

# Caractérisation d'une insertion CG dans le gène du collagène VII chez un patient atteint d'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive de Hallopeau-Siemens

Latifa HILAL<sup>1</sup>✧, Claudine BLANCHET-BARDON<sup>2</sup> & Michel GOOSSENS<sup>3</sup>

(Reçu le 27/05/1996 ; Accepté le 01/07/1996)

"Epidermolyse bulleuse dystrophique récessive de Hallopeau-Siemens" اكتشاف إضافة ثنائي CG في جين الكولاجين VII عند شخص مصاب بـ

هو مرض جلدي وراثي خطير (EBDR-HS) يتميز بهشاشة بالغة للجلد و الأغشية المخاطية، مصحوبة بتقص كبير بل بغياب ألياف الإرتباط المكونة أساسا من الكولاجين VII. لقد تم سابقا إثبات العلاقة الجينية مابين جين الكولاجين VII والمظهر الخارجي لـ EBDR-HS. في هذه الدراسة، اعتمادا على تقنيات البيولوجيا الجزيئية تم تمييز إضافة ثنائي CG عند شخص مصاب بهذا المرض. هذه الطفرة تؤدي إلى تفاوت في إطار فك الرموز و إلى خلق وحدة رمزية "قف" سابقة لأوانها، تنذر بتركيب كولاجين VII فاقد لـ 76% من البروتين الكاملة. إن نتائج هذا البحث توحى بشدة بأن هذه الطفرة التي تم إكتشافها في جين الكولاجين VII هي المسؤولة عن الشذوذ الذي يصيب ألياف الإرتباط عند الشخص محط الدراسة، إضافة إلى أنها جد مفيدة بالنسبة للإستشارة الوراثية و التشخيص الماقبل الولادي.

الكلمات المفتاحية : مرض الإنحلال البشري الفقاعي - الكولاجين VII - طفرة

## Caractérisation d'une insertion CG dans le gène du collagène VII chez un patient atteint d'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive de Hallopeau-Siemens

L'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive généralisée mutilante de Hallopeau-Siemens (EBDR-HS) est une génodermatose grave, caractérisée par une fragilité cutanéomuqueuse extrême associée à une forte diminution, voire une absence des fibres d'ancrage essentiellement constituées de collagène VII. Une liaison génétique a été établie entre le gène du collagène VII et le phénotype de l'EBDR-HS. Au cours de ce travail, on a caractérisé, à l'aide des techniques de DGGE et de séquençage d'ADN, une insertion d'un doublet CG chez un patient atteint d'EBDR-HS. Cette insertion conduit à un décalage du cadre de lecture et à la création d'un codon stop précoce prédisant la synthèse de collagène VII dépourvu de 76 % de la protéine totale. Ces résultats suggèrent fortement que cette mutation, identifiée dans le gène du collagène VII est responsable des anomalies des fibres d'ancrage chez le patient étudié. De plus ils sont très utiles au conseil génétique et au diagnostic prénatal.

**Mots clés :** Épidermolyse bulleuse - Collagène VII - PCR (Polymerase Chain Reaction) - DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) - Mutation

## CG-insertion within type VII collagen gene in a patient with Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa

The generalized mutilating form of recessive dystrophic epidermolysis bullosa (i.e. the Hallopeau-Siemens type, HS-RDEB) is a life-threatening disease characterized by extreme mucocutaneous fragility associated with absent or markedly altered anchoring fibrils. We previously linked HS-RDEB to the type VII collagen gene which encodes the major component of anchoring fibrils. In this paper, we identified CG-insertion in HS-RDEB patient. This insertion causes a frameshift which leads to a premature stop codon predicting the truncation of 76% of the type VII collagen. These results suggest strongly that the identified mutation within the type VII collagen gene prevents normal anchoring fibril formation and is the underlying cause of HS-RDEB in the studied patient. Furthermore it will be useful for genetic counseling and prenatal diagnosis.

**Key words :** Epidermolysis bullosa - Type VII collagen - PCR (Polymerase Chain Reaction) - DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) - Mutation

<sup>1</sup> Université Ibn Tofail, Unité de Génétique, Département de Biologie, Faculté des Sciences, BP 133, 14 000 Kénitra, Maroc

<sup>2</sup> Clinique des maladies cutanées, Hôpital Saint-Louis, 75 010 Paris, France

<sup>3</sup> INSERM U91, Hôpital Henri Mondor, 94 010 Créteil, France

✧ Auteur correspondant

## INTRODUCTION

Les épidermolyses bulleuses dystrophiques (EBD) représentent un groupe hétérogène de maladies héréditaires caractérisées par une fragilité cutanée de gravité variable. À la suite d'un traumatisme mineur, cette fragilité se traduit par la formation de décollements cutanés ("bulles") et parfois muqueux. Ces maladies sont transmises selon le mode autosomique. Elles peuvent être dominantes (EBDD) ou récessives (EBDR) (Fine *et al.*, 1991; Epstein 1992; Lin and Carter 1992; Dunnill & Eady 1995). Chacune de ces formes est représentée par plusieurs sous-groupes avec une sévérité du tableau clinique variable. Leur incidence, estimée à 1/50 000 naissances, est dix fois moins élevée pour les formes les plus sévères. Les patients atteints d'EBD présentent une séparation tissulaire qui a lieu sous la *lamina densa* dans le derme papillaire. Cette séparation est associée à une anomalie des fibres d'ancrage (Hashimoto *et al.*, 1976; Tidman & Eady 1985).

Les EBDR sont représentées par plusieurs sous-groupes : l'EBDR généralisée mutilante de Hallopeau-Siemens (EBDR-HS), l'EBDR généralisée mineure, les EBDR localisée et inversée. L'EBDR-HS (McKusick 226600) constitue la forme la plus sévère. Elle est caractérisée par une fragilité cutanée généralisée très grave, avec cicatrices atrophiques conduisant à une fusion des doigts et des orteils (pseudosyndactylie). Les muqueuses sont souvent atteintes. Une malnutrition, une anémie et un retard de croissance sont souvent observés. Le pronostic vital est menacé par des complications infectieuses et carcinologiques. L'état général des patients est atteint et la mort survient dans les 10 à 20 premières années de la vie (Hashimoto *et al.*, 1976; Tidman & Eady 1985; Fortier-Beaulieu *et al.*, 1987; McGrath *et al.*, 1992). L'examen en microscopie électronique de biopsie cutanée de patients EBDR-HS montre une forte diminution voire une absence des fibres d'ancrage (Tidman & Eady, 1985; Heagerty *et al.*, 1986; Fortier-Beaulieu *et al.*, 1987; Bruckner-Tuderman *et al.*, 1989; Lin & Carter 1992; McGrath *et al.*, 1992).

Les fibres d'ancrage sont essentiellement constituées de collagène VII (Sakai *et al.*, 1986; Burgeson *et al.*, 1990). Ce dernier est un homotrimère constitué de trois chaînes  $\alpha$  identiques ( $[\alpha 1(\text{VII})]_3$ ). Chacune des chaînes  $\alpha$  est constituée de trois domaines. Le domaine non collagénique (NC-1) de 145 kD à l'extrémité

N-terminale, contient plusieurs domaines ayant des homologies avec différentes molécules d'adhésion en particulier avec les domaines A et B des fibronectines de type III. NC-1 contient 9 domaines fibronectine : FN-1 à FN-9 chacun constitué de deux domaines A et B (Christiano *et al.*, 1992). Le domaine collagénique central de 145 kD est caractérisé par un motif répété Gly-X-Y (où X est souvent une proline et Y souvent une hydroxyproline ou hydroxylysine). Un deuxième domaine non collagénique (NC-2) de 30 kD se trouve à l'extrémité C-terminale (Christiano *et al.*, 1992).

Le gène du collagène VII (COL7A1) a été cloné et localisé sur le bras court du chromosome 3 dans la région 3p21.1 (Parente *et al.*, 1991; Christiano *et al.*, 1992). Il a une taille de 32 kb et est constitué de 118 exons de petite taille (27 à 350 pb) interrompus par des introns de 71 à 1293 pb. Il est transcrit en un ARNm de 9,2 kb et code pour une protéine de 340 kD (Christiano *et al.*, 1992). L'identification d'un RFLP (polymorphisme de restriction) Pvu II a permis d'établir une liaison génétique entre le gène COL7A1 et le phénotype de différentes formes d'EBD en particulier celle de l'EBDR-HS (Ryynänen *et al.*, 1991; Hovnanian *et al.*, 1992).

L'implication du gène COL7A1 dans les EBDR a été confirmée par la caractérisation récente de différents défauts moléculaires telles que des mutations faux-sens (Christiano *et al.*, 1993; Hilal *et al.*, 1993a; Hilal 1994), une insertion-délétion créant un codon stop (Hilal *et al.*, 1993b) et plusieurs mutations non-sens chez des patients atteints d'EBDR (Christiano *et al.*, 1994; Hovnanian *et al.*, 1994). La première mutation dans une forme dominante d'EBD a été identifiée. Il s'agit d'une substitution d'une glycine en serine dans le domaine central du collagène VII (Christiano *et al.*, 1994).

Dans ce travail, on se propose de caractériser, à l'aide des techniques de DGGE (Gel d'électrophorèse en gradient de dénaturation) et de séquençage d'ADN, une insertion d'un doublet CG en 3' de l'exon 19 codant pour le domaine FN-7B, chez un patient atteint d'EBDR-HS. Cette insertion conduit à un décalage du cadre de lecture et la création d'un codon stop qui conduirait à la synthèse d'une chaîne  $\alpha$  du collagène VII tronquée ne représentant que 24% ( $\approx 70$  kD) de la taille normale. Ces chaînes seraient incapables de participer à la formation des fibres d'ancrage chez le patient étudié.

## MÉTHODES

### 1. Patient

Le diagnostic a été réalisé par le Dr. Blanchet-Bardon de l'Hôpital Saint-Louis à Paris, selon les critères cliniques et de la microscopie électronique définis par Fine *et al.* (1991). Le patient a été diagnostiqué à l'âge de 4 ans et appartient à une famille non consanguine dont il est le seul descendant (Figure 1b). Les parents sont sains. Les lésions généralisées sont apparues chez le patient, à la naissance. Celui-ci présente des grains de milium et une pseudosyndactylie. La microscopie électronique de biopsie cutanée ne montre pas de fibres d'ancrage reconnaissables (Hovnanian *et al.*, 1992).

### 2. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait à partir de globules blancs par la méthode au phénol-chloroforme (John *et al.*, 1991).

### 3. PCR (polymerase chain reaction)

L'amplification a été réalisée à partir d'un µg d'ADN génomique dans un volume de 100 µl de tampon Tris pH 8,3 10mM; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTP 200 µM, gélatine 0,1 mg/ml, 10 pmoles de chacune des amorces P11 (5' 60GC-TGCACTGCCTCTCTGTTCTC 3') et P12 (5' ACGCCCCGCCAGCCTC 3'), Taq polymérase (Cetus) 2,5 U, pendant 40 cycles d'une 1 minute à 94°C, 1 minute à 62°C, 1 minute 30 secondes à 72°C, suivi d'un cycle de 7 minutes à 72°C (Hovnanian *et al.*, 1994).

### 4. DGGE (gel d'électrophorèse en gradient de dénaturation)

Cette technique permet la détection de mutations ponctuelles ainsi que des réarrangements allant jusqu'à une centaine de paires de bases. Elle est basée sur le fait que lorsqu'un fragment d'ADN est soumis à des conditions dénaturantes (urée, formamide), la dénaturation s'effectue en fonction de la séquence définissant des domaines de fusion se dénaturant en bloc les uns après les autres. Ainsi, une variation nucléotidique d'une seule paire de bases d'un fragment d'ADN modifie sa température de fusion. Ce changement se traduit par une différence de la mobilité électrophorétique détectable sur un gel à gradient dénaturant (Myers *et al.*, 1985; John, *et al.*, 1991). Cette méthode

nécessite la connaissance préalable de la séquence nucléotidique du gène à étudier et elle impose souvent la création d'un domaine artificiel de haute stabilité en incorporant à l'une des amorces de la PCR une région riche en CG ("CG clamp"). La région à étudier devient alors dans sa totalité le domaine le moins stable ce qui permet la détection des mutations dans toute cette région. De plus, elle permet de distinguer les échantillons hétérozygotes par la présence de quatre bandes, les deux homoduplexes correspondant aux allèles sauvage et muté et les deux hétéroduplexes correspondant à la réassociation des matrices alléliques avec mésappariement.

Concernant les conditions de DGGE, le type de gradient et le temps de migration ont été déterminés à l'aide du programme informatique de Lerman MELT et SQHTX (Myers *et al.*, 1985; Lerman & Silverstein 1987). Ce programme calcule la position (en degrés équivalent (°Eq), % agents dénaturants = 3,2 (°Eq-57)) de l'homoduplexe sauvage dans le gradient en fonction du temps ainsi que la différence entre les positions des homoduplexes et des hétéroduplexes.

Vingt à trente µl de produit de PCR sont soumis à une électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 6,5 % contenant un gradient linéaire d'agent dénaturant 40-80% (100% dénaturant = 7 M urée et 40% formamide). La migration est effectuée à 160 V pendant 6 heures à 60°C. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium puis photographié.

### 5. Séquençage d'ADN

Les produits de PCR amplifiés, à partir d'ADN génomique, par les amorces P11 et P12 ont été clonés dans le plasmide "TA cloning" à l'aide du Kit de clonage *In vitro* gen. La ligation a été effectuée en présence de 10 ng de produit de PCR purifié et de 25 ng de vecteur. Le séquençage est réalisé par la technique aux didésoxyribonucléotides (Sanger *et al.*, 1977).

## RÉSULTATS

Ce travail a été réalisé dans le cadre du criblage des mutations dans le gène COL7A1 chez 52 patients EBDR-HS (Hilal *et al.*, 1993b; Hovnanian *et al.*, 1994). Afin de déterminer le défaut moléculaire responsable du phénotype de l'EBDR-HS chez les familles étudiées, on a tout d'abord recherché une anomalie majeure dans le gène COL7A1, en utilisant la technique du "Southern blot". Ceci

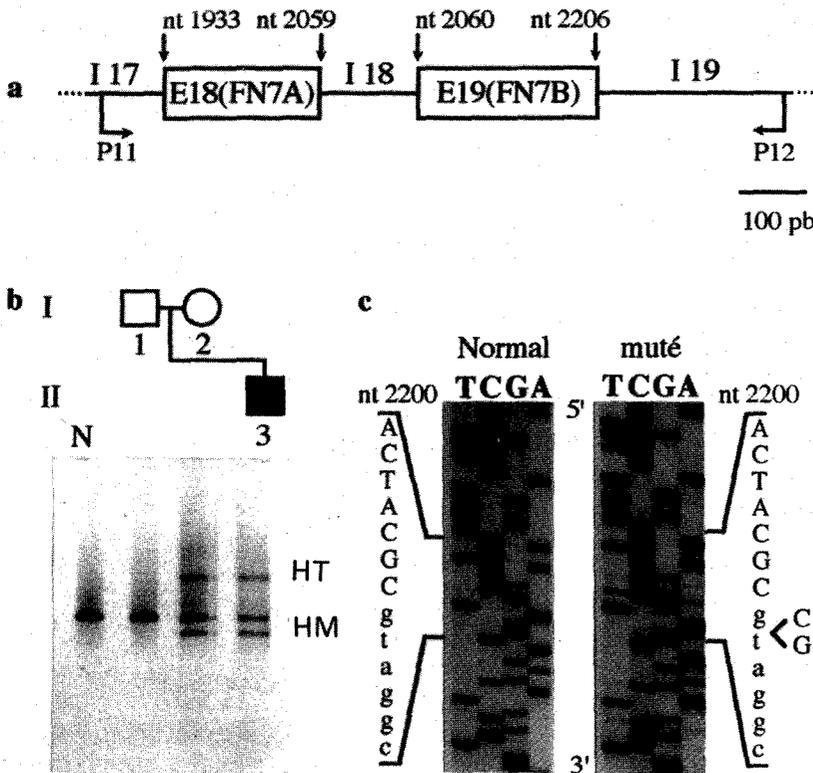
permet de montrer qu'aucune anomalie portant sur des fragments de grande taille (réarrangement, délétions, ou insertions de taille supérieure à environ 1kb) n'est à l'origine de la maladie chez tous les patients atteints d'EBDR-HS (Hovnanian *et al.*, 1994). Ensuite, on a recherché des mutations ponctuelles ainsi que des petits réarrangements allant jusqu'à une centaine de paires de bases à l'aide de la technique de DGGE.

Dans ce travail, on décrit une mutation chez l'un de ces patients (Figure 1b). Pour cela, l'ADN génomique de tous les membres de la famille a été amplifié par les amorces P11 et P12. Ces amorces

ont une localisation intronique et entourent les exons 18 et 19 codant pour le domaine FN-7 (Figure 1a). L'amorce P11 est localisée dans l'intron 17 et P12 dans l'intron 19. Les produits de PCR (d'une taille de 567 pb) ont tout d'abord été testés sur gel d'acrylamide 6% non dénaturant, ce qui a permis de montrer que les tailles obtenues correspondent aux tailles attendues (résultat non montré). Aucune différence de taille qui pourrait être due à une insertion ou une délétion n'a donc été détectée.

L'analyse des produits de PCR sur gel à gradient dénaturant (DGGE) 40-80% montre que le patient (II.3) ainsi que sa mère (I.2) présente un profil différent de celui du normal avec deux bandes correspondant aux homoduplexes sauvage et muté (bande inférieure), et une bande correspondant aux hétéro duplexes confondus dans notre cas (Fig. 1b). Ce profil est caractéristique d'une variation nucléotidique portée à l'état hétérozygote.

Le séquençage direct de matrices simple brin obtenues à partir d'ADN génomique de tous les membres de la famille ainsi que celui d'un individu normal montre que le père (I.1) présente une séquence normale. Cependant, la séquence des individus hétérozygotes en DGGE (le patient II.3 et sa mère I.2) présente une superposition de deux séquences (illisibles, correspondant à l'allèle normal et l'allèle muté) suggérant une insertion ou une délétion à l'état hétérozygote. Afin de séquencer séparément chacun des allèles des individus hétérozygotes, les produits de PCR amplifiés avec les amorces P11 et P12, à partir d'ADN génomique, ont été clonés dans le plasmide "TA cloning" puis séquencés à l'aide de l'amorce P11. L'analyse de la séquence des clones obtenus à partir de l'ADN du patient (II.3) et sa mère (I.2), montre que certains clones ont une séquence normale (allèle normal). D'autres clones présentent une addition de deux bases CG en 3' de l'exon 19 codant pour le domaine FN-7B (allèle muté) (Figure 1c).

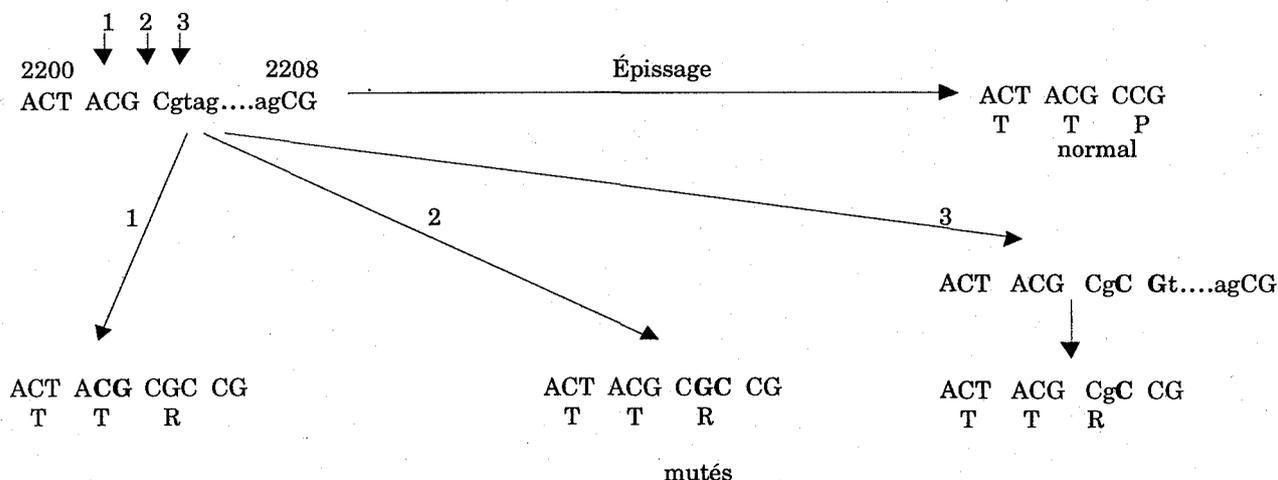


**Figure 1.** (a) Localisation des amorces utilisées pour l'étude en DGGE et entourant les exons 18 et 19 (E18 et E19) codant pour les domaines fibronectines 7A (FN-7A) et 7B (FN-7B). La numérotation des nucléotides (nt) est celle du cDNA, utilisée dans la référence (Christiano *et al.*, 1992). (b) Arbre généalogique de la famille étudiée et analyse des produits de PCR sur gel de DGGE. L'ADN génomique de tous les membres de la famille ainsi que celui d'un sujet normal (N) ont été amplifiés avec les amorces P11-P12 puis analysés sur gel dénaturant 40-80%. La migration est réalisée à 60°C pendant 6 heures. (c) Séquences partielles de l'allèle normal et de l'allèle muté portant l'insertion CG. Une partie de l'exon 19 est représentée en majuscules et une partie de l'intron 19 en minuscules. La position du premier nucléotide exonique est indiquée (I 17 et I 18 : introns 17 et 18, pb : paire de bases, HT : hétéroduplexes, HM : homoduplexes).

L'analyse de la séquence normale de cette région montre une série de deux CG. L'insertion d'un troisième doublet CG pourrait donc avoir lieu au niveau de trois sites différents : dans l'exon 19 entre le nucléotide (nt) 2203 et le nt 2204, entre le nt 2205 et le nt 2206 ou dans l'intron en 3' de l'exon 19, entre le g et le t du site donneur d'épissage (Figure 2) (La numérotation est celle du cDNA, utilisée par Christiano *et al.* (1992)). Quelque soit la localisation de l'insertion du doublet CG, celle-ci conduit à un décalage du cadre de lecture, 21 acides aminés en amont de la thréonine 735 (dans le domaine FN-7B) et à la création d'un codon stop

dans le domaine FN-8A (Figures 2 et 3). Ceci suggère la synthèse d'une chaîne  $\alpha 1$  du collagène VII tronquée ne représentant que 24% ( $\approx 70$  kD) de la taille de la protéine normale. Il faut noter que si l'insertion a lieu dans le site donneur de l'épissage gt, ce site sera conservé et l'épissage de l'intron 19 se déroulerait correctement (Figure 2). **DISCUSSION**

Une liaison génétique entre le phénotype de l'EBDR-HS et le gène COL7A1 a été récemment établie (Hovnanian *et al.*, 1992). Dans le cadre du criblage des mutations dans le gène COL7A1 chez



**Figure 2. Séquences nucléotidiques et peptidiques partielles (pour les acides aminés, le code à une seule lettre est utilisé) après épissage normal de l'intron 19 et après insertion du doublet CG (en gras) dans les différentes positions 1, 2 et 3**

Les séquences exoniques sont représentées en majuscules et introniques en minuscules

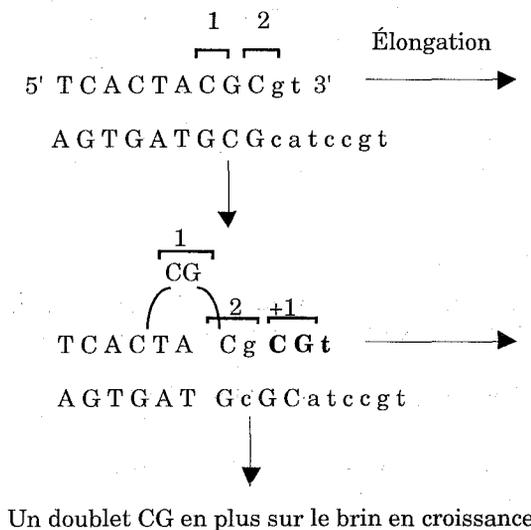
normal	2185	GTC TCC ATT GTT GTC ACT ACG CCG CCT GAG GCT CCG CCA GCC	2226
		V S I V V T T P P E A P P A	742
muté		GTC TCC ATT GTT GTC ACT ACG <b>CGC CGC</b> CTG AGG CTC CGC CAG	
		V S I V V T T <u>R R L R L R Q</u>	
normal		CTG GGG ACG CTT CAC GTG GTG CAG CGC GGG GAG CAC TCG CTG	2268
		L G T L H V V Q R G E H S L	756
muté		CCC TGG GGA CGC TTC ACG TGG TGC AGC GCG GGG AGC ACT CGC	
		<u>P W G R F T W C S A G S T R</u>	
normal		AGG CTG CGC TGG GAG CCG GTG CCC AGA GAG CAG GGC TTC CTT	2310
		<u>R L R W E P V P R E Q G F L</u>	770
muté		TGA	
		*	

**Figure 3. Comparaison des séquences nucléotidique (cDNA) et peptidique (code à une seule lettre) normale et portant l'insertion CG (\*)**

Cette insertion prédit un décalage du cadre de lecture (acides aminés soulignés) et la création d'un codon stop TGA. Les chiffres en début de séquences indiquent la position du premier nucléotide. Les chiffres en fin de séquences correspondent aux positions des nucléotides et des acides aminés

des patients EBDR-HS, par la technique de DGGE, on a identifié l'insertion d'un doublet CG en 3' de l'exon 19 (FN-7B). Cette addition de deux bases se serait produite pendant la réplication par un mécanisme connu sous le nom du "dérapage répliatif" (Kaplan & Delpuch, 1993). Ce phénomène est favorisé par la répétition de la succession de courts motifs répétés.

Au cours de la réplication il peut se produire, au niveau des séquences répétées, un glissement du brin en voie d'élongation par rapport au brin matrice. Ce phénomène entraîne alors l'augmentation ou la réduction (dans le cas où le glissement se produit au niveau du brin matrice) du nombre de répétitions. En 3' de l'exon 19, il y a, en effet, une succession de deux CG dont le G du deuxième doublet fait partie du site donneur de l'épissage (GT en 5' de l'intron) de l'intron 19 (Figure 4).



**Figure 4. Insertion d'un doublet CG (en gras) dans l'intron 19 du gène COL7A1 selon l'hypothèse du mécanisme du dérapage répliatif**

Les séquences exoniques sont celles en majuscules et introniques en minuscules

D'après le mécanisme du dérapage répliatif, le doublet CG se serait inséré entre le G et le T du site donneur. Cette insertion n'affecterait pas le site d'épissage mais conduirait à un décalage du cadre de lecture, 21 acides aminés en amont de la thréonine 735 (FN-7B) et à la création d'un codon stop dans le domaine FN-8A (exon 20).

L'insertion CG ainsi caractérisée est portée à l'état hétérozygote par le patient ; elle correspond donc à

la mutation portée par l'un des allèles du collagène VII. Étant donné que la maladie est récessive et que le patient est issu d'une union non consanguine, il est un hétérozygote composite c'est à dire porteur de deux mutations distinctes sur les deux allèles. La mutation portée par le second allèle reste donc à déterminer.

Il faut noter que le patient a hérité la mutation de sa mère qui est également hétérozygote mais saine, ce qui est compatible avec le caractère récessif de la maladie.

Cette insertion CG prédit que la synthèse des chaînes  $\alpha 1$  du collagène VII serait prématurément interrompue. Ces chaînes ne représenteraient que 24% de la taille normale et seraient dépourvues d'une grande partie du domaine central et en particulier de leurs extrémités C-terminales. La molécule de collagène VII est un homotrimère constitué de trois chaînes  $\alpha 1$  identiques.

Après leur synthèse, les chaînes  $\alpha$  subissent des modifications post-traductionnelles dans les cavités du réticulum endoplasmique rugueux. Trois chaînes  $\alpha$  interagissent par leurs domaines centraux pour former une triple hélice. Cet assemblage en homotrimère (procollagène) est initié par les extrémités C-terminales (Prockop *et al.*, 1990). Le procollagène est ensuite excrété, grâce à l'appareil de Golgi, dans le milieu extracellulaire où la quasi-totalité du domaine NC-2 subit un clivage protéolytique. Deux molécules de collagène VII s'assemblent en dimères antiparallèles chevauchant au niveau de leurs extrémités C-terminales, grâce à des ponts disulfures (Parente, *et al.*, 1991).

Plusieurs dimères interagissent ensuite latéralement pour former les fibres d'ancrage impliquées dans l'adhésion derme-épiderme. Les chaînes  $\alpha$  tronquées, dépourvues de leurs extrémités C-terminales, seraient donc incapables de participer à l'assemblage du collagène VII en fibres d'ancrage. Ceci expliquerait donc, au moins en partie, l'absence de ces structures chez le patient qui est hétérozygote composite. Chez la mère hétérozygote saine, les chaînes  $\alpha$  mutées seraient incapables d'interagir avec les chaînes  $\alpha$  normales et d'altérer l'assemblage des fibres d'ancrage ce qui est en accord avec le caractère récessif de la maladie. Ceci suggère également que la quantité de collagène VII codée par un seul allèle est suffisante pour que celui-ci assure sa fonction.

Le codon stop créé par l'insertion CG pourrait ne pas conduire à la synthèse de peptides tronqués mais au phénomène d'"exon skipping", mécanisme par lequel une mutation non-sens, une insertion ou une délétion exonique peut conduire à l'élimination de l'exon contenant la mutation et aboutir à une protéine partiellement fonctionnelle si le cadre de lecture est conservé (Dietz *et al.*, 1993). Ce phénomène pourrait conduire dans notre cas, à l'élimination de l'exon 20 (FN-8A) contenant le codon stop.

L'analyse de l'organisation du gène (séquence) montre que l'élimination de l'exon 20 (FN-8A) pourrait conduire à un changement du cadre de lecture et à un codon stop juste après la thréonine 825 (exon 21/FN8B). Il y aurait donc de forte chance que la protéine mutée soit non fonctionnelle. Afin de vérifier l'hypothèse de l'"exon skipping", il faudrait séquencer l'exon 20 ainsi que les exons adjacents et ce au niveau du cDNA. Ceci permettrait également de vérifier si l'épissage de l'intron 19 s'est bien déroulé. Pour cela il est nécessaire faire une biopsie cutanée sur le patient pour l'extraction des ARN et la synthèse du cDNA.

Il a déjà été montré dans certains gènes tels que le gène de la triosephosphate isomérase (Daar & Maquat 1988), de la  $\beta$ -globine (Baserga & Benz 1988) et le gène de l'ornithine aminotransférase (Mashima *et al.*, 1992), qu'une mutation non-sens ou une mutation décalant le cadre de lecture et introduisant un codon stop, conduit à une diminution du taux d'ARNm.

On a également montré, chez un patient atteint d'EBDR-HS, une diminution du taux d'ARNm du collagène VII, due à une insertion-délétion décalant le cadre de lecture et créant un codon stop (Hilal *et al.*, 1993b). Une des conséquences biologiques de l'insertion CG que nous avons caractérisée serait donc une diminution du taux d'ARNm du collagène VII codé par l'allèle muté. Cette diminution pourrait être également une des raisons de la réduction des fibres d'ancrage chez le patient. L'effet de la seconde mutation reste à déterminer.

Jusqu'à présent seules quelques mutations ont été caractérisées dans le gène COL7A1, chez des patients atteints d'EBDR. En particulier, une substitution d'une méthionine en lysine homozygote, dans le domaine NC-2, a été décrite chez deux patients de la même famille atteints de la forme généralisée mineure (Christiano *et al.*, 1993).

On a caractérisé une insertion-délétion homozygote conduisant à un décalage du cadre de lecture et à un codon stop dans le domaine FN-5A, chez un patient atteint d'EBDR-HS (Hilal *et al.*, 1993b). On a également identifié trois mutations non-sens à l'état hétérozygote chez quatre patients dont trois atteints d'EBDR-HS et un d'EBDR inversée (Hovnanian *et al.*, 1994). Quatre autres mutations créant des codons stop précoces dans le domaine NC-1 ont été caractérisées chez des patients EBDR-HS (Christiano *et al.*, 1994). L'ensemble de ces résultats laisse penser que les mutations stop ou créant un codon stop précoce sont à l'origine du phénotype d'EBDR-HS dans de nombreux cas. L'insertion CG qu'on a caractérisée précédemment appuie cette hypothèse.

Cependant, le nombre de mutations étant encore restreint il est trop tôt pour établir une corrélation entre les mutations stop et les EBDR-HS. La caractérisation d'autres mutations nous permettra de déterminer si les codons stop précoces sont communs aux EBDR-HS.

## CONCLUSION

Ces résultats confirment que le collagène VII est responsable de l'altération des fibres d'ancrage chez les patients atteints d'EBDR. Ils contribuent à l'établissement du spectre de mutations nécessaire à la corrélation entre la nature, la position de la mutation et la sévérité de la maladie. Sur le plan fondamental, ce spectre permettra d'éclaircir les mécanismes de l'assemblage de ces structures impliquées dans l'adhésion et le maintien de l'intégrité des tissus cutanés.

De plus, ces résultats pourraient être très utiles au conseil génétique et au diagnostic prénatal de cette forme très sévère d'EBDR.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Association "Epidermolyses Bulleuses Association Entraide" ainsi que les familles qui ont participé à ce travail. Leurs remerciements vont également à Annette Bullo, J. Uitto et A. Hovnanian.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Baserga S.J. & Benz E.J. (1988) Nonsense mutations in the human  $\beta$ -globin gene affect mRNA metabolism. *Proc. Natl. Acad. USA* 85:2056-2060

- Bruckner-Tuderman L., Mitsuhashi Y., Schnyder U.W. & Bruckner P. (1989) Anchoring fibrils and type VII collagen are absent from skin in severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 93:3-9
- Burgeson R.E., Lunstrum G.P., Rokosova B., Rimberg C.S.M. & Keene D.R. (1990) The structure and function of type VII collagen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 580:32-43
- Christiano A., Rosenbaum L., Chung-Honet L., Parente M., Woodley D., Pan T., Zang R. *et al.*, (1992) The large non-collagenous domain (NC-1) of type VII collagen is amino-terminal and chimeric. Homology to cartilage matrix protein, the type III domains of fibronectin and the A domains of von Willbrand factor. *Human molec. genet.* 1:475-481
- Christiano A.M., Anhalt G., Gibbons S., Bauer E.A. & Uitto J. (1994) Premature termination codons in the type VII collagen gene (COL7A1) underlie severe, mutilating recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Genomics* 21:160-168
- Christiano A.M., Chung-Honet L.C., Hovnanian A., Greespan D.S. & Uitto J. (1992) The gene encoding human type VII collagen (COL7A1) is highly complex: evidence for >115 exons. *Am. J. Hum. Genet.* 4:4489
- Christiano A.M., Greespan D.S., Hoffman G.G., Zhang X., Tamai Y., Lin A.N., Diez H.C. *et al.*, (1993) A missense mutation in type VII collagen in two affected siblings with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Nature genet.* 4:62-66
- Christiano A.M., Rynnanen M. & Uitto J. (1994) Dominant dystrophic epidermolysis bullosa: identification of a Gly → Ser substitution in the triple helical domain of type VII collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3549-3553
- Daar I.O. & Maquat L.E. (1988) Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* 8:802-813
- Dietz H.C., Valle D., Francomano C.A., Kendzior R.J., Pyeritz R.E. & Cutting G.R. (1993) The skipping of constitutive exons *in vivo* induced by nonsense mutations. *Science* 259:680-683
- Dunnill M.G.S. & Eady R.A.J. (1995) The management of dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin. Exp. dermatol.* 20:176-188
- Epstein E.H. Jr. (1992) Molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Science* 256:799-803
- Fine J.D., Bauer E.A., Briggaman R.A., Carter D.M., Eady R.A., Esterly N.B., Holbrook K.A. *et al.*, (1991) Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the subcommittee on diagnosis and classification of the national epidermolysis bullosa registry. *J. Am. Acad. Dermatol.* 24:119-135
- Fortier-Beaulieu M., Teillac D. & De Prost Y. (1987) Atteinte digestive au cours de l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive: A propos de six cas d'une revue de la littérature. *Ann. Dermatol. Venereol.* 114:963-971
- Hashimoto I., Schnyder U.W., Anton-Lamprecht I. & Gedde-Dahl T. (1976) Ultrastructural studies in epidermolysis bullosa hereditaria. III. Recessive dystrophic types with dermolytic blistering (Hallopeau-Siemens types and inverse type). *Arch. Dermatol. Res.* 256:137-150
- Heagerty A.H.M., Kennedy A.R., Leigh I.M., Purkis P. & Eady R.A.J. (1986) Identification of an epidermal basement membrane defect in recessive forms of dystrophic epidermolysis bullosa by LH7: 2 monoclonal antibody: use in diagnosis. *Brit. J. Dermatol.* 115:125-131
- Hilal L. (1994) Étude de liaison génétique et caractérisation de mutations dans les gènes responsables des épidermolyses bulleuses simples et dystrophiques. Thèse de Doctorat d'État, Faculté des Sciences, Kénitra 73-76
- Hilal L., Hovnanian A., Duquesnoy P., Blanchet-Bardon C., Christiano A.M., Uitto J. & Goossens M. (1993a) Characterization of mutations within the COL7A1 gene in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol. Abstract* 100:499
- Hilal L., Rochat A., Duquesnoy P., Blanchet-Bardon C., Wechsler J., Martin N., Christiano A.M. *et al.*, (1993b) A homozygous insertion-deletion in the type VII collagen gene (COL7A1) in Hallopeau-Siemens dystrophic epidermolysis bullosa. *Nature genet.* 5:287-293
- Hovnanian A., Duquesnoy P., Blanchet-Bardon C., Knowlton R., Amselem S., Lathrop M., Dubertret L. *et al.*, (1992) Genetic linkage of recessive dystrophic epidermolysis bullosa to the type VII collagen gene. *J. Clin. Invest.* 90:1032-1036

- Hovnanian A., Hilal L., Blanchet-Bardon C., De Prost Y., Christiano A.M., Uitto J.J. & Goossens M. (1994) Recurrent nonsense mutations within the type VII collagen gene in patients with severe dystrophic epidermolysis bullosa. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 289-296
- John S.W.M., Weitzner G., Rozen R. & Sriver C.R. (1991) A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 19:408
- Kaplan J.C. & Delpech M. (1993) Biologie moléculaire et médecine. Ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 298
- Lerman L.S. & Silverstein K. (1987) Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. New York, 482-501
- Lin A.N. & Carter D.M. (1992) Epidermolysis bullosa : Basic and clinical aspects. In: (eds) Springer-Verlag, New-York.
- Mashima Y., Murakami A., Weleber R.G., Kennaway N.G., Clarke L., Shiono T. & Inana G. (1992) Nonsense-codon mutations of the ornithine aminotransférase gene with decrease levels of mutant mRNA in gyrate atrophie. *Am. J. Hum. Genet.* 51:81-91
- McGrath J.A., Schofield O.M.V., Mayou B.J., McKee P.H. & Eady R.A.J. (1992) Epidermolysis bullosa complicated by squamous cell carcinoma: report of 10 cases. *J. Cutan. Pathol.* 19:116-123
- Myers R.M., Larin Z. & Maniatis T. (1985) Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science* 230:1242
- Parente M.G., Chung L.C., Ryyänen J., Woodley D.T., Wynn K.C., Bauer E.A., Mattei M.G. *et al.*, (1991) Human type VII collagen : cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6931-6935
- Prockop D.J., Olsen A., Kontusaari S., Hyland J., Ala-Kokko L., Vasan N.S., Barton E. *et al.*, (1990) Mutations in human procollagen genes. Consequences of the mutations in man and in transgenic mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 580:330-339
- Ryyänen M., Knowlton R.G., Parente M.G., Chung L.C., Chu M-L. & Uitto J. (1991) Human type VII collagen: genetic linkage of the gene (COL7A1) on chromosome 3 to dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Am. J. Hum. Genet.* 49:797-803
- Sakai L.Y., Keene D.R., Morris N.P. & Burgeson R.E. (1986) Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J. Cell. Biol.*, 103:1577-1586
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
- Tidman M.J. & Eady R.A.J. (1985) Evaluation of anchoring fibrils and other components of the dermal-epidermal junction in dystrophic epidermolysis bullosa by a quantitative ultrastructural technique. *J. Invest. Dermatol.* 84:374-377