

Néphropathie Familiale (NF) chez les English Cockers Spaniels (ECS)

George E. Lees, DVM, MS, DACVIM ; Texas A&M University, USA

[Email : glees@cvm.tamu.edu](mailto:glees@cvm.tamu.edu) Téléphone : 979-845-2351

Introduction

Une maladie héréditaire touchant les reins et provoquant une insuffisance rénale précoce est connue dans la population mondiale de cockers anglais depuis plus de 50 ans. Durant la dernière décennie, la recherche a montré que la maladie était causée par des anomalies des molécules de collagène contenues dans les parois des capillaires glomérulaires au travers desquels le sang est filtré dans les reins. Cette maladie rénale est analogue au syndrome Alport connu chez l'Humain.

La paroi des capillaires glomérulaires comprend plusieurs couches : des couches cellulaires interne et externe et une couche intermédiaire de matrice extracellulaire appelée membrane basale glomérulaire (MBG). La MBG contient un réseau important de molécules de collagène de type IV nécessaires au maintien de la structure et à la fonction des parois des capillaires glomérulaires. Ce réseau de molécules de collagène est un assemblage de 3 chaînes peptidiques distinctes, chacune de ces chaînes étant codée par un gène différent. Une mutation de l'un de ces 3 gènes peut léser l'intégrité moléculaire de la totalité du réseau et engendrer des dégâts rénaux progressifs conduisant à une déficience rénale. L'un de ces 3 gènes (COL4A5) est localisé sur le chromosome X chez les chiens et les humains et lorsque des mutations apparaissent sur ce gène, la maladie a un mode de transmission lié à l'X dans ces 2 espèces. Les 2 autres gènes (COL4A3 et COL4A4) sont localisés sur des autosomes (chromosome 2 chez l'humain et 25 chez le chien) et quand une mutation sur l'un de ces 2 gènes est en cause, la maladie est transmise selon un mode autosomique (habituellement récessif). Chez les ECS, la maladie est transmise selon un mode autosomique récessif et les peptides synthétisés à partir de COL4A3 et de COL4A4 sont complètement absents de la MBG (voir supra). Par conséquent, COL4A3 et COL4A4 sont les gènes candidats sur lesquels la mutation responsable de la NF chez l'ECS semble se produire mais la mutation en cause n'a pas encore été identifiée.

Signes cliniques

Les chiens atteints de NF développent une insuffisance rénale chronique généralement entre l'âge de 6 mois et 2 ans. Les signes cliniques associés sont les mêmes que ceux associés à une insuffisance rénale chronique d'une tout autre cause. Les signes cliniques fréquemment observés incluent une consommation d'eau excessive (polydipsie), un volume d'urine émis excessif (polyurie), un ralentissement de la croissance ou une perte de poids, une piètre qualité du poil, une perte d'appétit et des vomissements. De tels signes peuvent se manifester insidieusement et échapper à la vigilance jusqu'à ce que le degré d'insuffisance rénale soit si sévère qu'une urémie flagrante survienne. A ce stade avancé de la maladie, l'examen clinique peut mettre en évidence un amaigrissement, une déshydratation, des muqueuses pâles, une haleine à odeur caractéristique d'urémie et des ulcérations buccales. Parfois, surtout à des stades précoces, l'examen clinique peut se révéler normal.

Diagnostic de laboratoire

Quand les chiens atteints de NF développent une insuffisance rénale, les résultats d'analyse de sérum sont anormaux proportionnellement à la sévérité de l'insuffisance rénale. Les anomalies attendues sont une azotémie (augmentation des concentrations en urée et créatinine), hyperphosphatémie et acidose métabolique. Les résultats des tests hématologiques montrent généralement une certaine anémie. Les analyses d'urine mettent invariablement en évidence une altération de la concentration de l'urine (gradient de concentration anormalement bas). Toutes les anomalies des tests de laboratoires mentionnées ci-dessus peuvent être associées à une insuffisance rénale chronique quelle qu'en soit la cause ; elles ne permettent pas de dissocier la NF de toute autre cause d'insuffisance rénale.

Parce que la NF est une maladie glomérulaire, les chiens atteints montrent invariablement une protéinurie avant que toute maladie clinique ne puisse être attribuée aux premiers symptômes de NF. En effet, comme la maladie rénale évolue chez les chiens atteints de NF, la protéinurie est toujours la première anomalie qui peut être détectée par des tests non invasifs. Cette protéinurie peut être bien entendu associée à toute une palette de dysfonctionnements du tractus urinaire (par exemple infection bactérienne, calculs,...), une investigation clinique appropriée doit donc être conduite afin d'écartier toute autre cause. Néanmoins une protéinurie

persistante n'ayant pas pu être expliquée autrement chez un jeune cocker (3 à 12 mois) est le plus souvent due à la NF. Si elle est découverte très tôt, l'amplitude de la maladie peut être modérée mais elle devient typiquement marquée en mois d'un mois voire 2. Le ratio protéine/créatinine est généralement compris entre 5 et 10 et occasionnellement supérieur à 10. Si la maladie est détectée tôt, la protéinurie peut être observée alors que la capacité de concentration de l'urine est encore bien conservée (le gradient de concentration de l'urine est encore haut) et les concentrations en créatinine du sérum sont encore dans les limites de la normalité. Cependant, on observe, avec une surveillance continue, que les chiens atteints de NF auront une protéinurie persistante, perdront ultérieurement leur capacité à concentrer l'urine et présenteront petit à petit une augmentation des concentrations en créatinine dans le sérum. Si la NF a évolué vers une insuffisance rénale avant la réalisation des tests de laboratoire, les résultats montreront une protéinurie et une isothénurie marquées aussi bien que des anomalies hématologiques et sériques attendues lors d'insuffisances rénales sévères.

Traitement

La NF est d'évolution progressive et fatale ; quoi qu'il en soit, le taux de progression de la maladie observé chez des chiens affectés est variable. De plus, certains traitements (alimentation pour chiens spéciale insuffisance rénale et administration d'un inhibiteur de conversion de l'angiotensine comme l'enalapril ou le benazepril) ralentiraient quelque peu la progression de la maladie. Même s'ils sont effectifs, de tels efforts thérapeutiques ne retardent l'installation d'une insuffisance rénale terminale que de quelques semaines à quelques mois au mieux. Le taux de progression de la maladie est d'ailleurs nettement plus rapide pendant les derniers stades de l'affection. Une fois que le chien développe une azotémie modérée, l'insuffisance rénale évolue vers un stade terminal en 3 à 6 semaines tout au plus.

Caractéristiques pathologiques

Examinés au microscope, les reins de chiens atteints de NF présentent une multitude d'anomalies indicatrices d'une maladie glomérulaire progressive. La gravité de ces anomalies dépend de la phase de la maladie à laquelle le tissu a été prélevé mais les lésions sont non spécifiques. A fort grossissement, les modifications tissulaires induites par la NF sont similaires à celles causées par d'autres affections rénales chez les chiens. Les anomalies spécifiques de la NF ne peuvent être mises en évidence qu'avec des techniques d'immunocoloration et l'utilisation d'un microscope électronique à transmission.

L'immunocoloration des reins avec des anticorps qui reconnaissent et se lient spécifiquement aux molécules de collagène de type IV peut être utilisée pour identifier le collagène de toutes les membranes basales des reins. Une MBG normale répond positivement par une forte coloration des chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ de collagène de type IV. Ce modèle de coloration reflète la présence d'un réseau normal de chaînes $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$, requis pour une maintenance à long terme de la structure et de la fonction de la MBG. Cependant, chez les cockers anglais atteints de NF, la coloration des chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ est négative pour toutes les membranes basales, aux endroits où elles devraient être normalement présentes, y compris dans la MBG. De plus, la coloration des chaînes $\alpha 5$ de la MBG est considérablement réduite tandis que celle des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 6$, qui ne sont normalement pas des composants majeurs de la MBG, est nettement augmentée. Ces colorations anormales montrent l'absence des réseaux de chaînes $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ dans la MBG qui contient à la place des réseaux de chaînes $\alpha 1$ - $\alpha 1$ - $\alpha 2$ et $\alpha 5$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$. Ces réseaux de substitution ne fonctionnent pas correctement (ils ne fonctionnent pas comme les réseaux de chaînes $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$) ce qui met en jeu des processus d'atteinte du rein conduisant à une déficience rénale. Ce dessin anormal d'immunocoloration des chaînes α des molécules de collagène de type IV des membranes basales rénales est très révélateur de la NF chez le cocker anglais et peut être mis en évidence à tout stage de la maladie (même parfois dès la naissance).

Bien que certaines membranes basales du rein contiennent du collagène de type IV anormal, les reins des chiens atteints de NF se développent d'abord normalement et fonctionnent correctement. Cependant en quelques mois, du fait de l'absence du réseau $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$, l'ultrastructure de la MBG, qui ne peut être vue qu'au microscope électronique, commence à changer. C'est le premier changement de structure qui apparaît dans le rein et précède n'importe quelle modification rénale vue en pratique courante au microscope optique. Les remaniements de l'ultrastructure de la MBG sont d'abord focaux (c'est-à-dire présents à certains endroits seulement) et bénins, mais ils deviennent progressivement plus étendus et sévères tout au long de la maladie. Ces changements ultrastructuraux de la MBG sont également très caractéristiques de cette maladie, notamment une fois qu'ils

sont étendus et finalement modérément sévères. La MBG devient très fine et expose des fragments et fissures multilaminaires de sa structure interne. Ces modifications de la MBG sont associées à d'autres modifications de la paroi des capillaires glomérulaires qui altèrent ses propriétés de filtration et causent l'apparition de la protéinurie.

Avec la progression de la maladie, les lésions visibles au microscope optique se développent dans la zone glomérulaire ainsi que dans la zone tubulaire. La morphologie des lésions glomérulaires est celle d'une prolifération anarchique membranaire allant jusqu'à une sclérose glomérulaire et une dégénérescence accompagnée d'une fibrose périglomérulaire. Les modifications de la zone tubulaire, qui sont toujours remarquables quand l'insuffisance rénale s'est installée, englobent une dégénérescence tubulaire étendue, une dilatation et une atrophie, le tout associé à une inflammation et une fibrose interstitielle. Comme souligné précédemment, ces lésions visibles au microscope optique sont non spécifiques ; elles ne sont pas suffisantes en elles-mêmes pour établir définitivement le diagnostic de la NF.

Diagnostic définitif

Ajoutés à l'évolution observée cliniquement de la maladie qui est compatible avec la NF (et des examens cliniques ne décelant pas d'autres causes d'insuffisance rénale), les observations au microscope optique sont suffisantes pour poser un diagnostic de suspicion de NF. Néanmoins le diagnostic définitif reste toujours à démontrer à partir d'au moins une voire les 2 anomalies distinctes qui, elles seules, permettent de préférer la NF à tout autre cause d'insuffisance rénale. Par conséquent, le diagnostic définitif requiert systématiquement des études spécifiques (microscopie électronique et/ou immunocoloration) des reins du chien affecté. La disponibilité des centres pouvant réaliser ce genre de tests est limitée mais ce qui est le plus important : l'aptitude à réaliser (et à interpréter) de telles études dépend de la qualité des échantillons de tissus à examiner même si les centres habilités sont connus. En règle générale, les tissus qui sont fixés dans du formol à 10%, fixation communément utilisée pour la microscopie optique, ne sont pas satisfaisants pour la microscopie électronique ou l'immunocoloration. Ainsi, obtenir des échantillons de tissus convenant à ce type d'étude demande une préparation et un projet préalables afin de se familiariser avec les procédures appropriées et rassembler le matériel nécessaire.

Annexes – Conseils pour prélever des échantillons de tissu rénal de chiens suspectés d'être porteur de NF, dans un but d'étude pathologique.

1.Le moment du prélèvement est important, surtout pour les échantillons destinés à la microscopie électronique. Les prélèvements post-mortem doivent être effectués immédiatement après la mort ou l'euthanasie du chien. Les biopsies rénales doivent également être réalisées immédiatement.

2.Un autre point important est que les échantillons de tissus, destinés à la microscopie électronique et aux tests immunologiques, doivent contenir des glomérules; ils doivent donc être prélevés dans le cortex rénal.

3.La réussite d'une microscopie électronique satisfaisante repose sur une fixation complète et rapide des tissus (les ultrastructures et les MBG commencent à se détériorer en quelques minutes et le but de la fixation est d'arrêter ce processus). La fixation optimale est obtenue avec des fixateurs spécialement conçus pour la microscopie électronique (par exemple du glutaraldéhyde 2,5% ou 3,0% dans un tampon phosphate). Les fixateurs pour la microscopie électronique doivent être conservés au réfrigérateur et généralement utilisés rapidement ; on prépare habituellement un nouveau flacon de fixateur tous les 30 jours. Outre l'utilisation d'un fixateur approprié, la fixation est favorisée par une taille réduite de l'échantillon (1 mm cube), mais la coupe ne doit pas écraser l'échantillon. D'ordinaire on place un morceau de cortex rénal (d'environ 5-6 mm cube) sur une lame propre dans une goutte de fixateur (prélevée à l'aide d'une pipette de la «fiOLE prélèvement EM») et on le coupe en deux à l'aide d'une lame de rasoir neuve (ou de scalpel), on coupe alors chaque moitié en deux à nouveau, et ceci jusqu'à ce que tous les morceaux mesurent environ 1 mm cube. Ils sont alors mis dans la «fiOLE prélèvement EM» (qui est aussitôt remis au réfrigérateur).

Quand il n'y a pas de fixateur destiné à la microscopie électronique de disponible, la meilleure alternative est d'utiliser du formol à 10% (c'est à dire celui utilisé en microscopie optique). Cette fixation peut être satisfaisante, mais doit être réalisée immédiatement (c'est-à-dire avec des tissus

aussi frais que possible) et les morceaux doivent être suffisamment petits, car la fixation au formol est plus lente que la fixation obtenue avec les produits conventionnels de microscopie électronique.

4. La coloration immunologique est réalisée sur des échantillons de tissu refroidis très rapidement (dans de l'azote liquide) et conservés congelés ensuite. Pour éviter d'avoir à transporter des échantillons congelés, on utilise une solution de transport : le «Mitchel's Transport Medium» (une préparation non-fixatrice destinée à cet usage) pour conserver l'échantillon jusqu'à son arrivée au laboratoire où on le congèlera. Le «Mitchel's Transport Medium» doit être utilisé rapidement et conservé au frais (pendant le stockage et durant son utilisation), mais il permet de conserver les tissus en vue d'une coloration immunologique jusqu'à 2-3 jours (c'est-à-dire suffisamment longtemps pour l'envoyer au laboratoire).

5. On souhaite tout autant recevoir des échantillons conventionnels de rein fixés au formol pour des examens en microscopie optique de routine, que des examens spéciaux.

Note : les échantillons de tissu décrits ci-dessus sont utilisés à des fins de diagnostic. Pour notre étude génétique de la NF, nous aimerions également obtenir une prise de sang (sur EDTA, tube au bouchon violet, pour l'analyse ADN) et quelques échantillons de cortex rénal dans un «RNALater™» (pour l'isolement d'ARN).

Comme la plupart des produits ne peuvent pas être conservés longtemps et doivent être réfrigérés, il est possible, aux Etats-Unis (pour l'Europe, se renseigner au préalable auprès du EFNF), que l'on prépare et envoie «à la demande» des kits contenant tout le matériel nécessaire et les instructions aux vétérinaires. En utilisant le service postal (par exemple FedEx) pour les livraisons de nuit, on peut faire parvenir un de ces kits en moins de 24-36 heures (sauf le week-end).

Bibliographie

Lees GE, Wilson PD, Helman RG, Homco LD, Frey MS : Glomerular ultrastructural findings similar to hereditary nephritis in 4 English cocker spaniels. J Vet Intern Med 1997; 11: 80-85.

Lees GE, Helman RG, Homco LD, Millichamp NJ, Hunter JF, Frey MS : Early diagnosis of familial nephropathy in English cocker spaniels. J Am Anim Hosp Assoc 1998; 34: 189-195.

Lees GE, Helman RG, Kashtan CE, Michael AF, Homco LD, Millichamp NJ, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Kim Y : A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. Kidney Int 1998; 54: 706-719.

Traduction

Document traduit de l'anglais au français par Mlles Cassandre Boogaerts, Astrid Toullec, Claire Moiroud.