



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2023

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Description du phénotype et du génotype de la maladie rénale
chronique associée aux variants *MUC1***

Présentée et soutenue publiquement le 28 juin 2023 à 18 heures
au Pôle Recherche
par **Florentin BOURRE**

JURY

Président :

Monsieur le Professeur François GLOWACKI

Assesseurs :

Monsieur le Docteur Jean-Baptiste GIBIER

Monsieur le Docteur Olivier GRUNEWALD

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Victor FAGES

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses :
celles-ci sont propres à leurs auteurs.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics
ADMCKD : Autosomal dominant medullary cystic kidney disease
ADN : acide désoxyribonucléique,
ADTKD : Autosomal Dominant Tubulo-Interstitial Kidney Diseases
AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien
ATF6 : activating transcription factor 6
AUC : Area Under the ROC Curve
CA15-3 : Cancer Antigen 15-3
CAKUT : Congenital anomalies of the kidney and urinary tract
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CKD EPI : Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
DFG : Débit de filtration glomérulaire
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
ERGIC : ER-Golgi Intermediate Compartment
FJN : familial juvenile nephronophtise
GWAS : Genome Wide Association Study
HTA : hypertension artérielle
IRC : insuffisance rénale chronique
IRE1 : inositol requiring enzyme 1
IRT : insuffisance rénale terminale
kb : kilobase
kDa : kiloDalton
KDIGO : Kidney Disease Improving Global Outcomes
MCD : medullary cystic disease
MCKD : Medullary Cystic kidney disease
MODY : Maturity Onset Diabetes of the Young
MUC1fs : Mucin 1 frameshift
NCC : cotransporteur sodium chlore
NGS : next-generation sequencing
NTA : nécrose tubulaire aigüe
PCR : Polymerase Chain reaction
PERK : PKR-like ER kinase
RE : réticulum endoplasmique
SMRT : Single Molecule Real Time Sequencing
SNV : single nucleotide variant
UPR : unfolded protein reponse
VNTR : Variable Number Tandem Repeat

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
Introduction	3
I. Que sont les ADTKD :	3
a. Historique :	3
b. Définitions :	4
c. Épidémiologie	7
d. Description des principales ADTKD (hors <i>MUC1</i>)	8
i. <i>UMOD</i>	8
1. Génétique et physiopathologie :	8
2. Clinique :	13
3. Histologie :	14
4. Prise en charge :	15
ii. <i>REN</i>	16
1. Génétique, physiopathologie et histologie :	16
2. Clinique :	18
3. Prise en charge :	19
iii. <i>HNF1β</i>	19
iv. Autres ADTKD plus rares :	20
II. <i>MUC1</i> : rôle, génétique et clinique	21
a. Les mucines et leurs fonctions	21
b. <i>MUC1</i> : structure, génome et fonctions	24
i. Gène, synthèse et structure :	24
ii. Fonctions :	26
1. Dans les tissus sains	26
2. Dans le tissu rénal :	27
3. En oncologie :	29
iii. Mutation <i>MUC1</i> : historique et génétique	30
iv. Physiopathologie :	33
v. Phénotype clinique, explorations d'imagerie et histologie des patients <i>MUC1</i> :	36
vi. Prise en charge de la néphropathie <i>MUC1</i>	39
III. Conduite à tenir devant une ADTKD : recommandations	41

IV. Analyse génétique et mise en évidence de la mutation au CHU de Lille :	45
ARTICLE	54
RESULTATS :	71
I. Analyse des variants pathogènes identifiés au CHU par panel NGS pour recherche de néphropathie héréditaire	71
II. Caractéristiques génétiques, cliniques, biologiques et histologiques des patients <i>ADTKD-MUC1</i> :	74
DISCUSSION :	80
REFERENCES :	86
ANNEXES	93

RESUME

Contexte : Les variants *MUC1* sont responsables d'une néphropathie interstitielle autosomique dominante (ADTKD) et sont considérés comme une cause rare d'insuffisance rénale chronique. Ces variants pathogènes sont majoritairement représentés par une insertion de cytosine (insC) dans un domaine VNTR (Variable Number Tandem Repeat), dont l'analyse génétique est techniquement difficile. L'objectif de ce travail est de décrire les caractéristiques cliniques et histologiques des patients ADTKD-*MUC1* diagnostiqués par une nouvelle technique mise en place au CHU de Lille.

Méthode : Nous avons inclus les patients français ayant bénéficié d'un séquençage NGS à Lille pour néphropathies héréditaires du 1^{er} janvier 2018 au 28 février 2023. Un script bio-informatique a été développé permettant de compter les séquences sauvages et mutées du VNTR de *MUC1*. Les données cliniques, biologiques et histologiques des patients ADTKD-*MUC1* identifiés ont été recueillies de façon rétrospective.

Résultats : Sur les 61 résultats positifs, nous avons identifié 19 variants *MUC1* issus de 15 familles. 18 patients présentaient une insertion d'une cytosine dans le VNTR. L'âge médian d'insuffisance rénale terminale est de 37,5 ans [35 ; 50,5]. On retrouve une protéinurie moyenne de 0,09 g/g (+/- 0,06), la présence de kystes dans 53% des cas, une histoire familiale dans 94% des cas. L'histologie est peu spécifique, nous n'avons pas identifié de signe extra-rénal.

Conclusion : Nous décrivons pour la première fois une technique simple pour détecter les variants *MUC1* via NGS. C'est la première cause d'ADTKD dans notre étude, avec une insuffisance rénale chronique précoce, peu spécifique, probablement sous diagnostiquée. Cette nouvelle technique pourrait faciliter le diagnostic des néphropathies *MUC1*.

Introduction

I. Que sont les ADTKD :

a. Historique :

Au fil des descriptions, ces maladies ont eu plusieurs noms avant d'aboutir à une définition actuelle plus standardisée.

Décrites initialement sous le terme ADMCKD pour Autosomal dominant medullary cystic kidney disease, elles désignaient l'ensemble des néphropathies de l'adulte caractérisées par la formation de kystes rénaux, majoritairement à la jonction cortico-médullaire avec un syndrome de perte de sel.

Elles sont décrites dès 1944 par Thorn(1), puis par Smith et Graham(2) comme « medullary cystic diseases » abrégées MCD ; puis en 1951 par Fanconi(3) comme « familial juvenile nephronophthosis » abrégée FJN, qui signifie en grec désintégration du néphron. Dans les descriptions qui suivirent, on utilise le terme de complexe MCD/FJN devant les similarités de ces deux maladies. Elles partagent le même tableau clinique et pathologique, mais suivent un mode de transmission différent : autosomique dominant pour les MCD, apparaissant plutôt à l'âge adulte et autosomique récessive pour les FJN avec un développement plus précoce, avant 15 ans.

Les MCD ont été décrites en trois tableaux clinico-biologiques distincts :

- MCKD (medullary cystic kidney disease) de type 2, entraînant une hyperuricémie précoce et des crises de gouttes, évoluant lentement vers une IRC terminale.

- Une anémie précoce dans l'enfance avec également une hyperuricémie, une hyperkaliémie modérée et une IRC d'évolution lente.
- MCKD1, caractérisée par un sédiment urinaire normal et une IRC sans autre symptôme distinctif.

Avec le développement des analyses génétiques, les mutations responsables sont mises en évidence progressivement : la mutation du gène *UMOD* responsable des MCKD2, la mutation du gène *REN* pour l'anémie précoce avec hyperkaliémie. Ces gènes sont exprimés dans les cellules tubulaires, leur mutation mène à une fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire progressive.

La mutation responsable de MCKD1 a été localisée sur le chromosome 1 dès 1998(4) ; mais le gène incriminé n'a été identifié que récemment, en 2013 par KIRBY(5), en position 1q21, dans le gène *MUC1* codant pour la mucine 1.

Avec la multiplication des dénominations, le caractère non indispensable de la présence de kystes et la découverte de nouvelles mutations comme celle du gène *HNF1β*, il devient difficile d'établir une classification diagnostique claire. En 2015, un groupe international publie un consensus KDIGO pour populariser le terme ADTKD (pour autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease), décrire les critères diagnostiques, les tests proposés et la stratégie de prise en charge(6).

b. Définitions :

À la suite de ce consensus KDIGO (Tableau 1), l'ensemble de ces syndromes sont regroupés sous le terme ADTKD.

Causal Gene	Proposed terminology	Previously used terminology
<i>UMOD</i>	ADTKD- <i>UMOD</i>	UKD (Uromodulin Kidney Disease) ^a UAKD (Uromodulin-Associated Kidney Disease) FJHN (Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy) MCKD2 (Medullary Cystic Kidney Disease type 2)
<i>MUC1</i>	ADTKD- <i>MUC1</i>	MKD (Mucin-1 Kidney Disease) ^a MCKD1 (Medullary Cystic Kidney Disease type 1)
<i>REN</i>	ADTKD- <i>REN</i>	FJHN2 (Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy type 2)
<i>HNF1B</i>	ADTKD- <i>HNF1B</i>	MODY5 (Maturity-Onset Diabetes mellitus of the Young type 5) RCAD (Renal Cyst and Diabetes Syndrome)
Not known; i.e., not otherwise specified (either not tested or genetic test without definitive result)	ADTKD—NOS	

Abbreviations: ADTKD, Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease; HNF1B, hepatocyte nuclear factor 1β; MUC1, mucin-1; NOS, not otherwise specified; REN, renin; UMOD, uromodulin.

^aThese terms may be easier to use in communicating with patients.

Tableau 1 : Correspondance entre l'ancienne terminologie et celle plus simple proposée par les KDIGO(6).

Ces maladies ont plusieurs caractéristiques communes :

- La pénétrance est proche de 100%, mais la sévérité et l'âge d'apparition des symptômes sont très variables d'un individu à l'autre et d'une famille à l'autre. Ainsi, l'âge d'évolution vers l'IRC terminale varie de 20 à 80 ans, avec la majorité entre 30 et 50 ans.
- Le sédiment urinaire est souvent normal, parfois on peut observer une hématurie microscopique. La protéinurie est absente ou modérée d'ordre tubulaire.
- A l'imagerie, les reins sont de tailles normales initialement, puis ils se réduisent avec l'évolution de la maladie rénale.
- Les kystes peuvent être présents, de taille et de nombre variables, mais leur fréquence est la même que pour les maladies rénales « non kystiques » et sont souvent retrouvés à un stade avancé de la maladie rénale plutôt qu'au stade précoce.

- Généralement on n'observe pas d'HTA avant la maladie rénale.
- L'histologie est non spécifique, avec une fibrose interstitielle et atrophie tubulaire. Absence d'atteinte glomérulaire (en dehors de possibles lésions de HSF secondaires). Aspect fréquent de membrane basale tubulaire fine et multi-lamellée. Des dilatations tubulaires et des microkystes tubulaires peuvent être observés. L'immunofluorescence ne retrouve pas de dépôt d'immunoglobulines, pas de dépôt de protéines du complément. La microscopie électronique est généralement non contributive, mais peut révéler l'accumulation de la protéine mutée dans le cytoplasme des cellules tubulaires(7).

Des critères ont été définis pour suspecter et établir le diagnostic :

- Le diagnostic est suspecté si :
 - Il existe une **histoire familiale compatible** avec une transmission autosomique dominante.
 - En l'absence d'antécédent familial : il faut une **clinique compatible**, une histologie compatible ou une manifestation extrarénale compatible pour *HNF1β* ou une hyper uricémie ou goutte précoce.
- Pour établir le diagnostic il faut :
 - **une histoire familiale** avec une transmission autosomique dominante, une **clinique compatible** et une **histologie chez au moins un membre de la famille.**
 - ou **la découverte d'une mutation du spectre des ADTKD chez au moins un membre** de la famille.

Le diagnostic est donc le plus souvent réalisé avec le test génétique, cependant un test négatif n'exclut pas complètement la pathologie puisque de nouvelles mutations sont fréquemment découvertes.

c. Épidémiologie

Les ADTKD sont des causes rares de maladie rénale chronique. Cependant, avec l'amélioration des techniques de séquençages, leur diagnostic est devenu plus simple et de ce fait, de plus en plus fréquent.

En effet, leur prévalence est probablement sous-estimée. Lors d'une récente étude de 2019(8), il a été réalisé un whole exome chez plus 3 000 patients présentant une IRC. Un variant pathogène a été retrouvé chez 307 patients (soit 9,3%). Pour les patients avec une néphropathie indéterminée, une mutation est retrouvée dans 48 cas sur 281 soit 17,1% des cas. La mutation *UMOD* a été retrouvée chez 3% des individus présentant une cause monogénique de maladie rénale chronique, se plaçant en 6ème position des causes génétiques d'IRC (Figure 1).

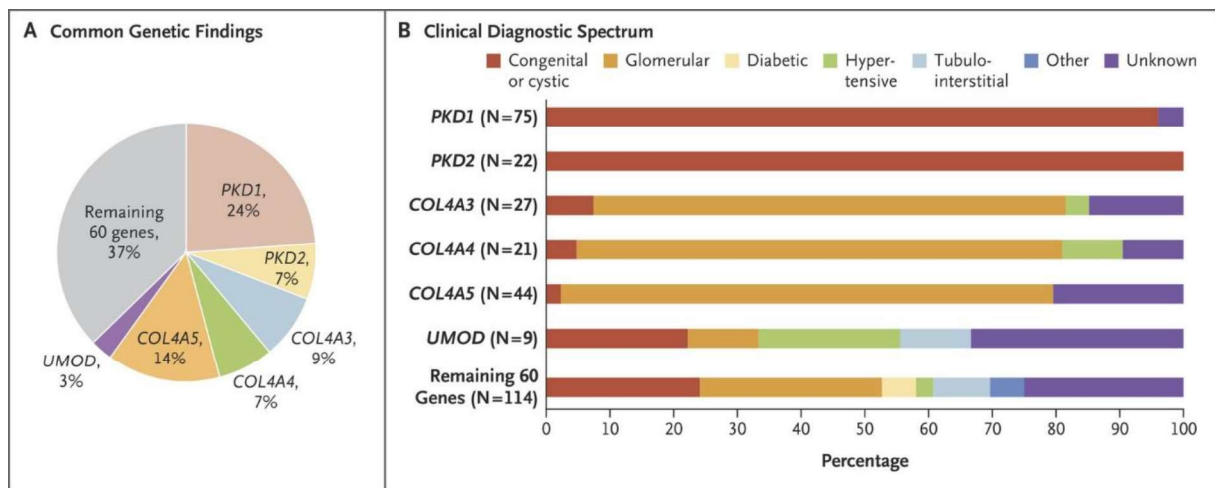


Figure 1 : La figure A illustre la proportion de chaque mutation retrouvée. Parmi les 66 mutations monogéniques retrouvées, 6 d'entre elles représentent 63% des diagnostics. La mutation *UMOD* est en 6^{ème} position, retrouvée dans 3% des cas. A noter que la mutation *MUC1* n'était pas recherchée dans cette étude. La figure B illustre le spectre des diagnostics cliniques attribués aux patients avant l'analyse génétique(8).

Parmi les ADTKD, *UMOD* semble être le variant le plus fréquent. Lors d'une étude monocentrique de 2018, La mutation *UMOD* représentait 1% des IRC stade 3 à 5, 2% des IRC terminales, 9% des maladies rénales héréditaires et 56% des ADTKD. Sa prévalence est estimée à 9 cas par million(9). *MUC1* est certainement la plus sous-estimée, du fait de la difficulté de son diagnostic génétique. Sa prévalence est estimée de 0,7 à 4 cas par million d'habitants(10,11).

d. Description des principales ADTKD (hors *MUC1*)

i. *UMOD*

1. Génétique et physiopathologie :

Le gène *UMOD* est situé sur le chromosome 16 en position p12. Il est composé de 11 exons, pour une taille de 20 kb et code l'uromoduline. Découverte en 1950 par Igor TAMM et Frank HORSFALL(12) dans les urines d'individus sains, elle est nommée protéine de Tamm-Horsfall. Elle est la protéine la plus abondante physiologiquement dans les urines (50 à 150 mg/j). En 1985 Muchmore et Decker(13) isolent dans les urines d'une femme enceinte une protéine de 85 kDa. En l'étudiant, elle montre une capacité in vitro d'immunomodulation et inhibe l'activité des monocytes et des lymphocytes T. Elle est alors nommée uromoduline.

En 1987, Pennica et al.(14) démontre que ce sont toutes deux la même molécule.

L'expression du gène est uniquement rénale, essentiellement dans la branche ascendante large de Henlé. Ses rôles sont nombreux :

- Homéostasie de l'eau et du sel : aide à l'imperméabilité à l'eau de la branche ascendante, facilite la mise à la membrane des transporteurs NaK2CL et ROMK ;
- Lutte contre les agents infectieux, notamment contre l'*E. coli* ;
- Protection contre la formation lithiasique ;
- Elle a un rôle bien connu en pathologie, notamment dans la « cast-nephropathy » et dans certaines maladies lithiasiques.

La mutation *UMOD* entraîne une anomalie conformationnelle, qui gêne le trafic de la protéine mutée et sa libération dans la lumière tubulaire. Elle s'accumule dans le réticulum endoplasmique (RE) (Figure 2). La mutation semble entraîner un gain de fonction, puisque les souris *UMOD*-KO ne développent pas les lésions histologiques. La protéine mutée accumulée a un effet toxique pour la cellule, entraînant son

apoptose. La finalité est une fibrose interstitielle avec atrophie tubulaire, responsable d'une insuffisance rénale chronique.

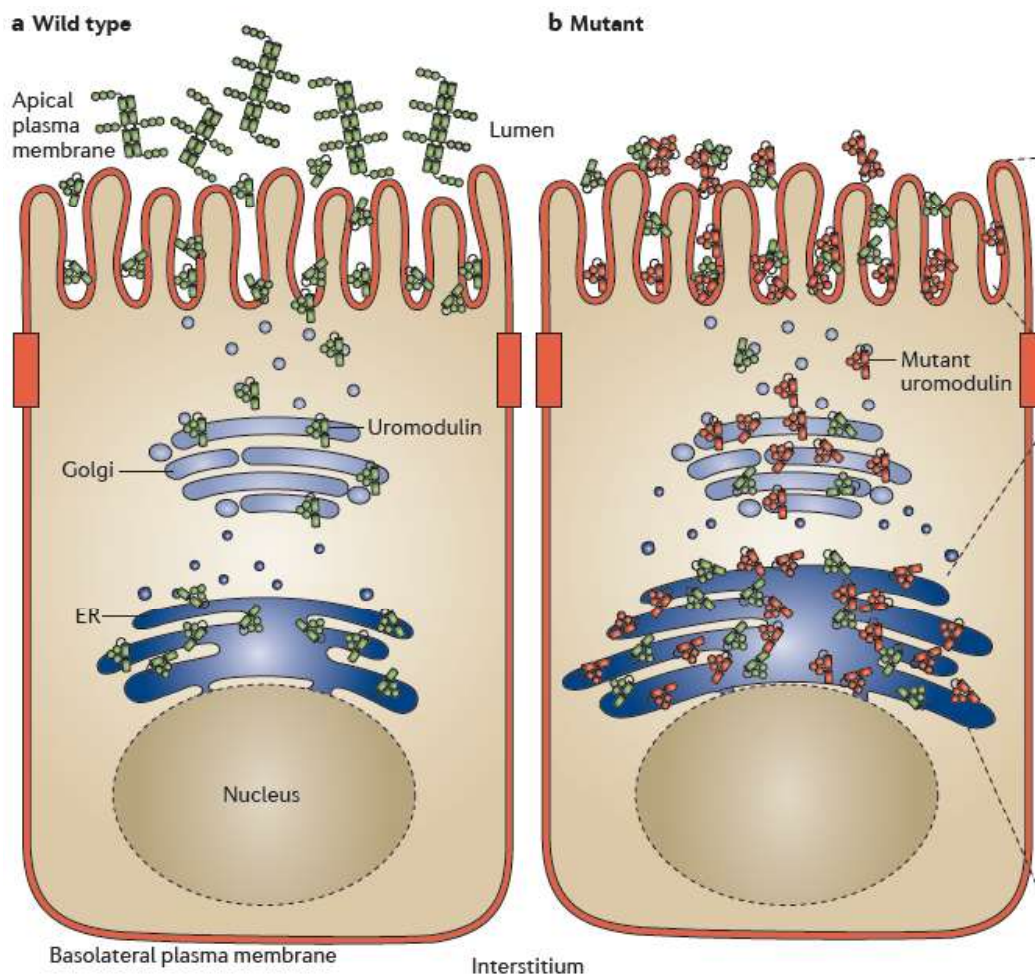


Figure 2 : En situation physiologique à gauche de l'image, l'uromoduline est synthétisée dans la cellule tubulaire de la branche fine ascendante de l'anse de Henlé. Elle passe dans la voie de sécrétion via le réticulum endoplasmique, pour être dirigée vers la membrane apicale et être sécrétée dans la lumière. A droite, la protéine mutée s'accumule dans la voie de sécrétion(15).

On observe avec ce gène plusieurs types de mutations :

- Des mutations très rares, de transmission autosomique dominante, sont responsables d'une ADTKD. Plus d'une centaine de mutations sont identifiées(15), la grande majorité sont des « missense », dans la partie N-terminale de la protéine (95% sont localisés dans les exons 3 et 4) (Figure 3). Dans 60% des cas, la mutation remplace ou supprime une cystéine, impliquée dans la formation de ponts disulfures. Cela mène à une anomalie conformationnelle et déstabilise la structure de la protéine.
- Après études de GWAS (Genome Wide Association Study) sur des larges populations et sur des larges cohortes de malades, le polymorphisme du gène *UMOD* a été associé à la fonction rénale. Plusieurs SNP (single nucleotid polymorphism) ont été identifiés comme facteur de risque d'IRC, alors que d'autres sont associés à un effet protecteur.

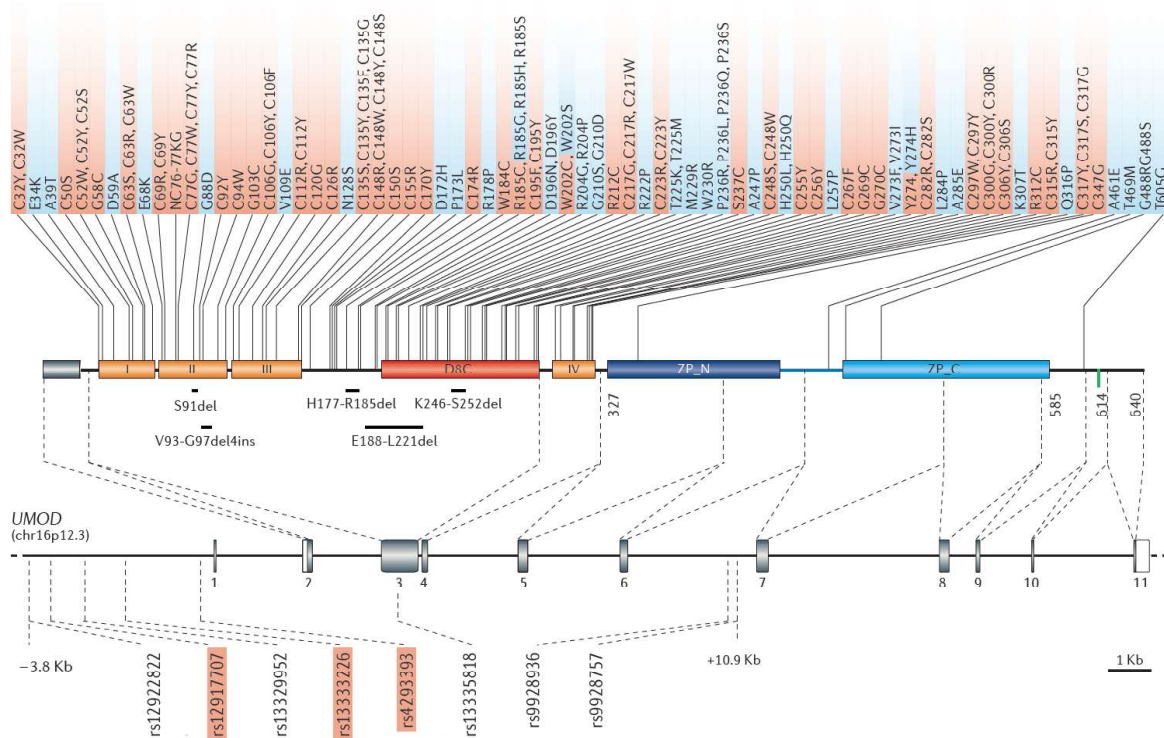


Figure 3 : sur le haut de l'image sont représentées les localisations et effets sur la séquence de la protéine de toutes les mutations UMOD rapportées. Sur le milieu de l'image, le gène UMOD avec les exons grisés. La grande majorité des mutations portent sur les exons 3 et 4. En bas, on peut observer la position des principaux SNP (surlignés en rouge) décrits dans les études de GWAS(15).

Plus récemment, en 2022 a été identifié un variant « missense » plus rare p.Thr62Pro, d'effet intermédiaire par rapport aux mutations précédemment décrites. Avec une fréquence à 1/1000 chez des individus aux ancêtres européens, celui-ci est de pénétrance incomplète et est associé au développement d'une IRC avec un odds ratio plus élevé que les SNP de 4,12 [1,32 – 12,85](16).

Le pronostic rénal semble être associé à la position de la mutation sur le gène : il est plus sévère si la mutation se situe sur le domaine cbEGF-2 ou cbEGF-3, en comparaison de mutations plus en aval sur le gène(17).

2. Clinique :

Hyperuricémie et goutte :

L'uromoduline facilite la mise à la membrane du co-transporteur NaK2Cl. La mutation entraîne une baisse de l'uromoduline fonctionnelle, donc une diminution de l'expression de ce co-transporteur à la membrane apicale. Ceci entraîne une augmentation de la natriurèse, responsable d'une déplétion volémique, qui entraîne une réponse du tubule proximal. L'augmentation de réabsorption proximale du sodium s'accompagne d'une réabsorption d'urate. Ainsi on observe une hyperuricémie avec une fraction excrétée de l'acide urique basse, inférieure à 6%.

Le tableau clinique est donc marqué par une hyperuricémie précoce et fréquente, observée dès l'enfance. Les crises de goutte concernent 50% à 79 % des patients (contre une prévalence de 4% dans la population générale), 8% des malades ont un premier épisode dans l'enfance(18–20). L'âge médian de la première crise de goutte est de 27 ans.

Insuffisance rénale chronique :

Comme décrite précédemment pour les autres ADTKD, on retrouve une IRC peu spécifique, avec une protéinurie absente ou peu abondante, une absence d'hématurie et de leucocyturie.

Dans l'étude de 2020 sur 303 patients(20), 90% ont présenté une IRC pendant leur suivi, avec une évolution vers l'IRC terminale dans 44% des cas, à un âge médian de 46 ans. Sur une cohorte franco-belge, la médiane de survie rénale est de 54 ans(19).

3. Histologie :

L'histologie est également peu spécifique(21,22) :

- Fibrose interstitielle diffuse, avec infiltrat inflammatoire très faible et atrophie tubulaire (Figure 4) ;
- Dilatation tubulaire pouvant rarement donner des kystes tubulaires ;
- Les cristaux d'acide urique sont très rares car l'hyperuricémie est liée à une diminution de l'excrétion urinaire plutôt qu'une production excessive.

Les dépôts peuvent être visibles en microscopie optique sous forme d'inclusions éosinophiles dans les cellules tubulaires, mais sont difficiles à mettre en évidence. Une étude en immunohistochimie via un anticorps anti-UMOD permet de mettre en évidence des dépôts cytoplasmiques, mais n'est pas facilement disponible ni réalisable en pratique.

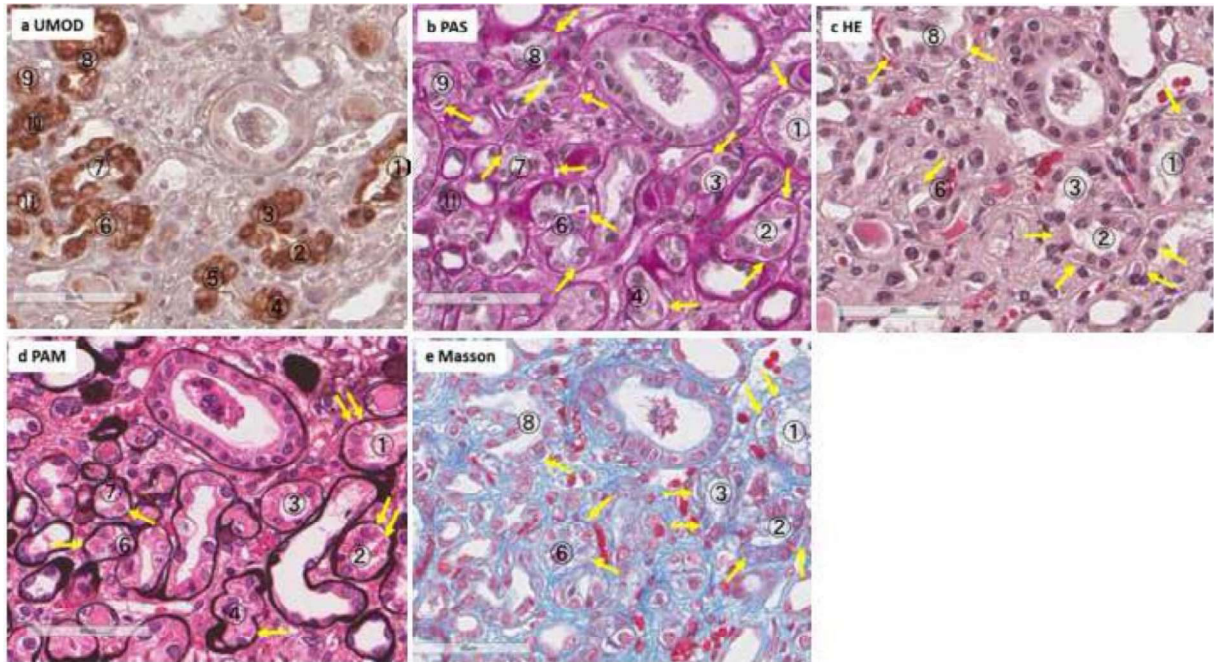


Figure 4 : Biopsies d'un patient muté pour UMOD. a : marquage en immunohistochimie via un anticorps anti-UMOD. b : coloration du PAS (Periodic Acid Schiff), c : coloration HE (Hématéine-Eosine), d : imprégnation argentique de Jones, e : trichrome de Masson. Les chiffres indiquent les tubules avec dépôts de protéines UMOD marqués par les flèches. Ces dépôts sont colorés par le PAS, bleus au trichrome, rouges en HES et Jones. La coloration PAS semble la plus sensible, avec des dépôts visibles sur 33% des biopsies(21).

4. Prise en charge :

Elle est également non spécifique : application des règles de néphroprotection, traitement symptomatique de la goutte et traitement de l'hyperuricémie. La transplantation rénale est particulièrement intéressante chez ces patients en cas d'IRT car elle survient souvent à un âge jeune et la maladie ne récidive pas sur le greffon(23).

ii. *REN*

1. Génétique, physiopathologie et histologie :

Située sur le chromosome 1 dans le gène codant la rénine, la mutation responsable peut être située dans le promoteur, le segment codant le prosegment ou le segment codant le peptide mature(24). Le gène est exprimé uniquement au niveau rénal dans l'appareil juxta-glomérulaire.

La rénine est produite sous forme de prépro-rénine composée d'une partie N-terminale qui a un rôle de signal peptide et qui permet au précurseur d'être envoyé dans le réticulum endoplasmique ; le pro segment qui lui assure une bonne conformation et la rénine mature de 340 acides aminés.

La rénine a de nombreux rôles dans l'organisme :

- Elle est nécessaire à la tubulogénèse et la formation rénale embryonnaire ;
- C'est le point de départ du système rénine angiotensine, impliqué dans la régulation de la pression artérielle, de l'homéostasie hydrosodée et du contrôle potassique ;
- Elle a un rôle dans l'érythropoïèse et le contrôle de la soif ;
- Elle joue un rôle dans la progression de la maladie rénale chronique et l'hypertrophie myocardique.

La physiopathologie est proche de la mutation *UMOD* (Figure 5). Par son caractère autosomique dominant, chaque patient a un allèle muté et un allèle sauvage. Les cellules produisent donc moins de rénine et produisent la protéine anormale, qui s'accumule en intracellulaire, entraînant l'apoptose puis progressivement la fibrose interstitielle et atrophie tubulaire.

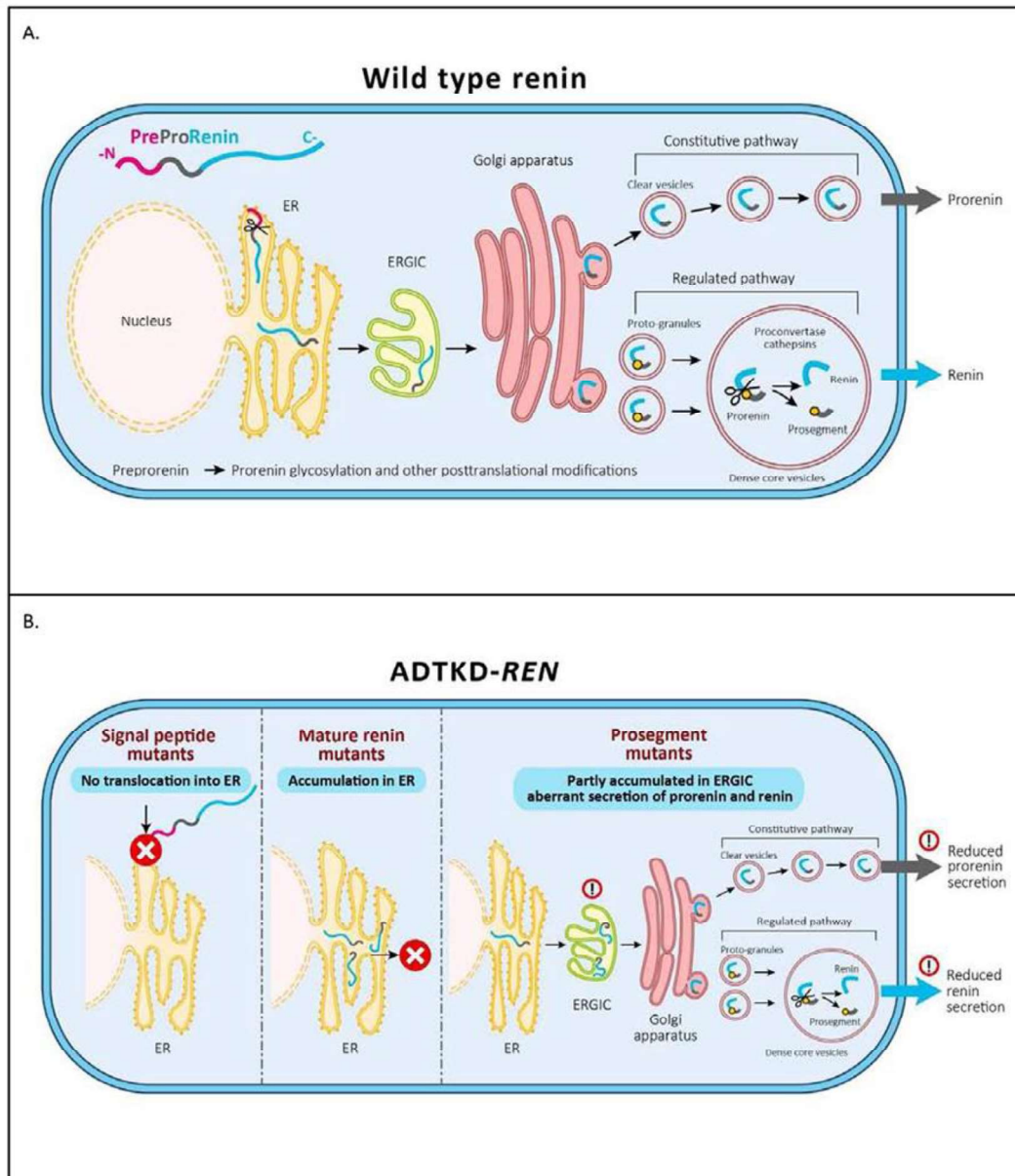


Figure 5 : Physiopathologie de la mutation REN. En A, la préprorénine sauvage est transloquée dans le RE. Le peptide signal est clivé, puis la prorénine est glycosylée et envoyée dans l'ERGIC qui s'assure de la bonne conformation protéique et détecte les protéines de forme aberrante. Dans le Golgi, une partie de la prorénine sera sécrétée et une partie sera transformée en rénine pour être stockée. En B, la mutation du signal peptide empêche l'adressage au RE, la mutation peut être également dans la protéine mature ou dans le prosegment modifiant sa conformation, induisant une accumulation dans l'appareil sécrétoire et un stress cellulaire (25).

L'histologie est peu spécifique(24). Sur une étude de 3 familles, il est décrit :

- Une atrophie tubulaire et des lésions de dystrophie focales, plutôt dans les tubes proximaux avec vacuolisations cytoplasmiques, associées à une fibrose interstitielle.
- Une glomérulosclérose pour les IRC avancées, avec des lésions de HSF.

2. Clinique :

Elle résulte de la baisse de production de rénine et du déclin de la fonction rénale(25,26). La sévérité semble être associée à la localisation de la mutation avec des tableaux plus précoces et plus sévères pour une mutation du peptide signal. Sur la cohorte de 2020 de 111 individus, 62% ont une mutation du signal peptide, 24% du prosegment et 14% de la rénine mature.

Le phénotype est variable :

- Tendance à la tension artérielle basse, par défaut du système rénine-angiotensine ; avec tendance à l'hyperkaliémie et à l'acidose ;
- Episode d'insuffisance rénale aiguë fonctionnelle, notamment observé dans l'enfance en cas de fièvre, de diarrhées, de prise d'AINS ;
- Anémie arégénérative, qui précède l'IRC ;
- Rare polyurie ;
- Hyperuricémie et risque de goutte, secondaire à l'hyporéninisme avec perte de sel distal, compensé par une réabsorption proximale plus importante, entraînant une réabsorption passive de l'acide urique.

L'âge d'évolution vers l'IRC varie selon la mutation. L'âge moyen d'évolution vers l'IRC est de 57 ans dans le groupe peptide signal, 62 ans dans le prosegment et 68 ans dans le groupe rénine.

La mutation dans le peptide signal entraine une clinique plus riche, des signes plus précoces (19,7 ans en moyenne contre 22,4 ans dans le groupe présegment et 37 ans dans le groupe rénine). Au contraire la mutation dans la zone codant la rénine n'entraine souvent qu'une IRC avec crises de goutte.

3. Prise en charge :

Il n'y a pas de traitement spécifique, la prise en charge de l'IRC repose sur les mesures de néphroprotection habituelles.

La prise en charge de l'anémie n'est pas spécifique : elle est souvent modérée, avec une hémoglobine entre 10 et 12 g/dL. Un traitement par érythropoïétine peut être nécessaire. En cas de signes d'hyporéninisme, on peut proposer un régime riche en sel et une substitution par FLUDROCORTISONE.

iii. *HNF1 β*

L'Hepatocyte Nuclear factor 1 β est un facteur de transcription impliqué dans le développement embryonnaire du rein, du pancréas, du foie et du tractus uro-génital. Ce gène régule *PKHD1* (responsable de polykystoses rénales autosomiques récessives), *PKD2*, *GLIS2* (mutation responsable de néphronoptise) et joue un rôle dans l'intégrité des structures tubulaires et les échanges de solutés tubulaires(27).

Au point de vue génétique, 50% des mutations sont de novo, avec une pénétrance incomplète, ce qui en fait un diagnostic difficile. La mutation la plus fréquente, dans la moitié des cas, est la délétion complète du gène dans un contexte de microdélétion 17q12.

La mutation hétérozygote dans le gène *HNF1β* peut entraîner différentes atteintes(18,28,29) :

- Une atrophie pancréatique avec diabète de type MODY ;
- Une perturbation des bilans biologiques hépatiques avec notamment une cytolyse ;
- Des anomalies congénitales des reins et des voies urinaires, notamment une polykystose. Sur les échographies prénatales, on peut retrouver des reins hyperéchogènes bilatéraux, mais également des polykystoses uni ou bilatérales, une agénésie rénale, une hypoplasie rénale, des malformations vésicales(30) ;
- Une insuffisance rénale chronique ;
- Une hyperuricémie et des crises de goutte ;
- Une hyperparathyroïdie primaire(31) ;
- Une perte de régulation de *FXDY2*, qui code pour la sous unité gamma de la NaKATPase impliquée dans la régulation des transports ioniques tubulaires, se manifestant par une hypomagnésémie.

La clinique est donc souvent plus riche pour cette mutation. La présentation sous forme d'une IRC isolée est plus rare.

Le traitement est toujours non spécifique : supplémentation en magnésium, le traitement du diabète nécessite souvent une supplémentation insulinique, traitement de l'hyperuricémie en cas de goutte, traitement de l'IRC.

iv. Autres ADTKD plus rares :

Mutation *SEC61A1* (3q21.3) : décrite dans très peu de familles. Deux familles ont été décrites en 2016 par Bolar et al(32) : la première présentait une insuffisance rénale

lentement progressive, une anémie, une hyperuricémie et de nombreux signes extra rénaux. L'échographie retrouvait des petits reins kystiques. L'histologie retrouve également une fibrose interstitielle et atrophie tubulaire. La deuxième famille mutée présentait une IRC, une anémie et neutropénie, des crises de gouttes précoces.

Mutation *DNAJB11* : une trentaine de familles rapportées. Tableau clinique associant des petits kystes rénaux bilatéraux, kystes hépatiques, une IRC tardive après 60 ans(33).

II. *MUC1* : rôle, génétique et clinique

a. Les mucines et leurs fonctions

Les épithéliums sont des tissus constitués de cellules étroitement jointives, polarisés avec une extrémité apicale et basale. La plupart d'entre eux sont exposés à l'environnement extérieur et nécessitent des moyens de protection pour maintenir leur intégrité.

Les mucines sont situées au pôle apical des cellules épithéliales. Glycoprotéines de haut poids moléculaire, les mucines sont les composantes principales du mucus et sont impliquées dans la protection et lubrification des surfaces luminales des épithéliums (notamment des épithéliums respiratoire, gastrointestinal et du tractus génital). Elles donnent au mucus son caractère visco-élastique.

Elles sont caractérisées en 2 types selon leur localisation (Figure 6) :

- « secretory mucin » : les mucines sécrétées n'ont pas de domaine transmembranaire et sont sécrétées dans l'espace extracellulaire (comme MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 et MUC19)

- « membrane bound mucin » : ce sont des protéines membranaires, avec un domaine transmembranaire et une partie cytoplasmique en C terminal (comme MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC16, MUC17, MUC18, MUC21). Elles peuvent aussi être libérées dans certaines conditions par clivage protéolytique. Elles ont un rôle supplémentaire de « sensor » à travers leur domaine extracellulaire et sont aussi impliquées dans la transduction du signal avec une partie extramembranaire qui lie un ligand ou par liaison avec un récepteur de facteur de croissance ou de différenciation.

Leur domaine extracellulaire a une organisation commune : il est composé d'un axe protéique central polymorphique codé par un VNTR (variable number tandem repeat) et richement O-glycosylé(34). Le VNTR est un emplacement du génome où une courte séquence nucléotidique est répétée successivement, avec un nombre de copie différent d'un individu à l'autre.

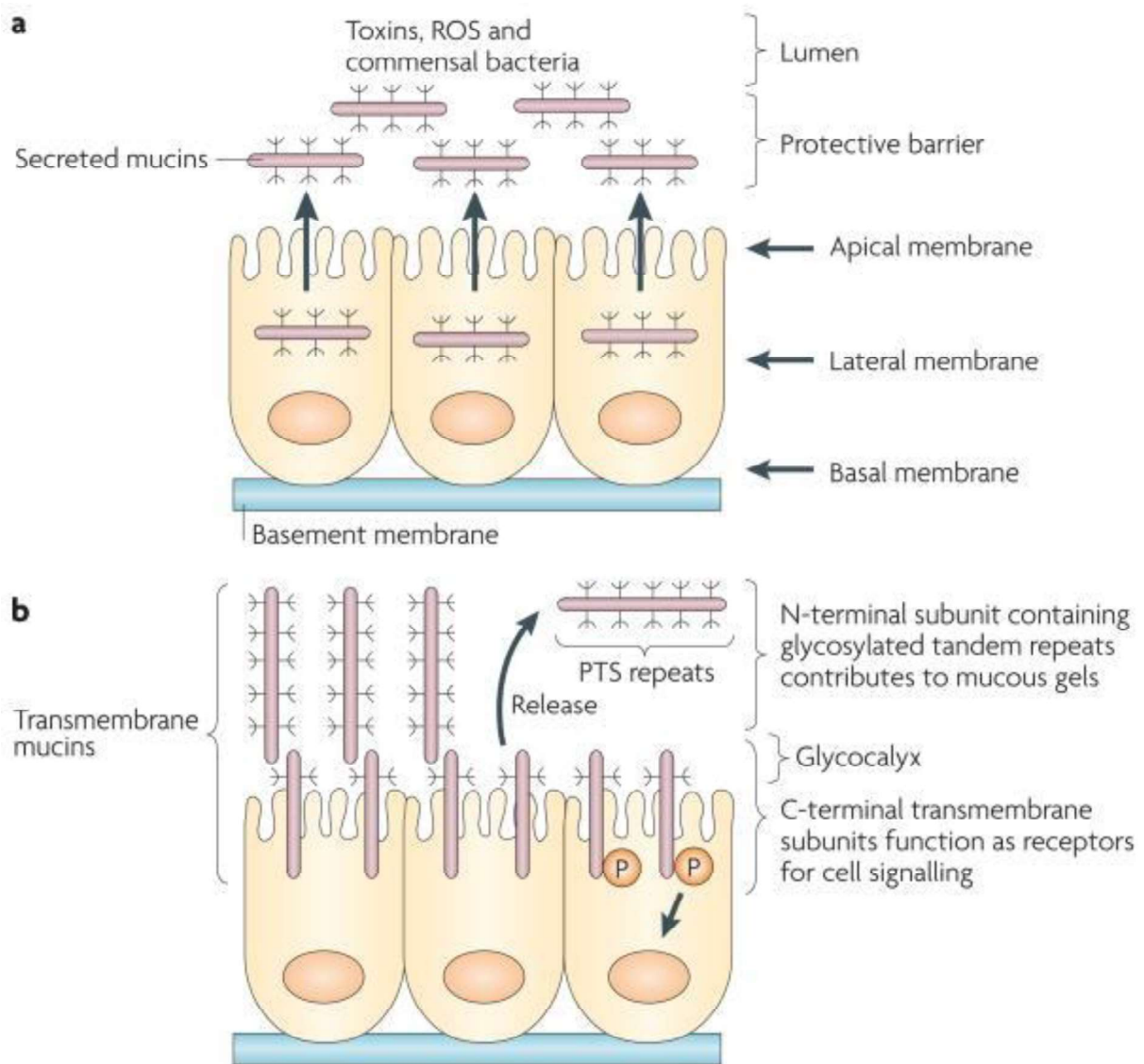


Figure 6 : issue de l'article de Kufe(35) illustrant les mucines sécrétées en a et les mucines transmembranaires en b.

Une trentaine de mucines sont décrites, numérotées par ordre de découverte. MUC1 est la mieux caractérisée d'entre elles, la première découverte en 1987(36). En oncologie, via le domaine intracellulaire, elles jouent un rôle important pour le développement tumoral. Le gène *MUC1* est fréquemment surexprimé dans de nombreux adénocarcinomes, notamment pulmonaire, hépatique, colique, mammaire, pancréatique et ovarien. MUC1 a un rôle oncogène qui régule de nombreuses

caractéristiques cancéreuses en interagissant avec différentes voies de signalisation (croissance, prolifération, apoptose...). Elle est donc une cible de choix en oncologie, à visée thérapeutique et pronostique, mais aussi immunogène pour le développement de vaccin à visée anticancéreuse.

b. MUC1 : structure, génome et fonctions

i. Gène, synthèse et structure :

Le gène codant *MUC1* est situé sur le chromosome 1 en position 1q21. La mucine 1 est initialement traduite en un monomère, puis est clivée par autoprotéolyse dans le réticulum endoplasmique. Les deux sous unités sont liées par une liaison non covalente(37).

Elle est composée (figure 7) :

- d'un important segment extracellulaire en N terminal. Il est constitué :
 - o d'un axe peptidique avec une alternance de domaines richement O-glycosylés (sur les résidus serine, thréonine et proline) intercalés entre de courtes régions moins glycosylées. **Cette structure est codée par un VNTR (variable number tandem repeat) : il s'agit d'un motif de 60 bases codant pour 20 acides aminés ; répété successivement 20 à 120 fois dans le génome (le nombre de domaines est variable pour chaque individu).**
 - o d'un domaine SEA (sperm enterokinase-agarin), qui contient la zone de clivage potentiel de la mucine.
- d'une partie C terminale avec :
 - o un domaine transmembranaire de 28 AA.

- une queue cytoplasmique en C terminal, de 72 AA qui est un site de phosphorylation, impliquée dans la transduction du signal, pouvant interagir avec de nombreuses tyrosines kinases (avec les récepteurs ErbB comme les protein kinase C delta (PKC δ), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) et epidermal growth factor receptor (EGFR)).

En situation oncologique, *MUC1* est surexprimé et la chaîne riche en carbohydrates devient incomplète, formant de nouvelles chaînes carbohydrates appelées Thomsen-Friedenreich (TF or T), Tn, et sialyl-Tn (STn) et révélant le corps peptidique.

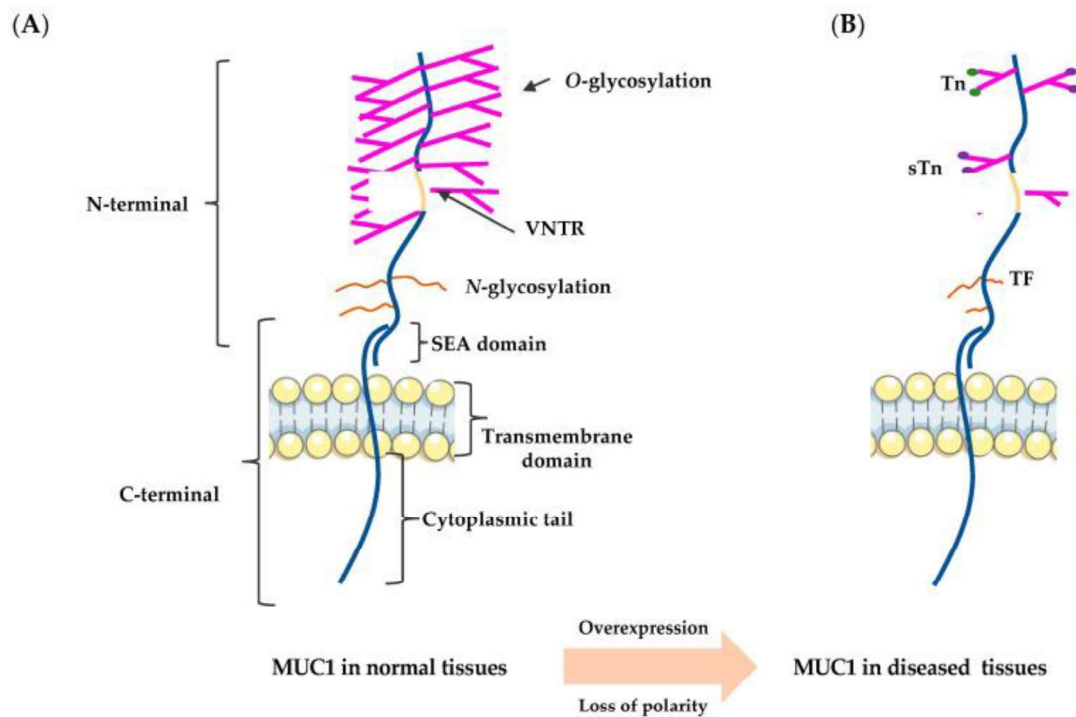


Figure 7(38) illustrant la structure de *MUC1* dans les tissus sains en (A) et dans les tissus tumoraux en (B).

ii. Fonctions :

1. Dans les tissus sains

En recouvrant la surface apicale des épithéliums, la mucine assure une protection vis à vis des agents infectieux, elle module la réponse immune, agit comme un leurre pour les pathogènes qui s'y fixent et protège la membrane des enzymes de dégradations en cas d'infection.

Dans le tube digestif : MUC1 limite l'infection par *Campylobacter jejuni* chez la souris(39) ; elle se fixe à l'*Escherichia coli* et favorise l'arrivée des cellules inflammatoires sur le site d'infection(40). Beaucoup d'études se sont également intéressées à l'infection à *Helicobacter pylori*. Les individus avec des VNTR courts seraient plus à risque d'infection(41). La bactérie se fixe sur le domaine extra membranaire qui est ensuite libérée dans la lumière gastrique(42).

Dans les voies respiratoires : MUC1 est un site de fixation du *Pseudomonas aeruginosa*(43), du *Streptococcus pneumoniae* dont elle favorise la phagocytose(44) et elle diminue la sévérité des infection au virus de la grippe A(45). Son rôle immunomodulateur et anti-inflammatoire a récemment été décrit dans de nombreuses infections pulmonaires(46).

MUC1 participe au bon fonctionnement de l'épithélium, elle agit sur le maintien de la polarité cellulaire, régule les propriétés d'adhérences entre les cellules et avec la matrice extracellulaire, permet la bonne hydratation de la face apicale.

MUC1 est également retrouvée à la surface des cellules du système immunitaire. Elle a un rôle d'immunomodulation des LT, diminue l'activation des TLR (toll like récepteur) des cellules de l'immunité innée(47).

2. Dans le tissu rénal :

En situation physiologique, MUC1 est exprimée à la surface des cellules du tube contourné distal et du canal collecteur(34).

Tout d'abord, *MUC1* jouerait un rôle néphroprotecteur en situation d'ischémie (47,48) :

- sur un modèle murin d'insuffisance rénale aigue par ischémie-reperfusion (par clampage du pédicule rénale gauche 25 min), il est retrouvé une augmentation de l'expression de la mucine dans le parenchyme rénal en comparaison des souris témoins sans agression rénale. Elle était observée à la surface des cellules tubulaires distales, mais également apparue sur les cellules tubulaires en souffrance. En histologie : les souris *MUC1* $-/-$ présentaient à J2 une NTA plus sévère que les souris *MUC1* $+/+$. Le marqueur de souffrance rénale KIM-1 était également plus exprimé chez les souris KO à J4.
- sur des patients transplantés rénaux, les biopsies précoces à une semaine de greffe et présentant une nécrose tubulaire aigue ont été comparée à une seconde biopsie protocolaire à 3 mois de la transplantation. Sur 48 patients, la biopsie initiale mettait en évidence, comme chez la souris, une induction de MUC1 sur les cellules des tubes en souffrance, avec une expression corrélée à la sévérité de la NTA.

En situation d'ischémie, MUC1 s'exprime également sur quelques cellules du tube contourné proximal et notamment dans les cellules « dédifférenciées », en transition épithélio-mésenchymateuse, à l'origine de la récupération de la nécrose tubulaire aiguë.

Cependant à un temps plus tardif, *MUC1* semble avoir un effet profibrosant. Au 14^{ème} jour de l'ischémie sur le modèle murin, l'expression de deux gènes profibrosant

(fibronectine et collagène I) est augmentée comparativement aux souris *MUC1* KO et la fibrose rénale est plus importante sur l'histologie à J28. Même constatation sur l'analyse des biopsies de greffon à 3 mois, les patients qui avaient récupéré sans développement de fibrose avaient une expression normale de MUC1, alors que MUC1 continuait d'être exprimée sur les tubes atrophiés des patients avec une fibrose plus importante.

***MUC1* jouerait un rôle néphroprotecteur également en situation de sepsis(47,49).**

En reproduisant un sepsis chez les souris par injection de LPS(Lipopolysaccharides), il est retrouvé une urée significativement plus élevée à 24h de l'injection chez les souris *MUC1* -/- en comparaison des souris *MUC1* +/+ et des lésions histologiques plus sévères.

Cet effet protecteur de *MUC1* dans l'IRA en contexte septique serait lié à un rôle immunomodulateur avec notamment des marqueurs pro-inflammatoires et cytokiniques moins élevés chez les souris *MUC1* +/+ et à un recrutement de macrophages au profil pro inflammatoire plus important chez les souris KO.

***MUC1* aurait un rôle pro-fibrosant dans la néphropathie diabétique** via la voie des β -catenin (50). Sur des cellules d'épithélium mésangial in vitro, l'exposition à une hyperglycémie entraîne une expression de MUC1 par les cellules mésangiales et active un signal de prolifération et pro-fibrosant. A l'inverse sur les cellules KO pour le gène, après exposition à une hyperglycémie, on observe une prolifération mésangiale moins importante et une expression plus faible des marqueurs de fibrose (fibronectine, collagènes I et IV).

MUC1 serait un acteur de l'homéostasie du calcium et interviendrait dans la régulation des transporteurs calciques TRPV5 et TRPV6 avec un effet protecteur contre la

formation de lithiase en augmentant la réabsorption calcique dans le tubule contourné distal (51,52). Ces hypothèses sont remises récemment en cause dans une étude de 2023 dans laquelle des souris *MUC1* *-/-* ont une calcémie plus basse que les souris sauvages sans différence significative de calciurie.

3. En oncologie :

En oncologie, MUC1 peut être présente de façon aberrante et surexprimée (carcinome pulmonaire, hépatique, colique, mammaire, pancréatique et ovarien) : elle entraîne une inhibition de l'apoptose et une prolifération cellulaire (38). Elle peut être pro inflammatoire via des interactions avec les cellules dendritiques et les macrophages ayant pour conséquence un recrutement de cellules inflammatoires, une modification du microenvironnement tumoral. Elle facilite également la migration de métastases(53).

Elle a un rôle d'échappement aux thérapeutiques avec une baisse d'efficacité des chimiothérapies (par exemple la surexpression de MUC1 entraîne une résistance au 5-Fluorouracil (5-FU) dans les tumeurs du pancréas) (54).

MUC1 a de nombreuses applications cliniques en oncologie(55) :

- c'est un marqueur pronostique de nombreuses tumeurs (gastrique, colorectale, pancréatique, mammaire). Par exemple, le CA15-3 (Cancer Antigen 15-3) est un dosage de MUC1 sérique, détecté par un anticorps spécifique d'une séquence de 8 acides aminés codés par le VNTR(56).
- c'est une cible en cours d'étude pour le développement d'immunothérapies :
 - o son segment extra membranaire peut être ciblé par des anticorps spécifiques ;

- développement de vaccins ciblant MUC1, administré en complément de la chimiothérapie;
- des études sont en cours pour des essais de CART-cell ciblés contre les MUC1 tumorales(57).

iii. Mutation *MUC1* : historique et génétique

La première association entre la mutation du chromosome 1 et la néphropathie interstitielle chronique a été réalisée en 1998 par Christodoulou et al (4), à partir de deux familles chypriotes. Cependant, la mutation responsable n'a été découverte que beaucoup plus tardivement, en 2013, par l'équipe du Dr KIRBY du Broad Institute(5).

Comme vu précédemment, le gène de *MUC1* comporte un VNTR (Variable Number Tandem Repeat) : il s'agit d'une séquence large de 60 bases riches en GC (>80%) répétées entre 20 et 120 copies, dans la partie codante du gène. Dans cette étude(5), ils ont étudié deux individus avec un tableau d'ADTKD, sans mutation retrouvée. Le whole exome et le whole genome sont revenus tous les deux négatifs. Ils ont supposé que la mutation était soit dans une zone récalcitrante au séquençage, soit liée à un nouveau type de mutation. Ils ont émis l'hypothèse que la mutation pouvait se trouver dans un VNTR, zone reconnue depuis peu au moment de l'étude comme pouvant être source de pathologie et particulièrement difficile à analyser. Ils ont alors analysé 5 gènes possédant un VNTR (*KCNN3*, *EFNA3*, *ASH1L*, *MEF2D* et *MUC1*) pour finalement se concentrer sur *MUC1*.

Tout d'abord, la pathologie n'était pas en lien avec le nombre de copies composant la zone VNTR. L'équipe a conclu qu'il s'agissait d'une mutation dans le motif composant le VNTR, puisque ces zones sont exclues des whole exome et des panels. De plus elles sont sous représentées dans les résultats finaux après le filtre qualité bio-

informatique en whole genome (par exemple, le whole genome hg 19, issu du genome reference consortium human build 37 (GRCh37), rend une région VNTR beaucoup plus courte que celle mesurée par l'équipe de KIRBY). Ils ont alors séquencé en Sanger puis reconstruit manuellement la séquence VNTR des patients. C'est ainsi qu'ils ont découvert l'insertion d'une cytosine dans un motif du VNTR. Cette méthode expérimentale était initialement difficile et longue à réaliser, ils ont développé une méthode pour reconnaître le motif de référence et le motif muté plus rapidement.

La mutation la plus fréquente est l'insertion d'une cytosine, entraînant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré. Cela entraîne la production d'une protéine aberrante et tronquée appelée MUC1fs (frameshift). D'autres mutations plus rares ont été découvertes depuis. L'insertion de la cytosine en position 27 est la plus fréquente (figure 8), représentant 93,5% des mutations sur une étude de 104 individus (20). Viennent ensuite les mutations 28dupA, 26_7insG, 23delinsAT, (1_16dup) et (51dupC) (58,59). Toutes ces mutations (insertion, duplication ou délétion) entraînent un décalage du cadre de lecture lors de la traduction de l'ARNm, aboutissant à un codon stop prématuré avant le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique.

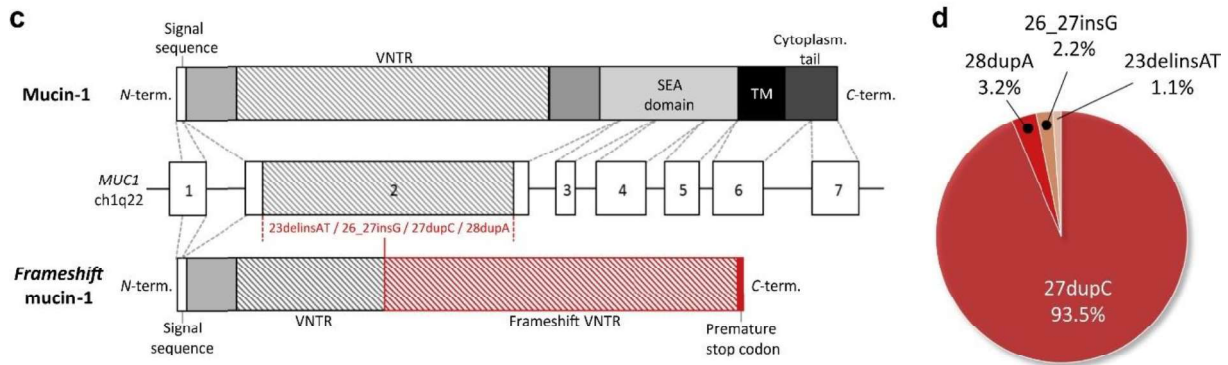


Figure 8 issu de l'article de Olinger et al(20) : l'image de gauche illustre la protéine sauvage avec le domaine extra-membranaire contenant le VNTR, le domaine transmembranaire (TM) et le domaine cytoplasmique. En dessous, les 7 régions codantes. L'ensemble des mutations responsable de l'ADTKD sont retrouvées dans le VNTR et aboutissent toutes à une protéine tronquée, illustrée en bas de l'image. A droite, on retrouve les variants du gène identifiés. 93,5% des mutations sont l'insertion d'une cytosine en position 27.

Trois problèmes rendent l'analyse de ce gène difficile :

- **la région est difficile à séquencer** car le motif répété est riche en GC et répété 20 à 120 fois dans le gène. La technologie utilisée au CHU de Lille de séquençage par synthèse de fragment d'environ 150 paires de bases fait que l'on séquence aléatoirement autant les motifs VNTR Wild type que la potentielle mutation. On n'est pas assuré de séquencer chaque répétition du VNTR (l'amorce se fie sur une zone précise, choisie, mais répétée ici de nombreuses fois dans le VNTR).
- **l'étape d'alignement des fragments séquencés est rendue difficile** par la répétition de la séquence de référence.
- **enfin la mutation ne se situe que dans un seul des motifs.** Donc même si elle est présente et détectée, elle serait comptée comme un artéfact car ultra

minoritaire (ex : si un patient à 50 copies du VNTR, dont 1 motif muté sur un chromosome, il aura donc 1 VNTR muté et 99 Wild type).

Devant ces difficultés d'accès, d'autres approches ont été proposées pour aboutir au diagnostic de *MUC1* mais ne sont pas utilisées en pratique clinique :

- l'immunohistochimie sur biopsie rénale et sur prélèvement urinaire via un anticorps ciblant la protéine MUC1fs(59). Leur méthode est testée sur 11 PBR de patients malades contre témoins (patients *UMOD* ou non mutés), avec une sensibilité de 91,7% et une spécificité de 81,8%. Concernant le prélèvement urinaire, la sensibilité est de 94,2% et la spécificité est à 88,6%.
- une méthode de spectrométrie de masse capable de détecter le variant muté qui possède 8 cytosines dans sa séquence alors que le variant sauvage possède 7 cytosines(60).

iv. Physiopathologie :

Comme pour les mutations *UMOD* et *REN*, la protéine MUC1fs s'accumule dans la cellule. Elle est tronquée et ne peut être adressée à la membrane. On sait que *MUC1* n'est pas indispensable à la survie de la souris (les souris *MUC1-KO* ne présentent pas de symptôme, pas d'insuffisance rénale(61)).

On sait également que la protéine MUC1fs s'accumule dans tous les tissus où elle est normalement produite. Cela a été démontré dans l'étude de Martina Živná(59), via un marquage en immunohistochimie ciblant la protéine mutée (figure 9). Elle est ainsi retrouvée dans la peau, dans les glandes sébacées, dans les glandes mammaires, dans le colon, le poumon et les trompes de Fallope. Pourtant les patients semblent développer une atteinte rénale isolée. La pathogénie serait donc certainement secondaire à un gain de fonction de la protéine mutée au niveau rénal.

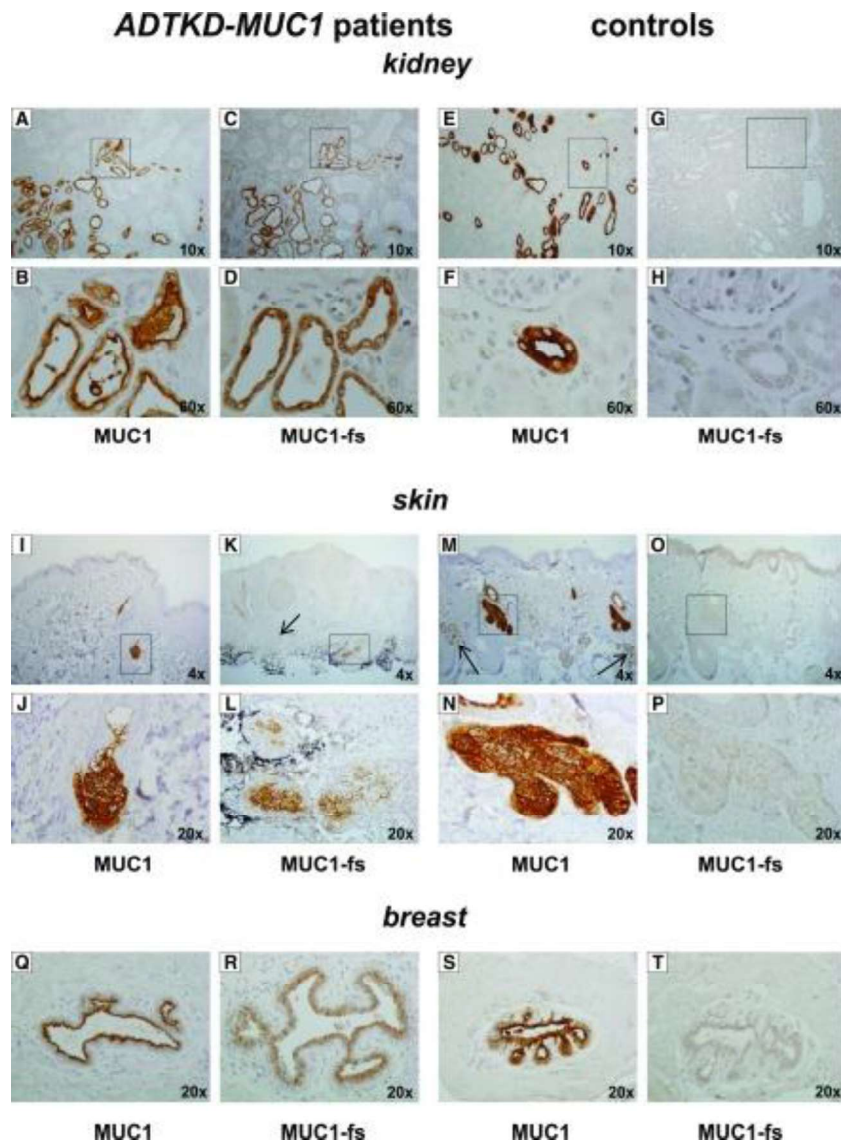


Figure 9 : marquage en immunohistochimie de MUC1 sauvage et de MUC1fs chez des patients malades et chez des témoins. On observe une diminution de la protéine sauvage à la membrane et une accumulation de la protéines tronquées dans le cytoplasme des cellules épithéliales tubulaires rénales, cutanées et mammaires(59).

Une cinquantaine de protéinopathies sont décrites, toutes sont caractérisées par une anomalie génétique qui entraîne la production d'une protéine anormale et son accumulation intracellulaire. Les protéines accumulées peuvent avoir une toxicité cellulaire (comme dans certaines formes de sclérose latérale amyotrophique et de maladie de Parkinson), une accumulation de la protéine dans les voies cellulaires

sécrétoires soit le reticulum endoplasmique ou l'appareil de golgi (comme dans certaines formes de rétinite pigmentaire) ou enfin une agrégation de protéines anormales dans le cytoplasme ou le noyau cellulaire comme dans la maladie de Huntington.

La voie sécrétoire initiale est composée du RE (reticulum endoplasmique), puis du ERGIC (ER-Golgi intermediate compartiment) puis de l'appareil de Golgi :

- la première étape est le RE, qui est une organelle qui est chargée de la synthèse, le pliage et puis la maturation structurale des protéines à partir de l'ARNm.
- l'ERGIC est le compartiment de tri entre les protéines qui retournent vers le RE et celles qui continuent vers le Golgi.
- l'appareil de Golgi est le centre de régulation du trafic cellulaire vésiculaire qui oriente les cargos qui l'empruntent vers leur destination (la membrane plasmique, le milieu extracellulaire et les lysosomes).

Ce système est donc responsable de la synthèse et de l'adressage intracellulaire d'un grand nombre de protéines. La réponse aux protéines non pliées (UPR, unfolded protein response) est activée par un stress dans le RE, secondaire à une accumulation de protéines non repliées dans sa lumière (liée à une forte demande en protéines, une infection virale ou une privation d'énergie le plus souvent). Les 3 acteurs principaux sont UPR—IRE1 (inositol requiring enzyme), PERK (PKR-like ER kinase) et ATF6 (activating transcription factor 6).

Le résultat de l'activation de l'UPR est une augmentation du repliement des protéines, leur transport et leur dégradation, accompagné d'une diminution de la production de protéines pour rétablir l'homéostasie du RE. Si ce système est dépassé, la cellule entre en apoptose.

Dans une étude menée au Broad Institute par DVELA-LEVITT(62), il a été montré que MUC1fs dans la voie sécrétrice précoce est trappée dans des vésicules de l'appareil sécrétoire riches en protéine cargo TMED9. Cette accumulation active l'UPR via la voie ATF6 (figure 10). Sur le modèle cellulaire créé dans l'étude (cellule épithéliale tubulaire immortalisée de patient mutés pour *MUC1*), l'inhibition de ATF6 mène à une accumulation plus importante de MUC1fs et à la mort cellulaire. ATF6 serait activée pour contrer l'accumulation de la protéine mutée et sa toxicité cellulaire en augmentant sa dégradation par le lysosome. Cependant face à un stress trop important dans le RE, le système UPR finit par être dépassé et mène à l'apoptose.

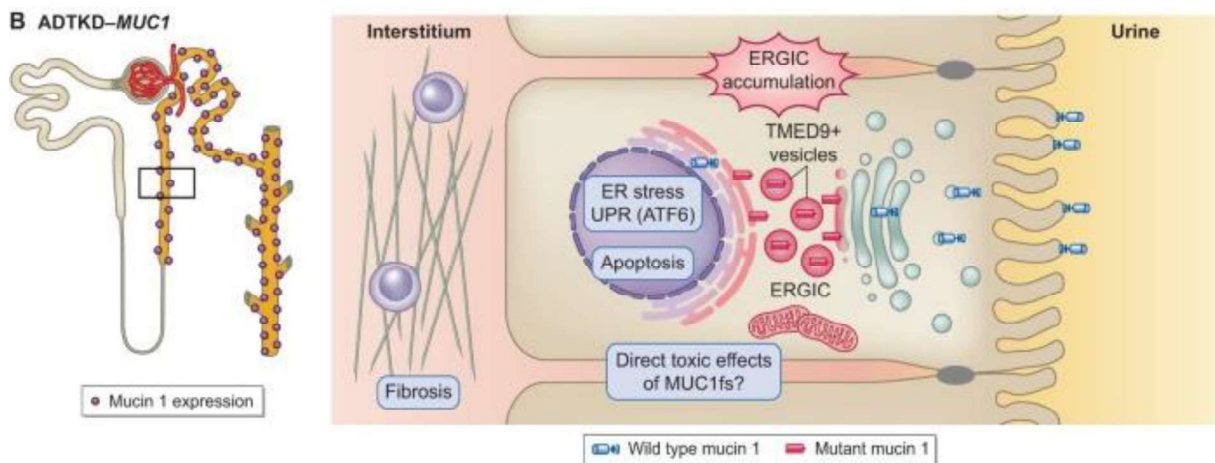


Figure 10 issue de l'article de Mabillard(63) : MUC1fs est trappée par les vésicules TMED9+ dans l'appareil sécrétoire, active l'UPR et mène à la mort cellulaire.

v. Phénotype clinique, explorations d'imagerie et histologie des patients *MUC1* :

Le premier article qui décrit le phénotype des patients *MUC1*, avec confirmation de la mutation, est paru en 2014 et fait suite à la publication du Broad Institute(64). 27 familles avec une ADTKD et négatifs pour *UMOD* et *REN* ont été étudiées. Sur 186 individus testés, 95 étaient porteur de la mutation *MUC1*. 111 individus étaient considérés comme « historiquement affectés » c'est-à-dire que le diagnostic a été

porté a posteriori. Ils nécessitaient deux conditions : avoir une mutation prouvée dans la descendance et avoir une IRC compatible.

On retrouve une évolution **vers une IRC terminale chez 147 individus, a un âge moyen de 44,9 ans** (s'étendant de 16 à 80 ans). 0,68% avant 20 ans, 16.3% entre 20 et 30 ans, 49% entre 30 et 50 ans, 25.2% entre 50 et 70 ans, 8.8% après 70 ans.

Concernant le déclin de la fonction rénale :

- 22 patients avaient suffisamment de données avec un DFG > 50 ml/min. On retrouve alors un déclin du DFG de -0.99 ± 6 mL/min/an.
- Au contraire, chez 29 individus avec un DFG < 50 mL/min (souvent correspondant au suivi néphrologique), on retrouve un déclin bien plus rapide, mesuré à -6.7 ± 4.2 mL/min/1,73m².

La pénétrance est complète mais le déclin de fonction rénale est variable selon les individus y compris au sein d'une même famille.

Le profil est **tubulo-interstitiel** :

- 79% ne présentaient pas de protéinurie,
- 76% ne présentaient pas d'hématurie
- les reins étaient tous de taille normale ou de petite taille selon le stade de maladie rénale chronique. 70% n'avaient pas de kyste, 13% 1 kyste, 17% avaient 2 kystes ou plus.
- 34 biopsies avaient été réalisées. Elles objectivaient toutes une néphrite tubulo-interstitielle. 12% retrouvaient une dilatation microkystique des tubules.
- Pas de surrisque de polyurie, de lithiase ou d'infection urinaire.
- 24% (soit 30/127) ont présentés au moins une crise de goutte. Le DFG était inférieur à 50 mL/min chez 88% des patients au moment de cet épisode.

Concernant les atteintes extrarénales : pas de pathologie pulmonaire, mammaire, gastrointestinales. Sur 99 femmes mutées *MUC1*, deux ont développées un cancer du sein.

Enfin la deuxième étude majeure sur le sujet est celle publiée en 2020 par OLINGER(20), à ce jour le plus grand nombre de patients rapportés. 726 patients avec ADTKD issus de 585 familles : 451 patients suivis aux Etats Unis et 275 patients suivis en Belgique ou Suisse avec 104 patients *MUC1*. Au niveau épidémiologique, *UMOD* semble la mutation la plus fréquente (37,1%) suivie par *MUC1* (21% de la population, 35% des patients négatifs pour *UMOD*). Comparés aux patients *UMOD*, l'évolution vers l'IRCT est plus fréquente (58% des malades contre 44%) chez les patients *MUC1*, elle est également plus précoce (âge médian de 36 ans contre 46 ans) (figure 11).

La goutte est plus fréquente chez les patients *UMOD* (79% vs 26%) et plus précoce (27 ans en moyenne contre 45 ans).

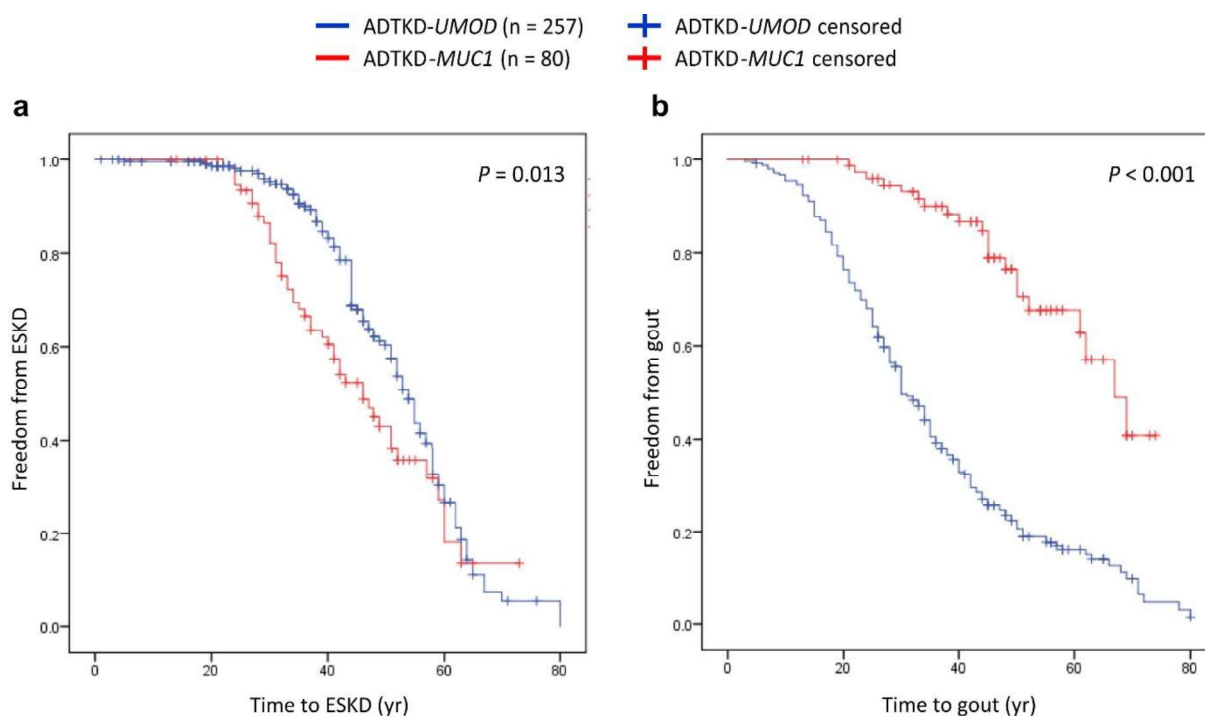


Figure 11 : courbe de survie sans IRC terminale à gauche et survie sans goutte à droite chez les patients mutés pour UMOD et MUC1(20).

vi. Prise en charge de la néphropathie MUC1 :

Comme pour les autres ADTKD, il n'existe pas actuellement de traitement spécifique. La prise en charge repose donc sur les règles de néphro-protection et la prise en charge de l'insuffisance rénale terminale lorsque l'évolution est défavorable.

L'ADTKD-MUC1 est un modèle de référence des protéinopathies pour le développement de thérapies spécifiques (62,65,66). Sur plus de 3 700 molécules testées en cours d'étude préclinique ou clinique, BRD4780 semble être la plus prometteuse. Cette molécule était initialement conçue comme antihypertenseur mais a montré un effet limité en étude préclinique. Elle a été testée sur un modèle murin de mutation MUC1, il est retrouvé une diminution de la protéine MUC1fs sans modifier MUC1 sauvage avec un effet dose dépendant (figure 12). Après 7j de traitement à la dose maximale, les tissus rénaux des souris mutées étaient comparables aux témoins.

L'efficacité est retrouvée également sur un modèle cellulaire de patient muté pour *MUC1*, laissant supposer une efficacité chez l'homme.

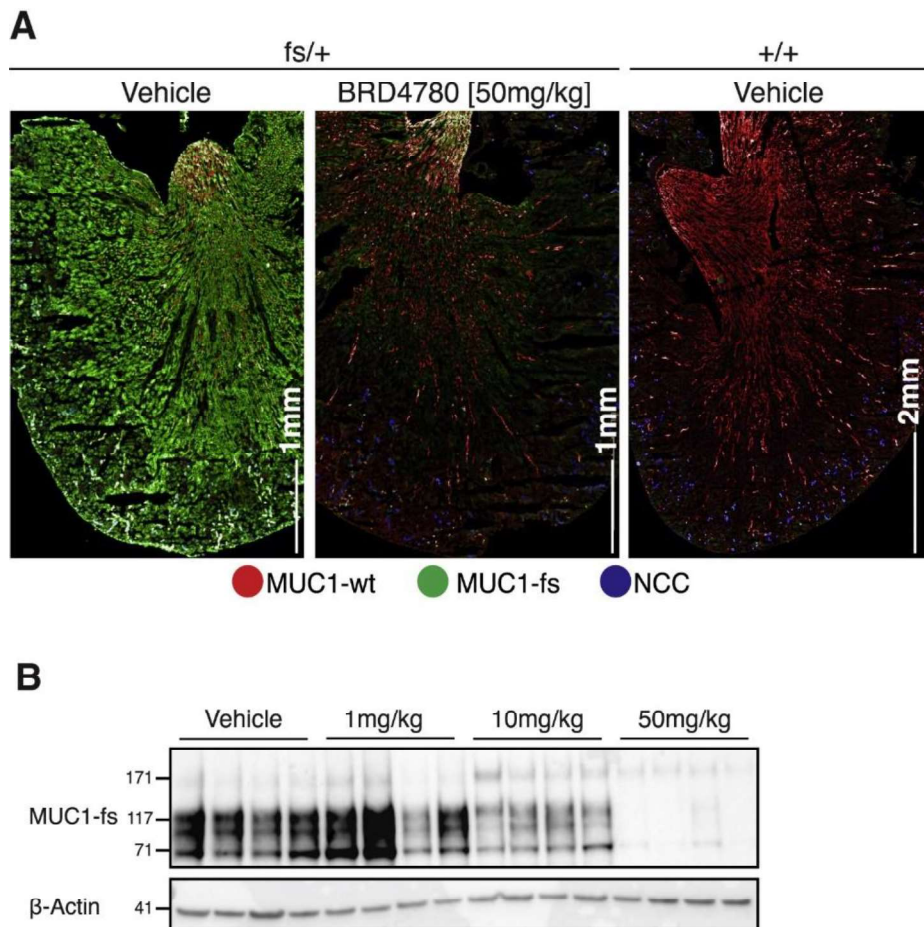


Figure 12 : En A, image en immunofluorescence de *MUC1fs* (vert), *MUC1* sauvage (rouge) et NCC (bleu, cotransporteur Sodium Chlore pour marquer les cellules du tube contourné distal) sur souris mutée (*fs/+*) traitée par vecteur à gauche ou BRD4780 au milieu pendant 7 jours comparé à une souris témoin (*+/+*) traitée par vecteur à droite. La dose maximale de traitement permet une diminution de *MUC1fs*, avec un aspect proche du témoin.

En B, l'analyse en immunoblot de *MUC1fs* sur le produit de lyse rénal des souris mutées *fs/+* traitées par le vecteur ou BRD4780 pendant 7 jours à la dose de 1, 10 et 50 mg/kg/j. On voit une diminution progressive de la protéine mutée dans le tissu avec un effet dose.

BRD4780 semble agir sur TMED9. Elle empêche alors le trappage de MUC1fs dans l'appareil sécrétoire et permet, via le système UPR, son adressage vers le lysosome pour être dégradé et empêcher son accumulation. Son action semble efficace sur d'autres protéinopathies. Testée sur un modèle cellulaire de mutation *UMOD* et de rétinite pigmentaire liée à une accumulation de rhodopsine, on retrouve une diminution de la protéine mutée intracellulaire en présence de BRD4780.

III. Conduite à tenir devant une ADTKD : recommandations

La figure 13 ci-dessous propose un résumé des caractéristiques communes des ADTKD et les particularités des six plus fréquentes.

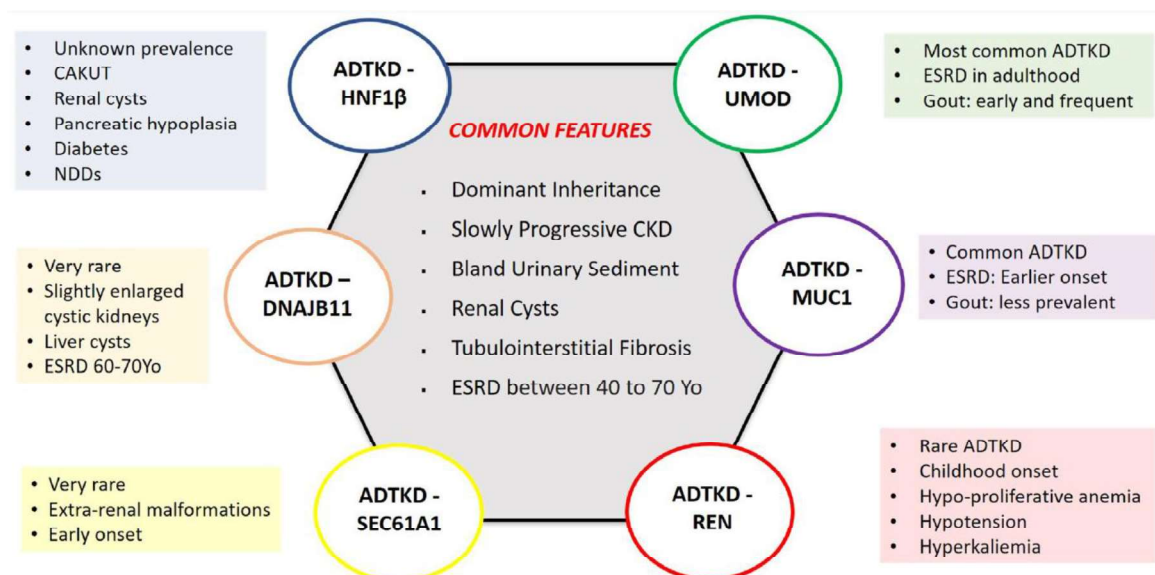


Figure 13 : tableau résumant les principales caractéristiques cliniques des différentes ADTKD, issus de l'article de Econimo et al(67).

Les KDIGO de 2015 recommandent devant une suspicion d'ADTKD de réaliser en première intention un panel pour rechercher *UMOD*, *REN* et *HNF1β*. En cas de résultat négatif, se rapprocher d'un centre de référence pour rechercher la mutation *MUC1*(6).

Au vu de la difficulté d'accès au diagnostic génétique de la mutation *MUC1*, le Dr OLINGER propose dans son article de 2020 son arbre décisionnel en incluant la clinique et des explorations biologiques. Il définit un *UMOD*-score (figure 14) pour différencier les deux ADTKD les plus fréquentes et s'orienter vers le bon examen.

Clinical <i>UMOD</i> -score		
Characteristics	Item	Value
Family history of CKD or early gout (<40 yr) compatible with autosomal dominant inheritance		+ 2
CKD of unknown origin ^a		+ 2
Age at gout onset	<30 yr	+ 3
	>30 yr	+ 1
Serum uric acid	>500 μmol/l (>8.41 mg/dl)	+ 3
	<500 μmol/l (<8.41 mg/dl)	+ 1
Histological findings compatible with ADTKD ^b		+ 2
Proteinuria/hematuria ^c		- 1
Diabetes/uncontrolled hypertension ^d		- 1
Renal cysts/enlarged kidneys ^e		- 1

Figure 14 : *UMOD*-score. L'item le plus discriminant est l'âge de goutte précoce et l'hyperuricémie. L'AUC est médiocre à 0,72. Un score > 5 a une sensibilité de 98,1% et une spécificité de 41,4% pour *UMOD*.

Ce score est amélioré en incluant le dosage d'uromoduline urinaire, qui est retrouvé abaissé dans la mutation *UMOD* et à un taux normal dans la mutation *MUC1*. L'AUC passe alors à 0,89. Devant un score élevé, on s'oriente en premier vers une recherche de mutation *UMOD* (figure 15).

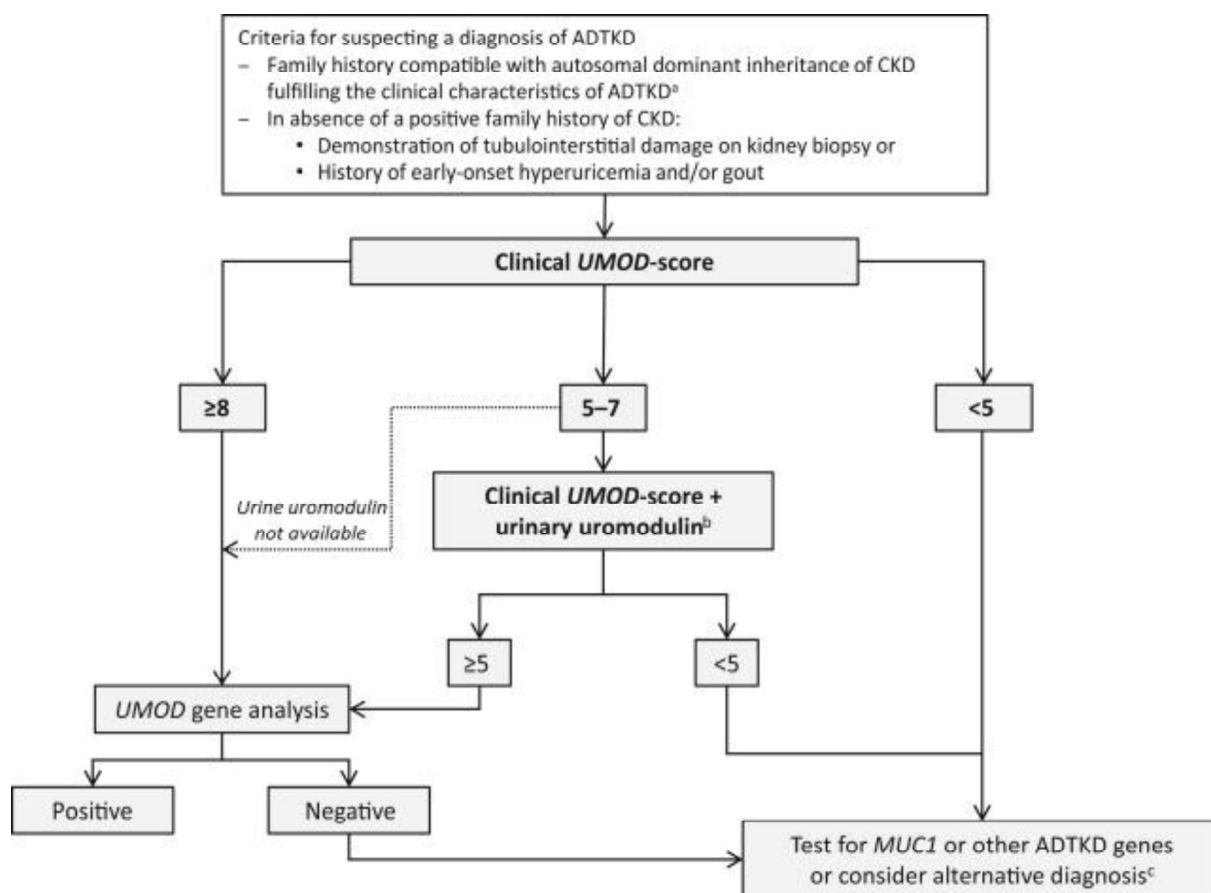


Figure 15 : arbre décisionnel devant une ADTKD proposé par l'article de Olinger.

L'arbre est sensiblement superposable dans un article plus récent de 2022(59), illustrant la difficulté d'accès au diagnostic génétique toujours présente (figure 16).

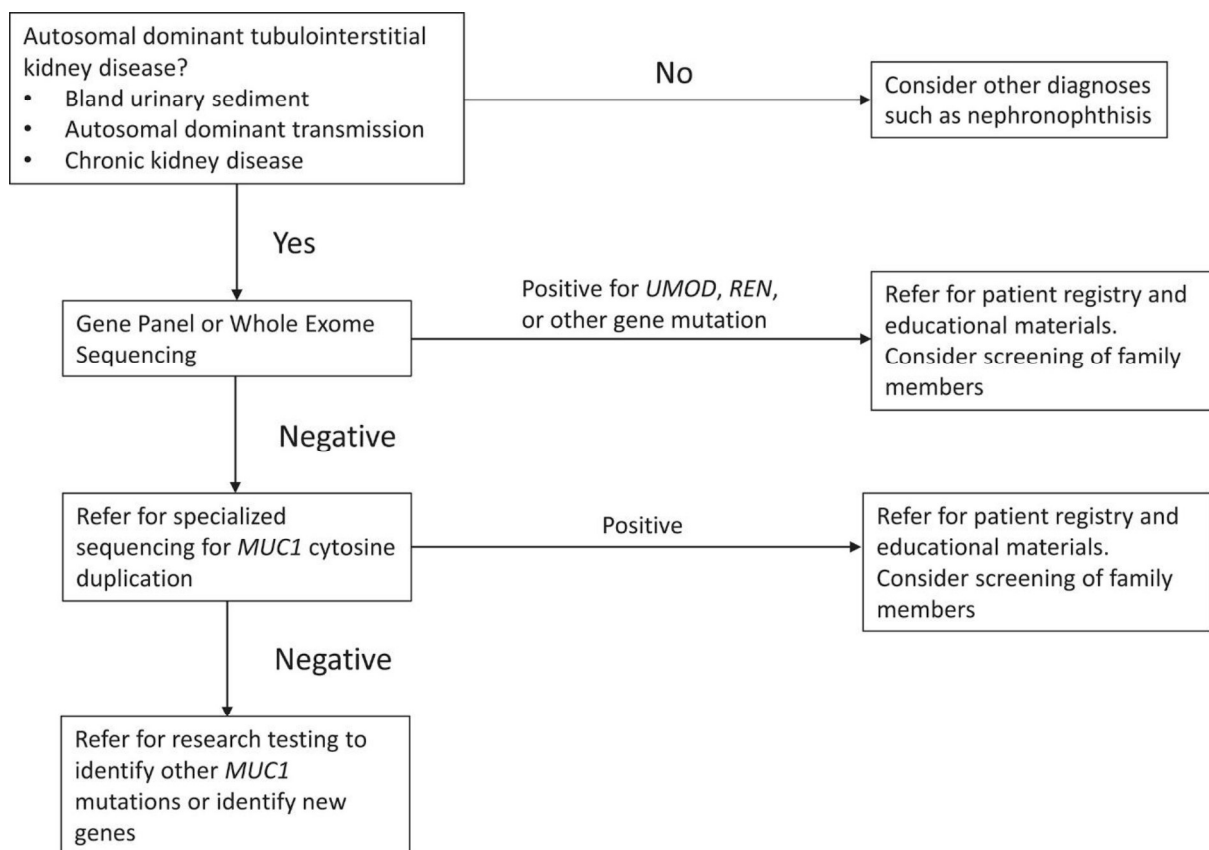


Figure 16 : autre proposition de conduite à tenir : rechercher dans un premier temps les critères d'ADTKD, puis réaliser un panel ou whole exome permettant de rechercher les mutations UMOD, REN, HNF1 β . Seulement en cas de négativité, contacter un centre de référence pour le séquençage de MUC1.

Les recommandations de l'Agence de Biomédecine et de la Haute Autorité de Santé concernant les prescriptions d'examen génétique et l'annonce des résultats sont disponibles en annexe.

IV. Analyse génétique et mise en évidence de la mutation au CHU de Lille :

Il existe 3 types d'approche du séquençage haut débit :

- Une étude ciblée sur quelques gènes d'intérêt, on parle de panels de gène ou capture d'exon ;
- L'étude sur l'ensemble des régions codantes du génome : on parle alors de « whole exome sequencing » ;
- L'étude de l'ensemble du génome est appelée « whole genome sequencing »

Le séquençage haut débit permet en une seule analyse d'étudier un grand nombre de gènes. Plusieurs méthodes de séquençage sont disponibles :

- le séquençage par synthèse (méthode Illumina) ;
- le pyroséquencage ;
- la ligation ;
- la détection d'ions H⁺.

La plus répandue actuellement est le séquençage par synthèse.

Des techniques de séquençage dite de « troisième génération » commencent à se répandre. Ils permettent l'étude de longs fragments d'ADN.

Dans l'objectif de mettre au point un panel pour le diagnostic de néphropathies héréditaires au CHU de Lille, la technologie Illumina a été choisie(68) : elle permet un coût par base faible, c'est la technique la plus utilisée par la communauté scientifique et avec un taux d'erreur faible (0,1%).

La deuxième étape a été le choix de la technique de préparation de la librairie disponible sur Illumina parmi les trois existantes :

- La technique Haloplex de la société Agilent, basée sur l'utilisation d'amplicons pour l'enrichissement de gènes cibles (panel de gènes) a été choisie. Elle est facile d'utilisation, reproductible, nécessite peu d'ADN. L'étape d'amplification permet d'obtenir de nombreuses copies du même amplicon. Les fragments séquencés sont longs, et donc souvent bien alignés lors de l'analyse bio-informatique des données. Les inconvénients sont : une moindre performance pour étudier les régions répétées, les gènes avec des pseudogènes (*PKD1*), et la quantité totale étudiée est limitée. De plus la répartition des fragments amplifiés est hétérogène et certaines régions auront une profondeur élevée, d'autres peuvent ne pas être assez couverte.
- Technique Sureselect (de Agilent) : technique d'hybridation. Donne une couverture de zone plus homogène. Technique plus récente, peu répandue.
- Technique SeqCap (de Roche) : technique d'hybridation, mais peu implantée également.

Explications sur le fonctionnement de la technique (figure 17)(69) :

- **1. Préparation de la librairie :**
 - On extrait l'ADN leucocytaire sur un prélèvement de tube EDTA.
 - On fragmente l'ADN par des enzymes de restriction (protéines capables de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée site de restriction). On obtient des fragments d'ADN digérés de tailles différentes.
 - Capture des gènes d'intérêt en les hybridant avec des sondes biotinylées, spécifiques des extrémités 5' et 3' des fragments d'intérêts préalablement digérés. Ces sondes contiennent également les motifs nucléotidiques utiles au séquençage (code barre d'identification patient,

adaptateur universelle pour se fixer au Flow cell, amorce de séquençage). Comme la sonde reconnaît l'ADN digéré à ses deux extrémités, elle entraîne la circularisation du fragment d'ADN.

- Purification à l'aide de billes magnétiques pour ne garder que les gènes d'intérêt du panel.
- 2. **Amplification des fragments** capturés par PCR sur Flow cell (lame de verre, recouverte d'amorce universelle de séquence. Les adaptateurs ajoutés sur les gènes d'intérêt viennent se lier au Flow cell, pour y être séquencés).
- 3. **Séquençage**, ici selon une méthode par synthèse : chaque nucléotide incorporé est fluorescent, permettant une lecture par laser.

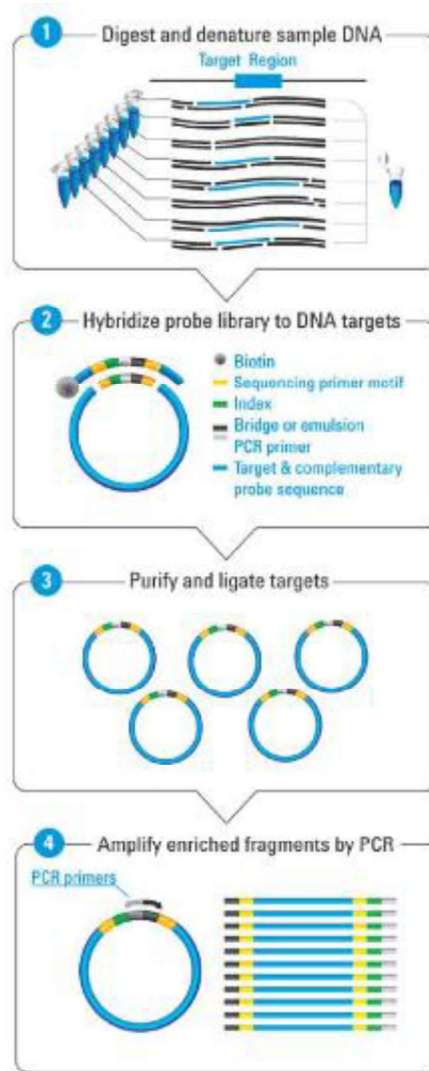


Figure 17 (70) : illustration des étapes de dénaturation de l'ADN, puis hybridation, purification et amplification des fragments par PCR.

- 4. **Analyse bio-informatique** (figure 18) : Le séquençage génère une quantité importante de données, qui sont interprétées via des outils appelés Pipeline (ou Workflow)(71).
 - o Détermination de la séquence « base calling ». On ne garde que le génome du patient (on retire les bases ajoutées pour le séquençage etc...).

- Alignement de la séquence sur le génome de référence : « mapping ».
- Deux paramètres essentiels pour l'interprétation des lectures (ou reads, c'est-à-dire la succession de bases lues par le séquenceur) : la profondeur et la couverture.
- Couverture : c'est le pourcentage de base séquencée par rapport à la région d'intérêt.
 - Profondeur : pour une base donnée, c'est le nombre de fois où cette base est séquencée (exprimée en X).

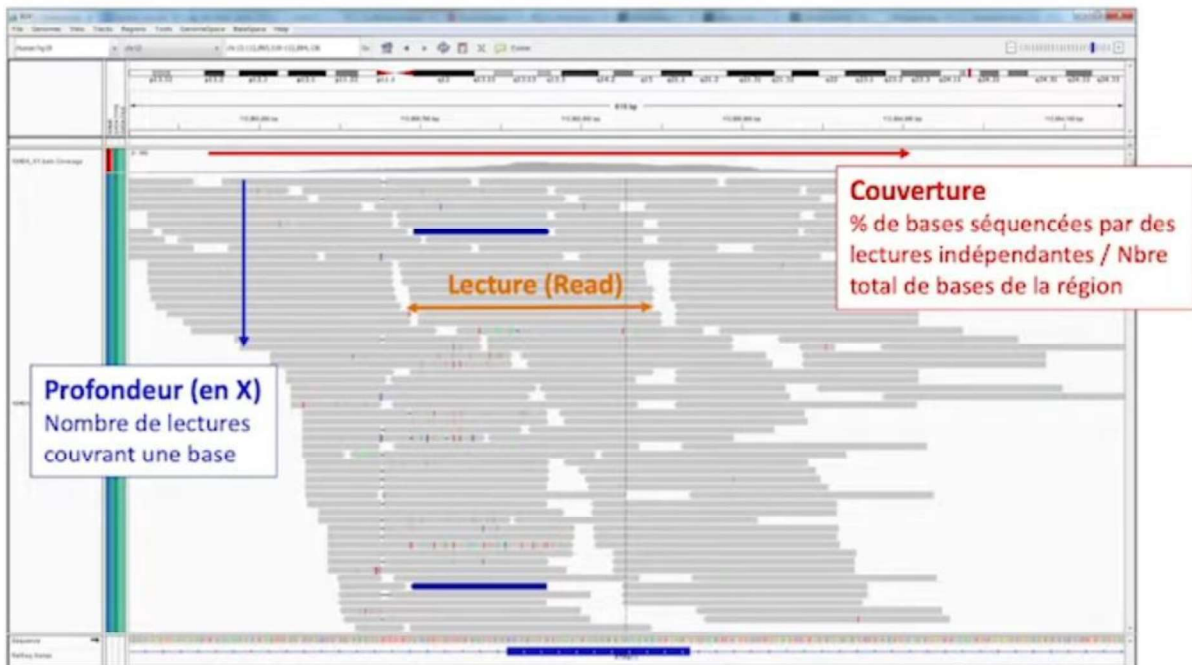


Figure 18 : capture d'écran du pipeline. En haut la séquence du génome de référence. En dessous, les reads alignés sur celle-ci. Pour chaque base on détermine sa profondeur. Pour chaque read on détermine sa couverture du génome.

- Détection des variants par l'outil bio-informatique : « variant calling », c'est-à-dire les différences par rapport à la séquence de référence.
- Enfin, création d'un fichier VCF, qui correspond à l'annotation de chaque variant. On vient décrire ce variant par rapport aux bases de données

internationales pour connaître sa fréquence dans la population, s'il est décrit dans la littérature. Les résultats sont rendus sous forme d'un tableur où chaque ligne correspond au variant et son analyse (% de read retrouvant cette anomalie, la conséquence du variant sur la protéine obtenue).

- Filtrage des variants : Il faut un bon équilibre entre un choix trop strict qui risquerait d'entraîner des faux négatifs et un choix trop permissif qui entraînerait trop de variants à analyser. Pour l'analyse des néphropathies héréditaires au CHU de Lille, le taux de couverture pour la technique et le panel de gène est de 98,4%.

- **5. Interprétation par le biologiste.** Les variants sont classés en 5 classes selon les recommandations ACMG de 2015. Un score SNV de 1 à 2 correspond à un risque neutre. Un score de 4 à 5 correspond à risque de variant pathogène important.

Cette technique offre notamment la possibilité d'avoir, pour un locus donné, une couverture par des amplicons différents et donc, de pouvoir éliminer lors de l'analyse les biais introduits par la PCR et les mutations liées à des artefacts de séquençage.(70)

Mais le NGS a également ses limites :

- Certains variants sont mal détectés (l'expansion de triplets par exemple),
- Pour les pseudogènes comme *PKD1* : il présente des difficultés pour l'alignement,
- Certaines régions sont difficiles à capturer et amplifier : notamment les régions riches en GC (car 3 liaisons hydrogènes vs 2 liaisons avec les AT, donc plus difficile à dénaturer).

Comme vu précédemment, le gène *MUC1* est particulièrement difficile à étudier. Pourtant lors de l'élaboration du panel à Lille, il a été mis en évidence 3 cas d'ins-C, visible sur le pipeline(68). Ces résultats étaient bien en faveur de la mutation pathogène et n'étaient pas évocateurs d'un artéfact :

- Les artéfacts à type d'insertion sont rares avec la technologie Illumina (moins de 0,1%)
- Il était retrouvé la même mutation que décrite dans la littérature (insC), avec notamment la même anomalie retrouvée dans une même famille (une mère et son fils).
- Cette image n'a été retrouvée que chez ces patients présentant une suspicion d'ADTKD, on ne la retrouve pour aucun autre patient testé.

En France, il n'y a pas de laboratoire capable de séquencer *MUC1* avec la technique de référence du Broad Institute. Les futurs séquenceurs de 3^{ème} et de 4^{ème} génération semblent prometteurs, avec un séquençage en temps réel sur une molécule unique d'ADN, sans amplification. On parle de séquençage « long read » c'est-à-dire de plusieurs kilobases. Ils permettent une analyse plus facile des régions riches en GC, le séquençage des régions répétées, la détection de variants de structure. Cette technique est disponible à Cologne, avec des résultats prometteurs pour le séquençage de *MUC1* par technique SMRT (Single Molecule Real Time Sequencing)(72).

Le Dr GRUNEWALD au CHU de Lille a mis au point un script bio-informatique de comptage de la variation. Celui-ci permet, à partir des données du séquençage, de compter le nombre de fois où la séquence insC est séquencée et le nombre de fois où la séquence Wild-type est identifiée. Ensuite on compare cette valeur aux autres patients. Par un test de Fischer, on regarde s'il y a une différence significative.

Par exemple pour notre patient on a compté 65 fois le motif, contre 0 à 4 fois chez les sujets témoins. Le rapport copie muté/copie sauvage s'est avéré significativement plus élevé chez les patients identifiés comme porteur de la mutation.

Ces résultats ont pu être validés :

- Avec Cologne : Lille a reçu l'ADN de 2 patients diagnostiqués positifs. Le script de comptage est revenu également positif.
- Avec le Broad Institute :
 - o Les échantillons des 7 patients identifiés dans la première série ont été envoyés au centre de référence, confirmant la mutation pour tous les cas.
 - o Une famille a été un témoin négatif : une mère a été identifiée positive alors que ces quatre enfants étaient négatifs pour cette maladie autosomique dominante. Le centre de référence a confirmé encore ces résultats.
 - o Enfin 16 ADN ont été envoyés par le Broad Institute en aveugle. Le laboratoire a identifié 6 *MUC1*, 8 *UMOD* et 2 négatifs. Ces deux derniers patients possédaient un variant *MUC1* autre que l'insertion de cytosine décrite précédemment (20). Ces variants ont alors été ajoutés au script.

Actuellement le script comporte :

- Les 5 mutations décrites dans la littérature ;
- La séquence Wild type ;
- Un script « all » : permet de détecter n'importe quelle différence avec la séquence Wild type ;

- Une sixième mutation (21insG) a ainsi été identifiée avec le script « all » sur un patient présentant un tableau d'ADTKD.

Cette technique a **pour avantage de faire partie du panel NGS utilisé en routine, ce qui permet de rechercher un variant *MUC1* en même temps que toutes les autres ADTKD.**

ARTICLE

Title: Description of a new simple and cost-effective molecular testing that could simplify *MUC1* variant detection

Authors:

Florentin BOURRE/Victor FAGES, Romain LARRUE, Andrea WENZEL, Jean-Baptiste GIBIER, Martin FIGEAC, Claire-Marie DHAENENS, Kendrah KIDD, Anthony BLEYER, François GLOWACKI/Olivier GRUNEWALD

Introduction

ADTKD (Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease) is a group of hereditary kidney disease characterized by tubular damage and interstitial fibrosis of the kidney leading to ESKD (end stage kidney disease)(1). Patients with ADTKD usually present with non-specific progressive chronic kidney disease (CKD) with mild to negative proteinuria and a family history(2). Several genes have been associated with ATKD, notably *UMOD* encoding uromodulin, *MUC1* encoding transmembrane epithelial mucin 1 and *REN*, *HNF1 β* and *SEC61A1*(3). According to latest studies, *UMOD* represents the most frequent subtype of ADTKD with estimated prevalence of 37.1% followed by *MUC1* in 35% of families that are *UMOD* negative with an estimated overall prevalence of 21%(4).

ADTKD is presumed to be underdiagnosed given the non-specificity of the phenotypic characteristics. ADTKD-*MUC1* pathogenic variations of *MUC1* are located in a repetitive sequence of 60 basepairs in the variable number tandem repeat (VNTR) domain of the gene. This mutation leads to the formation of a frameshift protein

(MUC1fs) that accumulates in the cytoplasm, leading to abnormal intracellular transport and tubulo-interstitial damage(4–6). VNTR are genomic sequences seven to thousands of base pairs long that are repeated in tandem from two to hundred of times(4). In humans, VNTRs have been implicated in monogenic disorders such as *MUC1* but VNTR polymorphisms also seem to influence several kidney disease related characteristics(4). VNTRs also have consequences beyond kidney diseases as they are known to have a functional role in genome regulation and as biomarkers, notably in neurology and oncology and their analysis remains challenging(7,8).

MUC1 VNTR is particularly difficult to assay as it consists of many copies of a large repeat unit (60 basepairs) with a very high G-C content (>80%)(5). Thus, ADTKD-MUC1 prevalence remains unclear as *MUC1* variants are not detected by standard NGS techniques due to difficulties in interpreting and reassembling sequences in areas of repetitive DNA. Consequently, ADTKD-MUC1 is probably underdiagnosed and require specialized genetic testing that are not yet clinically available(1,5).

We describe a new simple and cost-effective method for molecular testing of ADTKD-MUC1 and we describe ADTKD-MUC1 clinical and genetic characteristics in our cohort.

METHODS

Participants

Between January 2018 and February 2023, we collected data on all patients diagnosed with *MUC1* variants in Lille University Hospital. Genetic analysis were sent from different hospitals across France. Clinico-biologic characteristics were recorded

including longitudinal eGFR and renal outcomes. Participants with suspected ADTKD according to their referral nephrologist had a positive family history compatible with autosomal dominant inheritance of CKD with features of ADTKD including progressive loss of kidney function, bland urinary sediment, absent to mild albuminuria, normal sized or small sized kidneys. Minor patients were excluded from the study. Genetic analyses were performed after obtaining written consent from patients.

Ethical statement

This study was performed according to the Declaration of Helsinki and the Declaration of Istanbul. Ethical committee was bypassed according to French laws and the local institutional review board (Centre Hospitalier Universitaire de Lille) as the study was retrospective and observational. Informed consent was obtained from all subjects. Patients and laboratory data were analyzed anonymously and registered in respect with the French data protection registry (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés, i.e. CNIL), referenced #DEC22-308.

DNA Analysis – Genetic Testing

- *Panel NGS 107 – Haloplex, MUC1*

We used for this work an NGS gene panel of 107 genes known to be involved in inherited kidney disease. This panel contains all five ADTKD described genes, *MUC1* being one of those genes. This panel is used in routine molecular diagnosis of CKD in our molecular biology department in the Lille University Hospital in France since 2017. We used the library preparation kit Haloplex of the society Agilent. Reference of the kit is ID 22339-1591352935. Libraries were sequenced with a Miseq or a NextSeq550

Illumina sequencer. This technique provides large depth of coverage of the *MUC1* VNTR, over 1000x for each one of the sequenced samples.

Bio-informatic script, description and validation

• Description of the script Mutation Counter

In order to detect very low rate of altered reads, we used a bio-informatic counting script (available in Supplementary File), called Mutation Counter, developed by the bio-informatic team of the Lille University Hospital. This script can detect specific genetic sequences in the sequencing data and count the number of occurrences. We input in the settings all five described VNTR *MUC1* variations(4), the wild type sequence (WT) and a specific “All” sequence searching for any undescribed variation of the seven cytosine homopolymer:

- MUT_27dupC : GGGCTCCACCGCCCCCCC**C**AGCCCACGGTGTC
- MUT_27insCCCC : GGGCTCCACCGCCCCCCC**CCCC**AGCCCACGGTGTC
- MUT_26_27insG: GGGCTCCACCGCCCCCCC**G**CAGCCCACGGTGTC
- MUT_28dupA: GGGCTCCACCGCCCCCCCA**A**GCCCACGGTGT
- MUT_23delinsAT : GGCTCCACCGCC**AT**CCCCAGCCCACGGTGTC
- WT : GGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCCACGGTGTC
- All : GGGCTCCACCG.*****CCCCCCCAGCCCACGGTGTC

• Bio-informatic analysis

For each variation, a Fischer statistic test was applied to compare samples in an NGS run. A p-value <0.001 was considered as significative, meaning the sample contains a

significantly higher number of reads presenting the variation compared to the other samples in the same run, and was considered as a positive carrier of the variation.

- *Validation of the technique*

To test this novel molecular testing, we used DNA samples from 27 patients. 11 of them were patients from the Lille University Hospital in France (7 patients with clinically suspected ADTKD and 4 major asymptomatic adult child of an ADTKD-MUC1 patient). 16 were from the Wake Forest Hospital (North Carolina – USA). Participants all agreed for specific MUC1 molecular testing. Samples were anonymized before testing. All 27 seven samples were tested anonymously by the BROAD Institute reference technique for confirmation. Their technique was considered as the gold standard to detect MUC1 variant(5).

Statistical analysis

Quantitative parameters are presented as median and IQR or means and SD when appropriate and qualitative parameters are presented as fractions with percentages. Kaplan-Meier curves were generated to display ESKD-free survival. Patients who had not reached ESKD at the end of the study (outcome of interest not occurred during follow-up time) were considered censored individuals. Censoring time was defined as age at last follow-up. Data were analyzed with R software version 3.6.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

1) Validation of the novel molecular testing tool for MUC1 variant detection

11 patients from the Lille University Hospital in France (7 patients with clinically suspected ADTKD that were positive with our technique and 4 major asymptomatic adult children of an ADTKD-MUC1 patient that we all negative with our technique) were anonymously sent to the reference center at the Broad Institute. All results were confirmed with the snapshot reference technique. 16 patients from the Wake Forest Hospital (North Carolina – USA) (8 positive and 8 negative for *MUC1* with the snapshot reference technique at the Broad Institute) were anonymously sent to our department in Lille. With our technique, we were able to get a 100% concordance with results from the gold standard.

2) Identification of pathogenic variants by NGS

Between January 2018 and February 2023, genetic analysis was performed using NGS and our new bio-informatic script in 886 patients with suspected non-glomerular nephropathy. 137 patients had clinically suspected ADTKD. Variants in the following genes were detected: *MUC1* (n=19), *UMOD* (n=7), *HNF1B* (n=3), *COL4A3* (n=1), *PAX2* (n=3), *NPHP1*(n=1), *NPHP4*(n=1), *TTC21B*(n=1), *CLCN5* (n=1), *REN*(n=1), *NRIP1*(n=1). 18/19 patients positive for ADTKD-MUC1 had a cytosine insertion in *MUC1*-VNTR. 1 had a new mutation (21insG). Median delay between first nephrology visit and genetic diagnosis was 6 (IQR 2.2;11) years.

3) Clinical characteristics of ADTKD-MUC1 patients

Clinical characteristics are summarized in Table 1. 12 patients out of 19 were female. Age at presentation was 36 years. Nearly all of them had a positive CKD family history. All had proteinuria <0.3g/L. 8 patients underwent renal biopsies, we found non-specific lesions of glomerulosclerosis and tubulointerstitial kidney disease. 4 biopsies revealed

microcystic dilatation of the tubules. eGFR at diagnosis was 43 (+/-19)mL/min/1.73m². More than half of them had renal cysts, mainly small bilateral cysts. Median age at ESKD was 37.5 (IQR 35-50.5) years, freedom from ESKD is displayed in survival curve in Supplemental Figure 1. No specific extra-renal manifestation were found.

Table 1. Clinical characteristics of patients with ADTKD-MUC1

Characteristics	Patients with ADTKD-
	MUC1 (n=19)
Sex, female (%)	12/19 (63)
Age at presentation (years)	36 (28,48)
Proteinuria (g/L)	0.09(+/-0.06)
Hypertension (%)	4/16 (25)
Positive CKD family history (%)	16/17 (94)
eGFR at diagnosis (mL/min/1.73m ²)	43 (+/-19)
ESKD	8/16 (50)
Age at ESKD (years)	37.5 (35;50.5)
Renal cysts (%)	8/15 (53)
Gout (%)	2/17 (12)
Number of families	15

ADTKD, autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease ; CKD, chronic kidney disease ; eGFR, estimated glomerular filtration rate ; ESKD, end-stage kidney disease (dialysis or preemptive kidney transplant).

Quantitative parameters are presented as means +/- standard deviations or medians (interquartile ranges). Qualitative parameters are presented as fractions with percentages.

DISCUSSION

ADTKD-MUC1 diagnosis remains challenging and is probably under-diagnosed due to the lack of a genetic method testing that could be used in clinical practice. Latest KDIGO Consensus Report on ADTKD suggests referral to specialized centers(1). In 2021, Bleyer et al. suggested the use of an inherited kidney disease multigene panel including UMOD, REN, and other genes of interest; and to consider use of a laboratory specifically performing MUC1 targeted analysis if this multigene panel was negative(9). Indeed, due to the high guanosine-cytosine content and the repetitive nature of VNTR sequences, MUC1 variants cannot be identified by commonly used sequencing methods (NGS, exome sequencing)(9). MUC1 diagnosis can only be done in centers performing targeted analysis for MUC1 frameshift variants, such as CLIA-certified Broad Institute of Harvard and MIT laboratory(9). We describe for the first time a new simple and cost-effective method that could simplify ADTKD-MUC1 diagnosis.

We found in our cohort characteristics that were similar to those previously described in ADTKD-MUC1 patients. Age at presentation was 36 years, earlier than in ADTKD-MUC1 cohort described by Olinger which was 47 years(4). In our study, age at ESKD was 37.5 (35;50.5) years. In a Japanese cohort of ADTKD-MUC1 variants, (n=31 with inclusion of family affected patients), ESKD was described at a later stage with a median age at ESKD of 45years(10). Olinger et al, found a median age at ESKD of 36 years in their ADTKD-MUC1 cohort, similarly to ours(4). This difference could be

explained by the exclusion of family members in our cohort and in Olinger's. Phenotypes can be variable(11); in a study with 186 families and 95 patients with *MUC1* variants, Bleyer et al. described a variable age of onset of ESRD within and between families, ranging from 16 to >80 years(12). Occasional renal cysts can be found, but their frequency appears to be no higher than in other non-cystic kidney diseases. In their study, Bleyer et al. found no medullary cysts on ultrasounds of 35 individuals(12). In our study, half of patients had renal cysts of variable localization and size. It is now known that the presence of medullary cysts should not be considered as a good predictor of ADTKD-MUC1(9). Gout was rare, which was expected with *MUC1* variant. Gout is more prevalent and of earlier onset in ADTKD-UMOD compared to MUC1(4). As described previously, MUC1fs accumulates in several tissues(13) but does not cause extrarenal manifestations. We did not find evidence of specific clinical manifestations besides the kidney in our study. Of note, one patient had a lymphangiomyomatosis with cystic lung lesions, with no evident link with ADTKD-MUC1. *MUC1* is known to be involved in cancer invasion, metastasis and angiogenesis, through its role in intracellular signaling processes(14). As described in the literature, we did not find an increased risk of cancer in our cohort. Histology revealed tubular microcystic 4 of 8 biopsies. We did not perform noninvasive immunohistochemical method to detect MUC1fs as we do not have access to this technique in our center.

Penetrance is known to be complete and there are no genotype-phenotype correlations. In our cohort all patients but one had positive CKD family history. Individuals with no family history are unlikely to have ADTKD-MUC1 but it should not completely rule out the diagnosis as de novo variants may occur(9). All patients but

one had a cytosine insertion in MUC1-VNTR which is the most frequent mutation described in the literature. In Bleyer's study, all families were found to have an additional cytosine insertion in the VNTR of MUC1, suggesting that the neoprotein created because of this insertion is central to the pathogenesis of the kidney disease(12). Among the 93 families with ADTKD-MUC1 in Olinger's study, 87 presented with a cytosine duplication (27dupC, 93.5%), 3 with an adenine duplication (28dupA, 3.2%), 2 with a guanine insertion (26_27insG, 2.2%), and 1 with a small indel (23delinsAT, 1.1%)(4). Mutation 27dupC is the most commonly reported MUC1 mutation in studies in Europe, United States and Japan(4,10). In our study, one patient 1 had a new mutation, 21insG, not yet described in the literature, which leads to a frameshift variation and a truncated MUC1 protein. Consequences on the frameshift protein are probably similar to those with a cytosine insertion.

Recently, a novel mutation located before the first VNTR repeat unit was identified in a Dutch family(15).

MUC1-ADTKD is probably underdiagnosed as its diagnosis require specialized genetic testing due to the complexity of VNTR analysis. ADTKD-UMOD is considered as the most frequent cause of ADTKD(16). In the International ADTKD Cohort, the ADTKD-UMOD represented the most frequent subtype of ADTKD with an estimated prevalence of 37.1% followed by ADTKD-MUC1 in 35.1% of families *UMOD* negative(4). However, in a Spanish cohort, *MUC1* variant was the main genetic cause of ADTKD(11). Lately, Osaka et al. used long-read sequencing to detect *MUC1* variant; ADTKD-MUC1 was most commonly found with *MUC1* variants in 9 patients whereas 6 had *UMOD* variants(10). In their study, diagnostic rate of *MUC1* variants in patients with clinically suspected ADTKD is 18.8%. In our study, after exclusion of patients who previously

had a negative multigene panel, we identified 13 patients with *MUC1* variants, 3 with *UMOD* variants among patients with clinically suspected ADTKD. Thus, ADTKD-*MUC1* also appears to be more frequent than *UMOD* in this study.

Other identified gene with pathogenic variants were *HNF1 β* (n=3), *REN*(n=1), *COL4A3* (n=1), *PAX2* (n=3), *NPHP1*(n=1), *NPHP4* (n=1), *TTC21B*(n=1), *CLCN5* (n=1), *NRIP1*(n=1). Patients with *HNF1 β* mutations are usually distinguishable as they present with extra-renal manifestations such as diabetes, gout and hyperparathyroidism, hypomagnesemia, elevated liver enzymes, and congenital anomalies of the kidney and urogenital tract (CAKUT) (17). *HNF1 β* prevalence is probably probably underestimated in this study as we focused on patients with suspected ADTKD whereas *HNF1 β* diagnosis can also be made with genetic testing for diabetes or CAKUT. Patients with *REN* variants also usually have specific characteristics compared to other ADTKD, such as childhood anemia, mild hypotension and hyperkalemia(18). Other variants found are consistent with the literature on ADTKD. Wopperer et al. performed exome sequencing in sixteen families with ADTKD with no mutations found (including *MUC1*), of which nine showed diagnostic variants in the nephrome (four in *COL4A5*, two in *INF2* and one each in *COL4A4*, *PAX2*, *SALL1* and *PKD2*)(19). Nephronophthisis (1 *NPHP1*, 1 *NPHP4* and 1 *TTC21B* found in our study) may also be a differential diagnosis of ADTKD in young adults but usually autosomal recessive inheritance distinguishes it from ADTKD(1,20). *NRIP1* and *CLCN5* are less frequently described in patients with clinical features of ADTKD.

Thousands of different VNTR polymorphisms are known in human genome, they have been implicated in monogenic disorders but could also contribute to complex traits including kidney-related traits(21,22). VNTR could also have functional consequences and need to be considered more in research of complex disorders(23). As they are difficult to analyze, their role in physiology is still not fully understood(7). The difficulty in VNTR analysis lies in the detection of a variant within a 60 basepairs repeat unit of a VNTR sequence. Indeed, repeated regions in the DNA cause difficulties for the alignment of sequences and genome assembly making it difficult to discern where the repeat lies, their true copy numbers and whether the repeat is polymorphic(23). Considering this, we understand that ADTKD-MUC1 diagnosis is complex and that *MUC1* pathogenic variant have been identified only recently by Kirby et al. as they lie in *MUC1* VNTR region which consists of many copies of a large repeat unit (60 basepairs) with a very high G-C content (>80%)(5). As seen previously, *MUC1* variants are not detected by NGS which uses short-read sequencing.

We describe for the first time a new simple and cost-effective method for molecular testing of ADTKD-MUC1 using NGS. This technique uses a script “Mutation Counter” that allows to count the number of altered reads and compare samples in an NGS run, in order to identify patients with significantly higher number of reads presenting the variation compared to the other samples. All samples anonymously tested, positive and negative, have been confirmed by the BROAD Institute reference technique(9). This technique could ease ADTKD-MUC1 diagnosis in clinical practice and unveil a higher prevalence of the disease. The major advantage of our technique is that it doesn't require any additional technical analysis and it simply relies on NGS data analysis. Therefore, it is possible to test concomitantly *MUC1* and other ADTKD genes.

Testing all 5 genes (*MUC1*, *UMOD*, *REN*, *HNF1 β* and *SEC61A1*) at the same time in NGS will be more efficient and at no additional cost. Improving detection of mutations within the VNTR might also impact diagnosis of other diseases. For example, mutations in carboxyl ester lipase (*CEL*) gene VNTR have been associated with diabetes and exocrine pancreatic dysfunction(24).

This technique also has several limitations. First, the counting script only detects determined genetic sequences and cannot detect an unknown variation. We prevented this issue with a generic seed that can detect any undescribed variation of the seven cytosine homopolymer of the VNTR. Using this technique, we were even able to detect a novel mutation 21insG. We were able to get a 100% concordance with results from the gold standard on the 27 samples that were tested with both techniques. However, we cannot exclude false negatives. If p-value is equivocal, the best diagnostic strategy would be to send the sample to a specialized center to test the patient with the snapshot reference technique. Second, this technique does not permit to locate precisely the position of the mutated 60 basepairs sequence. This position is not correlated to the phenotype but could be relevant for familial segregation studies. The best technique to determine precise positioning of the causative mutation and to identify sequence variants in *ATKD-MUC1* is long read single molecule real time sequencing (SMRT)(25). This technique is able to identify potential novel mutations occurring within the VNTR, contrary to the snapshot reference technique that can only detect cytosine insertion variant. SMRT for *MUC1* is still expensive and is only done in few specialized centers. Lastly, in order to detect a small number of sequences with mutation, we need an important depth of coverage. Haloplex kit of Agilent allow a depth

of 1000x but other NGS Library Preparation Kits may not be usable. This technique could also be difficult with WES or WGS with depths usually around 50-100x.

Currently, *MUC1* diagnosis cannot be done in routine but the increasing availability of long read sequencing methods should improve this diagnosis and lead to a greater understanding of underlying physiology and disease. Non-invasive immunohistochemical method could also be useful in the future for diagnostic testing but are not yet available in clinical practice(13). Improving *MUC1* variant detection with routine techniques seems essential, especially as targeted therapies are being studied but no specific treatment has been validated yet. Dvela-Levitt et al. reported that a small molecule BRD4780 re-routes *MUC1* for lysosomal degradation and could be a promising lead for the treatment of toxic proteinopathies(26).

In conclusion, we describe for the first time a novel technique to detect *MUC1* variant with a bioinformatic script using NGS. Genetic analyses in our cohort suggest that *MUC1* might be the first cause of ADTKD. Increasing the availability of *MUC1* diagnosis tools will contribute to a better understanding of the disease and to the development of specific treatments.

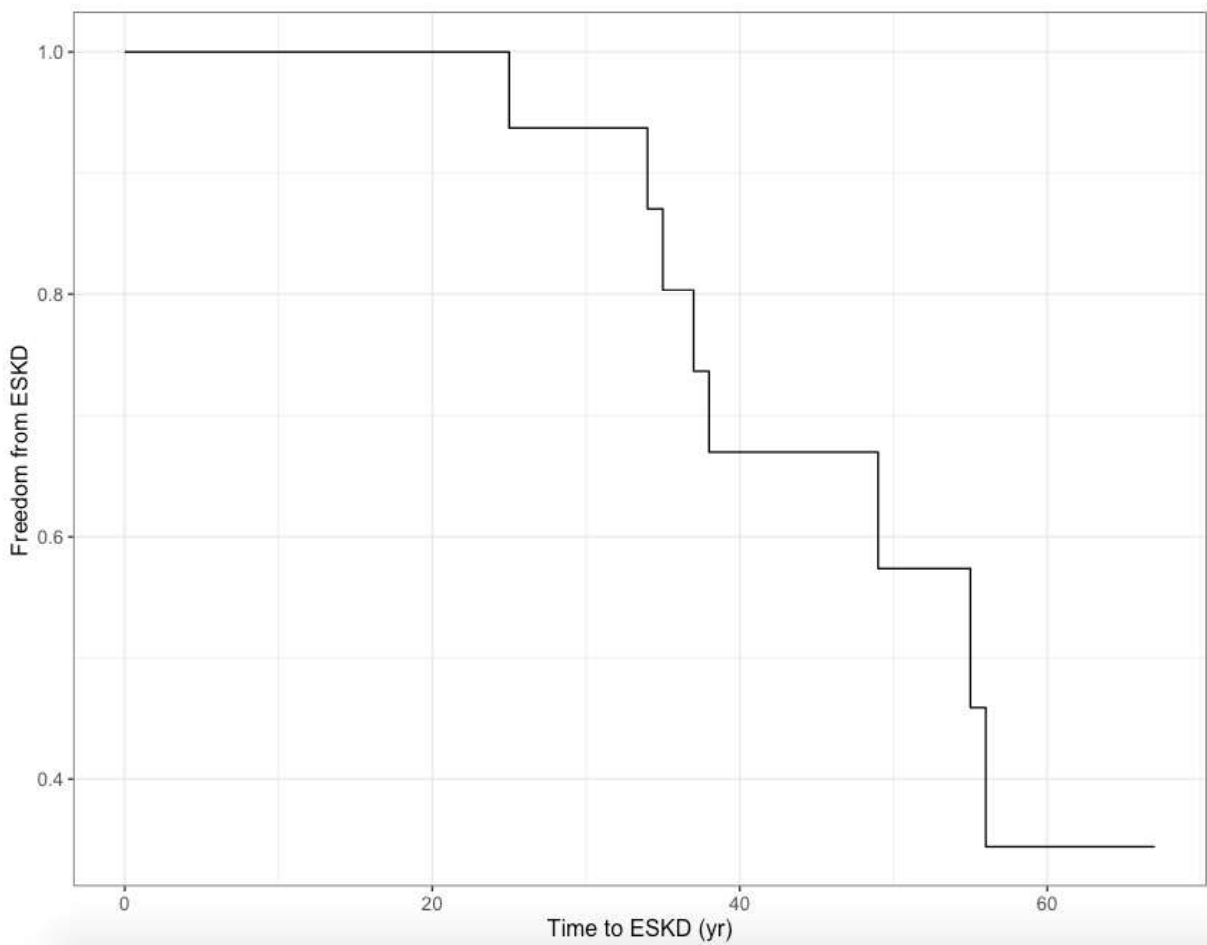
References

1. Eckardt KU, Alper SL, Antignac C, Bleyer AJ, Chauveau D, Dahan K, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: diagnosis, classification, and management—A KDIGO consensus report. *Kidney International*. 2015 Oct;88(4):676–83.
2. Devuyst O, Olinger E, Weber S, Eckardt KU, Knoch S, Rampoldi L, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Sep 5;5(1):60.
3. Bolar NA, Golzio C, Živná M, Hayot G, Van Hemelrijk C, Schepers D, et al. Heterozygous Loss-of-Function SEC61A1 Mutations Cause Autosomal-Dominant Tubulo-Interstitial and Glomerulocystic Kidney Disease with Anemia. *The American*

Journal of Human Genetics. 2016 Jul;99(1):174–87.

4. Olinger E, Hofmann P, Kidd K, Dufour I, Belge H, Schaeffer C, et al. Clinical and genetic spectra of autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease due to mutations in UMOD and MUC1. *Kidney International*. 2020 Sep;98(3):717–31.
5. Kirby A, Gnirke A, Jaffe DB, Barešová V, Pochet N, Blumenstiel B, et al. Mutations causing medullary cystic kidney disease type 1 lie in a large VNTR in MUC1 missed by massively parallel sequencing. *Nat Genet*. 2013 Mar;45(3):299–303.
6. Ekici AB, Hackenbeck T, Morinière V, Pannes A, Buettner M, Uebe S, et al. Renal fibrosis is the common feature of autosomal dominant tubulointerstitial kidney diseases caused by mutations in mucin 1 or uromodulin. *Kidney International*. 2014 Sep;86(3):589–99.
7. Marshall JN, Lopez AI, Pfaff AL, Koks S, Quinn JP, Bubb VJ. Variable number tandem repeats – Their emerging role in sickness and health. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021 Jun;246(12):1368–76.
8. Li Z, Yang D, Guo T, Lin M. Advances in MUC1-Mediated Breast Cancer Immunotherapy. *Biomolecules*. 2022 Jul 6;12(7):952.
9. Bleyer AJ, Živná M, Kidd K, et al. Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease – MUC1. 2013 Aug 15 [Updated 2021 Oct 21]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al, editors *GeneReviews®* [Internet] Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023.
10. Okada E, Morisada N, Horinouchi T, Fujii H, Tsuji T, Miura M, et al. Detecting MUC1 Variants in Patients Clinicopathologically Diagnosed With Having Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease. *Kidney International Reports*. 2022 Apr;7(4):857–66.
11. Ayasreh N, Bullich G, Miquel R, Furlano M, Ruiz P, Lorente L, et al. Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease: Clinical Presentation of Patients With ADTKD-UMOD and ADTKD-MUC1. *American Journal of Kidney Diseases*. 2018 Sep;72(3):411–8.
12. Bleyer AJ, Knoch S, Antignac C, Robins V, Kidd K, Kelsoe JR, et al. Variable Clinical Presentation of an MUC1 Mutation Causing Medullary Cystic Kidney Disease Type 1. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2014 Mar;9(3):527–35.
13. Živná M, Kidd K, Přistoupilová A, Barešová V, DeFelice M, Blumenstiel B, et al. Noninvasive Immunohistochemical Diagnosis and Novel MUC1 Mutations Causing Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Sep;29(9):2418–31.
14. Chen W, Zhang Z, Zhang S, Zhu P, Ko JKS, Yung KKL. MUC1: Structure, Function, and Clinic Application in Epithelial Cancers. *IJMS*. 2021 Jun 18;22(12):6567.
15. de Haan A, van Eerde AM, Eijgelsheim M, Rump P, van der Zwaag B, Hennekam E, et al. Novel MUC1 variant identified by massively parallel sequencing explains interstitial kidney disease in a large Dutch family. *Kidney International*. 2023 May;103(5):986–9.
16. Gast C, Marinaki A, Arenas-Hernandez M, Campbell S, Seaby EG, Pengelly RJ, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease-UMOD is the most frequent non polycystic genetic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2018 Dec;19(1):301.
17. Verhave JC, Bech AP, Wetzels JFM, Nijenhuis T. Hepatocyte Nuclear Factor 1 β -Associated Kidney Disease: More than Renal Cysts and Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2016 Feb;27(2):345–53.

18. Živná M, Kidd K, Zaidan M, Vyleťal P, Barešová V, Hodaňová K, et al. An international cohort study of autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease due to mutations identifies distinct clinical subtypes. *Kidney International*. 2020 Dec;98(6):1589–604.
19. Wopperer FJ, Knaup KX, Stanzick KJ, Schneider K, Jobst-Schwan T, Ekici AB, et al. Diverse molecular causes of unsolved autosomal dominant tubulointerstitial kidney diseases. *Kidney International*. 2022 Aug;102(2):405–20.
20. Devuyst O, Knoers NVAM, Remuzzi G, Schaefer F. Rare inherited kidney diseases: challenges, opportunities, and perspectives. *The Lancet*. 2014 May;383(9931):1844–59.
21. Olinger E, Wilson I, Devuyst O, Sayer JA. Kidney traits on repeat—the role of MUC1 VNTR. *Kidney International*. 2022 May;101(5):863–6.
22. Mukamel RE, Handsaker RE, Sherman MA, Barton AR, Zheng Y, McCarroll SA, et al. Protein-coding repeat polymorphisms strongly shape diverse human phenotypes [Internet]. *Genetics*; 2021 Jan [cited 2023 May 23]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.01.19.427332>
23. Brookes KJ. The VNTR in complex disorders: The forgotten polymorphisms? A functional way forward? *Genomics*. 2013 May;101(5):273–81.
24. Ræder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, et al. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet*. 2006 Jan;38(1):54–62.
25. Wenzel A, Altmueller J, Ekici AB, Popp B, Stueber K, Thiele H, et al. Single molecule real time sequencing in ADTKD-MUC1 allows complete assembly of the VNTR and exact positioning of causative mutations. *Sci Rep*. 2018 Mar 8;8(1):4170.
26. Dvela-Levitt M, Kost-Alimova M, Emani M, Kohnert E, Thompson R, Sidhom EH, et al. Small Molecule Targets TMED9 and Promotes Lysosomal Degradation to Reverse Proteinopathy. *Cell*. 2019 Jul;178(3):521-535.e23.



Supplemental Figure 1. Freedom from end-stage kidney disease (ESKD). Kaplan Meier curve of renal survival in patients with ADTKD-MUC1. Median renal survival was 37.5 years[35;50.5]. Censored : ESKD has not occurred during the follow-up time.

RESULTATS :

I. Analyse des variants pathogènes identifiés au CHU par panel NGS pour recherche de néphropathie héréditaire

Entre le 1^{er} janvier 2018 et le 28 février 2023, 886 échantillons ont bénéficié d'une analyse NGS pour recherche de néphropathie héréditaire non glomérulaire. 228 demandes ont été sélectionnées pour notre analyse pour les indications suivantes : suspicion d'ADTKD, néphropathie kystique de l'adulte (hors mutation *PKD1* et *PKD2*, *DNAJB11* et *IFT140*), IRC d'étiologie indéterminée et cas familial d'un patient ADTKD.

La suspicion d'ADTKD est la principale indication de demandes d'examen avec 137 demandes (dont 14 demandes pour cas familiaux). 71,4% provenaient de la région Haut de France (n=163) dont une demande d'Amiens. Le détail sur l'origine géographique des demandes de panel est disponible en annexe (annexe 2).

Sur les 228 demandes d'examens sélectionnées, 61 variants pathogènes ont été identifiés (figure 18) :

- Concernant les ADTKD : 19 variants *MUC1*, 7 variants *UMOD*, 1 variant *REN*, 4 variants *HNF1β*, absence de *SEC61A1*.
- Ensuite ont été identifiées 15 anomalies de COL4 (*COL4A3* (n=9), *COL4A4* (n=4) et *COL4A5* (n=2)) ; 7 cas de néphronoptise (*NPHP1* (n=3), une mutation de *ANSK6*, *NPHP3*, *NPHP4*, *TTC21B*)(73) ; une maladie de Dent de type 1 (mutation *CLCN5*) ; un syndrome de BOR (mutation *EYA1*) ; un CAKUT (mutation *NRIP1*) ; trois syndromes rein colobome (mutation *PAX2*) ; deux

polykystose rénale autosomique récessive à type de maladie de Caroli (mutation *PKHD1*).

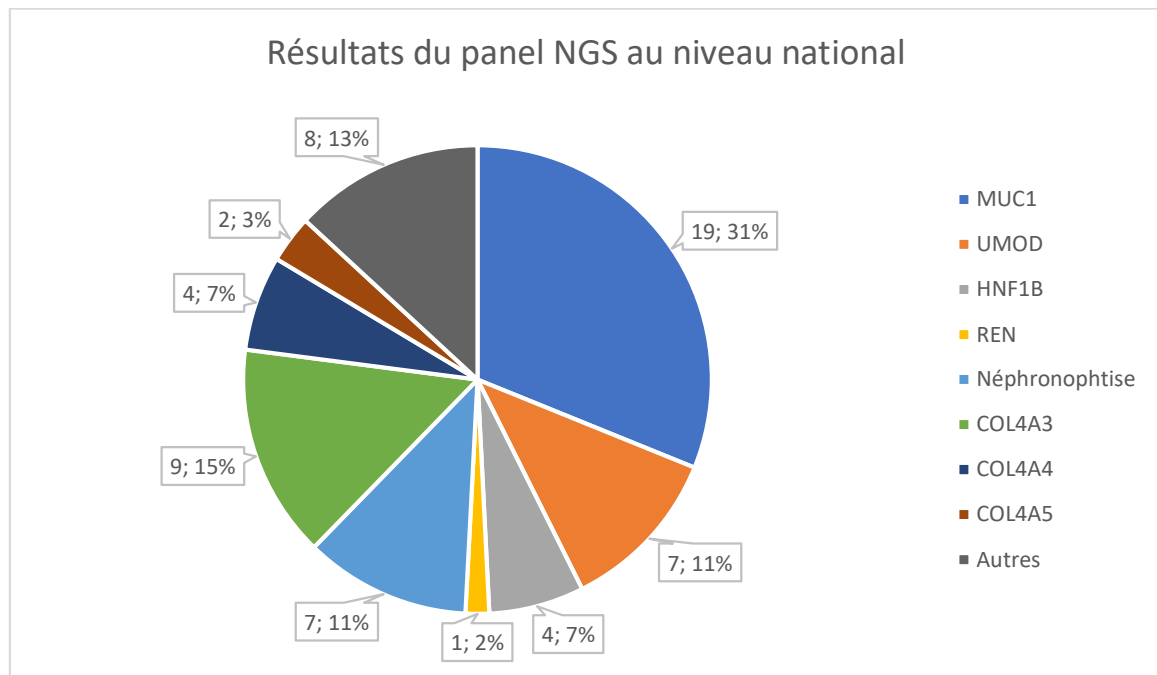


Figure 18 : répartition des 61 variants identifiés parmi les 228 demandes sélectionnées.

Pour les départements du Nord et du Pas de Calais, les 162 échantillons analysés sont revenus positifs pour 42 patients, dont 19 ADTKD (13 mutations *MUC1*, 3 mutations *UMOD*, 2 mutations *HNF1 β* et 1 mutation *REN*). Les résultats sont représentés sur la figure 19.

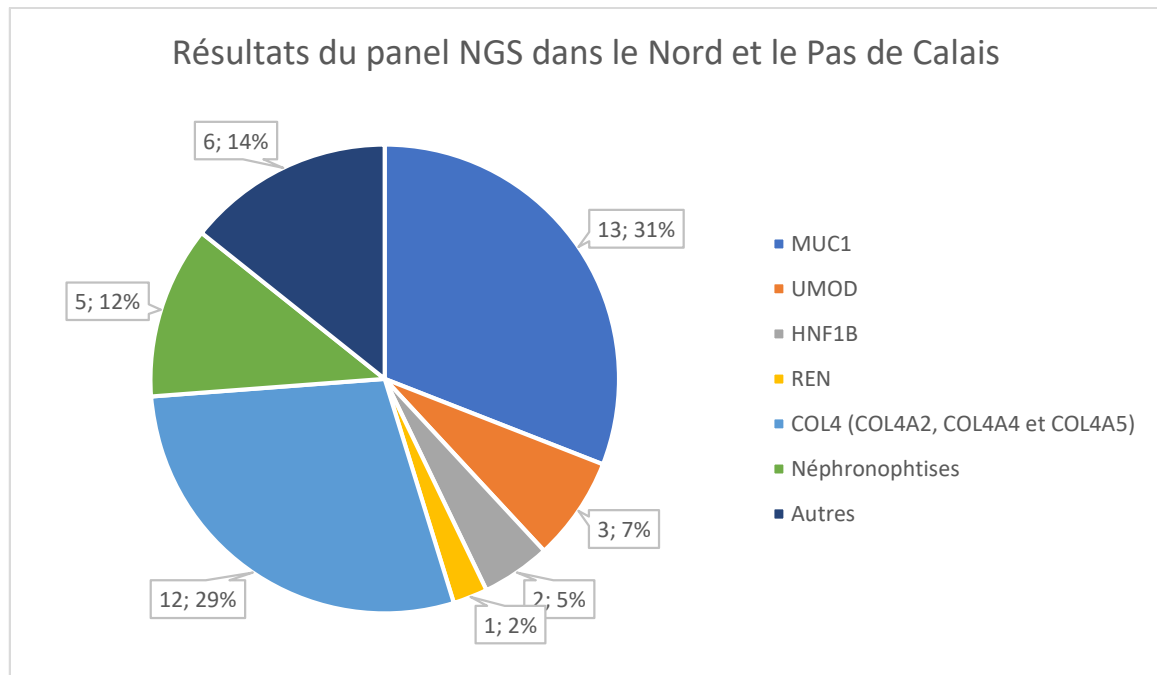


Figure 19 : répartition des 42 variants identifiés parmi les 162 demandes issues du Nord et du Pas de Calais.

Parmi les 137 patients avec une suspicion initiale d'ADTKD, 39 variants ont été identifiés : *MUC1* (n=19), *UMOD* (n=7), *HNF1B* (n=3), *COL4A3* (n=1), *PAX2* (n=3), *NPHP1*(n=3), *CLCN5* (n=1), *REN* (n=1), *NRIP1* (n=1). Aucun *MUC1* identifié sur les prélèvements adressés pour néphropathie kystique. Au total, 19 patients ADTKD-*MUC1* sont identifiés (figure 20).

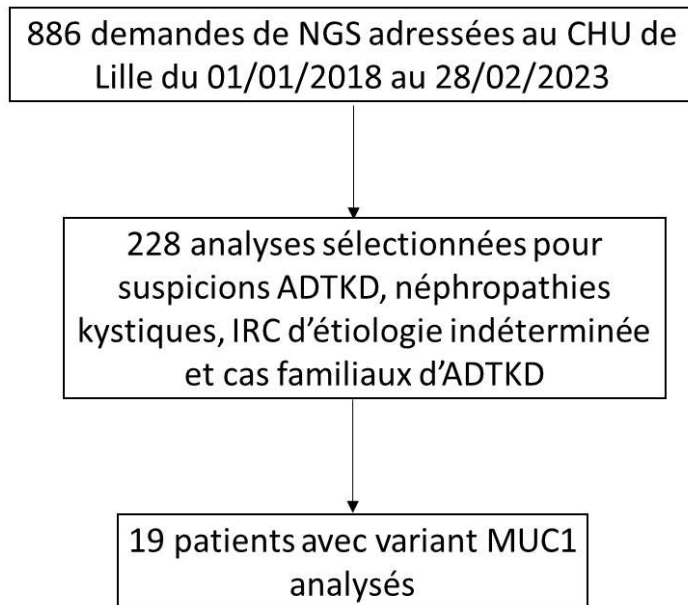


Figure 20 : flow chart

II. Caractéristiques génétiques, cliniques, biologiques et histologiques des patients ADTKD-MUC1 :

12 patients sur 19 étaient des femmes ; issus de 15 familles.

Caractéristiques génétiques :

18 patients présentaient une insertion d'une cytosine dans le VNTR. Un patient présentait une mutation 21insG, qui entraîne également un décalage du cadre de lecture et aboutit à la formation de la protéine tronquée MUC1fs. Deux patients ont bénéficié d'une consultation spécifique de génétique clinique. Tous les patients, excepté un, avaient des antécédents familiaux d'IRC au premier degré.

Caractéristiques au diagnostic :

L'âge médian de premier contact médical est de 36 ans, avec au diagnostic une créatinine moyenne à 21,5 mg/L (soit un DFG estimée par la formule CKD EPI à 43 +/- 19 mL/min/1,73m²). 4 patients présentaient une HTA, la tension artérielle moyenne était de 135/79 mmHg.

L'analyse urinaire objective :

- une protéinurie inférieure à 0,3 g/g de créatininurie pour tous les patients, en moyenne à 0,09 g/g.
- Une hématurie moyenne de 3,8 éléments/mm³. 2 cas d'hématurie microscopique significative.
- Une leucocyturie moyenne de 6,1 éléments/mm³. 4 cas de leucocyturie significative.

La taille moyenne des reins au diagnostic est de 10,1 cm. On trouve la présence de kystes chez 8 patients (5 patients à une IRC stade III, 1 patient en IRC stade IV, 1 patient en IRC stade V, 1 sans précision), le plus souvent de petits kystes bilatéraux. Les caractéristiques détaillées de chaque patient sont disponibles en annexe 3.

Caractéristiques histologiques :

8 patients ont réalisé une biopsie rénale.

- Au niveau glomérulaire : une glomérulosclérose entre 0 et 50% selon l'évolution de l'IRC ; absence d'anomalie glomérulaire.
- Au niveau tubulo-interstitielle : FIAT non spécifique :
 - infiltrat inflammatoire interstitiel dans les zones de fibrose, tubulite légère lymphocytaire sur une biopsie,

- distensions tubulaires ou dilatations kystiques sur 4 biopsies,
- anomalies des membranes basales tubulaires avec un aspect épaissi de façon segmentaire sur deux biopsies.
- Il a également été mis en évidence au CHU de Lille des lésions similaires à celles observées dans la néphronophtise décrites par Larsen et al(74) (figure 21) :
 - tubules tortueux et irréguliers avec plus de 4 embranchements ;
 - atypies de l'épithélium tubulaire avec des noyaux clarifiés, un aspect pseudo-stratifié et un cytoplasme bombant vers la lumière dans certains tubules.

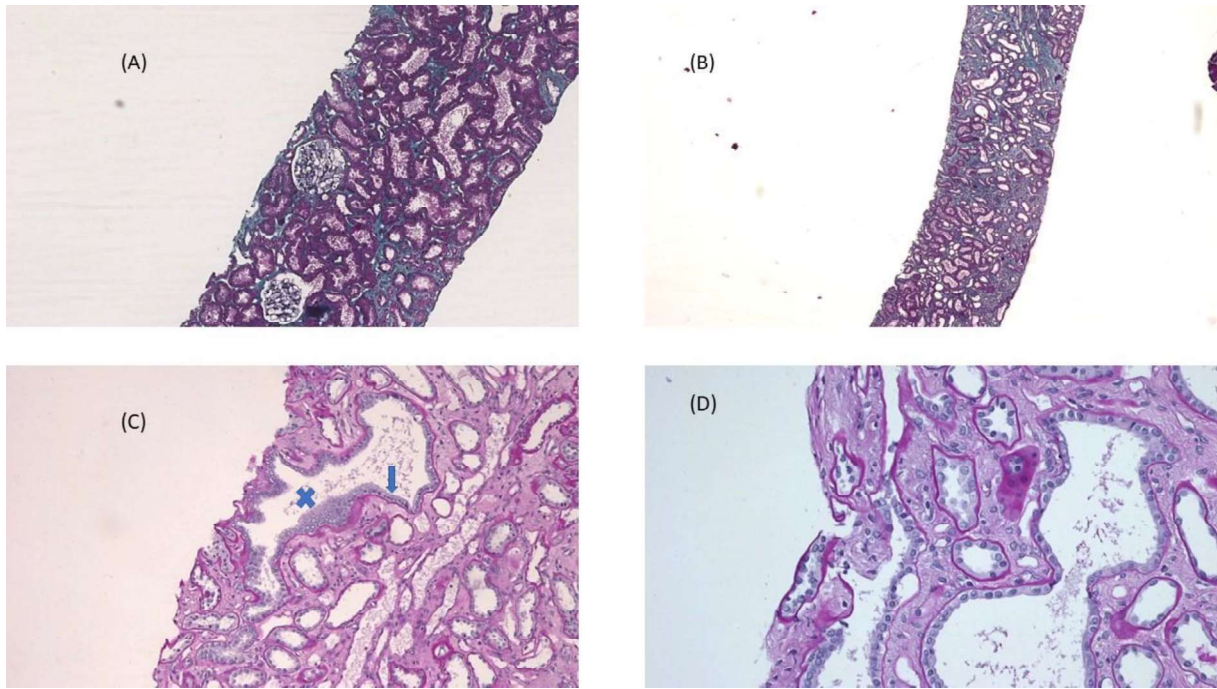


Figure 21 : biopsie rénale d'un patient ADTKD-MUC1, images fournies par le Dr GIBIER.

(A) Coloration du Trichrome de Masson. Absence de lésion sur les glomérules perméables. Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire.

(B) FIAT avec distensions tubulaires légères et focales.

(C) Coloration PAS. Tubule tortueux et irrégulier avec plus de 4 embranchements, un aspect pseudo-stratifié (marqué par X) et un cytoplasme bombant vers la lumière (marqué par une flèche).

(D) Coloration PAS. Autres tubules tortueux présentant une clarté péri-nucléaire.

Absence de dépôt significatif sur l'étude en immunofluorescence. Une étude ultrastructurale met en évidence des lésions des membranes basales tubulaires, sous la forme d'un épaissement irrégulier avec de manière très focale un aspect feuilleté.

Evolution de la maladie rénale chronique :

8 patients ont évolué vers une IRC terminale, caractérisée par une nécessité de dialyse ou une greffe rénale, à un âge médian de 37,5 ans (figure 22). 2 patients ont présenté une crise de goutte.

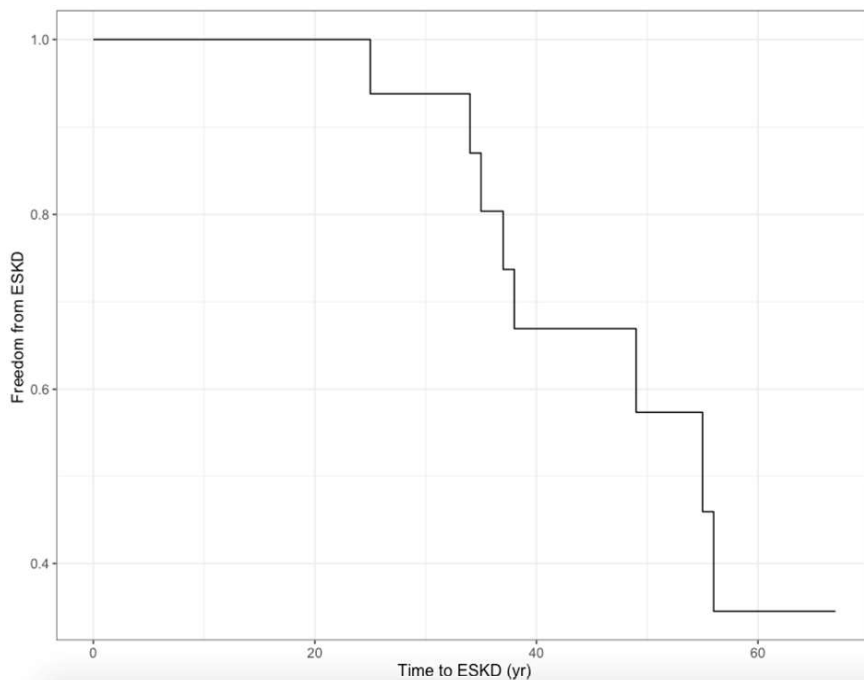


Figure 22 : courbe de survie rénale (courbe de Kaplan Meier), censurée chez les patients sans IRC terminale pendant le suivi.

Manifestations extra-rénales :

- Sur le plan pulmonaire : découverte d'une lymphangioléiomyomatose avec bilan étiologique négatif, d'un aspect de micronodules pulmonaires bilatéraux, une bronchopneumopathie chronique obstructive et un syndrome d'apnées obstructives du sommeil.

- Sur le plan digestif : une découverte fortuite d'une lésion caudale pancréatique et une découverte de calcification pancréatique bénigne. Un patient avec infection prouvée à *Helicobacter pylori*, 3 gastrites sans infection associée.
- Sur le plan infectieux : infections urinaires chez 2 patients, une hépatite C iatrogène post transfusion, une méningite dans l'enfance, un tableau d'angines à répétition.
- Sur le plan oncologique : un adéno-carcinome canalaire infiltrant bilatéral (contexte de mutation *BRCA1*), un adénocarcinome de prostate à 57 ans, un cancer pulmonaire à 53 ans.
- 26 grossesses, dont une avec HTA gravidique.
- Deux anomalies du tractus uro-génital : un bassinnet extra-sinusal sans syndrome de jonction et une néphropathie de reflux de l'enfance avec réimplantation urétéro-vésicale à l'âge de 1 an.

Cas familiaux identifiés : 36 apparentés au premier ou deuxième degré avec une insuffisance rénale chronique ont été identifiés. Les données pour 7 apparentés ont pu être recueillies, l'âge médian d'IRC terminale total est de 39 ans.

DISCUSSION :

Les variants responsables de la néphropathie *MUC1* sont difficiles à mettre en évidence devant l'absence de test génétique utilisable en pratique clinique et cette maladie est de ce fait probablement sous diagnostiquée. Les recommandations KDIGO sur les ADTKD proposent de tester en première intention *UMOD*, *REN* et *HNF1 β* puis seulement en cas de négativité, de se rapprocher d'un centre référent pour l'étude de *MUC1*(6). Nous décrivons pour la première fois une méthode simple, peu coûteuse, utilisable en pratique et rapide pour identifier l'ADTKD-*MUC1*.

Notre étude rapporte également pour la première fois le phénotype de 19 patients ADTKD-*MUC1* français. Nos données sont cohérentes avec la littérature. Nos patients consultent tôt, à un âge médian de 36 ans, contre une médiane de 47 ans sur l'étude de Olinger en 2020(20). L'évolution vers l'IRC terminale de 37,5 ans (moyenne à 41,1 ans), très proche des données de la cohorte américano-belgo-suisse à 36 ans d'Olinger mais plus précoce que l'âge médian de 51 ans sur une étude espagnole de 16 familles (75) et 45 ans sur 9 patients japonais(76). Ces différences peuvent être expliquées par la grande variabilité phénotypique inter et intra familiale. Tous nos patients présentaient un sédiment urinaire compatible avec l'atteinte tubulo-interstitielle, sans protéinurie significative avec dans certains cas une hématurie ou leucocyturie minime. On retrouve la présence de kystes rénaux chez 8 patients (42%), proche des 40% retrouvés dans l'étude princeps de 2014. Cependant si l'on exclut les IRC stade IV et V, il reste alors 33% des patients avec kystes. Ceux-ci n'ont rien de spécifiques et semblent être le plus souvent nombreux, petits et bilatéraux. Leur présence n'est donc pas indispensable, aucun kyste n'est retrouvé dans l'étude de 35 patients par Bleyer(64).

Dans la littérature, on retrouve en étude histologique une FIAT et la présence de dilatations microkystiques sur 45% des biopsies(75,76). Nous enrichissons cette description avec des lésions décrites récemment dans les néphronophytises(74). La présence d'embranchements tubulaires (dénommés « tubular floret profile », ou tubule en fleuron) et l'aspect « macula densa-like » (avec quelques cellules tubulaires au rapport nucléocytoplasmique élevé et un noyau bombé et riche en chromatine) semblent être partagés par les deux groupes nosologiques. Dans l'étude de Larsen, ces deux lésions étaient présentes dans 56% et 78% des biopsies étudiées et significativement plus fréquentes que sur les témoins. Nous n'avons pas retrouvé de dépôts interstitiels de Tamm-Horsfall, de duplication des membranes basales tubulaires et de fibrose périglomérulaire, sous réserve d'un faible nombre de biopsies disponibles pour une relecture. Cependant, avec l'accès facilité aux examens génétiques, la biopsie rénale n'est par exemple pas recommandée en première intention pour l'ADTKD-*UMOD*(18). En revanche, si le marquage spécifique de la protéine MUC1fs en immunohistochimie devenait disponible, il pourrait être une alternative au séquençage génétique(59).

Seulement 2 patients (10%) ont présenté une crise de goutte, à un stade d'IRC déjà avancé. C'est comparable aux 7% retrouvé dans l'étude espagnole, bien inférieur aux 24% de gouttes retrouvées en 2014, cependant 88% de ces épisodes sont survenus chez des patients avec un DFG < 50 mL/min/1,73m². C'est le critère majeur pour s'orienter vers un variant *MUC1* ou *UMOD* devant une ADTKD(20).

Malgré l'accumulation de la protéine tronquée MUC1fs dans tous les tissus qui l'expriment(59), il n'existe pas de manifestation extra rénale associée à la mutation *MUC1* dans la littérature. Nous nous sommes focalisés sur les possibles atteintes pulmonaire, digestive, oncologique et infectieuse. Au niveau pulmonaire, une

lymphangioliomyomatose sporadique a été décrite, sans contexte de sclérose tubéreuse de Bourneville(77). Il s'agit d'une maladie rare, avec une prévalence estimée entre 1/129 000 et 1/385 000, caractérisée par la présence diffuse de kystes pulmonaires typiques au scanner. Elle peut être associée à une sclérose tubéreuse de Bourneville, une biopsie pulmonaire montrant des kystes et des cellules immatures anormales musculaires lisses, des angiomyolipomes rénaux, un épanchement chyleux abdominal ou thoracique et un taux élevé de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire D (VEGF-D). Il n'y a actuellement pas de cas rapporté dans la littérature d'association de lymphangioliomyomatose et de mutation MUC1. Au niveau digestif, on ne retrouve pas de surrisque pour l'infection à *Helicobacter pylori* dans notre population avec uniquement un cas. Nous n'avons pas identifié de surrisque infectieux ou oncologique. Les grossesses des patientes de notre étude sont de bon pronostic avec une HTA gravidique sur 26 grossesses.

La pénétrance de cette mutation est complète : tous les patients porteurs du variant développeront des signes cliniques, avec une sévérité variable. Tous nos patients, excepté un, rapportaient un antécédent de maladie rénale au premier degré. Ainsi en l'absence de parent malade, la probabilité d'une ADTKD est faible, même si une mutation de novo est possible. La mutation la plus fréquente est l'insertion d'une cytosine dans le domaine VNTR retrouvée dans 94,7% des cas dans notre étude, très proche des données de la littérature qui trouvaient cette mutation dans 93,5% des cas(20). C'est la plus fréquente également en population japonaise(76). Nous avons découvert un nouveau variant (21insG) qui entraîne lui aussi un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré. Récemment, une insertion de 25 bases juste avant le VNTR a été découverte chez une famille néerlandaise avec le même phénotype que l'ADTKD-MUC1, amenant à un décalage du cadre de lecture d'une base, puis à la

production de la même protéine tronquée MUC1fs, prouvée par analyse en immunohistochimie de la biopsie rénale(78). Uniquement 2 familles ont bénéficié de consultation de génétique clinique. Il semble important de faire connaître les ADTKD et d'orienter les patients qui le souhaitent en consultation spécialisée, afin de dépister les apparentés mutés pour assurer leur néphroprotection et sélectionner les bons candidats pour la greffe avec don vivant.

L'ADTKD-*MUC1* est probablement sous-diagnostiquée car l'analyse du VNTR est difficile et requiert des tests génétiques spécifiques. Pourtant dans notre étude c'est la première cause identifiée face à une suspicion d'ADTKD. Sur les 61 résultats positifs, 31 sont des ADTKD : 61% de variant *MUC1*, 23% d'*UMOD*, 13% d'*HNF1β* et 3% de *REN*. Un biais potentiel est que la recherche d'*UMOD*, *REN* et *HNF1β* est réalisée en pratique courante dans de nombreuses régions, contrairement à la recherche de *MUC1*. Il est donc possible que certains centres nous adressent leur demande en deuxième intention, pour recherche spécifique de *MUC1* après avoir éliminé les autres mutations. Pour limiter cet effet, nous nous sommes intéressés uniquement aux demandes régionales qui sont majoritairement adressées au CHU de Lille en première intention. Ainsi sur 162 demandes, on retrouve 13 *MUC1* (soit 68% des ADTKD), puis 3 *UMOD* (soit 16% des ADTKD), 2 *HNF1β* (soit 11% des ADTKD) et un *REN* (soit 5% des ADTKD).

La prévalence de *MUC1* calculée dans notre étude sur la population du Nord Pas de Calais est de 3,2 par million d'habitants. Elle est similaire aux prévalences retrouvées dans la littérature de 0,7 à 4 cas par million d'habitants(10,11).

UMOD est considérée comme l'ADTKD la plus fréquente. La plus grande cohorte internationale d'ADTKD(20) rassemble 726 patients issus de 585 familles (429 familles américaines et 156 familles européennes). L'ADTKD la plus fréquente est la mutation

UMOD (303 patients, 216 familles) devant *MUC1* (93 familles, 104 individus). Pourtant comme notre travail, plusieurs publications placent *MUC1* en première cause d'ADTKD. En 2018 dans l'étude multicentrique d'une population espagnole de 56 familles (131 patients) avec une ADTKD(75), une mutation est retrouvée dans 25 familles (45%). La plus fréquente est l'insertion de cytosine dans le gène *MUC1* (16 familles, 90 individus) puis *UMOD* (9 familles soit 41 individus). En 2022 sur une population Japonaise(76) de 48 suspicions d'ADTKD, on observe 9 ADTKD-*MUC1*, puis 6 ADTKD-*UMOD*, une ADTKD-*REN* et une *NPHP1*.

Les autres gènes retrouvés face à une suspicion d'ADTKD sont : *PAX2*(n=3), *NPHP1* (n=1), *NPHP4* (n=1), *COL4A3* (n=1), *NRIP1* (n=1), *TTC21B* (n=1), *CLCN5* (n=1). Plusieurs de ces mutations sont évoquées comme diagnostics différentiels d'une ADTKD. Wopperer et al.(79) a séquencé l'exome de 16 familles avec ADTKD sans mutation retrouvée (dont *MUC1*). 9 variants sont retrouvés : *COL4A5* (n=4), *INF2* (n=2), et un cas pour *COL4A4*, *PAX2*, *SALL1* and *PKD2*. De plus, les néphronophthises (*NPHP1*, *NPHP4* et *TTC21B* identifiées) sont des diagnostics différentiels chez l'adulte jeune mais leur mode de transmission autosomique récessif, les signes extrarénaux et l'âge plus précoce des symptômes permettent de les différencier le plus souvent.

Notre étude possède plusieurs points forts. Tout d'abord nous décrivons une méthode diagnostique simple de la mutation *MUC1*, déjà mise en place en pratique quotidienne au CHU de Lille et qui permet en un seul panel NGS de tester les 5 mutations les plus fréquentes pour les ADTKD (*MUC1*, *UMOD*, *REN*, *HNF1 β* and *SEC61A1*), ainsi que de nombreuses néphropathies génétiques héréditaires. De plus, cette technique permet de détecter toute différence avec la séquence VNTR sauvage, faisant découvrir de nouveaux variants pathogènes. Ensuite, c'est la première étude qui décrit les patients ADTKD-*MUC1* français, avec des données en adéquations avec la

littérature, une description histologique inédite et l'exploration de potentiels signes extra-rénaux.

Ce travail possède plusieurs limites. C'est une étude rétrospective avec recueil des données dans les dossiers médicaux, impliquant des données manquantes, absentes des courriers consultés. Du fait d'un diagnostic génétique difficile et d'une mutation rare, il est probable que nous n'ayons pas inclus tous les patients atteints de la mutation *MUC1*. Nous avons également peu de données concernant les cas familiaux non testés pour la mutation. Pour finir, le faible nombre de patients inclus ne permet pas de conclure sur l'existence ou l'absence de manifestations extra-rénales rares.

Perspectives : Ce travail pourrait être poursuivi pour mettre en place un registre des patients ADTKD-*MUC1* du Nord Pas de Calais et de France et approfondir nos connaissances sur le phénotype rénal et extra-rénal. Si un traitement venait à apparaître, nos données permettraient d'évaluer son efficacité sur le déclin de la fonction rénale et l'évolution vers l'IRC terminale.

Conclusion : Nous décrivons pour la première fois une technique simple, peu coûteuse et utilisable en pratique clinique pour détecter les variants *MUC1* pathogènes via NGS. C'est la première cause d'ADTKD identifiée dans notre étude, avec une insuffisance rénale chronique précoce, une clinique et une histologie peu spécifiques et sans manifestation extra-rénale, donc probablement sous diagnostiquée. La prise en charge repose actuellement sur la néphroprotection et les techniques de suppléance, mais de nouvelles molécules prometteuses sont à l'étude.

REFERENCES :

1. Thorn GW, Smith CA, Graham JB. Renal failure simulating adrenocortical insufficiency. *New England Journal of Medicine*. 1945;
2. Smith CA, Graham JB. Congenital medullary cysts of the kidneys with severe refractory anemia. *American Journal of Diseases of Children*. 1945;
3. Fanconi G, Hanhart E, von ALBERTINI A, Uhlinger E, Dolivo G, Prader A. [Familial, juvenile nephronophthisis (idiopathic parenchymal contracted kidney)]. *Helv Paediatr Acta*. févr 1951;6(1):1-49.
4. Christodoulou K, Tsingis M, Stavrou C, Eleftheriou A, Papapavlou P, Patsalis PC, et al. Chromosome 1 localization of a gene for autosomal dominant medullary cystic kidney disease. *Hum Mol Genet*. mai 1998;7(5):905-11.
5. Kirby A, Gnirke A, Jaffe DB, Barešová V, Pochet N, Blumenstiel B, et al. Mutations causing medullary cystic kidney disease type 1 lie in a large VNTR in MUC1 missed by massively parallel sequencing. *Nat Genet*. mars 2013;45(3):299-303.
6. Eckardt KU, Alper SL, Antignac C, Bleyer AJ, Chauveau D, Dahan K, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: diagnosis, classification, and management—A KDIGO consensus report. *Kidney International*. 1 oct 2015;88(4):676-83.
7. Nasr SH, Lucia JP, Galgano SJ, Markowitz GS, D'Agati VD. Uromodulin storage disease. *Kidney International*. 2 avr 2008;73(8):971-6.
8. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, Petrovski S, Aggarwal VS, Milo-Rasouly H, et al. Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. *New England Journal of Medicine*. 10 janv 2019;380(2):142-51.
9. Gast C, Marinaki A, Arenas-Hernandez M, Campbell S, Seaby EG, Pengelly RJ, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease-UMOD is the most frequent non polycystic genetic kidney disease. *BMC Nephrol*. 30 oct 2018;19(1):301.
10. Devuyst O, Olinger E, Weber S, Eckardt KU, Knoch S, Rampoldi L, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 5 sept 2019;5(1):60.
11. Cormican S, Connaughton DM, Kennedy C, Murray S, Živná M, Knoch S, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease (ADTKD) in Ireland. *Ren Fail*. nov 2019;41(1):832-41.
12. Tamm I, Horsfall FL. Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc Soc Exp Biol Med*. mai 1950;74(1):106-8.

13. Uromodulin: A Unique 85-Kilodalton Immunosuppressive Glycoprotein Isolated from Urine of Pregnant Women | Science [Internet]. [cité 7 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2409603>
14. Pennica D, Kohr WJ, Kuang WJ, Glaister D, Aggarwal BB, Chen EY, et al. Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. *Science*. 3 avr 1987;236(4797):83-8.
15. Devuyst O, Olinger E, Rampoldi L. Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat Rev Nephrol*. sept 2017;13(9):525-44.
16. Olinger E, Schaeffer C, Kidd K, Elhassan EAE, Cheng Y, Dufour I, et al. An intermediate-effect size variant in UMOD confers risk for chronic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 août 2022;119(33):e2114734119.
17. Moskowitz JL, Piret SE, Lhotta K, Kitzler TM, Tashman AP, Velez E, et al. Association between genotype and phenotype in uromodulin-associated kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. août 2013;8(8):1349-57.
18. Bleyer AJ, Wolf MT, Kidd KO, Zivna M, Kmoch S. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: more than just HNF1 β . *Pediatr Nephrol*. mai 2022;37(5):933-46.
19. Bollée G, Dahan K, Flamant M, Morinière V, Pawtowski A, Heidet L, et al. Phenotype and outcome in hereditary tubulointerstitial nephritis secondary to UMOD mutations. *Clin J Am Soc Nephrol*. oct 2011;6(10):2429-38.
20. Olinger E, Hofmann P, Kidd K, Dufour I, Belge H, Schaeffer C, et al. Clinical and genetic spectra of autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease due to mutations in UMOD and MUC1. *Kidney Int*. 2020;98(3):717-31.
21. Onoe T, Hara S, Yamada K, Zoshima T, Mizushima I, Ito K, et al. Significance of kidney biopsy in autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease-UMOD: is kidney biopsy truly nonspecific? *BMC Nephrology*. 4 janv 2021;22(1):1.
22. Ekici AB, Hackenbeck T, Morinière V, Pannes A, Buettner M, Uebe S, et al. Renal fibrosis is the common feature of autosomal dominant tubulointerstitial kidney diseases caused by mutations in mucin 1 or uromodulin. *Kidney Int*. sept 2014;86(3):589-99.
23. Cormican S, Kennedy C, Connaughton DM, O'Kelly P, Murray S, Živná M, et al. Renal transplant outcomes in patients with autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease. *Clin Transplant*. févr 2020;34(2):e13783.
24. Živná M, Hůlková H, Matignon M, Hodaňová K, Vyleťal P, Kalbáčová M, et al. Dominant Renin Gene Mutations Associated with Early-Onset Hyperuricemia, Anemia, and Chronic Kidney Failure. *Am J Hum Genet*. 14 août 2009;85(2):204-13.
25. Živná M, Kidd K, Zaidan M, Vyleťal P, Barešová V, Hodaňová K, et al. An international cohort study of autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease

due to REN mutations identifies distinct clinical subtypes. *Kidney Int.* déc 2020;98(6):1589-604.

26. Bleyer AJ, Zivná M, Hulková H, Hodanová K, Vyletal P, Sikora J, et al. Clinical and molecular characterization of a family with a dominant renin gene mutation and response to treatment with fludrocortisone. *Clin Nephrol.* déc 2010;74(6):411-22.
27. Ferrè S, Igarashi P. New insights into the role of HNF-1 β in kidney (patho)physiology. *Pediatr Nephrol.* 1 août 2019;34(8):1325-35.
28. Bockenhauer D, Jaureguiberry G. HNF1B-associated clinical phenotypes: the kidney and beyond. *Pediatr Nephrol.* 1 mai 2016;31(5):707-14.
29. Verhave JC, Bech AP, Wetzels JFM, Nijenhuis T. Hepatocyte Nuclear Factor 1 β -Associated Kidney Disease: More than Renal Cysts and Diabetes. *J Am Soc Nephrol.* févr 2016;27(2):345-53.
30. Heidet L, Decramer S, Pawtowski A, Morinière V, Bandin F, Knebelmann B, et al. Spectrum of HNF1B Mutations in a Large Cohort of Patients Who Harbor Renal Diseases. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* juin 2010;5(6):1079.
31. Ferrè S, Bongers EMHF, Sonneveld R, Cornelissen EAM, van der Vlag J, van Boekel GAJ, et al. Early development of hyperparathyroidism due to loss of PTH transcriptional repression in patients with HNF1 β mutations? *J Clin Endocrinol Metab.* oct 2013;98(10):4089-96.
32. Bolar NA, Golzio C, Živná M, Hayot G, Van Hemelrijk C, Schepers D, et al. Heterozygous Loss-of-Function SEC61A1 Mutations Cause Autosomal-Dominant Tubulo-Interstitial and Glomerulocystic Kidney Disease with Anemia. *Am J Hum Genet.* 7 juill 2016;99(1):174-87.
33. Cornec-Le Gall E, Olson RJ, Besse W, Heyer CM, Gainullin VG, Smith JM, et al. Monoallelic Mutations to DNAJB11 Cause Atypical Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *Am J Hum Genet.* 3 mai 2018;102(5):832-44.
34. Leroy X, Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Aubert JP, Gosselin B, et al. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology.* mai 2002;40(5):450-7.
35. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer.* déc 2009;9(12):874-85.
36. Swallow DM, Gendler S, Griffiths B, Kearney A, Povey S, Sheer D, et al. The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumour associated epithelial mucins, is located on chromosome 1, within the region 1q21-24. *Ann Hum Genet.* oct 1987;51(4):289-94.
37. Ligtenberg MJ, Kruijshaar L, Buijs F, van Meijer M, Litvinov SV, Hilkens J. Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J Biol Chem.* 25 mars 1992;267(9):6171-7.

38. Chen W, Zhang Z, Zhang S, Zhu P, Ko JKS, Yung KKL. MUC1: Structure, Function, and Clinic Application in Epithelial Cancers. *Int J Mol Sci.* 18 juin 2021;22(12):6567.
39. McAuley JL, Linden SK, Png CW, King RM, Pennington HL, Gendler SJ, et al. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J Clin Invest.* 1 août 2007;117(8):2313-24.
40. Enteroaggregative Escherichia coli Adherence Fimbriae Drive Inflammatory Cell Recruitment via Interactions with Epithelial MUC1 | *mBio* [Internet]. [cité 29 janv 2023]. Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00717-17>
41. Vinall LE, King M, Novelli M, Green CA, Daniels G, Hilkens J, et al. Altered expression and allelic association of the hypervariable membrane mucin MUC1 in Helicobacter pylori gastritis. *Gastroenterology.* 1 juill 2002;123(1):41-9.
42. Lindén SK, Sheng YH, Every AL, Miles KM, Skoog EC, Florin THJ, et al. MUC1 Limits Helicobacter pylori Infection both by Steric Hindrance and by Acting as a Releasable Decoy. *PLOS Pathogens.* 9 oct 2009;5(10):e1000617.
43. Lillehoj EP, Kim BT, Kim KC. Identification of Pseudomonas aeruginosa flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* avr 2002;282(4):L751-6.
44. Full article: Mucin 1 protects against severe Streptococcus pneumoniae infection [Internet]. [cité 29 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2017.1341021>
45. McAuley JL, Corcilius L, Tan HX, Payne RJ, McGuckin MA, Brown LE. The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunol.* nov 2017;10(6):1581-93.
46. Kato K, Lillehoj EP, Lu W, Kim KC. MUC1: The First Respiratory Mucin with an Anti-Inflammatory Function. *J Clin Med.* 29 nov 2017;6(12):110.
47. Gibier JB. Rôle de la mucine MUC1 en pathologie rénale non tumorale [Internet] [These de doctorat]. Université de Lille (2018-2021); 2021 [cité 21 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2021LILUS002>
48. Gibier JB, Hémon B, Fanchon M, Gaudelot K, Pottier N, Ringot B, et al. Dual role of MUC1 mucin in kidney ischemia-reperfusion injury: Nephroprotector in early phase, but pro-fibrotic in late phase. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(6):1336-49.
49. Gibier JB, Swierczewski T, Csanyi M, Hemon B, Glowacki F, Maboudou P, et al. MUC1 Mitigates Renal Injury and Inflammation in Endotoxin-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting the TLR4-MD2 Axis and Reducing Pro-inflammatory Macrophages Infiltration. *Shock.* 1 oct 2021;56(4):629-38.
50. Tao Y, Han J, Liu W, An L, Hu W, Wang N, et al. MUC1 Promotes Mesangial Cell Proliferation and Kidney Fibrosis in Diabetic Nephropathy Through Activating STAT and β -Catenin Signal Pathway. *DNA Cell Biol.* oct 2021;40(10):1308-16.

51. Nie M, Bal MS, Yang Z, Liu J, Rivera C, Wenzel A, et al. Mucin-1 Increases Renal TRPV5 Activity In Vitro, and Urinary Level Associates with Calcium Nephrolithiasis in Patients. *J Am Soc Nephrol.* nov 2016;27(11):3447-58.
52. Al-Bataineh MM, Kinlough CL, Marciszyn A, Lam T, Ye L, Kidd K, et al. Influence of glycoprotein MUC1 on trafficking of the Ca²⁺-selective ion channels, TRPV5 and TRPV6, and on in vivo calcium homeostasis. *J Biol Chem.* mars 2023;299(3):102925.
53. Yin Y, Yang C, Xu J, Luo Y, Xia Q, He K. MUC1 promotes lung metastases of liver cancer by impairing anti-tumor immunity. *Discov Oncol.* 4 févr 2023;14(1):18.
54. Kalra AV, Campbell RB. Mucin impedes cytotoxic effect of 5-FU against growth of human pancreatic cancer cells: overcoming cellular barriers for therapeutic gain. *Br J Cancer.* 8 oct 2007;97(7):910-8.
55. Li Z, Yang D, Guo T, Lin M. Advances in MUC1-Mediated Breast Cancer Immunotherapy. *Biomolecules.* juill 2022;12(7):952.
56. Vylet'Al P, Kidd K, Ainsworth HC, Springer D, Vrbacká A, Přistoupilová A, et al. Plasma Mucin-1 (CA15-3) Levels in Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease due to MUC1 Mutations. *Am J Nephrol.* 2021;52(5):378-87.
57. Systematic Review of Available CAR-T Cell Trials around the World - PubMed [Internet]. [cité 25 avr 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35681646/>
58. Yamamoto S, Kaimori JY, Yoshimura T, Namba T, Imai A, Kobayashi K, et al. Analysis of an ADTKD family with a novel frameshift mutation in MUC1 reveals characteristic features of mutant MUC1 protein. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(12):2010-7.
59. Zivna M, Kidd K, Pristoupilova P, Baresova V, DeFelice M, Bleyer AJ. Erratum: Noninvasive immunohistochemical diagnosis and novel MUC1 mutations causing autosomal dominant tubulo-interstitial kidney disease (*Journal of the American Society of Nephrology* (2018) 29 (2418-2431) DOI: 10.1681/ASN.2018020180). *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(4):892.
60. Blumenstiel B, DeFelice M, Birsoy O, Bleyer AJ, Kmoch S, Carter TA, et al. Development and Validation of a Mass Spectrometry-Based Assay for the Molecular Diagnosis of Mucin-1 Kidney Disease. *J Mol Diagn.* juill 2016;18(4):566-71.
61. Spicer AP, Rowse GJ, Lidner TK, Gendler SJ. Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *J Biol Chem.* 15 déc 1995;270(50):30093-101.
62. Dvela-Levitt M, Kost-Alimova M, Emani M, Kohnert E, Thompson R, Sidhom EH, et al. Small Molecule Targets TMED9 and Promotes Lysosomal Degradation to Reverse Proteinopathy. *Cell.* 25 juill 2019;178(3):521-535.e23.

63. Mabillard H, Sayer JA, Olinger E. Clinical and genetic spectra of autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 14 sept 2021;gfab268.
64. Bleyer AJ, Kmoch S, Antignac C, Robins V, Kidd K, Kelsoe JR, et al. Variable Clinical Presentation of an MUC1 Mutation Causing Medullary Cystic Kidney Disease Type 1. *CJASN*. 7 mars 2014;9(3):527-35.
65. Dvela-Levitt M, Shaw JL, Greka A. A Rare Kidney Disease To Cure Them All? Towards Mechanism-Based Therapies for Proteinopathies. *Trends Mol Med*. avr 2021;27(4):394-409.
66. Carney EF. Study of ADTKD-MUC1 identifies a new lead for the treatment of toxic proteinopathies. *Nat Rev Nephrol*. oct 2019;15(10):593.
67. Econimo L, Schaeffer C, Zeni L, Cortinovis R, Alberici F, Rampoldi L, et al. Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease: An Emerging Cause of Genetic CKD. *Kidney International Reports*. nov 2022;7(11):2332-44.
68. Grunewald O. Mise en place du diagnostic moléculaire des néphropathies héréditaires par séquençages à haut débit au CHU de Lille. [Lille]: Lille; 2019.
69. Samorodnitsky E, Jewell BM, Hagopian R, Miya J, Wing MR, Lyon E, et al. Evaluation of Hybridization Capture Versus Amplicon-Based Methods for Whole-Exome Sequencing. *Hum Mutat*. sept 2015;36(9):903-14.
70. e-cancer.fr. SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION D'UN PANEL DE GÈNES POUR L'ANALYSE EN GÉNÉTIQUE SOMATIQUE - Validation de la méthode. 2016.
71. NGS et application sur les neutropénies, par le Dr Christine Bellanné-Chantelot (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris) Lors de la 5ème Journée nationale maladies rares immuno-hématologiques MaRIH 2019 [Internet]. 2019 [cité 1 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.youtube.com/watch?v=HCAtjwSCdw0>
72. Wenzel A, Altmueller J, Ekici AB, Popp B, Stueber K, Thiele H, et al. Single molecule real time sequencing in ADTKD-MUC1 allows complete assembly of the VNTR and exact positioning of causative mutations. *Sci Rep*. 8 mars 2018;8(1):4170.
73. Stokman M, Lilien M, Knoers N. Nephronophthisis-Related Ciliopathies. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., éditeurs. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2016 [cité 1 juin 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368475/>
74. Larsen CP, Bonsib SM, Beggs ML, Wilson JD. Fluorescence in situ hybridization for the diagnosis of NPHP1 deletion-related nephronophthisis on renal biopsy. *Human Pathology*. 1 nov 2018;81:71-7.
75. Ayasreh N, Bullich G, Miquel R, Furlano M, Ruiz P, Lorente L, et al. Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease: Clinical Presentation of Patients With

ADTKD-UMOD and ADTKD-MUC1. American Journal of Kidney Diseases. 1 sept 2018;72(3):411-8.

76. Okada E, Morisada N, Horinouchi T, Fujii H, Tsuji T, Miura M, et al. Detecting MUC1 Variants in Patients Clinicopathologically Diagnosed With Having Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease. *Kidney Intl Rep.* 2022;7(4):857-66.
77. RESERVES IUTD. Orphanet: Lymphangioliomyomatose [Internet]. [cité 7 mai 2023]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=538
78. Haan A de, Eerde AM van, Eijgelsheim M, Rump P, Zwaag B van der, Hennekam E, et al. Novel MUC1 variant identified by massively parallel sequencing explains interstitial kidney disease in a large Dutch family. *Kidney International.* 1 mai 2023;103(5):986-9.
79. Wopperer FJ, Knaup KX, Stanzick KJ, Schneider K, Jobst-Schwan T, Ekici AB, et al. Diverse molecular causes of unsolved autosomal dominant tubulointerstitial kidney diseases. *Kidney International.* août 2022;102(2):405-20.
80. Agence de la biomédecine, Haute Autorité de Santé. Règles de bonnes pratiques en génétique constitutionnelle à des fins médicales.

ANNEXES

Annexe 1 : Consultation en génétique en pratique clinique :

Comme rappelé dans l'introduction des règles de bonnes pratiques en génétique constitutionnelle à des fins médicales rédigées par l'agence de Biomédecine et la Haute Autorité de Santé(80) : « Les caractéristiques de génétique constitutionnelle ont la particularité d'être définitives. Les résultats des tests génétiques ont des conséquences non seulement pour la personne testée mais souvent aussi pour sa famille. »

La prescription de l'examen :

Tout d'abord, la prescription d'examen génétique est encadrée légalement. On retrouve dans l'article 16-10 du code civil : « L'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ne peut être entrepris qu'à des fins médicales ou de recherche scientifique. Le consentement exprès de la personne doit être recueilli par écrit préalablement à la réalisation de l'examen, après qu'elle a été dûment informée de sa nature et de sa finalité. Le consentement mentionne la finalité de l'examen. Il est révocable sans forme et à tout moment ».

Qui peut prescrire ?

- « Un médecin généticien ;
- Un conseiller en génétique exerçant sous la responsabilité d'un médecin qualifié en génétique ;
- Un médecin non généticien connaissant la situation clinique (maladie, prise en charge thérapeutique) et les conséquences familiales et capable d'en

interpréter le résultat. Ce médecin doit travailler en relation avec une équipe de génétique clinique. »

A qui peut-on prescrire un test génétique ?

- A une personne malade, à visée diagnostique ou d'adaptation thérapeutique (pharmacogénétique).
- Chez une personne asymptomatique : l'examen doit être prescrit lors d'une consultation individuelle, par un médecin exerçant au sein d'une équipe pluridisciplinaire de prise en charge des patients asymptomatiques (article R 1131-5 du code de la santé publique).
- Plusieurs situations sont possibles :
 - Identification de porteur sain : pour identification d'une mutation à l'état hétérozygote pour les maladies récessives ou liées à l'X.
 - Examen pré-symptomatique et de prédispositions :
 - Le terme pré-symptomatique désigne un individu qui n'a pas de symptôme, mais qui a un risque proche de 100% d'en développer dans le futur si l'anomalie est confirmée.
 - « Un examen de prédisposition génétique à une maladie identifie un risque élevé de développer la maladie dans le futur sans que ce risque soit de 100%, car l'anomalie génétique à l'origine de la maladie est nécessaire mais pas suffisante pour développer la maladie. »
 - « La prescription d'un examen génétique susceptible d'annoncer la survenue d'une maladie grave chez un sujet asymptomatique, sans option de traitement ou de prévention ou avec des possibilités de traitement et prévention limitées doit être effectuée

dans le cadre d'une consultation individuelle par un médecin exerçant au sein d'une équipe pluridisciplinaire de prise en charge des patients asymptomatiques en raison des conséquences potentiellement délétères d'une information incomplète ou mal comprise. Cette équipe doit valider la bonne préparation de la personne à la réalisation du test. »

- Examen de susceptibilité : permet d'identifier des variants, de plus en plus nombreux, qui modifie faiblement le risque de développer la maladie. Cette contribution est le plus souvent faible, n'entre pas dans la prise en charge du patient, donc leur prescription est très limitée.

Dans chacun de ces cas, le prescripteur doit connaître la maladie et informer le patient lors d'une consultation individuelle, de la nature de l'examen, sa finalité et des conséquences potentielles des résultats pour lui et sa famille. Le patient est informé des spécificités de la maladie, les possibilités des traitements et de prévention.

Le patient donne alors son consentement éclairé, celui-ci doit préciser la nature du test, son indication ainsi que l'attitude en cas de résultats autres que ceux recherchés dans le cadre de la prescription initiale. Il est signé par la personne qui bénéficiera de l'examen, pour les mineurs par les titulaires de l'autorité parentale et pour les majeurs sous tutelle par le tuteur après avoir systématiquement recherché le consentement du patient.

Le patient doit être informé de la nécessité de prévenir sa famille en cas de positivité des résultats. Comme décrit dans l'article L. 1131-1- 2 du Code de la santé publique « préalablement à la réalisation d'un examen des caractéristiques génétiques d'une personne, le médecin prescripteur informe celle-ci des risques qu'un silence ferait courir aux membres de sa famille potentiellement concernés si une anomalie

génétiq ue grave dont les conséquences sont susceptibles de mesures de prévention, y compris de conseil génétique, ou de soins était diagnostiquée. Il prévoit avec elle, dans un document écrit qui peut, le cas échéant, être complété après le diagnostic, les modalités de l'information destinée aux membres de la famille potentiellement concernés afin d'en préparer l'éventuelle transmission ».

Communication du résultat :

« Le résultat d'un examen génétique ne doit pas être directement communiqué au patient par le laboratoire mais par le prescripteur. » Ainsi le praticien doit informer sur les conséquences pour l'individu, les conséquences pour sa famille et comment les informer. Si nécessaire, on peut l'orienter vers une consultation de conseil génétique complémentaire. Le patient peut délivrer cette information lui-même, seul ou avec l'aide du médecin.

Au contraire, comme stipulé dans l'article L. 1131-1-2 du Code de la santé publique : « si la personne ne souhaite pas informer elle-même les membres de sa famille potentiellement concernés, elle peut demander par un document écrit au médecin prescripteur, qui atteste de cette demande, de procéder à cette information. Elle lui communique à cette fin les coordonnées des intéressés dont elle dispose. Le médecin porte alors à leur connaissance l'existence d'une information médicale à caractère familial susceptible de les concerner et les invite à se rendre à une consultation de génétique, sans dévoiler ni le nom de la personne ayant fait l'objet de l'examen, ni l'anomalie génétique, ni les risques qui lui sont associés ».

Si le patient refuse de délivrer l'information à sa famille, le médecin doit respecter ce refus et respecter le secret médical, en l'informant à nouveau des risques que ce silence peut faire courir aux personnes potentiellement concernées.

Annexe 2 : répartition géographique des demandes de panel pour néphropathie héréditaire adressées au CHU de Lille.

Région	Nombre de demandes
Auvergne-Rhône-Alpes	6
Bretagne	1
Grand Est	10
HDF	163
Normandie	4
Nouvelle Aquitaine	27
Occitanie	4
Outre Mer	2
Pays de la Loire	8
Provence-Alpes-Côte- d'Azur	1
Savoie	2
Total général	228

Annexe 3 : Principales caractéristiques cliniques, biologiques et génétiques des patients ADTKD-*MUC1*.

Légende : DFG : Débit de filtration glomérulaire estimé par la formule CKD-EPI en mL/min/1,73m², TA : tension artérielle en mmHg, ProtU : protéinurie en g/g de créatininurie, HématU : hématurie en éléments/mm³, leucoU : leucocyturie en éléments/mm³, IRC t : insuffisance rénale terminale correspondant au début de

l'épuration extra-rénale ou la greffe, Variant c : insertion cytosine dans le VNTR, 21
insG : insertion guanine en position 21 dans le VNTR.

	Sexe	DFG initial	TA initiale	ProtU initiale	HématU initiale	LeucoU initiale	Goutte	Kystes	Age IRC t	Histoire familiale	Variant
1	F	20	130/70	0,06	-	-	-	-	49	+	C
2	F								34	+	C
3	F	57	114/70		-	-	-	-	38	+	C
4	F	48	140/70	0,06	-	-	-	+	-	+	C
5	F	42	135/85	0,18	-	-	-	+	-	+	C
6	F			0	-	-	-	-		+	C
7	F	35	120/70	0,04	-	-	-		-	+	C
8	F	47	120/70	0,04	-	-	-	-	-	+	C
9	M	90	150/100	0,03	-	+	-	-	-	+	C
10	F										C
11	M	52	155/80	0,3	-	-	-	+	-	+	C
12	M	58	150/75	0,09	-	-	-	-	-	+	C
13	F	6	120/70	0	-	-	-	+	35	+	C
14	F	45	130/90	0	+	+	-	+	56		C
15	M		130/80				-	+		+	C
16	M	33	190/100	0,24	-	-	+		25	+	C
17	M	44	120/70	0,11	-	+	-	-	55	+	C
18	F	46	130/80	0,21	+	+	-	+	37	+	C
19	M	22	125/85	0	-	-	+	+	-	-	21insG

AUTEUR : Nom : BOURRE

Prénom : Florentin

Date de soutenance : Mercredi 28 juin 2023

Titre de la thèse : Description du phénotype et du génotype de la maladie rénale chronique associée aux variants *MUC1*

Thèse - Médecine - Lille 2023

Cadre de classement Médecine

DES : Néphrologie

Mots-clés : Génétique - ADTKD - VNTR - *MUC1*

Résumé :

Contexte : Les variants *MUC1* sont responsables d'une néphropathie interstitielle autosomique dominante (ADTKD) et sont considérés comme une cause rare d'insuffisance rénale chronique. Ces variants pathogènes sont majoritairement représentés par une insertion de cytosine (insC) dans un domaine VNTR (Variable Number Tandem Repeat), dont l'analyse génétique est techniquement difficile. L'objectif de ce travail est de décrire les caractéristiques cliniques et histologiques des patients ADTKD-*MUC1* diagnostiqués par une nouvelle technique mise en place au CHU de Lille.

Méthode : Nous avons inclus les patients français ayant bénéficié d'un séquençage NGS à Lille pour néphropathies héréditaires du 1^{er} janvier 2018 au 28 février 2023. Un script bio-informatique a été développé permettant de compter les séquences sauvages et mutées du VNTR de *MUC1*. Les données cliniques, biologiques et histologiques des patients ADTKD-*MUC1* identifiés ont été recueillies de façon rétrospective.

Résultats : Sur les 61 résultats positifs, nous avons identifié 19 variants *MUC1* issus de 15 familles. 18 patients présentaient une insertion d'une cytosine dans le VNTR. L'âge médian d'insuffisance rénale terminale est de 37,5 ans [35 ; 50,5]. On retrouve une protéinurie moyenne de 0,09 g/g (+/- 0,06), la présence de kystes dans 53% des cas, une histoire familiale dans 94% des cas. L'histologie est peu spécifique, nous n'avons pas identifié de signe extra-rénal.

Conclusion : Nous décrivons pour la première fois une technique simple pour détecter les variants *MUC1* via NGS. C'est la première cause d'ADTKD dans notre étude, avec une insuffisance rénale chronique précoce, peu spécifique, probablement sous diagnostiquée. Cette nouvelle technique pourrait faciliter le diagnostic des néphropathies *MUC1*.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur François GLOWACKI

Asseseurs : Monsieur le Docteur Jean-Baptiste GIBIER, Monsieur le Docteur Olivier GRUNEWALD

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Victor FAGES