



Projet ARNPOMVID

Approche innovante de thérapie ARNm par voie orale pour traiter la Maladie des Inclusions Microvillositaires: élaboration d'une preuve de concept pré-clinique

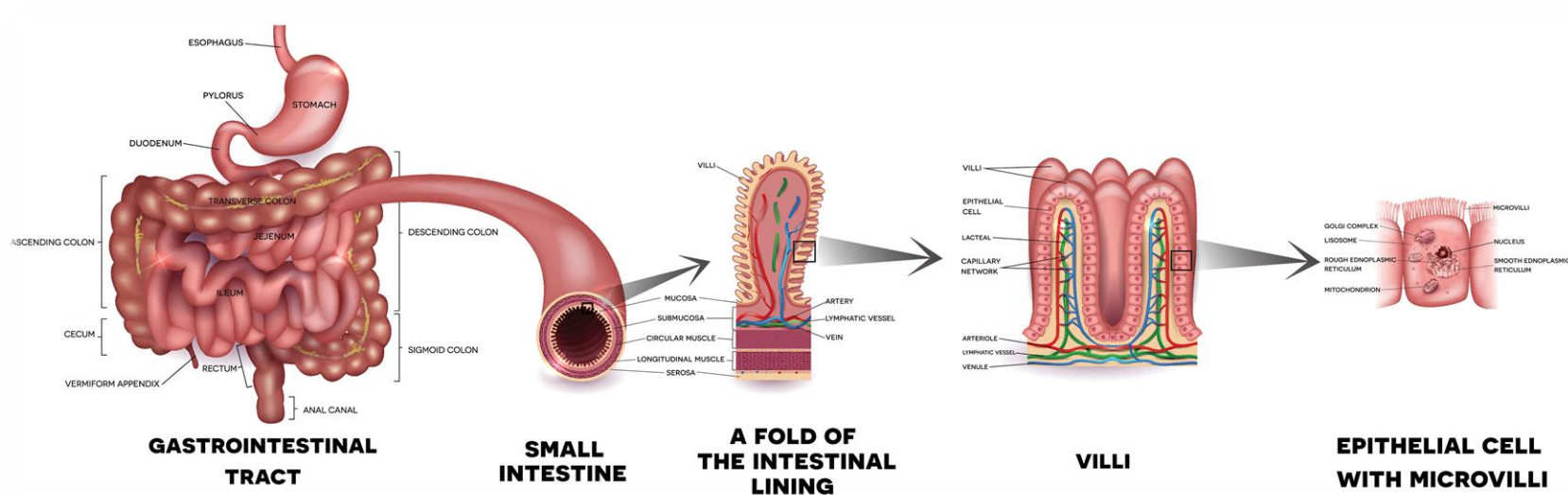
Projet Leaders : Virginie Escriou¹, Ganesh Mamodaly², Shémeline Asmina³
Affiliation(s) : UTCBS Laboratory (Unit of Chemical and Biological Technologies for Health) - CNRS (UMR 8258) – Inserm (U 1268), ²Cure MVID Association, ³LHF Espoir Association



La Maladie des Inclusions Microvillositaire (MVID)

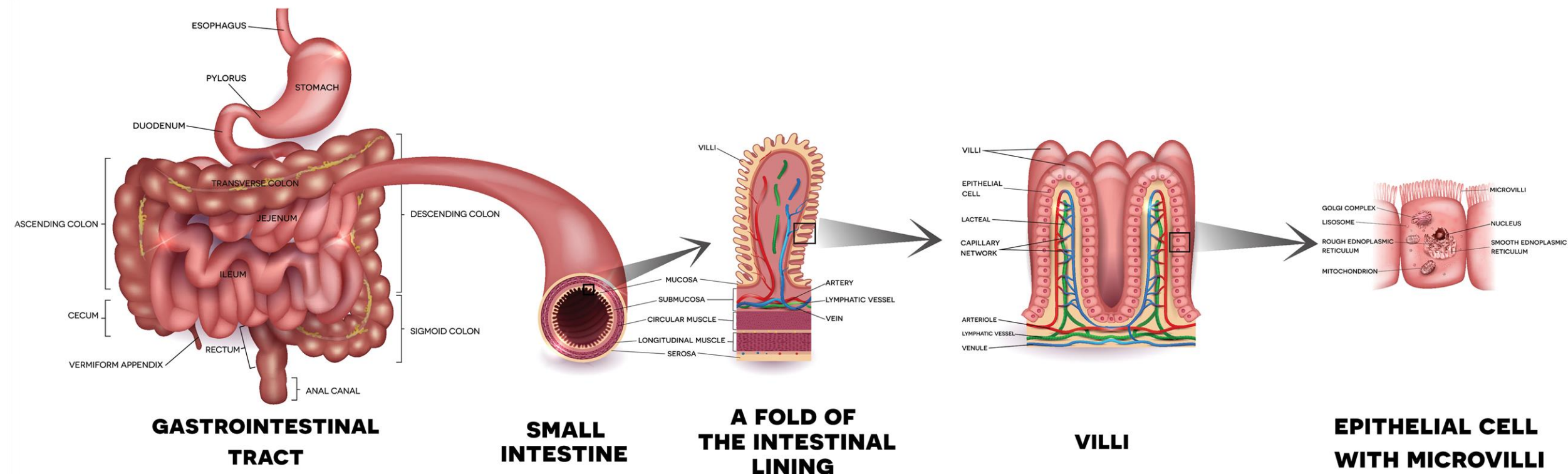
Description de la maladie

- Maladie digestive rare génétique à transmission autosomique récessive → entéropathie congénitale
- **Prévalence:** estimée à ~ 150 cas en Europe, 250 dans le monde²
- **Maladie du tube digestif caractérisée par une altération des microvillosités de l'intestin grêle:** de minuscules structures en forme de doigt présentes à la surface des cellules de l'intestin grêle. Ces microvillosités sont essentielles pour l'absorption des nutriments dans l'intestin.



La Maladie des Inclusions Microvillositaire (MVID)

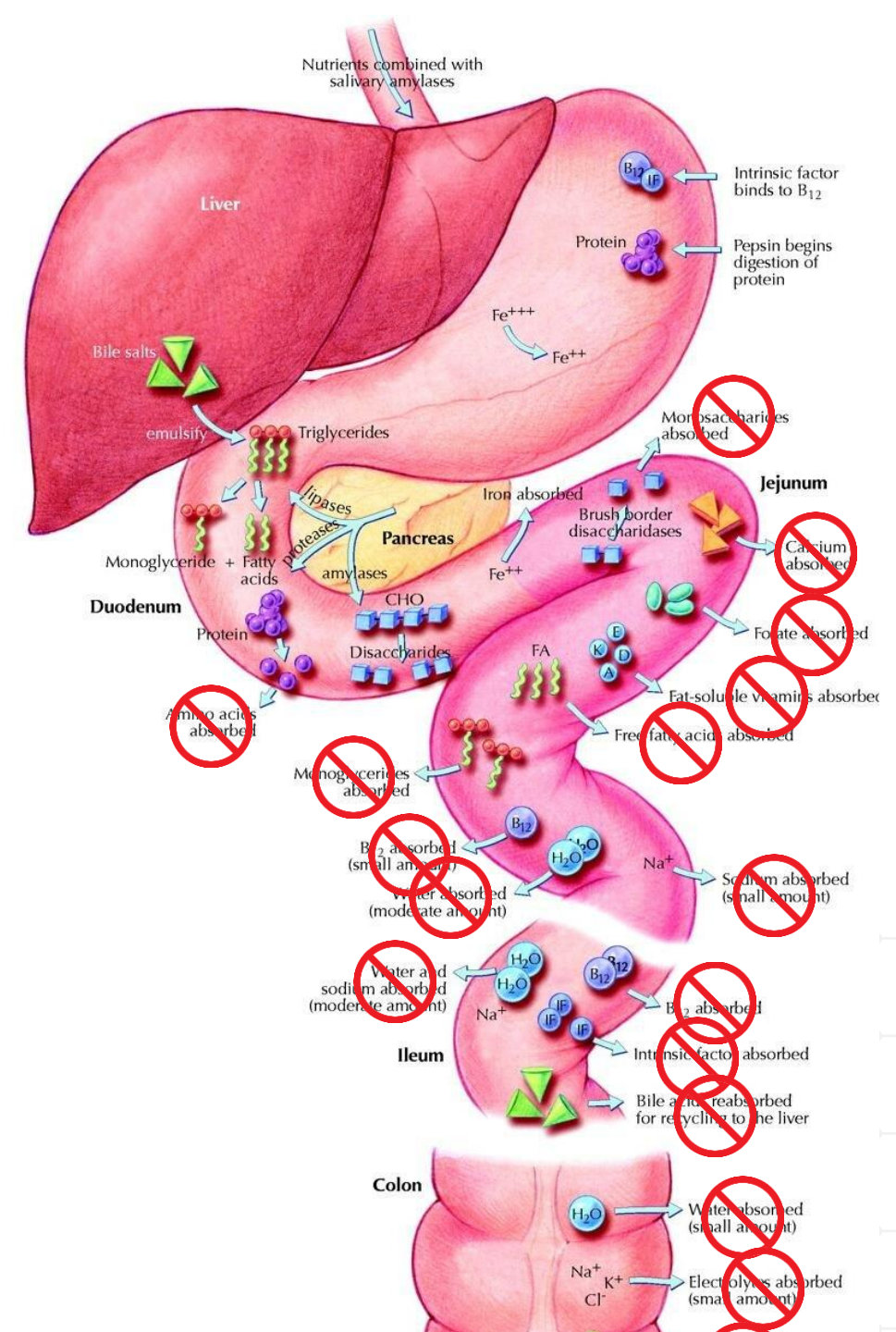
Description de la maladie



La Maladie des Inclusions Microvillositaire (MVID)

Description de la maladie

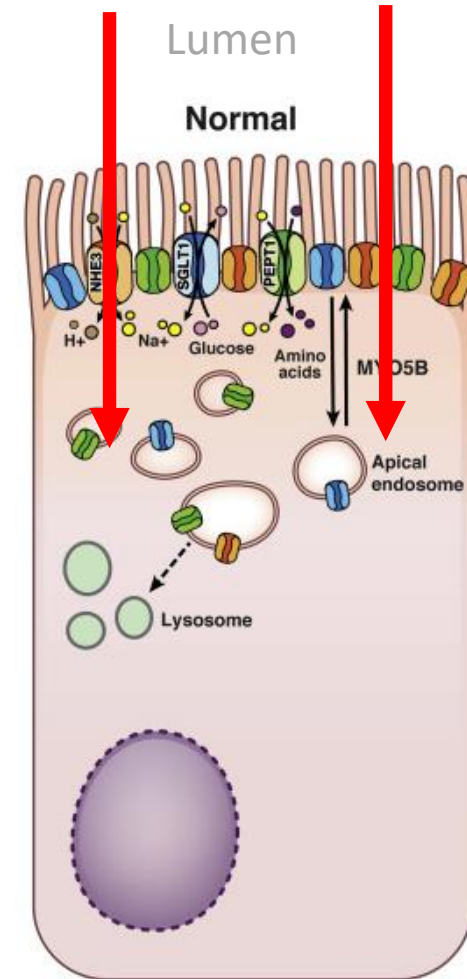
- L'intestin grêle est le principal site d'absorption des nutriments.
- **Rôle des entérocytes** : Les cellules épithéliales intestinales (entérocytes) transportent les nutriments à travers la barrière intestinale vers la circulation sanguine.
- **MVID et malabsorption des nutriments** : Dans la MVID, un trafic vésiculaire défectueux au sein des entérocytes perturbe le transport des nutriments, entraînant une malabsorption sévère, une diarrhée chronique et une dépendance à la nutrition parentérale.



La Maladie des Inclusions Microvillositaire (MVID)

Physiopathologie

- En conditions normales, les transporteurs de sodium ou de nutriments circulent entre la bordure en brosse et les endosomes apicaux des entérocytes.
- Dans la **MVID**:
 - Des mutations perte de fonction dans quatre gènes connus entraînent une perte de la polarisation des entérocytes et une accumulation de vésicules intracellulaires au niveau apical, ce qui perturbe l'exocytose.
 - Il en résulte une absence de localisation des transporteurs à la bordure en brosse, ainsi que des composants essentiels de la structure des microvillosités.
 - Cela conduit à une malabsorption, une déshydratation et un déséquilibre des électrolytes.



Abtahi, S. & Turner, J. R. Exploiting alternative brush border trafficking routes to treat microvillous inclusion disease. *Gastroenterology* (2020).

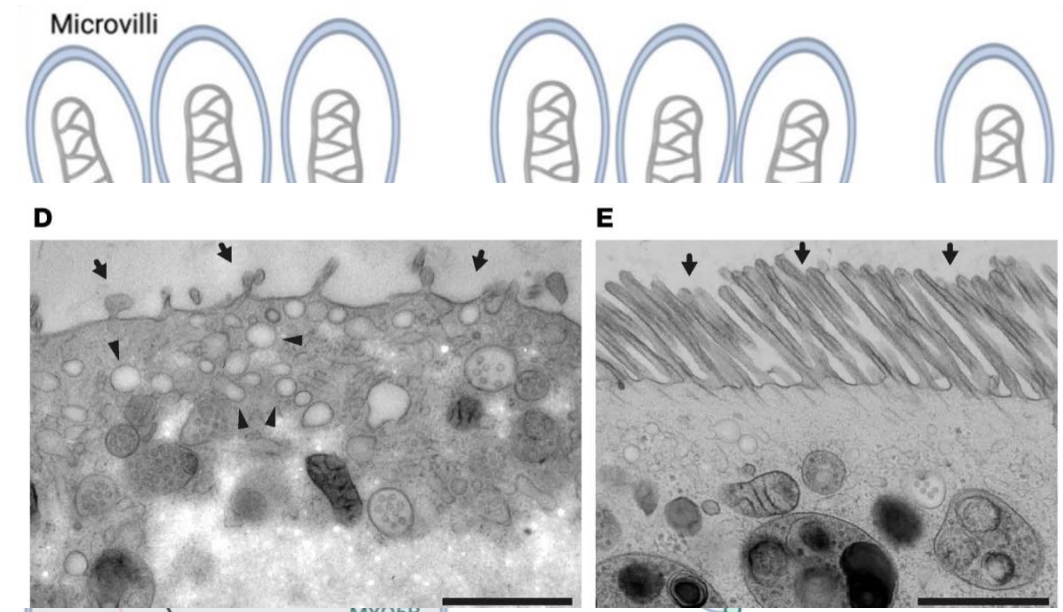
La Maladie des Inclusions Microvillositaire (MVID)

Physiopathologie

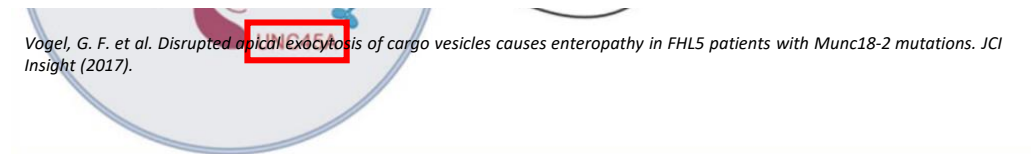
➤ Dans un épithélium intestinal sain :

- Les vésicules de transport se déplacent vers la membrane cellulaire.
- Ce processus dépend de l'activité motrice de la myosine 5B (**Myo5B**) le long du cytosquelette d'actine.
- Lorsque la vésicule de transport approche de la membrane, une interaction se produit entre **STX3** et **STXBP2** (également connu sous le nom de Munc18-2) pour permettre la fusion active avec la membrane.
- L'axe **Myo5B-STX3-STXBP2** est essentiel au bon recyclage apical.
- Par ailleurs, **UNC45A** est indispensable au bon repliement de Myo5B.

➤ La perte de l'un de ces composants clés entraîne le phénotype intestinal observé dans la MVID



Apical surface of mutated (D) and healthy (E) enterocytes, scanning electron microscopy⁴



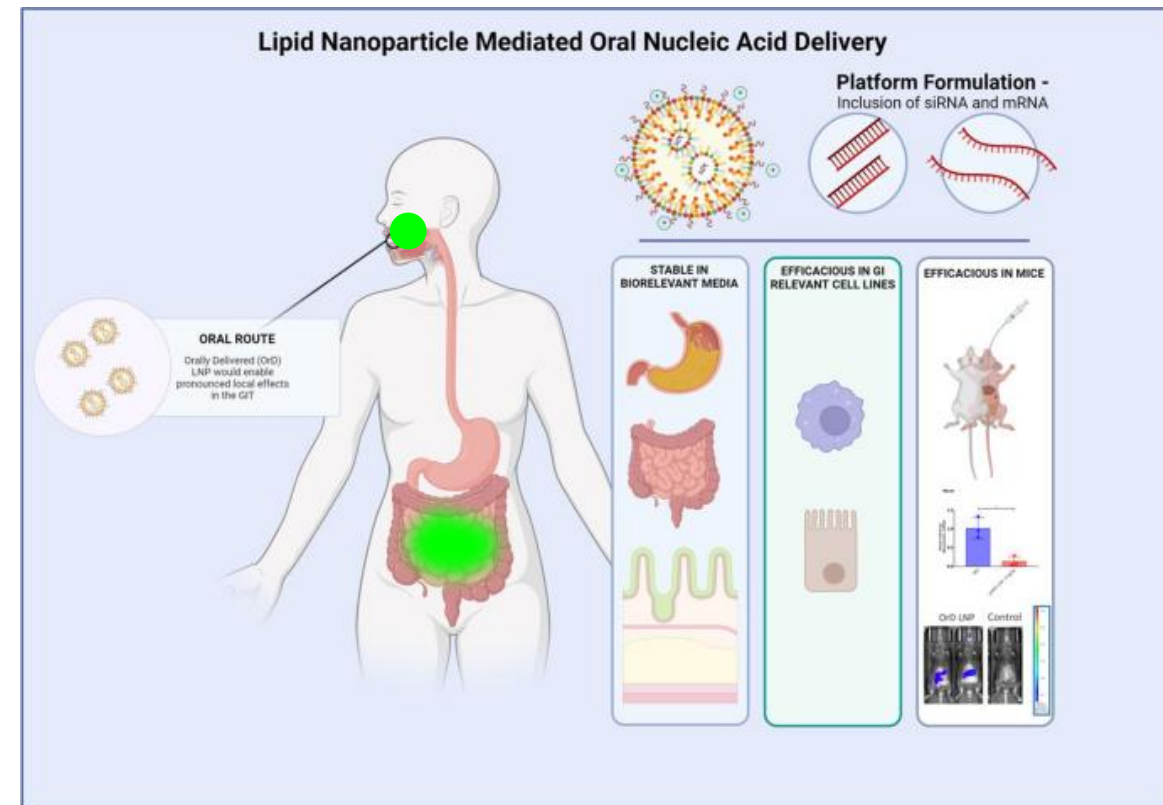
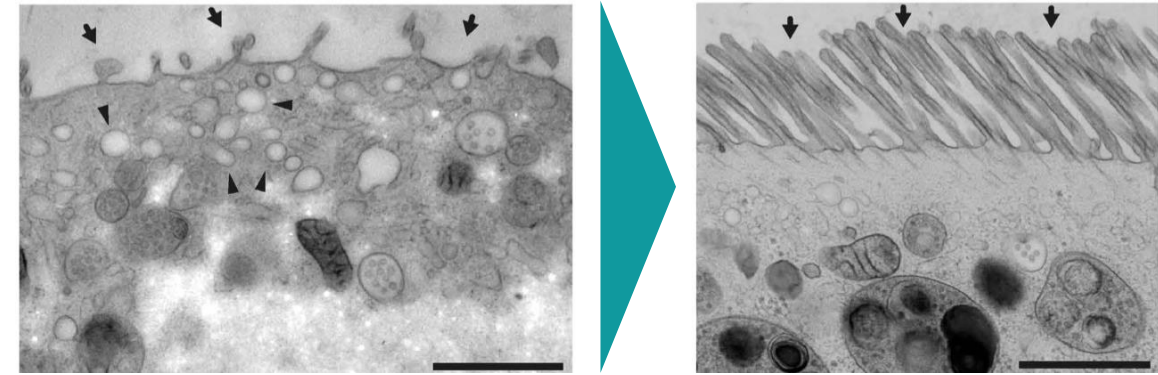
Vogel, G. F. et al. Disrupted apical exocytosis of cargo vesicles causes enteropathy in FHL5 patients with Munc18-2 mutations. JCI Insight (2017).

Babcock, S. J., Flores-Marin, D. & Thiagarajah, J. R. The genetics of monogenic intestinal epithelial disorders. Hum. Genet. (2022)

Stratégie Thérapeutique

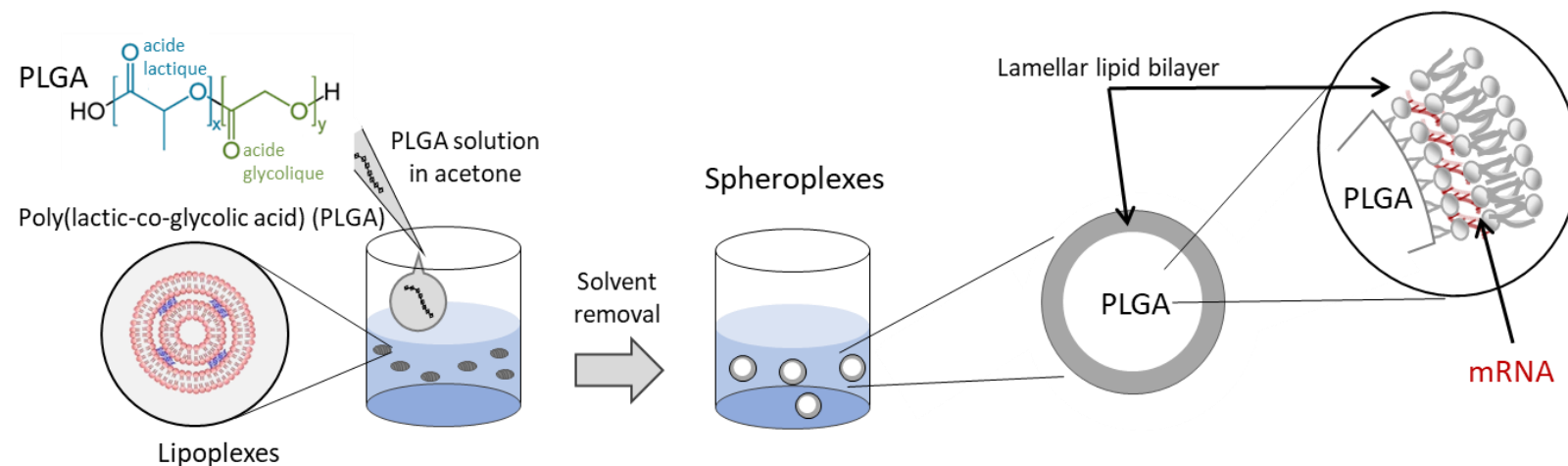
Une thérapie ARNm par voie orale

- Objectif thérapeutique → restaurer la fonction cellulaire
- Cibler les enterocytes avec l'ARNm
- L'administration d'une thérapie par **ARNm vectorisé par voie orale** aux cellules intestinales pourrait ainsi permettre de remplacer les protéines défectueuses en exprimant des protéines de type sauvage dans les entérocytes.
- Cela pourrait potentiellement restaurer la polarité cellulaire, le trafic intracellulaire, ainsi que les paramètres cliniques, histologiques et moléculaires.



Stratégie Thérapeutique

Nanoparticules hybrides lipide-polymère = Spheroplexes

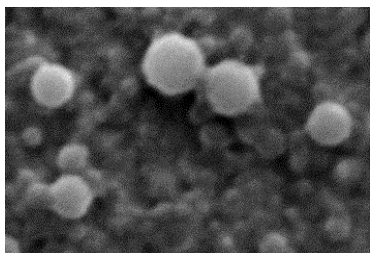


Sphéroplexes = particules

- ~ 200-300 nm de diamètre
- forme sphérique
- matrice polymérique centrale
- lamelles emprisonnant l'acide nucléique en surface

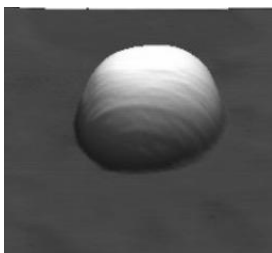
- ➔ Protection de l'acide nucléique
- ➔ Entrée dans la cellule
- ➔ **Administration orale**

SEM

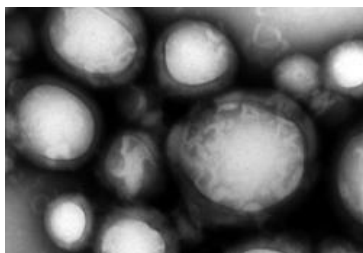


100nm

AFM



TEM



Cryo-TEM



● ● ● Projet ARNPOMVID

Etapes du projet

1

Fabrication de vecteurs ARNm
Myo5b

2

Tests sur modèles cellulaires

3

Tests sur modèles animaux de
MVID

Etapes du projet

1

Fabrication de vecteurs ARNm
Myo5b

2

Tests sur modèles cellulaires

3

Tests sur modèles animaux de
MVID

➤ **Sélection de la protéine à restaurer : Myo5b**

- Myo5b est la protéine la plus fréquemment affectée dans la MVID (80 % des cas).

➤ **Préparation des Spheroplexes d'ARNm Myo5b**

➤ **Caractérisation physico-chimique des nanoparticules, incluant :**

- Taille
- Charge de surface
- Polydispersité
- Taux d'encapsulation de l'ARNm



Etapes du projet

1

Fabrication de vecteurs ARNm Myo5b

2

Tests sur modèles cellulaires

3

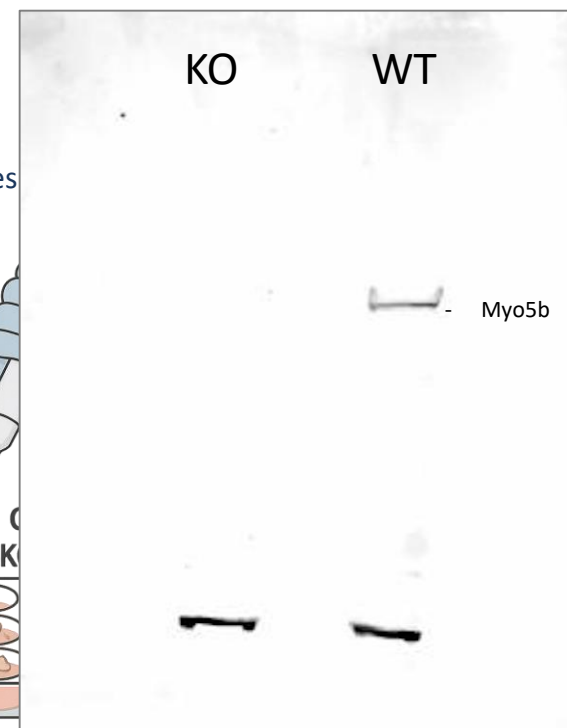
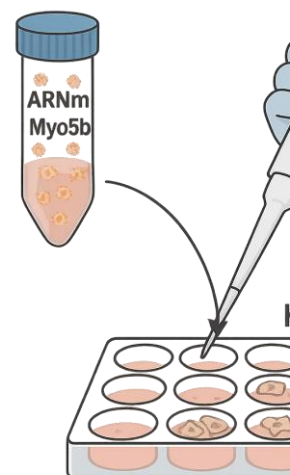
Tests sur modèles animaux de MVID

Validation de la restauration fonctionnelle par l'expression de la protéine Myo5b

➤ **Modèles cellulaires** : Deux lignées cellulaires Caco2 invalidées pour l'expression de Myo5b (Caco2 KO Myo5b)

➤ **Transfection et évaluation fonctionnelle** :

- Transfection des lignées Caco2 KO Myo5b avec des



CaCo2 WT

CRISPR-Cas9
editing



CaCo2
Myo5b KO

Etapes du projet

1

Fabrication de vecteurs ARNm
Myo5b

2

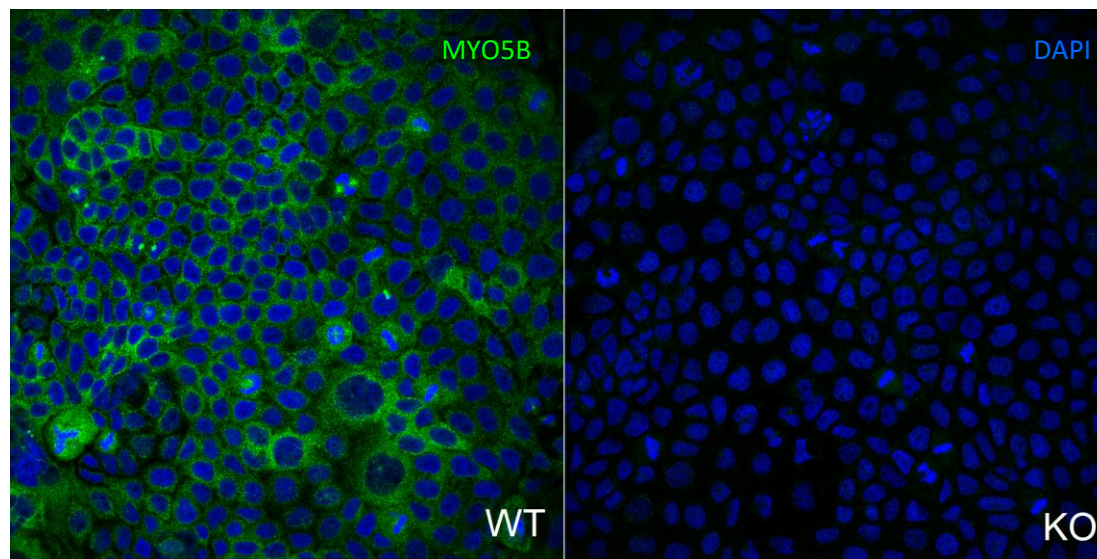
Tests sur modèles cellulaires

3

Tests sur modèles animaux de
MVID

Validation de la restauration fonctionnelle par l'expression de la protéine Myo5b

➤ **Expression protéique:** vérification de l'expression de la protéine Myo5b 24h après transfection



Etapes du projet

1

Fabrication de vecteurs ARNm
Myo5b

2

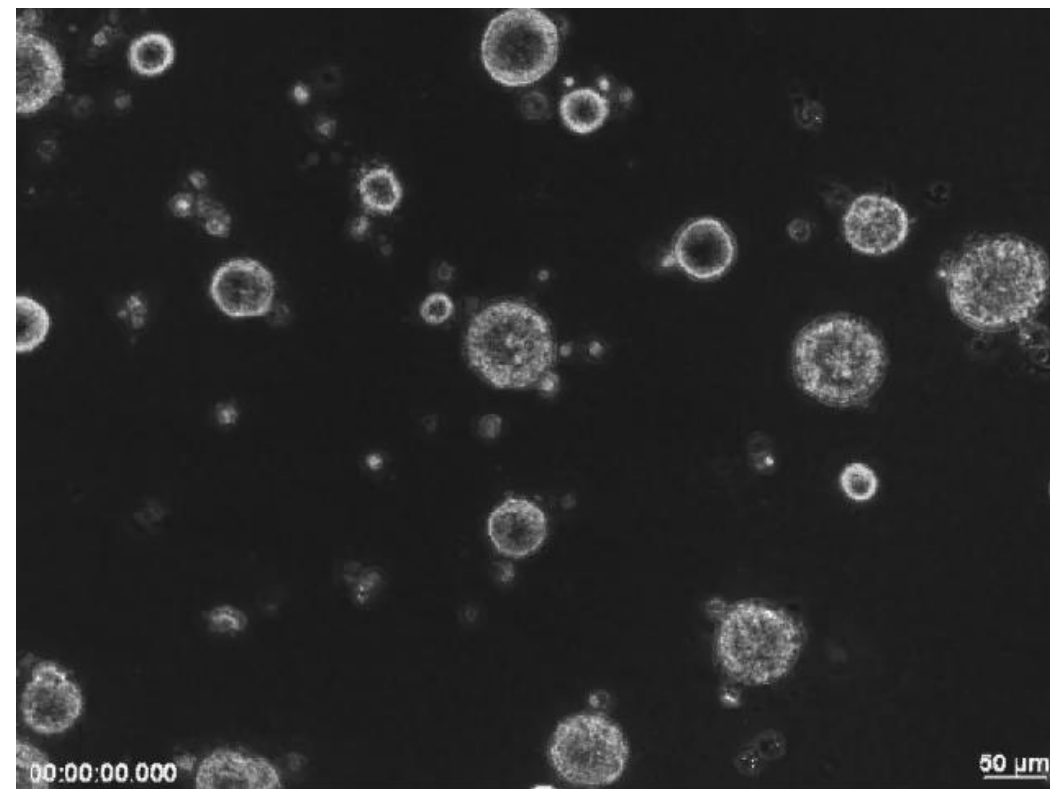
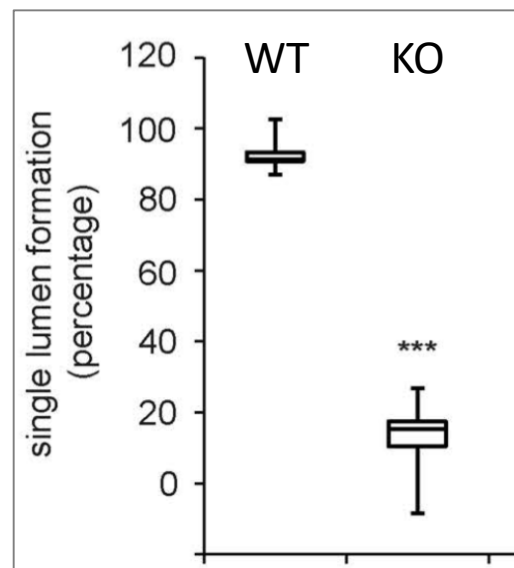
Tests sur modèles cellulaires

3

Tests sur modèles animaux de
MVID

Validation de la restauration fonctionnelle par l'expression de la protéine Myo5b

➤ Cyst Assay



Etapes du projet

1

Fabrication de vecteurs ARNm
Myo5b

2

Tests sur modèles cellulaires

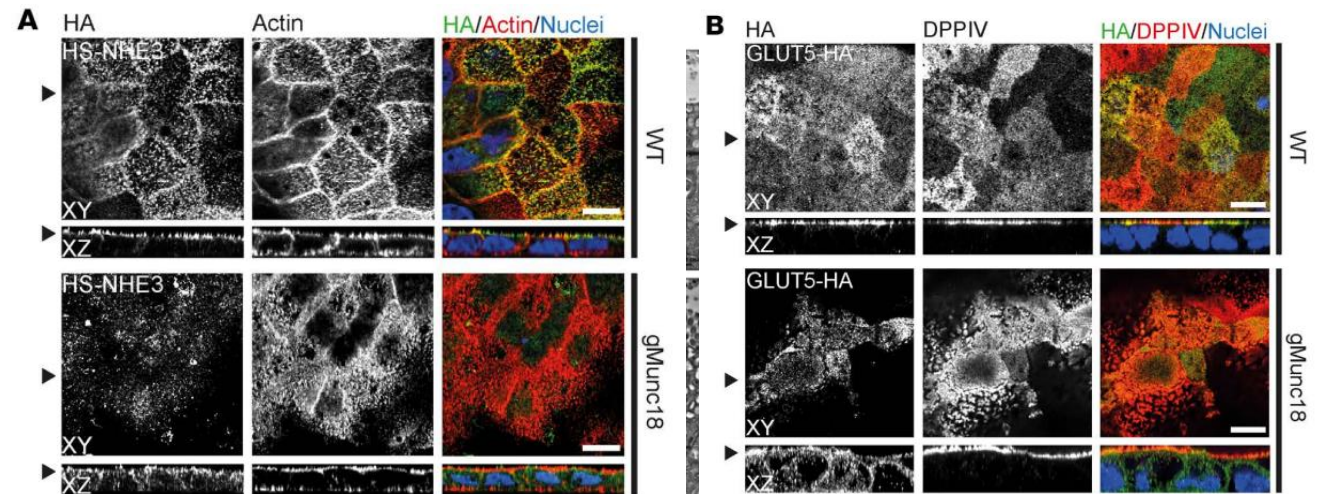
3

Tests sur modèles animaux de
MVID

Validation de la restauration fonctionnelle par l'expression de la protéine Myo5b

➤ Morphologie et localisation des transporteurs membranaires

- Évaluer les modifications de la morphologie des microvillosités, des vésicules apicales et la présence d'inclusions microvillositaires (en microscopie électronique)
- Localisation des transporteurs de la bordure en brosse (par exemple NHE3 et GLUT5) par immunofluorescence (IF)



Vogel, G. F. et al. Disrupted apical exocytosis of cargo vesicles causes enteropathy in FHL5 patients with Munc18-2 mutations. JCI Insight 2, (2017).

Etapes du projet

1

Fabrication de vecteurs ARNm
Myo5b

2

Tests sur modèles cellulaires

3

Tests sur modèles animaux de
MVID

➤ Localisation des vecteurs d'ARNm après administration orale chez des souris saines

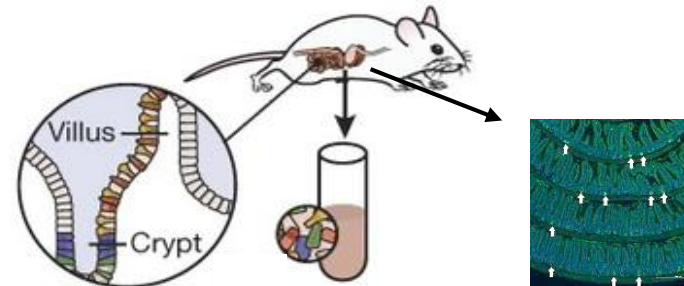
1

Gavage avec des spheroplexes d'ARN fluorescents



2

Évaluation de la biodistribution



- Les cellules intestinales sont isolées par dissociation enzymatique du tissu intestinal.
- La cytométrie en flux est utilisée pour évaluer la localisation des vecteurs d'ARNm et leur internalisation cellulaire.
- Localisation des vecteurs d'ARNm au sein des coupes intestinales
- Microscopie confocale

Etapes du projet

1

Fabrication de vecteurs ARNm
Myo5b

2

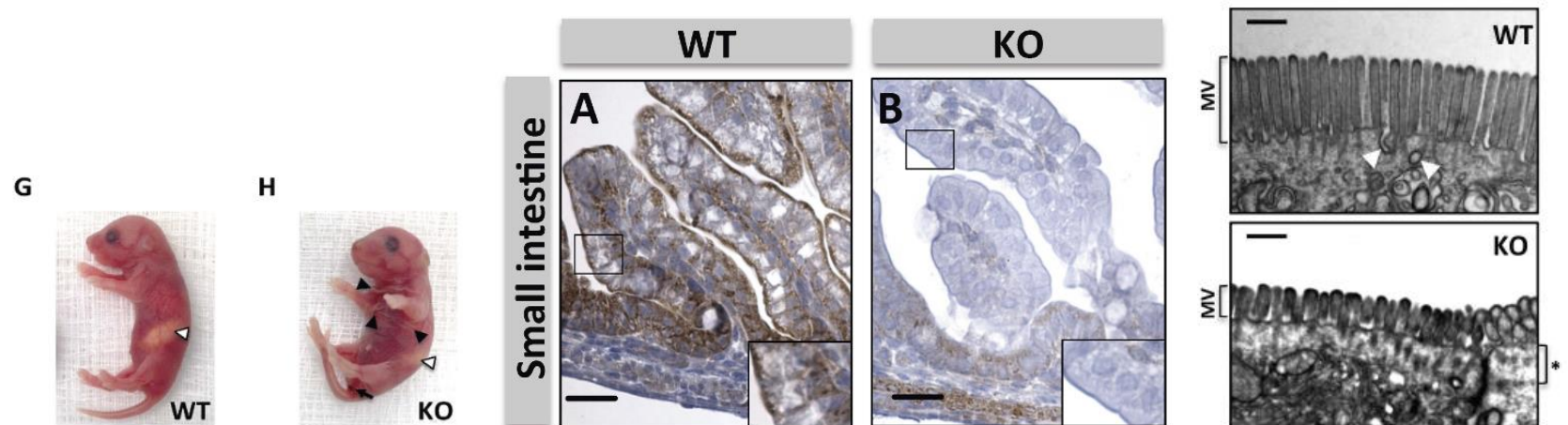
Tests sur modèles cellulaires

3

Tests sur modèles animaux de
MVID

➤ Induction de l'expression de Myo5b par les vecteurs d'ARNm

- Souris avec invalidation conditionnelle du gène Myo5b (Dr Diego Arango)
- Administration de spheroplexes d'ARNm Myo5b par gavage oral
- Expression de Myo5b dans les entérocytes
- Restauration fonctionnelle potentielle (évaluée sur coupes intestinales, morphologie des microvillosités et observations cliniques)



Cartón-García et al, Myo5b knockout mice as a model of microvillus inclusion disease, Scientific Reports (2015)

Perspectives et implications

- Les résultats de cette étude pourraient avoir des implications importantes dans le traitement de la MVID qui n'a, à ce jour, aucune thérapie
- Il est porteur de grand espoir pour les enfants et parents d'enfants atteints de MVID mais aussi plus largement pour toutes les **entéropathies congénitales et aux maladies rares digestives d'origine génétique.**
- Les résultats attendus pourraient déboucher sur des essais cliniques sur des enfants atteints de MVID dans l'objectif de les sevrer définitivement de la nutrition parentérale et tous les inconvénients associés
- La thérapie pourrait s'envisager par une prise régulière d'ARNm par voie orale (sous forme de poudre à reconstituer, de comprimé ou de suspension buvable) afin de substituer la protéine déficiente dans l'intestin



Budget et Calendrier

Budget

Budget total du projet

380 000€

Détail du financement du projet :

1. Produits, matériel, imagerie, modèles cellulaires et animaux: **100 000€**
2. Coût du personnel sur 3 ans (charges comprises) :
 - Ingénieur d'étude CDD : **150 000€**
 - Doctorant: **130 000€**



Financé par



Calendrier

Début
Novembre 2024

Durée
3 ans





CO-MVID

COHORTE OBSERVATIONNELLE DE LA MALADIE DES INCLUSIONS MICROVILLOSITAIRES

Mieux comprendre la MVID grâce à la première cohorte multicentrique de patients

Promoteur et coordination: Association Cure MVID

Investigateur Principal: Dr Cécile Lambe (Hôpital Necker)



**CURE
MVID**
ASSOCIATION





CO-MVID

COHORTE OBSERVATIONNELLE DE LA MALADIE DES INCLUSIONS MICROVILLOSITAIRES

Pourquoi une cohorte MVID?

- Amélioration des connaissances sur la MVID
- Manque de données à long terme sur la maladie
- Standardisation de la prise en charge
- Appui pour les recommandations cliniques
- Création d'un registre pérenne et épidémiologie
- **Préparation d'essais cliniques thérapeutiques → identifier les patients**



**CURE
MVID**
ASSOCIATION



CO-MVID

COHORTE OBSERVATIONNELLE DE LA MALADIE DES INCLUSIONS MICROVILLOSITAIRES

Objectifs du projet

- Analyser l'évolution clinique des patients atteints de la maladie des inclusions microvillositaires à partir des données issues de plusieurs centres spécialisés
- L'étude vise à documenter de manière détaillée plusieurs aspects clés de la maladie :
 - Les comorbidités et symptômes associés, afin d'identifier d'éventuelles complications sous-estimées.
 - La qualité de vie des patients sous nutrition parentérale prolongée.
 - L'évolution de la croissance staturo-pondérale, élément essentiel du suivi pédiatrique.
 - L'adaptation des besoins en nutrition parentérale et la transition vers une prise en charge à domicile.
- En analysant ces paramètres, cette étude ambitionne de mieux comprendre l'histoire naturelle de la MVID, d'identifier les facteurs de risque et de progression de la maladie, et d'optimiser les stratégies de prise en charge.
- Les résultats obtenus pourront ainsi éclairer le développement de futures recommandations cliniques et de nouvelles approches thérapeutiques adaptées aux patients atteints de MVID.



**CURE
MVID**
ASSOCIATION



CO-MVID

COHORTE OBSERVATIONNELLE DE LA MALADIE DES INCLUSIONS MICROVILLOSITAIRES

Nombre de patients

- **30** patients en France (phase 1)
- **100** au niveau international (phase 2)

Méthodologie

- Type d'étude: cohorte rétrospective observationnelle multicentrique, menée à partir de données médicales collectées via un eCRF anonymisé rempli par les centres de référence participants.
- Critères d'Inclusion:
 - Enfants et adultes atteints de MVID confirmée génétiquement ou sur des critères histologiques
 - Patients ayant nécessité une nutrition parentérale prolongée (> 3 mois).
 - Patients suivis dans des centres spécialisés disposant de données cliniques détaillées.



**CURE
MVID**
ASSOCIATION