

PROJET DE RECHERCHE SUR LA POLYKYSTOSE AUTOSOMIQUE RÉCESSIVE (PKR)

■ De C.Loirat/ M.Peuchmaur

“Pour la deuxième année consécutive, l’AIRG a accordé la somme de 20.000 euro au projet des Professeurs Chantal Loirat et Michel Peuchmaur sur la PKR, intitulé : *“Registre National de la Polykystose Autosomique Récessive et de la Fibrose Hépatique et Congénitale : Corrélation génotype-phénotype et facteurs pronostics (1^{ère} phase du projet) / Phénotype des cellules épithéliales tubulaires dans la polykystose autosomique : relations avec le génotype (2^{ème} phase)”*.”

Il nous a semblé important de faire ici un point sur les avancées de cette étude, les investigations en cours et les perspectives attendues en terme de connaissance de la maladie, après vous avoir rappelé quels étaient les objectifs et justifications du projet initial :

■ I/ Rappel du projet initial (Appel d’offre 2004/2005) : introduction, justifications de la recherche, résultats attendus et perspectives.

La polykystose rénale autosomique récessive (PKR) est une des néphropathies héréditaires souvent grave de l’enfant, touchant 1/20000 enfants nés vivants. Elle est caractérisée par une dilatation des tubes collecteurs rénaux, une dysgynésie des voies biliaires et une fibrose des espaces portes.

Le phénotype clinique, rénal et hépatique, est en réalité variable. Les formes les plus sévères (environ 40 %) sont dépistées par les échographies anténatales précoces et conduisent le plus souvent en France à une interruption médicale de grossesse (IMG), ou entraînent le décès peu après la naissance, par insuffisance respiratoire liée à une hypoplasie pulmonaire.

Dans les formes moins sévères, les échographies anténatales restent normales jusqu’à un stade avancé de la grossesse. Ces enfants survivent pour la plupart à la période néonatale et on sait que 60 à 80 % d’entre eux auront encore des reins fonctionnels à 15 ans, le stade d’insuffisance rénale terminale (IRT) pouvant n’être atteint qu’à la fin de la 2^{ème} décennie ou pendant la 3^{ème} décennie, voire plus tard.

L’atteinte hépatique est également de gravité variable. Des accidents de cholangites peuvent menacer le pronostic vital dès la petite enfance. Les formes les plus sévères nécessitent une dérivation portocave pour hypertension portale tôt dans la vie. Mais de nombreux cas restent asymptomatiques pendant toute l’enfance ou jusqu’à l’âge adulte.

Des études récentes ont montré que la PKR est due à des mutations dans un seul gène, PKHD1. Le nombre de cas étudiés est actuellement limité et les corrélations entre le génotype et le phénotype restent à ce jour fragiles.

Le projet est double :

- constituer un registre du maximum de cas de PKR connus en France,
- étudier les mutations du gène PKHD1 dans tous ces cas de PKR.

Les résultats attendus et les perspectives sont les suivants :

1. Préciser le pronostic à long terme et répondre à des questions non résolues, telles que les indications de transplantation hépatique, ou le risque d’encéphalopathie en cas d’IRT et d’hémodialyse chez les patients ayant une dérivation portocave.

2. Mieux comprendre la physiopathologie de la maladie, par l’étude des corrélations entre le génotype et le phénotype, en particulier en terme de gravité clinique et anatomopathologique.

3. Permettre un diagnostic génétique direct lorsque le diagnostic de PKR est incertain chez un patient en vie, ou en anténatal lorsque le diagnostic est incertain dans le cas index, lorsqu’on ne dispose pas d’ADN du cas index ou lorsque des phénomènes de recombinaison rendent impossible un diagnostic indirect.

En améliorant les connaissances sur la maladie et les possibilités de diagnostic anté et postnatal, cette étude permettra une meilleure prise en charge des patients et de leurs familles.

■ II/ Bilan de la 1^{ère} phase de l'étude, fin 2005

Une cohorte de 72 fœtus ou enfants décédés dans les premiers jours de vie, présentant une polykystose rénale récessive (PKR) confirmée par l'étude histologique des reins et du foie, a pu être étudiée.

Dans la plupart des décès, il s'agissait du cas princeps dans la famille, dépisté par l'échographie anténatale avec des critères de gravité (énormes reins différenciés et hyperéchogènes, anamnios ou oligoamnios, vessie vide) dépistés tôt dans la grossesse.

Il n'existait aucune cohorte homogène de cette importance dans la littérature. En effet, les études génétiques publiées ces 2 dernières années par d'autres équipes concernent parfois des fœtus ou des enfants décédés à la naissance, mais également des enfants nés vivants.

Ces cohortes incluent donc des formes de PKR a priori moins sévères que les formes conduisant à des interruptions médicales de grossesse (IMG) en France.

1. Les études moléculaires du gène *PKHD1* ont été réalisées par le Dr. GERARD*, O. PASCAUD et A. BOURILLON, Techniciens de Recherche, et le Pr E. DENAMUR*.

119 mutations ont été identifiées, soit un taux de mutations identifiées de 83 %. 63 des 119 mutations identifiées (53%) sont des mutations entraînant une protéine tronquée. Le spectre des mutations s'avère très varié, puisque 72 mutations différentes ont été trouvées. Les mutations sont réparties sur tout le gène dans 40 exons, les mutations les plus fréquentes étant la T36M (14 fois) et les décalages du cadre de lecture c.9689 delA (12 fois) et c.5895 dupA (9 fois).

Cette étude est la première à rapporter l'épidémiologie des mutations de *PKHD1* en France. Quarante six (64 %) des mutations identifiées sont rapportées pour la première fois. Nous avons identifié 8 patients homozygotes pour la mutation retrouvée. Ceci est rarement rapporté dans la littérature et est particulièrement intéressant pour les études phénotypiques proposées, car l'homozygotie supprime la variabilité génétique à ce niveau.

Enfin, la répartition des mutations sur le gène permet de proposer une approche ciblée du séquençage, le ciblage de 6 exons identifiant 43,8 % des mutations. Le séquençage supplémentaire de 2 ou 6 exons permet ensuite une couverture de 49,5 ou 57,6 % des mutations.

2. Collecte des données concernant le phénotype des fœtus et des patients décédés.

Les informations qui permettront l'analyse des corrélations entre le génotype et le phénotype sont à ce jour collectées pour les 72 fœtus/enfants pour lesquels l'étude du gène est terminée.

Le travail a été réalisé par P. MISSY, Technicienne d'Etude Clinique à mi-temps sur ce projet depuis un an, qui a pu récupérer toutes les données utiles à partir des dossiers obstétricaux pré et post-nataux et de nombreux contacts (mails, courriers, téléphone) avec les obstétriciens, généticiens, foetopathologistes et les anatomopathologistes impliqués dans le suivi des grossesses, dans le conseil génétique, et dans l'analyse histologique après IMG ou décès.

3. L'analyse histologique des reins et des foies des fœtus/enfants décédés a été réalisée par le Dr. DELEZOIDE*, le Dr. GUBLER*, et le Dr R. BOUVIER*. La lecture a été faite sans connaissance de la mutation, de manière indépendante par chacun des lecteurs, suivie d'un consensus pour la réponse à chaque information collectée.

A ce jour, il ressort de ce travail d'une part que le diagnostic de PKR était exact dans tous les cas, d'autre part que l'expression histologique au niveau rénal et hépatique est d'importance variée.

Les corrélations entre le génotype et le phénotype vont pouvoir être analysées et permettre de répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les corrélations entre la gravité des lésions rénales et hépatiques, et le type de mutation du gène *PKHD1* ?
- L'importance variable des lésions de PKR au niveau rénal et hépatique est-elle liée exclusivement au type de mutation du gène *PKHD1*, ou bien y a-t-il des variations liées à l'âge gestationnel au moment de l'IMG ?
- La gravité des lésions rénales et hépatiques était-elle parallèle, ou y a-t-il dissociation entre la gravité respective de l'atteinte de ces 2 organes ? Dans ce cas, quels sont les liens entre la variabilité de gravité d'atteinte des 2 organes et le type de mutation ?

D'ores et déjà, un diagnostic prénatal génétique par recherche directe de la mutation identifiée chez un enfant vivant a pu être offert à 3 familles.

L'étude génétique d'une soixantaine de cas atteints de PKR moins ou peu sévère sera débutée en janvier 2006, incluant des enfants et des adultes, et des patients chez qui l'atteinte hépatique prédomine.

■ III/ Objectifs du projet complémentaire (2^{ème} phase, appel d'offre 2005/2006)

L'étude a permis d'identifier chez 72 fœtus ou enfants décédés à la naissance, 119 mutations dans le gène *PKHD1*. L'étude du gène *PKHD1* a été couplée à une étude anatomopathologique dont l'objectif était la confirmation du diagnostic et la classification des cas en fonction de la gravité des lésions rénales et hépatiques. Il a permis la collection d'un matériel unique (reins de 72 fœtus ou enfants décédés à la naissance, foies pour 59 d'entre eux).

L'objectif de ce projet complémentaire est de reprendre le matériel collecté pour étudier les relations phénotype-génotype en se focalisant sur l'étude de l'expression de protéines potentiellement régulées par la fibrocystine et intervenant dans plusieurs fonctions cellulaires essentielles : l'équilibre prolifération-différenciation-migration-apoptose, la polarité cellulaire et les fonctions de transport d'eau et de solutés, l'appareil ciliaire des cellules épithéliales tubulaires, et l'adhésion matrices - cellules et cellules - cellules.

L'expression génique et l'éventuelle délocalisation à l'échelle cellulaire des protéines impliquées dans ces grandes fonctions cellulaires où la fibrocystine intervient, seront étudiées essentiellement par des méthodes immunohistochimiques utilisant des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt :

- Mise en évidence de l'apoptose par méthode Tunel et par détection de la Captase-3 par immunohistochimie.
- Quantification de la prolifération cellulaire par l'étude de l'expression de Ki-67 en immunohistochimie.
- Etude de l'expression de facteurs de prolifération cellulaire tels que EGF/EGFR et HNF-1b, par immunohistochimie.

- Etude des protéines NA-K ATPase et aquaporine-2 impliquées dans le transport épithélial, par méthode immunohistochimique.

- Appréciation de la polarité des cellules du canal collecteur par étude de l'expression en immunohistochimie des récepteurs EGF, c-erbB-2, cathepsine B et E-cadhérine.

- Etude de la voie Wnt-bcaténine, intervenant à la fois dans l'apoptose, la prolifération et l'adhérence, par mise en évidence par méthode immunohistochimique de la bcaténine et de certaines protéines associées ou cibles : bcaténine, cyclin-D1, c_myc, CD44, MMP-7, p65-NFkB.

Des techniques de double marquage immunohistochimique et/ou de microscopie confocale pourront être utilisées le cas échéant, pour définir des collocalisations de ces différentes protéines.

Les données obtenues seront confrontées aux types de mutation observées : mutations entraînant une protéine tronquée, T36M et mutations prédites peu sévères. L'étude des patients homozygotes pour les deux premiers types de mutation sera particulièrement intéressante.

Organisation et consentement :

L'information et le consentement des parents sont légalement obligatoires pour cette étude portant sur les tissus des fœtus/enfants décédés.

En pratique, le Pr DENAMUR enverra les résultats des études du gène *PKHD1* aux médecins et/ou généticiens et/ou foetopathologistes avec lesquels il a été en relation dans le cadre du diagnostic prénatal réalisé dans tous les cas étudiés.

L'information sera fournie aux parents et leur consentement demandé par le médecin généticien qui les avait pris en charge dans le cadre du conseil génétique, du diagnostic prénatal et de la décision d'IMG. Le nouveau projet sera expliqué aux parents lors de la rencontre avec le généticien qui leur donnera les résultats de l'étude génétique. Le but de la recherche (progresser dans les connaissances du mécanisme du développement des kystes) sera expliqué aux parents et leur consentement demandé. En cas de refus, aucune étude ne sera faite sur les tissus du fœtus.

Les blocs de tissus ou les tissus congelés seront stockés dans un lieu sécurisé dans le Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique, partie intégrante du Centre d'Investigation Biologique Phenogen (Pr J. ELION) de l'Hôpital Robert Debré.

Conclusion

Au total, cette étude permettra de décrire sur les tissus humains l'expression de protéines intervenant dans les fonctions cellulaires où la fibrocystine intervient. La mise en évidence d'expressions différentielles de ces protéines et l'étude des corrélations avec les mutations de *PKHD1* apporteront des éléments de compréhension des mécanismes intervenant dans la constitution des kystes. Les conclusions de cette étude pourront contribuer au développement des recherches thérapeutiques.

La contribution de l'AIRG à cette étude a permis en 2005 de financer partiellement la recherche des mutations dans le gène *PKHD1* ainsi que le poste de technicien d'étude clinique à mi-temps. La nouvelle attribution de 20.000 euro permet de renouveler le contrat de cette personne à qui est confié le travail de collecte des tissus et de financer l'analyse immunohistochimique (anticorps, système de révélation et petit matériel).

Investigateurs *

- **Pr Michel PEUCHMAUR**, Investigateur principal, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique, Hôpital Robert Debré et Equipe d'Accueil EA3102, Université Paris 7 Denis Diderot.
- **Pr Chantal LOIRAT**, Coordinateur, Service de Néphrologie, Hôpital Robert Debré.
- **Pr Georges DESCHENES**, Service de Néphrologie, Hôpital Trousseau jusqu'en septembre 2006, Hôpital Robert Debré à partir de septembre 2006.
- **Pr Erick DENAMUR**, Laboratoire de Biochimie Génétique, Hôpital Robert Debré.
- **Dr Anne Lise DELEZOIDE**, Laboratoire de Foetopathologie, Hôpital Robert Debré.
- **Dr Raymonde BOUVIER**, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique, Hôpital Edouard Herriot, Lyon.
- **Dr Marie Claire GUBLER**, Directeur de Recherche Emérite, INSERM U574, Hôpital Necker.

Aide méthodologique :

Unité d'Epidémiologie Clinique, INSERM CIE 5, **Dr Corinne ALBERTI, Pascale MISSY, Isabelle ZACCARIA.**

Tous nos remerciements à M^{me} le Professeur Chantal Loirat pour les documents fournis sur l'étude.



Cystinose

La 4^{ème} Conférence Internationale sur la Cystinose aura lieu le 30 juin, 1 et 2 juillet 2006 à Noordwijkerhout (Pays Bas) sous l'égide de l'AIRG-Hollande.

Site : www.cystinose.nl
Courriel : cystinose@wanadoo.nl