

Maladies génétiques

Le gène de la pancréatite héréditaire

Le concept de pancréatite héréditaire est né en 1952, lorsque Comfort et Steinberg ont décrit une famille dans laquelle quatre sujets présentaient des épisodes à répétition de douleurs abdominales évocatrices de pancréatite aiguë débutant très tôt dans la petite enfance et évoluant ensuite tout au long de la vie sur le mode chronique [1]. Dès cette époque, les auteurs évoquaient un mode de transmission autosomique dominant pour cette nouvelle maladie génétique. De nombreuses autres familles furent rapportées dans les années suivantes et aujourd'hui plus de 100 familles ont été décrites dans la littérature. La grande majorité est d'origine caucasienne mais quelques publications mentionnent aussi la présence de familles atteintes de pancréatite héréditaire dans la population asiatique, au Japon et en Chine [2-4].

L'étude clinique de ces sujets atteints de pancréatite familiale a pu être affinée et cela a permis à J.B. Gross de définir les critères cliniques de diagnostic et à J. Perrault (Rochester, MI, USA) de mieux cerner l'histoire naturelle de la maladie en comparant le profil clinique et évolutif des sujets atteints de la forme héréditaire à celui des sujets souffrant de pancréatite chronique idiopathique [5, 6]. L'âge moyen d'apparition est plus précoce (7 ans contre 12 ans pour la forme idiopathique); en revanche, les signes et symptômes observés au cours des épisodes aigus sont tout à fait similaires dans les deux groupes avec des complications, semble-t-il plus fréquentes, dans la forme héréditaire. La compilation des données rapportées dans la littérature montre à l'évi-

dence que le mode de transmission dominant ne présente pas une pénétrance totale. On considère aujourd'hui que cette pénétrance est de l'ordre de 80%. Les explorations biochimiques réalisées chez les patients au décours des épisodes aigus ne permirent pas de mettre en évidence d'anomalies particulières du métabolisme en dehors des dérèglements enzymatiques classiques secondaires à la pancréatite. En l'absence d'explication physiopathologique claire pour comprendre la survenue de la maladie et en l'absence de gène candidat, il fallut attendre le développement récent des outils puissants de cartographie génétique pour envisager un clonage positionnel de ce gène, premier fil d'Ariane qui conduirait à l'identification de la protéine. et à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette forme de pancréatite chronique [7].

Localisation du gène

L'histoire s'est brusquement accélérée cette année puisque, grâce à une étroite collaboration entre cliniciens et généticiens, notre groupe rapportait en avril 1996 la localisation du gène responsable de la maladie sur le bras long du chromosome 7 [8].

Nous avons abouti à la première étape du clonage positionnel du gène de la pancréatite héréditaire en le positionnant sur l'extrémité du bras long du chromosome 7 en 7q35-qter. L'étude fut conduite à partir d'une seule et très grande famille originaire de Vendée, suivie pendant 25 ans par l'équipe de Nantes. [9]. Cette famille a été décrite pour la première fois par

Cornet en 1963 [10]. A l'époque, 17 sujets atteints avaient été regroupés. Le suivi constant et systématique de cette famille et des apparentés a permis de réunir une généalogie de 249 membres descendant d'un même couple. On a pu obtenir des prélèvements de 147 sujets dont 45 étaient atteints avec souvent des formes d'apparition très précoces de la maladie (vers l'âge de 2 ou 3 ans), évoluant sur le mode récurrent. Les crises s'accompagnent d'une élévation des enzymes pancréatiques dans le sang. On note la présence de calcifications pancréatiques, visibles à la radiographie de l'abdomen ou à l'échographie. D'autres étiologies telles que la mucoviscidose ou l'association d'une amino-acidurie familiale ont été écartées. Après avoir éliminé les gènes de la famille *REG* situés sur le chromosome 2, nous nous sommes dirigés vers une stratégie d'étude systématique du génome à la recherche d'une liaison significative entre le locus du gène morbide et les marqueurs microsatellites. Après avoir écarté 40% du génome, nous avons mis en évidence cette liaison entre deux locus, D7S 661 et D7S 676, sur l'extrémité du chromosome 7 et cela avec un *lod score* supérieur à 8. Cette localisation était confirmée quelques mois plus tard par Whitcomb *et al.* (Pittsburg, PA, USA) à partir d'une famille du Kentucky [11]. Dans cette région du génome couvrant 20 cM environ, la recherche de candidats potentiels était assez limitée. On notait la présence du locus du gène de la carboxypeptidase A, du récepteur de l'antigène des cellules T (TCR) et du trypsinogène cationique.

Un bon gène candidat : le gène du trypsinogène cationique

Nous avons retenu l'hypothèse de l'implication possible de la carboxypeptidase A tandis que l'équipe de Whitcomb focalisait son attention sur le trypsinogène cationique et bénéficiait de résultats non publiés correspondant au séquençage complet de 685 kb de cette région du locus/TCR β où 8 gènes de type trypsinogène étaient séquencés complètement. Trois d'entre eux s'avèrent être des pseudogènes; les cinq autres étaient regroupés à l'extrémité 3' du locus TCR β . Ces cinq gènes de trypsinogènes sont homologues et se situent dans une région dupliquée en tandem de 10 kb [12].

Le séquençage systématique des cinq exons du trypsinogène cationique les a conduits à identifier une mutation (une transition G \rightarrow A) correspondant à une mutation faux sens en position 117 de la protéine, changeant une arginine en histidine (R117H). Cette mutation ségrège avec le phénotype de pancréatite dans la famille du Kentucky et n'est jamais trouvée dans une série de 140 sujets normaux non apparentés. L'équipe américaine la retrouve également dans cinq autres familles apparemment non apparentées. Nous avons parallèlement regroupé huit familles avec pancréatite familiale de diverses régions de France pour étudier l'homogénéité génétique de la maladie. Les tests HOMOG validaient l'homogénéité génétique et l'étude des marqueurs microsatellites de la région montraient une grande diversité allélique puisque huit haplotypes différents ségrégeaient avec le locus morbide. La mutation R117H est également présente dans trois de nos familles françaises, en particulier dans la grande famille vendéenne à partir de laquelle la localisation initiale fut menée à bien. Cela confirme l'implication du gène codant pour le trypsinogène cationique dans la genèse de la pancréatite héréditaire.

Physiopathologie moléculaire de la pancréatite

Whitcomb *et al.* examinèrent la structure de la protéine grâce aux don-

nées de cristallographie aux rayons X du complexe trypsinogène cationique - inhibiteur du complexe. Il s'avère que la mutation R117H est située à l'opposé du site catalytique de la molécule ainsi que du site de liaison à l'inhibiteur de la trypsine. Cette position laisse à penser que la mutation R117H altère probablement très peu l'activité catalytique de la protéine, voire interfère peu ou pas avec les sites de liaison des inhibiteurs. Cependant cette position 117 est réellement une position-clé dans l'architecture de la molécule : la structure tertiaire de la protéine permet la création d'un site de clivage à cet endroit, site primaire de protéolyse pour la trypsine. La mutation R117H rendrait ce site résistant aux protéases de type trypsine empêchant ainsi la trypsine d'être inactivée par ce mécanisme. Il existe à l'état physiologique dans le pancréas normal des petites traces de trypsine libérée dont la quantité est contrôlée par plusieurs mécanismes d'autorégulation ; ces systèmes de défense permettent de protéger le pancréas d'une autodestruction consécutive à l'activation de cette cascade enzymatique. La première enzyme à intervenir est l'inhibiteur pancréatique de la trypsine (PSTI ou *pancreatic secretory trypsin inhibitor*), un peptide de 56 acides aminés qui est capable d'inhiber de manière réversible jusqu'à 20 % de l'activité trypsine accessible.

Lorsque les capacités d'inhibition du PSTI sont dépassées, entre alors en jeu une série d'enzymes protéolytiques de type trypsine tels que la méso-trypsine et l'enzyme Y capables d'inactiver la trypsine produite. Lorsque cette activité de contrôle est inefficace ou dépassée, la présence de trypsine en excès conduit à l'autodestruction du contenu des granules de zymogène, la libération d'enzymes conduisant à l'autodigestion du pancréas et à la pancréatite. A l'état physiologique, toutes les enzymes protéolytiques, comme la phospholipase et la colipase, sont synthétisées sous forme de proenzymes inactives qui sont protégées des autres composés cellulaires sous forme de granules de zymogène protégés par une membrane. L'activation de ces enzymes digestives survient normalement en

dehors du pancréas lorsque les entérokinases intestinales hydrolysent le trypsinogène pour donner la trypsine active. La trypsine s'auto-active à partir du trypsinogène et transforme toutes les autres proenzymes en enzymes actives dans l'intestin (*figure 1*).

Ainsi, ce modèle proposé par Whitcomb *et al.* permet d'expliquer que les sujets porteurs de l'allèle muté, ayant une histidine en 117, soient protégés de l'autodigestion pancréatique tant que le niveau d'activité de la trypsine est contrôlé par la capacité de la PSTI d'inhiber la trypsine. Dès lors que cette capacité d'inhibition est dépassée, il apparaît une activité trypsine non contrôlée car la mutation située sur le site de clivage Arg 117 empêche la destruction de la trypsine. L'impossibilité de détruire l'excès de trypsine intrapancréatique peut entraîner le déclenchement de poussées de pancréatite, même chez les hétérozygotes. La mutation identifiée dans le trypsinogène cationique représente un modèle certes séduisant car il repose sur une explication physiopathologique vraisemblable d'activation non appropriée de la trypsine. Cependant, cela reste un modèle qui devra, pour être validé, être confronté aux résultats des études expérimentales permettant l'expression et l'étude enzymatique de la protéine normale et de la protéine mutée. Ce modèle offre une explication satisfaisante et somme toute rationnelle aux données de la physiologie et de la biologie de la pancréatite héréditaire. Il permet, de plus, de rendre compte des symptômes observés : les crises de pancréatites surviennent de manière intermittente et souvent après des agressions du pancréas dues à l'ingestion excessive d'alcool ou après des repas trop copieux. La pénétrance incomplète de la maladie n'est, en revanche, pas encore bien comprise. Quoi qu'il en soit, le trypsinogène cationique apparaît bien aujourd'hui être le gène ou l'un des gènes responsables de la maladie puisque Whitcomb retrouve la mutation R117H dans cinq familles différentes et notre équipe dans trois de nos familles françaises. La mutation est portée par trois haplotypes différents

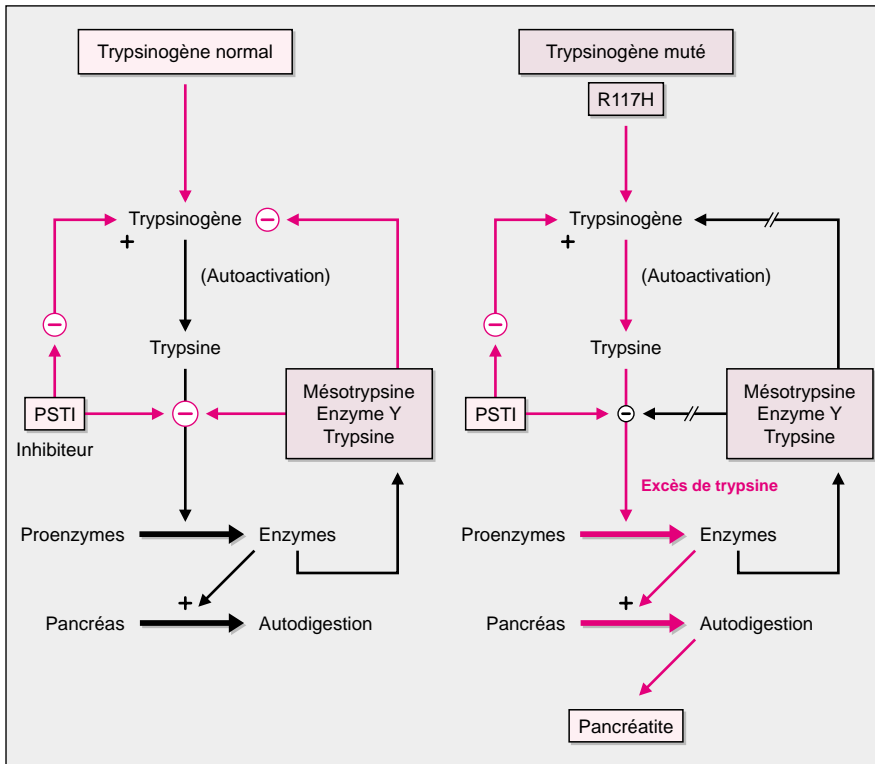


Figure 1. **Le trypsinogène muté: modèle proposé par Whitcomb et al. [11].** A l'état normal, de petites quantités de trypsin libérées dans le pancréas sont contrôlées par plusieurs mécanismes d'auto-régulation. Le premier est la synthèse du PSTI (pancreatic secretory trypsin inhibitor) puis celle de toute une série d'enzymes protéolytiques (mésotrypsine, enzyme Y) capables d'inactiver la trypsin produite en la clivant. En cas de dépassement de cette capacité de contrôle, l'excès de trypsin entraîne la destruction locale des granules de zymogène et la libération d'enzymes protéolytiques qui vont digérer le pancréas. La mutation du trypsinogène en position 117 supprime le site de clivage de la trypsin qui permet son inactivation. Si bien que toute synthèse de trypsin dépassant les capacités d'inactivation par le PSTI pourrait entraîner une activité trypsin locale incontrôlée et la pancréatite.

ce qui indique une probable récurrence de cette mutation. Lorsque la mutation R117H est identifiée chez un malade, on peut très facilement la repérer chez les apparentés par simple amplification et digestion enzymatique par l'enzyme Afl III. Cela permet de diagnostiquer les sujets en période présymptomatique. Il reste maintenant à mettre en évidence l'implication éventuelle d'autres mutations qui pourraient compléter notre vision actuelle de la pathologie moléculaire de la pancréatite. Il faudra également comprendre les relations éventuelles entre la pancréatite sporadique et la pancréatite héréditaire et confirmer

si le mécanisme proposé correspond à une réalité biologique qui permettra peut-être de mieux comprendre la physiopathologie des pancréatites en général, qu'elles soient d'origine alcoolique ou d'apparition idiopathique.

Conclusion

L'extrême rapidité du succès du clonage positionnel permettant la caractérisation du gène de la pancréatite héréditaire quelques mois après sa localisation en 7q35 est due pour une grande part aux informations apportées par le séquençage total des 685 kb de la région du locus TCR β et

des huit gènes trypsinogènes de la région. Après les exemples déjà rapportés, tel celui du syndrome de Werner [13], cela souligne de façon éclatante la valeur du séquençage de larges régions du génome pour accélérer l'identification des gènes d'intérêt situés dans l'intervalle préalablement identifié par les techniques du clonage positionnel ■

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'un financement de l'Inserm (CRI 4U007B).

Claude Férec
Odile Raguènes

Centre de biogénétique, ETSBO, UBO, CHU, BP 454, 29275 Brest Cedex, France.

Jean-Denis Bignon

Établissement de transfusion sanguine de Loire-Atlantique/Vendée, Laboratoire d'histocompatibilité, 34, boulevard Jean-Monnet, BP 349, 44011 Nantes Cedex 01, France.

Thierry Georgelin
Louis Le Bodic

Clinique des maladies de l'appareil digestif, Hôpital Laënnec, BP 1005, Nantes Cedex 01, France.

Association Française
pour la Sauvegarde de la Main
Centre Permanent d'Initiation
à l'Environnement

Le VII^e Colloque de Sireuil-Les-Eyzies, organisé par l'Association Française pour la Sauvegarde de la Main, aura pour thème :

« MAIN ET COMMUNICATION :
DE LA PRÉHISTOIRE
À NOS JOURS »

les 4-5 et 6 septembre 1997
à Sireuil-Les-Eyzies-de-Tayac
(Dordogne)

Pour tous renseignements, s'adresser à :

Annie CAPLIEZ - Secrétariat du Colloque
16, boulevard Émile-Zola
92000 NANTERRE, France
Tél. : 01 46 69 66 99 - Fax : 01 47 21 39 44

RÉFÉRENCES

1. Comfort MW, Steinberg AG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 1952 ; 21 : 54-63.
2. Sato T, Saitoh Y. Familial chronic pancreatitis associated with pancreatic lithiasis. *Am J Surg* 1974 ; 127 : 511-7.
3. Mori I, Kimura N, Tadano T. Pancreatic lithiasis observed in father and daughter. *Rinsho-to-Kenkyu (Jap)* 1971 ; 48 : 3159.
4. Lin JT, Wang TH, Chen DS. Hereditary pancreatitis in a Chinese family. *J Clin Gastroenterol* 1990 ; 12 : 81-4.
5. Gross JB, Jones JD. Hereditary pancreatitis : analysis of experience to May 1969. In : Beck IT, Sinclair DG, eds. *The exocrine pancreas*. London : J. and A. Churchill, 1971 : 247-70.
6. Perrault J. Hereditary pancreatitis. *Pediatr Gastroenterol* 1994 ; 23 : 743-52.
7. Weissenbach J, *et al.* A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992 ; 359 : 794-801.
8. Le Bodic L, Bignon JD, Raguénès O, Mercier B, Georgelin T, Schnee M, Soulard F, Gagne K, Bonneville F, Muller JY, Bachner L, Férec C. The hereditary pancreatitis maps to long arm of chromosome 7. *Hum Mol Genet* 1996 ; 5 : 549-54.
9. Le Bodic L, Schnee M, Georgelin T, Soulard F, Férec C, Bignon JD, Sagniez M. An exceptional genealogy for hereditary chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1996 ; 41 : 1504-
10. Cornet E, Hardy M, Dupont H, Gordeef A. Pancréatites chroniques familiales primitives avec ectasies canalaies. *Rev Med Chir Mal Foie* 1963 ; 37 : 1-22.
11. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature Genet* 1996 ; 14 : 141-5.
12. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobases DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science* 1996 ; 272 : 1755-62.
13. Kahn A. Réparation, cancer et sénescence : le gène du syndrome de Werner. *Med Sci* 1996 ; 12 : 802-4.

TIRÉS À PART

C. Férec