



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

REVUE FRANÇAISE
D'
Allergologie

Revue française d'allergologie xxx (2011) xxx-xxx

Mise au point

Angio-œdèmes héréditaires : dépistage et caractérisation des grandes délétions sur le gène du C1 inhibiteur^{☆,☆☆}

Hereditary angioedema: Screening and characterization of large deletions in the C1 inhibitor gene

V. Fremeaux-Bacchi

Laboratoire d'immunologie, hôpital européen Georges-Pompidou, 20-40, rue Leblanc, 75015 Paris, France

Reçu le 4 mai 2011 ; accepté le 4 mai 2011

Résumé

Les déficits héréditaires en C1 inhibiteur sont à l'origine de manifestations particulières par leur aspect clinique associant œdèmes sous-cutanés ou sous-muqueux itératifs. Ils sont conséquence d'anomalies diverses du gène du C1 inhibiteur : plus de 200 ont été identifiées. Nous avons constitué depuis 2001, une collection biologique associée à une banque d'ADN et à des données cliniques pour 120 familles présentant un déficit en C1 inhibiteur. Une anomalie génétique a été mise en évidence chez 82 % des cas par la technique de séquençage direct des exons de ce gène. Nous nous proposons de poursuivre les investigations génétiques sur la collection existante par *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA), technique permettant de quantifier les exons afin d'identifier des grandes délétions de ce gène. L'objectif est double : la caractérisation des grandes délétions au niveau du gène de C1 inhibiteur et comparer les manifestations cliniques par rapport à la cohorte de patients présentant une mutation ponctuelle du gène. La recherche de nouvelles anomalies génétiques permettra de progresser dans la connaissance de cette pathologie et d'approcher les 100 % de détection d'anomalies géniques, ce qui permet une classification indiscutable des formes d'angio-œdèmes récidivants, en particulier en démontrant les anomalies du gène du C1 inhibiteur dans les formes héréditaires où cela n'avait pu être fait par les techniques en vigueur à ce jour.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Angio-œdèmes ; Déficit en C1 inhibiteur ; Grandes délétions ; Génétique

Abstract

Hereditary deficits of the C1 inhibitor are at the origin of distinctive clinical manifestations, associating repeated sub-cutaneous and/or sub-mucous edema. They are the consequence of diverse anomalies of the C1 inhibitor gene; more than 200 have been identified to date. Since 2001, we have built up a laboratory collection with a DNA bank and clinical data on 120 families with a C1 inhibitor deficit. A genetic anomaly was detected in 82% of the cases by the direct sequencing method of the exons of this gene. We propose to follow the genetic investigations on the existing collection by using "Multiplex ligation-dependant probe amplification" (MLPA), a technique which will allow us to quantify the exons in order to identify large deletions in this gene. The objective is double: to characterize large deletions at the level of the C1 inhibitor gene and to compare the associated clinical manifestations in comparison with a cohort of patients presenting a single mutation of the gene. Investigation of new genetic anomalies will permit us to advance the knowledge of this pathology and to approach 100% detection of genetic anomalies, allowing us to classify unquestionably the forms of recurrent angioedemas, in particular, those showing anomalies of the C1 inhibitor gene in its hereditary forms, which cannot be done with the techniques in use up to now.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Angioedemas; C1 inhibitor gene deficit; Large deletions; Genetics

[☆] Travail de recherche ayant bénéficié de la subvention 2010 de la Société française d'allergologie.

^{☆☆} Cette mise au point est soumise avant publication dans la *Revue française d'allergologie* à bwallaert@chru-lille.fr.

Adresse e-mail : veronique.fremaux-bacchi@egp.aphp.fr.

Les angio-œdèmes héréditaires ont été décrits par Osler en 1888, leur transmission autosomale dominante n'a pu être affirmée qu'en 1917 par Crowder, mais ce n'est qu'en 1963 que Donaldson montre sa relation avec la présence d'un déficit quantitatif ou fonctionnel en C1 inhibiteur (C1-Inh ; inhibiteur de la fraction du C1 du complément). Stoppa-Lyonnet, en 1987, a montré que le déficit était lié à une anomalie du gène de structure de cette glycoprotéine, gène situé sur le chromosome 11 [1]. Depuis, plus de 200 mutations ou délétions ont été décrites, touchant l'un des exons du gène, chaque famille étant caractérisée par une anomalie génétique propre.

1. Les angio-œdèmes héréditaires

Ce sont des « bouffissures » qui affectent une partie différente de l'organisme à chacune des crises. Celles-ci durent 24 à 48 heures pour disparaître totalement entre les crises. Il n'y a pas d'urticaire, ni de dermographisme associé. L'angio-œdème est circonscrit, peu ou non prurigineux. Il apparaît en règle générale en alternance avec des crises digestives de type occlusif responsables de vomissements, de météorisme abdominal intense et de douleurs vives spontanées et à la palpation de la paroi abdominale. Ces manifestations digestives durent elles-aussi 24 à 48 heures et sont liées à la constitution d'un angio-œdème intestinal dont la conséquence est un obstacle qui va disparaître spontanément. Le risque est la localisation laryngée de cet œdème de Quincke qui va mettre en jeu le pronostic vital et qui requiert prise en charge immédiate et traitement spécifique en urgence. Ces manifestations surviennent à intervalle très variable d'un malade à l'autre et même parfois d'une décennie à l'autre chez un même malade. L'âge de début est échelonné de la petite enfance à l'âge adulte. Dans les formes avec déficit en C1-Inh, la transmission est autosomique dominante mais il faut souligner la grande fréquence des formes dite *de novo* où aucun des parents n'est atteint. Le pronostic autrefois sombre du déficit en C1-Inh a été transformé par les possibilités thérapeutiques aujourd'hui plus nombreuses : prévention par les stéroïdes anabolisants ou les anti-fibrinolytiques, utilisation du C1-Inh intraveineux ou de l'icatibant en cas de crise sévère.

2. Principales caractéristiques de l'inhibiteur du C1 [2]

Le C1-Inh est une glycoprotéine de 105 kDa, formée d'une seule chaîne polypeptidique de 478 acides aminés et qui a la particularité d'être riche en carbohydrates et hautement glycosylée. Le C1-Inh est synthétisé par le foie, les monocytes, les fibroblastes, et les cellules endothéliales. La concentration circulante est de 170 à 540 mg/L. Comme l'alpha-1-antitrypsine, le C1-Inh est un inhibiteur de protéases appartenant à la famille des sérines protéases. Dans cette famille, la protéine inactive son substrat en formant un complexe stable avec lui. Le C1-Inh est la principale protéine de régulation de la voie classique du complément initiée par des complexes antigène-anticorps [3]. Le C1-Inh empêche l'auto-activation de C1, dissocie le C1 de l'activateur de la voie classique en se combinant à C1r et à C1s pour former un complexe C1r-C1s-(C1-Inh)₂. L'activité de la protéine C1-Inh n'est cependant pas limitée à la régulation de la

voie classique du complément. Cette protéine régule aussi l'activation des systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse. Il est l'inhibiteur plasmatique principal de la kallikréine, du facteur XII et aussi du facteur XI. La kallikréine agit sur la libération de kinines en formant un peptide actif pharmacologiquement, la bradykinine, à partir du kininogène de haut poids moléculaire, participe à la fibrinolyse en activant le plasminogène et agit sur la phase contact de la coagulation en amplifiant l'activation du facteur XII. Le déficit en C1-Inh a pour conséquence une augmentation de la kallikréine, qui a son tour augmente la production de bradykinine, médiateur extrêmement labile mais très puissant. Ces phénomènes aboutiraient à une augmentation de la perméabilité vasculaire, responsable de l'apparition de l'angio-œdème. Ces hypothèses physiopathologiques sont confortées par les études réalisées sur la souris invalidée pour le gène du C1-Inh 4. Celle-ci présente une augmentation de la perméabilité vasculaire mise en évidence par une perfusion de bleu Evans, et régressive par traitement par du C1-Inh ou par inhibiteur de la kallikréine ou encore par un agoniste du récepteur de la bradykinine de type 2 (Bk2R). Les souris doublement invalidées C1-INH-/- et Bk2R-/- ont une perméabilité capillaire normale [4].

3. Le diagnostic de déficit en C1 inhibiteur

Il doit être évoqué par le clinicien dès les premières manifestations cliniques d'angio-œdème. Les formes frustes, pauci symptomatiques ou incomplètes sont particulièrement difficiles à déceler, c'est dire l'intérêt de la collaboration avec le laboratoire spécialisé. Le diagnostic biologique repose sur les dosages antigénique et fonctionnel du C1 inhibiteur aidés du dosage du C4 dont le taux est presque toujours effondré par consommation du fait de l'activation permanente de la voie classique. Cependant, un C4 antigénique normal ne permet pas d'exclure le diagnostic [5].

Il est classique de différencier les déficits quantitatifs caractérisés par une concentration de C1-Inh qui varie entre 5 à 30 % de la normale et les déficits qualitatifs (type II) caractérisés par une concentration normale ou augmentée de la protéine et une activité biologique diminuée. Le déficit est le plus fréquemment de type quantitatif (type I) [6]. Il importe de faire le diagnostic biologique du déficit par la démonstration de la réduction de la capacité inhibitrice du sérum vis-à-vis du C1 activé. Les tests chromogéniques sont les plus utilisés [7]. Le principe du test est une compétition entre la liaison du C1-Inh du plasma et un substrat chromogénique avec le C1s activé coâté sur un support. Les résultats sont rendus en pourcentage par rapport à un échantillon témoin. Les déficits héréditaires sont à différencier des déficits acquis en C1-Inh fréquemment satellite d'un syndrome lymphoprolifératif [8] responsable d'une hyperconsommation du C1-Inh ou de la circulation d'un anticorps spécifique du site actif du C1-Inh.

4. Génétique moléculaire des déficits en C1 inhibiteur

Le déficit, lorsqu'il est héréditaire, est transmis selon un mode autosomique dominant. La prévalence de la maladie a été estimée à 1/50 000. En France, plus de 200 familles ont été

répertoriées. Le gène du C1-Inh est situé sur le chromosome 11 (11q11-q13.1) sur 17 Kb et comporte huit exons. La connaissance de la séquence du gène du C1-Inh a permis de caractériser les premiers mécanismes moléculaires associés aux déficits en C1-Inh. Des progrès considérables ont été réalisés ces dernières années grâce au développement de techniques de biologie moléculaire adaptés au diagnostic des maladies rares. En moins de dix ans, plus de 200 mutations différentes ont été rapportées. Elles sont différentes d'une famille à l'autre. Les anomalies génomiques observées dans les déficits en C1-Inh sont répertoriées dans une base de données (<http://hae.en-zim.hu>). En France deux laboratoires effectuent le génotypage du C1-Inh (Centre de référence des angio-œdèmes liés à la bradykinines, à Grenoble et le laboratoire d'immunologie de l'hôpital européen Georges-Pompidou à Paris). Le séquençage de l'ensemble des exons du gène du C1-Inh permet la détection efficace et la localisation précise de substitutions nucléotidiques et de petites délétions/insertions. Les huit exons du gène et leurs régions flanquantes sont ainsi analysés. Des études génétiques peuvent maintenant être proposés aux familles afin de permettre le diagnostic précoce à partir du sang de cordon ou de confirmer l'origine héréditaire du déficit [9]. L'expression clinique de la maladie est très variable entre les patients mais aucune corrélation n'a été à ce jour mise en évidence avec l'anomalie génétique identifiée. Le polymorphisme localisé au niveau du promoteur du gène pourrait jouer et ainsi influencer la sévérité des symptômes [10]. Dans 25 % des cas, le déficit n'est pas présent chez aucun des deux parents, la mutation, dite *de novo* est cependant susceptible d'être transmise aux générations futures[11].

5. Les différentes anomalies du gène

Les anomalies génétiques qui induisent un déficit quantitatif (type I) se rattachent à toutes les classes de mutations trouvées dans d'autres gènes : substitutions nucléotidiques, anomalies touchant l'épissage, délétions ou insertions de petite taille qui modifient le code de lecture de la protéine aboutissant le plus souvent à un codon stop prématuré. Dans le déficit en C1-Inh de type I, ces mutations sont liées dans plus de 40 % des cas à un changement d'un seul acide aminé et dans 20 à 40 %, à une petite délétion ou insertion [12]. Roche et al. ont publié en 2005 les données génétiques de 87 familles espagnoles qui présentent un déficit en C1-Inh [13]. Plus de 50 % des patients présentent une mutation faux-sens ou non-sens localisées pour la moitié au niveau de l'exon 8 et de l'exon 3 du gène [14]. Kalmar et al. ont analysé 26 familles hongroises et identifié dans 50 % des cas une mutation ponctuelle le plus fréquemment au niveau de l'exon 3 [15]. Les déficits fonctionnels (type II) sont le plus souvent associés à des mutations touchant des acides animés du site actif de la protéine, qui altèrent les propriétés enzymatiques de la protéine (comme l'Arg en position 444 de la protéine où se situe le site actif) [16]. La richesse en séquences Alu (séquences répétitives ayant une homologie importante entre elles et sources ainsi de mésappariement du gène) pourrait rendre compte parmi les anomalies génétiques

de la présence de grandes délétions qui peuvent concerner un ou plusieurs exons du gène du C1-Inh [12]. La caractérisation de ce mécanisme moléculaire est actuellement difficile, mais la fréquence de ce mécanisme semble être de moins de 20 % [17]. Laimer et al. ont rapporté l'observation d'une famille qui présente une grande délétion dans la région 3'UTR du gène du C1-Inh [16]. Chez 22 patients de notre cohorte, aucune anomalie génétique n'a été mise en évidence : ils seront donc éligibles pour la recherche d'une grande délétion.

6. Étude des grandes délétions

Les techniques de séquençage ont permis de mettre en évidence chez la plupart des patients atteints d'un déficit, les anomalies moléculaires de type mutation ponctuelle ou microdélétion. Mais ces techniques sont inefficaces pour mettre en évidence des délétions de grande taille. Nous souhaitons utiliser la technique de *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) récemment commercialisée par la société MRC Holland. Cette technique permet de compter le nombre de copies de chaque exons des gènes. C'est une technique relativement complexe et chère car les sondes sont plus longues que les amorces de PCR standard. À l'aide des données qui seront acquises, nous adapterons une technique de PCR utilisant une Taq polymérase (Elongase® Amplification System, Life Technologies) capable d'amplifier de grands fragments d'ADN (jusqu'à 20 Kb) et en choisissant, grâce aux données de la littérature, un couple d'oligonucléotides situés aux berges de ces délétions.

7. Conclusion

Les mutations du gène du C1-Inh des patients qui présentent un déficit quantitatif sont très hétérogènes et différent d'un individu à l'autre. Plusieurs mécanismes différents sont mis en évidence et se rattachent à toutes les classes de mutations trouvées dans d'autres gènes. En collaboration avec les équipes de l'Institut Pasteur (Dr Guinépain et Dr Laurent) et de l'hôpital européen Georges-Pompidou (Pr L. Weiss), nous avons constitué depuis 2001 une collection biologique associée à une banque d'ADN et à des données cliniques pour 120 familles présentant un déficit en C1-Inh. Une anomalie génétique a été mise en évidence chez 82 % des cas par la technique de séquençage directe des exons de ce gène. Nous avons identifié des mutations faux-sens et non-sens, des délétions de petite taille (d'un à 20 nucléotides) et des substitutions nucléotidiques localisée au niveau d'un nucléotide qui participe à l'épissage des exons. Pour 22 patients de cette cohorte, aucune anomalie génétique n'a été mise en évidence. Deux patients de ce groupe présentent une grande délétion qui implique des fragments de 2 Kb à 3 Kb du génome humain et qui comprend l'exon 4 du gène (description dans la publication originale de Stoppa-Lyonnet et al. en 1987). La richesse en séquences Alu pourrait rendre compte de cette hétérogénéité des grands remaniements génétiques à proximité de l'exon 4. Les bornes ne sont pas définies à ce jour.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Stoppa-Lyonnet D, Tosi M, Laurent J, Sobel A, Lagrue G, Meo T. Altered C1 inhibitor genes in type I hereditary angioedema. *N Engl J Med* 1987;317:1–6.
- [2] Wagenaar-Bos IG, Hack CE. Structure and function of C1-inhibitor. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;26:615–32.
- [3] Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:1058–66.
- [4] Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis 3rd AE. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest* 2002;109:1057–63.
- [5] Tarzi MD, Hickey A, Forster T, Mohammadi M, Longhurst HJ. An evaluation of tests used for the diagnosis and monitoring of C1 inhibitor deficiency: normal serum C4 does not exclude hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol* 2007;149:513–6.
- [6] Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Blouin J, Mouthon L, Fridman WH. Investigation of the complement system in clinical practice. *Ann Med Interne (Paris)* 2003;154:529–40.
- [7] Gompels MM, Lock RJ. Laboratory testing for C1 inhibitor deficiency: a comparison of two approaches to C1 inhibitor function. *Ann Clin Biochem* 2007;44:75–8.
- [8] Fremeaux-Bacchi V, Guinépain MT, Cacoub P, Dragon-Durey MA, Mouthon L, Blouin J, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy in patients presenting with acquired angioedema type 2. *Am J Med* 2002;113:194–9.
- [9] Weiler CR, van Dellen RG. Genetic test indications and interpretations in patients with hereditary angioedema. *Mayo Clin Proc* 2006;81:958–72.
- [10] Duponchel C, Djenouhat K, Fremeaux-Bacchi V, Monnier N, Drouet C, Tosi M. Functional analysis of splicing mutations and of an exon 2 polymorphic variant of SERPING1/C1NH. *Hum Mutat* 2006;27:295–6.
- [11] Pappalardo E, Cicardi M, Duponchel C, Carugati A, Choquet S, Agostoni A, et al. Frequent de novo mutations and exon deletions in the C1 inhibitor gene of patients with angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1147–54.
- [12] Tosi M. Molecular genetics of C1 inhibitor. *Immunobiology* 1998;199:358–65.
- [13] Roche O, Blanch A, Duponchel C, Fontan G, Tosi M, Lopez-Trascasa M. Hereditary angioedema: the mutation spectrum of SERPING1/C1NH in a large Spanish cohort. *Hum Mutat* 2005;26:135–44.
- [14] Blanch A, Roche O, Lopez-Granados E, Fontan G, Lopez-Trascasa M. Detection of C1 inhibitor (SERPING1/C1NH) mutations in exon 8 in patients with hereditary angioedema: evidence for 10 novel mutations. *Hum Mutat* 2002;20:405–6.
- [15] Kalmar L, Bors A, Farkas H, Vas S, Fandl B, Varga L, et al. Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema. *Hum Mutat* 2003;22:498.
- [16] Laimer M, Klausegger A, Aberer W, Oender K, Steinhuber M, Lanschuetz CM, et al. Haploinsufficiency due to deletion within the 3'-UTR of C1-INH-gene associated with hereditary angioedema. *Genet Med* 2006;8:249–54.
- [17] Cugno M, Zanichelli A, Foieni F, Caccia SCicardi M. C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress. *Trends Mol Med* 2009;15:69–78.