

## Syndrome d'Alport, une maladie héréditaire du collagène de type IV

Laurence Heidet  
Lionel Forestier  
Corinne Antignac  
Marie-Claire Gubler

Le syndrome d'Alport est une maladie héréditaire associant une néphropathie hématurique évoluant vers l'insuffisance rénale terminale, une surdité de perception, fréquemment une atteinte oculaire et, rarement, des anomalies plaquettaires ou une léiomyomatose œsophagienne diffuse. Ce syndrome est hétérogène non seulement cliniquement, mais aussi sur le plan génétique. Il est secondaire à une anomalie de structure du collagène de type IV (dont six chaînes  $\alpha$  sont actuellement identifiées) principal constituant des membranes basales. Les mutations du gène *COL4A5*, localisé en Xq22, sont responsables du syndrome d'Alport lié à l'X tandis que le syndrome d'Alport récessif autosomique, plus rare, est secondaire à des mutations des gènes *COL4A3* ou *COL4A4* situés « tête à tête » sur le chromosome 2. Récemment, il a été montré que l'association très particulière syndrome d'Alport-léiomyomatose œsophagienne diffuse est liée à de larges délétions emportant la partie 5' des gènes *COL4A5* et *COL4A6* situés « tête à tête » sur le chromosome X. La prolifération des cellules musculaires lisses œsophagiennes pourrait être due, soit à la présence de chaîne  $\alpha 6(IV)$  tronquée dans la membrane basale, soit à une mutation avec « gain de fonction » d'un troisième gène situé dans le second intron du gène *COL4A6*.

### ADRESSE

L. Heidet: poste d'accueil à l'Inserm. L. Forestier: ingénieur d'étude stagiaire. C. Antignac: directeur de recherche à l'Inserm. M.C. Gubler: directeur de recherche à l'Inserm. Inserm U. 423, Tour Lavoisier, 6<sup>e</sup> étage, hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

### TIRÉS À PART

L. Heidet.

**L**e syndrome d'Alport est une affection héréditaire caractérisée par l'association d'une néphropathie hématurique évoluant vers l'insuffisance rénale chronique, et d'une surdité de perception d'évolution également progressive. Il est responsable d'environ 2% des cas d'insuffisance rénale terminale. La néphropathie est caractérisée par des anomalies ultrastructurales des membranes basales glomérulaires (MBG). Des anomalies du

collagène de membrane basale, le collagène de type IV, ont été mises en cause par les efforts conjoints des morphologistes, des biochimistes et des biologistes moléculaires. L'identification de mutations dans les gènes codant pour différentes chaînes de collagène IV a permis de mieux comprendre l'hétérogénéité clinique, immunohistochimique et génétique de ce syndrome. Cependant, les corrélatons entre génotypes et phénotypes doivent encore être précisées et

## RÉFÉRENCES

1. Alport AC. Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br Med J* 1927; 1: 504-6.
2. Atkin CL, Gregory MC, Border WA. Alport syndrome. In: Schrier RW, Gottschalk CW, eds. *Diseases of the kidney*. Boston: Little Brown, 1988: 617-41.
3. Gubler MC, Antignac C, Deschênes G, Knebelmann B, Hors-Cayla MC, Grünfeld JP, Broyer M, Habib R. Hétérogénéité génétique, clinique et morphologique dans le syndrome d'Alport. In: Funck-Brentano JL, Bach JF, Kreis H, Grünfeld JP, eds. *Actualités Néphrologiques 1992*. Paris: Flammarion, 1992: 15-33.
4. Hinglais N, Grünfeld JP, Bois E. Characteristic ultrastructural lesion of the glomerular lesion of the glomerular basement membrane in progressive hereditary nephritis (Alport's syndrome). *Lab Invest* 1972; 27: 473-87.
5. Spear GS, Slusser RJ. Alport's syndrome: emphasizing electron microscopic studies of the glomerulus. *Am J Pathol* 1972; 69: 213-24.
6. McCoy RC, Johnson KH, Stone WJ, Wilson CB. Variation in glomerular basement membrane antigen in hereditary nephritis (abstract). *Lab Invest* 1976; 34: 325-6.
7. Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 1989; 180: 487-502.
8. Van der Rest M. Biologie du collagène et maladies héréditaires de la matrice extracellulaire. *Med Sci* 1987; 3: 411-20.
9. Giry-Lozinguez C, Kleman J, Van der Rest M. Interactions moléculaires et modularité des protéines au sein des matrices extracellulaires. *Med Sci* 1994; 10: 1234-43.
10. Wieslander J, Barr JF, Butkowski R, Edwards SJ, Bygren P, Heinegard D, Hudson BG. Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane. localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3838-42.
11. Butkowski RJ, Langeveld JPM, Wieslander J, Hamilton J, Hudson BG. Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1987; 262: 7874-7.
12. Kashtan C, Fish AJ, Kleppel M, Yoshioka K, Michael AF. Nephritogenic antigen determinants in epidermal and renal basement membranes of kindreds with Alport-type familial nephritis. *J Clin Invest* 1986; 78: 1035-44.
13. Atkin CL, Hasstedt SJ, Menlove L, Cannon L, Kirschner N, Schwartz C, Nguyen K, Skolnick MH. Mapping of Alport syndrome to the long arm of the X chromosome. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 249-55.

les mécanismes responsables de la détérioration progressive de la fonction rénale restent à élucider.

### **Le syndrome d'Alport lié à l'X**

Dans la famille rapportée en 1927 par A. Cecil Alport [1], les sujets de sexe masculin présentaient une surdité associée à une néphropathie évoluant vers l'insuffisance rénale et la mort au cours de la deuxième décennie, tandis que les femmes, hématuriques, et présentant parfois une surdité, avaient une survie prolongée suggérant une transmission selon un mode dominant lié à l'X. Ce mode de transmission est observé dans environ 85 % des cas.

Chez les sujets de sexe masculin, l'hématurie est constante, précoce, parfois détectée dès les premiers jours de vie, souvent macroscopique dans l'enfance. L'aggravation de la néphropathie, constante chez l'homme, est précédée par l'apparition et l'augmentation progressive d'une protéinurie évoluant vers un syndrome néphrotique dans environ 40 % des cas. Chez les femmes, l'hématurie est le plus souvent microscopique et isolée. Elle est parfois intermittente mais 5 % seulement des femmes transmettrices sont totalement asymptomatiques tandis qu'environ 10 % d'entre elles développeront une insuffisance rénale. La rapidité d'évolution de la néphropathie chez les sujets de sexe masculin diffère selon les familles, permettant d'opposer des formes «juvéniles», où l'insuffisance rénale terminale survient autour de l'âge de 20 ans et où l'évolution intrafamiliale est très stéréotypée, à des formes dites «adultes» où l'âge auquel le malade atteint le stade d'insuffisance rénale est plus avancé, de l'ordre de 40 ans, et également plus dispersé [2, 3].

La surdité est une surdité de perception. Elle porte initialement sur les fréquences aiguës et n'est détectée que par audiométrie. Elle s'étend ensuite aux fréquences conversationnelles, et son évolution est en général parallèle à celle de la néphropathie. Elle peut être compensée par une prothèse auditive. L'existence de néphropathies héréditaires en tout point identiques au syndrome d'Alport mais sans surdité a fait couler

beaucoup d'encre jusqu'à ce que les études de biologie moléculaire démontrent que ces néphropathies et le syndrome d'Alport sont alléliques.

Des anomalies oculaires touchant le cristallin et/ou la rétine ont été décrites chez environ 30 % des malades. Elles soulignent le caractère systémique du syndrome. Le lenticône antérieur, spécifique du syndrome d'Alport, est une protrusion conique de la face antérieure du cristallin. Il se développe progressivement, presque exclusivement chez les sujets de sexe masculin, et peut être responsable de myopie. Les anomalies rétinienues, asymptomatiques, sont également spécifiques. Elles sont caractérisées par une image en cocarde de la région maculaire, la macula rouge foncée étant entourée d'une couronne de grains blanc jaunâtre, développés dans la partie la plus superficielle de la rétine. Ces lésions oculaires sont toujours associées aux formes juvéniles de syndrome d'Alport.

On a également décrit d'autres manifestations extrarénales, la léiomyomatose œsophagienne diffuse, la thrombopathie à plaquettes géantes, sur lesquelles nous reviendrons.

Les études histologiques, en microscopie optique, ont été décevantes: les reins sont optiquement normaux chez les enfants les plus jeunes, puis des lésions glomérulaires non spécifiques se développent. Ce sont les études ultrastructurales qui ont permis l'identification de lésions spécifiques touchant la MBG [4, 5]. Ces lésions associent un épaississement irrégulier de la MBG et une fragmentation, un feuilletage de la lamina densa qui limite ainsi des zones claires contenant des microgranulations (figure 1). L'épaississement de la MBG est le plus souvent diffus chez l'adulte, alors qu'il est segmentaire chez l'enfant où un deuxième type d'anomalie, la membrane basale mince, lui est associé et peut être prédominant (figure 1) [3]. A partir de ces constatations, l'hypothèse d'une anomalie d'un des constituants biochimiques de la MBG a été envisagée.

### **La biochimie sur la piste du collagène de type IV**

En 1976, McCoy *et al.* décrivent l'absence de fixation sur les MBG de

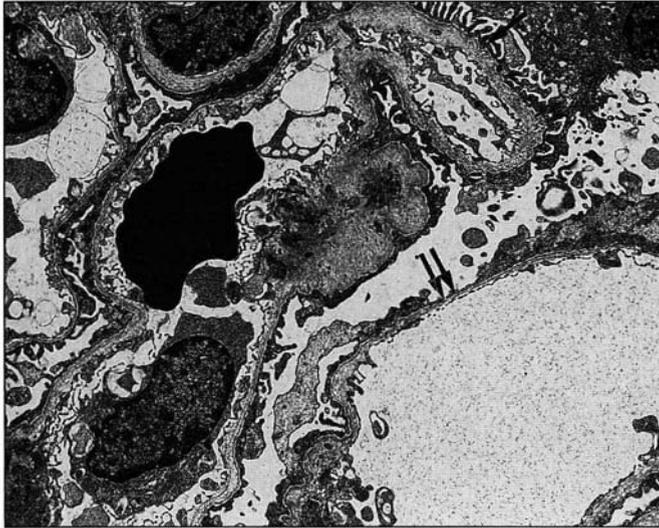


Figure 1. **Anomalies ultrastructurales de la MBG d'un garçon de 13 ans atteint de syndrome d'Alport. Extrême irrégularité de son épaisseur et de sa structure avec alternance de segments épais à versant externe festonné (↗) et de segments anormalement minces (↘). Dans les segments épais, la lamina densa est feuilletée.** (x 5000).

sujets atteints de syndrome d'Alport, d'un anticorps anti-MBG développé chez un malade atteint de syndrome d'Alport ayant reçu un greffon rénal [6]. Cette observation fut par la suite confirmée par l'utilisation du même type de sérum, de sérum de malades atteints de syndrome de Goodpasture (néphropathie auto-immune caractérisée par la présence d'anticorps anti-MBG), ou d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène GP, antigène de structure de la MBG reconnu par les anticorps de patients atteints de syndrome de Goodpasture (*m/s n° 3, vol. 4, p. 197*). L'absence de fixation de ces anticorps était observée chez la majorité des sujets de sexe masculin, mais n'était pas constante. Chez les femmes, les résultats étaient variables. Ces observations renforcèrent l'hypothèse d'une anomalie biochimique primitive de la MBG et orientèrent les travaux vers un des principaux constituants des membranes basales, le collagène de type IV.

Le collagène de type IV est composé, comme les autres collagènes, de trois chaînes  $\alpha$  enroulées en hélice [7-9] (*m/s n° 5, vol. 7, p. 510*) (figure 2A). Chaque chaîne est constituée d'un long domaine « collagénique » d'environ 1 400 résidus, comportant une glycine tous les trois acides aminés (Gly-X-Y). La glycine est le plus petit des acides aminés et sa présence tous les trois acides aminés est

essentielle pour permettre l'enroulement en hélice de trois chaînes  $\alpha$ . Le collagène de type IV est non fibrillaire, et présente un certain nombre de particularités: le domaine collagénique comporte une vingtaine de courtes interruptions non collagéniques, qui jouent probablement un rôle dans sa flexibilité; à l'extrémité aminotermine de la molécule, le domaine dit 7S, de 20 à 30 acides aminés, comporte des résidus cystéine impliqués dans les liaisons intermoléculaires; à l'extrémité carboxyterminale persiste un domaine non collagénique dit NC1, d'environ 220 résidus, constitué de deux moitiés homologues contenant chacune six cystéines, responsable de la formation de ponts disulfures intra- et intermoléculaires. Ces propriétés permettent l'organisation du collagène IV en un réseau plan à la fois flexible et résistant dans les membranes basales (figure 2B).

Dans le cadre du syndrome d'Alport, les recherches portèrent initialement sur le collagène de type IV dit « classique », le seul alors connu, composé de l'association de 2 chaînes  $\alpha 1$  et d'une chaîne  $\alpha 2$  et dont l'expression est ubiquitaire. Elles n'ont permis aucune conclusion. En effet, les anticorps anti-GP ne reconnaissaient pas les peptides obtenus par digestion trypsique ou peptidique de collagène IV de membrane basale placentaire; les anticorps anti-collagène IV

préparés contre ces peptides se fixaient normalement sur les MBG de sujets atteints de syndrome d'Alport.

C'est grâce aux travaux de l'équipe de Hudson (Kansas City, KA, USA), qu'une nouvelle étape fut franchie dans la connaissance du syndrome

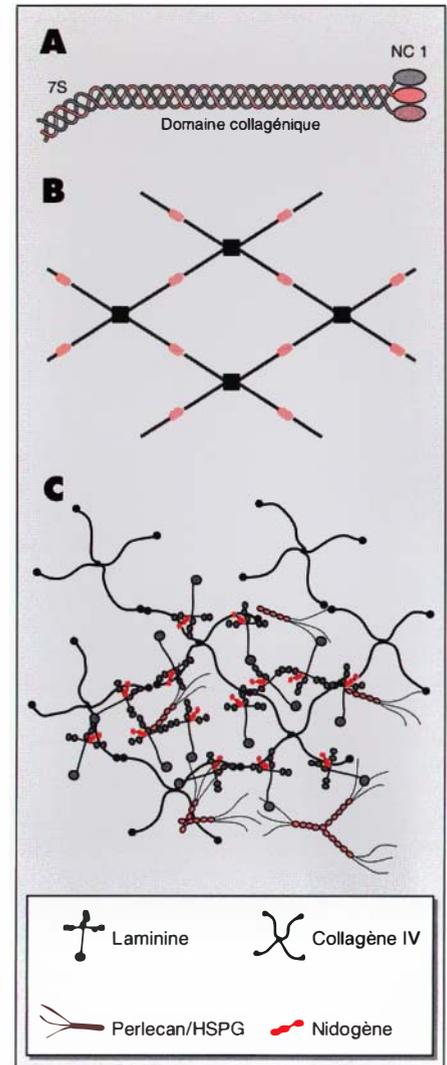


Figure 2. **Structure du collagène IV. A. Structure en triple hélice de la molécule de collagène de type IV. B. Organisation en réseau des molécules de collagène IV grâce à la formation de dimères au niveau des domaines NC1 et de tétramères au niveau des domaines 7S. C. Organisation tridimensionnelle du réseau de collagène IV et des autres molécules de la membrane basale selon Giry-Loringuez et al. [9] HSPG: heparan sulfate protéoglycanes.**

## RÉFÉRENCES

14. Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB, Tryggvason K. Identification of a distinct type IV collagen chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1606-10.

15. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason K. Identification of mutations in the *COL4A5* collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990; 247: 1224-7.

16. Heikkilä P, Soininen R. The type IV collagen family. In: Tryggvason K, ed. *Molecular pathology and genetics of Alport syndrome*. Basel: Karger, 1996: 105-29.

17. Tryggvason K, Zhou J, Hostikka SL, Shows TB. Molecular genetics of Alport syndrome. *Kidney Int* 1990; 43: 38-44.

18. Antignac C, Knebelmann B, Drouot L, Gros F, Deschênes G, Hors-Cayla MC, Zhou J, Tryggvason K, Grünfeld JP, Broyer M, Gubler MC. Deletions in the *COL4A5* collagen gene in X-linked Alport syndrome. Characterization of the pathological transcripts in nonrenal cells and correlation with disease expression. *J Clin Invest* 1994; 93: 1195-207.

19. Renieri A, Bruttini M, Galli L, Zanelli P, Neri T, Rossetti S, Turco A, Heiskari N, Zhou J, Gusmano R, Massella L, Banfi G, Scolari F, Sessa A, Rizzoni G, Tryggvason K, Pignatti PF, Savi M, Ballabio A, De Marchi M. X-linked Alport syndrome: an SSCP-based mutation survey over all 51 exons of the *COL4A5* gene. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1192-204.

20. Knebelmann B, Breillat C, Forestier L, Arrondel C, Jacassier D, Giatras I, Drouot L, Deschênes G, Grünfeld JP, Broyer M, Gubler MC, Antignac C. Spectrum of mutations in the *COL4A5* collagen gene in X-linked Alport syndrome. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1221-32.

21. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Gianelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1773-8.

22. Koenig M, Campuzano V, Cossée M, Mandel J. Ataxie de Friedreich: les expansions de triplets frappent encore. *Med Sci* 1996; 12: 431-5.

23. Kashtan CE, Kleppel MM, Gubler MC. Immunohistochemical findings in Alport syndrome. In: Tryggvason K, ed. *Molecular pathology and genetics of Alport syndrome*. Basel: Karger, 1996: 142-53.

24. Nakanishi K, Yoskikawa N, Iijima K, Nakamura H. Expression of Type IV collagen  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  chain mRNA in X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 938-45.

d'Alport [10, 11]. En utilisant des MBG de bœuf, et surtout en digérant ces MBG par la collagénase qui laisse intactes les structures non collagéniques, Wieslander *et al.* obtinrent des hexamères de domaines NCI, qui, après dissociation, s'avèrent contenir les domaines NCI des chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et ceux de deux nouvelles chaînes de collagène de type IV, qui furent appelées  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$ . Ils montrèrent que l'antigène GP, impliqué à la fois dans le syndrome de Goopasture et le syndrome d'Alport, était localisé dans le domaine NCI de la chaîne  $\alpha 3$ . Les « nouvelles » chaînes avaient une distribution sélective dans les tissus: elles étaient exprimées dans les MBG, les membranes basales des tubes distaux, les membranes basales spécialisées de l'œil, de l'oreille interne, et dans celles du plexus choroïde et du poumon. En outre, chez environ deux malades sur trois présentant un syndrome d'Alport lié à l'X, les anticorps dirigés contre le domaine NCI de la chaîne  $\alpha 3$ (IV) ne se fixaient pas sur les MBG. On pensait alors avoir découvert la protéine responsable du syndrome d'Alport.

Cependant, parallèlement à ces études, Kashtan dans le groupe de Minneapolis démontre que le sérum d'un patient atteint de syndrome d'Alport, transplanté et ayant développé des anticorps anti-MBG, reconnaissait un antigène différent des domaines NCI des quatre chaînes de collagène IV connues, présent dans la membrane basale dermo-épidermique. Il mit en évidence une anomalie de distribution de cet antigène dans la membrane basale dermo-épidermique de patients atteints de syn-

drome d'Alport, et émit l'hypothèse que cet antigène correspondait à une cinquième chaîne de collagène de type IV dont l'anomalie serait le substratum biochimique du syndrome d'Alport [12].

## La génétique moléculaire sur la piste de la chaîne $\alpha 3$ ... et le clonage de la chaîne $\alpha 5$

L'étude de la coségrégation de marqueurs polymorphes de l'ADN et de la maladie dans quelques familles nucléaires permet de localiser le gène responsable du syndrome d'Alport lié à l'X sur le bras long du chromosome X, dans la région Xq22 [13]. Un peu plus tard, en explorant une banque d'ADNc de placenta avec un oligonucléotide comportant une séquence conservée du domaine NCI des collagènes de type IV, et en isolant les clones positifs qui n'hybridaient pas avec les sondes d'ADNc des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ (IV), l'équipe de Tryggvason en Finlande clonait un gène de collagène de type IV qui ne codait ni pour la chaîne  $\alpha 3$  ni pour la chaîne  $\alpha 4$  (dont une partie de la séquence protéique était connue). Ce gène, appelé *COL4A5*, était localisé en Xq22 par hybridation *in situ* et par hybridation d'ADN d'hybrides somatiques (*m/s* n° 6, vol. 6, p. 601, n° 7, vol. 6, p. 710) [14]. Il constituait alors le gène candidat majeur du syndrome d'Alport lié à l'X. Très rapidement la même équipe rapportait, chez deux patients, des remaniements de l'ADN observés par *Southern blot* avec des sondes codant pour la partie 3' du gène: il s'agissait d'une délétion et d'une mutation ponctuelle introduisant un site de restriction *PstI* [15].

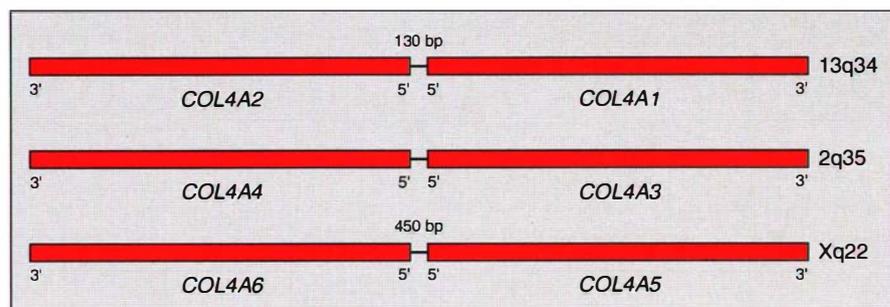


Figure 3. Organisation des 6 gènes de collagène IV groupés par paires sur 3 chromosomes. La distance entre les deux gènes COL4A4 et COL4A3 n'a pas été déterminée avec précision.

## Les gènes de collagène de type IV

Actuellement, six chaînes  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  du collagène de type IV sont identifiées (revue dans [16]). Les chaînes  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  (IV) sont exprimées dans toutes les membranes basales, alors que les chaînes  $\alpha 3$ - $\alpha 6$  (IV) ont un profil d'expression plus réduit. Ces chaînes sont codées par 6 gènes, *COL4A1*-*COL4A6*, qui ont une organisation génomique tout à fait particulière puisqu'ils sont regroupés deux par deux sur trois chromosomes (figure 3). Chacune des paires de gènes présente la même organisation « tête à tête », avec une orientation transcriptionnelle inverse, les extrémités 5' de chacun des deux gènes étant séparées par moins de 500 paires de bases. La caractérisation de la structure primaire de ces chaînes a révélé des analogies importantes, en particulier au niveau du domaine NCI, qui permettent de distribuer ces chaînes en deux classes:  $\alpha 1$ -like, comportant les chaînes  $\alpha 1$ , 3 et 5, et  $\alpha 2$ -like, comportant les chaînes  $\alpha 2$ , 4 et 6. Cela suggère l'existence d'un gène ancestral commun qui s'est d'abord dupliqué au même locus, puis ces deux gènes se sont tripliqués sur deux autres chromosomes. La caractérisation des premiers clones génomiques chez l'homme comme chez la souris a permis de montrer que la taille des exons des gènes de collagène de type IV ne répondait pas à la règle des multiples de 54 paires de bases observée dans les collagènes fibrillaires. De plus la grande taille des introns, s'ajoutant au nombre important d'exons (de 45 à 51, respectivement, pour les gènes *COL4A6* et *COL4A5*) explique l'étendue importante de ces gènes qui a pu être estimée par cartographie en électrophorèse en champ pulsé à 100-160 kb pour *COL4A1*, 230-250 kb pour *COL4A5*, et environ 400 kb pour *COL4A6*. La structure intron-exon a été totalement caractérisée pour les gènes *COL4A1*, *COL4A2*, *COL4A5* et *COL4A6*, ainsi que pour la partie 3' des gènes *COL4A3* et *COL4A4*. Des transcrits alternatifs ont été rapportés dans le rein pour le gène *COL4A3*, dans le rein et la peau pour le gène *COL4A5*. Il n'existe aucune preuve que ces transcrits sont traduits en protéines. S'il y a traduction,

les peptides en résultant comporteraient une partie C-terminale dépourvue de domaine NCI, ou ayant un domaine NCI tronqué. L'étude des messagers par *Northern blot* a montré que les six chaînes de collagène sont synthétisées dans le rein, le poumon, le muscle squelettique, les méninges et le cœur. Des transcrits de tailles différentes sont retrouvés en *Northern blot* pour les chaînes  $\alpha 4$  (IV) (7,5 et 10 kb dans le rein, le poumon, et le muscle squelettique) et  $\alpha 5$  (IV) (5, 7 et 7,3 kb dans le placenta). Ces transcrits représentent des messagers alternatifs et/ou des sites différents de polyadénylation.

La régulation de la transcription des gènes de collagène IV semble complexe. Elle n'a été étudiée que pour les gènes *COL4A1* et *COL4A2*. Les sites de début de la transcription de ces deux gènes sont séparés par une région de 130 paires de bases représentant un promoteur bidirectionnel dépourvu de boîte TATA, mais comportant plusieurs sites potentiels de liaison de facteurs transcriptionnels, notamment cinq boîtes GC liant le facteur Sp1. En outre, des éléments de régulation de type *enhancer* et *silencer* ont été mis en évidence dans les introns des deux gènes *COL4A1* et *COL4A2* chez la souris, certains réglant l'activité des deux gènes, d'autres semblant spécifiques d'une chaîne. Ces éléments jouent probablement un rôle important dans la détermination du rapport  $\alpha 1/\alpha 2$ . Il est intéressant de noter que les chaînes  $\alpha 3$  (IV) et  $\alpha 4$  (IV) sont co-exprimées dans les mêmes tissus. En revanche, les chaînes  $\alpha 5$  (IV) et  $\alpha 6$  (IV) sont co-exprimées dans certains tissus (peau et œsophage par exemple), mais pas dans tous: la chaîne  $\alpha 5$  (IV) est exprimée dans le rein au niveau de la MBG, ce qui n'est pas le cas de la chaîne  $\alpha 6$  (IV). Récemment il a été montré que le gène *COL4A6* comporte deux exons I, alternativement transcrits à partir de deux promoteurs. Cette organisation pourrait être déterminante pour le rapport d'expression des deux gènes dans différents organes.

## Mutations du gène COL4A5

Près de 200 mutations différentes ont été rapportées chez des patients pré-

sentant un syndrome d'Alport de transmission liée à l'X (en excluant les formes associées à une léiomyomatose œsophagienne, qui seront discutées plus bas) [16-20]. Dans environ 10% des cas, ces mutations sont des remaniements importants impliquant une partie plus ou moins étendue du gène. Il s'agit de délétions de taille variable pouvant aller jusqu'à la délétion complète du gène. Dans les autres cas, tous les types de mutations ponctuelles, disséminées tout le long du gène, ont été décrites (faux sens, non sens, mutations dans les sites d'épissage et petites délétions ou insertions provoquant une modification du cadre de lecture). Un pourcentage important (38%) des mutations faux sens aboutit à la substitution d'une glycine (acide aminé clé du motif collagénique Gly-X-Y) par un autre acide aminé. Ce type de mutation est fréquemment rencontré dans toutes les maladies héréditaires du collagène, provoquant un défaut d'enroulement de la triple hélice et des modifications post-traductionnelles. En dehors de quelques cas de mutations récurrentes survenant la plupart du temps dans un dinucléotide CpG, une mutation différente est observée dans chaque famille.

Tous les types de mutations sont observés dans les formes juvéniles. En revanche, seules des mutations faux sens (remplacement d'une glycine dans le domaine collagénique ou d'un acide aminé très conservé dans le domaine non collagénique) ou des mutations dans un site d'épissage, et plus particulièrement celles qui aboutissent à un épissage anormal permettant le maintien du cadre de lecture, ont été rapportées dans les formes de type adulte avec ou sans surdité.

Bien que pratiquement toute la séquence codante ait maintenant pu être explorée, dans 40% à 50% des cas selon les séries, aucune mutation du gène *COL4A5* n'a pu être détectée. Dans certains cas, en particulier dans les cas sporadiques ou dans les familles qui ont peu de sujets atteints, ce qui ne permet pas d'affirmer avec certitude une transmission liée à l'X, on trouvera peut-être des mutations des gènes *COL4A3* ou *COL4A4*, responsables du syndrome d'Alport autosomique récessif (voir

## RÉFÉRENCES

25. Naito I, Shinichiro K, Nomura S, Sado Y, Osawa G, and the Japanese Alport Network. Relationship between *COL4A5* gene mutation and distribution of type IV collagen in male X-linked Alport syndrome. *Kidney Int* 1996; 50: 304-12.
26. Thorner P, Jansen B, Baumal R, Valli VEO, Goldberger A. Samoyed hereditary glomerulopathy. *Lab Invest* 1987; 56: 435-43.
27. Zheng K, Thorner PS, Marrano P, Baumal R, McInnes RR. Canine X chromosome-linked hereditary nephritis: a genetic model for human X-linked hereditary nephritis resulting from a single base mutation in the gene encoding the  $\alpha 5$  chain of collagen type IV. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3989-93.
28. Thorner PS, Zheng K, Kalluri R, Jacobs R, Hudson BG. Coordinate gene expression of the  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , and  $\alpha 5$  chains of collagen type IV. *J Biol Chem* 1996; 271: 13821-8.
29. Gubler MC, Knebelmann B, Beziau A, Broyer M, Pirson Y, Haddoum F, Kleppel MM, Antignac C. Autosomal recessive Alport syndrome: immunohistochemical study of type IV collagen chain distribution. *Kidney Int* 1995; 47: 1142-7.
30. Antignac C, Zhou J, Sanak M, Cochat P, Roussel B, Deschênes G, Gros F, Knebelmann B, Hors-Cayla MC, Tryggvason K, Gubler MC. Alport syndrome and diffuse leiomyomatosis: deletions in the 5' end of the *COL4A5* collagen gene. *Kidney Int* 1992; 42: 1178-83.
31. Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, de Paepe A, Tryggvason K, Reenders ST. Deletion of the paired  $\alpha 5$ (IV) and  $\alpha 6$ (IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science* 1993; 261: 1167-9.
32. Heidet L, Dahan K, Zhou J, Xu Z, Cochat P, Gould JDM, Leppig KA, Proesmans W, Guyot C, Guillot M, Roussel B, Tryggvason K, Grünfeld JP, Gubler MC, Antignac C. Deletions of both  $\alpha 5$ (IV) and  $\alpha 6$ (IV) collagen genes in Alport syndrome and in Alport syndrome associated with smooth muscle tumours. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 99-108.
33. Dahan K, Heidet L, Zhou J, Mettler G, Leppig KA, Proesmans W, David A, Roussel B, Mongeau JG, Gould JMD, Grünfeld JP, Gubler MC, Antignac C. Smooth muscle tumors associated with X-linked Alport syndrome: carrier detection in females. *Kidney Int* 1995; 48: 1900-6.
34. Schoenmakers E, Wanschura S, Mols R, Bullerdiel J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, *HMGI-C*, in benign mesenchymal tumours. *Nature Genet* 1995; 10: 436-43.
- plus loin). Toutefois, cela ne peut rendre compte des mutations « manquantes » dans les familles pour lesquelles une transmission liée à l'X est irréfutable. On sait maintenant que le gène *COL4A6* ne peut être incriminé (la chaîne  $\alpha 6$ (IV) n'est pas synthétisée dans la MBG), et il est possible qu'il existe des « points chauds » de mutation dans des régions du gène *COL4A5* qui n'ont pas été explorées (régions promotrices et/ou régions introniques, en particulier grands introns 1 et 2) comme cela a pu être montré dans l'hémophilie A [21] ou, plus récemment, dans l'ataxie de Friedreich [22].

### Retentissement protéique des mutations de COL4A5

L'analyse immunohistologique de la distribution des différentes chaînes de collagène IV dans les MBG et les membranes basales dermo-épidermiques de sujets atteints de syndrome d'Alport lié à l'X permet d'aborder le problème du retentissement protéique des mutations de *COL4A5*. Chez environ deux tiers des malades, cette distribution est anormale: la chaîne  $\alpha 5$ (IV), mais également les chaînes  $\alpha 3$ -4(IV) et  $\alpha 6$ (IV), sont absentes des membranes basales rénales (et dermo-épidermiques) chez les sujets de sexe masculin, tandis que leur distribution est discontinue chez les femmes (figure 4) (revue dans [23]). Ces constatations ont fait suggérer qu'une anomalie de conformation de la chaîne  $\alpha 5$  du collagène IV peut empêcher l'intégration normale des chaînes  $\alpha 3$ -4(IV) et  $\alpha 6$ (IV) dans le réseau de collagène IV. Une étude récente portant sur l'expression des gènes *COL4A5*, *COL4A3* et *COL4A4* par PCR quantitative à partir des ARN des reins des patients [24] va dans ce sens puisqu'elle a montré une expression normale de ces différents gènes. De plus, la surexpression des chaînes  $\alpha 1$ -2(IV) observée dans les MBG conforte les études suggérant que les chaînes  $\alpha 1$ -2(IV) forment un réseau collagénique indépendant de celui des chaînes  $\alpha 3$ -4(IV).

Ces anomalies sont constamment observées chez les malades ayant des délétions mais peuvent également être associées à des mutations ponctuelles (non-sens, mutations dans un site

d'épissage) et même à des mutations faux sens responsables d'une substitution de glycine dans le domaine collagénique [18, 20, 25]. Quel que soit le type de mutation, ces anomalies sont observées dans les formes « juvéniles » de syndrome d'Alport. Dans d'autres familles, des mutations faux sens aboutissant également à une substitution de glycine peuvent s'accompagner d'une synthèse normale ou diminuée des différentes chaînes de collagène IV [20, 25].

### Un modèle animal de syndrome d'Alport lié à l'X

Dans une famille de chiens Samoyèdes, une néphropathie héréditaire transmise selon le mode dominant lié à l'X et due à une mutation non-sens du gène *COL4A5* représente un excellent modèle animal de syndrome d'Alport [26, 27]. Cette famille canine bien caractérisée est intéressante à plusieurs niveaux. Les biopsies rénales itératives ont permis d'analyser les modifications ultrastructurales progressives de la MBG en fonction du sexe et de montrer que les anomalies de distribution des différentes chaînes de collagène IV sont présentes dès la naissance. Surtout, l'anomalie immunohistochemique a été mise en évidence dans les membranes basales spécialisées de l'œil et de l'oreille interne, chez cet animal qui ne présente aucun symptôme d'atteinte extrarénale, démontrant ainsi qu'une anomalie de la composition biochimique de la membrane basale peut, dans certains tissus, rester asymptomatique. D'autre part, l'étude de l'expression des gènes de collagène de type IV dans les reins dans cette famille de chiens a non seulement montré une diminution très importante (de l'ordre de 90 %) de l'expression de *COL4A5*, mais aussi de *COL4A3* et *COL4A4* [28]. Ces résultats, différents de ceux rapportés chez l'homme atteint de syndrome d'Alport lié à l'X (chez qui la synthèse des chaînes  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , et  $\alpha 5$  était comparable à celle des contrôles), suggèrent qu'une mutation dans le gène *COL4A5* pourrait, par un mécanisme qui reste à déterminer, intervenir sur la régulation transcriptionnelle d'autres gènes de collagène de type IV, situés à distance sur le génome.

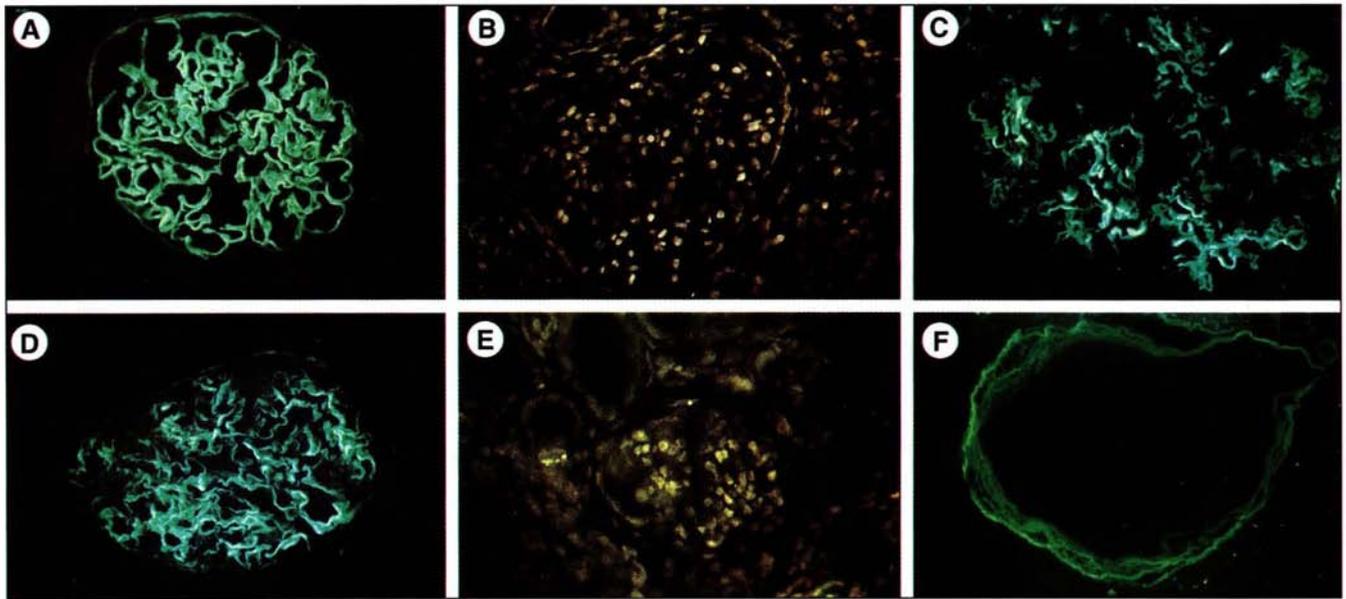


Figure 4. **Analyse immunohistologique des chaînes  $\alpha3(IV)$  (A, B, C, E) et  $\alpha5(IV)$  (D, F) dans les MBG d'un rein normal (A, D) et de reins de sujets atteints de syndrome d'Alport (B, C, E, F).** Dans le syndrome d'Alport lié à l'X (B, C), la chaîne  $\alpha3(IV)$  est absente des membranes basales rénales du sujet de sexe masculin (B) et la distribution discontinue de la même chaîne dans les membranes basales du sujet de sexe féminin (C), suggère une inactivation au hasard du chromosome X. Dans le syndrome d'Alport autosomique récessif (E, F), la chaîne  $\alpha3(IV)$  est absente de l'ensemble des membranes basales (E) tandis que la chaîne  $\alpha5(IV)$ , absente de la MBG est présente dans la membrane basale de la capsule de Bowmann (F).

Ainsi, les anomalies de synthèse des chaînes  $\alpha3(IV)$  et  $\alpha4(IV)$  dans les MBG des patients atteints de syndrome d'Alport liés à l'X pourraient faire intervenir des mécanismes de régulation au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel qui seraient différents selon le type de mutation.

A l'heure actuelle, différents groupes s'attachent à créer des modèles de souris transgéniques pour pouvoir entreprendre, sur un animal de petite taille, un programme de thérapie génique.

### **Le syndrome d'Alport récessif autosomique**

Ce mode de transmission a longtemps été méconnu et peu d'études lui ont été consacrées. Dans notre expérience, les patients présentent un syndrome d'Alport typique, de type juvénile, une surdité quasi constante et souvent des lésions oculaires caractéristiques. C'est la survenue de la maladie dans une seule génération, l'existence éventuelle d'une consanguinité, la gravité identique de la maladie chez les garçons et les filles qui suggèrent une transmission récessive autosomique.

Histologiquement les altérations ultrastructurales sont identiques à celles observées dans la forme liée à l'X.

Cette forme est secondaire à des mutations des gènes *COL4A3* ou *COL4A4*. Compte tenu de sa reconnaissance récente et de l'absence de caractérisation des régions intron-exon de ces gènes en dehors de la région non collagénique (nécessitant une approche de PCR inverse pour détecter les mutations), peu de mutations (environ 14) ont été rapportées jusqu'à maintenant. La plupart sont des mutations homozygotes détectées chez des enfants issus d'un mariage consanguin, mais quelques mutations hétérozygotes ont également été retrouvées. En fait, la recherche de mutations est fastidieuse puisqu'elle doit être réalisée dans deux grands gènes (*COL4A3* et *COL4A4*) et sur les deux allèles. Cependant, il s'agit de la seule approche qui permettrait de connaître la fréquence exacte des formes autosomiques (ce qui n'est pas sans conséquences sur le conseil génétique) et d'avoir une idée précise du phénotype des individus hétérozygotes. Certains, en effet, sont totale-

ment asymptomatiques tandis que d'autres présentent une hématurie microscopique. Il est possible que la maladie héréditaire dominante autosomique décrite sous le nom d'« hématurie familiale bénigne » corresponde en fait aux formes hétérozygotes de syndrome d'Alport récessif.

Dans ces formes récessives, des anomalies de distribution des chaînes de collagène IV sont observées dans la majorité des cas [29]. Elles se caractérisent, quel que soit le sexe, par la co-absence des chaînes  $\alpha3$ - $\alpha5(IV)$  dans la MBG contrastant avec la persistance de la synthèse des chaînes  $\alpha5$ - $\alpha6(IV)$  dans les membranes basales des tubes collecteurs et la membrane basale dermo-épidermique, c'est-à-dire dans les basales où les chaînes  $\alpha3$ - $\alpha4(IV)$  ne sont pas présentes.

### **Le syndrome d'Alport autosomique dominant**

Ce mode de transmission est rarement observé et, de ce fait, la maladie n'est pas bien caractérisée. Récemment, une liaison génétique au locus *COL4A3-COL4A4* a été mise en évidence dans une grande famille irlandaise.

daise. L'identification de la mutation étendrait le spectre de phénotypes associés aux mutations de *COL4A3*-*COL4A4*.

### **Syndrome d'Alport et transplantation rénale**

Environ 3 % à 4 % des malades atteints de syndrome d'Alport développent, après transplantation rénale, des anticorps anti-MBG responsables d'une glomérulonéphrite rapidement progressive et de la perte du greffon [6, 23]. Les anticorps retrouvés chez ces patients reconnaissent soit le domaine NCI de la chaîne  $\alpha 5$ (IV), soit le domaine NCI de la chaîne  $\alpha 3$ (IV) correspondant à l'antigène GP. Cette complication récidive en cas de nouvelle transplantation et peut toucher plusieurs membres d'une même famille. Une vingtaine d'observations détaillées ont été rapportées et ont permis de définir les caractères des sujets « à risque ». Il s'agit presque toujours de sujets de sexe masculin présentant une forme sévère de syndrome d'Alport et dont les études moléculaires montrent fréquemment (mais non constamment) des délétions partielles ou totales du gène *COL4A5*. La même complication a été observée chez deux femmes ayant une maladie récessive autosomique sévère avec mutations ponctuelles du gène *COL4A3*. L'allo-immunisation serait secondaire à l'introduction, par le greffon rénal, de MBG contenant des épitopes antigéniques normalement présents dans le domaine NCI du collagène IV mais non reconnu comme « soi » par les sujets receveurs. Il faut cependant souligner que les anticorps n'apparaissent pas chez de nombreux autres malades ayant le même type de mutation, ce qui suggère l'importance d'autres facteurs, immunologiques en particulier, dans leur survenue.

### **Syndrome d'Alport et thrombopathie**

L'association d'un syndrome d'Alport et d'une thrombopénie à plaquettes géantes a été décrite dans une douzaine de familles (*revue dans* [3]). Ces patients présentent des symptômes hématologiques, rénaux et auditifs très variables (avec parfois une variabilité intrafamiliale) : certains sont

asymptomatiques alors que d'autres présentent un syndrome hémorragique et/ou une néphropathie sévère. Dans plusieurs familles des inclusions dans les polynucléaires rappelant les inclusions de May-Hegglin\* ont été observées. Le syndrome semble transmis le plus souvent selon le mode dominant autosomique mais, à ce jour, sa pathogénie reste totalement inconnue.

### **Syndrome d'Alport et léiomyomatose œsophagienne diffuse**

La léiomyomatose œsophagienne diffuse est une tumeur de l'œsophage caractérisée par un épaississement diffus de la paroi œsophagienne liée à une prolifération bénigne des cellules musculaires lisses. Les symptômes (dysphagie, vomissements à répétition) apparaissent dans l'enfance, sont sévères, et conduisent dans la majorité des cas à une œsophagectomie chirurgicale. Dans la plupart des cas les patients développent également une symptomatologie respiratoire de type obstructif liée à une léiomyomatose bronchique. De plus, quelques femmes présentent une atteinte génitale avec hypertrophie clitoridienne et/ou léiomyomes utérins, périvaginaux, périrectaux, voire urétraux. Des formes sporadiques et familiales de cette affection ont été décrites, ces dernières étant le plus souvent liées à l'X et toujours associées à un syndrome d'Alport chez les patients de sexe masculin.

L'étude moléculaire de l'ADN de ces patients a montré dans tous les cas des délétions emportant la partie 5' des deux gènes *COL4A5* et *COL4A6* [30, 31]. Les chaînes  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  de collagène de type IV étant toutes deux synthétisées dans la membrane basale des cellules musculaires lisses de l'œsophage normal, et compte tenu du rôle maintenant bien connu de la matrice extracellulaire dans le contrôle de la différenciation cellulaire, l'hypothèse initialement proposée était celle d'une prolifération cellulaire liée à l'absence de la chaîne  $\alpha 6$ (IV) ou des

deux chaînes  $\alpha 5$ (IV) et  $\alpha 6$ (IV) dans la membrane basale des cellules musculaires lisses. L'étude, par électrophorèse en champ pulsé, de la taille et de la localisation des délétions chez une quinzaine de patients présentant cette association a montré que l'étendue des délétions dans le gène *COL4A5* était très variable, alors que les points de cassure dans le gène *COL4A6* étaient toujours situés dans l'intron 2 – de grande taille (150 kb) – de ce gène (à l'intérieur de cet intron, les points de cassure étaient de localisation variable, et pouvaient être distants de plus de 100 kb) (*figure 5*). Mais c'est surtout l'étude de l'ADN de quatre patients présentant un syndrome d'Alport sans léiomyomatose œsophagienne, connus pour avoir une délétion de la partie 5' du gène *COL4A5*, qui a remis en cause l'hypothèse d'une prolifération cellulaire liée à une mutation nulle du gène *COL4A6* (ou des deux gènes *COL4A5* et *COL4A6*). Ces quatre malades ont tous atteint un âge adulte et un examen œsophagien a permis d'éliminer toute tumeur. Alors que nous attendions des délétions n'affectant pas *COL4A6*, nous avons eu la surprise de mettre en évidence chez ces quatre patients des délétions s'étendant au-delà de l'intron 2 dans *COL4A6* (*figure 5*) : une délétion emporte l'ensemble du gène, et les trois autres ont des points de cassure dans l'intron 3 [30]. D'autre part, l'étude du génotype des membres de familles atteints de syndrome d'Alport avec léiomyomatose œsophagienne diffuse a montré que cette dernière se comporte comme une affection dominante avec pénétrance et expressivité complète chez les femmes [33], contrairement à la néphropathie du syndrome d'Alport lié à l'X, le plus souvent bénigne chez elles. En effet, toutes les femmes porteuses d'une délétion hétérozygote présentent une symptomatologie digestive sévère ayant conduit à une œsophagectomie. L'ensemble de ces résultats (effet dominant, points de cassure dans l'intron 2 de *COL4A6* dans tous les cas de léiomyomatose œsophagienne, et absence de tumeur dans les cas de délétion plus étendue) permettent de proposer deux autres hypothèses : (1) la présence dans la membrane basale musculaire lisse d'une chaîne  $\alpha 6$  tronquée de collagène de type IV

\* Inclusion basophile faite d'ARN, proche de la membrane cytoplasmique, rencontrée dans les polynucléaires neutrophiles au cours de certaines maladies infectieuses ou toxiques, ou d'anomalie héréditaire de May-Hegglin.

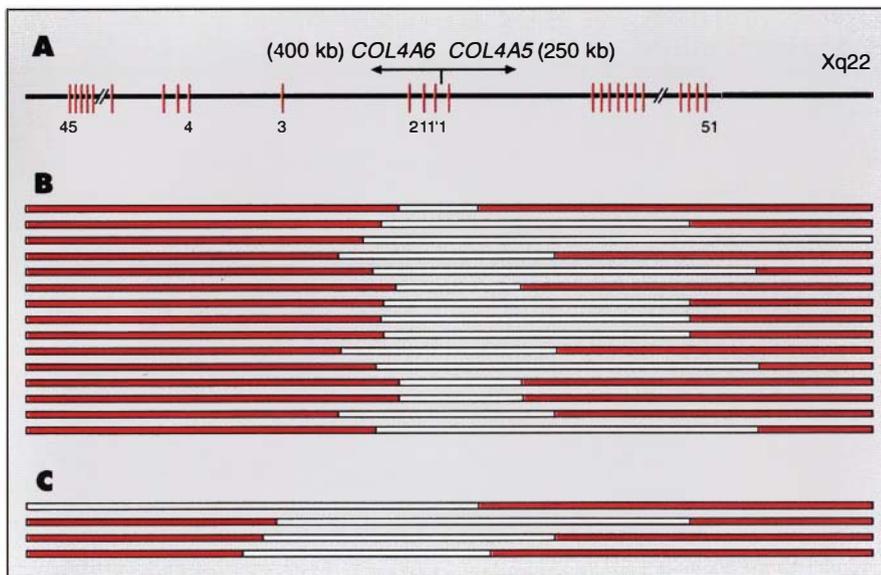


Figure 5. **Représentation schématique des délétions.** **A.** Organisation génomique des gènes COL4A5 et COL4A6 au locus Xq22. Les exons sont représentés sous forme de barres verticales. Le gène COL4A5 comporte 51 exons. Le gène COL4A6 comporte 46 exons incluant deux exons 1 alternativement transcrits. Les introns 2 et 3 du gène COL4A6 sont remarquablement grands (150 et 120kb respectivement). **B.** Délétions (rectangles blancs) observées chez 15 patients non apparentés présentant l'association syndrome d'Alport et léiomyomatose œsophagienne diffuse. L'étendue des délétions est variable dans COL4A5, mais tous les points de cassure dans COL4A6 sont localisés dans le deuxième intron du gène. **C.** Délétions (rectangles blancs) chez 4 patients non apparentés présentant un syndrome d'Alport sans tumeur œsophagienne et une délétion de la partie 5' de COL4A5. Les points de cassure dans COL4A6 sont tous situés au delà de l'exon 3.

pourrait exercer un effet dominant par déstabilisation des hétérotrimères de collagène dans lesquels elle s'intègre habituellement (l'absence totale de chaîne  $\alpha 6(\text{IV})$  pourrait être sans conséquence si d'autres isoformes de collagène de type IV peuvent la suppléer). Par RT-PCR, et en utilisant différents couples d'amorces localisés dans la séquence de l'ADNc du gène COL4A6, nous avons mis en évidence dans une tumeur d'un patient de sexe masculin, dont la délétion est caractérisée, l'existence d'un transcrite COL4A6 comportant l'exon 4 mais pas l'exon 3, et dont la signification reste à élucider; (2) la prolifération cellulaire pourrait être sans rapport avec le gène COL4A6, mais secondaire à l'atteinte d'un autre gène, localisé dans l'intron 2 de COL4A6, dont l'interruption par les délétions conduirait à une activation (mutation avec gain de fonction). A ce titre, les résultats rapportés récemment par une équipe belge étudiant les anomalies moléculaires des léio-

myomes utérins sporadiques et d'autres tumeurs mésoenchymateuses sont tout à fait intéressants [34]. Les anomalies caryotypiques, à type de translocation, intéressent constamment le bras long du chromosome 12, et les points de cassure sont toujours situés dans un intron de grande taille du gène HMGIC (codant pour une protéine de la famille des *high mobility group protein*, petites protéines nucléaires liant l'ADN et au rôle encore mal connu). Ces remaniements conduisent à l'expression de transcrits HMGIC tronqués ou chimériques très probablement impliqués dans le développement des tumeurs. Un tel modèle, avec un gène situé dans l'intron 2 de COL4A6, pourrait parfaitement expliquer l'ensemble des résultats. La recherche de gènes dans la région ainsi que l'étude du transcrite COL4A6 mis en évidence dans une tumeur permettront probablement de faire la lumière sur la pathogénie de la léiomyomatose œsophagienne diffuse ■

## Summary

### Alport's syndrome: hereditary mutations in the type IV collagen family

Alport syndrome is an inherited disorder characterized by progressive hematuric nephritis with structural defects of the glomerular basement membrane, and sensorineural deafness. Ocular abnormalities are frequently associated whereas macrothrombocytopenia or diffuse esophageal leiomyomatosis have been reported only in a few families. The disease is heterogeneous at both clinical and genetic levels. It occurs as a consequence of structural abnormalities in type IV collagen, the major constituent of basement membranes. Six genetically distinct chains of type IV collagen have been identified. While the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains are ubiquitous, the  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  chains distribution is restricted. Mutations in the COL4A5 gene located at Xq22, and encoding the  $\alpha 5(\text{IV})$  chain are responsible for X-linked Alport syndrome whereas COL4A3 or COL4A4 located « head to head » on chromosome 2 are involved in the rarer autosomal forms of the disease. Recently, large deletions removing the 5' end of both COL4A5 and COL4A6 genes, also arranged in a head to head fashion on chromosome X, have been reported in patients in whom the Alport syndrome is associated with diffuse esophageal leiomyomatosis. In these cases deletions encompass only the two first exons of COL4A6, the breakpoint being located in the second intron of COL4A6 whose size exceeds 65kb. Patients with a larger deletion in COL4A6 have Alport syndrome without diffuse esophageal leiomyomatosis. These results suggest that smooth muscle cell proliferation could be due to the presence of an abnormal truncated  $\alpha 6(\text{IV})$  chain within the muscular basement membrane, or by a dominant activating mutation of a third gene lying in the large second intron of COL4A6.