



HAL
open science

Étude clinique et génétique des formes familiales de néphrose cortico-sensible à propos de 59 familles

Guillaume Dorval

► **To cite this version:**

Guillaume Dorval. Étude clinique et génétique des formes familiales de néphrose cortico-sensible à propos de 59 familles. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-01912822

HAL Id: dumas-01912822

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01912822>

Submitted on 5 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2018

N° 68

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

Étude clinique et génétique des formes familiales de
néphrose cortico-sensible à propos de 59 familles

Présentée et soutenue publiquement
le 16 mai 2018

Par

Guillaume DORVAL
Né le 12 avril 1985 à Paris (75)

Dirigée par Mme Le Docteur Olivia Boyer, MCU-PH

Jury :

M. Le Professeur Rémi Salomon, PU-PH Président

Mme Le Professeur Bénédicte Neven, PU-PH

M. Le Professeur Georges Deschênes, PU-PH



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Remerciements

A Monsieur Rémi Salomon,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury et de me donner l'opportunité de faire mon clinicat dans votre service lors des deux prochaines années. Merci de la confiance que vous m'accordez.

A Olivia Boyer,

Merci de m'avoir accompagné tout au long de ce travail. Merci de m'avoir soutenu et d'avoir corrigé les énièmes révisions ... Plus largement, merci également de me guider dans mes projets de recherche à la fois cliniques et plus fondamentaux au labo. Merci pour ta disponibilité et pour ta confiance.

A Madame Bénédicte Neven,

Merci d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse. Merci de m'avoir donné les bases de l'immunologie clinique et biologique, qui me permettent maintenant d'étudier l'interface entre l'immunologie et la néphrologie à travers ce fameux facteur de perméabilité glomérulaire.

A Monsieur Georges Deschênes,

Merci de me faire l'honneur de participer à ce jury. Merci de susciter en moi l'envie de partir à la recherche de la compréhension de cette maladie qu'est le syndrome néphrotique immunitaire.

A Madame Corinne Antignac,

Merci de m'avoir transmis le goût de la génétique et de m'accompagner au labo depuis mon master ...

A Monsieur Tim Ulinski,

Merci de m'avoir initié à la néphrologie pédiatrique au cours de mon internat, et de m'avoir donné l'envie d'aller plus loin.

A tous les médecins que j'ai rencontrés pendant mon internat et qui m'ont beaucoup appris sur le plan médical et humain.

A mes filles Apolline et Blanche,

Merci pour vos sourires et pour le bonheur que vous me procurez.

A Ombeline,

Merci pour ta patience, tes encouragements, ton écoute et ton soutien sur tous mes projets.

Table des matières

<u>REMERCIEMENTS</u>	2
<u>PARTIE I - INTRODUCTION</u>	4
<u>PARTIE II - MATERIEL ET METHODES</u>	9
1. PATIENTS	9
2. SEQUENCAGE SANGER DES GENES <i>EMP2</i> ET <i>HLA-DQA1</i>	10
3. ANALYSES DE LIAISONS	10
4. SEQUENCAGE D'EXOME (WES) ET "MUTATION CALLING"	10
5. ANALYSE MUTATIONELLE DANS LES GENES DE SNCR	11
6. ANALYSES STATISTIQUES	11
<u>PARTIE III - RESULTATS</u>	13
1. CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES FAMILLES DE SNCS	13
a. TRANSMISSION	13
b. EVOLUTION ET REPOSE AUX TRAITEMENTS	18
c. MALADIES ASSOCIÉES	21
2. GENOTYPAGE <i>HLA-DQA1</i> DANS LES FAMILLES DE SNCS	21
3. SEQUENCAGE <i>EMP2</i> DANS LES FAMILLES DE SNCS	24
4. SEQUENCAGE D'EXOME DANS LES FAMILLES DE SNCS	24
5. ANALYSE MUTATIONELLE DES GENES DE SNCR DANS LES FAMILLES DE SNCS	25
<u>PARTIE IV - DISCUSSION</u>	26
<u>PARTIE V - CONCLUSION</u>	31
<u>PARTIE VI - BIBLIOGRAPHIE</u>	32
<u>PARTIE VII - ANNEXES</u>	37
1. RESSOURCES WEB	37
2. TABLEAU S1	38
3. TABLEAU S2	40
4. FIGURE S1A-B	41

PARTIE I - INTRODUCTION

Le syndrome néphrotique idiopathique (INS) est la cause la plus fréquente de syndrome néphrotique chez les enfants et les jeunes adultes. Le SN peut survenir selon deux mécanismes principaux, aboutissant à un effacement des pieds des podocytes en microscopie électronique (Figure 1). (1) Une expression défectueuse des protéines spécifiques des podocytes résultant d'anomalies génétiques [presque toutes les SN dits cortico-résistants (SNCR)][1]; ou plus fréquemment, une réponse anormale (et non déterminée à ce jour) du système immunitaire, à des stimuli exogènes [principalement les SN cortico-sensibles (SNCS)][2]. En effet, l'hypothèse d'un facteur circulant pouvant dériver des cellules immunitaires est maintenant largement acceptée, mais non prouvée [3]. Les arguments en faveur de cette hypothèse incluent: le déclenchement de rechutes après une allergie ou une infection, l'observation unique d'une rémission de la protéinurie après transplantation d'un rein néphrotique chez un receveur non néphrotique, la transmission materno-fœtale d'un SN transitoire dans les heures qui suivent la naissance [4] et la récurrence immédiate d'une protéinurie néphrotique après transplantation rénale chez 30 à 50% des patients présentant un SNCR [5], qui répondent ensuite partiellement aux échanges plasmatiques ou aux immunoadsorption [6,7]. De plus, il a été montré que l'injection de surnageants de lymphocytes en culture issus de patients néphrotiques à des rongeurs immunocompétents induit une protéinurie néphrotique [8,9]. À ce jour, de nombreux candidats ont été évoqués, mais aucun n'a été définitivement incriminé comme la cause du syndrome néphrotique à médiation immunitaire [10].

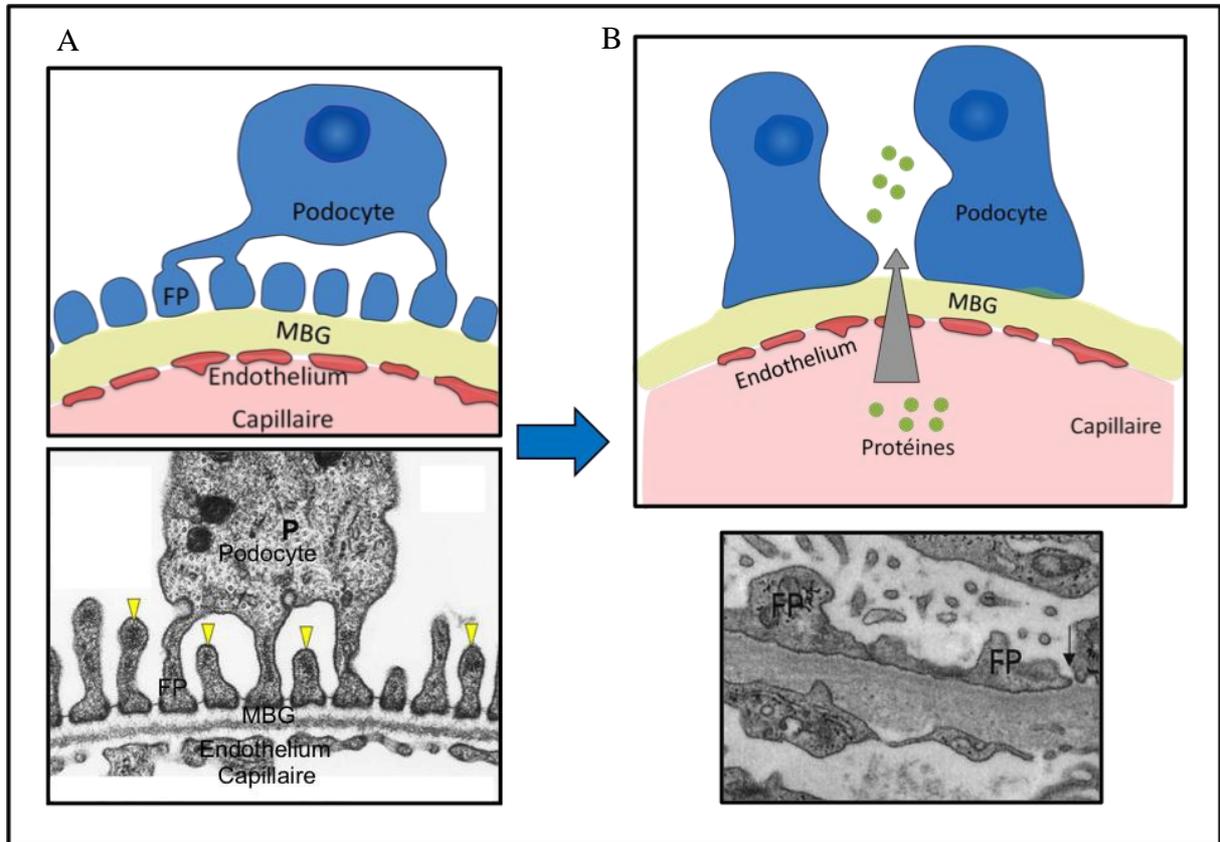


Figure 1 – Représentations schématique et en microscopie électronique d'un podocyte sain (A), et d'un podocyte lors d'un syndrome néphrotique (B) présentant un effacement des pédicelles responsable de la protéinurie.

Les patients atteints de SNCR ont fait l'objet d'études génétiques intenses au cours des dernières décennies. L'identification d'environ 40 gènes mutés codant pour des protéines exprimées dans le podocyte a permis de déchiffrer la physiopathologie de la barrière de filtration glomérulaire (Figure 1) [11]. Ces mutations sont identifiées dans 30 à 40% des cas de SNCR. Inversement, plusieurs études ont recherché des mutations dans les gènes podocytaires (principalement NPHS1, NPHS2 et WT1) dans des cohortes de SNCS, mais aucune mutation causale n'a été identifiée [15,16,12,17,18]. De plus, les formes familiales de SNCS sont rares [12-14]. En associant une stratégie d'analyse de liaison couplée au séquençage d'exome, des mutations dans le gène *EMP2* ont été identifiées chez quelques patients présentant un SNCS autosomique récessif (AR) [19]. Ce gène code la protéine Epithelial Membrane Protein 2, une tétraspane résidant dans des membranes lipidiques, et connue pour réguler le trafic de protéines telles que les intégrines et les protéines d'ancrage au GPI [20]. Cette découverte est surprenante dans une pathologie probablement médiée par un facteur circulant. Enfin, une étude récente a identifié par Exome-Wide-Association-Study deux variations dans le gène *HLA-DQA1* associées à la survenue d'un SNCS dans une population de patients originaires d'Asie du Sud-Est, puis confirmé cette association dans une cohorte de SNCS sporadiques caucasiens [21].

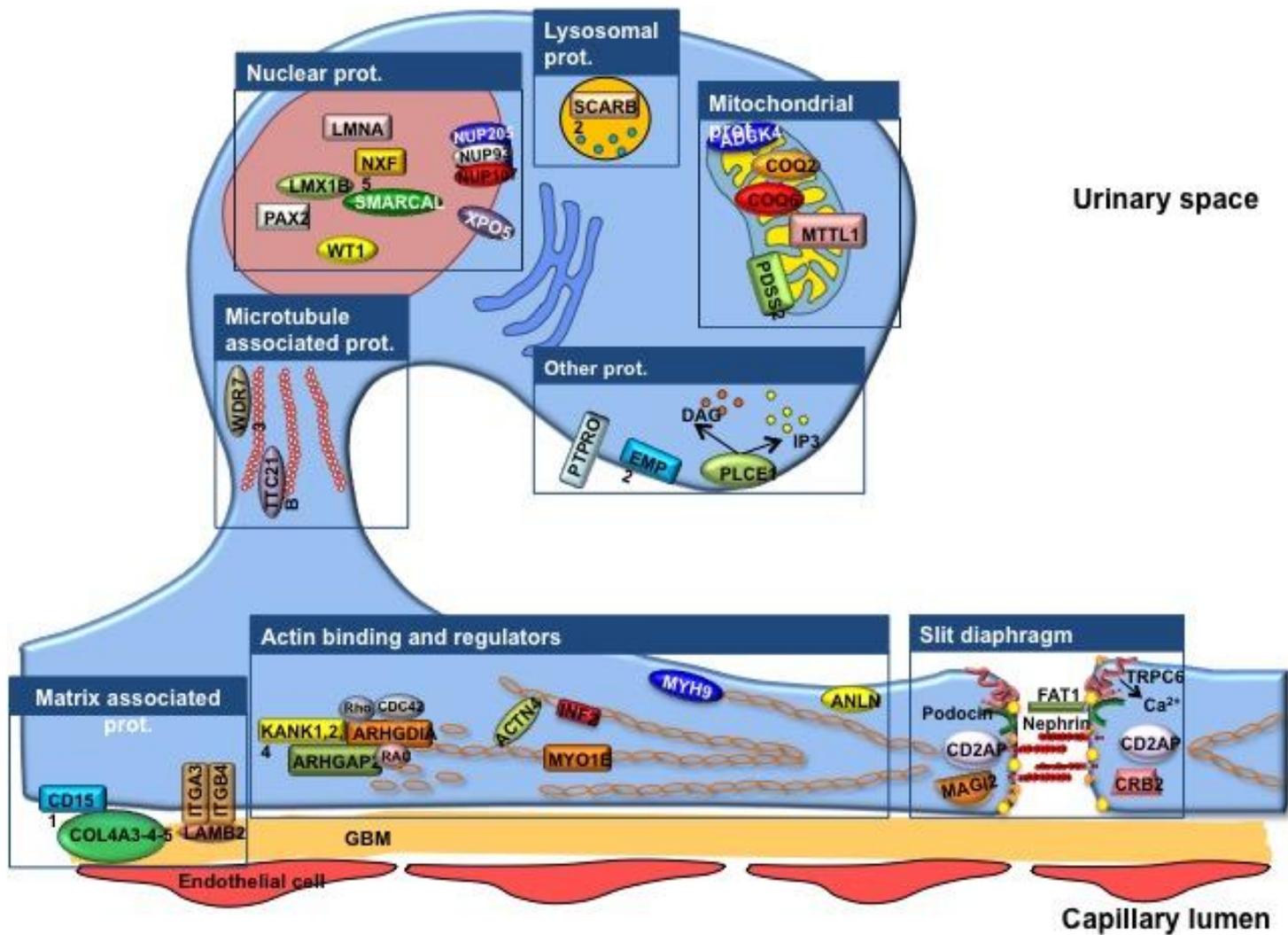


Figure 2 – Représentation schématique des gènes responsables de SNCR dits génétiques ou podocytopathies.

Le but de cette étude était double. D'abord, nous avons voulu évaluer le phénotype des SNCS familiaux grâce à une grande cohorte mondiale développée dans le laboratoire des maladies rénales héréditaires de l'institut Imagine depuis les années 1990. Nous avons ensuite voulu évaluer la contribution génétique sous-jacente à cette maladie à travers différentes analyses.

- (1) Nous avons déterminé la prévalence des mutations *EMP2* dans notre cohorte de familles SNCS compatibles avec un mode de transmission autosomique récessif (AR).

- (2) Par analyse de liaison combinée au séquençage de l'exome entier (WES), nous avons recherché une ou plusieurs mutation(s) dans des nouveaux gènes impliqués dans le SNCR dans un sous-ensemble de familles avec une hérédité AR.

- (3) Nous avons génotypé les deux variations du gène *HLA-DQA1* récemment associées à la survenue de SNCS sporadique.

PARTIE II - MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Patients

Au cours des trois dernières décennies, nous avons établi une cohorte mondiale de patients atteints de SN héréditaires. Parmi eux, 59 familles avec ≥ 2 individus atteints de SN, et dont ≥ 1 était cortico-sensible au diagnostic ont été incluses. Les informations cliniques ainsi que des échantillons d'ADN étaient disponibles pour 131 et 102 patients respectivement. Les familles ayant au moins deux membres atteints dans la même génération ont été considérées comme compatibles avec un mode de transmission autosomique récessif (AR), bien qu'une transmission liée à l'X soit également possible dans plusieurs familles. Inversement, lorsque la pathologie impliquait deux sujets dans deux générations successives, le mode d'hérédité était considéré comme autosomique dominant (AD). La sensibilité aux corticoïdes a été définie comme l'absence ou des traces de protéines sur la bandelette urinaire sur 3 jours consécutifs [22,23] après mise en route de la corticothérapie (4 semaines de prednisone à une dose de $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{j} \pm 3$ bolus de méthylprednisolone) selon le protocole de la Société Française de Néphrologie Pédiatrique [24]. La cortico-résistance secondaire a été définie comme l'absence de rémission complète après 8 semaines de corticothérapie chez des patients présentant une cortico-sensibilité initiale. Comme il n'a pas été possible de classer tous les patients en tant que rechuteurs fréquents ou cortico-dépendants selon les définitions de l'International Study of Kidney Disease in Children (ISKDC) [22] en raison du manque de détails chronologiques dans cette étude rétrospective, nous avons utilisé la classification suivante :

- (1) Les patients ayant présenté > 2 rechutes ou ayant eu besoin de traitements immunosuppresseurs d'épargne cortisonique ont été classés comme rechuteurs fréquents (RF).

- (2) Les patients ayant présenté ≤ 2 rechutes et ayant reçu uniquement une corticothérapie ont été classés comme non-rechuteurs fréquents (NRFs).

Le consentement éclairé écrit a été obtenu auprès des participants ou de leurs parents, et l'étude a été approuvée par le Comité de Protection des Personnes "Ile-De-France II".

2. Séquençage Sanger des gènes *EMP2* and *HLA-DQA1*

Les quatre exons codants et les séquences flanquantes introniques du gène *EMP2* ont été séquencés par la méthode Sanger chez les cas index des 33 familles avec un mode d'héritabilité compatible avec une transmission autosomique dominante. De plus, le second exon du gène *HLA-DQA1* a été séquencé pour analyser les fréquences alléliques des variants rs1129740 et rs1071630 chez tous les patients, et chez 33 témoins européens souffrant de SNCS sporadique. Les chromatogrammes de séquence ont été analysés en utilisant le logiciel Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, MI).

3. Analyses de liaison

Les analyses de liaison pan-génomique ont été réalisées en utilisant la puce Human Mapping 250k *NspI* array (Affymetrix). Les LOD-scores multipoints ont été calculés sur l'ensemble du génome à l'aide du logiciel MERLIN, dans un modèle d'hérédité AR avec pénétrance complète.

4. Séquençage d'exome et "Mutation Calling"

Le séquençage d'exome a été réalisé en utilisant le kit de capture Agilent SureSelect All Exon 51Mb V5 sur un séquenceur HiSeq2500 (Illumina). Les séquences obtenues ont été alignées sur le génome humain (National Center for Biotechnology build 37 / hg19) en utilisant le logiciel Lifescope de Life Technologies. Les appels de substitution et de variants

ont été effectués à l'aide du Genome Analysis Toolkit GATK, développé par le Broad Institute. Les variants ont ensuite été annotés à l'aide du logiciel de la plateforme de Bioinformatique de l'Université Paris Descartes. Pour la recherche de gène candidats, nous avons supposé que la mutation causale devait respecter les conditions suivantes:

- 1 / ségréger avec la maladie dans les familles
- 2/ ne pas être référencée par les bases de données disponibles, ou à une fréquence allélique mineure (MAF) $< 1/1000$ dans dbSNP [25], 1000 Genome Project [26] et ExAC [27];
- 3/ ne pas être retrouvé dans $> 10/1226$ projets de notre base de données interne.

La pathogénicité des variants faux-sens a été évaluée avec PolyPhen2, SIFT et Mutation Taster. Lorsque l'ADN était disponible, l'analyse de la ségrégation des variations d'intérêt dans les familles a été effectuée par séquençage de Sanger.

5. Analyse mutationnelle dans les gènes de SNCR

Le dépistage des gènes impliqués dans certaines formes de SNCR a été réalisé en utilisant un panel de gènes ciblé conçu pour un séquençage spécifique des exons codants et des séquences introniques flanquantes de plus de 10 bp de 34 gènes de SNCR connus (Multiplicom Kit-FSGS MASTR, Supp. Table 1) [28]. Les alignements de séquences et l'analyse des données ont été effectués comme décrit ci-dessus.

6. Analyses statistiques

Le logiciel Graphpad Prism a été utilisé pour les analyses statistiques. Les différences entre les proportions ont été évaluées en utilisant le test exact de Fisher, et les moyennes ont été comparées avec le test t de Student. Le coefficient de corrélation a été calculé par la méthode de Pearson. Les facteurs de risque ont été exprimés en odds ratio. Les données ont été examinées en utilisant un intervalle de confiance à un seuil de 95% et la signification

statistique a été fixée à $p < 0,05$. Lorsque des comparaisons multiples étaient effectuées, une correction de Bonferroni a été appliquée pour contrôler les résultats dits faux-positifs.

PARTIE III - RESULTATS

1. Caractéristiques cliniques des familles de SNCS

a. Transmission

Cinquante-neuf familles avec ≥ 2 individus présentant un SN, et dont ≥ 1 était cortico-sensible au diagnostic ont été identifiées. Les informations cliniques étaient disponibles pour 131 patients, 77 étant des hommes (58.8%). Tous les patients ont présenté un syndrome néphrotique avec des œdèmes cliniques découvert à un âge médian de 7,85 ans [1-58] (Table 1).

La cohorte a été divisée en deux groupes en fonction du mode de transmission potentiel le plus probable: AR (71 patients de 33 familles non apparentées) ou AD (60 patients de 26 familles non apparentées). Cependant, dans certains cas de transmission AR, une transmission autosomique dominante avec pénétrance incomplète, ou une transmission liée à l'X ne pouvait pas être exclue. Les données cliniques sont présentées dans le tableau 1 et Supp. Figure 1A-B.

Les familles avec une transmission AR probable étaient principalement composées de 2-3 frères et sœurs (Supp Figure 1A). Notons que la cohorte comprenait une unique grande famille de 2 frères et sœurs et 3 cousins impliquant trois générations et plusieurs boucles de consanguinité. Tous les sujets atteints ont présenté une évolution similaire avec une cortico-sensibilité sans cortico-résistance secondaire (SS20, Supp. Figure 1A). Deux fratries étaient composées de triplés, dont une à l'état monozygote et dans laquelle seulement 2 frères étaient atteints avec un âge d'apparition des premiers symptômes identique (respectivement 7,1 et 7,3

ans). Ils ont cependant présenté une évolution très différente (SS6, Supp. Figure 1A). Quatre autres paires de jumeaux se composaient de deux frères et sœurs monozygotes dont tous étaient affectés et de deux dizygotes également malades.

Tableau 1: Caractéristiques des patients

	groupe AR		Total AR (1)	Total AD (2)	p (1) vs. (2)
	Exome	Pas d'exome			
Familles (patients)	13 (30)	20 (41)	33 (71)	26 (60)	
Familles consanguines Connue/suspectée	4/3	4/1	8/4	2	
Age moyen au diagnostic (ans) ± ETM	4.57 ± 0.65	8.08 ± 1.81	6.52 ± 1.06	10.21 ± 1.94	0.08
Ratio (H/F)	4	1.2	1.85	1.04	
Traitements (patients)					
Corticoïdes	30	41	71	60	
Bolus de corticoïdes	3 (10%)	3 (7.3%)	6 (8.5%)	3 (5.0%)	0.51
Agents alkylants	9 (30%)	10 (24.4%)	19 (26.8%)	9 (15.0%)	0.13
Inhibiteur de calcineurine	6 (20%)	21 (50.2%)	27 (38%)	23 (40.0%)	0.86
Mycophenolate Mofetil	5 (16.7%)	4 (9.8%)	9 (12.7%)	7 (11.7%)	1.00
Echanges plasmatiques	0	2 (4.9%)	2 (2.8%)	0	-
Ergamisole / Lévamisole	4 (13.3%)	0	4 (5.6%)	2 (3.3%)	0.45
Rituximab	2 (6.7%)	1 (2.4%)	3 (4.2%)	4 (6.7%)	0.70
Rechuteurs fréquents	18 (60%)	22 (53.7%)	40 (56.3%)	34 (56.7%)	0.90
Rechuteurs Non-Fréquents	12 (40%)	19 (46.3%)	31 (43.7%)	26 (43.3%)	
Cortico-résistance					
Primaire	0	4 (9.8%)	4 (5.6%)	3 (5.0%)	0.90
Secondaire	2 (6.7%)	7 (14.6%)	8 (11.3%)	5 (8.3%)	0.77
Histologie	9	21	30	25	
LGM	8 (88.9%)	16 (76.2%)	24 (80%)	21 (84%)	0.74
HSF	1 (11.1%)	5 (23.8%)	6 (20%)	4 (16.0%)	
IRT					
Cortico-sensibilité initiale	0	4	4	2	0.69
Cortico-résistance initiale	0	0	0	0	-
Transplantation rénale	0	4	4	2	
Récidive après transplantation	0	1	1	1	
Maladie auto-immune associées	1	0	1	2	0.90
Origine géographique (familles)					
Europe			14	19	
Maghreb			13	5	
Iran/Oman/Inde/Turkie			5	0	
USA			1	0	
Asie du SE			0	2	

Notes: AR: autosomique récessif; AD: autosomique dominant; ETM: Ecart type à la moyenne; H: homme; F: Femme; IRT: Insuffisance Rénale Terminale; LGM: Lésion Glomérulaire Minime; HSF: Hyalinose Segmentaire et Focale

Aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes AR et AD concernant l'évolution de la maladie, les traitements utilisés, ou les lésions histologiques.

La plupart des familles présentant une transmission AD apparente de la maladie étaient composées d'un parent et d'un enfant, quel que soit le sexe (15 sur 26 familles). Aucune grande famille n'a été rapportée dans ce groupe (Supp Figure 1B).

La plupart des patients de la cohorte ont développé un SN dans l'enfance (89,7%). L'âge moyen au début était de $6,52 \pm 1,06$ ans et de $10,21 \pm 1,94$ ans dans chacun des groupes AR et AD respectivement ($p = 0,08$). La variabilité inter- et intra-familiale concernant l'âge au diagnostic était faible dans chaque groupe (Figure 3A-B). La différence moyenne dans l'âge à l'apparition entre les apparentés était de 5,4 ans. Cependant, dans une famille issue du groupe AR et six issues du groupe AD, les apparentés affectés présentaient une différence d'âge aux premiers symptômes de plus d'une décennie (figure 3A-B).

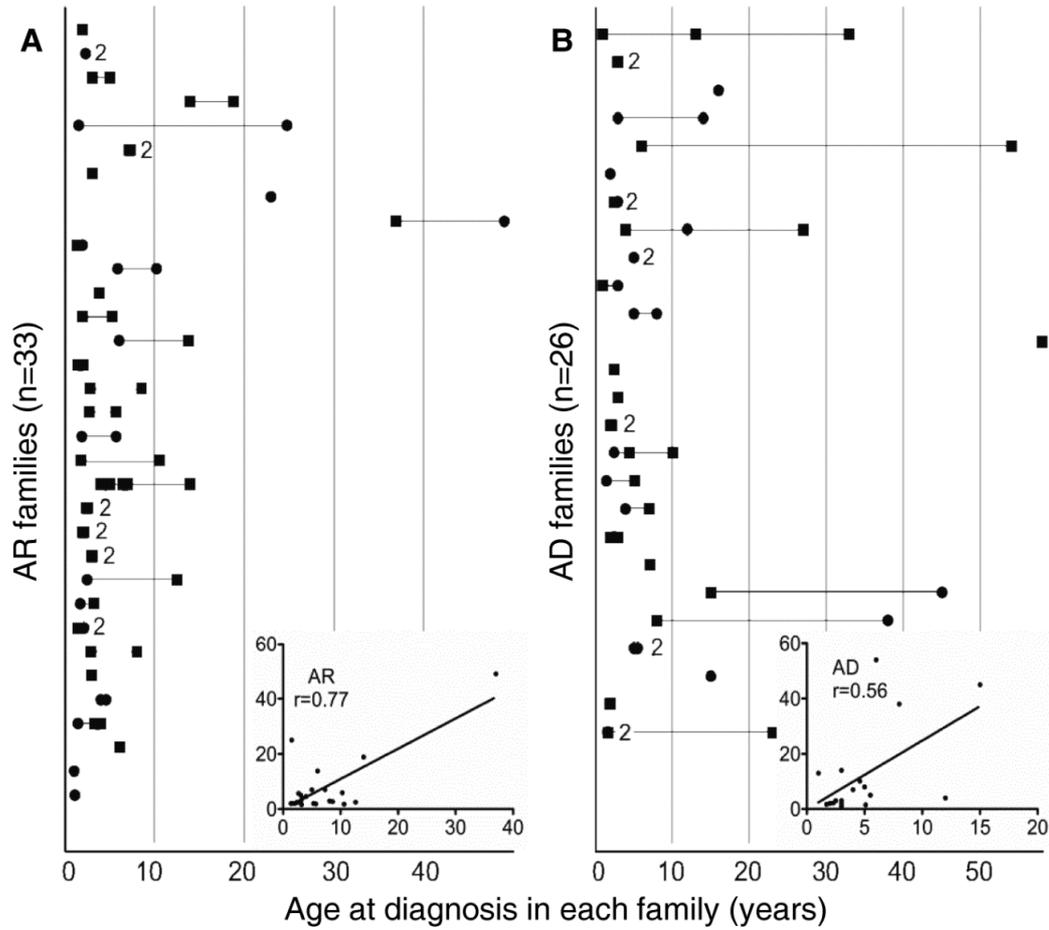


Figure 3 - Variabilité Inter- et intra-familiale concernant l'âge au diagnostic de SNCS.

L'âge au début de la maladie est corrélé entre les différents sujets affectés dans les familles AR (A) et AD (B). L'âge moyen au début est de $6,52 \pm 1,06$ ans et de $10,21 \pm 1,94$ ans dans les groupes AR et AD respectivement. Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé dans toutes les familles dont l'âge était disponible au départ dans au moins deux cas.

Chaque ligne horizontale représente une famille. Les numéros de famille sont donnés le long de l'axe vertical. Les garçons sont représentés par des carrés, les filles par des cercles. Le nombre "2" est noté quand deux carrés / cercle (s) sont indiscernables.

b. Evolution et réponse aux traitements

Les données histologiques étaient similaires entre les patients des deux groupes (Tableau 1). Les lésions glomérulaires minimales (LGM) étaient les plus fréquemment observées dans la cohorte (81,8%).

Tous les patients ont reçu une corticothérapie initiale, et les traitements d'épargne cortisonique les plus utilisés étaient les anti-calcineurines, quel que soit le groupe (Tableau 1). Le nombre de patients RF et NRF ne différait pas de manière significative entre les groupes, mais un total de 25 familles (42,4%) partageait des patients RF et NRF (tableau 1, figure 4A-B).

Par définition, au moins un sujet affecté présentait un SNCS typique au diagnostic. Cependant, dans 19 familles, au moins un patient présentait une cortico-résistance, qu'elle soit primaire (n = 7 - 7 familles) ou secondaire (n = 13 - 12 familles) avec une proportion similaire dans les deux groupes (primaire 5,6% vs 5,0% et secondaire 11,3 % et 8,3%, p = 1 et 0,77 respectivement). Chez les patients présentant une cortico-résistance primaire (4 dans le groupe AR et 3 dans le groupe AD - Tableau 2A), la rémission a été obtenue par la suite sous traitement immunosuppresseur plus intensif. Treize (10%) patients issus de 12 familles ont développé une cortico-résistance secondaire. La rémission a été obtenue chez six d'entre eux en utilisant un autre traitement immunosuppresseur, et six autres ont progressé vers l'insuffisance rénale terminale (IRT) (Tableau 2B). Parmi eux, quatre n'ont pas récidivé après transplantation. Les deux autres ont récidivé mais la rémission a pu être obtenue après immunosuppression intensive (échanges plasmatiques +/- cyclosporine IV +/- rituximab). Le dernier patient a été perdu de vue.

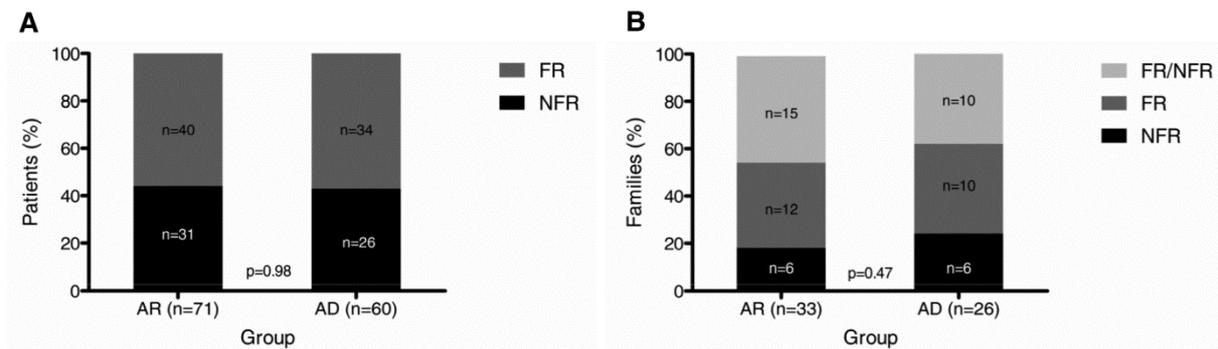


Figure 4- Evolution en fonction du nombre de rechutes.

A) Proportion de patients rechuteurs fréquents (RF) ou non (NRFs), et classés selon le mode de transmission. Les deux groupes étaient similaires en ce qui concerne l'évolution de la maladie. (B) Proportion de familles ayant présenté un RF, un NRF ou RF-NRF. La plupart des familles partageaient des patients RF et NRF.

Tableau 2: Devenir des patients SNCR primaires (A, n=7) ou secondaires (B, n=13).

A	AR	AD
Cortico-résistance primaire	4	3
Evolution vers l'IRT	0	0
Traitement utilisé pour induire la rémission		
Inhibiteur de calcineurine	2	2
Rituximab	0	1
Décédé sous traitement	1	0
Perdu de vu	1	0
B	AR	AD
Cortico-résistance secondaire	8	5
Evolution vers l'IRT	4	2
Transplantation	4	2
Récidive après transplantation	1	1
Traitement utilisé pour induire la rémission		
a- Sans transplantation		
Cyclophosphamide	1	0
Echanges plasmatiques	1	0
Rituximab	2	0
Inhibiteur de calcineurine	0	1
MMF	0	1
Perdu de vu	0	1
b- Récidive après transplantation		
EP + Inhibiteurs de calcineurine + Rituximab	1	0
EP seuls	0	1

Notes: AR: Autosomique Récessif ; AD: Autosomique Dominant ; IRT: Insuffisance Rénale Terminale; EP: Echanges plasmatiques ; MMF : Mycophénolate Mofetil ; IV : Intra-veineux

Parmi les patients ayant présenté une cortico-résistance primaire, aucun n'a évolué vers une insuffisance rénale terminale (IRT). Inversement, parmi les 13 patients ayant développé une cortico-résistance secondaire, 6 ont progressé vers l'IRT et ont finalement été transplantés; 2 ont récidivé après la transplantation.

c. Maladies associées

Peu de maladies auto-immunes associées ont été identifiées: un diabète de type 1 avec l'allèle à risque *HLA-DQB1*, une gammopathie monoclonale et une vascularite leucocytoclasique. Par ailleurs, dans une famille non consanguine, deux enfants et leur père présentaient une néphrolithiase hypophosphatémique / ostéoporose-1 (NPHLOP1 - # OMIM-612286) sans mutation retrouvée dans les gènes *SLC34A1* et *SLC9A3R1*. Un patient avait une surdité neurologique bilatérale progressive associée à une hypoplasie rénale droite sans insuffisance rénale.

Globalement, les caractéristiques cliniques étaient compatibles avec un SN à médiation immunitaire dans tous les cas. Nous avons observé une grande variabilité intra- et inter-familiale concernant l'évolution de la maladie, en dehors de l'âge d'apparition entre les cas apparentés.

2. Séquençage *HLA-DQA1* dans les familles de SNCS

Deux variations fréquentes du gène *HLA-DQA1* (rs1129740 et rs1071630) ont récemment été rapportées comme facteurs de risque de développer un SNCS sporadique [21]. Tous les patients de notre cohorte ont été génotypés pour les variations *HLA-DQA1*, incluant un total de 49 patients d'origine Européenne. Cette population a été comparée à 23 cas contrôle présentant un SNCS sporadiques et 503 témoins Européens en apparence bonne santé à partir de la base de données 1000genomes. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3. Ces deux variants étaient enrichis dans notre cohorte de SNCS familial. Un risque accru était observé par rapport aux contrôles sains: OR = 5,54 [3,27-9,38] et OR = 6,57 [3,88-11,12] pour chacun des variants rs1129740 et rs1071630 respectivement avec une valeur de $p < 0,001$ pour les deux après la correction de Bonferroni. Les patients ayant une évolution atypique de leur maladie (SNCR primaire ou secondaire) présentaient par ailleurs le même risque que les autres: OR = 1 [0,36-2,81]. Aucune différence n'a été trouvée entre les cas de SNCS familiaux

et sporadiques pour chacune des deux variations (OR = 0,56 [0,19-1,52]). Enfin, les patients qui présentaient ces variations à l'état homozygote (n = 73) avaient un âge inférieur au diagnostic par rapport aux patients hétérozygotes (n = 24) (AgeHO = 6,13 ± 0,93 et AgeHE = 11,54 ± 3,82, P = 0,04).

Tableau 3: Génotypage *HLA-DQA1* (rs1129740 and rs1071630) dans le SNCS familial comparé aux cas sporadiques et à la base de données 1000génomés.

Origine	Variation <i>HLA-DQA1</i>	Allèle	Fréquence allélique minimale		OR (CI _{95%})	Allèle	Fréquence allélique minimale		OR (CI _{95%})
			SNCS Familial	Contrôles sains 1KGenome			SNCS Familial	SNCS Sporadique	
Monde	rs1129740	G	32 (0.157)	2388 (0.477)	OR=4,89 (3,35-7,18) p<0.001	G	32 (0.157)	9 (0.122)	OR=0,74 (0,33-1,63) p=0.46
		A	172 (0.843)	2620 (0.523)		A	172 (0.843)	65 (0.878)	
	rs1071630	T	32 (0.157)	2238 (0.447)	OR=4,34 (2,96-6,36) p<0.001	T	32 (0.157)	9 (0.122)	OR=0,74 (0,33-1,63) p=0.46
		C	172 (0.843)	2770 (0.553)		C	172 (0.843)	65 (0.878)	
Europe	rs1129740	G	18 (0.184)	448 (0.445)	OR=5,54 (3,27-9,38) p<0.001	G	18 (0.184)	5 (0.109)	OR=0,56 (0,19-1,62) p=0.26
		A	80 (0.817)	558 (0.555)		A	80 (0.817)	41 (0.891)	
	rs1071630	T	18 (0.184)	406 (0.404)	OR=6,57 (3,88-1,12) p<0.001	T	18 (0.184)	5 (0.109)	OR=0,56 (0,19-1,62) p=0.26
		C	80 (0.817)	600 (0.596)		C	80 (0.817)	41 (0.891)	

Note ;; SNCS: Syndrome Néphrotique Cortico-Sensible (<http://www.internationalgenome.org>)

3. Séquençage d'*EMP2* dans les familles SNCS

Des mutations du gène *EMP2* ont été rapportées dans trois familles présentant un SNCS ou SNCR autosomique récessif [19]. Les quatre exons codants et leurs séquences introniques flanquantes ont été séquencés en Sanger chez les 33 cas index de chaque famille AR. Aucune mutation pathogène n'a pu être détectée. Ces résultats suggèrent que les mutations *EMP2* ne sont pas fréquemment impliquées dans la survenue d'un SNCS familial de transmission AR.

4. Séquençage d'exome dans les familles SNCS

Nous avons cherché de nouveaux gènes impliqués dans le SNCS héréditaire en se concentrant sur les formes AR. Dans quatre familles différentes, avec une consanguinité connue (SS26 et SS20) ou suspectée (SS27 et SS23), l'analyse de liaison n'a pas abouti à l'identification d'une région commune d'homozygotie. De plus, dans la grande famille multiplex (SS20), nous n'avons trouvé aucune région commune d'homozygotie. Dans ce dernier cas, l'analyse de l'arbre généalogique suggère une hérédité AR, bien qu'une transmission liée à l'X ne puisse être exclue. Aucune région avec un score LOD significatif n'a été identifiée.

Le WES a été réalisé dans un sous-groupe de 13 familles AR dans lesquelles l'ADN était disponible chez les frères et sœurs atteints et leurs parents pour des études de ségrégation (Supp Figure 1). Selon la stratégie de filtration des variants utilisée, et après des études de ségrégation, 8 variants (sur 7 gènes) ont été identifiés dans 4 familles (1 homozygote, 5 hémizygotés, 2 hétérozygotes composites). Aucun gène muté n'était commun à deux familles (Supp Table 2). Aucun des gènes candidats identifiés n'est connu pour avoir une expression protéique spécifique dans les lymphocytes ou les podocytes selon ProteinAtlas® (Supp. Tableau 2). De plus, malgré l'hypothèse d'un facteur circulant, aucune protéine associée à un

de ces gène ne présentait de peptide signal de sécrétion [29]. Ces résultats ont été soumis à GeneMatcher [30] mais aucune correspondance n'a été identifiée à ce jour.

5. Analyse mutationnelle des gènes de SNCR dans les familles SNCS

Cinq des six patients ayant présentant une IRT ont été sélectionnés pour l'étude des 34 gènes impliqués dans la survenue d'un SNCR (Tableau Supp. 1). Le dernier n'avait plus d'ADN disponible, mais présentait une cortico-sensibilité initiale (SS12 - Supp Figure 1A). Trois autres patients, perdus de vue (n = 1) ou avec une évolution de la maladie inhabituelle (n = 2) ont également été testés. Parmi eux, un avait présenté une cortico-résistance primaire avec notion de rémission complète puis évolution vers une IRT sans autre information. L'autre a présenté un SN cortico-sensible associé à une surdité neurosensorielle. Aucune mutation pathogène n'a été retrouvée chez chacun des huit patients.

PARTIE IV - DISCUSSION

Au cours des dernières années, les études génétiques des formes familiales puis sporadiques de SNCR ont conduit à la découverte de nombreux gènes dont les mutations sont impliquées dans la survenue de la maladie. Contrairement au SNCR héréditaire, le SNCS familial est une pathologie très rare, et les quelques études publiées n'ont pas permis d'élucider la physiopathologie de cette maladie. Nous rapportons aujourd'hui 131 cas atteints de SNCS familial, issus de 59 familles non apparentées qui représentent la plus grande cohorte de SNCS familial publiée à ce jour. En effet, seuls 139 cas de SNCS familiaux (> 53 familles) ont été décrits dans un total de 16 cohortes publiées (tableau 4).

Tous les patients de notre cohorte étaient sensibles à un traitement immunosuppresseur, ce qui soutient fortement le rôle de mécanismes immunitaires sous-jacents à la physiopathologie de cette maladie [2]. En effet, les rares cas de SNCR primaire que nous rapportons ont finalement tous été sensibles à un autre immunosuppresseur au cours du suivi.

Les caractéristiques de notre cohorte sont similaires à la plupart des séries de SNCS idiopathiques sporadiques de la littérature [24,44]. En effet, comme les autres études, nous avons observé une prédominance masculine (59,5%), une médiane d'âge au diagnostic de 7,85 ans [1-58], 35,6% de patients cortico-dépendants, 14,2% des patients cortico-résistants et 78,3% de LGM à la biopsie. Nous rapportons ici environ 56% de rechuteurs fréquents quel que soit le groupe AR ou AD, tandis que Harambat et coll. ont rapporté 60% de FR et de patients cortico-dépendants dans une cohorte française de SN sporadiques en 2013 [45]. En 1974, Bader et coll. rapportaient une évolution clinique similaire chez 16 patients atteints de SNCS familial (9 familles) et 54 cas sporadiques [34].

Des données contradictoires existent concernant la variabilité intra-familiale de l'évolution de la maladie dans les SNCS familiaux. En 2001, Fuchshuber et coll. ont rapporté 32 cas (15 familles) présentant un SNCS familial survenu pendant l'enfance [12]. L'évolution de la maladie était favorable chez tous les patients. À l'inverse, l'évolution clinique pouvait être très hétérogène entre les patients d'une même famille, y compris chez les jumeaux monozygotes dans la série publiée par Bader et coll. [34]. Notre série confirme cette variabilité intra-familiale, puisque 42,4% des familles partagent à la fois des sujets RF et NRF. Il est intéressant de noter que parmi les triplés monozygotes, l'un n'était pas affecté, l'autre était cortico-sensible alors que le dernier a présenté une cortico-résistance secondaire. Ces données plaident fortement contre une origine monogénique du SNCS familial, et suggèrent plutôt le rôle prépondérant de facteurs environnementaux.

Cependant, nous avons évoqué précédemment la faible variabilité intra-familiale concernant l'âge aux premiers symptômes, avec un coefficient de corrélation de Pearson de 0,77 et 0,56 dans les groupes AR et AD respectivement. De même, dans la série de Fuchshuber et coll., le coefficient de corrélation de Spearman était de 0,60 et la différence d'âge au début entre les frères et sœurs n'excédait pas 4 ans, sauf dans 2 familles. Ces données suggèrent une influence génétique, *a minima* sur le développement des formes familiales de SN. En effet, une cause environnementale commune entraînerait l'apparition synchrone de la maladie chez les apparentés, mais pas au même âge. Globalement, si l'environnement semble jouer un rôle majeur dans l'évolution de la maladie, l'âge d'apparition pourrait être associé à une prédisposition génétique.

Au niveau moléculaire, Gee et coll. ont identifié des mutations dans le gène *EMP2* chez 3 patients issus de 2 familles présentant un SNCS, et chez un patient avec SNCR [19]. La protéine *EMP2* codée est exprimée dans les podocytes [19] mais aussi dans les autres cellules glomérulaires [46]. Cependant, on pourrait s'attendre à ce que le gène impliqué dans le SNCS

héréditaire code une protéine exprimée dans le système immunitaire. De plus, l'identification de mutations dans le gène *EMP2* à la fois chez des patients cortico-sensible et cortico-résistante est une découverte inattendue au regard de la physiopathologie différente de chacune de ces maladies. Nous n'avons trouvé aucune mutation dans le gène *EMP2* chez 33 individus atteints (provenant de 33 familles avec une transmission AR), suggérant que les mutations du gène *EMP2* ne sont pas une cause fréquente de SNCS familial. D'autres études sont nécessaires pour rechercher le lien entre ces mutations et les perturbations immunitaires observées dans les SNCS pendant les rechutes. De plus, certaines études rapportent que les corticoïdes peuvent avoir un impact sur le cytosquelette, et donc un bénéfice potentiel sur les formes de SN associées à des maladies du podocyte [47]

Alors que la plupart des SNCR héréditaires a une héritabilité monogénique classique, nos résultats suggèrent un modèle d'hérédité plus complexe dans le cas des SNCS familiaux. En effet, si le SNCS représente plus de 90% des patients avec un SN [48], le SNCS familial est très rare et représente moins de 10% des 570 familles de SN incluses dans notre cohorte de SN familiaux (SNCR + SNCS). De plus, nous rapportons dans la cohorte actuelle l'histoire originale d'une famille de triplets monozygotes, dont seuls deux frères ont développé un SNCS au même âge, le troisième étant resté indemne (famille SS6). Enfin, nous n'avons identifié aucune mutation dans le gène *EMP2*, ni dans les séquences codantes du génome. Au total, ces données suggèrent fortement une héritabilité complexe du SNCS familial, bien que des mutations privées dans des séquences codantes ou des ARN non codants ne puissent pas être exclues.

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté l'implication du locus HLA comme facteurs de risque de survenue de SNCS, supportant l'hypothèse d'une héritabilité polygénique [49]. Nous décrivons dans ce travail une forte corrélation entre la survenue d'un SNCS et les deux variations du gène *HLA-DQA1* (rs1129740 et rs1071630) précédemment citées, qui diffèrent

significativement des fréquences rapportées chez les témoins sains. Ces résultats corroborent ceux rapportés par Gbagedesin et al. en 2015 [21]. En raison de la difficulté de trouver des témoins d'origine géographique identique, et en raison de l'absence de cas familiaux, les variations dans *HLA-DQA1* ne pouvaient pas être comparées dans des populations non Européennes. Cependant, les comparaisons entre notre cohorte et les données de la base de données 1000genome ont montré des résultats similaires (Tableau 3).

Tableau 4: Cohorte de SNCS familial publiées depuis 1970.

Référence	Année	Pays d'origine	Hommes/Femmes	Cas de SNCS familiaux
Roy et al.(31)	1971	USA	0/2	Jumeaux
Moncrieff et al.(32)	1973	Deux hôpitaux en Angleterre	ND	14 cas dans 7 familles
White et al.(33)	1973	Vingt-quatre hôpitaux en Europe	ND	12 cas
Bader et al.(34)	1974	USA	12/4	16 cas dans 9 familles
McEnery et al.(35)	1989	USA	ND	8 cas dans 4 familles
Awadalla et al.(36)	1989	Koweit	3/0	3 cas dans une famille
Mallman et al.(37)	1998	Pakistan	2/0	2 cas dans une famille; hexadactilie post-axiale
Fuchshuber et al.(12)	2001	Sept pays Caucasiens	25/7	32 cas dans 15 familles
Kari et al.(38)	2001	Inde	5/6	11 cas dans 3 familles
Ruf et al.(14)	2003	Allemagne	2/1	3 cas dans une famille
Landau et al.(13)	2007	Deux familles Bédouines	10/4	14 cas dans 2 familles
Roberts et al.(39)	2008	Australie	1/1	2 cas dans une famille
Motoyama et al.(40)	2009	Japon	1/3	4 cas dans 2 familles
Xia et al.(41)	2013	Chine	7/2	9 cas dans 3 familles
Tusgaard Peterson et al.(42)	2012	Danmark	2/0	2 cas dans une famille
Cehade et al.(43)	2013	Portugal et France	5/0	5 cas dans 2 familles
Total			75/30 (71.4% hommes)	139 cas familiaux

Notes: Cent trente-neuf cas familiaux ont été rapportés dans la littérature. Le ratio H/F était de 2,5..ND: Non Disponible

PARTIE V - CONCLUSION

Les progrès réalisés dans la compréhension de la physiopathologie du syndrome néphrotique soulignent l'importance de distinguer les patients atteints d'une maladie à médiation immunitaire de ceux associés à un défaut génétique intrinsèque au podocyte. Comme nous le rapportons ici, la cortico-sensibilité n'est pas un critère exclusif pour retenir la médiation immunitaire de la maladie. En effet, nous rapportons ici que les patients cortico-résistants (primaires et secondaires) étaient tous compatibles avec une médiation immunitaire à travers leur sensibilité à au moins un immunosuppresseur. Le monogénisme semble être une cause très rare de SN immunitaire, au moins dans les formes familiales. Ceci soutient l'hypothèse d'une influence génétique plus complexe dans ces familles. En ce sens, la combinaison de variants, dans le système HLA ou non, pourrait s'associer à un risque accru de développer un SN immunitaire. La mise en évidence de ces variants, à l'origine de l'hétérogénéité de la maladie, aiderait les cliniciens à classer les patients. Cependant, seule l'analyse génétique à grande échelle, telle que le génome-WAS pourra aider à déchiffrer la physiopathologie de la maladie en découvrant d'autres susceptibilités génétiques à développer un SN à médiation immunitaire.

PARTIE VI - BIBLIOGRAPHIE

1. Machuca E, Benoit G, Antignac C (2009) Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Human molecular genetics* 18 (R2):R185-194. doi:10.1093/hmg/ddp328
2. Ding WY, Koziell A, McCarthy HJ, Bierzynska A, Bhagavatula MK, Dudley JA, Inward CD, Coward RJ, Tizard J, Reid C, Antignac C, Boyer O, Saleem MA (2014) Initial steroid sensitivity in children with steroid-resistant nephrotic syndrome predicts post-transplant recurrence. *J Am Soc Nephrol* 25 (6):1342-1348. doi:10.1681/ASN.2013080852
3. Shalhoub RJ (1974) Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 2 (7880):556-560
4. Kemper MJ, Wolf G, Muller-Wiefel DE (2001) Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 344 (5):386-387. doi:10.1056/NEJM200102013440517 [doi]
5. Hoyer JR, Vernier RL, Najarian JS, Raij L, Simmons RL, Michael AF (1972) Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. *Lancet* 2 (7773):343-348
6. Dantal J, Bigot E, Bogers W, Testa A, Kriaa F, Jacques Y, Hurault de Ligny B, Niaudet P, Charpentier B, Souillou JP (1994) Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 330 (1):7-14. doi:10.1056/NEJM199401063300102 [doi]
7. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, Lovell H, Warady B, Gunwar S, Chonko AM, Artero M, Vincenti F (1996) Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 334 (14):878-883. doi:10.1056/NEJM199604043341402 [doi]
8. Boulton Jones JM, Tulloch I, Dore B, McLay A (1983) Changes in the glomerular capillary wall induced by lymphocyte products and serum of nephrotic patients. *Clin Nephrol* 20 (2):72-77
9. Koyama A, Fujisaki M, Kobayashi M, Igarashi M, Narita M (1991) A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas. *Kidney Int* 40 (3):453-460
10. Davin JC (2015) The glomerular permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology*. doi:10.1007/s00467-015-3082-x
11. Lovric S, Ashraf S, Tan W, Hildebrandt F (2016) Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how? *Nephrol Dial Transplant* 31 (11):1802-1813. doi:10.1093/ndt/gfv355
12. Fuchshuber A, Gribouval O, Ronner V, Kroiss S, Karle S, Brandis M, Hildebrandt F (2001) Clinical and genetic evaluation of familial steroid-responsive nephrotic syndrome in childhood. *J Am Soc Nephrol* 12 (2):374-378

13. Landau D, Oved T, Geiger D, Abizov L, Shalev H, Parvari R (2007) Familial steroid-sensitive nephrotic syndrome in Southern Israel: clinical and genetic observations. *Pediatric nephrology* 22 (5):661-669. doi:10.1007/s00467-006-0409-7 [doi]
14. Ruf RG, Fuchshuber A, Karle SM, Lemainque A, Huck K, Wienker T, Otto E, Hildebrandt F (2003) Identification of the first gene locus (SSNS1) for steroid-sensitive nephrotic syndrome on chromosome 2p. *J Am Soc Nephrol* 14 (7):1897-1900
15. Caridi G, Gigante M, Ravani P, Trivelli A, Barbano G, Scolari F, Dagnino M, Murer L, Murtas C, Edefonti A, Allegri L, Amore A, Coppo R, Emma F, De Palo T, Penza R, Gesualdo L, Ghiggeri GM (2009) Clinical features and long-term outcome of nephrotic syndrome associated with heterozygous NPHS1 and NPHS2 mutations. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 4 (6):1065-1072. doi:10.2215/CJN.03910808
16. Dhandapani MC, Venkatesan V, Rengaswamy NB, Gowrishankar K, Ekambaram S, Sengutavan P, Perumal V (2016) Report of novel genetic variation in NPHS2 gene associated with idiopathic nephrotic syndrome in South Indian children. *Clinical and experimental nephrology*. doi:10.1007/s10157-016-1237-0
17. Mao J, Zhang Y, Du L, Dai Y, Gu W, Liu A, Shang S, Liang L (2007) NPHS1 and NPHS2 gene mutations in Chinese children with sporadic nephrotic syndrome. *Pediatric research* 61 (1):117-122. doi:10.1203/01.pdr.0000250041.19306.3d
18. Ruf RG, Schultheiss M, Lichtenberger A, Karle SM, Zalewski I, Mucha B, Everding AS, Neuhaus T, Patzer L, Plank C, Haas JP, Ozaltin F, Imm A, Fuchshuber A, Bakkaloglu A, Hildebrandt F, Group APNS (2004) Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int* 66 (2):564-570. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00775.x
19. Gee HY, Ashraf S, Wan X, Vega-Warner V, Esteve-Rudd J, Lovric S, Fang H, Hurd TW, Sadowski CE, Allen SJ, Otto EA, Korkmaz E, Washburn J, Levy S, Williams DS, Bakkaloglu SA, Zolotnitskaya A, Ozaltin F, Zhou W, Hildebrandt F Mutations in EMP2 Cause Childhood-Onset Nephrotic Syndrome. *Am J Hum Genet*. doi:S0002-9297(14)00182-7 [pii]10.1016/j.ajhg.2014.04.010 [doi]
20. Forbes A, Wadehra M, Mareninov S, Morales S, Shimazaki K, Gordon LK, Braun J (2007) The tetraspan protein EMP2 regulates expression of caveolin-1. *J Biol Chem* 282 (36):26542-26551. doi:M702117200 [pii]10.1074/jbc.M702117200 [doi]
21. Gbadegesin RA, Adeyemo A, Webb NJ, Greenbaum LA, Abeyagunawardena A, Thalgahagoda S, Kale A, Gipson D, Srivastava T, Lin JJ, Chand D, Hunley TE, Brophy PD, Bagga A, Sinha A, Rheault MN, Ghali J, Nicholls K, Abraham E, Janjua HS, Omoloja A, Barletta GM, Cai Y, Milford DD, O'Brien C, Awan A, Belostotsky V, Smoyer WE, Homstad A, Hall G, Wu G, Nagaraj S, Wigfall D, Foreman J, Winn MP, Mid-West Pediatric Nephrology C (2015) HLA-DQA1 and PLCG2 Are Candidate Risk Loci for Childhood-Onset Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 26 (7):1701-1710. doi:10.1681/ASN.2014030247

22. Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO), Glomerulonephritis work group: KDIGO Clinical practice guidelines for Glomerulonephritis (2012). *Kidney Int (Suppl 2)*:240-242
23. Gipson DS, Massengill SF, Yao L, Nagaraj S, Smoyer WE, Mahan JD, Wigfall D, Miles P, Powell L, Lin JJ, Trachtman H, Greenbaum LA (2009) Management of childhood onset nephrotic syndrome. *Pediatrics* 124 (2):747-757. doi:10.1542/peds.2008-1559
24. Dossier C, Sellier-Leclerc AL, Rousseau A, Michel Y, Gautheret-Dejean A, Englander M, Madhi F, Charbit M, Ulinski T, Simon T, Jacqz-Aigrain E, Deschenes G (2014) Prevalence of herpesviruses at onset of idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology* 29 (12):2325-2331. doi:10.1007/s00467-014-2860-1
25. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29 (1):308-311
26. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* 526 (7571):68-74. doi:10.1038/nature15393
27. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG, Exome Aggregation C (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536 (7616):285-291. doi:10.1038/nature19057
28. Boyer O, Lipska-Zietkiewicz B, Gribouval O, Nitschke P, Bole C, Rothier A, Schaefer F, Antignac C (2014) Rationalizing the Genetic Diagnosis of SRNS/FSGS Using Next Generation Sequencing Kits. *J Am Soc Nephrol* 25:172A
29. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8 (10):785-786. doi:10.1038/nmeth.1701
30. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A (2015) GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat* 36 (10):928-930. doi:10.1002/humu.22844
31. Roy S, 3rd, Pitcock JA (1971) Idiopathic nephrosis in identical twins. *American journal of diseases of children* 121 (5):428-430

32. Moncrieff MW, White RH, Glasgow EF, Winterborn MH, Cameron JS, Ogg CS (1973) The familial nephrotic syndrome. II. A clinicopathological study. *Clin Nephrol* 1 (4):220-229
33. White RH (1973) The familial nephrotic syndrome. I. A European survey. *Clin Nephrol* 1 (4):215-219
34. Bader PI, Grove J, Trygstad CW, Nance WE (1974) Familial nephrotic syndrome. *The American journal of medicine* 56 (1):34-43
35. McEnery PT, Welch TR (1989) Major histocompatibility complex antigens in steroid-responsive nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology* 3 (1):33-36
36. Awadalla NB, Teebi AS, Elzouki AY, Shaltout A (1989) Frequent relapser minimal change nephrosis: an unrecognized X-linked disorder? *European journal of pediatrics* 149 (3):205-207
37. Mallmann R (1998) Idiopathic nephrotic syndrome and hexadactyly in two brothers. *Pediatric nephrology* 12 (5):417-419
38. Kari JA, Sinnott P, Khan H, Trompeter RS, Snodgrass GJ (2001) Familial steroid-responsive nephrotic syndrome and HLA antigens in Bengali children. *Pediatric nephrology* 16 (4):346-349
39. Roberts IS, Gleadle JM (2008) Familial nephropathy and multiple exostoses with exostosin-1 (EXT1) gene mutation. *J Am Soc Nephrol* 19 (3):450-453. doi:10.1681/ASN.2007080842
40. Motoyama O, Sugawara H, Hatano M, Fujisawa T, Iitaka K (2009) Steroid-sensitive nephrotic syndrome in two families. *Clinical and experimental nephrology* 13 (2):170-173. doi:10.1007/s10157-008-0117-7
41. Xia Y, Mao J, Jin X, Wang W, Du L, Liu A (2013) Familial steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome: seven cases from three families in China. *Clinics* 68 (5):628-631. doi:10.6061/clinics/2013(05)08
42. Tusgaard Petersen B, Frydensbjerg Andersen R, Rittig S (2012) [Family occurrence of steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome]. *Ugeskrift for laeger* 174 (46):2868-2869
43. Chehade H, Cachat F, Girardin E, Rotman S, Correia AJ, Fellmann F, Bonny O (2013) Two new families with hereditary minimal change disease. *BMC nephrology* 14:65. doi:10.1186/1471-2369-14-65
44. Dossier C, Lapidus N, Bayer F, Sellier-Leclerc AL, Boyer O, de Pontual L, May A, Nathanson S, Orzechowski C, Simon T, Carrat F, Deschenes G (2016) Epidemiology of idiopathic nephrotic syndrome in children: endemic or epidemic? *Pediatric nephrology* 31 (12):2299-2308. doi:10.1007/s00467-016-3509-z
45. Harambat J, Godron A, Ernould S, Rigothier C, Llanas B, Leroy S (2013) Prediction of steroid-sparing agent use in childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology* 28 (4):631-638. doi:10.1007/s00467-012-2365-8

46. Takemoto M, He L, Norlin J, Patrakka J, Xiao Z, Petrova T, Bondjers C, Asp J, Wallgard E, Sun Y, Samuelsson T, Mostad P, Lundin S, Miura N, Sado Y, Alitalo K, Quaggin SE, Tryggvason K, Betsholtz C (2006) Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *The EMBO journal* 25 (5):1160-1174. doi:10.1038/sj.emboj.7601014
47. Gbadegesin R, Lavin P, Foreman J, Winn M (2011) Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: an update. *Pediatric nephrology* 26 (7):1001-1015. doi:10.1007/s00467-010-1692-x
48. The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. A report of the International Study of Kidney Disease in Children (1981). *J Pediatr* 98 (4):561-564
49. Karp AM, Gbadegesin RA (2016) Genetics of childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology*. doi:10.1007/s00467-016-3456-8

PARTIE VII - ANNEXES

Web Resources :

The URLs for data presented herein are as follows:

dBSNP : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

1000genomes project : <http://www.internationalgenome.org>

PolyPhen : <http://genetics.bwh.harvard.edu>

SIFT <http://sift.jcvi.org>

Mutation Taster <http://www.mutationtaster.org>

ExaC: <http://exac.broadinstitute.org>

ProteinAtlas: <http://www.proteinatlas.org>

GeneMatcher: <https://genematcher.org>

Tableau S1 : Liste des 34 gènes testés par la puce Multiplicom.

Nom du gène	Chr	Position génomique Début	Position génomique Fin	NCBI Refseq	CCDS	Transcript Ensembl	Nombre total d'exons	Nombre total d'exons codants	Séquences codantes (bp)	Protéine
ACTN4	19	39138310	39222223	XM_005259283	CCDS12518	ENST00000252699	21	21	2736	actinin, alpha 4
ADCK4	19	41197434	41222790	XM_005259275	CCDS12562	ENST00000324464	15	14	1635	aarF domain containing kinase 4
ANLN	7	36429415	36493400	NM_018685	CCDS5447	ENST00000265748	24	24	3375	anillin, actin binding protein
ARHGAP24	4	86396267	86923823	NM_001025616	CCDS34025	ENST00000395184	10	9	2247	Rho GTPase activating protein 24
ARHGDIA	17	79825597	79829282	NM_001185078	CCDS11788	ENST00000269321	6	5	615	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha
CD151	11	832952	838834	XM_005253261	CCDS7719	ENST00000322008	9	7	762	CD151 molecule (Raph blood group)
CD2AP	6	47445525	47594999	XM_005248977	CCDS34472	ENST00000359314	18	18	1920	CD2-associated protein
COL4A3	2	228029281	228179508	XM_005246280	CCDS42829	ENST00000396578	52	52	5013	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
COL4A4	2	227867427	228028829	XM_005246281 ; NM_000092	CCDS42828	ENST00000396625	48	47	5073	collagen, type IV, alpha 4
COL4A5	X	107683112	107940775	NM_000495	CCDS14543	ENST00000361603	51	51	5058	collagen, type IV, alpha 5
COL4A5	X	107683112	107940771	XM_005262070	CCDS35366	ENST00000328300	53	51		collagen, type IV, alpha 5
COQ2	4	84184977	84206067	XM_005262927	CCDS47090	ENST00000311469	7	7	1266	coenzyme Q2 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase
COQ6	14	74416996	74430373	NM_182476	CCDS9823	ENST00000334571	12	12	1407	coenzyme Q6 monooxygenase
CRB2	9	126118539	126141032	NM_173689	CCDS6852	ENST00000373631	13	13	3858	crumbs homolog 2 (Drosophila)
DGKE	17	54911460	54946036	XM_005257749	CCDS11590	ENST00000284061	12	12	1704	diacylglycerol kinase, epsilon 64kDa

EMP2	16	10622279	10674555	NM_001424	CCDS1054 1	ENST0000035954 3	5	4	504	epithelial membrane protein 2
INF2	14	105155943	105185942	XM_005268005	CCDS4517 3	ENST0000033063 4	22	20	3723	inverted formin, FH2 and WH2 domain containing
INF2	14	105155974	105185940	XM_005268007	CCDS9989	ENST0000039263 4	23	21		inverted formin, FH2 and WH2 domain containing
LAMB2	3	49158547	49170551	XM_005265127	CCDS2789	ENST0000041810 9	33	32	5397	laminin, beta 2 (laminin 5)
LMX1B	9	129376722	129458730	NM_002316.3	CCDS6866	ENST0000052611 7	8	8	1188	LIM homeobox transcription factor 1, beta
MAGI2	7	77646393	79082890	NM_012301	CCDS5594	ENST0000035421 2	22	22	4365	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2
MT-TL1	MT	3230	3304			ENST0000038634 7	1	1	75	mitochondrially encoded tRNA leucine 1 (UUA/G)
MYH9	22	36677327	36784063	NM_002473	CCDS1392 7	ENST0000021618 1	41	40	5883	myosin, heavy chain 9, non-muscle
MYO1E	15	59427113	59665099	NM_004998	CCDS3225 4	ENST0000028823 5	28	28	3327	myosin IE
NPHS1	19	36316866	36342739	XM_005258961	CCDS3299 6	ENST0000037891 0	29	29	3726	nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)
NPHS2	1	179519674	179545068	NM_014625	CCDS1331	ENST0000036761 5	8	8	1152	nephrosis 2, idiopathic, steroid-resistant (podocin)
PAX2	10	102505468	102589698	XM_005269873	CCDS5356 9	ENST0000042843 3	11	11	1254	paired box 2
PDSS2	6	107473761	107780767	XM_005267059	CCDS5059	ENST0000036903 7	8	8	1200	prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 2
PLCE1	10	95790569	96092580	XM_005269882	CCDS4155 2	ENST0000037138 0	32	31	6909	phospholipase C, epsilon 1
PLCE1	10	95848830	96088149	XM_005269882	CCDS5355 5	ENST0000037138 5	32	31		phospholipase C, epsilon 1
PTPRO	12	15475331	15750327	NM_030667	CCDS8675	ENST0000028117 1	27	26	3651	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O
SCARB2	4	77079890	77135046	NM_005506	CCDS3577	ENST0000026489 6	12	12	1437	scavenger receptor class B, member 2
SMARCAL1	2	217277137	217347776	XM_005246632	CCDS2403	ENST0000035727 6	18	16	2865	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of

										chromatin, subfamily a-like 1
TRPC6	11	101322295	101454659	XM_005271656	CCDS8311	ENST0000034432 7	13	13	2796	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6
TTC21B	2	166729872	166810353	NM_024753	CCDS3331	ENST0000024334 5	29	29	3951	tetratricopeptide repeat domain 21B
WDR73	15	85185999	85197566	NM_032856	CCDS4533	ENST0000043463 9	8	8	1137	WD repeat domain 73
WT1	11	32409321	32457176	NM_024426	CCDS7878	ENST0000033235 1	10	10	1554	Wilms tumor 1
WT1	11	32410225	32457081	NM_024424.3	CCDS4456	ENST0000044807 2	10	10	1554	Wilms tumor 1

Le tableau expose les différents transcrits utilisés pour analyser les variants identifiés. Les 34 gènes contiennent 648 exons codants et couvrent 92663 pb de séquence codante

Tableau S2 Liste des gènes retrouvés en séquençage d'exome après application de différents filtres dans un sous-groupe de patients (13 familles) présentant une transmission AR.

Gene	Ensembl® Transcript	Protein	Status Ho/He/Hemi	Chromosomal localization	Variation			Score			ExAC frequency	Protein function (NeXtProt®)	Expression in immune system / glomeruli
					Exon	Nucleotid	Protein	PolyPhen 2	SIFT	Mutation Tester			
SS21													
<i>KLHL13</i>	ENST00000262820.7	Kelch-like protein 13	Hemi	Xq24	7	c.1948T>A	p.Ser650Thr	0.885	0	DC:1	0	Substrate-specific adapter of a BCR (BTB-CUL3-RBX1) E3 ubiquitin-protein ligase complex required for mitotic progression and cytokinesis.	Immune: no Glomeruli: no
<i>MAP7D1</i>	ENST00000373151.6	Microtubule associated protein 7 domain containing 1	Comp he	1p34.3	5	c.680G>A	p.Arg227Gln	0.973	0	DC:1	1/120000	Microtubule cytoskeleton organization	LN: low Glomeruli: no
					15	c.2248G>A	p.Glu750Lys	0.058	0.87	PM:1	0		
SS19													
<i>ASB12</i>	ENST00000362002.2	Ankyrin repeat and SOCS box protein 12	Hemi	Xq11.2	10	c.806delT	p.(Leu269Cysfs*18)	NA	NA	NA	14/75000	Intracellular signal transduction. Protein ubiquitination. Cytokine signaling.	Immune: NA Glomeruli: no
SS27													
<i>FRMPD3</i>	ENST00000276185.8	FERM and PDZ domain-containing protein 3	Hemi	Xq22.3	14	c.3736C>T	p.Pro1246Ser	0.992	0	PM:0.792	5/82000	Unknown	BM and spleen: low Spleen: low Glomeruli: no
<i>RGAG4</i>	ENST00000609883.1	Retrotransposon GAG domain-containing protein 4	Hemi	Xq13.1	1	c.526G>C	p.Asp176His	0.052	0.01		4/82000	Unknown	BM and LN: low Glomeruli: no
SS22 0													
<i>HDAC6</i>	ENST00000334136.9	Histone deacetylase 6	Hemi	Xp11.23	9	c.694G>A	p.Ala232Thr	0.986	0	DC:1	0	Protein deacetylase activity. Degradation of misfolded proteins	Ubiquitarious
<i>FIBCD1</i>	ENST00000372338.8	Fibrinogen C domain-containing protein 1	Ho	9q34.12	2	c.542G>A	p.Arg181His	0.008	0	DC:0.992	0	Facilitate the endocytosis of acetylated components	Ubiquitarious

Note: La couverture moyenne allait de 88 à 123 avec 98% de bases couvertes à 15X et 99% à 5X avec le kit SureSelect

◇ Analyses de liaison; DC: Disease Causing score; PM : Polymorphisme; NA: Non available; He: Hétérozygote; Hemi: Hémizygotte; Ho: Homozygote;

Comp He: Hétérozygote Composite; LN: Lymph Node; BM: Bone Marrow

NeXtProt (<https://www.nextprot.org/>)

ProteinAtlas (<http://www.proteinatlas.org/>)

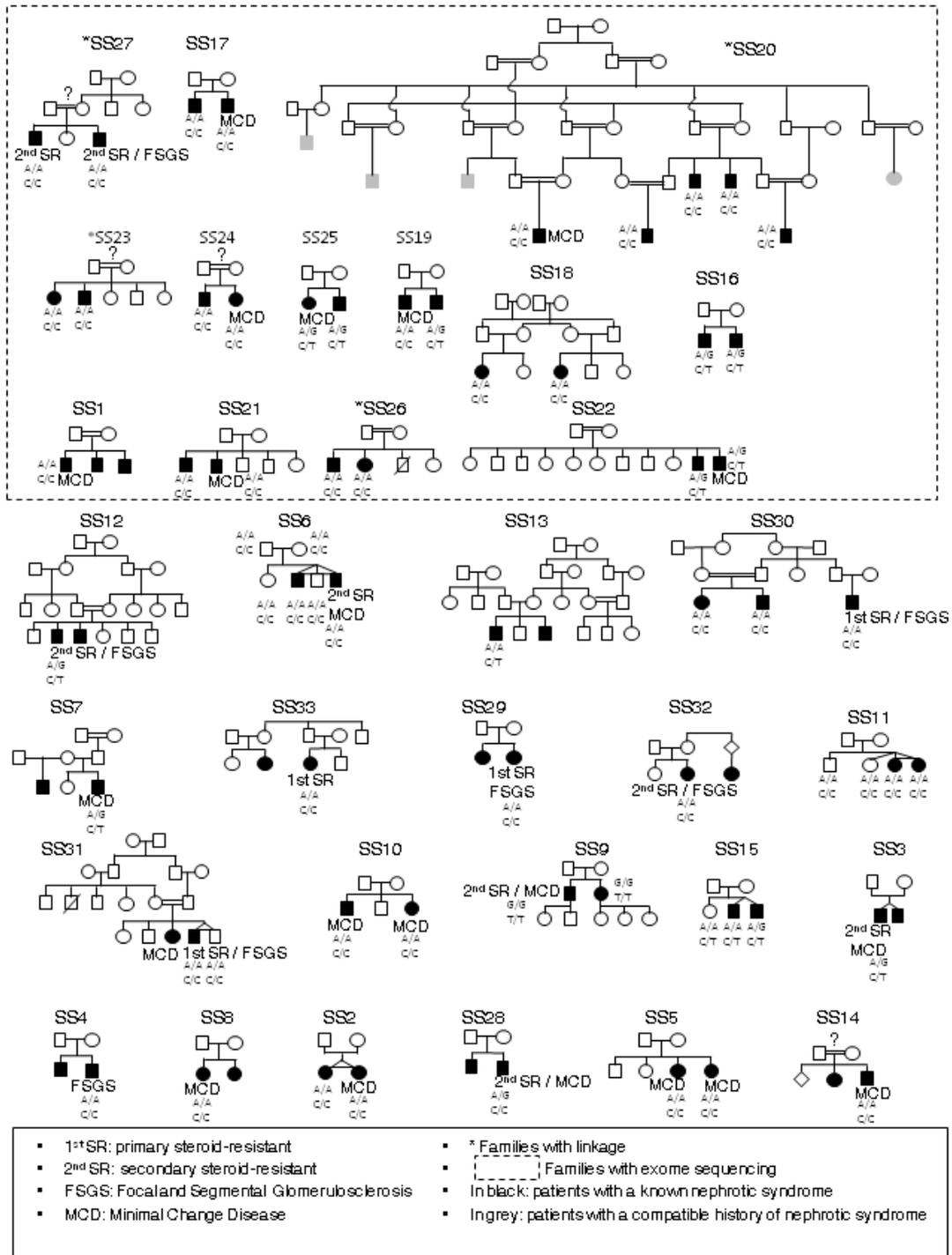


Figure S1A – Arbres généalogiques des 33 familles présentant une transmission autosomique récessive. Les familles testées par analyse de liaison sont notées *, et les familles dans lesquelles un séquençage d'exome a été réalisé apparaissent dans l'encadré.

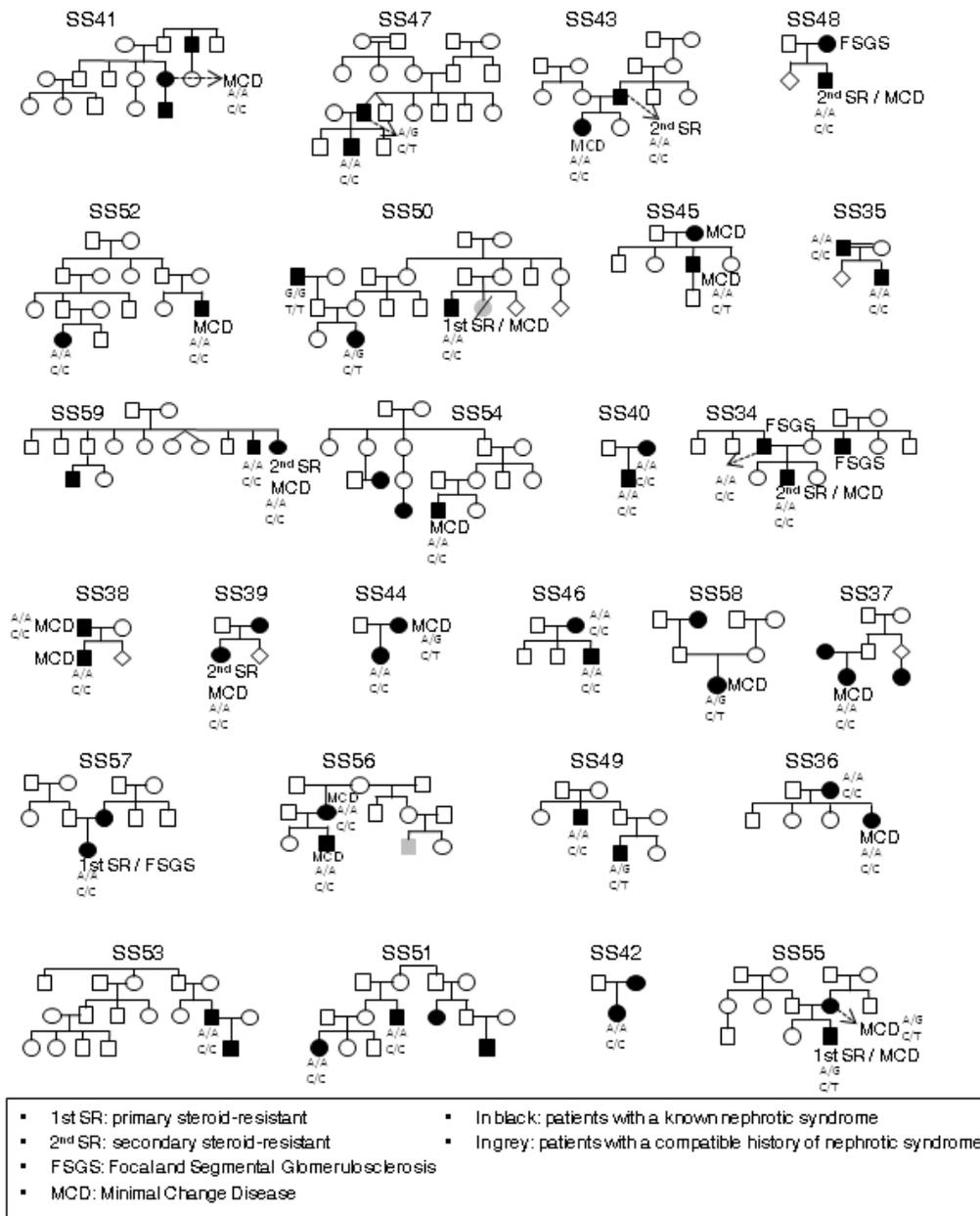


Figure S1B - Arbres généalogiques des 26 familles présentant une transmission autosomique dominante.

Etude clinique et génétique des formes familiales de néphrose cortico-sensible à propos de 59 familles

Le syndrome néphrotique cortico-sensible familial (SNCS) est une maladie rare. Des formes récessives liées à des mutations dans le gène *EMP2* ont été identifiées, et des variations spécifiques de *HLA-DQA1* ont été associées à sa survenue.

Les données cliniques de 59 familles de SNCS ont été analysées. *EMP2* a été séquencé dans des familles avec une hérédité autosomique récessive (AR). Un séquençage de l'exome a été effectué dans chez 13 patients présentant une potentielle transmission AR. Deux variants *HLA-DQA1* rapportés dans les formes sporadiques de SNCS ont été génotypés dans l'ensemble de la cohorte.

Dans l'hypothèse d'une hérédité Mendélienne, une transmission AR ou dominante (AD) était compatible chez 33 et 26 familles. Les caractéristiques cliniques entre les groupes AR et AD étaient similaires, et la variabilité intra-familiale concernant l'âge au diagnostic était faible dans chaque groupe. Tous les patients, y compris ceux présentant un SNCR primaire (n = 7) ou secondaires (n = 13) étaient sensibles à un traitement immunosuppresseur. Les variations *HLA-DQA1* étaient fortement liées à la maladie (OR = 4.34 et OR = 4.89; p < 0.001). Le séquençage d'exome n'a pas révélé de mutation pathogène dans le sous-groupe étudié. Le séquençage ciblé de *EMP2* n'a pas mis en évidence de mutation dans ce gène.

Ces résultats soulignent l'hétérogénéité clinique et génétique du SNCS familial. Les résultats cliniques soutiennent une origine immunitaire, et ce quelle que soit la sensibilité initiale des patients aux corticoïdes. L'absence de variant partagé par deux familles, ainsi que la présence des variants fréquents dans *HLA-DQA1* suggèrent une héritabilité complexe de la maladie.

Mots clés : Syndrome Néphrotique Familial - Génétique - *EMP2* - Immunité - Cortico-sensibilité - Cortico-résistance - Podocyte - *HLA-DQA1*

Clinical and genetic analyzes of a large cohort of familial steroid-sensitive nephrotic syndrome

Familial steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) is a rare condition. The disease pathophysiology remains elusive. However, bi-allelic mutations in the *EMP2* gene were identified, and specific variations in *HLA-DQA1* were linked to a high risk to develop the disease.

Clinical data were analyzed in 59 SSNS families. *EMP2* gene was sequenced in families with a potential autosomal recessive (AR) inheritance. Exome sequencing was performed in a subset of 13 families with potential AR inheritance. Two variations in *HLA-DQA1* were genotyped in the whole cohort.

Transmission was compatible with an AR (n=33) or dominant (AD-n=26) inheritance, assuming that familial SSNS is a monogenic trait. Clinical features did not differ between AR and AD groups. Intra-familial variability regarding the age at diagnosis was low in each group. All patients, including primary (n=7) and secondary-SRNS (n=13) were sensitive to additional immunosuppressive therapy. Both *HLA-DQA1* variations were found to be highly linked to the disease (OR=4.34 and OR=4.89; p<0.001). Exome sequencing did not reveal any pathogenic mutation, nor *EMP2* sequencing.

Altogether, these results highlight the clinical and genetic heterogeneity in familial SSNS. Clinical findings sustain an immune origin, whatever initial steroid-sensitivity in all patients. The absence of variant shared by two families and the *HLA-DQA1* variations enrichments suggest a complex mode of inheritance.

Keywords : Familial Nephrotic Syndrome - Genetics - *EMP2* - Immunity - Steroid-Sensitivity - Steroid-Resistance - Podocyte - *HLA-DQA1*

Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'École de Médecine
75270 Paris cedex 06