettant de limiter les douleurs et les poussées aiguës pendant en moyenne 3 ans. Il est bien connu que les douleurs sont plus fréquentes et intenses pendant l'enfance et l'adolescence. Des gestes simples pourraient limiter les douleurs tout en préservant le pancréas. Ces gestes techniques consistent à la mise en place d'une prothèse en plastique dans le canal du pancréas ou à détruire

des gros calculs intra pancréatiques par des ultra sons ou tout simplement à ouvrir l'entrée du canal pancréatique principal. Ces gestes se font par voie naturelle et ne nécessitent que quelques jours d'hospitalisation. Cependant ils peuvent à eux seuls déclencher des poussées de pancréatite au décours immédiat du geste. Il faut donc toujours décider d'un tel geste après concertation d'experts dans des centres expérimentés. Si les dossiers des patients sont bien analysés, quelques enfants pourraient peut être bénéficier de ces alternatives thérapeutiques.

Enfin l'étude Européenne pour l'étude des traitements anti oxydants (vitamine C, Sélénium, bêta carotène...) ou à base de magnésium chez les patients ayant une pancréatite chronique héréditaire douloureuse se poursuit à l'hôpital Beaujon (Clichy, 92).

Tous les patients souhaitant participer sont les bienvenus et pourront ainsi bénéficier d'un nouveau traitement dont le but est de diminuer l'inflammation chronique du pancréas et ainsi les poussées. Tous les patients présentant des douleurs chroniques dans le cadre de la pancréatite héréditaire peuvent être inclus. Le traitement est de 12 mois avec une visite trimestrielle de suivi pendant ces 12 mois. Nous avons besoin de vous.

Dr Vinciane Rebours, service de Gastroentérologie et Pancréatologie.
Hôpital BEAUJON, Clichy (92110) vinciane.rebours@bjn.aphp.fr

Références

- 1/ van der Woerd WL, van Haaften-Visser DY, van de Graaf SF, et al. Mutational Analysis of ATP8B1 in Patients with Chronic Pancreatitis. *PLoS One*. 2013 Nov 19;8(11).
- 2/ Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet*. 2013 Oct;45(10):1216-20.
- 3/ Ceppa EP, Pitt HA, Hunter JL, et al. Hereditary pancreatitis: endoscopic and surgical management. *J Gastrointest Surg*. 2013 May;17(5):847-56.