



**HAL**  
open science

## LA PHASE CONTACT

Pauline Sellier

► **To cite this version:**

Pauline Sellier. LA PHASE CONTACT: Son activation et son controle par C1 Inhibiteur. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01467754

**HAL Id: hal-01467754**

**<https://ephe.hal.science/hal-01467754>**

Submitted on 14 Feb 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR DE LA RECHERCHE**  
**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**  
Sciences de la Vie et de la Terre

**MÉMOIRE**

présenté par Pauline SELLIER

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Etudes

**La phase contact :**  
**Son activation et son contrôle par C1 Inhibiteur**

Soutenu le 4 juillet 2016, devant le jury suivant :

Docteur Marie-Christine LEBART	<i>Président</i>
Docteur Marie-Nathalie SARDA	<i>Rapporteur</i>
Docteur Nicole THIELENS	<i>Examineur</i>
Docteur Arije GHANNAM	<i>Tuteur scientifique</i>
Docteur Véronique FRACHET	<i>Tuteur pédagogique</i>

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. Arije GHANNAM	Laboratoire de Recherche et Développement KininX
Dr. Véronique FRACHET	Laboratoire Cancer, Cycle Cellulaire et Sénescence, EPHE (Sciences de la vie et de la Terre)

## REMERCIEMENTS

Je remercie Madame Marie-Christine Lebart d'avoir eu la gentillesse d'accepter de présider le Jury du diplôme.

Je tiens également à remercier Madame Marie-Nathalie Sarda et Madame Nicole Thielens pour le temps qu'elles ont accordé à juger ce travail et pour la pertinence de leurs remarques.

J'exprime également toute ma gratitude à Madame Véronique Frchet, le coordonnateur de ce projet, pour ses conseils avisés et sa grande disponibilité.

Je remercie singulièrement Monsieur Christian Drouet pour ses conseils, ses encouragements et son énergie qui m'ont permis de découvrir de progresser et de m'épanouir dans la recherche.

Je souhaite également remercier Monsieur Takis Breyiannis, de m'avoir accueilli au sein de KininX où j'ai pu évoluer au fur et à mesure des différents projets.

Je dois également beaucoup à Madame Arije Ghannam, à qui j'adresse des remerciements chaleureux pour son encadrement, sa patience, ainsi que pour la confiance qu'elle m'accorde.

Merci aux membres du GREPI et de KininX que j'ai côtoyé ou que je côtoie toujours avec plaisir. Merci pour leur disponibilité, leur sympathie et leur amitié.

## TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>6</b>
1. Figures .....	6
2. Tableaux.....	8
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>9</b>
<b>CONTEXTE DE RECHERCHE .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>I. La phase contact, dans le processus systémique d'activation .....</b>	<b>13</b>
1. Les précurseurs des kinines.....	13
2. Les protéases de la phase contact.....	15
3. Les kinines .....	16
4. Les enzymes du catabolisme des kinines.....	18
5. Les récepteurs des kinines.....	19
6. Le contrôle de la phase contact .....	20
<b>II. C1 Inhibiteur, Serpine majeure de la régulation.....</b>	<b>22</b>
1. Principe de contrôle par les Serpines .....	23
2. La Serpinopathie .....	24
<b>III. L'Angioedème, une pathologie des kinines .....</b>	<b>26</b>
1. Les différentes étiologies .....	27
2. Le diagnostic biologique.....	29
3. Les traitements .....	30
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>32</b>
<b>Partie 1 : L'activité de la phase contact.....</b>	<b>32</b>
<b>I. Espèces moléculaires du kininogène de haut poids moléculaire et production de bradykinine .....</b>	<b>32</b>

<b>Partie 2 : Le contrôle de la phase contact par C1 Inhibiteur .....</b>	<b>33</b>
<b>I. Reconstitution de la phase contact et dosage de C1 Inhibiteur fonctionnel .....</b>	<b>33</b>
<b>II. Déglycosylation de C1 Inhibiteur et impact sur sa fonction inhibitrice .....</b>	<b>33</b>
<b>III. Mutations du gène <i>SERPING1</i> et identification des polymères de C1 Inhibiteur .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIEL &amp; METHODES.....</b>	<b>35</b>
1. Produits sanguins .....	35
2. Dosage de protéines : BiCinchoninic acid Assay.....	35
3. Immuno Blot.....	35
4. Activité fonctionnelle de C1 Inhibiteur vis-à-vis de la kallibréine .....	37
5. Déglycosylation de C1 Inhibiteur .....	38
6. Activité fonctionnelle de C1 Inhibiteur vis-à-vis de C1s.....	39
7. Enzyme linked immunosorbent assay.....	39
<b>RESULTATS .....</b>	<b>41</b>
<b>Partie 1 : L'activation de la phase contact .....</b>	<b>41</b>
<b>I. Espèces moléculaires du kininogène de haut poids moléculaire et production de bradykinine .....</b>	<b>41</b>
1. Angioedème héréditaire associé à C1 Inhibiteur normal.....	41
2. Mise en place d'un test de diagnostic.....	41
3. Application aux sujets sains .....	44
4. Application aux patients.....	46
5. Performance du test .....	47
6. Exemples de cas cliniques.....	50
7. Conclusion.....	54
<b>Partie 2 : Le contrôle de la phase contact par C1 Inhibiteur .....</b>	<b>56</b>
<b>I. Reconstitution de la phase contact et dosage de C1 Inhibiteur fonctionnel .....</b>	<b>56</b>
1. Angioedème avec déficit pour C1 Inhibiteur.....	56
2. Mise en place d'un test de diagnostic.....	56
3. Application aux sujets sains .....	57
4. Application aux patients.....	59
5. Performance du test .....	60
6. Exemples de cas cliniques.....	61
7. Conclusion.....	64
<b>II. Déglycosylation de C1 Inhibiteur et impact sur sa fonction inhibitrice .....</b>	<b>65</b>
1. Déglycosylation de C1 Inhibiteur.....	65
2. Fonction de C1 Inhibiteur vis-à-vis de la kallibréine .....	66

3. Fonction de C1 Inhibiteur vis-à-vis de C1s.....	70
4. Fonction de C1 Inhibiteur et des anticorps anti-C1 Inhibiteur.....	73
5. Conclusion.....	76
<b>III. Mutations du gène <i>SERPING1</i> et identification des polymères de C1 Inhibiteur</b> .....	<b>77</b>
1. Détection des polymères de C1Inh plasmatique .....	78
2. Examen de différentes mutations du gène <i>SERPING1</i> .....	80
3. Conclusion.....	82
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>84</b>
<b>Partie 1 : L'activation de la phase contact .....</b>	<b>84</b>
<b>I. Espèces moléculaires du kininogène de haut poids moléculaire et production de bradykinine .....</b>	<b>84</b>
<b>Partie 2 : Le contrôle de la phase contact par C1 Inhibiteur .....</b>	<b>88</b>
<b>I. Reconstitution de la phase contact et dosage de C1 Inhibiteur fonctionnel .....</b>	<b>88</b>
<b>II. Déglycosylation de C1 Inhibiteur et impact sur sa fonction inhibitrice.....</b>	<b>91</b>
<b>III. Mutations du gène <i>SERPING1</i> et identification des polymères de C1 Inhibiteur</b> .....	<b>94</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>96</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS .....</b>	<b>105</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### 1. Figures

<b>Figure 1</b> : Clivage du kininogène de haut poids moléculaire par la kallibréine plasmatique et libération de la bradykinine .....	14
<b>Figure 2</b> : Clivage du kininogène de bas poids moléculaire par la kallibréine tissulaire et libération de la kallidine.....	15
<b>Figure 3</b> : Conversion des zymogènes de la phase contact en protéases actives.....	16
<b>Figure 4</b> : Transformation de la bradykinine en <i>desArg</i> <sup>9</sup> -bradykinine par les enzymes du catabolisme .....	17
<b>Figure 5</b> : Clivage des kinines par les enzymes du catabolisme .....	19
<b>Figure 6</b> : Fixation des kinines sur leurs récepteurs membranaires.....	20
<b>Figure 7</b> : Contrôle de la phase contact par différents inhibiteurs .....	21
<b>Figure 8</b> : Différentes cascades enzymatiques sous le contrôle de C1 Inhibiteur .....	23
<b>Figure 9</b> : Mode d'action d'une Serpine avec sa protéase cible .....	24
<b>Figure 10</b> : Effets pathologiques de l'angioedème.....	26
<b>Figure 11</b> : Classification des différents types d'angioedème .....	29
<b>Figure 12</b> : Effet de différents médicaments pour traiter l'angioedème .....	31
<b>Figure 13</b> : Clivage du kininogène de haut poids moléculaire par la kallibréine et libération de la bradykinine .....	42
<b>Figure 14</b> : Evaluation du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé par Immuno Blot.....	43
<b>Figure 15</b> : Distribution du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets sains masculins et féminins .....	45
<b>Figure 16</b> : Distribution du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets masculins sains et chez les patients atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal.....	46
<b>Figure 17</b> : Distribution du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets féminins sains et des patientes atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal.....	47
<b>Figure 18</b> : Courbe <i>Receiver Operating Characteristic</i> pour le kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets masculins sains et chez les patients atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal .....	48

**Figure 19** : Courbe *Receiver Operating Characteristic* pour le kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets féminins sains et chez les patientes atteintes d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal..... 49

**Figure 20** : Evaluation du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les patients atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal..... 51

**Figure 21** : Evaluation du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les patientes atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal, avec ou sans traitement œstroprogestatif..... 52

**Figure 22** : Distribution du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets féminins sains et chez les patientes atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal, avec ou sans traitement œstroprogestatif..... 53

**Figure 23** : Dosage de C1 Inhibiteur vis-à-vis de la kallibréine par méthode amidolytique ..... 57

**Figure 24** : Distribution de C1 Inhibiteur fonctionnel chez les sujets sains masculins et chez les sujets sains féminins..... 58

**Figure 25** : Distribution de C1 Inhibiteur fonctionnel chez les sujets masculins et féminins et chez les patients atteints d'angioedème héréditaire par déficit de C1 Inhibiteur ..... 59

**Figure 26** : Courbe *Receiver Operating Characteristic* chez les sujets sains et chez les patients atteints d'angioedème héréditaire par déficit de C1 Inhibiteur..... 60

**Figure 27** : Distribution de C1 Inhibiteur fonctionnel chez les sujets féminins sains et chez les patientes atteints d'angioedème héréditaire par déficit de C1 Inhibiteur, avec ou sans traitement œstroprogestatif ..... 63

**Figure 28** : Répartition des glycosylations sur la protéine C1 Inhibiteur..... 65

**Figure 29** : Analyse de la déglycosylation de C1 Inhibiteur ..... 66

**Figure 30** : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur son contrôle de la phase contact..... 67

**Figure 31** : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur la formation de complexes avec la kallibréine ..... 68

**Figure 32** : Dosage de C1 Inhibiteur vis-à-vis de C1s par méthode enzymatique..... 70

**Figure 33** : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur son contrôle de C1s..... 71

**Figure 34** : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur la formation de complexes avec C1s..... 72

**Figure 35** : Les polysaccharides comme cible des auto-anticorps anti-C1 Inhibiteur .. 74

**Figure 36** : Fonction de C1 Inhibiteur en présence d'auto-anticorps anti-C1 Inhibiteur ..... 75

**Figure 37** : Localisation structurale des mutations du gène *SERPING1*..... 78



**Figure 38** : Détection de polymères de C1 Inhibiteur plasmatique par Immuno Blot.. 79  
**Figure 39** : Détection des polymères de C1 Inhibiteur chez les patients porteurs de mutations du gène *SERPING1* ..... 80

## 2. Tableaux

**Tableau I** : Quantification du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé par Immuno Blot..... 44  
**Tableau II** : Analyse des courbes *Receiver Operating Characteristic* pour le kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets masculins..... 49  
**Tableau III** : Analyse des courbes *Receiver Operating Characteristic* pour le kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets féminins..... 50  
**Tableau IV** : Quantification kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les patients atteints d'angioedème héréditaire avec C1 Inhibiteur normal, en crise ou hors crise..... 51  
**Tableau V** : Analyse des courbes *Receiver Operating Characteristic* chez les sujets sains et chez les patients atteints d'angioedème par déficit de C1 Inhibiteur ..... 61  
**Tableau VI** : Mutations du gène *SERPING1* et fonction C1 Inhibiteur..... 62  
**Tableau VII** : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur la quantification de complexes avec la kallistéine ..... 69  
**Tableau VIII** : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur la quantification de complexes avec C1s..... 73  
**Tableau IX** : Présence de pC1Inh plasmatique chez des patients porteurs de différentes mutations..... 80  
**Tableau X** : Présence des polymères de C1 Inhibiteur chez les patients porteurs de mutations du gène *SERPING1* ..... 81

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\alpha$ 2M	$\alpha$ 2-macroglobuline
$\alpha$ <sub>2</sub> -AP	$\alpha$ 2-anti plasmine
ATIII	Antithrombine III
AO	Angioœdème
AOA	Angioœdème acquis
AO-nC1Inh	Angioœdème avec C1 Inhibiteur normal
AOH	Angioœdème héréditaire
AOH-dC1Inh	Angioœdème héréditaire avec déficit de C1 Inhibiteur
APP	Aminopeptidase P
APS	Persulfate d'ammonium
B1R	Récepteur 1B
B2R	Récepteur 2B
BCA	BiCinchoninic acid Assay
BK	Bradykinine
$\beta$ ME	$\beta$ -mercaptoethanol
BSA	Bovine sérum albumine
C1	Condition 1
C2	Condition 2
C3	Condition 3
CH	Chaîne lourde
CHU	Centre hospitalier universitaire
CL	Chaîne légère
CLc	Chaîne légère clivée
CPN	Carboxypeptidase N
dC1Inh	C1 Inhibiteur déglycosylé
<i>desArg</i> <sup>9</sup> -BK	<i>desArg</i> <sup>9</sup> Bradykinine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine I
ECL	Enhancer chemiluminescent
EDTA	Ethylènediamine tétraacétique
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
FPH	FXIIa + pKK + HK
FXII	Facteur XII

FXIIa	FXII activé
GREPI	Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire
HRPO	Peroxydase de radis noir
HK	Kininogène de haut poids moléculaire
HKc	Kininogène de haut poids moléculaire clivé
HKn	Kininogène de haut poids moléculaire natif
IEC	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion
KD	Kallidine
KK	Kallicréine
LK	Kininogène de bas poids moléculaire
nC1Inh	C1 Inhibiteur natif
PBS	Tampon Phosphate Saline
pKK	Pré kallicréine
PNGase	Peptide- <i>N</i> -glycosidase F
Pro-Phe-Arg- <i>p</i> NA	Proline-Phénylalanine-Arginine-P-nitroanilide dihydrochloride
SDS	Dodécylsulfate de sodium
TBS	Tampon Tris saline
V <sub>max</sub>	Vitesse maximale initiale
UA	Unité arbitraire
UI	Unité Internationale

## CONTEXTE DE RECHERCHE

KininX est une spin-off du Groupe de recherche et d'étude du processus inflammatoire (GREPI) et du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble, qui a été créée le 31 juin 2013. KininX est un laboratoire de recherche spécialisé dans le domaine des pathologies des kinines et de l'angioedème (AO). KininX dispose d'un actif technologique et d'un savoir-faire sur les médiateurs inflammatoires, dans leurs aspects analytiques et fonctionnels, sur les cibles humaines et animales.

L'objectif de KininX consiste à valoriser des travaux scientifiques réalisés au sein du GREPI, ainsi que de poursuivre les recherches dans le domaine du métabolisme des kinines.

L'importance du projet est strictement liée aux problèmes suivants :

### **a) Le problème de la sécurité des médicaments dans un cadre concurrentiel de plus en plus difficile pour les compagnies pharmaceutiques**

La question des effets adverses des médicaments est d'actualité. Certains médicaments font l'objet d'une procédure spéciale de suivi des effets indésirables appelée « Plan de gestion des risques ». Pour les compagnies pharmaceutiques, la question de sécurité des médicaments ainsi que le contrôle des effets de certaines molécules devient crucial. En effet, de nombreuses procédures de surveillance se mettent en place et la réglementation se renforce de plus en plus. Certains médicaments peuvent provoquer une crise d'angioedème, tels que les antihypertenseurs, les médicaments contre le diabète de type II ainsi que les médicaments de désensibilisation aux allergènes. Le besoin de maîtriser plus efficacement le cycle de développement et la mise sur le marché des nouveaux médicaments poussent à un diagnostic plus efficace et suffisamment en amont, pour minimiser les risques sanitaires.

## **b) Les dangers et le caractère contraignant relatifs au déclenchement de l'angioedème**

Le second facteur à l'origine de la création de KininX est relatif aux accidents liés au déclenchement de l'angioedème et à la nécessité de la mise en place d'un dispositif de diagnostic. L'angioedème est une pathologie rare, mais grave, qui se traduit par un gonflement important des tissus sous-cutanés et sous-muqueux, qui peut affecter le visage, les membres supérieurs et inférieurs ainsi que le larynx et la zone abdominale. Quand la maladie se localise au niveau du système digestif, les douleurs abdominales sont extrêmement fortes et lorsqu'elle touche le larynx, elle peut provoquer la mort. L'efficacité du diagnostic des personnes à risques (maladie héréditaire dans certains cas) ainsi que l'orientation des traitements thérapeutiques sont des paramètres primordiaux. La maladie est maintenant mieux connue et la mise en place du diagnostic devient particulièrement importante.

# INTRODUCTION

## I. La phase contact, dans le processus systémique d'activation

Les effets des kinines ont été découverts en 1909 par les chercheurs Abelous et Bardier (Hillmeister and Persson, 2012). Le système des kinines représente un complexe de protéines enzymatiques dont la cible principale affecte l'endothélium vasculaire. Ce système contribue à la régulation du tonus vasculaire et de la perméabilité capillaire. La phase contact est une cascade complexe de protéases qui s'active au niveau de l'endothélium en présence de surface chargés négativement (plaquettes, collagène). L'activation de la phase contact est génératrice de kinines en faisant intervenir des protéases à Serine (les kininogénases) qui sont capables de cliver leurs substrats (les kininogènes) afin de libérer des peptides vaso-actifs (les kinines) (Hofman et al., 2016). L'abondance des kinines à proximité des récepteurs est régulée par différentes enzymes du catabolisme des kinines (les kininases). L'effet biologique des kinines est principalement médié par deux récepteurs membranaires : le récepteur B2 (R2B) et le récepteur B1 (R1B) (Russo-Marie, 1998) (Prado et al., 2002).

### **1. Les précurseurs des kinines**

Les précurseurs des kinines, également appelés kininogènes, sont des glycoprotéines synthétisées par le foie grâce au gène *KNG1* (Cagliani et al., 2013). Ces précurseurs sont capables de libérer des peptides vaso-actifs. Deux types de kininogènes sont produits, par épissage alternatif du gène *KNG* :

- Le kininogène de haut poids moléculaire (HK)
- Le kininogène de bas poids moléculaire (LK)

#### **Le kininogène de haut poids moléculaire (HK) :**

Le HK est une protéine plasmatique de 110 kDa dont la demi-vie varie entre 48 et 72 heures (Schaller et al., 2008). Il est synthétisé par le foie et sa concentration est comprise entre 70 et 90 µg/mL de plasma. Le HK est une macromolécule qui possède 6 domaines fonctionnels. Les domaines 1, 2 et 3 forment la chaîne lourde (CH) de 56 kDa et les domaines 5 et 6 composent la chaîne légère (CL) de 45 kDa. Le domaine 4 constitue la partie kininomatrice du kininogène, c'est-à-dire que lorsqu'il est clivé, le domaine 4 représente une kinine appelée bradykinine (BK).

Lors de l'activation de la phase contact, le HK est responsable de la libération de la BK *via* le clivage de son domaine 4 par une protéase, la kallibréine plasmatique (KK) (figure 1). Après rupture du pont disulfure reliant le domaine 1 au domaine 6, la KK libère la CH en clivant le HK en C-terminal du domaine 3, puis la CL par clivage en C-terminal du domaine 4. Le domaine 5 de la CL peut également être clivé par la KK pour former la chaîne légère clivée (CLc). La CH et la CL sont dissociées du HK et circulent séparément dans l'organisme avant d'être dégradées. Cette succession de clivages provoque la libération de BK au niveau du site inflammatoire.

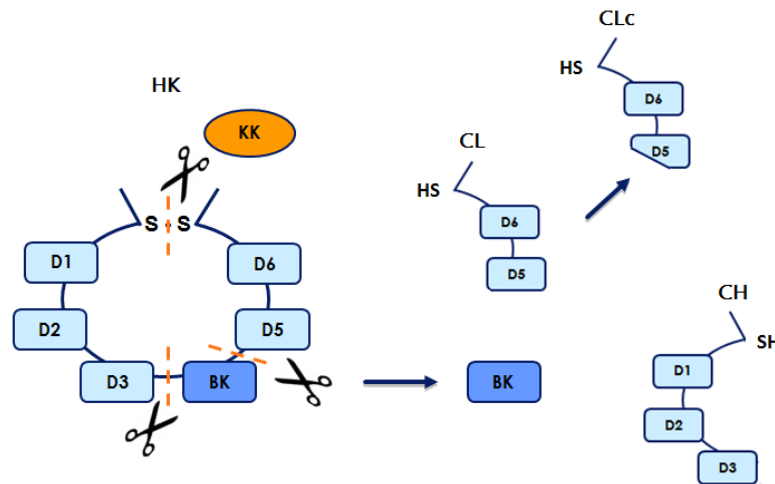


Figure 1 : Clivage du kininogène de haut poids moléculaire par la kallibréine plasmatique et libération de la bradykinine : Le HK, composé de 6 domaines fonctionnels (D1 à D6) est clivé par la KK en CH et en CL ce qui entraîne la libération du domaine 4, la BK.

### Le kininogène de bas poids moléculaire (LK) :

Le LK est une protéine de 68 kDa synthétisée par le foie pour une concentration d'environ 160 µg/mL de plasma (Seth, 2008). Cette macroprotéine est présente dans différents tissus comme les vaisseaux sanguins, les muscles et les reins. Le LK possède 5 domaines fonctionnels ; les domaines 1, 2 et 3 forment la chaîne lourde (CH) de 56 kDa, partagés avec le HK, et le domaine 4 qui correspond à une kinine appelée kallidine (KD). Le LK possède également un cinquième domaine qui correspond à la chaîne légère (CL) de 4kDa et qui permet la protection du domaine 4.

Le clivage du LK est responsable de la libération de la KD *via* la libération de son domaine 4 par une autre protéase, la kallibréine tissulaire (KK.t) (figure 2). Après rupture du pont disulfure reliant le domaine 1 au domaine 5, la KK.t libère la CH en clivant la LK en C-terminal du domaine 3, puis libère la CL par un clivage en C-terminal du domaine 4. La CH et la CL sont dissociées du LK et circulent

séparément dans l'organisme avant d'être dégradées. Cette succession de clivages provoque la libération de KD au niveau du site inflammatoire tissulaire.

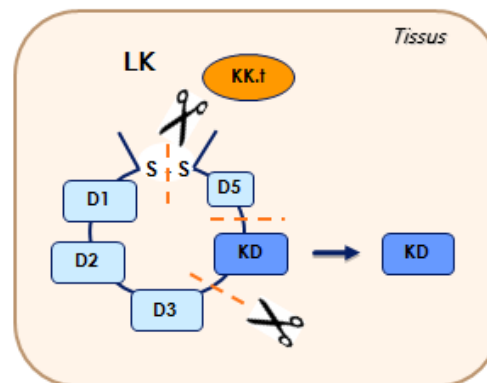


Figure 2 : Clivage du kininogène de bas poids moléculaire par la kallibréine tissulaire et libération de la kallinine : le LK, composé de 6 domaines fonctionnels (D1 à D5), est clivé par la KK.t en CH et CL ce qui entraîne la libération du domaine 4, la KD.

## 2. Les protéases de la phase contact

Les protéases de la phase contact sont des protéases à Sérine plasmatiques. Elles possèdent un site catalytique composé de la triade : Sérine-Aspartate-Histidine, qui assure le clivage des protéines substrats en hydrolysant leurs liaisons peptidiques Arginine-X. Ces protéases sont présentes dans l'organisme sous deux formes ; la forme zymogène inactive et la forme active. Dans la phase contact, les protéases qui interviennent majoritairement sont les couples (figure 3) :

- Facteur XII (FXII) / Facteur XII activé (FXIIa)
- Prékallibréine (pKK) / Kallibréine (KK)

### Facteur XII (FXII) / Facteur XII activé (FXIIa) :

Le FXII, également appelé facteur Hageman, est une protéine de 80 kDa synthétisée par le foie et codée par le gène *F12*. Ce zymogène circule dans le sang à des concentrations de 30 à 40 µg/mL de plasma, avec une demi-vie variant entre 50 et 70 heures (Madsen et al., 2013). Cette protéine intervient dans la coagulation et la phase contact (Kenne et al., 2015). Le FXII a la capacité de s'auto-activer (FXIIa) au contact d'une surface électronégative, comme les plaquettes ou le collagène *in vivo*, ainsi que le verre ou le dextran sulfate *in vitro* (Mitropoulos, 1999) (de Maat et al., 2014). Cette particularité du FXII, à l'origine de la dénomination de la phase contact,



permet d'initier l'activation de cette cascade enzymatique. L'activation du FXII est caractérisée par un changement conformationnel du zymogène FXII et son clivage en FXIIa. Lorsque le FXII est activé, il devient capable de cliver la pKK et ainsi de l'activer en KK.

### Prékallicréine (pKK) / Kallicréine (KK) :

La pKK est une protéine de 85 kDa dont la demi-vie très longue s'étend de 7 à 10 jours. Cette protéine circule dans le sang sous forme inactive, pour des concentrations de 50 µg/mL de plasma (Alving et al., 1983) (Björkqvist et al., 2013). Elle circule sous forme zymogène dont 80 à 90 % forment un complexe avec le HK. La pKK peut être activée par le FXIIa afin de générer la KK. La KK peut à son tour activer le FXII, formant ainsi une boucle d'amplification. La KK est une protéine de 60 kDa d'une durée de demi-vie relativement faible comparée à celle de son précurseur car elle n'est présente sous la forme active que 5 minutes dans l'organisme (Nishimura et al., 1986). Une fois activée, la KK est capable de cliver le HK et ainsi de provoquer la libération de la BK.

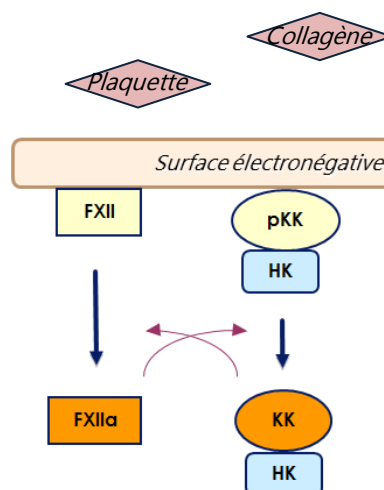


Figure 3 : Conversion des zymogènes de la phase contact en protéases actives : Activation du FXII en FXIIa par une surface électro-négative et conversion de la pKK en KK. Activation du FXII en FXIIa par la KK, formant une boucle d'amplification.

### 3. Les kinines

Les kinines sont des peptides vaso-actifs impliqués dans le contrôle cardiovasculaire, l'inflammation, la perméabilité vasculaire et la douleur (Ito et al., 1991). Ce sont des peptides de 8 à 10 acides aminés dont la demi-vie,

courte varie entre 17 et 37 secondes (Cyr et al., 2001). Dans la phase contact, les kinines responsables du processus inflammatoire et de la vasodilatation sont (figure 4) :

- La bradykinine (BK)
- La *desArg*<sup>9</sup>-bradykinine (*desArg*<sup>9</sup>-BK)

#### **La bradykinine (BK) :**

La BK correspond au domaine 4 du HK qui est directement issu du clivage du HK par la KK. C'est un peptide qui a un pouvoir vasodilatateur ainsi que des propriétés inflammatoires. La BK est formée d'une séquence de 9 acides aminés : Arginine- Proline- Proline- Glycine- Phénylalanine- Serine- Proline- Phénylalanine- Arginine (Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>). Les effets vasculaires de la BK sont médiés par son récepteur B2 (B2R) présent à la surface des cellules endothéliales.

#### **La *desArg*<sup>9</sup>-bradykinine (*desArg*<sup>9</sup>-BK) :**

La *desArg*<sup>9</sup>-BK est le métabolite actif de la BK qui est formé à partir du clivage de la BK. Le clivage de l'Arg<sup>9</sup> est assuré par deux enzymes : la carboxypeptidase N (CPN) qui est une enzyme soluble et circulante et la carboxypeptidase M (CPM) qui est une glycoprotéine membranaire fixée aux cellules endothéliales. Le produit *desArg*<sup>9</sup>-BK est un peptide composé d'une séquence de 8 acides aminés issu du clivage de la BK : Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>. Le clivage de la BK par la CPN ou la CPM est irréversible.

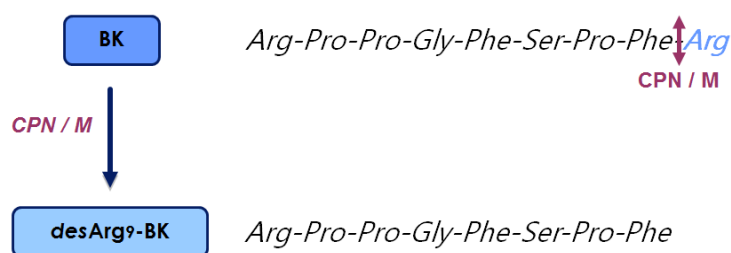


Figure 4 : Transformation de la bradykinine en *desArg*<sup>9</sup>-bradykinine par les enzymes du catabolisme : Clivage de l'Arginine<sup>9</sup> de la BK par les enzymes du catabolisme CPN ou CPM et formation du métabolite actif de la BK ; la *desArg*<sup>9</sup>-BK.

#### 4. Les enzymes du catabolisme des kinines

Les enzymes du catabolisme des kinines, également appelés kininases, sont des enzymes capables de cliver les kinines en différentes positions afin de les dégrader. La dégradation des kinines est un moyen efficace de contrôler leurs actions vaso-actives au niveau du site inflammatoire. Les principales enzymes intervenant dans le catabolisme sont (figure 5) :

- La carboxypeptidase N (CPN)
- La carboxypeptidase M (CPM)
- L'aminopeptidase P (APP)
- L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA)

##### La carboxypeptidase N (CPN) et la carboxypeptidase M (CPM) :

La CPN et la CPM clivent la liaison Phénylalanine<sup>8</sup>-Arginine<sup>9</sup> du côté C-terminal de la BK. Ce clivage élimine le résidu Arginine<sup>9</sup> C-terminal de la BK pour former un nouveau peptide vaso-actif, la *desArg*<sup>9</sup>-BK. Dans l'organisme, ce clivage est faible relativement aux autres clivages de la BK, seulement 3.5 % de la BK est convertie en *desArg*<sup>9</sup>-BK (Drapeau et al., 1991).

##### L'aminopeptidase P (APP) :

L'APP clive la liaison Arginine<sup>1</sup>-Proline<sup>2</sup> du côté N-terminal de la BK et de la *desArg*<sup>9</sup>-BK. L'APP contribue majoritairement à la dégradation de la *desArg*<sup>9</sup>-BK (65 %) comparativement à la BK (21.5 %).

##### L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) :

L'ECA clive la liaison la liaison Phénylalanine<sup>5</sup>-Serine<sup>6</sup> de la BK et de la *desArg*<sup>9</sup>-BK. L'ECA est l'enzyme majoritaire pour la dégradation de la BK (75%), c'est une enzyme secondaire pour le catabolisme de la *desArg*<sup>9</sup>-BK (35%).

L'APP et l'ECA sont des enzymes qui permettent de cliver la BK et la *desArg*<sup>9</sup>-BK afin de former des peptides inactifs qui sont ensuite dégradés dans l'organisme.

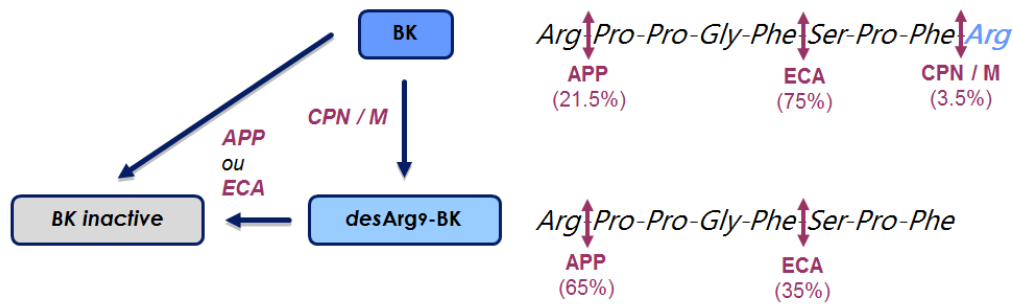


Figure 5 : Clivage des kinines par les enzymes du catabolisme : Formation de la *desArg*<sup>9</sup>-BK par le clivage de la BK par la CPN ou CPM et dégradation des kinines par l'APP et l'ECA.

## 5. Les récepteurs des kinines

Les effets pharmacologiques et physiopathologiques des kinines sont médiés par deux récepteurs membranaires exprimés à la surface des cellules endothéliales (Kaplan and Ghebrehiwet, 2010) (Defendi et al., 2012). Ces deux récepteurs appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (Gαq/11 et Gαi) et possèdent 7 domaines transmembranaires. Les deux récepteurs membranaires relatifs à la BK et à la *desArg*<sup>9</sup>-BK sont (figure 6) :

- Le récepteur B2 (B2R)
- Le récepteur B1 (B1R)

### Le récepteur B2 (B2R) :

Le B2R est un récepteur spécifique de la BK. Ce récepteur est distribué de manière ubiquitaire à la surface des cellules endothéliales, musculaires, épithéliales... Son expression constitutive est responsable de la majorité des réponses pharmacologiques des kinines (Prado et al., 2002). Le B2R est impliqué dans tous les signes cardinaux de l'inflammation aiguë, incluant la vasoconstriction et la vasodilatation, ainsi que l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la dilatation artérielle et la douleur. Le B2R joue un rôle majeur dans la phase aiguë de l'inflammation et de la douleur. L'activation du B2R entraîne la libération de médiateurs vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote, les prostaglandines et des médiateurs de la douleur comme le glutamate (Filippelli-Silva et al., 2015).

### Le récepteur B1 (B1R) :

Le B1R est un récepteur spécifique de la *desArg*<sup>9</sup>-BK. Son expression n'est pas constitutive mais inductible lors d'un processus inflammatoire ou de lésions tissulaires. L'induction du B1R est contrôlée par la libération de cytokines

pro-inflammatoires (Il-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , etc.) généralement libérées lors de la fixation de la BK sur le B2R (Catalioto et al., 2015). L'activation du B1R est à l'origine d'un phénomène de vasodilatation qui provoque une augmentation de la perméabilité endothéliale (Bossi and Tedesco, 2013).

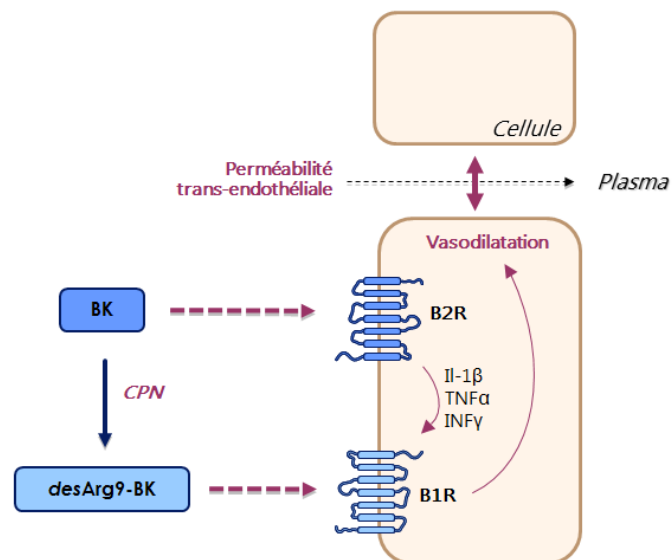


Figure 6 : Fixation des kinines sur leurs récepteurs membranaires : Fixation de la BK sur le B2R et induction du B1R par les cytokines pro-inflammatoires ; déclenchement de la vasodilatation et de la perméabilité trans-endothéliale.

## 6. Le contrôle de la phase contact

Le contrôle de l'activation de la phase contact est assuré par plusieurs protéines inhibitrices, telles que C1 Inhibiteur (C1Inh), l'antithrombine III (ATIII), l' $\alpha$ 2-anti plasmine ( $\alpha$ 2-AP) et l' $\alpha$ 2-macroglobuline ( $\alpha$ 2M) (figure 7). C1Inh est le contrôle majeur du FXIIa et de la KK. Il favorise le contrôle de la KK plasmatique avec un constant d'association ( $K_{on}$ ) ( $102 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) comparativement à celui du FXIIa ( $222 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). La KK et le FXIIa sont également contrôlés par l' $\alpha$ 2M, néanmoins, l' $\alpha$ 2M est un inhibiteur peu efficace du FXIIa ( $5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) et assure un contrôle partiel de la KK plasmatique ( $69 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Le FXIIa est aussi très partiellement contrôlé par l'ATIII et l' $\alpha$ 2-AP (Pixley et al., 1985) (Pixley et al., 1987) (Schapira et al., 1987) (Caliezi et al., 2000).

C1Inh assure une contribution majeure au contrôle de la phase contact en intervenant vis-à-vis du FXIIa et de la KK avec une forte affinité (Cugno et al., 1993) (Ghannam et al., 2013).

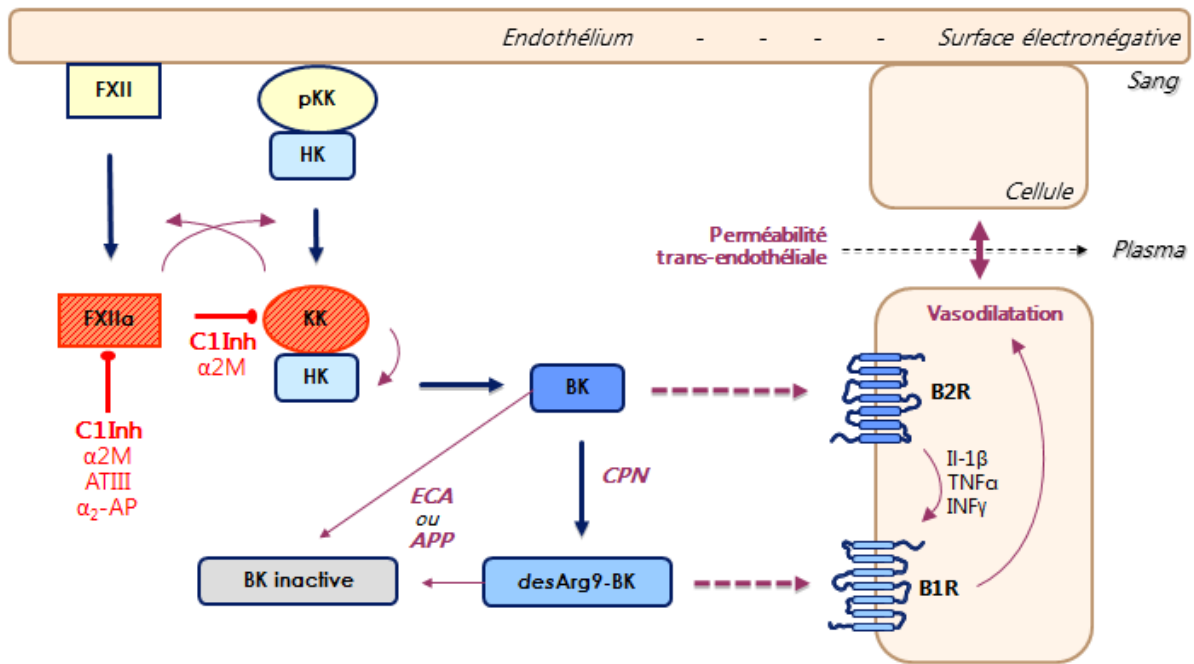


Figure 7 : Contrôle de la phase contact par différents inhibiteurs : Contrôle de la phase contact par l'inhibition du FXIIa et de la KK par les Serpines C1Inh,  $\alpha$ 2M, ATIII et  $\alpha$ 2-AP.

## II. C1 Inhibiteur, Serpine majeure de la régulation

C1Inh, ou inhibiteur de la C1 estérase, est une protéine sérique appartenant à la famille des Serpines. Les Serpines sont des inhibiteurs de protéases à Sérine qui sont responsables de l'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines (Breugelmans et al., 2009) (Ponard, 2015). Cette Serpine est codée par le gène *SERPING1* du chromosome 11 et synthétisée par le foie (Colobran et al., 2014). C1Inh circule dans le sang à des concentrations de 190 à 350 µg/mL avec une moyenne 270 µg/mL (Caubet et al., 2003) ; concentration qui définit 1 unité internationale de C1Inh par mL de plasma (UI/mL) (Shapiro and Zacek, 2014).

C1Inh a été initialement été identifié comme contrôle des protéases dans différentes cascades enzymatiques (figure 8) :

- Le complément participe à l'immunité innée par l'élimination des pathogènes dans l'organisme grâce à l'activation de l'une des trois voies enzymatiques (la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines). Le complément est régulé par C1Inh *via* le contrôle de C1r et C1s pour la voie classique et de MASP-1 et MASP-2 pour la voie des lectines (Panelius and Meri, 2015).

- La coagulation permet la formation de caillots sanguins afin d'interrompre un saignement pour éviter une hémorragie. La coagulation est régulée par C1Inh *via* l'inhibition du FXIa, du FXIIa et de la thrombine (Zakharova et al., 2015).

- La fibrinolyse est un processus qui intervient après la coagulation et permet de dissoudre les caillots sanguins afin de restaurer la fonction des vaisseaux sanguins. C1Inh contrôle la plasmine afin de réguler la fibrinolyse (Al-Horani, 2014).

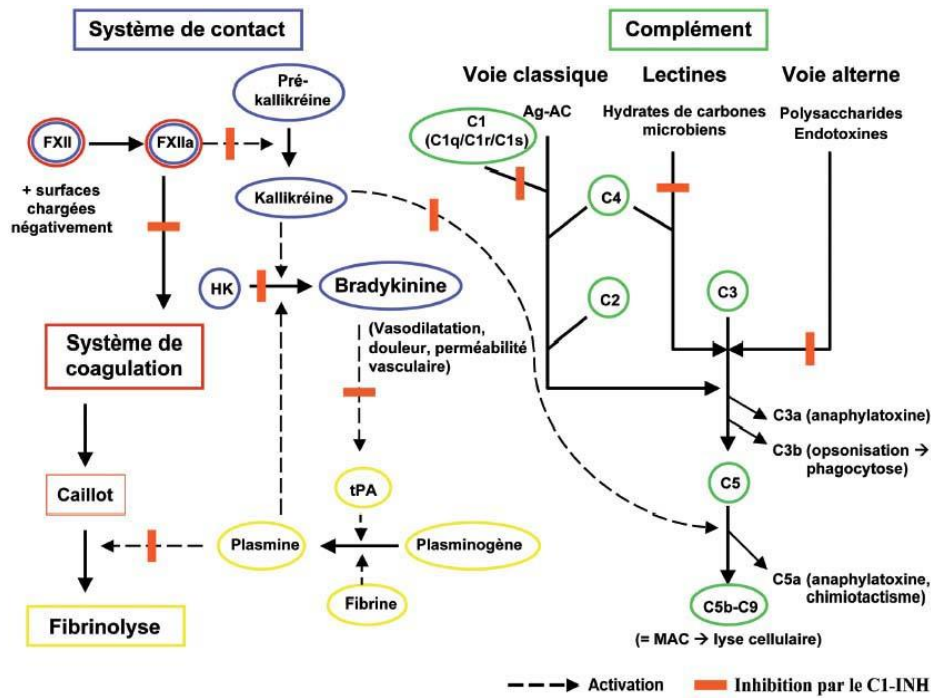


Figure 8 : Différentes cascades enzymatiques sous le contrôle de C1 Inhibiteur : La phase contact (bleu), le complément (vert), la coagulation (en rouge), la fibrinolyse (jaune) et leur régulation par C1Inh.

## 1. Principe de contrôle par les Serpines

Comme toutes les Serpines, C1Inh agit de manière irréversible, sous la forme d'un substrat-suicide, car la molécule devient inactive. C1Inh est composé de quatre feuillets- $\beta$  et d'une boucle réactive sur laquelle se situe le site de clivage cible de la fixation de la protéase cible. Lorsque C1Inh se fixe sur le site catalytique d'une protéase (comme le FXIIa ou la KK), une modification conformationnelle se produit. Le site de clivage de la boucle réactive est rompu et une liaison covalente (Serine-Arginine) s'engage avec la protéase cible. Le repliement de la boucle se réactive pour constituer un cinquième feuillet- $\beta$ . La formation de ce cinquième feuillet- $\beta$  est irréversible, la Serpine reste fixée à sa protéase cible et devient inactive (figure 9) (Huntington et al., 2000).



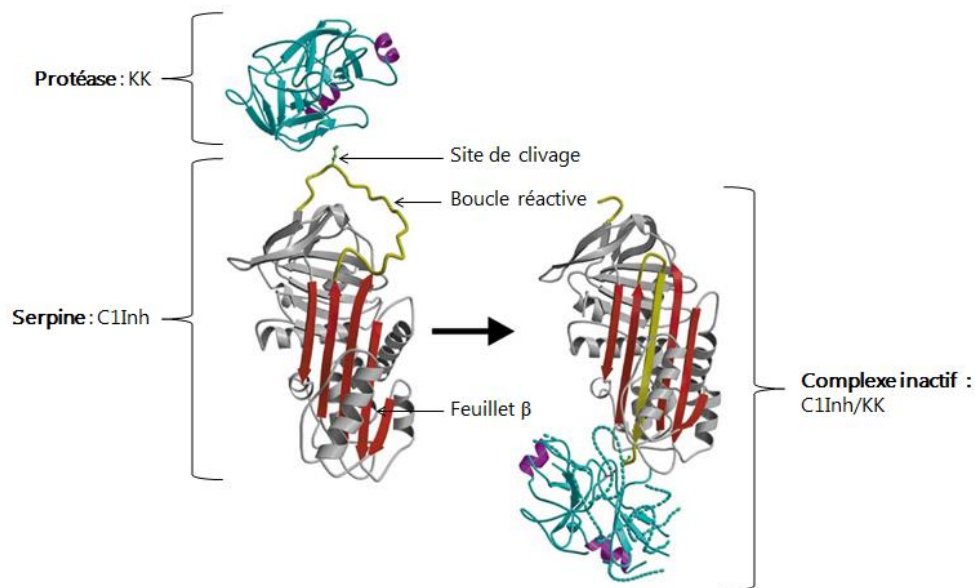


Figure 9 : Mode d'action d'une Serpine avec sa protéase cible : C1Inh, composé de quatre feuillets- $\beta$  (rouge) et d'une boucle réactive (jaune), entre en contact avec la sérine du site catalytique de la KK. Repliement de la boucle réactive pour former un cinquième feuillet- $\beta$  (jaune).

## 2. La Serpinopathie

La Serpine C1Inh, protéine clé dans la régulation de la phase contact, peut subir des modifications conformationnelles lors de sa synthèse. Dans certains cas, le gène *SERPING1* peut porter des mutations qui altèrent la production de C1Inh. Certaines de ces mutations entraînent une diminution de la production de C1Inh, et d'autres provoquent la synthèse de formes tronquées de C1Inh où un repliement de la boucle réactive en feuillet- $\beta$  est naturellement observé. Ces formes repliées de C1Inh ne sont plus capables de se fixer sur les protéases cibles, car le site de clivage de la Serpine n'est plus accessible. Les formes tronquées de C1Inh sont donc considérées comme non fonctionnelles et sont incapables de contrôler la phase contact. De plus, les formes mal repliées de C1Inh ont la capacité de former des agrégats entre plusieurs molécules de C1Inh. Ces agrégats sont appelés des polymères de C1Inh (pC1Inh) et regroupent différentes formes de C1Inh, comme les formes natives fonctionnelles et les formes mal repliées et non fonctionnelles (Madsen et al., 2014). Les pC1Inh possèdent des propriétés particulières ; ils sont capables d'activer le FXII ce qui amplifie l'activation de la phase contact. La polymérisation de C1Inh transforme la molécule de contrôle en un activateur de la phase contact (Madsen et al., 2015). La Serpinopathie est une pathologie moléculaire

structurale associée à un déficit de la Serpine C1Inh, pouvant entraîner une dérégulation de diverses cascades enzymatiques.

### III. L'angioœdème, une pathologie des kinines

L'angioœdème est une pathologie inflammatoire rare qui se distingue en deux étiologies :

- Angioœdème à histamine, causé par l'activation mastocytaire entraînant la libération d'histamines. Ce phénomène, relativement fréquent, est lié à une réaction inflammatoire et/ou allergique, due par exemple à un médicament ou à un aliment.
- Angioœdème à kinine, causé par l'activation endothéliale entraînant la libération de bradykinines.

L'angioœdème à kinine (AO) est une maladie rare décrite pour la première fois en 1882 par le Docteur Heinrich Quincke puis par William Osler en 1888 (Lane et al., 2012). Cette pathologie, de prévalence variable entre 1/50 000 et 1/100 000, touche les hommes et les femmes mais peut également apparaître chez l'enfant ; dans 50% des cas la pathologie s'exprime avant 7 ans et dans 75% des cas avant 13 ans (Riedl et al., 2015).

L'AO se caractérise par l'apparition d'œdèmes sous-cutanés ou sous muqueux (figure 10). Pour la plupart des patients, les crises peuvent subvenir au moins une fois par mois. Ces œdèmes, spontanés et transitoires, durent entre 24 et 72 heures puis disparaissent sans séquelles. Ils affectent les extrémités, la face et le larynx ainsi que les sphères ORL et digestives. Ces œdèmes s'avèrent très douloureux lorsqu'ils se localisent au niveau de la sphère digestive et peuvent également devenir mortels si le larynx et les voies respiratoires sont touchés ; 25 % de mortalité en cas d'œdèmes laryngés non traités à temps (Williams and Craig, 2015). L'AO à kinine est une pathologie complexe dont les causes peuvent être multiples.

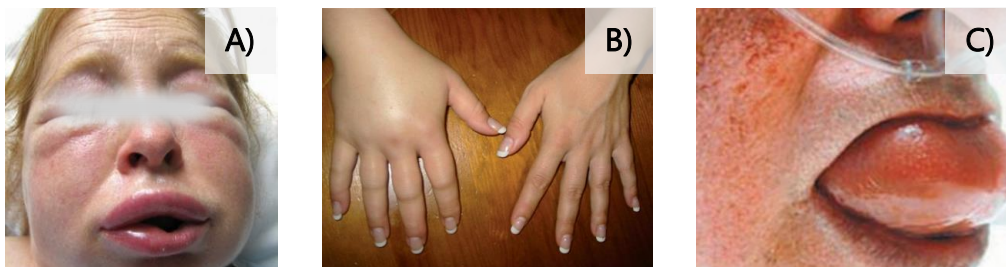


Figure 10 : Effets pathologiques de l'angioœdème : Gonflement de la face (A), des extrémités (B) ou de la langue (C), lors d'une crise d'AO.

## 1. Les différentes étiologies

L'AO à kinines est une situation pathologique qui se distribue en différentes étiologies (figure 11) :

- L'angioedème avec déficit pour C1 Inhibiteur (AOH-dC1Inh)
- L'angioedème avec C1 Inhibiteur normal (AO-nC1Inh)

### L'angioedème avec déficit pour C1 Inhibiteur (AOH-dC1Inh) :

L'AOH-dC1Inh est provoqué lorsque la concentration de C1Inh est inférieure au seuil des valeurs normales. La régulation de la phase contact devient insuffisante ce qui développe une augmentation de l'activité kininogénase et induit le déclenchement d'une crise d'AO suite à la libération de BK (Defendi et al., 2015). Parmi les AOH-dC1Inh, il existe une forme acquise rare (AOA).

#### **a - Héritaire (AOH-dC1Inh)**

Cette forme héréditaire (OMIM 106100) est une maladie à transmission autosomique dominante qui touche une personne sur 50 000. Parmi les AOH-dC1Inh, il en existe deux types (Kargarsharif et al., 2015) :

- Le type I (85% des cas), est caractérisé par une diminution du taux de C1Inh de C1Inh. Cette diminution est due à une mutation du gène *SERPING1*.

- Le type II (15% des cas), est défini par une quantité normale de C1Inh mais sous forme non fonctionnelle. Ce dysfonctionnement est la conséquence d'une mutation codante du gène *SERPING1* qui provoque la synthèse de formes mal repliées et non fonctionnelles de C1Inh.

- Le type I/II, type intermédiaire, est caractérisé par une expression partielle de l'allèle anormal de C1Inh avec pour conséquence un déficit de C1Inh. Ce type d'AO est associé à différentes mutations du gène *SERPING1*.

#### **b - Acquis (AOA-dC1Inh)**

La forme acquise existe chez les personnes de plus de 50 ans. Elle provoque des crises qui sont souvent associées à une hyperconsommation de C1Inh, le plus souvent due à un désordre auto-immun. Elles peuvent également être associées à la présence d'auto-anticorps anti-C1Inh bloquant son activité ou accélérant son catabolisme (Björkqvist et al., 2013) (Fain et al., 2015).

### **L'angioœdème avec C1 Inhibiteur normal (AO-nC1Inh) :**

Dans le cas des AO-nC1Inh, la phase contact est correctement régulée par C1Inh, mais une augmentation de la formation de kinines (kininofomation) ou une baisse de l'activité d'une ou plusieurs enzymes du catabolisme est constatée. Ce type d'AO touche en moyenne 1 personne sur 100 000.

#### **a - Héréditaire (AOH-nC1Inh)**

Pour ce type d'AOH, la concentration et la fonction de C1Inh restent normales, mais une surproduction des kinines est constatée. Cette surproduction est provoquée par l'activation de la phase contact qui peut être associée à une mutation du gène *F12* (gène codant pour la synthèse du FXII) (OMIM 610618) (Charignon et al., 2014). Cette catégorie d'AO est plus observée chez les femmes par l'imprégnation oestrogénique au cours des grossesses ou lors de la prise de traitements oestrogéniques (OP). En effet, les œstrogènes sont connus pour inhiber la synthèse de C1Inh (Giard et al., 2012a) (Gompel, 2015). L'AOH-nC1Inh peut également être provoqué par un défaut des enzymes du catabolisme des kinines suite à un défaut moléculaire tel qu'un polymorphisme du gène *XPNPEP2* qui code pour la production de l'enzyme APP ou du gène *CPN1* qui code pour la production de l'enzyme CPN. Cela provoque un déficit des enzymes du catabolisme, ce qui entraîne une accumulation des kinines (Levy et al., 2014).

#### **b - Acquis ou iatrogène**

L'AO iatrogène est une forme fortement favorisée lors de la prise de certains médicaments tels que les anti-hypertensions, comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (IEC), les sartan ou les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase IV tels que les gliptines. Ces AO associés à la prise de médicament sont appelés AO iatrogène. Les risques d'œdèmes sont fortement augmentés lors de la prise de traitement œstroprogestatif (OP) chez la femme (Drouet et al., 2008) (Brown et al., 2009) (Roberts et al., 2012) (Toh et al., 2012).

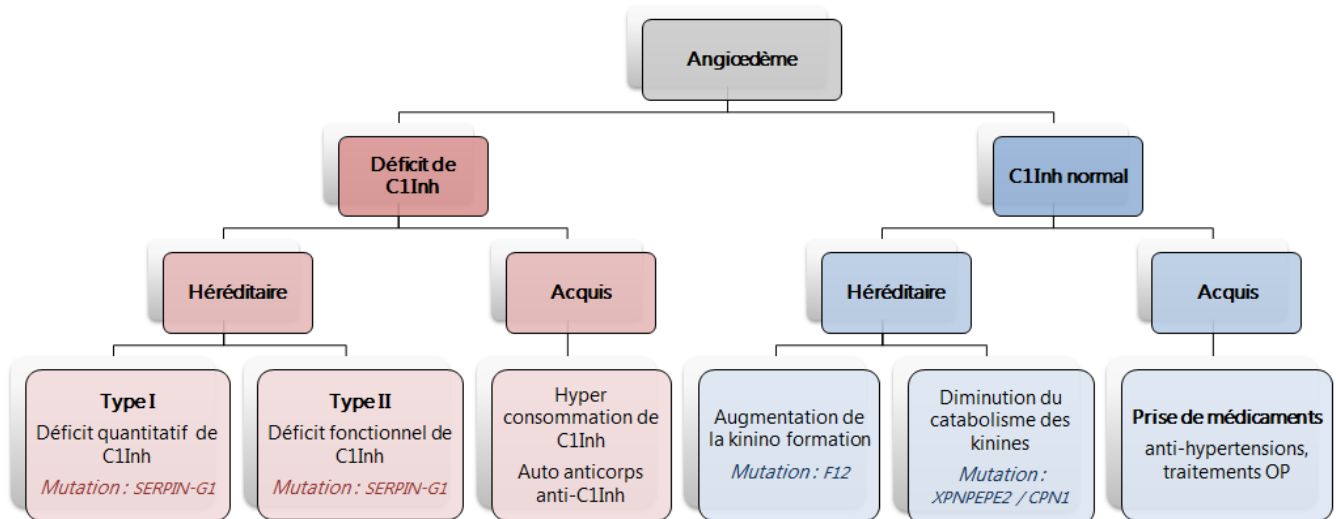


Figure 11 : Classification des différents types d'angioedème : L'AO peut être associé à un déficit pour C1Inh ou à un C1Inh normal, avec dans les deux cas, un caractère héréditaire ou acquis de la pathologie.

## 2. Le diagnostic biologique

L'AO est une pathologie qui est souvent mal diagnostiquée car ses symptômes ressemblent fortement à ceux d'autres maladies, telles que les réactions allergiques comme les œdèmes de Quincke. Les différents types d'OA (héréditaire ou acquis) ont les mêmes symptômes mais des caractéristiques biologiques et une prise en charge thérapeutique différentes.

L'exploration biologique de l'AO repose sur plusieurs paramètres :

- La capacité de production des kinines (l'activité kininoformatrice du plasma, la coupure des substrats naturels, la quantité de BK produite pendant la crise).
- L'efficacité des systèmes de contrôle de la kininoformation (C1Inh), les enzymes du catabolisme des kinines et la mesure des activités kinases.

L'exploration génétique appuie le diagnostic biologique avec la connaissance de l'anomalie (López-Lera et al., 2014) (Firin et al., 2015). La mesure de la fonction de C1Inh reste un paramètre biochimique primordial pour le diagnostic d'AOH-dC1Inh. La fonction de C1Inh est mesurée par deux dosages : la fonction de C1Inh et la quantité de C1Inh plasmatique (l'antigénémie). La quantité de C1Inh plasmatique est dosée dans le plasma par un test ELISA. Cet ELISA permet de capter le C1Inh plasmatique entre deux anticorps anti-C1Inh. L'activité fonctionnelle de C1Inh peut être évaluée vis-à-vis de la protéine C1s, par deux tests différents :

- Le test immuno-enzymatique quantifie la formation de complexes entre C1Inh plasmatique et l'une des cibles de la protéase (C1r ou C1s) issues de l'activation de C1. Ce système a été comparé au suivant dans une étude européenne (Wagenaar-Bos et al., 2008).

- L'essai chromogénique mesure l'activité de C1s protéase résiduelle après contact du plasma (qui apporte C1Inh). L'activité de C1s protéase est mesurée par cinétique de production du NADH, réaction couplée au clivage du benzoyle-L-Arginine éthyl-ester (BAEe) (ce test est réalisé par le CHU de Grenoble au laboratoire d'immunologie) (Drouet et al., 1988).

Le dosage fonctionnel de C1Inh plasmatique vis-à-vis de C1s n'est pas une méthode très spécifique. C1s est une protéase cible assez accessible par purification, mais sans impact dans le processus pathologique de l'AO car elle n'intervient pas dans la phase contact. Du fait de son unique contrôle par C1Inh, la protéase C1s a été choisie pour analyser la fonction de C1Inh. C1s n'est pas la cible idéale pour réagir avec C1Inh dans la pathologie de l'AO.

Un retard, souvent important, de diagnostic est constaté. Le diagnostic de l'AOH n'est proposé en moyenne que 7 à 12 ans après la première crise. Dans ce cas, une prise en charge familiale est prévue avec un dépistage, même chez les sujets asymptomatiques, afin de déceler une potentielle anomalie génétique.

### 3. Les traitements

Le traitement de l'AO durant les crises peut être extrêmement difficile, car contrairement aux réactions allergiques, l'œdème lié à l'AO ne répond pas à l'épinéphrine, ni aux antihistaminiques ou aux corticoïdes. Récemment, plusieurs médicaments ont été développés par diverses entreprises pharmaceutiques (figure 12) :

- *C1Inh purifié* (p.C1Inh) (Berinert<sup>®</sup> ou Cinyze<sup>®</sup>) et *C1Inh recombinant* (r.C1Inh) ou Estérasine (Ruconest<sup>®</sup>) : est un inhibiteur du FXIIa et de la KK. Il agit sur l'organisme en 30 minutes environ, mais n'est réservé qu'aux crises graves de l'AO (Riedl et al., 2014).

- Le *Danazol* : permet d'augmenter la synthèse de C1Inh par le foie et ainsi d'augmenter la régulation de la phase contact (Rahal et al., 2014).

- L'*Icatibant* (Firazyr®) : est un antagoniste compétitif du R2B spécifique de la BK. Il permet de limiter l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires et l'induction du R1B (Charignon et al., 2012).

- L'*Ecallantide* ou DX-88 (Kalibtor®) : est un inhibiteur de la KK. Il permet de limiter le clivage du HK et la libération de BK (Craig et al., 2015).

Parmi ces médicaments disponibles, certains sont prescrits en tant que traitements prophylactiques alors que d'autres ne sont utilisés qu'en cas de crise. De plus, les traitements développés possèdent une gamme d'action assez large ce qui permet de traiter les différents types d'AO de manière optimale.

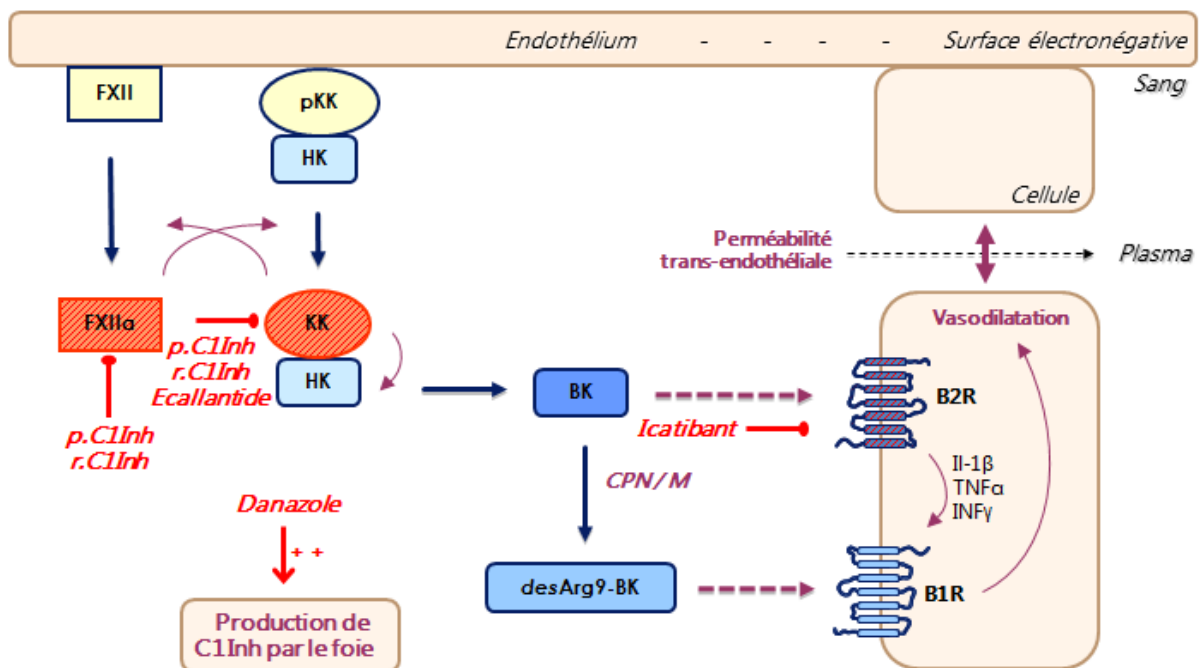


Figure 12 : Effet de différents médicaments pour traiter l'angioœdème : Effet activateur ou inhibiteur de différentes molécules thérapeutiques sur la phase contact.



## OBJECTIFS

La phase contact est une cascade enzymatique complexe, qui débute par l'activation du FXII et mène à la production de kinines, responsables des crises d'AO. L'activation de cette phase contact, contrôlée par la Serpine C1Inh, est due à un déséquilibre entre :

- Une surproduction des kinines pathologiques (BK et *desArg*<sup>9</sup>-BK) causée par un déficit de C1Inh ou une auto-activation du FXII.
- Un déficit des enzymes du catabolisme des kinines : APP, ECA et CPN qui n'assurent plus la dégradation suffisante des kinines dans l'organisme.

Au cours de ces deux années de recherche dans le cadre du diplôme de l'école pratique des hautes études, mon projet s'est déroulé en deux axes :

- 1) L'activation de la phase contact
- 2) Le contrôle de la phase contact par C1Inh

### Partie 1 : L'activité de la phase contact

#### I. Espèces moléculaires du kininogène de haut poids moléculaire et production de bradykinine

L'activation de la phase contact se traduit par une libération de kinines (BK et *desArg*<sup>9</sup>-BK) dans l'organisme, impliquant des médiateurs de la douleur et de l'inflammation. Ce phénomène est à l'origine de déclenchement d'œdèmes localisés, appelés AO. La libération de la BK est un paramètre essentiel pour le diagnostic des patients atteints d'AO, notamment pour les patients AO-nC1Inh. En effet, les tests dosant la fonction de C1Inh ne sont pas discriminants pour ce type de patients. La quantité de BK libérée durant les crises est proportionnelle à la quantité de HK clivée par le KK. Ce clivage du HK peut-être observable par Immuno Blot en comparant la quantité de HK natif, ayant un poids moléculaire de 120 kDa, et de HK clivé, ayant un poids moléculaire de 56 kDa. Cette technique apportera un nouvel axe pour le diagnostic des patients souffrant d'AO-nC1Inh et ainsi faciliter leur traitement.

## Partie 2 : Le contrôle de la phase contact par C1 Inhibiteur

### I. Reconstitution de la phase contact et dosage de C1 Inhibiteur fonctionnel

C1Inh est le contrôle majeur de la phase contact. Sa fonction inhibitrice est un paramètre essentiel pour limiter l'activation de la phase contact grâce à l'inhibition du FXIIa et de la KK. Le dosage de C1Inh fonctionnel est un paramètre primordial pour le diagnostic des patients AOH-dC1Inh. A ce jour, la fonction de C1Inh est mesurée vis-à-vis d'une protéase du complément, C1s, qui n'est pas impliquée dans la physiopathologie de l'AO. Le deuxième objectif du projet était de développer un nouveau test pour améliorer le dosage de C1Inh fonctionnel des patients atteints d'AOH-dC1Inh. Ce test utilisera les protéases de la phase contact comme cible. Ce dosage de C1Inh est basé sur la reconstitution de la phase contact *in vitro* grâce aux protéines purifiées FXIIa, pKK et HK. Il permet de déterminer, par activité amidase, l'inhibition de la KK par C1Inh plasmatique. Cette nouvelle technique améliorera le diagnostic des patients grâce à sa sensibilité et sa spécificité.

### II. Déglycosylation de C1 Inhibiteur et impact sur sa fonction inhibitrice

La Serpine C1Inh est une protéine très glycosylée qui possède plus de 40% de polysaccharides, liés majoritairement aux résidus de son domaine *N*-terminal. C1Inh porte deux types de polysaccharides : les polysaccharides *O*-liés et les polysaccharides *N*-liés. Les études envisagées ont pour hypothèse d'identifier le rôle de ces motifs polysaccharidiques et de déterminer l'effet d'une déglycosylation sur la fonction inhibitrice de C1Inh. Ces études examineront en parallèle les deux protéases cibles, la KK et C1s, afin de déterminer l'impact de la déglycosylation de C1Inh sur la fonction de contrôle de C1Inh. Ces études sont attendues pour apporter des connaissances supplémentaires sur le rôle des polysaccharides de C1Inh dans son activité inhibitrice vis-à-vis des protéines de la phase contact.

### III. Mutations du gène *SERPING1* et identification des polymères de C1 Inhibiteur

Les pC1Inh sont des agrégats non fonctionnels de plusieurs molécules de C1Inh. La présence de ces pC1Inh implique un défaut de contrôle de la phase qui se traduit par l'apparition d'œdèmes. Il s'agit d'étudier différents échantillons de

patients AOH-dC1Inh porteurs de différentes mutations, déjà identifiées, du gène *SERPING1*. Les plasmas de ces patients seront analysés par Immuno Blot pour détecter la présence de ces pC1Inh, responsables d'un déficit de la régulation de la phase contact et d'une auto-activation du FXII. Cette étude a pour but de déterminer si une corrélation peut être établie entre les différents types de mutations du gène *SERPING1* et la présence des pC1Inh dans le plasma.

## MATERIEL & METHODES

### 1. Produits sanguins

Le plasma est un produit issu de prélèvement sanguin, par ponction veineuse. Il est récupéré dans des tubes BD Vacutainer<sup>®</sup> (type 366415) contenant 0,1 mol/L de Na-citrate qui permet de neutraliser les ions calcium en les liant pour former des complexes non ionisés (citrate de calcium.) Les tubes citratés à 10 % permettent d'effectuer toutes les analyses sur plasma (obtenu après centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes à 20 °C). Le plasma, pauvre en plaquettes, est recueilli délicatement, de façon à ne pas le contaminer avec l'anneau de plaquettes et de globules blancs qui divise la phase plasmatique et les globules rouges. Le plasma est ensuite aliquoté dans des microtubes identifiés avec une étiquette spécifique de l'échantillon puis stocké au congélateur à -80 °C.

### 2. Dosage de protéines : BiCinchoninic acid Assay

Les composants purifiés (FXIIa, pKK, HK, C1Inh, etc.) sont, au cours de leur dissolution dans le tampon d'épreuve, quantifiés par un kit colorimétrique : le BiCinchoninic acid Assay (BCA) [Uptima]. Une gamme étalon de bovine sérum albumine (BSA) allant de 0.5 µg/mL à 40 µg/mL est réalisée sur une plaque de 96 puits et les différentes protéines à quantifier sont déposées sur la plaque. Un substrat composé d'ions cuivriques  $\text{Cu}^{\text{II}}$  et d'acide bichinchoninique est ajouté dans chacun des puits. La plaque est ensuite incubée 1 heure à 60°C. Durant cette phase d'incubation, les protéines réduisent les ions cuivriques  $\text{Cu}^{\text{II}}$  en  $\text{Cu}^{\text{I}}$ . L'acide bichinchoninique, réactif colorigène hautement spécifique pour le  $\text{Cu}^{\text{I}}$ , forme des complexes pourpres ayant une absorption maximale à 562 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines, qui peut être calculée à l'aide de la gamme étalon de BSA.

### 3. Immuno Blot

Les échantillons (plasma, milieu réactionnel FPH, etc.) sont dénaturés en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) 2 % [Merck] qui réduit les liaisons faibles

et charge négativement les protéines et de  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ ME) 2.5 % [Merck], réducteur très puissant qui rompt les ponts disulfures inter et intra chaînes des protéines. Les protéines passent alors d'une structure tertiaire ou quaternaire à une structure dénaturée linéaire en chaînes polypeptidiques. Pour cela, les échantillons contenant les protéines à analyser sont mises en présence de « sample buffer » 1X [Appli Chem] à pH 6.7 avant d'être chauffés 5 minutes à 100 °C. Après dénaturation, les protéines ne sont plus discriminées par leurs charges ou par leurs structures mais par le seul paramètre de leur taille. L'Immuno Blot est une méthode d'analyse couplant une séparation en fonction de la taille des protéines sur un gel de polyacrylamide et un transfert sur membrane de nitrocellulose suivie d'une révélation immunologique.

## 1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les protéines chargées négativement par le SDS migrent sous l'action d'un champ électrique en fonction de leur taille dans un gel constitué d'un réseau d'acrylamide et de bisacrylamide. En fonction du poids moléculaire de la protéine à révéler, ce réseau pourra être lâche, favorisant la migration des protéines de poids moléculaire élevé ou au contraire, plus dense, pour les protéines de faible poids moléculaire. Un gel d'électrophorèse est composé de deux phases de polyacrylamide [Sigma] : la première, de concentration (4 % de polyacrylamide) sur laquelle les protéines dénaturées sont déposées permet de concentrer la protéine ; la deuxième, de séparation (entre 7 et 15 % de polyacrylamide) permet de séparer les protéines grâce à son réseau de polyacrylamide plus dense. Les gels sont alors placés dans une cuve d'électrophorèse en présence de tampon de migration [Appli Chem] à pH 8.8. Les échantillons déposés migrent de la cathode vers l'anode sous un courant électrique de 60 V dans le gel de concentration puis de 120 V dans le gel de séparation.

## 2. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines, séparées en fonction de leurs poids moléculaire dans le gel de séparation, sont transférées sur une membrane de nitrocellulose [Biorad] dans un système immergé, dans un tampon de transfert [Appli Chem] à pH 8.3. Le montage est réalisé entre la cathode et l'anode selon le schéma suivant : trois papiers Whatman, gel, membrane, trois papiers Whatman. Un courant électrique de 20 V et 60 mA par gel permet le transfert des protéines chargées négativement par le SDS,

vers l'anode, sur la membrane de nitrocellulose. Le transfert est de 75 minutes pour les gels de 0.75 mm et de 135 minutes pour les gels de 1.5 mm.

### 3. Immuno détection de la protéine d'intérêt

De façon à éviter toute fixation non spécifique, les sites de fixation des protéines restées libres sur la membrane de nitrocellulose sont saturés à 4°C sous agitation pendant une nuit avec une solution tampon Tris saline (TBS) à pH 7.3 Tween 20 (0.05 %) [Appli Chem] contenant du lait écrémé (5%). La membrane est ensuite mise en présence de l'anticorps primaire de souris, de chèvre ou de lapin [GE Healthcare], dirigé contre la protéine d'intérêt pendant 1 heure. Il s'ensuit 3 lavages de 10 minutes avec du TBS-Tween 20 (0.05 %) puis une incubation d'une heure avec l'anticorps secondaire [GE Healthcare] dirigé contre la partie constante de l'anticorps primaire couplé à la peroxydase de radis noir (HRPO). Après trois nouveaux lavages de 10 minutes en TBS-Tween 20 (0.05 %), la membrane est déposée sur un film plastique de type « saran » et incubé en présence de réactif de détection enhancer chemiluminescent (ECL) contenant du peroxyde d'hydrogène et du luminol [Biorad]. Ce réactif est mis en contact, une minute à l'obscurité, avec la membrane de nitrocellulose. Ainsi, le luminol est excité en présence de peroxyde d'hydrogène par une réaction catalysée par l'HRPO. Le retour à l'état fondamental du luminol est accompagné par une émission de photons sur le site de fixation de l'anticorps conjugué (anticorps primaire de la protéine d'intérêt) mesurable avec la camera CCD [Biorad®]. Le temps d'exposition à la camera varie entre 10 secondes et 30 minutes, selon l'intensité du marquage.

### 4. Activité fonctionnelle de C1 Inhibiteur vis-à-vis de la kalllicréine

Les protéines purifiées (FXIIa, pKK et HK) [Enzyme Research Laboratories] de la phase contact sont diluées en tampon Tris/NaCl [Appli Chem] à pH 7.8. Les trois protéines sont mélangées puis incubées avec C1Inh pendant 10 minutes à 37°C afin d'activer les proenzymes en enzymes. Le FXIIa permet la conversion du proenzyme pKK en KK, qui à son tour entraîne le clivage du HK, ce qui rétablit l'activation de la phase contact. En parallèle, C1Inh permet l'inhibition du FXIIa et de la KK produite. Ce milieu réactionnel est appelé FPH.

La réaction d'activation de la phase contact est mesurée par méthode amidolytique avec l'ajout de substrat chromogène, le tripeptide : Proline-Phénylalanine-Arginine-P-nitroanilide dihydrochloride (Pro-Phe-Arg-pNA) [Bachem]. Ce tripeptide est clivé par

la KK au niveau de l'arginine libérant ainsi le  $p$ NA. Lorsque le  $p$ NA est clivé, il passe de l'incolore au jaune. Cette variation colorimétrique est mesurée par spectrophotométrie [Thermo Fisher Scientific®] à 405nm sur une cinétique de 60 minutes à 30 °C. La réaction est inversement proportionnelle à la quantité fonctionnelle de C1Inh présente dans le milieu réactionnel. Une grande quantité fonctionnelle de C1Inh favorise l'inhibition de la KK active présente dans le milieu réactionnel, et limite le clivage du substrat Pro-Phe-Arg- $p$ NA.

Cette méthode a été développée puis brevetée par le laboratoire KininX (Ghannam et al., 2012 - Dosage de la capacité de contrôle de C1 Inhibiteur).

## 5. Déglycosylation de C1 Inhibiteur

La protéine purifiée C1Inh [Berinert ®] est déglycosylée par digestion enzymatique. Les trois enzymes utilisées sont : la neuraminidase (10 mU), le PNGase F (1 250 mU) et la *O*-glycosidase (100 mU) [Roche]. La serpine (1mg/mL de C1Inh) est incubée une nuit à 37°C avec ces enzymes. C1Inh déglycosylé est ensuite conservé par aliquotes de 10  $\mu$ L à -20 °C.

Les polysaccharides liés aux acides aminés de C1Inh peuvent être clivés par différentes enzymes :

- La neuraminidase (ou sialidase), est une enzyme qui appartient à la classe des glycosides hydrolases. Cette enzyme hydrolyse les liaisons osidiques engagées par les acides sialiques terminaux des motifs polysaccharidiques liés à une protéine. La neuraminidase est utilisée pour le traitement préalable à l'hydrolyse des polysaccharides *N*-liés, *O*-liés ou les *O*-acides-neuraminiques qui sont  $\alpha(2,3)$ ,  $\alpha(2,6)$  ou  $\alpha(2,8)$  liés aux protéines.

- Le peptide *N*-Glycosidase F (PNGase F) ou *N*-glycosidase, est une endoglycosidase. Cette enzyme permet le clivage des oligosaccharides *N*-liés aux résidus Asparagine, de *N*-Acétylglucosamine haut mannose ainsi que les oligosaccharides des complexes de glycoprotéines *N*-liées.

- La *O*-glycosidase (ou endo- $\alpha$ -*N*-acétylgalactosaminidase), est utilisée pour cliver les motifs oligosaccharidiques *O*-liés aux protéines. Les liaisons des motifs polysaccharidiques aux résidus Sérine et Thréonine sont hydrolysées. Des substituants au niveau du disaccharide (par exemple, l'acide sialique) peuvent

empêcher l'hydrolyse et, par conséquent, doivent être enlevés chimiquement ou enzymatiquement (par exemple, par la neuraminidase).

## **6. Activité fonctionnelle de C1 Inhibiteur vis-à-vis de C1s**

La protéine du complément C1s [Enzyme Research Laboratories] et la Serpine C1Inh [Berinert ®] sont diluées en tampon Tris base / Tetra sodium diphosphate / Semicarbazide [Appli Chem] à pH 8.5. C1s est incubé (en excès connu) avec C1Inh pendant 15 minutes à 37°C. Un complexe inactif est formé entre C1Inh et C1s et seul C1s résiduel reste actif dans le milieu réactionnel.

L'activité résiduelle de C1s est mesurée par méthode estérasiqque par un substrat chromogène, le Benzoyl-L-Arginine éthyl-ester (BAEe) [Fisher Scientific]. Le BAEe est clivé par C1s, pour libérer le groupement BA. Cette réaction est couplée avec la réduction du NAD en NADH H<sup>+</sup> (Alcool déshydrogénase), qui est suivi par spectrophotométrie à 340nm sur une cinétique de 10 minutes à 30°C. La réaction est inversement proportionnelle à la quantité fonctionnelle de C1Inh présente dans le milieu réactionnel. Une grande quantité fonctionnelle de C1Inh favorise la formation de complexe C1Inh/C1s, il y a moins de C1 résiduel actif et moins de clivage du substrat BAEe.

## **7. Enzyme linked immunosorbent assay**

L'Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) est une méthode immuno-enzymatique. Il permet de détecter la présence d'anticorps ou d'antigènes présents dans un échantillon. Pour doser la quantité d'auto-anticorps anti-C1Inh plasmatique, une plaque de 96 puits est recouverte avec 100 µL de différentes espèces de C1Inh purifiée, déglycosylées ou non [Berinert ®, CSL Behring GmbH] (1 µg/mL) pendant une heure sous agitation. Après rinçage au PBS tween 0.05 %, la plaque est ensuite saturée une heure avec 300 µL de solution de PBS + BSA (2 %) [Sigma Aldrich]. Après rinçage, 100 µL de plasma de différents patients possédant des auto-anticorps anti-C1Inh est dilué au 1/10<sup>ème</sup> avant d'être ajouté dans les différents puits. Après une heure d'incubation, la plaque est rincée et une solution d'anticorps anti- IgG, IgA ou IgM humain couplée au HRP est ajoutée pendant une heure. Ces anticorps se fixent sur les différents anticorps plasmatiques déjà fixés sur la plaque. Après rinçage, les anticorps couplés au HRP sont révélés par l'ajout de 100 µL TMB [BioRad] pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 100 µL de solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



[NormaPur]. La coloration de la plaque, proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés, est mesurée par absorbance à 450 nm.

# RESULTATS

## Partie 1 : L'activation de la phase contact

### I. Espèces moléculaires du kininogène de haut poids moléculaire et production de bradykinine

L'activation de la phase contact conduit à la libération de BK, médiateur inflammatoire prédominant dans la pathologie de l'AO. Le dosage de la BK est un point essentiel pour le diagnostic de l'AO. Ce dosage n'est pas une technique pertinente à cause de la courte demi-vie de la BK et son métabolite actif, la *desArg*<sup>9</sup>-BK (27 ± 10 secondes et 643 ± 436 secondes, respectivement BK et *desArg*<sup>9</sup>-BK) (Cyr et al., 2001). Le HK est la protéine précurseur de la BK qui, lors de son clivage par la KK, entraîne la libération proportionnelle de BK. Le HK possède une durée de demi-vie beaucoup plus longue que celle de la BK (entre 2 et 3 jours) (Schaller et al., 2008). Le clivage du HK reflète adéquatement la libération de BK, traduisant l'activation de la phase contact. Cela fait du HK un paramètre idéal pour quantifier la production de kinines.

#### **1. Angioedème héréditaire associé à C1 Inhibiteur normal**

L'AO-nC1Inh est un type d'AO moins répandu que celui AOH-dC1Inh. Chez ces patients, la phase contact est contrôlée par C1Inh, mais un taux élevé des kinines (BK et *desArg*<sup>9</sup>-BK) est constaté. Les tests permettant de doser la quantité ou la fonction de C1Inh ne sont pas discriminants pour ce type de patients. Il devient primordial de développer les outils nécessaires au diagnostic applicable à cette catégorie de patients.

#### **2. Mise en place d'un test de diagnostic**

Les kinines sont issues du clivage du HK lors de l'activation de la phase contact (figure 13). La KK clive le pont disulfure (S-S) reliant le domaine 1 au domaine 6. Elle libère ensuite la CH en clivant le HK après son domaine 3 puis libère la CL par un clivage après son domaine 4. Le domaine 5 de la CL peut également être clivé par la KK pour former la chaîne légère clivée (CLc). La CH et la CL sont ainsi dissociées du

HK et circulent séparément dans l'organisme avant d'être dégradées. Cette succession de clivages provoque la libération de la BK.

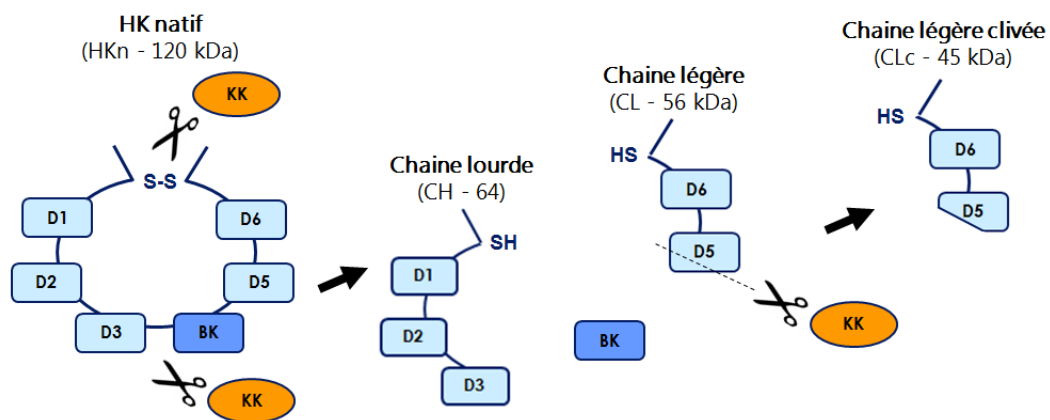


Figure 13 : Clivage du kininogène de haut poids moléculaire par la kallikréine et libération de la bradykinine, le HK (120 kDa), composé de 6 domaines fonctionnels, est clivé par la KK en CH (64 kDa) et en CL (56 kDa) ce qui entraîne la libération du domaine 4, la BK.

Le clivage du HK peut être observable et quantifiable grâce à un Immuno Blot anti-HK. L'anticorps utilisé est un anticorps anti-HK humain couplé à la peroxydase qui se fixe sur le domaine 6 de la CL de la protéine. Lors de sa révélation, il permet de détecter le HK natif (HKn) pour un poids moléculaire de 120 kDa et le HK clivé (HKc) avec la CL de 56 kDa et la CLc de 45 kDa.

Pour chaque Immuno Blot, une gamme étalon de HK purifié est établie à l'aide des valeurs densitométriques issues de chacune des bandes. Cette gamme permet de quantifier le HKn présent dans les échantillons plasmatiques de patients AO-nC1Inh. Le pourcentage de HKc (CL et CLc) est ensuite calculé par rapport à la quantité de HK totale (figure 14).

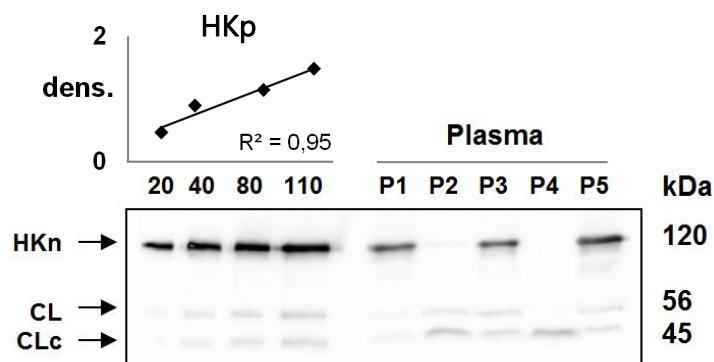


Figure 14 : Evaluation du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé par Immuno Blot, gamme étalon de HKp (20 à 110 ng/puits) permettant la quantification du HKn et du HKc des échantillons plasmatiques (P1 à P5).

Comme illustré dans la figure 14, le HK se trouve majoritairement sous forme de HKn (120 kDa) et l'intensité des bandes est proportionnelle à la quantité de protéines purifiées déposée sur le gel (gamme étalon de HKp de 20 à 110 ng/puits). Des bandes de HKc (56 et 45 kDa) sont également observées. Elles correspondent à une dégradation de la protéine purifiée lors de la manipulation des échantillons. Pour les échantillons plasmatiques des patients, les trois bandes de HK (120, 56 et 45 kDa) sont observées et différents profils se distinguent. Pour les plasmas P1, P3 et P5, le HK est présent majoritairement sous forme de HKn alors que pour les plasmas P2 et P4, le HK se trouve uniquement sous les deux formes de HKc.

Les différentes bandes de la gamme et des échantillons plasmatiques sont quantifiées par densitométrie et exprimées en unité arbitraire (UA) grâce au ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software [Biorad] (méthode semi-quantitative) afin de tracer la gamme étalon de HKp. Une fois la gamme étalon de HKp établie, l'équation de la droite est calculée. Elle permet de déterminer la quantité de HKn et le pourcentage de HKc présents dans chacun des échantillons plasmatiques déposés sur le gel (tableau I).

**Tableau I : Quantification du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé par Immuno Blot**, détermination de la quantité HKn (ng/μL) et du pourcentage de HKc des échantillons plasmatiques (P1 à P5) par rapport à la gamme étalon de HKp (20 à 110 ng/puits).

Plasma	Densitométrie (UA)	HKn (ng/puits)	HKn (ng/μL)	HKc (%)
P1	14 752 474	29	58	8
P2	542 940	0	0	89
P3	15 864 632	35	70	20
P4	254 020	0	0	95
P5	20 461 973	63	126	14

La quantification des bandes de chacun des patients confirme les différents profils observés par Immuno Blot. Les plasmas P1, P3 et P5 ont une concentration de HKn supérieures à 50 ng/μL et un pourcentage de HKc inférieur à 20 % alors que les plasmas P2 et P4 ont une concentration nulle de HKn et un pourcentage de HKc proche de 100 %. Ces variations peuvent s’expliquer par une différence d’état physiologique des patients.

Ces Immuno Blots sont ensuite réalisés sur un ensemble de sujets sains et de patients AO-nC1Inh afin de déterminer si une corrélation peut être établie entre la quantité de HKn, le pourcentage de HKc et l’état pathologique des individus.

### 3. Application aux sujets sains

Différents sujets sains (n=93) dont 51 sujets masculins et 42 sujets féminins sont analysés par Immuno Blot. La quantification du HKn et du pourcentage de HKc est calculée séparément entre les sujets masculins et les sujets féminins afin de déterminer si le sexe des individus intervient dans ces quantifications (figure 15).

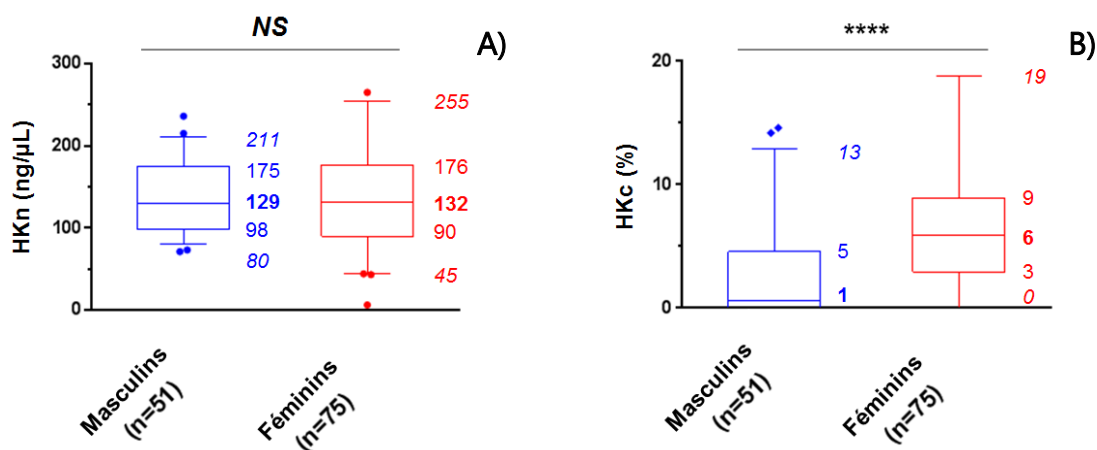


Figure 15 : Distribution du kinogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets sains masculins et féminins : (A) Quantité de HKn et (B) Pourcentage de HKc, chez 126 sujets sains en fonction du sexe des individus : 51 sujets masculins (bleu) et 75 sujets féminins (rouge).

La quantité de HKn est distribuée entre 45 et 255 ng/μL (percentiles 5 et 95 %) pour l'ensemble des sujets sains. La médiane des sujets masculins est de 129 ng/μL alors que celle des sujets féminins est de 132 ng/μL. En comparant ces deux médianes par le test de Mann Whitney, la  $p$ -valeur de 0.74 ne permet pas de différencier ces deux groupes. Le pourcentage de HKc des sujets sains est distribué entre 0 et 19 % (percentiles 5 et 95 %). Ces valeurs sont différentes entre les sujets masculins et féminins. La médiane des sujets masculins est de 1 % alors que celle des sujets féminins est de 6 %. En comparant ces deux médianes par le test de Mann Whitney, la  $p$ -valeur, inférieur à 0.001, confirme une différence significative entre ces deux groupes.

Une différence est établie entre le pourcentage de HKc des sujets sains masculins et féminins. Les sujets féminins sont soumis à une imprégnation oestrogénique (OP) au cours des grossesses, ce qui pourrait avoir un impact sur la formation et sur le clivage du HK. Pour limiter ces variations entre les sujets féminins, toutes les femmes étant sous traitement OP ne sont pas prises en compte dans cette étude. Pour la suite des analyses, les patients masculins et féminins sont analysés séparément afin de mettre au point un test plus fiable.

#### 4. Application aux patients

Suite à l'établissement des valeurs de références, le test est appliqué aux patients masculins (n = 30) (figure 16) et féminins (n = 38) (figure 17). Ces patients ont été suivis et diagnostiqués par le CHU de Grenoble. Ils possèdent une fonction normale de C1Inh et une mutation du gène *F12* (AO-nC1Inh).

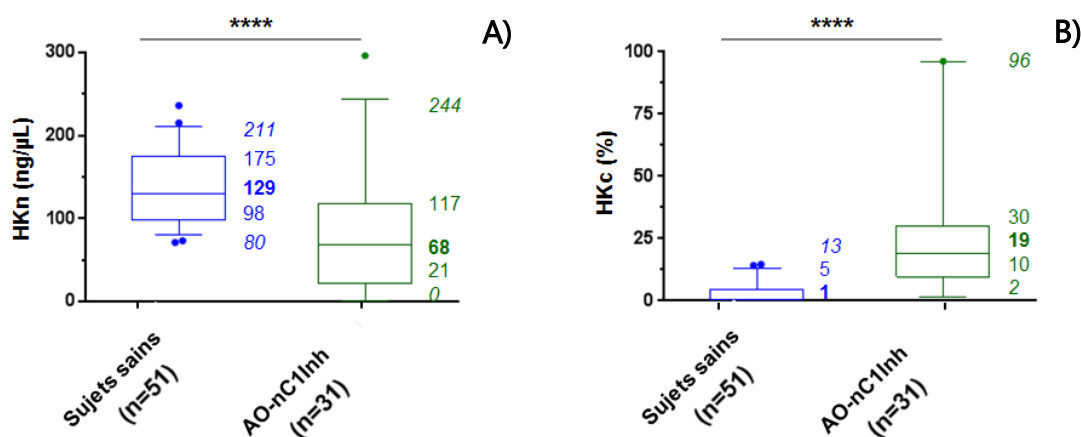


Figure 16 : Distribution du kinogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets masculins sains et chez les patients atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal : (A) Quantité de HKn et (B) Pourcentage de HKc, chez 51 sujets sains (bleu) et chez 31 patients AO-nC1Inh (vert).

Une répartition inégale de la quantité de HKn est observée chez les sujets masculins entre les individus sains et les patients AO-nC1Inh. Les deux médianes sont très différentes pour ces deux groupes, elle est de 129 ng/µL pour les sujets sains et de 68 ng/µL pour les patients AO-nC1Inh. En comparant ces deux médianes par le test de Mann Whitney, la  $p$ -valeur inférieure à 0.0001 confirme une différence significative entre ces deux groupes. Le pourcentage de HKc est également différent entre les deux groupes (sains ou AO-nC1Inh), avec une médiane de 1 % pour les sujets sains et de 19 % pour les patients AO-nC1Inh. En comparant ces deux médianes par le test de Mann Whitney, la  $p$ -valeur est inférieure à 0.0001 ce qui confirme une différence significative entre ces deux groupes.

Des études similaires sont réalisées sur des sujets féminins sains et des patients AO-nC1Inh (figure 17).

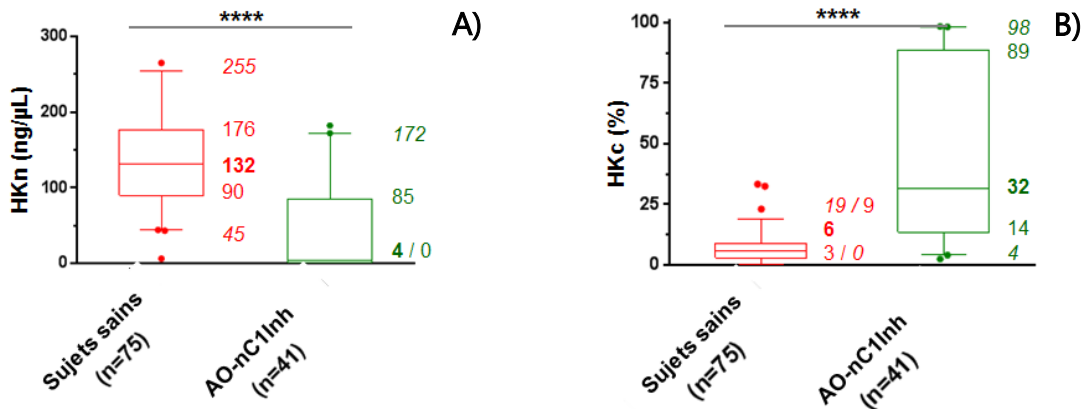


Figure 17 : Distribution du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets féminins sains et des patientes atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal : (A) Quantité de HKn et (B) Pourcentage de HKc, chez 75 sujets sains (rouge) et 41 patientes AO-nC1Inh (vert).

Une répartition inégale de la quantité de HKn est observée chez les sujets féminins entre les individus sains et les patients AO-nC1Inh. Les deux médianes sont très différentes pour ces deux groupes, elle est de 132 ng/μL pour les sujets sains et de 4 ng/μL pour les patients AO-nC1Inh. En comparant ces deux médianes par le test de Mann Whitney, la  $p$ -valeur inférieure à 0.0001 confirme une différence significative entre ces deux groupes. Le pourcentage de HKc est également différent entre les deux groupes (sains et AO-nC1Inh), avec une médiane de 6 % pour les sujets sains et de 32 % pour les patients AO-nC1Inh. En comparant ces deux médianes par le test de Mann Whitney, la  $p$ -valeur est inférieure à 0.0001 ce qui confirme une différence significative entre ces deux groupes.

La comparaison des sujets sains et des patients AO-nC1Inh montre une différence significative pour la quantité de HKn et pour le pourcentage de HKc chez les sujets masculins et féminins. Pour les patients AO-nC1Inh, la quantité de HKn est relativement faible (moyenne entre 68 et 6 ng/μl) ce qui implique que le HK est majoritairement présent sous forme clivée (moyenne entre 20 et 30 %). Par ce test, la différence de HKn et de HKc permet une bonne discrimination entre les sujets sains et les patients AO-nC1Inh.

## 5. Performance du test

Afin de déterminer la performance de ce test, certains paramètres statistiques sont calculés entre les différents groupes d'individus. La sensibilité d'un test permet



de mesurer sa capacité à donner un résultat positif lors de l'analyse d'un patient. Elle s'oppose à la spécificité, qui mesure la capacité d'un test à donner un résultat négatif lors de l'analyse d'un sujet sain. Ces paramètres déterminent la capacité du test à discriminer les valeurs positives et négatives. Les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) sont également calculées. Elles permettent de déterminer le nombre de patients diagnostiqués sur l'ensemble des tests positifs (VPP) et le nombre de sujets sains non diagnostiqués sur l'ensemble des tests négatifs (VPN).

Pour déterminer ces paramètres, la quantité de HKn plasmatique et le pourcentage de HKc des sujets sains sont comparés avec les valeurs des patients AO-nC1Inh. Cette comparaison permet de mettre en place une courbe *Receiver Operating Characteristic* (ROC) pour la quantité de HKn plasmatique et pour le pourcentage de HKc chez les hommes (figure 18) (tableau II) et chez les femmes (figure 20) (tableau III). Ces courbes ROC permettent également de mettre en place les seuils de référence inférieurs et supérieurs afin de distinguer les sujets sains des patients AO-nC1Inh.

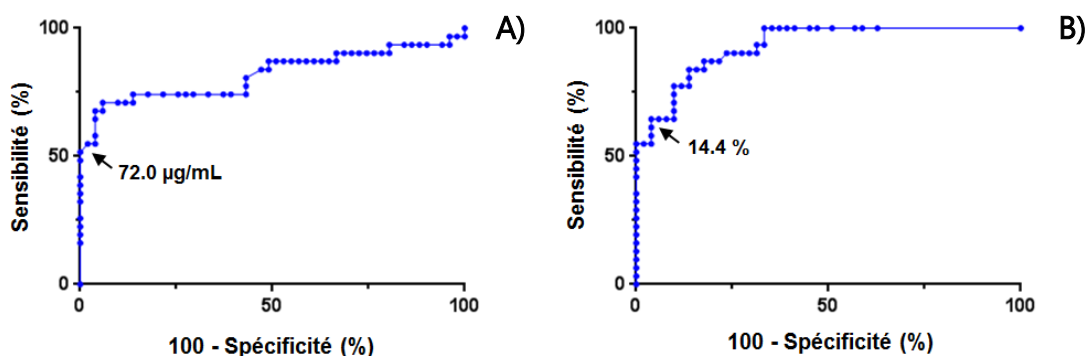


Figure 18 : Courbe *Receiver Operating Characteristic* pour le kinogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets masculins sains et chez les patients atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal : (A) Quantification de HKn et (B) Quantification du pourcentage de HKc chez les sujets masculins sains (n=51) et chez les patients AO-nC1Inh (n= 31).

Tableau II : Analyse des courbes *Receiver Operating Characteristic* pour le kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets masculins : Détermination de l'aire sous la courbe (AUC), du seuil, de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) chez les sujets masculins sains (n=51) et chez les patients AO-nC1Inh (n= 31).

	AUC (95%CI)	Seuil	Sensibilité (95%CI)	Spécificité (95%CI)	VPP	VPN
HKn (ng/μL)	0.89 (0.71-0.93)	< 72.0	54.8 (0.36-0.73)	98.0 (0.90-1.0)	95.7	86.2
HKc (%)	0.93 (0.88-0.98)	> 14.4	54.8 (0.36-0.73)	98.0 (0.90-1.0)	95.5	84.7

La sensibilité et la spécificité du test ont été calculées de manières optimales en sélectionnant un seuil inférieur à 72.0 ng/μL de HKn et supérieur à 14.4 % de HKc pour discriminer les sujets sains des patients AO-nC1Inh. Pour ces seuils, la sensibilité et la spécificité ont été établies à 54.8 % et 98.0 % pour le test de quantification du HKn et à 54.8 % et 98.0 % pour le pourcentage de HKc. Concernant la quantification de HKn, les VPP et les VPN sont calculées à 95.7 et 86.2 % ; pour la quantification du pourcentage de HKc, elles sont de 95.5 et 84.7 %.

Ces analyses statistiques sont ensuite réalisées sur des sujets féminins en comparant les sujets sains et les patients AO-nC1Inh (figure 19) (tableau III).

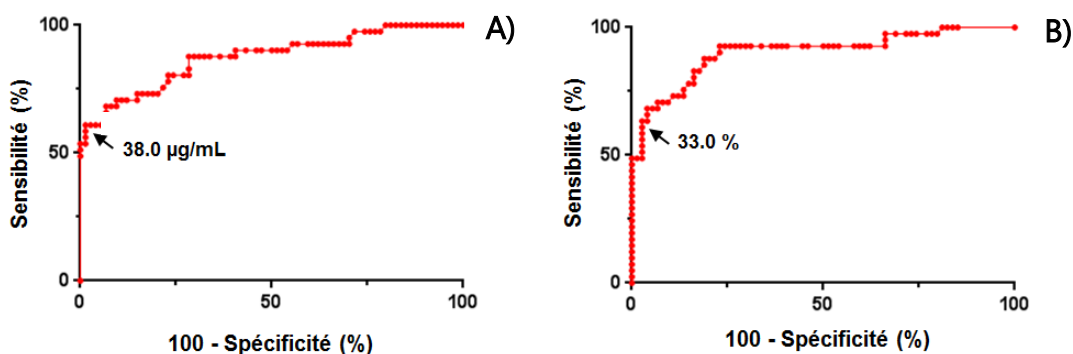


Figure 19 : Courbe *Receiver Operating Characteristic* pour le kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets féminins sains et chez les patientes atteintes d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal : (A) Quantification de HKn et (B) Quantification du pourcentage de HKc chez les sujets féminins sains (n=75) et chez les patientes AO-nC1Inh (n= 71).

**Tableau III : Analyse des courbes *Receiver Operating Characteristic* pour le kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets féminins : Détermination de l'aire sous la courbe (AUC), du seuil, de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) chez les sujets féminins sains (n=75) et chez les patientes AO-nC1Inh (n= 71).**

	AUC (95%CI)	Seuil	Sensibilité (95%CI)	Spécificité (95%CI)	VPP	VPN
HKn (ng/μL)	0.87 (0.80-0.95)	< 38.0	61.0 (0.44-0.76)	98.7 (0.93-1.0)	96.9	85.4
HKc (%)	0.90 (0.84-0.97)	> 33.0	48.8 (0.33-0.65)	97.7 (0.93-1.0)	97.1	89.1

La sensibilité et la spécificité du test ont été calculées de manière optimale en sélectionnant un seuil inférieur à 38.0 ng/μL de HKn et supérieur à 33.0 % de HKc pour discriminer les sujets sains des patients AO-nC1Inh. Pour ces seuils, la sensibilité et la spécificité ont été établies à 61.0 % et 98.7 % pour le test de quantification du HKn et à 48.8 % et 97.6 % pour le pourcentage de HKc. Concernant la quantification de HKn, les VPP et les VPN sont calculées à 96.9 et 85.4 % ; pour la quantification du pourcentage de HKc, elles sont de 97.1 et 89.1 %.

La mise en place de ces courbes ROC a permis de mettre au point les seuils de références chez les sujets sains. La limite inférieure pour le dosage de HKn est établie à 72.0 ng/μL et 38.0 ng/μL chez les sujets masculins et féminins respectivement. Pour le pourcentage de HKc, la limite supérieure est définie à 14.4 % et 33.0 % chez les sujets masculins et féminins respectivement.

## 6. Exemples de cas cliniques

### 1. Suivi du patient : en crise et hors crise

Afin d'observer si le clivage du HK est modifié durant les crises d'AO, les plasmas de différents patients AO-nC1Inh sont analysés durant la crise puis un mois après la crise (figure 20) (tableau IV).

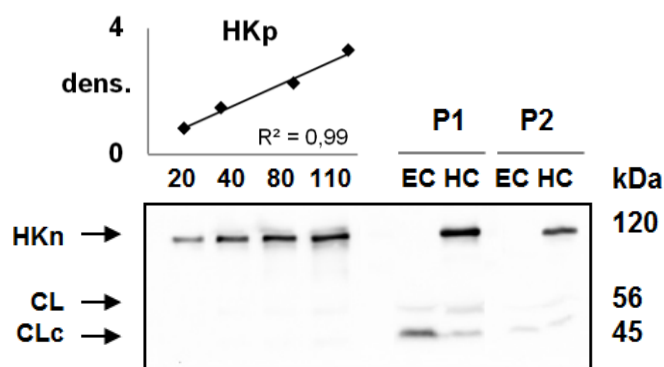


Figure 20 : Evaluation du kinogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les patients atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal, en crise ou hors crise : Gamme étalon de HKp (20 à 110 ng/puits) permettant la quantification du HKn et du HKc chez deux patients AO-nC1Inh (P1 et P2) en crise (EC) ou hors crise (HC).

Tableau IV : Quantification kinogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les patients atteints d'angioedème avec C1 Inhibiteur normal, en crise ou hors crise : Détermination de la quantité HKn (ng/μL) et du pourcentage de HKc des échantillons plasmatiques (P1 à P2) par rapport à la gamme étalon de HKp (20 à 110 ng/puits). Plasma de deux patients AO-nC1Inh (P1 et P2) en crise (EC) ou hors crise (HC).

Patients	P1 féminin		P2 masculin	
	EC	HC	EC	HC
HKn (ng/μL)	0	136	0	105
HKc (%)	98	17	96	5

Pour ces deux patients, lors d'un prélèvement sanguin durant une crise d'AO (EC), la quantité de HKn est nulle (0 ng/μL) ; la totalité du HK est présente sous forme clivée (98 et 96 % respectivement pour P1 et P2). Les valeurs de HKn et de HKc chez ces patients dépassent les seuils de références fixés précédemment ce qui confirme l'état pathologique de ces patients AO-nC1Inh. Un deuxième prélèvement sanguin est réalisé un mois après la crise des patients (HC). La quantité de HK a considérablement augmentée (136 et 105 ng/μL respectivement pour le P1 et le P2) ce qui se traduit par une diminution du pourcentage de HKc (17 et 5 %). Un mois après la crise, ces deux patients retrouvent des valeurs normales pour la quantité de HKn. Pour la patiente P1, le pourcentage de HKc reste supérieur au seuil mis en place précédemment contrairement au patient P2.

## 2. Impact de traitement œstroprogestatif

Chez les sujets féminins, il a été démontré que la prise de traitement OP augmente les risques de déclencher une crise d'AO (Giard et al., 2012b) (Gompel, 2015). Pour vérifier si la pathologie est liée à la prise de traitement OP, deux prélèvements sanguins sont réalisés chez des femmes AO-nC1Inh (n = 11). Le premier prélèvement est réalisé pendant le traitement OP et le deuxième est réalisé quelques mois après l'arrêt du traitement (figure 21).

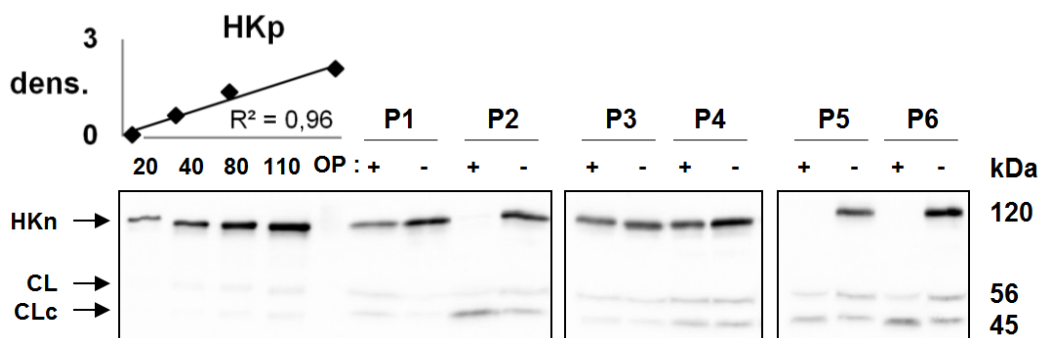


Figure 21 : Evaluation du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les patientes atteintes d'angioœdème avec C1 Inhibiteur normal, avec ou sans traitement œstroprogestatif : Gamme étalon de HKp (20 à 110 ng/puits) permettant la quantification du HKn et du HKc chez six patients AO-nC1Inh (P1 à P6) sous traitement œstroprogestatif (+OP) puis après l'arrêt de ce traitement (-OP).

Le niveau de HKn est très faible et indétectable chez certaines de ces patientes (P2, P5 et P6) en présence de traitement OP. Quelques mois après l'arrêt du traitement, cette bande de HKn est à nouveau observable par Immuno Blot et le pourcentage de HKc est moins important.

Le niveau de HK a été investigué chez des sujets sains féminins sans traitement OP (n=42) et sous traitement OP (n=33). Ces valeurs sont comparées à celles de patientes AO-nC1Inh sous traitement OP et après sevrage (n = 11) (figure 22).

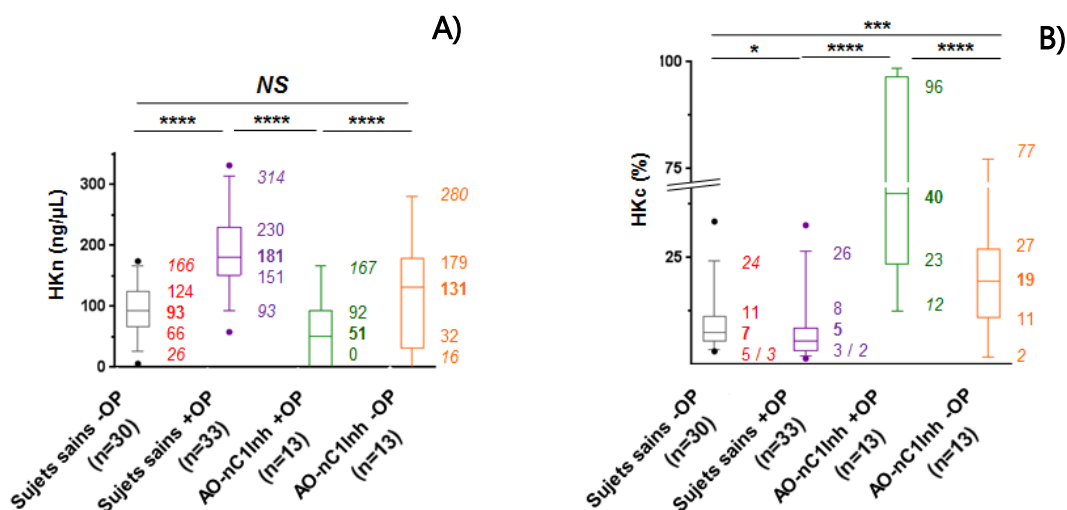


Figure 22 : Distribution du kininogène de haut poids moléculaire natif et clivé chez les sujets féminins sains et chez les patientes atteints d'angioœdème avec C1 Inhibiteur normal, avec ou sans traitement œstroprogestatif : (A) Quantité de HKn et (B) Pourcentage de HKc, chez les sujets sains avec (n=33) (violet) ou sans (n=30) (rouge) traitement œstroprogestatif (OP) ainsi que chez les patients AO-nC1Inh avec (n=13) (vert) ou sans (n=13) (orange) traitement OP.

La prise de traitement OP chez les sujets sains entraîne une légère variation sur la quantité de HKn. Comme vu précédemment, les sujets sains sans traitement OP ont une quantité de HKn majoritairement répartie entre 26 et 166 ng/μL (percentiles 5 et 95 %). Pour des sujets sains sous traitement OP, la quantité de HKn varie entre 93 et 314 ng/μL. En comparant ces deux médianes, 93 et 181 ng/μL (respectivement -OP et +OP) par le test de Mann Whitney, la *p*-valeur, inférieur à 0.001, démontre un effet significative de la prise de traitement OP. Pour les femmes sans traitement, le pourcentage de HKc varie entre 3 et 24 % et celui des femmes sous traitement OP varie entre 2 et 26 %. En comparant les médianes par le test de Mann Whitney (6 % pour les femmes avec ou sans traitement OP), la *p*-valeur de 0.03 démontre un effet significative de la prise de traitement OP. Chez les femmes saines, la prise d'un traitement OP une augmentation de la quantité de HKn et du pourcentage de HKc.

Pour les patientes AO-nC1Inh (n = 13) sous traitement OP, la quantité de HKn varie entre 0 et 17 ng/μL pour une médiane de 51 ng/μL et le pourcentage de HKc varie entre 12 et 98 % pour une médiane de 40 %. Ces valeurs, basses pour le HKn et élevées pour le HKc, dépassent les seuils de référence mis au point précédemment, ce qui confirme l'état pathologique de ces patientes. En comparant l'effet de traitement

OP sur les sujets sains et sur les patients, une variation importante est constatée ( $p$ -valeur inférieur à 0.001).

Lorsque ces mêmes patientes arrêtent la prise de traitement OP, une variation importante de ces paramètres est mesurée. La quantité de HKn passe de 51 à 131 ng/ $\mu$ L ( $p$ -valeur de 0.005 d'après le test de Wilcoxon) et le pourcentage de HKc passe de 40 à 19 % ( $p$ -valeur de 0.001 d'après le test de Wilcoxon). Ces résultats montrent que le sevrage du traitement OP permet une augmentation significative de la quantité de HKn et de la diminution du clivage de HK. Pour ces patients, la quantité de HKn atteint à nouveau le seuil de référence des valeurs normales (38.0 ng/ $\mu$ L) lors du sevrage du traitement OP. Le pourcentage de HKc est également inférieur au seuil de référence (33.0 %). Pour ces patientes AO-nC1Inh, la prise de traitement OP affecte la quantité de HKn et de HKc. Le sevrage du traitement OP permet de ramener les valeurs de HKn proche des sujets sains ( $p$ -valeur inférieur à 0.001 entre les sujets sains et les patients sans traitement OP) et de diminuer le pourcentage de HKc ( $p$ -valeur inférieur à 0.001 entre les sujets sains et les patients sans traitement OP).

## 7. Conclusion

La mise en place de ce test permet de diagnostiquer les patients souffrant d'AO-nC1Inh grâce à la quantification du HKn ainsi que du pourcentage de HKc. Les seuils de références des sujets sains sont calculés séparément afin de mettre en place un test plus sensible et spécifique. Les limites des valeurs normales sont fixées à 72.0 ng/ $\mu$ L pour la quantification du HKn et à 14.4 % pour le pourcentage de HKc pour les sujets masculins. Pour les sujets féminins ces limites sont fixées à 38.0 ng/ $\mu$ L et 33.0 %. Ces limites permettent d'établir un test d'une sensibilité supérieure à 50 % et d'une spécificité supérieure à 98 %. Ce test de diagnostic constitue un nouvel outil de diagnostic pour les patients souffrant d'AO-nC1Inh. Néanmoins longue à mettre en œuvre, cette technique permettra de constater le clivage de HK et ainsi la production de BK pendant la crise, ce qui facilitera l'orientation thérapeutique des patients.

Des études supplémentaires ont permis de mettre en évidence que la prise de traitement OP chez les femmes est à l'origine d'une augmentation du pourcentage de HKc et de la production de kinines. Il a également été démontré que l'arrêt de ce

traitement permet de rétablir un taux normal de HKn et de HKc et ainsi de limiter la production de BK.



## Partie 2 : Le contrôle de la phase contact par C1 Inhibiteur

### I. Reconstitution de la phase contact et dosage de C1 Inhibiteur fonctionnel

La phase contact est une cascade peptidique, qui, lorsqu'elle est suractivée ou mal contrôlée, entraîne l'apparition d'œdèmes suite à une production de BK. Le défaut du contrôle est, pour la plupart des cas, due à un déficit quantitatif ou fonctionnel de la Serpine C1Inh. Ces déficits sont dus à différentes mutations affectant le gène *SERPING1*, gène codant pour la synthèse de C1Inh. Lorsque C1Inh ne contrôle pas suffisamment la phase contact, l'inhibition du FXIIa et de la KK n'est pas assez importante et la phase contact n'est plus contrôlée. Une activation de pKK en KK est constatée, ce qui a pour conséquence une augmentation de la production de kinines (Defendi et al., 2015). Le dosage de l'activité fonctionnelle de C1Inh est un paramètre essentiel pour le diagnostic de l'AO.

#### 1. Angioœdème avec déficit pour C1 Inhibiteur

L'AOH-dC1Inh est le type d'AO le mieux connu. Les types I (défaut quantitatif de C1Inh) et les types II (défaut dysfonctionnel de C1Inh) sont des formes héréditaires de l'AO, provoquées par une mutation du gène *SERPING1* (Kargarsharif et al., 2015). Il existe également des formes acquises est associées à une hyperconsommation de C1Inh, régulièrement le fait d'une lymphopathie et pouvant être associée à un désordre auto-immun (Björkqvist et al., 2013) (Fain et al., 2015). Les tests de diagnostic permettant de doser la fonction de C1Inh utilisent la protéase C1s du complément (Drouet et al., 1988), cette protéase est sans impact dans le processus pathologique de l'AO, car elle n'intervient pas dans la phase contact. Ce n'est donc pas une cible idéale pour l'examen de C1Inh.

#### 2. Mise en place d'un test de diagnostic

C1Inh assure le contrôle majeur de la phase contact en inhibant la KK ( $102.10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Le dosage de C1Inh fonctionnel vis-à-vis de la KK est une méthode efficace pour permettre le diagnostic des patients AOH-dC1Inh puisque la KK intervient directement dans la production de kinines. La fonction de C1Inh est étudiée par reconstitution de la phase contact *in vitro* grâce aux composants purifiés FXIIa, pKK et HK.

C1Inh est incubé 10 minutes à 37°C avec le FXIIa, la pKK et le HK. C1Inh inhibe le FXIIa et la KK, ce qui a pour conséquence une diminution de l'activité de la KK dans le milieu réactionnel. L'activité de la KK est mesurée par dosage amidolytique grâce à un substrat chromogène : le tripeptide Pro-Phe-Arg- $\rho$ NA. Ce tripeptide est clivé par la KK au niveau du  $\rho$ NA, ce qui provoque une modification colorimétrique suivie par cinétique à 405 nm (figure 23).

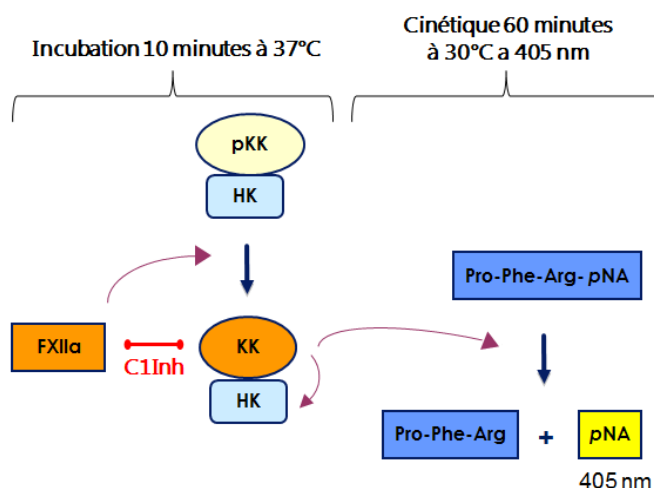


Figure 23 : Dosage de C1 Inhibiteur vis-à-vis de la kallibréine par méthode amidolytique : Conversion de la pKK en KK par le FXIIa et clivage du substrat Pro-Phe-Arg- $\rho$ NA par la KK. Inhibition du FXIIa et de la KK par C1Inh purifié ou plasmatique.

La quantité de C1Inh fonctionnel présent dans le plasma est dosée à l'aide une gamme de C1Inh purifié (de 0 à 4 pmol). Ces différentes concentrations de C1Inh permettent de tracer une gamme de titrage de C1Inh à l'aide de la vitesse initiale maximale ( $V_{max}$ ). La réaction est ensuite réalisée avec un microlitre de plasma et la  $V_{max}$  mesurée permet de calculer la quantité de C1Inh présent dans le plasma. Après avoir déterminé la quantité de C1Inh fonctionnel présente dans un microlitre de plasma, la quantité de C1Inh est convertie en unité fonctionnelle par millilitre de plasma (UI/mL) avec 1 UI = 270 ng de C1Inh d'après Berinert®. Cette unité correspond à l'unité internationale de C1Inh (Thelwell et al., 2011).

### 3. Application aux sujets sains

Différents sujets sains (n = 281) dont 123 masculins et 158 féminins sont analysés par activité amidase (figure 24). Le dosage de C1Inh fonctionnel est réalisé

séparément entre les sujets masculins et les sujets féminins afin de déterminer si le sexe des individus intervient dans ce dosage.

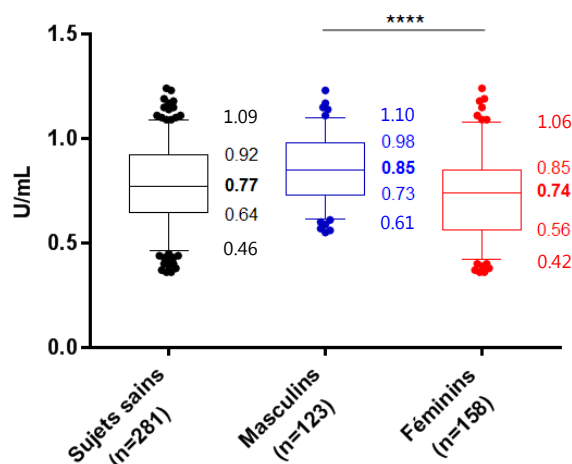


Figure 24 : Distribution de C1 Inhibiteur fonctionnel chez les sujets sains masculins et chez les sujets sains féminins : Fonction de C1Inh (UI/mL) chez 281 sujets sains (noir) en fonction du sexe des individus : 123 sujets masculins (bleu) et 158 sujets féminins (rouge).

La quantité de C1Inh fonctionnel chez les sujets sains est majoritairement répartie entre 0.46 et 1.09 UI/mL (percentiles 5 et 95 %). Ces valeurs sont distribuées différemment entre les sujets masculins et féminins. La médiane des sujets masculins est de 0.85 UI/mL alors que celle des sujets féminins est de 0.74 UI/mL. En comparant ces deux médianes par le test de Mann Whitney, la  $p$ -valeur est inférieure à 0.0001 ce qui confirme une différence significative entre ces deux groupes.

Ces résultats démontrent une différence dans le dosage de C1Inh fonctionnel selon le sexe des individus. Cette différence peut s'expliquer par l'imprégnation oestrogénique au cours de grossesses chez les sujets féminins, ce qui peut avoir un impact sur le dosage de C1Inh fonctionnel plasmatique. Pour limiter les variations entre les sujets féminins, toutes les femmes étant sous traitement OP ne sont pas prises en compte dans la mise en place de ce test. Pour la suite des analyses, les patients masculins et féminins sont analysés séparément afin de mettre au point un test de diagnostic plus sensible et spécifique.

#### 4. Application aux patients

Suite à l'établissement des valeurs de référence, le test est appliqué aux patients masculins (n = 47) et féminins (n = 46) (figure 25). Ces patients sont suivis et diagnostiqués par le CHU de Grenoble. Ils sont caractérisés par AOH-dC1Inh de type I, II ou acquis.

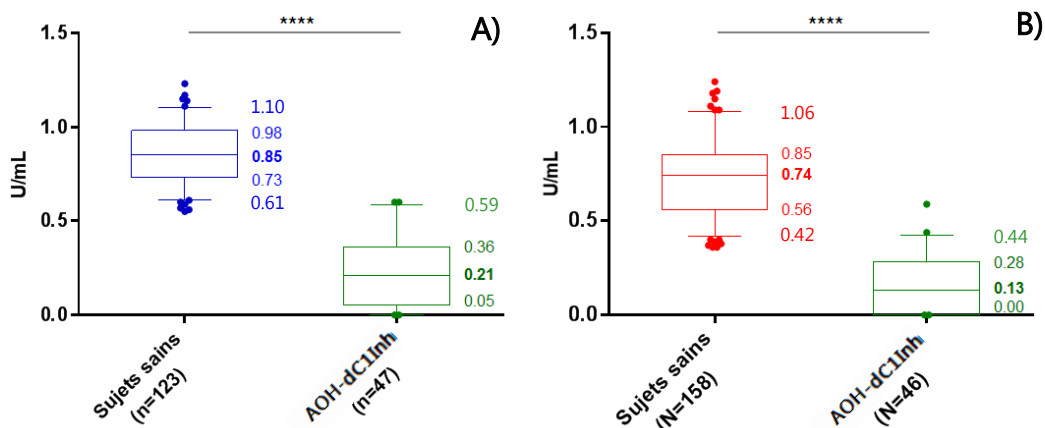


Figure 25 : Distribution de C1 Inhibiteur fonctionnel chez les sujets masculins et féminins et chez les patients atteints d'angioœdème héréditaire par déficit de C1 Inhibiteur : Variation la quantité de C1Inh fonctionnel (UI/mL) chez les sujets sains (bleu/rouge) et chez les patients AOH-dC1Inh (vert) pour les sujets (A) Masculins (n=123 et 47) et (B) Féminins (n=158 et 46).

L'ensemble des sujets masculins montre une répartition inégale du dosage de C1Inh fonctionnel entre les individus sains et les patients AOH-dC1Inh. Les deux médianes sont différentes pour ces deux groupes ; elle est de 0.85 UI/mL pour les sujets sains et de 0.21 UI/mL pour les patients AOH-dC1Inh. En comparant ces deux médianes par le test de Mann Whitney, la  $p$ -valeur inférieure à 0.0001 confirme une différence significative entre ces deux groupes. En dosant C1Inh fonctionnel chez les sujets féminins, une répartition inégale est observée selon le type d'individus. Les deux médianes sont différentes pour ces deux groupes ; elle est de 0.74 UI/mL pour les sujets sains et de 0.13 UI/mL pour les patientes AOH-dC1Inh. En comparant ces deux médianes par le test de Mann Whitney, la  $p$ -valeur inférieure à 0.0001 confirme une différence significative entre ces deux groupes.

La comparaison des sujets sains et des patients AOH-dC1Inh montre une différence significative pour le dosage de C1Inh fonctionnel vis-à-vis de la KK chez les sujets masculins et féminins. Pour les patients, la fonction de C1Inh est relativement faible

(moyenne entre 0.21 et 0.13 UI/ $\mu$ l). Par ce test, la différence de C1Inh fonctionnel permet une bonne discrimination entre les sujets sains et les patients AOH-dC1Inh.

### 5. Performance du test

Afin de déterminer la performance de ce test, certains paramètres statistiques sont calculés entre les différents groupes d'individus. La sensibilité et la spécificité du test sont calculées ainsi que les VPP et les VPN.

Pour déterminer ces paramètres, le dosage de C1Inh fonctionnel des sujets sains est comparé avec les valeurs des patients AOH-dC1Inh. Cette comparaison permet de mettre en place une courbe ROC chez les hommes et chez les femmes (figure 26) (tableau V). Ces courbes ROC permettent également de mettre en place les seuils de référence inférieurs afin de distinguer les sujets sains des patients AOH-dC1Inh.

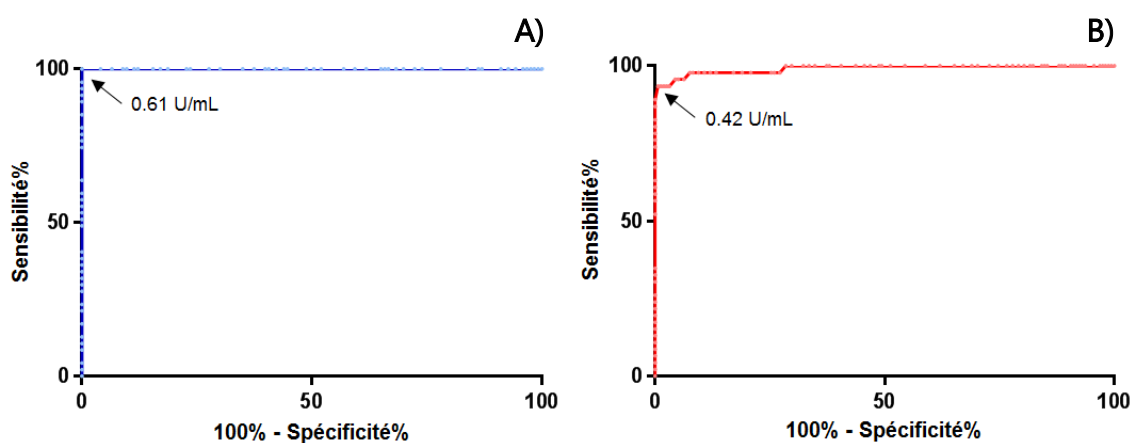


Figure 26 : Courbe *Receiver Operating Characteristic* chez les sujets sains et chez les patients atteints d'angioedème héréditaire par déficit de C1 Inhibiteur : Dosage de la fonction de C1Inh chez les sujets (A) Masculins (n=123/47) et (B) Féminins (n=158/46).

Tableau V : Analyse des courbes *Receiver Operating Characteristic* chez les sujets sains et chez les patients atteints d'angioœdème héréditaire par déficit de C1 Inhibiteur : Détermination de l'aire sous la courbe (AUC), du seuil de référence, de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) pour le test du dosage de la fonction de C1Inh chez des sujets masculin sains (n=123/47) et féminins (n=158/46).

	AUC (95%CI)	Seuil	Sensibilité (95%CI)	Spécificité (95%CI)	VPP	VPN
<b>Sujets masculins</b>	100 (0.97-1.0)	< 0.61	100 (0.92-1.0)	100 (0.97-1.0)	100	100
<b>Sujets féminins</b>	99.0 (0.97-1.0)	< 0.42	93.5 (0.82-0.99)	99.4 (0.97-1.0)	95.6	95.6

La sensibilité et la spécificité du test ont été calculées de manière optimale en sélectionnant un seuil inférieur à 0.61 UI/mL pour les sujets masculins et inférieur à 0.42 UI/mL pour les sujets féminins. Ces seuils permettent de discriminer les sujets sains des patients AO-nC1Inh. Pour ces seuils, la sensibilité et la spécificité sont établies à 100 % pour les sujets masculins et à 94 % et 99 % pour les sujets féminins (respectivement sensibilité et spécificité). Pour les sujets masculins, les VPP et les VPN sont de 100 % et pour les sujets féminins de 96 %.

## 6. Exemples de cas cliniques

### 1. Mutation du gène *SERPING1*

La position des mutations du gène *SERPING1* a une importance stratégique pour le contrôle de la phase contact par C1Inh. Trois mutations différentes répertoriées dans 6 familles sont comparées. Le dosage de C1Inh fonctionnel vis-à-vis de la KK et vis-à-vis de C1s est réalisé en parallèle sur des patients porteurs des mutations I271T, R378C ou L107R du gène *SERPING1* (tableau VI).

Tableau VI : Mutations du gène *SERPING1* et fonction C1 Inhibiteur : Dosage de C1Inh fonctionnel vis-à-vis de la KK et de C1s en fonction du type de mutations affectant le gène *SERPING1*.

Sexe de l'individu	Fonction de C1Inh (UI/mL)		Mutation <i>SERPING1</i>
	KK	C1s	
Masculin	<0.11 (<12.9%)	5.4 (24.3%)	I271T
Masculin	<0.11 (<12.9%)	5.4 (24.3%)	I271T
Féminin	<0.11 (<12.9%)	9.6 (43.2%)	I271T
Féminin	<0.11 (<12.9%)	8.4 (37.8%)	I271T
Féminin	<0.11 (<12.9%)	3.4 (15.3%)	I271T
Masculin	0.23 (27.0%)	15.6 ( <b>70.2%</b> )	R378C
Masculin	0.11 (12.9%)	12.8 ( <b>57.6%</b> )	R378C
Masculin	0.11 (12.9%)	12.4 ( <b>56%</b> )	R378C
Masculin	<0.11 (<12.9%)	8.5 (38.25%)	R378C
Masculin	<0.11 (<12.9%)	4 (18.2%)	R378C
Féminin	0.20 (27.0%)	13.5 ( <b>60.7%</b> )	R378C
Féminin	0.11 (12.9%)	13.2 ( <b>59.4%</b> )	R378C
Féminin	0.14 (18.9%)	11.4 ( <b>51.3%</b> )	R378C
Féminin	<0.11 (<12.9%)	10.9 (49%)	R378C
Féminin	<b>0.45 (60.8%)</b>	5.5 (24.7%)	L107R

En ce qui concerne la première mutation I271T, la fonction de C1Inh est sous la limite de détection du test vis-à-vis de la KK. Lorsque le test vis-à-vis de C1s est utilisé, la fonction de C1Inh est comprise entre 15 % et 43 %. Le même phénomène est identifié pour la deuxième mutation R378C. La fonction de C1Inh est sous la limite de détection du test vis-à-vis de la KK. Lorsque le test vis-à-vis de C1s est utilisé, la fonction est comprise entre 18 % et 70 %. Pour la troisième mutation L107R les résultats ne sont pas concordants. La fonction de C1Inh est de 61 % vis-à-vis de la KK et 25 % vis-à-vis de C1s.

L'analyse des patients porteurs de différentes mutations sur le gène *SERPING1* démontre que le taux de C1Inh fonctionnel est calculé différemment s'il est mesuré vis-à-vis de la KK ou de C1s. Ces résultats peuvent sous-entendre que C1Inh n'a pas le même effet inhibiteur vis-à-vis de la KK ou de C1s et que les différentes mutations peuvent affecter l'inhibition de l'une ou l'autre des protéines cibles.

## 2. Effet de traitements œstroprogestatifs

Chez les sujets féminins, il a été démontré que la prise de traitements OP augmente les risques de crises d'AO (Giard et al., 2012 ; Gompel, 2015). Pour vérifier l'effet du traitement OP sur la fonction de C1Inh, deux prélèvements sanguins sont réalisés chez des femmes AOHH-dC1Inh. Le premier prélèvement est réalisé pendant le traitement OP (n = 23) et le deuxième est réalisé quelques mois après l'arrêt du traitement (n = 16) (figure 27).

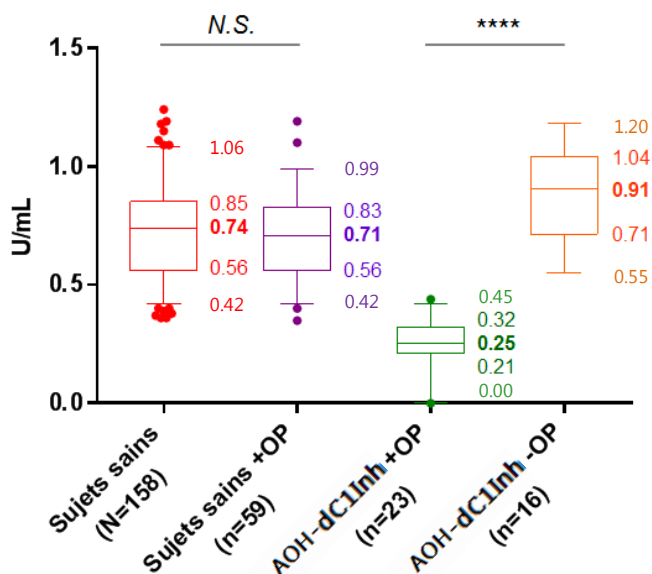


Figure 27 : Distribution de C1 Inhibiteur fonctionnel chez les sujets féminins sains et chez les patientes atteintes d'angioœdème héréditaire par déficit de C1 Inhibiteur, avec ou sans traitement œstroprogestatif : Quantité de C1Inh fonctionnel (UI/mL) chez les sujets sains avec (n=59) (violet) ou sans (n=158) (rouge) traitement OP ainsi que chez des patientes AOHH-dC1Inh avec (n=23) (vert) ou sans (n=16) (orange) traitement OP.

La prise de traitements OP sur les femmes saines (n = 59) entraîne une légère différence du dosage de C1Inh fonctionnel. Comme vu précédemment, les femmes saines sans traitement OP ont un taux de C1Inh fonctionnel réparti entre 0.42 et 1.06 UI/mL (percentiles 5 et 95 %). Pour les femmes saines sous traitements OP, le taux de C1Inh fonctionnel varie entre 0.42 et 0.99 UI/mL. En comparant les deux médianes, 0.74 et 0.71 UI/mL (respectivement –OP et +OP), par le test de Mann Whitney, la *p*-valeur de 0.590 ne permet pas de différencier ces deux groupes. Sur les femmes saines, la prise de traitement OP n'entraîne pas de modification significative sur la quantité de C1Inh fonctionnel.



Pour les patientes AOH-dC1Inh sous traitement OP (n = 23), le taux de C1Inh fonctionnel varie entre 0 et 0.45 UI/mL pour une médiane de 0.25 UI/mL. Ces valeurs basses sont inférieures au seuil de référence mis au point précédemment (0.42 UI/mL), ce qui confirme l'état pathologique de ces patientes. Lors de l'arrêt du traitement OP chez ces patientes, une variation importante du dosage de C1Inh fonctionnel est mesurée ; il passe de 0.25 à 0.91 UI/mL ( $p$ -valeur de 0.0001 d'après le test de Wilcoxon). Pour ces patientes AO-nC1Inh, la prise de traitement OP affecte la quantité de C1Inh fonctionnel. Toutefois, le sevrage du traitement OP permet de ramener les valeurs de C1Inh fonctionnel supérieur au seuil des valeurs normales.

## 7. Conclusion

La mise en place de ce test permet de diagnostiquer les patients souffrant d'AOH-dC1Inh grâce à un dosage de C1Inh fonctionnel plasmatique. Les limites des valeurs normales sont fixées à 0.61 UI/mL pour les sujets masculins et à 0.42 UI/mL pour les sujets féminins. Ces limites permettent d'établir un test d'une sensibilité supérieur à 94 % et d'une sensibilité supérieure à 99 %. Ce test de diagnostic constitue un nouvel outil de diagnostic pour les patients souffrant d'AOH-dC1Inh. Cette technique, rapide à mettre en œuvre permet le dosage de C1Inh fonctionnel, de manière plus sûre pour les patients déficitaires en C1Inh. La fonction de C1Inh est un paramètre essentiel à déterminer lors de l'administration des traitements en cours de crises.

Des études supplémentaires ont permis de mettre en évidence une diminution de C1Inh fonctionnel lors de la prise de traitement OP. Ces études ont également démontré que le sevrage du traitements OP permet de rétablir un taux normal de C1Inh fonctionnel.

## II. Déglycosylation de C1 Inhibiteur et impact sur sa fonction inhibitrice

C1Inh est une protéine de 105 kDa fortement glycosylée. Cette protéine est composée de deux domaines : Le domaine Serpine de 71 kDa et le domaine non-Serpine, domaine *N*-terminal de 34 kDa. C1Inh est formé d'un squelette polypeptidique constitué de 478 acides aminés, 6 *N*-glycosylations (en bleu) (situées sur les acides aminés Asparagine<sup>3</sup>, Asn<sup>47</sup>, Asn<sup>59</sup>, Asn<sup>216</sup>, Asn<sup>231</sup> et Asn<sup>330</sup>) et 14 *O*-glycosylations (en rose) (sur les acides aminés Serine<sup>42</sup> et Thréonine<sup>26</sup>, Thr<sup>49</sup>, Thr<sup>61</sup>, Thr<sup>66</sup>, Thr<sup>70</sup> et Thr<sup>74</sup>) (figure 28). Ces 20 polysaccharides, majoritairement liés au niveau du domaine *N*-terminal, apportent une teneur en glucides d'environ 40 % à la protéine (Koles et al., 2004) (Beinrohr et al., 2007).

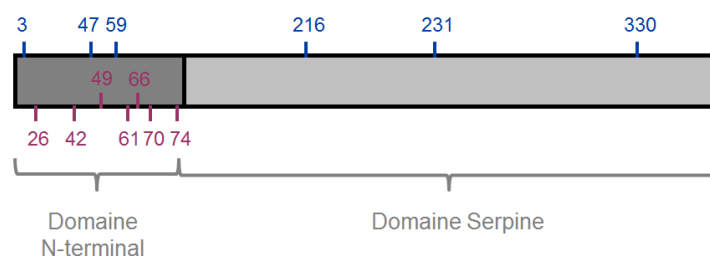


Figure 28 : Répartition des glycosylations sur la protéine C1 Inhibiteur : Position des 6 *N*-glycosylations (en bleu) réparties sur les deux domaines de C1Inh et des 14 *O*-glycosylations (en rose) réparties sur le domaine *N*-terminal.

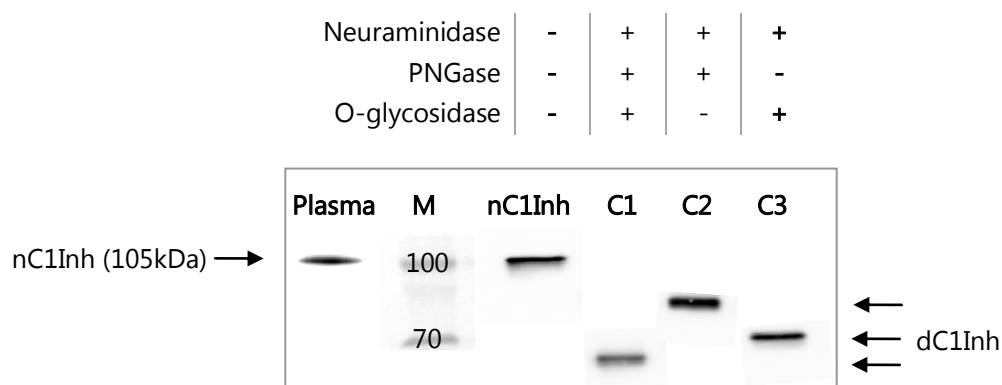
Les polysaccharides liés aux acides aminés de C1Inh peuvent être clivés par différentes enzymes comme le PNGase F ou la *O*-glycosidase. Ces enzymes ont différents modes de fonctionnement et permettent de cliver les polysaccharides *N*-lié (PNGase F) ou *O*-lié (*O*-glycosidase). La Neuraminidase est utilisée pour cliver l'acide sialique empêchant l'hydrolyse des polysaccharides. Le clivage des polysaccharides est réalisé afin de définir s'ils détiennent un rôle dans la fonction de C1Inh.

### 1. Déglycosylation de C1 Inhibiteur

L'effet des polysaccharides constituant le squelette polypeptidique de C1Inh est étudié en déglycosylant C1Inh grâce à différentes combinaisons de trois enzymes : la neuraminidase (10 mU), le PNGase F (1 250 mU) et la *O*-glycosidase (100 mU). C1Inh est incubé à 37°C pendant une nuit avec les combinaisons suivantes :

- Condition 1 (C1) : neuraminidase + PNGase + *O*-glycosidase
- Condition 2 (C2) : neuraminidase + PNGase
- Condition 3 (C3) : neuraminidase + *O*-glycosidase

Un Immuno Blot anti-C1Inh est réalisé pour vérifier le processus de déglycosylation de C1Inh. Cet Immuno Blot permet de différencier le poids moléculaire de C1Inh natif (nC1Inh) (105 kDa) des différentes conditions de déglycosylation de C1Inh (dC1Inh) (figure 29).



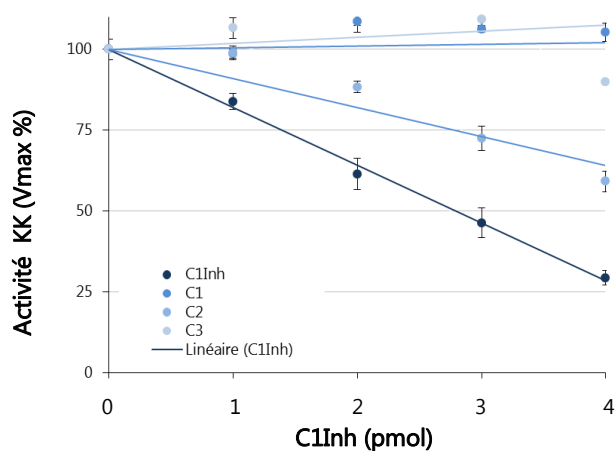
**Figure 29 : Analyse de la déglycosylation de C1 Inhibiteur :** Les différentes espèces de nC1Inh et dC1Inh déglycosylées par les enzymes neuraminidase, PNGase et O-glycosidase (C1) neuraminidase et PNGase (C2) et neuraminidase et O-glycosidase (C3) testées pour évaluer leur masse moléculaire.

Quel que soit l'échantillon déposé, une seule bande de C1Inh est révélée. Le puits contenant nC1Inh montre une bande de 105 kDa, correspondant au même poids moléculaire que l'échantillon de C1Inh plasmatique. Les trois conditions de déglycosylation de C1Inh présentent chacune une bande au poids moléculaire inférieur à celui de nC1Inh (respectivement 65, 90 et 70 kDa). Cette variation de poids moléculaire correspond au clivage des polysaccharides *N*- ou *O*- liés à la protéine par les enzymes de déglycosylation. Pour toutes les conditions de déglycosylation, la forme nC1Inh (105 kDa) n'est plus observée, ce qui indique une déglycosylation complète de C1Inh. Les différentes masses moléculaires (M) sont compatibles avec les données précédemment publiées (Reboul et al., 1987) (Liu et al., 2004).

## 2. Fonction de C1 Inhibiteur vis-à-vis de la kallibréine

Suite à la mise en place du test de diagnostic permettant le dosage de C1Inh par reconstitution de la phase contact *in vitro* (Ghannam et al., 2015), la fonction de C1Inh est évaluée par son contrôle de la KK par méthode amidase.

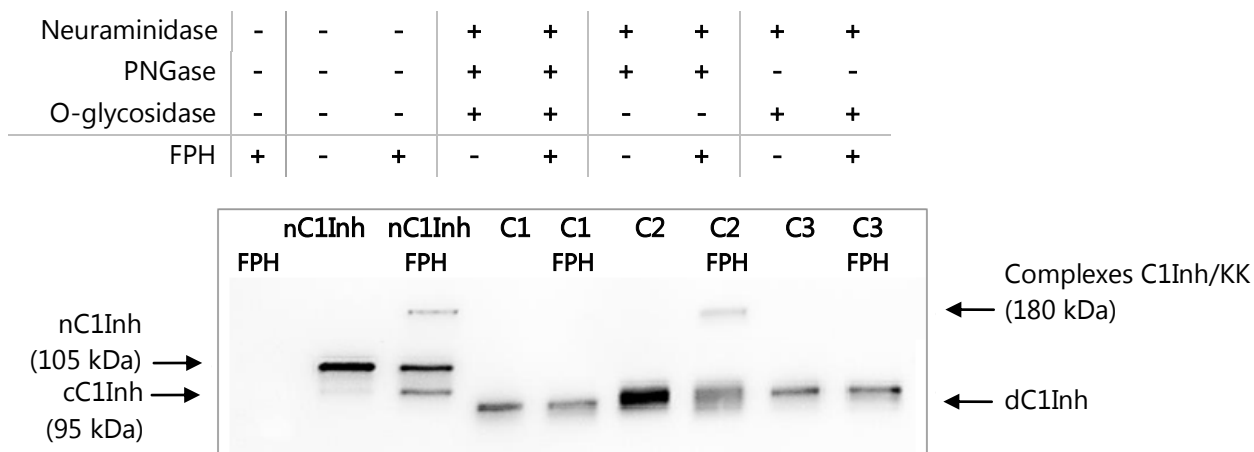
Le test est réalisé avec plusieurs quantités de nC1Inh et de dC1Inh pour évaluer la fonction de C1Inh (figure 30).



**Figure 30 : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur son contrôle de la phase contact :** Les différentes espèces de nC1Inh et dC1Inh déglycosylées par les enzymes neuraminidase, PNGase et O-glycosidase (C1) neuraminidase et PNGase (C2) et neuraminidase et O-glycosidase (C3) testées pour évaluer leur fonction comme contrôle de la phase contact.

Un effet dose-réponse du contrôle de la KK par C1Inh est observé. nC1Inh contrôle l'activité de la KK avec une diminution maximale de l'activité de 70 % en présence de 4 pmol de C1Inh. La déglycosylation par la neuraminidase et le PNGase (C2) contrôle partiellement l'activité de la KK avec une inhibition maximale de 40 %. Cette variation significative permet d'établir une différence entre nC1Inh et dC1Inh ( $p$ -valeur = 0.001 entre nC1Inh et la déglycosylation par la neuraminidase et le PNGase (C2) par le test de Man Whitney). Le contrôle de l'activité de la KK est aboli lorsque C1Inh est déglycosylé par la neuraminidase, le PNGase et la O-glycosidase (C1) ainsi que par la neuraminidase et la O-glycosidase (C3). Ces résultats démontrent que seul nC1Inh et la déglycosylation par la neuraminidase et le PNGase (C2) permettent l'inhibition de la KK. Toutefois, l'inhibition de la KK lors de cette déglycosylation est deux fois plus faible que celle de nC1Inh.

Pour renforcer ces résultats, les composants purifiés de la phase contact (FXIIa, pKK et HK : FPH) sont incubés avec les différentes espèces de C1Inh déglycosylées. Lorsque C1Inh est fonctionnel, des complexes entre C1Inh et la KK sont formés. Ces complexes sont identifiés par Immuno Blot anti-C1Inh (figure 31).



**Figure 31 : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur la formation de complexes avec la kallistéine :** Les différentes espèces de nC1Inh et dC1Inh déglycosylées par les enzymes neuraminidase, PNGase et O-glycosidase (C1) neuraminidase et PNGase (C2) et neuraminidase et O-glycosidase (C3) testées pour évaluer leur formation de complexes avec la KK.

Lorsque nC1Inh est incubé avec les composants de la phase contact, une bande de 180 kDa est observée. Cette bande correspond à la formation de complexes inactifs entre C1Inh et la KK. Une bande de 95 kDa est également observée. Cette bande correspond à C1Inh clivé (cC1Inh), issue de la fixation de C1Inh avec la KK. Lorsque C1Inh est déglycosylé par la neuraminidase, le PNGase et la O-glycosidase (C1) ainsi que par la neuraminidase et la O-glycosidase (C3) aucune bande de 180 kDa n'est observée. Ces formes déglycosylées de C1Inh ne sont plus capables de former de complexes avec la KK. Seule la déglycosylation par la neuraminidase et le PNGase (C2) permet la formation de complexes. Cette forme reste fonctionnelle vis-à-vis de la KK. Pour toutes les conditions, une bande de même poids moléculaire que C1Inh seul est également observée. Cette bande représente C1Inh ne formant pas de complexe avec la KK.

Chaque bande est ensuite quantifiée par densitométrie grâce au ChemiDoc™ XRS<sup>+</sup> System with Image Lab™ Software [Biorad] (méthode semi-quantitative). La quantité de C1Inh par puits est rapportée en pourcentage afin de comparer la quantité de complexes entre C1Inh et la KK et de C1Inh non complexé pour chaque condition (tableau VII).

**Tableau VII : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur la quantification de complexes avec la kallistéine :** Les différentes espèces de nC1Inh et dC1Inh déglycosylées par les enzymes neuraminidase, PNGase et *O*-glycosidase (C1) neuraminidase et PNGase (C2) et neuraminidase et *O*-glycosidase (C3) testées pour évaluer leur formation de complexes avec la KK.

	nC1Inh	C1	C2	C3
Neuraminidase	-	+	+	+
PNGase	-	+	+	-
<i>O</i> -glycosidase	-	+	-	+
Complexes C1Inh/KK	40 %	0 %	10 %	0 %
C1Inh non complexé	60 %	100 %	90 %	100 %

La quantification des bandes par densitométrie montre la formation de 40 % de complexes entre nC1Inh et la KK. Ces complexes traduisent la fixation de C1Inh sur la KK afin de l'inactiver. La déglycosylation par la neuraminidase et le PNGase (C2) permet la formation de 10 % de complexes entre C1Inh et la KK. Cette différence significative permet d'établir une différence entre nC1Inh et dC1Inh ( $p$ -valeur = 0.0013 entre nC1Inh et la déglycosylation par la neuraminidase et le PNGase (C2) par le test de Man Whitney). Lorsque C1Inh est déglycosylé par la neuraminidase, le PNGase et la *O*-glycosidase (C1) ainsi que par la neuraminidase et la *O*-glycosidase (C3) aucun complexe n'est formé. Ces résultats démontrent que seul nC1Inh et la déglycosylation par la neuraminidase et le PNGase (C2) permettent la formation de complexes entre C1Inh et la KK. Toutefois, la quantité de complexes formés lors de cette déglycosylation est moins importante que celle de nC1Inh.

Les résultats obtenus par activité amidase sont corrélés avec les résultats obtenus par Immuno Blot. Ces deux techniques ont démontré que seule la déglycosylation par la neuraminidase et le PNGase (C2) reste partiellement fonctionnelle vis-à-vis de la KK, avec un contrôle de 50 % de la KK. Cette déglycosylation entraîne le clivage des polysaccharides *N*-liés à C1Inh. Ces résultats supposent un rôle partiel des polysaccharides *N*-liés pour le contrôle de la KK. Les deux autres conditions de déglycosylation ont une fonction totalement abolie vis-à-vis de la KK. Ces deux conditions de déglycosylation entraînent le clivage des polysaccharides *O*-liés à C1Inh. Ces résultats impliquent un rôle essentiel des polysaccharides *O*-liés pour le contrôle de la KK. Les différents polysaccharides présents sur le domaine *N*-terminal de C1Inh participent activement à l'activité inhibitrice de C1Inh pour le contrôle de la KK.

### 3. Fonction de C1 Inhibiteur vis-à-vis de C1s

La fonction de C1Inh est évaluée par son contrôle de C1s, protéase du complément, par méthode estérase (Drouet et al., 1988).

C1Inh est incubé pendant 15 minutes à 37°C avec un excès de C1s ; des complexes entre C1Inh et C1s se forment dans le milieu réactionnel. Un substrat spécifique de C1s, le BAEe, est ajouté au milieu réactionnel et une cinétique de 10 minutes à 30°C est réalisée par spectrophotométrie à 340 nm. C1s résiduel (non complexé avec C1Inh) clive le substrat BAEe pour libérer le groupement BA. Le groupement BA entraîne la réduction du NAD en NADH, H<sup>+</sup> qui est mesurée par absorbance (figure 32).

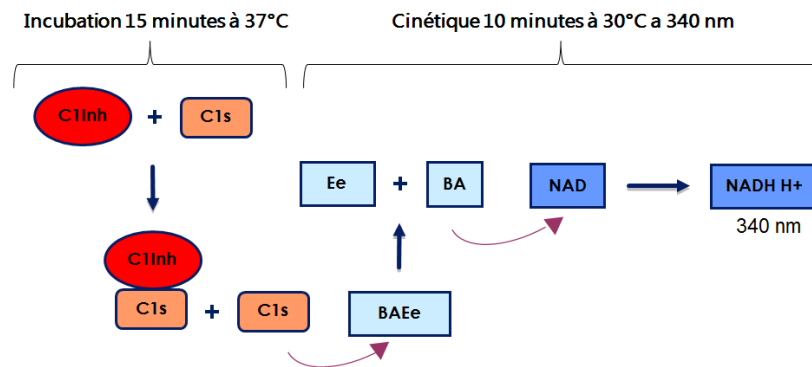
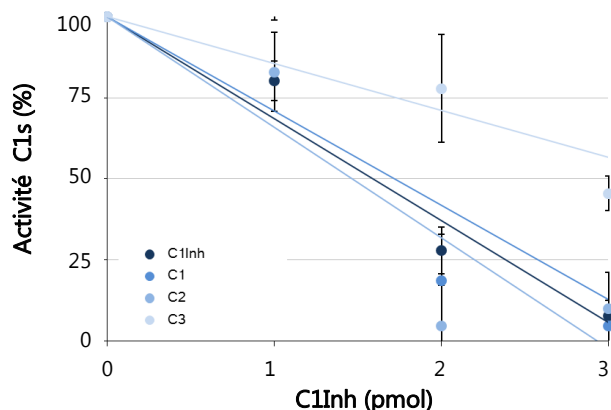


Figure 32 : Dosage de C1 Inhibiteur vis-à-vis de C1s par méthode enzymatique : Formation de complexes entre C1Inh et C1s puis clivage d'un substrat spécifique, le BAEe par C1s résiduel.

Le test est réalisé avec plusieurs quantités de nC1Inh et de dC1Inh pour évaluer la fonction de C1Inh (figure 33).

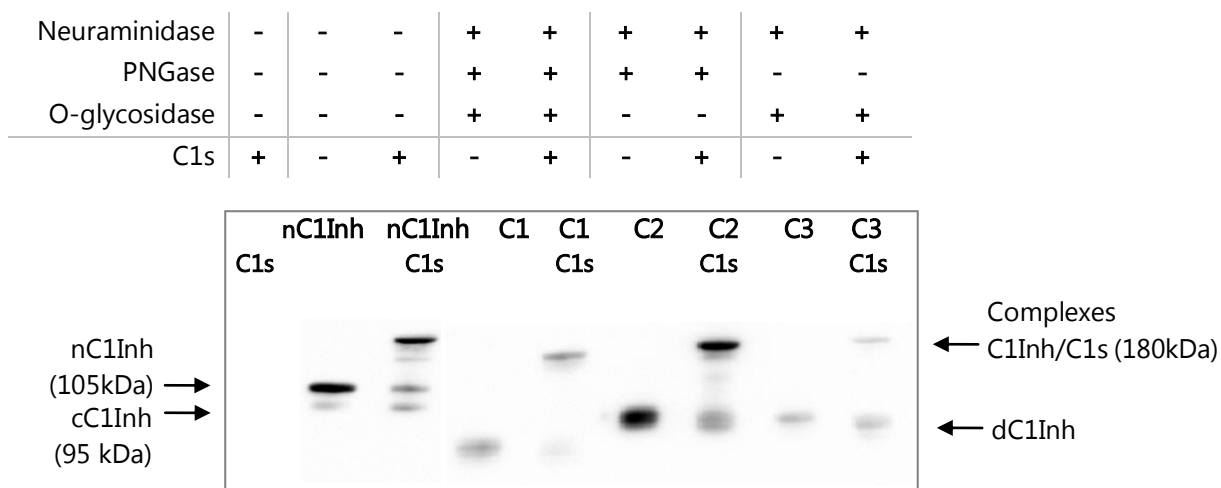


**Figure 33 : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur son contrôle de C1s :** Les différentes espèces de nC1Inh et dC1Inh déglycosylées par les enzymes neuraminidase, PNGase et *O*-glycosidase (C1) neuraminidase et PNGase (C2) et neuraminidase et *O*-glycosidase (C3) testées pour évaluer leur fonction comme contrôle de C1s.

Un effet dose-réponse du contrôle de C1s par C1Inh est observé. nC1Inh contrôle l'activité de C1s avec une diminution maximale de l'activité de 85 % en présence de 3 pmol de C1Inh. La déglycosylation par la neuraminidase, le PNGase et la *O*-glycosidase (C1) ainsi que par la neuraminidase et le PNGase (C2) contrôle l'activité de C1s avec une inhibition similaire à celle de nC1Inh. L'activité de C1s est contrôlée partiellement avec une inhibition maximale de 40 % lorsque C1Inh est déglycosylé par la neuraminidase et la *O*-glycosidase (C3). Cette variation significative permet d'établir une différence entre nC1Inh et dC1Inh ( $p$ -valeur = 0.001 entre nC1Inh et la déglycosylation par la neuraminidase et la *O*-glycosidase (C3) par le test de Man Whitney). Ces résultats démontrent que seuls nC1Inh et la déglycosylation par la neuraminidase et la *O*-glycosidase (C3) permettent l'inhibition de C1s. Toutefois, l'inhibition de C1s lors de la déglycosylation est deux fois plus faible que celle de nC1Inh.

Pour confirmer ces résultats, la protéase C1s est incubée avec les différentes espèces de C1Inh déglycosylées. Lorsque C1Inh est fonctionnel, des complexes entre C1Inh et C1s sont formés. Ces complexes sont identifiés par Immuno Blot anti-C1Inh (figure 34).





**Figure 34 : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur la formation de complexes avec C1s :** Les différentes espèces de nC1Inh et dC1Inh déglycosylées par les enzymes neuraminidase, PNGase et O-glycosidase (C1) neuraminidase et PNGase (C2) et neuraminidase et O-glycosidase (C3) testées pour évaluer leur formation de complexes avec C1s.

Lorsque nC1Inh est incubé avec la protéase C1s, une bande de 180 kDa est observée. Cette bande correspond à la formation de complexes inactifs entre C1Inh et C1s. Une bande de 95 kDa est également observée. Cette bande correspond à C1Inh clivé (cC1Inh), issu de la fixation de C1Inh avec C1s. Quel que soit le type de déglycosylation de C1Inh, la formation de complexes entre C1Inh et C1s est constatée. Ces formes restent fonctionnelles vis-à-vis de C1s. Pour toutes les conditions, une bande de même poids moléculaire que C1Inh seul est également observée. Cette bande représente C1Inh ne formant pas de complexe avec C1s.

Chaque bande est ensuite quantifiée par densitométrie grâce au ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software [Biorad] (méthode semi-quantitative). La quantité de C1Inh par puits est rapportée en pourcentage afin de comparer la quantité de complexes entre C1Inh et C1s et de C1Inh non complexé pour chaque condition (tableau VIII).

**Tableau VIII : Impact de la déglycosylation de C1 Inhibiteur sur la quantification de complexes avec C1s:** Les différentes espèces de nC1Inh et dC1Inh déglycosylées par les enzymes neuraminidase, PNGase et *O*-glycosidase (C1) neuraminidase et PNGase (C2) et neuraminidase et *O*-glycosidase (C3) testées pour évaluer leur formation de complexes avec C1s.

	nC1Inh	C1	C2	C3
Neuraminidase	-	+	+	+
PNGase	-	+	+	-
<i>O</i> -glycosidase	-	+	-	+
Complexes C1Inh/KK	55 %	65 %	35 %	70 %
C1Inh non complexé	45 %	35 %	65 %	30 %

La quantification des bandes par densitométrie montre la formation de 55 % de complexes entre nC1Inh et C1s. Ces complexes traduisent la fixation de C1Inh sur C1s afin de l'inactiver. Les trois conditions de déglycosylation permettent la formation de complexes entre C1Inh et C1s de 70, 65 et 35 % respectivement. Ces résultats démontrent que les différentes espèces de C1Inh déglycosylées permettent la formation de complexes entre C1Inh et C1s. Toutefois, la quantité de complexes formés lors de la déglycosylation par la neuraminidase et la *O*-glycosidase (C3) est moins importante que celle de nC1Inh.

Les résultats obtenus par activité estérase sont corrélés avec ceux obtenus par Immuno Blot. Ces deux techniques ont démontré que les différentes espèces de C1Inh déglycosylées restent fonctionnelles vis-à-vis de C1s. La déglycosylation par la neuraminidase et la *O*-glycosidase (C3) entraîne une diminution de la fonction de C1Inh, avec un contrôle de 50 % de C1s. Cette condition de déglycosylation entraîne le clivage des polysaccharides *O*-liés à C1Inh. Ces résultats supposent un rôle partiel des polysaccharides *O*-liés pour le contrôle de C1s. Lorsque C1Inh est déglycosylé par la neuraminidase et le PNGase (C2), la fonction de C1Inh n'est pas modifiée. Cette condition de déglycosylation entraîne le clivage des polysaccharides *N*-liés à C1Inh. Ces résultats impliquent que les polysaccharides *N*-liés ne participent pas au contrôle de C1s par C1Inh.

#### 4. Fonction de C1 Inhibiteur et des anticorps anti-C1 Inhibiteur

De rares cas d'AOA, non héréditaire, sont principalement associés à des troubles lymphoprolifératif ou auto-immuns. Des anticorps anti-C1Inh ont été

détectés dans environ 40% de ces patients. Dans les rares cas où les échantillons ont été testés, le contrôle de la phase de contact par C1Inh a été trouvé diminué dans les échantillons de plasma de patients AOA associés avec des anti-C1Inh. La question est de savoir si les polysaccharides pourraient être une cible pour les auto-anticorps anti-C1Inh plasmatique. La liaison de C1Inh sur les auto-anticorps plasmatique, de types IgG, IgA ou IgM, a été testée par ELISA. Pour réaliser ce test, une plaque de 96 puits est préalablement saturée avec nC1Inh ou dC1Inh, puis est incubée en présence de plasma de différents patients AOA (n=9). La présence et l'identification de ces auto-anticorps plasmatiques ont préalablement été mises en évidence par le CHU de Grenoble par la technique ELISA. Les auto-anticorps plasmatiques anti-C1Inh se fixent sur C1Inh recouverts dans les puits et un anticorps secondaire anti- IgG, IgA ou IgM humain couplé à la HRP est ajouté. L'absorbance de la plaque 96 puits est mesurée pour détecter la quantité d'auto-anticorps fixés (figure 35).

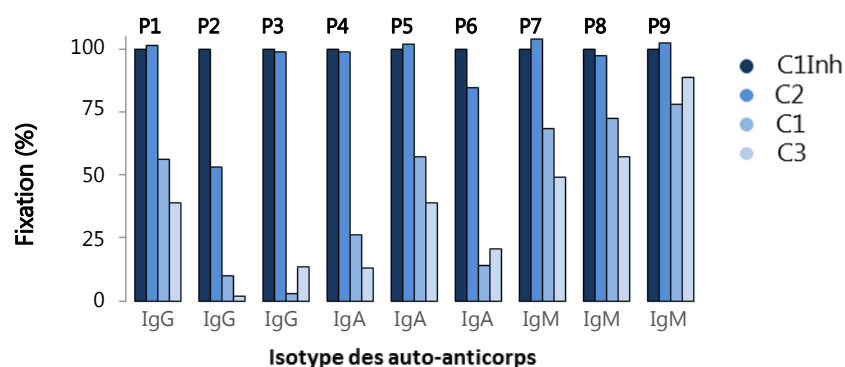


Figure 35: Les polysaccharides comme cible des auto-anticorps anti-C1 Inhibiteur : Les différentes espèces de nC1Inh et dC1Inh déglycosylées par les enzymes neuraminidase, PNGase et O-glycosidase (C1) neuraminidase et PNGase (C2) et neuraminidase et O-glycosidase (C3) testées sur la quantification des auto-anticorps anti-C1Inh plasmatique de type IgG (n=3), IgA (n=3) ou IgM (n=3) par ELISA.

Pour nC1Inh, la fixation des auto-anticorps anti-C1Inh est la plus importante. Un maximum d'auto-anticorps anti-C1Inh plasmatique (de type IgG, IgA ou IgM) se fixent à nC1Inh. Le taux de fixation à nC1Inh est considéré comme 100%. En recouvrant les puits avec les différentes espèces de dC1Inh, la fixation des auto-anticorps anti-C1Inh varie selon la déglycosylation. Pour la déglycosylation par la neuraminidase et le PNGase (C2), la fixation des auto-anticorps anti-C1Inh est proche de 100 %, quel que soit l'isotype des auto-anticorps plasmatiques. Seul les anticorps du patient 2 (P2) montrent seulement une fixation de 50 % par rapport à nC1Inh.

Pour la déglycosylation par la neuraminidase, le PNGase et la *O*-glycosidase (C1) ainsi que par la neuraminidase et la *O*-glycosidase (C3), les profils sont assez semblables ; la fixation des auto-anticorps anti-C1Inh de type IgG ou IgA sur dC1Inh est d'environ 25 % par rapport à nC1Inh. Les auto-anticorps anti-C1Inh de type IgM permettent une fixation à dC1Inh d'environ 70 %. La liaison des anticorps a été fortement diminuée suite à la digestion de C1Inh par la neuraminidase, la PNGase et la *O*-glycosidase, en particulier avec la *O*-glycosidase. Cette baisse est indépendante de l'isotype des auto-anticorps.

L'impact des auto-anticorps sur le contrôle de la phase contact par C1Inh est analysé. Les plasmas des patients testés ci-dessus ainsi qu'un plasma contrôle de patient sain, sont incubés avec différentes concentrations de C1Inh. La fonction de C1Inh est mesurée par activité amidase lors de l'activation de la phase contact *in vitro* (figure 36).

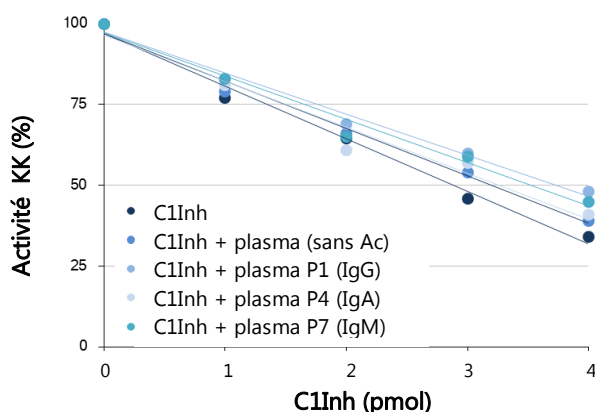


Figure 36 : Fonction de C1 Inhibiteur en présence d'auto-anticorps anti-C1 Inhibiteur : Impact d'auto-anticorps anti-C1Inh plasmatique (isotype de type IgG, IgA ou IgM) sur la fonction de C1Inh vis-à-vis de la KK.

Quel que soit le type de plasma ajouté au milieu réactionnel, le contrôle de la KK par C1Inh est similaire. L'inhibition de la KK par 4 pmol de C1Inh, avec ou sans auto-anticorps anti-C1Inh, est de 70 %. La présence des auto-anticorps anti-C1Inh de type IgG, IgA ou IgM ne modifie pas la fonction de C1Inh. Indépendamment de l'isotype des immunoglobulines, la fonction de C1Inh n'a pas été affectée par la présence des auto-anticorps.

Ces résultats indiquent que les polysaccharides représentent une cible pour les auto-anticorps qui ont été testés, mais les auto-anticorps n'affectent pas directement la fonction de C1Inh.

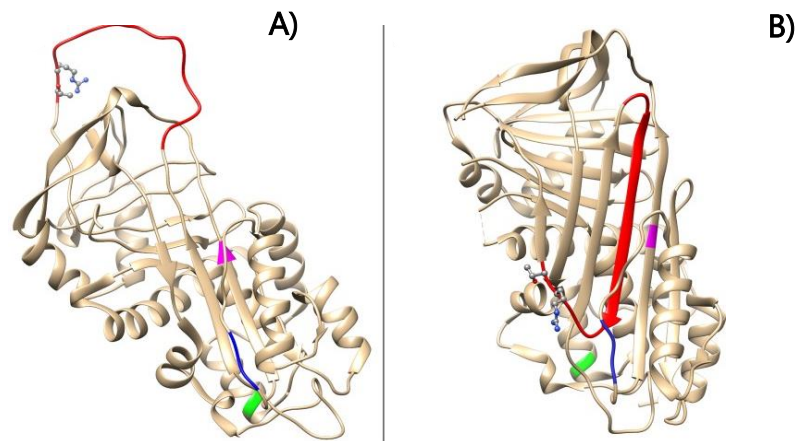
## 5. Conclusion

Ces études ont permis de mettre en évidence un rôle de la glycosylation de C1Inh. Lorsque C1Inh est déglycosylé par le PNGase (clivage des polysaccharides *N*-liés), C1Inh perd 50 % de sa fonction vis-à-vis de la KK mais reste fonctionnel vis-à-vis de C1s. Lorsque C1Inh est déglycosylé par la *O*-glycosidase (clivage des polysaccharides *O*-liés), C1Inh perd la totalité de sa fonction vis-à-vis de la KK et seulement 40 % vis-à-vis de C1s. Ces résultats démontrent un rôle essentiel des polysaccharides *O*-liés et un rôle partiel des polysaccharides *N*-liés dans le contrôle de la phase contact par C1Inh. Le rôle des polysaccharides est variable selon la protéine ciblée. Ces polysaccharides jouent également un rôle dans la reconnaissance antigénique de C1Inh. Ils représentent une cible pour les auto-anticorps anti-C1Inh.

### III. Mutations du gène *SERPING1* et identification des polymères de C1 Inhibiteur

Les AOH-dC1Inh sont des maladies génétiques induites par des mutations affectant le gène *SERPING1*. Ces mutations sont caractéristiques de l'AO du type I (défaut quantitatif de C1Inh), du type II (défaut qualitatif de C1Inh) et du type intermédiaire I/II (expression partielle de l'allèle anormal de C1Inh). Ces mutations ont pour conséquence une diminution du contrôle de la phase contact qui induit une augmentation de la libération de BK. Après synthèse, C1Inh présente une conformation métastable à haute énergie, qui est caractérisée par une boucle de centre réactif (RCL) saillante au domaine de la Serpine. La séquence d'acides aminés de la RCL sert de région d'amorce pour certaines protéases. Quand une protéase reconnaît et clive la liaison P1-P1' de la RCL, le domaine RCL s'insère comme un feuillet bêta supplémentaire de C1Inh avec la protéase. Après clivage, C1Inh obtient une conformation stable à faible énergie ; la protéase est inhibée d'une façon irréversible (Davis et al., 2010).

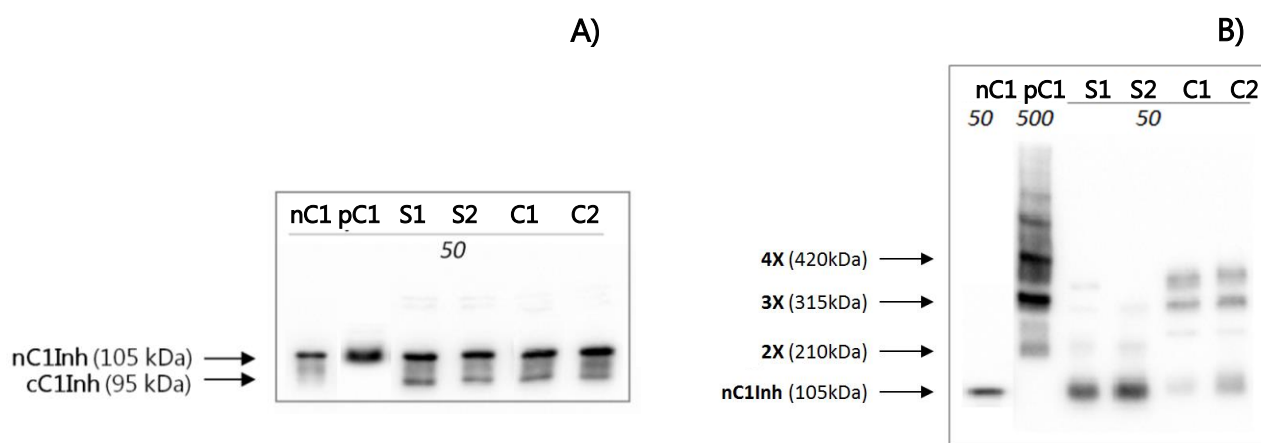
Les formes latentes, non fonctionnelles de C1Inh sont caractérisées par un repliement de la RCL en feuillet- $\beta$  et sont incapables d'inhiber leurs protéases cibles. Ces formes mal repliées ont la capacité de former des agrégats entre plusieurs molécules de C1Inh. Ces agrégats sont appelés des polymères de C1Inh (pC1Inh) et regroupent différentes formes de C1Inh. La présence des polymères dans le plasma des patients AOH-dC1Inh a été démontrée par l'équipe de Madsen en 2014. Cette démonstration est restreinte sur 6 individus porteurs des 3 mutations : p.Ile271Thr, p.Ser258\_Pro260del et p.Thr167Asn (figure 27) (Madsen et al., 2014). Il a été montré par l'équipe de Madsen en 2015 que ces pC1Inh transfèrent la propriété de C1Inh de contrôle en activateur de de la phase contact (Madsen et al., 2015). Vu l'importance de ce phénomène, une étude est réalisée pour élargir la recherche de ces pC1Inh chez les patients AOH-dC1Inh.



**Figure 37 : Localisation structurelle des mutations du gène *SERPING1* :** (A) Modèle de C1Inh fonctionnel et (B) Model de C1Inh non fonctionnel. Le RCL (rouge) et la liaison P1-P1' (Arg444-Thr445). Emplacements des trois mutations : Ile271Thr (magenta), Ser258\_Pro260del (bleu) et Thr167Asn (vert).

### 1. Détection des polymères de C1Inh plasmatique

L'identification des différentes formes pC1Inh présentes dans le plasma de patients AOH-dC1Inh est mise en évidence par un Immuno Blot anti-C1Inh. Des patients porteurs de différentes mutations du gène *SERPING1* sont investigués afin de déterminer si la présence de pC1Inh plasmatique peut être liée à une mutation. Pour comparer au mieux C1Inh présent dans les différents plasmas, la concentration de C1Inh est calculée pour chaque patient et permet de déposer 50 ng de C1Inh par puits. Le plasma de différents sujets sains (S1 et S2) et de différents patients atteint d'AOH-dC1Inh (C1 et C2) sont comparés à un contrôle de C1Inh purifié (nC1) et un contrôle de polymères (pC1) (figure 38).



**Figure 38 : Détection de polymères de C1 Inhibiteur plasmatique par Immuno Blot :** (A) Immuno Blot dénaturant et (B) Immuno Blot natif. Comparaison de plasmas de sujets sains (S1 et S2) et de patients AOH-dC1Inh (C1 et C2) avec un contrôle de C1Inh natif (nC1) et un contrôle de polymère (pC1).

L'analyse de C1Inh par Immuno Blot dénaturant, démontre une unique bande de 105 kDa pour nC1Inh et pour les pC1Inh. Quel que soit le plasma déposé (S ou C), une bande de 105 kDa, correspondant à nC1Inh est observée ainsi qu'une bande de cC1Inh à 95 kDa. La bande de 95 kDa est issue du clivage de C1Inh après fixation sur sa protéase. Aucune bande de pC1Inh n'est observée pour les sujets sains ou pour les patients. Les pC1Inh sont formés de plusieurs molécules de C1Inh liées entre elles par des liaisons faibles. En présence de SDS, les liaisons faibles reliant les différentes molécules de C1Inh sont rompues et les pC1Inh ne sont plus observable par Immuno Blot dénaturant. Pour pouvoir observer les pC1Inh plasmatiques, un Immuno Blot en conditions natives est mis au point.

Sur l'Immuno Blot natif présenté en figure 38 B, les contrôles de C1Inh purifiés apparaissent sous forme d'une unique bande de faible poids moléculaire (105 kDa) pour nC1Inh. Pour la piste pC1Inh, 3 bandes différentes sont présentes et correspondent aux polymères entre deux (2X), trois (3X) ou quatre (4X) molécules de C1Inh. En déposant une quantité de plasma contenant 50 ng de C1Inh, différentes bandes sont observées selon le type de plasma. Pour les plasmas de sujets sains (S), une bande unique est observée au même poids moléculaire que le contrôle nC1Inh. Ces deux sujets sains possèdent uniquement la protéine C1Inh sous forme native. Pour les deux patients (C1 et C2), dont la présence de polymères a été démontrée par l'équipe de Madsen, différents polymères sont identifiés sur le gel. Ces patients possèdent les mutations : p.Ile271Thr (C1) et p.Ser258\_Pro260del (C2). Deux bandes correspondant à 3X et 4X sont identifiées. Une bande de nC1Inh est également



observée, mais son intensité est largement inférieure à celle présente chez les sujets sains. Ces observations sont en accord avec celles de Madsen publiées en 2014.

## 2. Examen de différentes mutations du gène *SERPING1*

Pour déterminer si la présence de pC1Inh est spécifique à certaines mutations du gène *SERPING1* ou d'un type d'AOH-dC1Inh, différents patients AOH-dC1Inh (n=38) dont les mutations ont été caractérisées par le CHU de Grenoble sont analysés par Immuno Blot natif (figure 39) (tableau X).

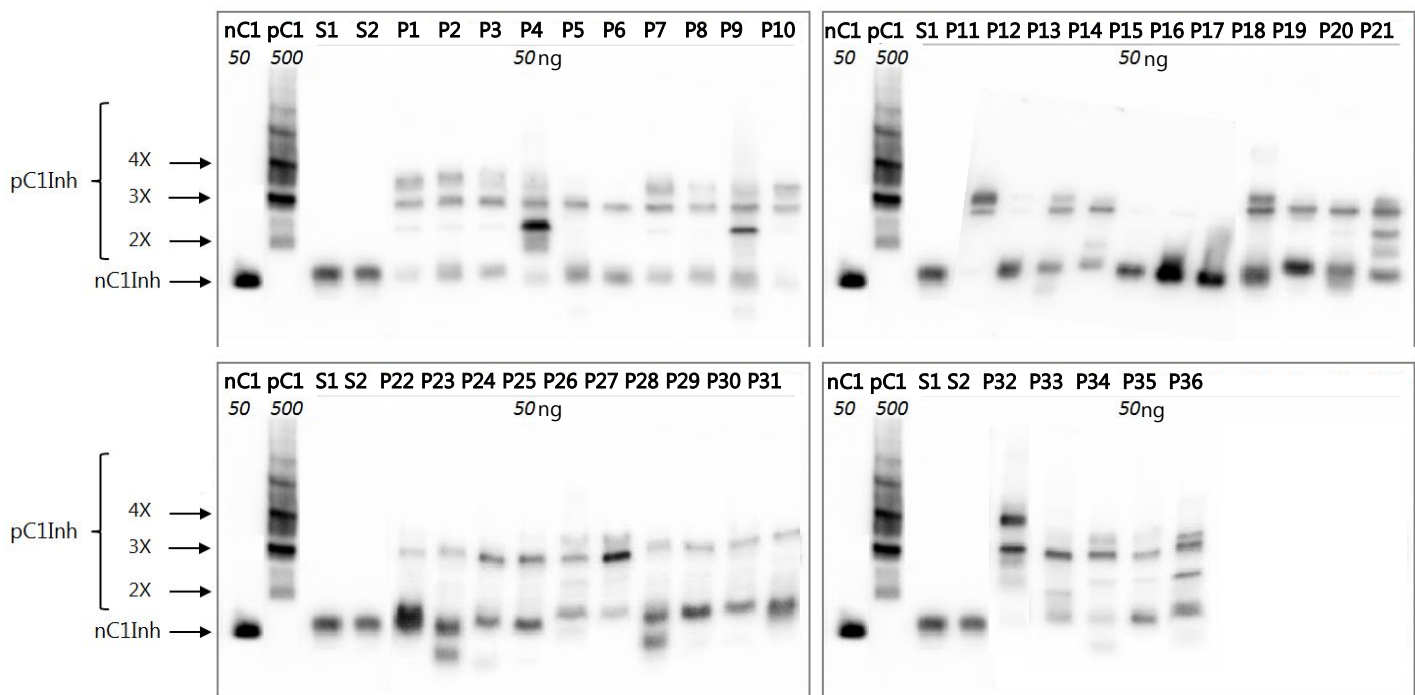


Figure 39 : Détection des polymères de C1 Inhibiteur chez les patients porteurs de mutations du gène *SERPING1* : Comparaison de plasmas de sujets sains (S1 et S2) et de patients AOH-dC1Inh (P1 à P36) possédant différentes mutations affectant le gène *SERPING1*.

Tableau X : Présence des polymères de C1 Inhibiteur chez les patients porteurs de mutations du gène *SERPING1*: Détection par Immuno Blot natif de pC1Inh plasmatique en fonction de différentes mutations affectant le gène *SERPING1*.

n°	Type	Mutation	Position	C1Inh (µg/mL)	pC1Inh (2X)	pC1Inh (3X)	pC1Inh (4X)
P14	I	c.51+3A>G	Intron 2	117	-	Oui	-
C2	I	Ser258_Pro260del	-	-	-	Oui	Oui
P1	I	Leu107Arg	Exon 3	81	-	Oui	Oui
P2	I	Ala134Pro	Exon 3	77	-	Oui	Oui
P4	I	Leu131Pro	Exon 3	41	Oui	Oui	-
P19	I/II	Ala153Pro	Exon 3	124	-	Oui	-
P33	I/II	Thr167Asn	Exon 4	74	-	Oui	-
P23	I/II	Leu175Pro	Exon 4	143	-	Oui	-
P28	I/II	Leu175Pro	Exon 4	144	-	Oui	-
P13	I	Leu175Val	Exon 4	112	-	Oui	-
P5	I	Ser200Pro	Exon 4	92	-	Oui	-
P12	II	Gln201Pro	Exon 4	289	-	-	-
P36	I/II	His204Asp	Exon 4	97	Oui	Oui	-
P25	I/II	Asn250del	Exon 5	70	-	Oui	-
P30	I/II	Asn250del	Exon 5	73	-	Oui	-
P35	I/II	Ser258Pro	Exon 5	84	-	Oui	-
P7	I	Gln316Stop	Exon 5	66	-	Oui	Oui
P10	I	Arg219Pro	Exon 5	73	-	Oui	Oui
C1	I	Ile271Thr	Exon 6	-	-	Oui	Oui
P18	I/II	Phe291Ser	Exon 6	39	-	Oui	Oui
P24	I/II	Phe291Ser	Exon 6	58	-	Oui	-
P22	I/II	Ser296Pro	Exon 6	116	-	Oui	-
P26	I/II	Val300Glu	Exon 6	31	-	Oui	-
P31	I/II	Met303del	Exon 6	110	-	Oui	-
P32	I/II	Met303Val	Exon 6	97	Oui	Oui	-
P21	I/II	His312Asp	Exon 6	66	Oui	Oui	-
P9	I/II	Pro377Ser	Exon 7	75	Oui	Oui	-
P34	I	Pro377Ala	Exon 7	80	-	Oui	-
P29	I/II	Met387Thr	Exon 7	145	-	Oui	-
P11	I	Del exon 8	Exon 8	32	-	Oui	Oui
P3	I	Thr423Arg	Exon 8	149	-	Oui	-
P27	I/II	Leu425Pro	Exon 8	108	-	Oui	-
P8	I	Pro454Leu	Exon 8	41	-	Oui	-
P15	II	Arg444Cys	Exon 8	785	-	-	-

P16	II	Arg444His	Exon 8	402	-	-	-
P17	II	Arg444Gly	Exon 8	483	-	-	-
P20	I	Arg472stop	Exon 8	45	-	Oui	-
P6	I	Arg472Leu	Exon 8	42	-	Oui	-

Chez les sujets sains, la concentration de C1Inh plasmatique varie entre 210 et 345 µg/mL. La concentration de C1Inh plasmatique est mesurée chez l'ensemble des patients. Les patients de type I ou I/II ont une concentration de C1Inh inférieure au seuil des valeurs normales (210 µg/mL). Les mutations de types I affectent la quantité de C1Inh synthétisé. Pour les quatre patients de type II, la concentration de C1Inh est normale ou supérieure aux valeurs normales, mais un déficit fonctionnel de C1Inh a été mis en évidence. Les mutations de type II affectent uniquement la fonction de C1Inh.

Ces résultats montrent que la formation de polymères est un phénomène assez répandu notamment chez les patients de type I ou de type intermédiaire I/II. Parmi les 38 patients analysés par Immuno Blot, la plupart d'entre eux possèdent des polymères contenant trois (3X) molécules de C1Inh. La présence de ces pC1Inh n'est pas spécifique de la mutation du gène *SERPING1*, ni de sa position au niveau des différents exons et introns. La présence de pC1Inh contenant deux (2X) ou quatre (4X) molécules de C1Inh est un phénomène beaucoup plus rare que les pC1Inh 3X, puisqu'ils sont présents chez seulement 20 % des patients analysés. Chez les patients de type II, aucun pC1Inh n'a été mis en évidence et C1Inh est présent uniquement sous la forme nC1Inh.

### 3. Conclusion

La présence de pC1Inh plasmatique a été démontrée chez un grand nombre de patients. Sur les 38 patients AOH-dC1Inh analysés (16 type I, 4 type II et 18 type I/II), l'ensemble des patients de type I et I/II possèdent des pC1Inh (2X, 3X et/ou 4X). Aucun lien n'a pu être établi entre la position des différentes mutations et la présence de pC1Inh. Chez les sujets possédant des pC1Inh, une suractivation de la phase contact est constatée avec une augmentation de l'activité kininogénase (FXIIa et KK). La phase contact n'est plus contrôlée par C1Inh et elle est suractivée par une auto-activation du FXII. La faible quantité de C1Inh fonctionnel synthétisé est piégée sous forme de polymères, ce qui les rend inactifs ; le FXIIa et la KK ne sont plus contrôlés. L'activation de la phase contact est également augmentée par l'activation du FXII en

FXIIa *via* les pC1Inh, ce qui entraîne une augmentation de l'activation de la KK. La polymérisation de C1Inh transforme cette molécule de contrôle en un activateur de la phase contact (Madsen et al., 2015).

## DISCUSSION

### Partie 1 : L'activation de la phase contact

La phase contact est une cascade enzymatique complexe. Initiée par l'activation du proenzyme FXII en FXIIa, elle devient capable de cliver la pKK et ainsi l'activer en KK. La KK peut à son tour activer le FXII, formant ainsi une boucle d'amplification. Une fois activée, la KK est capable de cliver le HK et de provoquer la libération de BK. La BK est un peptide vaso-actif impliqué dans la protection cardiovasculaire, l'inflammation, la perméabilité vasculaire et la douleur (Ito et al., 1991). Ce peptide peut être clivé pour former un second peptide vaso-actif, la *desArg*<sup>9</sup>-BK. La BK et la *desArg*<sup>9</sup>-BK sont des kinines dont les effets pharmacologiques et physiopathologiques sont médiés par deux récepteurs membranaires ; le R2B et le R1B exprimés à la surface des cellules endothéliales. La surproduction ou l'accumulation des kinines provoque une vasodilatation des vaisseaux sanguins et une augmentation de la perméabilité trans-endothéliale lors de leur fixation sur les récepteurs. Ce phénomène est associé à la pathologie de l'AO, caractérisé par l'apparition d'œdèmes sous cutanés ou sous muqueux (Lane et al., 2012).

### I. Espèces moléculaires du kininogène de haut poids moléculaire et production de bradykinine

L'AO-nC1Inh peut être d'origine héréditaire, dépendant de mutations du gène *F12* et associé à une augmentation de l'activité du FXIIa (Cichon et al., 2006) (Charignon et al., 2014). Ce phénomène entraîne l'amplification de l'activation de la phase contact qui se traduit par l'augmentation de la libération de BK. Du fait de la courte demi-vie de la BK et de son métabolite actif, la *desArg*<sup>9</sup>-BK ( $27 \pm 10$  et  $643 \pm 436$  secondes, respectivement pour la BK et la *desArg*<sup>9</sup>-BK), les kinines sont difficiles à doser dans le plasma (Cyr et al., 2001). La quantification du HKn et du HKc est un paramètre idéal puisque la demi-vie du HK est relativement longue (2 à 3 jours) et que sa cinétique de clivage est un phénomène assez rapide qui traduit directement la libération de BK (Scott et al., 1984) (Schaller et al., 2008). La reconstitution du HK *via* sa production par le foie est un phénomène lent ; ce paramètre renforce cette étude avec une analyse robuste de production de kinines *in*

*vivo* au cours des crises d'AO. Bien que plusieurs études ont déjà démontrées le clivage du HK chez les patients atteints d'AO, cette étude est la première à quantifier ce phénomène, tout en utilisant le HKn et le HKc pour établir un diagnostic (Defendi et al., 2013) (Suffritti et al., 2014) (Sala-Cunill et al., 2015).

L'analyse du HKn et du HKc par Western Blot, montre une variation importante en fonction du sexe des individus et de leur état (sains ou patients AO-nC1Inh). Chez les sujets sains, la quantité de HKn varie entre les sujets masculins (129 ng/ $\mu$ L) et les sujets féminins (132 ng/ $\mu$ L). Ces valeurs sont légèrement supérieures aux valeurs de référence connues pour la concentration plasmatique de HK (de 70 à 90  $\mu$ g/mL) (Adam et al., 1985; Kaplan and Ghebrehiwet, 2010) (Uchida and Katori, 1979) (Hilgenfeldt et al., 1998). Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation de différentes méthodes de dosage ; le Western Blot est une technique semi-quantitative qui ne permet pas de déterminer avec précision la quantité de HKn plasmatique. Le pourcentage de HKc est quasiment nul chez les sujets sains (1 et 6 %, respectivement pour les sujets masculins et les sujets féminins). Ce faible pourcentage de HKc indique qu'à l'état physiologique, une quantité faible de kinines est libérée. Une différence significative est établie entre les sujets sains masculins et féminins sur la quantité de HKn et sur le pourcentage de HKc. Cette différence n'a pas été mise en évidence dans les travaux précédents (Adam et al., 1985). Ces variations peuvent s'expliquer par le taux d'œstrogène chez les sujets féminins (Giard et al., 2012a) (Gompel, 2015). De ces deux paramètres, le pourcentage de HKc, peu sensible aux conditions expérimentales, est un élément clé pour le diagnostic des patients AO-nC1Inh.

La comparaison des patients AO-nC1Inh avec mutations du gène *F12* et des sujets sains montre une variation importante de la quantité de HKn et du pourcentage de HKc entre ces deux groupes. Pour les sujets masculins et féminins, la quantité de HKn est largement inférieure chez les patients AO-nC1Inh par rapport aux sujets sains ; cette diminution est directement liée à l'augmentation du pourcentage de HKc. Cette augmentation du pourcentage de HKc indique une augmentation de la KK due à l'activation de la phase contact. Le clivage de HK reflète une forte libération de BK, à l'origine de l'état pathologique de ces patients. Pour ces patients AO-nC1Inh, l'augmentation de l'activité du FXIIa favorise la conversion du zymogène pKK en KK et provoque le clivage du HK en BK. Ce phénomène, observé par Immuno Blot, conforte l'effet de la mutation du *F12* sur l'activation de la phase contact (Cichon et al., 2006) (Charignon et al., 2014).

Différents paramètres statistiques ont été étudiés pour évaluer la performance de ces tests, pour le diagnostic des patients AO-nC1Inh. Les courbes ROC ont servi à identifier les seuils de référence pour séparer les sujets sains des patients AO-nC1Inh. La limite inférieure pour le dosage de HKn est établie à 72.0 ng/μL pour les sujets masculins et à 38.0 ng/μL pour les sujets féminins. Concernant le pourcentage de HKc, la limite supérieure est définie à 14.4 et 33.0 % (respectivement pour les sujets masculins et les sujets féminins). Ces seuils de référence sont calculés de manière à obtenir le meilleur rapport sensibilité/spécificité. Par la quantification de HKn, le test permet de diagnostiquer 54.8 et 61.0 % des patients et d'exclure 98.0 et 98.7 % des sujets sains (respectivement pour les sujets masculins et les sujets féminins). Par le pourcentage de HKc, le test permet de diagnostiquer 54.8 et 48.8 % des patients et d'exclure 98.0 et 98.7 % des sujets sains (respectivement pour les sujets masculins et les sujets féminins). Ainsi la majorité des sujets sains sont exclus ; plus de 98 % de sujets sains répondent négativement au test de diagnostic. En vue du diagnostic des patients, ces valeurs sont légèrement inférieures à celles des sujets sains, ce test permet de diagnostiquer environ 50 % des patients masculins et 60 % des sujets féminins. Toutefois, en combinant ces deux dosages, le diagnostic des patients peut être réalisé de manière plus efficace.

Cette étude sur le HK peut compléter l'examen de C1Inh et la mesure de l'activité kininogénase pour le diagnostic des patients atteints d'AO. Ces différents tests analytiques sont appropriés aux diagnostics difficiles, lors de l'analyse de patients ayant un phénotype clinique rare (par exemple nC1Inh-AO) ou ambigu (participation de la composante des mastocytes). Un avantage principal de ce test réside dans sa grande spécificité, plutôt que de la sensibilité, ce qui pousse à proposer cette méthode comme un critère positif de l'AO (Hui and Walter, 1980). Ce test permet également de connaître la cinétique de HKn et de HKc circulant dans le plasma. Cela pourrait donner une image de l'activation de la phase contact et de la restauration du HK aidant ainsi au choix thérapeutique.

L'application de ce test à certains cas cliniques fait observer une variation du HK pendant les crises. L'analyse d'échantillons prélevés chez deux patients pendant une crise d'AO, montre que la totalité du HK est sous la forme de HKc. Ces patients possèdent des valeurs de HKn et de HKc dépassant les seuils de référence fixés précédemment ce qui confirme l'activation de la phase contact et la production de kinines. Dans cette circonstance, la totalité du HK a été clivée par la KK ce qui a

entraîné une libération de BK. La BK est convertie en *desArg*<sup>9</sup>-BK, ces kinines se fixent sur leur R2B et R1B ce qui active les voies pro-inflammatoires et déclenche une crise d'AO. En réalisant un deuxième prélèvement sanguin un mois après la crise, une variation de la quantité de HKn et du pourcentage de HKc est constatée. Pour ces patients, la quantité de HKn a été restaurée, objectivée par une diminution du pourcentage de HKc. Un mois après la crise, ces patients retrouvent des valeurs normales pour la quantité de HKn. Le pourcentage de HKc est relativement faible ce qui limite la libération de la BK et explique que ces patients ne se trouvent pas à nouveau en situation de crise.

L'influence de la prise d'un traitement OP a été comparée entre différents sujets sains féminins et patientes AO-nC1Inh. Pour les sujets sains, la prise de traitement OP n'affecte pas la production et le clivage de HK. Chez les patientes AO-nC1Inh sous prise de traitement OP, la quantité de HKn est de 51 ng/μL et le pourcentage de HKc est de 40 %. Ces valeurs, basses pour le HKn et élevées pour le HKc dépassent les seuils de référence mis au point précédemment, ce qui montre l'activation de la phase contact chez ces patientes. Lorsque ces mêmes patientes arrêtent la prise de traitement OP, une variation importante de ces paramètres est mesurée. Le sevrage du traitement OP permet d'augmenter la quantité de HKn chez tous les sujets, ainsi que de diminuer le pourcentage de HKc. Chez ces patientes, l'arrêt d'un traitement OP restaure les valeurs de HKn et de HKc près des valeurs normales, ce qui traduit une baisse de la libération de la BK. La prise de traitement OP a un réel effet négatif sur l'état de santé des patientes. En cas de symptômes d'AO, l'arrêt de ce traitement OP pourrait améliorer l'état de la patiente.

En conclusion, la quantification du HKn et du HKc par Immuno Blot permet de déterminer la production de kinines pour les patients atteints d'AO-nC1Inh. Ces travaux serviront dans les cas d'AO où la participation kinines doit être étudiée et peuvent être appliqués dans les circonstances d'activation de la phase contact suspectée. Par exemple, les cas de transfusion avec apparition de syndrome de détresse respiratoire aigu (TRALI) et d'autres réactions conséquentes à l'application de produits sanguins. Des essais supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si le HKc peut être utilisé comme marqueur de traitement préventif de l'AO.

L'ensemble de ces résultats est soumis dans le journal PLOS ONE.



## Partie 2 : Le contrôle de la phase contact par C1 Inhibiteur

La phase contact est une cascade enzymatique complexe dont le contrôle est assuré par plusieurs protéines, telles que l'ATIII et l' $\alpha_2$ -AP, contrôlant le FXIIa ainsi que l' $\alpha_2$ M et C1Inh contrôlant le FXIIa et la KK. C1Inh est la protéine dotée de la plus forte affinité vis-à-vis du FXIIa et de la KK ; elle assure une contribution majeure du contrôle de la phase contact (Kaufman et al., 1991) (Ghannam et al., 2013). C1Inh est une Serpine qui circule aux concentrations d'environ 270  $\mu$ g/mL et lors d'un déficit, la phase contact non contrôlée, a pour conséquence l'apparition d'œdèmes. Les mutations du gène *SERPING1* identifiées pour être causales de l'AOH-dC1Inh sont à l'origine d'un déficit quantitatif (type I) ou fonctionnel (type II) de C1Inh (Kargarsharif et al., 2015). Il existe également des cas acquis de la pathologie qui sont associés à une hyperconsommation de C1Inh, le plus souvent due à une lymphopathie. Ces cas peuvent également être associés à la présence d'auto-anticorps anti-C1Inh, bloquant son activité ou accélérant son catabolisme (Fain et al., 2015).

### I. Reconstitution de la phase contact et dosage de C1 Inhibiteur fonctionnel

Le dosage de C1Inh fonctionnel est un paramètre essentiel pour identifier l'AO et ainsi orienter le diagnostic (Cicardi et al., 2014). Pour améliorer le dosage de C1Inh fonctionnel des patients atteints d'AOH-dC1Inh, un nouveau test de diagnostic est mis en place. Ce test utilise sa cible naturelle, la KK. Le dosage est basé sur la reconstitution de la phase contact *in vitro*, grâce aux composants purifiés FXIIa, pKK et HK. C1Inh plasmatique assure l'inhibition de la KK issue de l'activation de la pKK par le FXIIa. Cette inhibition est mesurée par le clivage d'un substrat chromogène clivé par la KK. Cette technique permet de mesurer la fonction de C1Inh chez les patients.

En dosant C1Inh fonctionnel par activité amidase, une variation importante a été constatée en fonction du sexe des individus et de leur état (sains ou pathologiques). La quantité de C1Inh fonctionnel varie entre les sujets masculins (0.85 UI/mL) et féminins (0.74 UI/mL). Cette différence peut s'expliquer par le taux d'œstrogènes présent chez les sujets féminins (Giard et al., 2012a) (Gompel, 2015). Ces valeurs sont légèrement inférieures à la valeur de 1UI, tenue pour fonction médiane, associée à la concentration plasmatique de 270 mg/L de C1Inh (Thelwel et al., 2011). Pour ces

concentrations, la fonction de C1Inh plasmatique est suffisante pour contrôler la phase contact afin de limiter la production de BK.

La comparaison des données de C1Inh fonctionnel issues de ce test entre les sujets sains et les patients AOH-dC1Inh, acquis ou avec mutation du gène *SERPING1*, montre sans ambiguïté la capacité du test à discriminer les patients des sujets sains. Pour les sujets masculins et féminins, la quantité de C1Inh fonctionnel est inférieure chez les patients comparativement aux sujets sains. Chez les patients AOH-dC1Inh, les différentes mutations du gène *SERPING1* entraînent un déficit du contrôle de la phase contact. Le FXIIa et la KK ne sont plus régulés ce qui provoque une augmentation de la libération de BK.

L'évaluation de la performance du test par les courbes ROC a identifié les seuils de référence permettant de séparer les sujets sains des patients AOH-dC1Inh. La limite inférieure pour le dosage de C1Inh fonctionnel est établie à 0.61 UI/mL chez les sujets masculins et à 0.42 UI/mL chez les sujets féminins. Ces seuils de référence sont calculés de manière à obtenir le meilleur rapport sensibilité/spécificité. Ce test permet de diagnostiquer 100 et 93 % des patients AOH-dC1Inh et d'exclure 100 et 99 % des sujets sains (respectivement pour les sujets masculins et les sujets féminins).

En appliquant ce test, notamment à des patients dont les mutations du gène *SERPING1* ont été identifiées (mutations I271T, R378C et L107R), des variations sur C1Inh fonctionnel sont relevées, mettant en évidence l'importance des positions des mutations pour le contrôle par C1Inh. L'ensemble des patients porteurs de la mutation I271T ou R378C exprime une fonction de C1Inh inférieure au seuil de référence pour les tests vis-à-vis de la KK et de C1s. Les patients porteurs de la mutation R378C expriment une fonction de C1Inh inférieure à 20 % pour la mesure du contrôle vis-à-vis de la KK et supérieure à 50 % pour celui vis-à-vis de C1s. La fonction de C1Inh pour le patient porteur de la mutation L107R est normale, pour le contrôle vis-à-vis de la KK mais inférieure au seuil de référence pour celui vis-à-vis de C1s. La fonction de C1Inh est interprétée différemment selon le test utilisé. Les tests utilisant C1s comme cible sont incapables d'évaluer le contrôle de C1Inh avec fiabilité pour son contrôle de la formation des kinines (López-Lera et al., 2010). Ces résultats confortent le bien-fondé de ce nouveau test pour le diagnostic des patients souffrant d'AOH-dC1Inh.

La fonction de C1Inh a été considérée comme marqueur œstrogène-dépendant de l'AO durant les crises avec, par exemple, un gain de fonction du FXII (Martin et al., 2007) (Charignon et al., 2014). La prise d'un traitement OP est comparée entre deux groupes, femmes saines et patientes AOH-dC1Inh. Pour le groupe femmes saines, la prise de traitement OP n'affecte pas la fonction de C1Inh. Pour les patientes sous traitement OP, la fonction de C1Inh est faible (0.25 UI/mL). Ces valeurs s'écartent des seuils de référence retenus (0.42 UI/mL), ce qui confirme la susceptibilité à la maladie chez ces patientes. Lorsque ces mêmes patientes arrêtent la prise de traitement OP, une variation importante de ces paramètres est mesurée. L'arrêt de l'application OP s'associe à une forte augmentation de la fonction de C1Inh avec une médiane de 0.91 UI/mL. Le dosage de C1Inh fonctionnel retrouve des valeurs supérieures au seuil de référence. L'arrêt d'un traitement OP ramène les valeurs de C1Inh fonctionnel dans les valeurs normales, suggérant une meilleure régulation de la phase contact. La prise de traitement OP a un effet péjoratif sur l'état de santé des patientes ; en cas de symptômes d'AO, l'arrêt de traitement OP peut améliorer l'état de santé du patient.

En conclusion, le dosage de C1Inh fonctionnel ciblé sur la KK détermine le niveau de contrôle de la KK par C1Inh pour les patients atteints d'AO-nC1Inh. Ces travaux s'appliqueront dans les cas d'AO avec hypothèse de la participation des kinines. Des essais supplémentaires sont en cours afin de commercialiser le kit de dosage applicable au diagnostic des patients souffrant l'AO.

L'ensemble de ses résultats est publié dans un article paru dans le journal Allergy (Ghannam et al., 2015).

## II. Déglycosylation de C1 Inhibiteur et impact sur sa fonction inhibitrice

C1Inh est un inhibiteur de Sérine protéase ciblant plusieurs protéases à Sérine de différentes cascades plasmatiques. C1Inh est une glycoprotéine de 478 résidus d'acides aminés qui subit une modification post-traductionnelle importante, avec l'ajout de 45 % de polysaccharides dont 6 *N*-glycosylations et 14 *O*-glycosylations (Koles et al., 2004) (Beinrohr et al., 2007). C1Inh est l'une des protéines du plasma la plus fortement glycosylé. La plupart des polysaccharides de C1Inh sont situés sur le domaine non-Serpine, *N*-terminal (résidus 1-120) et seulement 3 *N*-glycosylations sont attachées au domaine Serpine : Asn<sup>216</sup>, Asn<sup>231</sup> et Asn<sup>330</sup>. La fonction précise de ces groupements glucidiques, sur l'interaction de C1Inh avec ses protéases cibles, n'a pas encore été étudiée. Grâce à différentes combinaisons d'enzymes (neuraminidase, PNGase et *O*-glycosidase), les résidus de polysaccharides (*N*-liés et *O*-liés) de C1Inh sont éliminés, ainsi leur rôle dans la fonction de C1Inh peut être décrypté.

La fonction de C1Inh est étudiée pour son contrôle vis-à-vis de deux protéases : la KK, protéine principale de la phase contact et cible dans le dosage de C1Inh fonctionnel (Ghannam et al., 2015) et C1s, protéase du complément qui permet le dosage de la fonction de C1Inh pour la plupart des tests de diagnostic disponibles actuellement (Drouet et al., 1988). L'étude de la fonction de C1Inh vis-à-vis de la KK démontre, par activité amidase, que lors du clivage des polysaccharides *O*-liés, la fonction de C1Inh est abolie. Le clivage des polysaccharides *N*-liés entraîne une perte partielle de la fonction de C1Inh. Des résultats similaires sont obtenus par Western Blot, avec la diminution de la formation de complexes entre C1Inh et la KK. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude réalisée par l'équipe de Patston, où C1Inh perd le contrôle de la KK lorsque son extrémité *N*-terminale est tronquée (Ravindran et al., 2004). L'étude de la fonction de C1Inh vis-à-vis de C1s démontre, par activité estérase et par Western Blot, que lors du clivage des polysaccharides *O*-liés, une perte partielle de la fonction de C1Inh est constatée. Le clivage des polysaccharides *N*-liés n'a pas d'impact sur la fonction de C1Inh. Ces résultats suggèrent que C1Inh déglycosylé conserve sa fonction inhibitrice vis-à-vis de C1s, comme rapporté dans les études précédentes (Reboul et al., 1987) (Liu et al., 2004).

Les polysaccharides *N*- ou *O*-liés à C1Inh n'ont pas les mêmes effets selon la protéine ciblée. Les polysaccharides *N*-liés n'ont aucun effet sur la capacité de C1Inh au contrôle de C1s, mais ils affectent celle du contrôle de KK à 50 %. Les polysaccharides

*O*-liés ont un rôle plus important que celui des polysaccharides *N*-liés puisqu'ils affectent le contrôle de C1s à 50 % et abolissent totalement la fonction inhibitrice vis-à-vis de la KK. Le clivage de ces polysaccharides, majoritairement répartie sur le domaine *N*-terminal de C1Inh permet de moduler la fonction de C1Inh. Ces résultats peuvent argumenter certains déficits fonctionnels de C1Inh. Des études antérieures ont montré que les modifications post-traductionnelles des Serpines, à savoir la glycosylation, affecte leur spécificité. Ces résultats confirment les conclusions émises par l'équipe de Sun en 2008, sur l'impact des glycosylations sur l'interaction Serpine / protéase (Sun et al., 2008). L'interaction de C1Inh avec la protéase C1s n'est affectée que partiellement par le clivage des polysaccharides, contrairement à son interaction avec la KK ; cet effet pourrait être spécifique de la protéase ciblée. Les polysaccharides *O*-liés sont présents à la surface du domaine non-Serpine, *N*-terminal. Étant donné que le clivage des polysaccharides *O*-liés modifie l'interaction de C1Inh vis-à-vis de la KK, une hypothèse peut être émise sur la contribution du domaine non-Serpine sur sa fonction (Minta, 1981).

Certains cas d'AOA sont associés à un syndrome lymphoprolifératif ou à un désordre auto-immun. Des anticorps anti-C1Inh sériques ont été détectés dans environ 40 % des cas chez ces patients. Ces patients possèdent une altération de la concentration et de la fonction de C1Inh, le gène *SERPING1* n'étant pas causal pour la pathologie. Le dosage de C1Inh fonctionnel a montré une baisse de la fonction de C1Inh vis-à-vis de la KK pour ces patients. Afin de savoir si les polysaccharides présents à la surface de C1Inh sont une cible pour les auto-anticorps anti-C1Inh sériques, différents sérums de patients AOA sont analysés par ELISA. Lorsque les polysaccharides *O*-liés sont clivés, la liaison de l'anticorps sur C1Inh est légèrement diminuée pour l'isotype IgM et fortement diminuée pour les isotypes IgG et IgA. En clivant les polysaccharides *N*-liés, la plupart des auto-anticorps anti-C1Inh sont capables de se lier à C1Inh. Quel que soit l'isotype des auto-anticorps présents, la fonction de C1Inh n'a pas été affectée directement par les auto-anticorps anti-C1Inh. L'hypothèse peut être émise que le clivage des polysaccharides *O*-liés peut altérer la conformation de C1Inh, avec une modification partielle de l'interaction avec les protéases de la phase de contact. Cette altération est potentiellement liée à un blocage du site de liaison de C1Inh. Les polysaccharides *O*-liés jouent un rôle dans le maintien des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines (Carraway and Hull, 1991) (Gowda and Davidson, 1994). La conformation pourrait être modifiée suivant la déglycosylation de C1Inh et diminuer son interaction avec les auto-anticorps. Par ailleurs, l'interaction des auto-anticorps avec les polysaccharides pourrait affecter l'efficacité d'un

traitement par C1Inh concentré. Certains anticorps anti-C1Inh de type IgM ont été observés dans le sérum de patients AOH lors de l'administration de C1Inh concentré (Varga et al., 2007). Ces anticorps, indépendamment de leur isotype, pourraient être des immunoglobulines polyspécifiques dirigées contre des glycoprotéines membranaires communes des protéines cibles.

En conclusion, cette étude a démontré que la glycosylation de C1Inh affecte sa fonction sur la cible de la phase de contact, la KK, mais pas sur C1s, après déglycosylation des polysaccharides *O*-liés. Ceci suggère que le domaine *N*-terminal est impliqué dans la fonction de C1Inh dans le contrôle de la phase contact. Cette étude a démontré aussi que le motif polysaccharide peut être une cible des auto-anticorps anti-C1Inh et que ces auto-anticorps n'affectent pas la fonction C1Inh. L'importance des polysaccharides *O*-liés pour la fonction de C1Inh devrait être approfondie en utilisant des formes tronquées et mutées sur les sites de glycosylation de C1Inh pour mieux investiguer le rôle de polysaccharides dans le contrôle de la KK.

L'ensemble de ces résultats a été publié dans le journal *Molecular Immunology* (Ghannam et al., 2016).

### III. Mutations du gène *SERPING1* et identification des polymères de C1 Inhibiteur

Certaines mutations du gène *SERPING1* entraînent la synthèse de formes de C1Inh où est observé un repliement de la boucle réactive pour constituer un feuillet- $\beta$  supplémentaire. Ces formes mal repliées de C1Inh ne sont plus capables de s'associer aux protéases cibles car la boucle réactive de la Serpine n'est plus accessible. Ces formes moléculaires sont considérées comme non fonctionnelles et incapables de contrôler la phase contact. Les formes mal repliées de C1Inh ont la capacité de former des agrégats intermoléculaires, appelés pC1Inh (Madsen et al., 2014). Les pC1Inh ont la particularité de pouvoir activer le FXII en FXIIa (Madsen et al., 2015) (Huang et al., 2016).

Par Immuno Blot natif, a été mise en évidence la présence de ces polymères chez un grand nombre de patients. La formation de polymères est un phénomène remarquable chez les patients identifiés pour les types I ou I/II. Parmi les patients analysés, la plupart d'entre eux possèdent des polymères de trois (3X) molécules de C1Inh. La présence de ces polymères de C1Inh n'est pas spécifique de la mutation de C1Inh ni de sa position au niveau des différents exons et introns du gène. La présence de pC1Inh contenant deux (2X) ou quatre (4X) molécules de C1Inh est un phénomène beaucoup plus rare que les pC1Inh 3X, puisqu'ils sont présents chez seulement 20 % des patients analysés. Chez les patients de type II, aucun pC1Inh n'a été mis en évidence par Immuno Blot. Ces patients sont caractérisés par un taux de C1Inh normal mais avec un déficit de la fonction de C1Inh. Ces résultats suggèrent que les formes non fonctionnelles sont incapables de se complexer afin de former des polymères. Les travaux de Madsen réalisés en 2014, ne montrent aucun pC1Inh pour les mutations Thr167Asn et Pro454Leu. Lorsque ces mutations sont étudiées par Immuno Blot, des pC1Inh 3X sont révélés. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence des anticorps anti-C1Inh. Cette étude reste à poursuivre en comparant ces résultats avec ceux obtenus en utilisant l'anticorps de Madsen.

La présence des pC1Inh chez les sujets AOH-C1Inh est associée à une activation de la phase contact. D'une part, elle n'est plus contrôlée par C1Inh et d'autre part, elle est suractivée car la protéine de contrôle devient activatrice. La faible quantité de C1Inh fonctionnelle synthétisée est piégée sous forme de polymères, ce qui rend C1Inh inactif ; le FXIIa et la KK ne sont plus contrôlés. L'activation de la phase contact est également augmentée par l'activation du FXII en FXIIa *via* les pC1Inh, ce qui entraîne une augmentation de l'activation de la KK. Ces deux phénomènes provoquent une

augmentation de l'activation de la phase contact avec une importante production de kinines. La polymérisation de C1Inh transforme cette molécule de contrôle en un activateur de la phase contact (Madsen et al., 2015) (Huang et al., 2016). La recherche des pC1Inh reste à approfondir en étudiant différents patients avec la même mutation afin de déterminer si la présence de pC1Inh est liée à la mutation du gène *SERPING1* ou s'il s'agit d'un phénomène aléatoire. L'exploration des pC1Inh reste à poursuivre afin de déterminer si les pC1Inh de type 2X, 3X ou 4X ont les mêmes effets sur l'activation de la phase contact. Cette découverte peut participer à l'orientation thérapeutique. L'ajout de C1Inh concentré pourrait s'avérer inefficace s'il se retrouve piégé dans les pC1Inh.



## BIBLIOGRAPHIE

### Articles :

Adam, A., Albert, A., Calay, G., Closset, J., Damas, J., and Franchimont, P. (1985). Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin. Chem.* *31*, 423–426.

Alving, B.M., Tankersley, D.L., and Mason, B.L. (1983). Plasma prekallikrein: quantitative determination by direct activation with Hageman factor fragment (beta-XIIa). *J. Lab. Clin. Med.* *101*, 226–241.

Beinrohr, L., Harmat, V., Dobó, J., Lőrincz, Z., Gál, P., and Závodszky, P. (2007). C1 Inhibitor Serpin Domain Structure Reveals the Likely Mechanism of Heparin Potentiation and Conformational Disease. *J. Biol. Chem.* *282*, 21100–21109.

Björkqvist, J., Sala-Cunill, A., and Renné, T. (2013). Hereditary angioedema: a bradykinin-mediated swelling disorder. *Thromb. Haemost.* *109*, 368–374.

Bossi, F., and Tedesco, F. (2013). Role of the B1 bradykinin receptor and gC1qR/p33 in angioedema. *Immunol Allergy Clin North Am* *33*, 535–544.

Breugelmans, B., Simonet, G., van Hoef, V., Van Soest, S., and Vanden Broeck, J. (2009). Pacifastin-related peptides: structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. *Peptides* *30*, 622–632.

Brown, N.J., Byiers, S., Carr, D., Maldonado, M., and Warner, B.A. (2009). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor use associated with increased risk of ACE inhibitor-associated angioedema. *Hypertension* *54*, 516–523.

Cagliani, R., Forni, D., Riva, S., Pozzoli, U., Colleoni, M., Bresolin, N., Clerici, M., and Sironi, M. (2013). Evolutionary analysis of the contact system indicates that kininogen evolved adaptively in mammals and in human populations. *Mol. Biol. Evol.* *30*, 1397–1408.

Caliezi, C., Wuillemin, W.A., Zeerleder, S., Redondo, M., Eisele, B., and Hack, C.E. (2000). C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol. Rev.* *52*, 91–112.

Carraway, K.L., and Hull, S.R. (1991). Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains. *Glycobiology* *1*, 131–138.

- Catalioto, R.-M., Valenti, C., Maggi, C.A., and Giuliani, S. (2015). Enhanced Ca(2+) response and stimulation of prostaglandin release by the bradykinin B2 receptor in human retinal pigment epithelial cells primed with proinflammatory cytokines. *Biochem. Pharmacol.* *97*, 189–202.
- Caubet, J.C., Vermeulen, C., and Hauser, C. (2003). «Vrais» et «faux» angioedèmes : Allergo-immunologie. *Médecine et hygiène* *61*, 799–802.
- Charignon, D., Späth, P., Martin, L., and Drouet, C. (2012). Icatibant, the bradykinin B2 receptor antagonist with target to the interconnected kinin systems. *Expert Opin Pharmacother* *13*, 2233–2247.
- Charignon, D., Ghannam, A., Defendi, F., Ponard, D., Monnier, N., Trascasa, M.L., Launay, D., Caballero, T., Djenouhat, K., Fain, O., et al. (2014). Hereditary angioedema with F12 mutation: factors modifying the clinical phenotype. *Allergy*.
- Cicardi, M., Aberer, W., Banerji, A., Bas, M., Bernstein, J.A., Bork, K., Caballero, T., Farkas, H., Grumach, A., Kaplan, A.P., et al. (2014). Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy* *69*, 602–616.
- Cichon, S., Martin, L., Hennies, H.C., Müller, F., Van Driessche, K., Karpushova, A., Stevens, W., Colombo, R., Renné, T., Drouet, C., et al. (2006). Increased Activity of Coagulation Factor XII (Hageman Factor) Causes Hereditary Angioedema Type III. *Am J Hum Genet* *79*, 1098–1104.
- Colobran, R., Pujol-Borrell, R., Hernández-González, M., and Guilarte, M. (2014). A novel splice site mutation in the SERPING1 gene leads to haploinsufficiency by complete degradation of the mutant allele mRNA in a case of familial hereditary angioedema. *J. Clin. Immunol.* *34*, 521–523.
- Craig, T.J., Li, H.H., Riedl, M., Bernstein, J.A., Lumry, W.R., MacGinnitie, A.J., Stolz, L.E., Biedenkapp, J., and Chyung, Y. (2015). Characterization of anaphylaxis after ecallantide treatment of hereditary angioedema attacks. *J Allergy Clin Immunol Pract* *3*, 206–212.e4.
- Cugno, M., Hack, C.E., de Boer, J.P., Eerenberg, A.J., Agostoni, A., and Cicardi, M. (1993). Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema. *J. Lab. Clin. Med.* *121*, 38–43.
- Cyr, M., Lepage, Y., Blais, C., Gervais, N., Cugno, M., Rouleau, J.L., and Adam, A. (2001). Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *281*, H275–H283.

- Davis, A.E., Lu, F., and Mejia, P. (2010). C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb. Haemost.* *104*, 886–893.
- Defendi, F., Charignon, D., Csopaki, F., Ponard, D., and Drouet, C. (2012). Actualités biologiques sur les angioedèmes à kinines. *Revue Francophone des Laboratoires* *2012*, 39–52.
- Defendi, F., Charignon, D., Ghannam, A., Baroso, R., Csopaki, F., Allegret-Cadet, M., Ponard, D., Favier, B., Cichon, S., Nicolie, B., et al. (2013). Enzymatic assays for the diagnosis of bradykinin-dependent angioedema. *PLoS ONE* *8*, e70140.
- Defendi, F., Charignon, D., Ghannam, A., Ponard, D., and Drouet, C. (2015). [Biological investigation of kinin-mediated angioedema]. *Ann Dermatol Venereol* *142*, 163–169.
- Drapeau, G., Chow, A., and Ward, P.E. (1991). Metabolism of bradykinin analogs by angiotensin I converting enzyme and carboxypeptidase N. *Peptides* *12*, 631–638.
- Drouet, C., Alibeu, C., Ponard, D., Arlaud, G.J., and Colomb, M.G. (1988). A sensitive method to assay blood complement C1- inhibitor activity. *Clin. Chim. Acta* *174*, 121–130.
- Drouet, C., Ponard, D., Monnier, N., Lunardi, J., and Bosson, J.-L. (2008). Classification and biological diagnostic of angioedema diseases. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* *48*, 441–446.
- Fain, O., Gobert, D., Khau, C.A., Mekinian, A., and Javaud, N. (2015). [Acquired angioedema]. *Presse Med* *44*, 48–51.
- Filippelli-Silva, R., Martin, R.P., Rodrigues, E.S., Nakaie, C.R., Oliveira, L., Pesquero, J.B., and Shimuta, S.I. (2015). The role of N-terminal and C-terminal Arg residues from BK on interaction with kinin B2 receptor. *Biol. Chem.*
- Firinu, D., Bafunno, V., Vecchione, G., Barca, M.P., Manconi, P.E., Santacroce, R., Margaglione, M., and Del Giacco, S.R. (2015). Characterization of patients with angioedema without wheals: The importance of F12 gene screening. *Clin. Immunol.* *157*, 239–248.
- Ghannam, A., Defendi, F., Charignon, D., Csopaki, F., Favier, B., Habib, M., Cichon, S., and Drouet, C. (2013). Contact system activation in patients with HAE and normal C1 inhibitor function. *Immunol Allergy Clin North Am* *33*, 513–533.
- Ghannam, A., Sellier, P., Defendi, F., Favier, B., Charignon, D., López-Lera, A., López-Trascasa, M., Ponard, D., and Drouet, C. (2015). C1-Inhibitor function using contact phase proteases as target: evaluation of an innovative assay. *Allergy*.

- Ghannam, A., Sellier, P., Fain, O., Martin, L., Ponard, D., and Drouet, C. (2016). C1 Inhibitor as a glycoprotein: The influence of polysaccharides on its function and autoantibody target. *Mol. Immunol.* *71*, 161–165.
- Giard, C., Nicolie, B., Drouet, M., Lefebvre-Lacoeuille, C., Le Sellin, J., Bonneau, J.-C., Maillard, H., Rénier, G., Cichon, S., Ponard, D., et al. (2012a). Angio-oedema induced by oestrogen contraceptives is mediated by bradykinin and is frequently associated with urticaria. *Dermatology (Basel)* *225*, 62–69.
- Gompel, A. (2015). [Hereditary angioedema and hormones]. *Presse Med* *44*, 65–69.
- Gowda, D.C., and Davidson, E.A. (1994). Isolation and characterization of novel mucin-like glycoproteins from cobra venom. *J. Biol. Chem.* *269*, 20031–20039.
- Hilgenfeldt, U., Puschner, T., Riester, U., Finsterle, J., Hilgenfeldt, J., and Ritz, E. (1998). Low-salt diet downregulates plasma but not tissue kallikrein-kinin system. *Am. J. Physiol.* *275*, F88–F93.
- Hillmeister, P., and Persson, P.B. (2012). The Kallikrein–Kinin system. *Acta Physiol* *206*, 215–219.
- Hofman, Z.L.M., Relan, A., Zeerleeder, S., Drouet, C., Zuraw, B., and Hack, C.E. (2016). Angioedema attacks in patients with hereditary angioedema: Local manifestations of a systemic activation process. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Al-Horani, R.A. (2014). Serpin regulation of fibrinolytic system: implications for therapeutic applications in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* *12*, 91–125.
- Huang, S., Engberg, A.E., Jonsson, N., Sandholm, K., Nicholls, I.A., Mollnes, T.E., Fromell, K., Nilsson, B., and Ekdahl, K.N. (2016). Reciprocal relationship between contact and complement system activation on artificial polymers exposed to whole human blood. *Biomaterials* *77*, 111–119.
- Hui, S.L., and Walter, S.D. (1980). Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* *36*, 167–171.
- Huntington, J.A., Read, R.J., and Carrell, R.W. (2000). Structure of a serpin–protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* *407*, 923–926.
- Ito, H., Sahashi, T., Hirose, I., Nagata, K., Wada, H., Takai, K., and Hirakawa, S. (1991). Role of the kinin-kallikrein system in the vasodilator action of an angiotensin converting enzyme inhibitor (captopril) on the systemic resistance and capacitance vessels of dogs. *Jpn. Circ. J.* *55*, 857–864.

- Kaplan, A.P., and Ghebrehiwet, B. (2010). The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol. Immunol.* *47*, 2161–2169.
- Kargarsharif, F., Mehranmehr, N., Zahedi Fard, S., Fazlollahi, M.R., Ayazi, M., Mohammadzadeh, I., Nabavi, M., Bemanian, M.H., Fayezi, A., Movahedi, M., et al. (2015). Type I and Type II Hereditary Angioedema: Clinical and Laboratory Findings in Iranian Patients. *Arch Iran Med* *18*, 425–429.
- Kaufman, N., Page, J.D., Pixley, R.A., Schein, R., Schmaier, A.H., and Colman, R.W. (1991). Alpha 2-macroglobulin-kallikrein complexes detect contact system activation in hereditary angioedema and human sepsis. *Blood* *77*, 2660–2667.
- Kenne, E., Nickel, K.F., Long, A.T., Fuchs, T.A., Stavrou, E.X., Stahl, F.R., and Renné, T. (2015). Factor XII: a novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation. *J. Intern. Med.*
- Koles, K., van Berkel, P.H.C., Pieper, F.R., Nuijens, J.H., Mannesse, M.L.M., Vliegenthart, J.F.G., and Kamerling, J.P. (2004). N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology* *14*, 51–64.
- Lane, C.J., Grant, J.A., and Dougherty, D. (2012). Life with hereditary angioedema: then and now. *Postgrad Med* *124*, 144–151.
- Levy, J., Rivard, G.-E., Wagner, E., Beezhold, D., Berlin, N., Fan, L., Zhang, Z., and Sussman, G.L. (2014). Examination of genetic variants involved in generation and biodisposition of kinins in patients with angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol* *10*, 60.
- Liu, D., Gu, X., Scafidi, J., and Davis, A.E. (2004). N-linked glycosylation is required for c1 inhibitor-mediated protection from endotoxin shock in mice. *Infect. Immun.* *72*, 1946–1955.
- López-Lera, A., Favier, B., de la Cruz, R.M., Garrido, S., Drouet, C., and López-Trascasa, M. (2010). A new case of homozygous C1-inhibitor deficiency suggests a role for Arg378 in the control of kinin pathway activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 1307–1310.e3.
- López-Lera, A., Pernia, O., López-Trascasa, M., and Ibanez de Caceres, I. (2014). Expression of the SERPING1 gene is not regulated by promoter hypermethylation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet J Rare Dis* *9*, 103.
- De Maat, S., de Groot, P.G., and Maas, C. (2014). Contact system activation on endothelial cells. *Semin. Thromb. Hemost.* *40*, 887–894.

- Madsen, D.E., Sidelmann, J.J., Overgaard, K., Koch, C., and Gram, J.B. (2013). ELISA for determination of total coagulation factor XII concentration in human plasma. *J. Immunol. Methods* *394*, 32–39.
- Madsen, D.E., Hansen, S., Gram, J., Bygum, A., Drouet, C., and Sidelmann, J.J. (2014). Presence of C1-inhibitor polymers in a subset of patients suffering from hereditary angioedema. *PLoS ONE* *9*, e112051.
- Madsen, D.E., Sidelmann, J.J., Biloft, D., Gram, J., and Hansen, S. (2015). C1-inhibitor polymers activate the FXII-dependent kallikrein-kinin system: Implication for a role in hereditary angioedema. *Biochim. Biophys. Acta* *1850*, 1336–1342.
- Martin, L., Raison-Peyron, N., Nöthen, M.M., Cichon, S., and Drouet, C. (2007). Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor gene in a family with affected women and men is associated with the p.Thr328Lys mutation in the F12 gene. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 975–977.
- Minta, J.O. (1981). The role of sialic acid in the functional activity and the hepatic clearance of C1-INH. *J. Immunol.* *126*, 245–249.
- Mitropoulos, K.A. (1999). High affinity binding of factor XIIa to an electronegative surface controls the rates of factor XII and prekallikrein activation in vitro. *Thromb. Res.* *94*, 117–129.
- Nishimura, K., Iwata, T., and Kokubu, T. (1986). Plasma half-life and organ uptake ratio of radiolabeled glandular kallikrein in control and nephrectomized rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* *198 Pt A*, 309–313.
- Panelius, J., and Meri, S. (2015). Complement system in dermatological diseases - fire under the skin. *Front Med (Lausanne)* *2*, 3.
- Pixley, R.A., Schapira, M., and Colman, R.W. (1985). The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* *260*, 1723–1729.
- Pixley, R.A., Schmaier, A., and Colman, R.W. (1987). Effect of negatively charged activating compounds on inactivation of factor XIIa by C1 inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* *256*, 490–498.
- Ponard, D. (2015). [Hereditary angioedema biological diagnosis]. *Presse Med* *44*, 57–64.
- Prado, G.N., Taylor, L., Zhou, X., Ricupero, D., Mierke, D.F., and Polgar, P. (2002). Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J. Cell. Physiol.* *193*, 275–286.

- Rahal, S., Gilabert, M., Ries, P., Oziel-Taieb, S., Dermeche, S., and Raoul, J.-L. (2014). Hepatocellular carcinoma in a noncirrhotic liver after long-term use of danazol for hereditary angioedema. *Case Rep Oncol* 7, 825–827.
- Ravindran, S., Grys, T.E., Welch, R.A., Schapira, M., and Patston, P.A. (2004). Inhibition of plasma kallikrein by C1-inhibitor: role of endothelial cells and the amino-terminal domain of C1-inhibitor. *Thromb. Haemost.* 92, 1277–1283.
- Reboul, A., Prandini, M.H., and Colomb, M.G. (1987). Proteolysis and deglycosylation of human C1 inhibitor. Effect on functional properties. *Biochem. J.* 244, 117–121.
- Riedl, M.A., Bernstein, J.A., Li, H., Reshef, A., Lumry, W., Moldovan, D., Farkas, H., Levy, R., Baker, J., Hardiman, Y., et al. (2014). Recombinant human C1-esterase inhibitor relieves symptoms of hereditary angioedema attacks: phase 3, randomized, placebo-controlled trial. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 112, 163–169.e1.
- Riedl, M.A., Lumry, W.R., Busse, P., Levy, H., Steele, T., Dayno, J., and Li, H.H. (2015). Prevalence of hereditary angioedema in untested first-degree blood relatives of known subjects with hereditary angioedema. *Allergy Asthma Proc.*
- Roberts, J.R., Lee, J.J., and Marthers, D.A. (2012). Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor angioedema: the silent epidemic. *Am. J. Cardiol.* 109, 774–775.
- Russo-Marie, F. (1998). *L'inflammation* (John Libbey Eurotext).
- Sala-Cunill, A., Björkqvist, J., Senter, R., Guilarte, M., Cardona, V., Labrador, M., Nickel, K.F., Butler, L., Luengo, O., Kumar, P., et al. (2015). Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1031–1043.e6.
- Schaller, J., Gerber, S., Kaempfer, U., Lejon, S., and Trachsel, C. (2008). *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function* (John Wiley & Sons).
- Schapira, M., Ramus, M.A., Waeber, B., Brunner, H.R., Jallat, S., Carvallo, D., Roitsch, C., and Courtney, M. (1987). Protection by recombinant alpha 1-antitrypsin Ala357 Arg358 against arterial hypotension induced by factor XII fragment. *J. Clin. Invest.* 80, 582–585.
- Scott, C.F., Silver, L.D., Schapira, M., and Colman, R.W. (1984). Cleavage of human high molecular weight kininogen markedly enhances its coagulant activity. Evidence that this molecule exists as a procofactor. *J. Clin. Invest.* 73, 954–962.
- Seth (2008). *Textbook Of Pharmacology* (Elsevier India).
- Shapiro, R.S., and Zacek, L. (2014). Training hereditary angioedema patients to self-administer intravenous C1 esterase inhibitor concentrate. *J Infus Nurs* 37, 284–290.

- Suffritti, C., Zanichelli, A., Maggioni, L., Bonanni, E., Cugno, M., and Cicardi, M. (2014). High-molecular-weight kininogen cleavage correlates with disease states in the bradykinin-mediated angioedema due to hereditary C1-inhibitor deficiency. *Clin. Exp. Allergy* *44*, 1503–1514.
- Sun, W., Parry, S., Panico, M., Morris, H.R., Kjellberg, M., Engström, A., Dell, A., and Schedin-Weiss, S. (2008). N-glycans and the N terminus of protein C inhibitor affect the cofactor-enhanced rates of thrombin inhibition. *J. Biol. Chem.* *283*, 18601–18611.
- Thelwell, C., Rigsby, P., Longstaff, C., and On behalf of the ISTH-SSC Subcommittee on Factor XI and the Contact System (2011). An international collaborative study to establish the WHO 1st international standards for C1-inhibitor, plasma and concentrate. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* *9*, 2097–2099.
- Toh, S., Reichman, M.E., Houstoun, M., Ross Southworth, M., Ding, X., Hernandez, A.F., Levenson, M., Li, L., McCloskey, C., Shoabi, A., et al. (2012). Comparative risk for angioedema associated with the use of drugs that target the renin-angiotensin-aldosterone system. *Arch. Intern. Med.* *172*, 1582–1589.
- Uchida, Y., and Katori, M. (1979). Differential assay method for high molecular weight and low molecular weight kininogens. *Thrombosis Research* *15*, 127–134.
- Varga, L., Széplaki, G., Visy, B., Füst, G., Harmat, G., Miklós, K., Németh, J., Cervenak, L., Karádi, I., and Farkas, H. (2007). C1-inhibitor (C1-INH) autoantibodies in hereditary angioedema. Strong correlation with the severity of disease in C1-INH concentrate naïve patients. *Mol. Immunol.* *44*, 1454–1460.
- Wagenaar-Bos, I.G.A., Drouet, C., Aygören-Pursun, E., Bork, K., Bucher, C., Bygum, A., Farkas, H., Fust, G., Gregorek, H., Hack, C.E., et al. (2008). Functional C1-inhibitor diagnostics in hereditary angioedema: assay evaluation and recommendations. *J. Immunol. Methods* *338*, 14–20.
- Williams, A.H., and Craig, T.J. (2015). Perioperative management for patients with hereditary angioedema. *Allergy Rhinol (Providence)* *6*, 50–55.
- Zakharova, N.V., Artemenko, E.O., Podoplelova, N.A., Sveshnikova, A.N., Demina, I.A., Ataulakhanov, F.I., and Pantelev, M.A. (2015). Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. *PLoS ONE* *10*, e0116665.



**Brevets :**

Ghannam A. Defendi F. Favier B. Drouet C. - Dosage de la capacité de contrôle de C1 inhibiteur. - Num INPI : FR 11 60851, 28 novembre 2011 (extension EU, US 2012); licence d'Exploitation à KininX® Université Joseph Fourier - CHU de Grenoble

## LISTE DES PUBLICATIONS

Ghannam, A., **Sellier, P.**, Defendi, F., Favier, B., Charignon, D., López-Lera, A., López-Trascasa, M., Ponard, D., and Drouet, C. (2015). C1-Inhibitor function using contact phase proteases as target: evaluation of an innovative assay. *Allergy*. 70: 1103-11

Ghannam, A., **Sellier, P.**, Fain, L., Martin, L., Ponard, D., and Drouet, C. (2016). C1 Inhibitor as a glycoprotein: the influence of polysaccharides on its function and autoantibody target. *Molecular Immunology*. 71:161-5

**Sellier, P.**, Baroso, R., Defendi, F., Charignon, D., Ponard, D., Favier, B., and Drouet, C. Evaluation of high molecular weight kininogen cleavage allows for diagnostics of kinin mediated oedem. *PlosOne* (soumis).

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR DE LA RECHERCHE  
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES  
Sciences de la Vie et de la Terre

## La phase contact : Son activation et son contrôle par C1 Inhibiteur

Pauline SELLIER

Soutenu le 04 juillet 2016

**Résumé :** Les kinines sont des peptides vaso-actifs impliqués dans le contrôle de l'inflammation et la perméabilité vasculaire. L'accumulation des kinines entraîne une augmentation de la vasodilatation et provoque l'apparition d'œdèmes appelés Angioœdème (AO). L'AO est une pathologie rare qui se déclenche en cas de déséquilibre entre une surproduction des kinines et/ou un défaut du catabolisme des kinines. La libération de kinines peut être investiguée par la mesure du pourcentage de kininogène clivé. Un test de diagnostic par Immuno Blot est mis au point et permet de diagnostiquer plus de 70 % des patients avec un taux normal de C1 Inhibiteur (C1Inh). C1Inh est un inhibiteur de protéases à sérine (Serpine), il est le contrôle majeur de la phase contact. La plupart des patients souffrant d'AO possèdent une mutation au niveau du gène *SERPING1*, gène codant pour la synthèse de la protéine C1Inh. Les différentes mutations identifiées entraînent une diminution quantitative ou qualitative de C1Inh et sont caractéristiques de l'AO avec déficit de C1Inh (AOH-dC1Inh). Un nouveau test de diagnostic est mis au point pour déterminer l'activité fonctionnelle de C1Inh vis-à-vis de la phase contact. La performance de ce test est excellente. C1Inh est une protéine fortement glycosylée qui contient plus de 40 % de polysaccharides. La déglycosylation de C1Inh a démontré une perte de sa fonction de contrôle vis-à-vis de la KK. Pour terminer l'étude de C1Inh, l'investigation de polymères de C1Inh (pC1Inh) a été mise en évidence chez un grand nombre de patients AOH-dC1Inh. Ces pC1Inh transforment cette molécule de contrôle en un activateur de la phase contact.

**Mots clés :** Angioœdème, C1 Inhibiteur, Diagnostic biologique, Kinines, Phase contact.