



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2023

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Caractéristiques cliniques, histologiques et génétiques d'une
cohorte de patients suivis pour un Syndrome d'Alport :
une étude rétrospective multicentrique**

Présentée et soutenue publiquement
le 26 octobre 2023 à 16h au Pôle Formation

Par Marie-Sophie PAGNIEZ

JURY

Président :

Monsieur le Professeur François GLOWACKI

Assesseurs :

Madame le Professeur Claire RIGOTHIER

Monsieur le Professeur Laurent MESNARD

Monsieur le Docteur Romain LARRUE

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.

TABLE DES MATIERES :

AVERTISSEMENTS	2
REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	10
TABLE DES ILLUSTRATIONS	14
RESUME	16

PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE : Le Syndrome d'Alport..18

Liste des abréviations	19
I. Le syndrome d'Alport : historique et épidémiologie	20
II. Physiopathologie du syndrome d'Alport	21
A. La membrane basale glomérulaire.....	21
B. Le collagène de type IV.....	22
C. Genèse des lésions glomérulaires.....	26
III. Génome humain et développement des méthodes de séquençage ...27	
A. Le génome humain	27
1) <i>Définition</i>	27
2) <i>Découverte de la molécule d'ADN et progrès de la médecine génomique</i>	27
3) <i>Unité fonctionnelle du génome : le gène</i>	28
B. Mutations génétiques.....	30
1) <i>Variants et polymorphisme</i>	30
2) <i>Types de mutations</i>	30
3) <i>Conséquences sur la protéine synthétisée</i>	31
C. Méthodes de séquençage du génome et interprétation des variants....	32
1) <i>Méthodes de séquençage</i>	32
2) <i>Interprétation des données de séquençage à haut débit</i>	34
3) <i>Classification de l'American College of Medical Genetics and Genomics et de l'Association for Molecular Pathology (ACMG-AMP)</i>	34

IV.	Transmission génétique du syndrome d'Alport	35
	A. Modèle de transmission lié à l'X.....	35
	B. Hérité mendélienne autosomique récessive.....	35
	C. Hérité mendélienne autosomique dominante.....	36
	D. Hérité digénique.....	37
V.	Phénotype clinique	37
	A. Néphropathie glomérulaire.....	37
	B. Surdité neurosensorielle.....	38
	C. Atteinte ophtalmologique.....	39
	D. Atteinte vasculaire.....	42
	E. La léiomyomatose diffuse.....	43
VI.	Phénotype histologique	44
	A. Microscopie optique.....	44
	B. Microscopie électronique.....	44
	C. Immunofluorescence.....	45
	D. Corrélation histologique avec le phénotype et la génétique.....	47
VII.	Corrélation entre le phénotype clinique et le génotype	48
	A. Transmission liée à l'X.....	48
	1) <i>Chez les hommes porteurs d'une mutation COL4A5</i>	48
	i) <i>Phénotype selon la nature du variant</i>	48
	ii) <i>Phénotype selon la localisation du variant</i>	50
	2) <i>Chez les femmes porteuses d'une mutation COL4A5</i>	52
	3) <i>Chez les digéniques non mendéliens COL4A5 / autre COL4A</i> ...54	
	B. Patients homozygotes ou hétérozygotes composites en <i>trans</i> pour COL4A3 ou pour COL4A4.....	55
	1) <i>Évolution vers l'insuffisance rénale chronique terminale</i>	55
	2) <i>Impact défavorable selon le type de variants</i>	55
	3) <i>Cas particulier de la transmission digénique de mutations de COL4A3 et de COL4A4</i>	56
	C. « ADAS», Néphropathie à « membrane basale fine », ou « Hématurie microscopique bénigne »?.....	56
	D. Syndrome d'Alport avec recherche génétique négative.....	60
VIII.	Association syndrome d'Alport et autres glomérulopathies	61
	A. Hyalinoses segmentaires et focales	61

B. Syndrome d'Alport et Néphropathies à IgA	63
1) Généralités.....	63
2) Association entre la néphropathie à IgA et le SA.....	63
3) Hypothèses physiopathologiques.....	64
IX. Néphropathies kystiques et Syndrome d'Alport.....	65
X. Traitements.....	67
A. Inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	67
B. Inhibiteurs de SGLT2.....	68
C. Thérapeutiques en cours d'essais.....	68
D. Recherche fondamentale.....	69
<u>PARTIE II : ORIGINAL ARTICLE</u> : Exon location of glycine substitutions impacts renal survival in Autosomal Dominant Alport Syndrome.....	71
ABSTRACT.....	72
ABBREVIATIONS LIST.....	73
INTRODUCTION.....	74
MATERIAL AND METHODS.....	76
a) Participants.....	76
b) Ethical statement.....	76
c) Clinical data.....	76
d) Genetic Testing.....	77
e) Statistical analysis.....	78
RESULTS.....	79
a) Study population.....	79
b) Kidney disease.....	79
c) Extra renal manifestations.....	79
d) Histologic features.....	80
e) Genetic Testing.....	80
f) Correlation between molecular features and renal survival.....	80
DISCUSSION.....	82
BIBLIOGRAPHY (version article).....	88
FIGURES & TABLES.....	92

SUPPLEMENTAL TABLES	102
----------------------------------	-----

<u>PARTIE III</u> : RESULTATS SUPPLEMENTAIRES : Description de la cohorte complète	104
---	-----

1) Caractéristiques génétiques	105
2) Diagnostics présumés.....	107
3) Caractéristiques cliniques.....	108
4) Caractéristiques histologiques	110
5) Survie rénale et déclin du DFGe dans toute la cohorte de SA.....	112
6) Facteurs prédictifs d'IRCT parmi les patients ADAS.....	115
7) Conclusion.....	116

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (<i>revue de la littérature</i>).....	117
--	-----

SERMENT D'HIPPOCRATE	130
-----------------------------------	-----

TABLE DES ILLUSTRATIONS :

PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE :

Figure 1 : Représentation schématique de la membrane basale glomérulaire.....	22
Figure 2 : Représentation schématique de <i>COL4A5</i> et du trimère de collagène IV correspondant.....	24
Figure 3 : Représentation schématique de la localisation génique, de l'organisation, de l'expression génique et de l'assemblage protéique des six différents isoformes des chaînes de collagène IV humain.....	25
Figure 4 : Représentation schématique de l'assemblage des protomères de Collagène IV.....	25
Figure 5 : Représentation schématique des sites régulateurs de l'épissage alternatif.....	30
Figure 6 : Anomalies cornéennes dans le Syndrome d'Alport.....	41
Figure 7 : Anomalies cristallinienne dans le Syndrome d'Alport.....	41
Figure 8 : Anomalies rétinienne dans le Syndrome d'Alport.....	42
Figure 9 : Anomalies de la membrane basale glomérulaire observées dans le Syndrome d'Alport en microscopie électronique.....	45
Figure 10 : Marquage en immunofluorescence des chaînes $\alpha 5$ du collagène IV glomérulaires dans le Syndrome d'Alport.....	46
Figure 11 : Marquage en immunofluorescence des chaînes $\alpha 5$ du collagène IV sur la membrane basale épidermique dans le Syndrome d'Alport.....	47

PARTIE II : ORIGINAL ARTICLE :

Figure 1 : Schematic view of <i>COL4A3</i> and the corresponding collagen IV trimer.....	92
Figure 2 : Type of disease-causing variants in <i>COL4A3/COL4A4</i> in patients with ADAS....	93
Figure 3A : Probability of reaching ESKD in patients with heterozygous disease-causing variants in <i>COL4A3</i> or <i>COL4A4</i>	94
Figure 3B : Probability of reaching ESKD in patients with ADAS comparing truncating <i>versus</i> nontruncating disease causing variants.....	95
Figure 4 : Probability of reaching ESKD in patients with missense glycine substitutions according to molecular location.....	96
Figure 5 : Exon location of glycine substitution impacts negatively renal survival in ADAS, possibly through an earlier trimerization impairment.....	97

Table 1 : Clinico-biologic characteristics of patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome (ADAS).....	98
Table 2 : Histological characteristics of patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome (ADAS).....	99
Table 3 : Outcomes in eGFR and age at ESKD according to molecular characteristics....	100
Table 4 : Cox proportional hazards model for renal survival in patients with <i>COL4A3/4</i> glycine missense variants.....	101
Supplemental Table S1 : Variant description for each patient with a substitution impacting glycine in collagen domains in ADAS.....	102

PARTIE III : RESULTATS SUPPLEMENTAIRES :

Figure 1 : Nature des mutations identifiées dans la cohorte complète de patients suivis pour un Syndrome d'Alport.....	106
Figure 2 : Diagnostics évoqués par le néphrologue avant les résultats du test génétiques et/ou les résultats de de la biopsie rénale.....	107
Figure 3 :End-stage kidney disease-free survival of different Alport syndrome types in the whole AS-cohort.....	113
Table 1 : Clinical characteristics of all AS-patients.....	109
Table 2 : Histological characteristics of all AS-patients.....	111
Table 3 : Outcome in eGFR and age at ESKD according to different AS types.....	114
Table 4 : Cox proportional hazards model for kidney survival in patients with ADAS.....	115

Résumé:

Contexte : Le syndrome d'Alport (SA) correspond à la seconde cause d'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) d'origine génétique. Si la corrélation génotype/phénotype est bien documentée pour les formes liées à l'X masculines (XLAS) ou autosomiques récessives (ARAS), aucun lien aussi clair n'a pu être à ce jour établi chez les patients porteurs d'un variant unique de *COL4A3* ou de *COL4A4*, ou SA autosomique dominant (ADAS).

Méthode : Etude de cohorte multicentrique, rétrospective, incluant les patients diagnostiqués SA sur la base de la présence d'au moins un variant pathogène (ACMG IV ou V) de *COL4A3*, *COL4A4* ou de *COL4A5*. Les données ont été recueillies à partir des dossiers médicaux et registres génétiques de chaque centre (CHU de Lille, Bordeaux et Paris-Tenon).

Résultats : 193 patients ont été inclus, dont 38 XLAS masculins, 36 XLAS féminins, 22 ARAS, et 97 ADAS. Le diagnostic était obtenu à l'aide d'un whole exome sequencing (n=60), un panel (n=95) ou un test de Sanger (n=18). Les mutations les plus fréquentes correspondaient à des substitutions impliquant la glycine (n=109, dont 61 ADAS). Comme attendu, l'âge de survenue de l'IRCT était significativement plus précoce chez les XLAS masculins (36.1 [29.6-NA] ans) et chez les ARAS (43.5 [25.7-NA] ans) que chez les XLAS féminins (57 [54.6-NA] ans) et les ADAS (62.8 [55.5-NA] ans) (p < 0.0001). Chez les ADAS, la localisation de la mutation dans les exons distaux (21 à C-ter) était significativement associée à un impact péjoratif sur la survie rénale (HR = 3.9 (1.2-13), p=0.02), à un âge de survenue plus précoce de survenue de l'IRCT (55.5 *versus* 69.5 ans, p=0.014), et enfin à un déclin annuel du DFGe plus prononcé (-2.3 ml/min/1.73m²/an *versus* -1.7 ml/min/1.73m²/an, p=0.04). Dans cette population, la présence d'une mutation sévère (non-sens, décalante, délétion étendue, atteinte

des sites d'épissages), n'impactait à l'inverse pas péjorativement la survie rénale ou le déclin du DFGe.

Conclusion : Notre étude confirme les données établies sur les XLAS et les ARAS, et apporte des données nouvelles concernant la corrélation génotype/phénotype des ADAS. Chez ces derniers, nous avons mis en évidence pour la première fois à notre connaissance qu'une substitution de la glycine impliquant les exons distaux impactait péjorativement la survie rénale, probablement par défaut de trimérisation.

PARTIE I: REVUE DE LA LITTERATURE :

Le Syndrome d'Alport

LISTE DES ABREVIATIONS :

- **ADAS** : Syndrome d'Alport autosomique dominant,
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **AG** : site accepteur de l'épissage,
- **ARA2** : antagoniste du récepteur de l'angiotensine II
- **ARAS** : Syndrome d'Alport autosomique récessif,
- **ARNm** : ARN (acide ribonucléique) messenger,
- **CB** : Capsule de Bowman,
- **DF** : diaphragme de fente,
- **ESE** : site promoteur de l'épissage exonique,
- **ESS** : site inhibiteur de l'épissage exonique,
- **GU** : Site donneur de l'épissage,
- **HMZ** : homozygote
- **HSF** : Hyalinose segmentaire et focale,
- **HTZ** : hétérozygote
- **IEC** : inhibiteur de l'enzyme de conversion
- **IF** : immunofluorescence,
- **IgAN** : néphropathie à IgA,
- **IRCT** : insuffisance rénale chronique terminale,
- **ISE** : site promoteur de l'épissage intronique
- **ISS** : site inhibiteur de l'épissage intronique,
- **LD** : Léiomyomatose diffuse,
- **LGM** : néphropathie à lésions glomérulaires et minimes,
- **MBE** : membrane basale épidermique
- **MBG** : membrane basale glomérulaire,
- **MBT** : membrane basale tubulaire,
- **ME** : microscopie électronique,
- **miARN** : micro-ARN interférents,
- **MO** : microscopie optique,
- **NC** : domaine non collagénique du collagène IV
- **NC1** : domaine non collagénique à l'extrémité C-terminale du collagène IV
- **NGS** : Next-Generation Sequencing ou séquençage à haut débit,
- **PCR** : Réaction de polymérisation en chaîne,
- **SA** : Syndrome d'Alport,
- **SRA** : Système rénine-angiotensine
- **TBMN** : Néphropathie à « membrane basale mince »,
- **WES** : Whole Exome Sequencing,
- **WGS** : Whole Genome Sequencing,
- **XLAS** : Syndrome d'Alport lié à l'X.

I. Le syndrome d'Alport : historique et épidémiologie

En 1927, le Docteur Arthur Cecil Alport décrit pour la première fois la présence d'une néphropathie au sein d'une famille britannique, responsable d'une hématurie microscopique – parfois macroscopique - et d'une protéinurie, associée à une surdité, affectant plus précocement et plus sévèrement les hommes (1). A titre posthume, la communauté scientifique retiendra à partir de 1961 le nom de Syndrome d'Alport (SA) pour caractériser cette entité. A partir de 1970, on identifie le collagène de type IV comme étant au cœur de la physiopathologie du syndrome d'Alport, grâce aux séquençages de trois grands gènes, *COL4A5*, formé de 53 exons et situé sur le chromosome X (2), *COL4A3* (52 exons) et *COL4A4* (48 exons), ces deux derniers étant quant à eux situés sur le chromosome 2 (3). Historiquement, le SA était décrit comme secondaire à une mutation de *COL4A5* avec transmission liée à l'X dans 80% des cas, les 20% restant étant de transmission autosomique en lien avec des mutations de *COL4A3* ou de *COL4A4* (15% autosomique récessive et 5% autosomique dominant) (4). En 2018, un groupe d'expert comprenant des Néphrologues et des Généticiens, a proposé une classification reposant sur le résultat du séquençage génétique (5). Par cette classification inclusive, toute personne porteuse d'un variant pathogène de *COL4A3*, *COL4A4* ou de *COL4A5*, est à présent considérée comme présentant un SA. Cette définition inclut donc également les femmes porteuse d'un variant sur *COL4A5*, les patients porteurs d'un variant pathogène unique sur un des gènes *COL4A3* ou *COL4A4* (considéré antérieurement comme ayant une néphropathie à membrane basale fine (Thin Basal Membrane Nephropathy (TBMN) ou hématurie familiale bénigne), ainsi que certaines formes de hyalinose segmentaire et focale (HSF) génétiques associées à une mutation sur une chaîne du collagène IV (6). Ainsi, sur la base de cette classification, la prévalence

réelle du syndrome d'Alport pourrait être très probablement sous-estimée, et serait vraisemblablement très différente de celle rapportée dans les descriptions historiques (7). Elle est estimée à 1/5 000 dans la population américaine (avec une incidence de 1/50 000 naissances)(8), à 1/17 000 en Suède (9) et à 1/53 000 en Finlande (10). Il s'agit de la deuxième cause de néphropathie héréditaire, après la polykystose rénale autosomique dominante (11). Le SA représentait 0.5% des causes d'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) de l'adulte dans une étude de cohorte de patients australiens et Néo-Zélandais comprenant 58 442 patients (12), 0.2% des adultes aux États-Unis et 0.6% des adultes en Europe (7). Chez l'enfant, la part du SA dans l'IRCT est plus importante, estimée à entre 2.2% et 12% dans les populations pédiatriques Américaines et Japonaises, respectivement (13).

II. Physiopathologie du syndrome d'Alport

A. La membrane basale glomérulaire

Le SA correspond ainsi à une maladie génétique, conduisant à la synthèse d'un collagène IV défectueux, nuisant à l'intégrité de la membrane basale glomérulaire (MBG). La barrière de filtration glomérulaire est formée de trois couches : la MBG est ainsi tapissée sur son versant interne par des cellules endothéliales fenêtrées, et est au contact sur son versant externe avec les processus interdigités des pieds des podocytes formant le diaphragme de fente (DF). La MBG, couche de 300 à 350 nm d'épaisseur, est composée de quatre principales macromolécules de la matrice extracellulaire : le collagène de type IV, la laminine, le nidogène et enfin certains glycosaminoglycanes, comme les héparanes sulfates (14). Ces macromolécules forment un maillage entrelacé en forme de ruban, autorisant ou non le passage des molécules plasmatiques vers l'urine primitive, avec une sélectivité de taille et de

charge (15). Le collagène de type IV, isolé pour la première fois en 1973 (16), représente environ 50% de la masse protéique totale de la MBG (**Figure 1**).

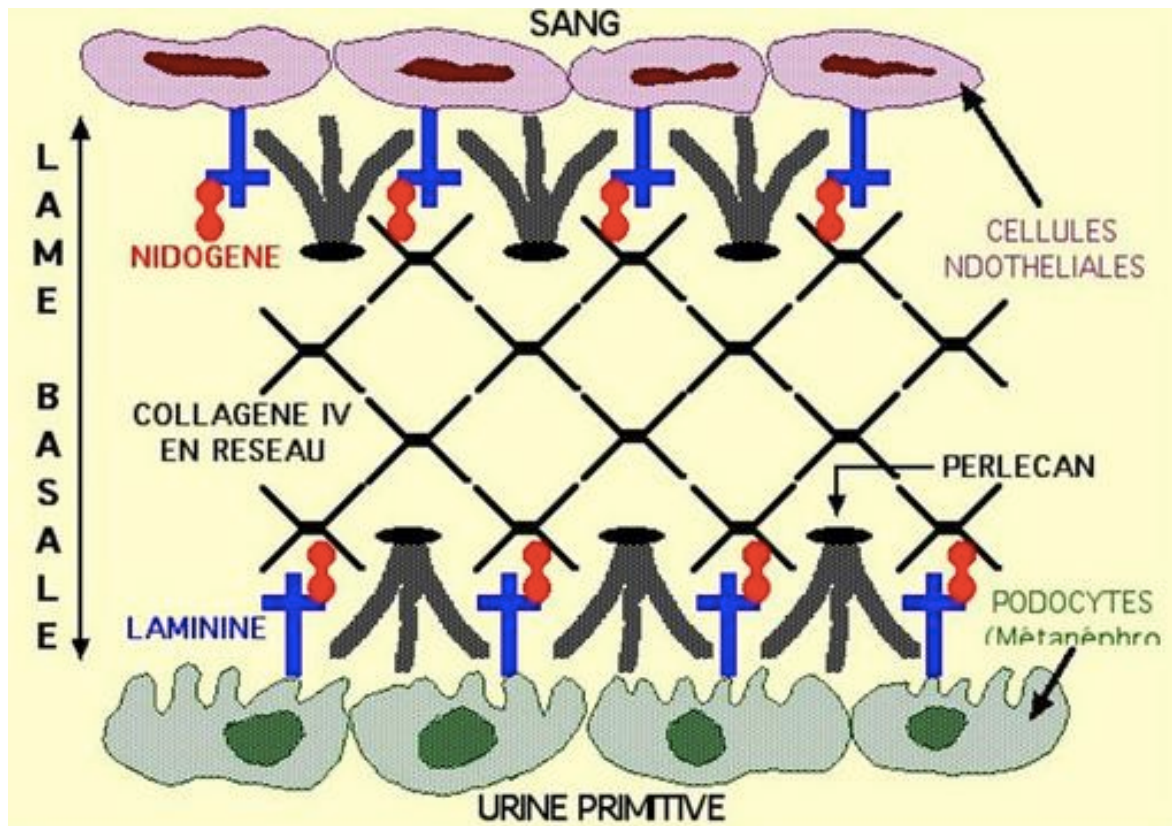


Figure 1. Représentation schématique de la membrane basale glomérulaire, selon Lagrange *et al.* (17).

B. Le collagène de type IV

Le collagène est une protéine structurale, présente dans la matrice extracellulaire de tous les tissus (os, cartilages, vaisseaux...) ayant une fonction de résistance à l'étirement, d'échafaudage, de morpho-régulation ou enfin d'adhésion cellulaire (18).

Il est formé de trois chaînes polypeptidiques enroulées entre-elles en hélices, homo ou hétérotrimériques. Il existe 28 formes différentes de collagène chez les vertébrés.

Le collagène de type IV est la principale protéine des membranes basales. Au niveau des glomérules rénaux, elle participe de manière capitale à la filtration glomérulaire.

Le collagène de type IV est formé d'une combinaison de 3 chaînes alpha parmi les 6

chaînes existantes ($\alpha 1$ à $\alpha 6$), respectivement codées par les gènes *COL4A1* à *COL4A6*. La composition de chaque chaîne correspond à une séquence collagénique intermédiaire composée d'une séquence d'acides aminés, Gly-Xaa-Yaa, où Xaa et Yaa correspondent souvent à des prolines ou à des 4-hydroxyprolines. La glycine étant le plus petit des acides aminés, elle est essentielle à la flexibilité de l'hélice, et sa position interne permet notamment le compactage serré des chaînes entre-elles (19). Cette chaîne est interrompue par 21 à 26 courtes interruptions non collagéniques (NC), essentielles à la flexibilité de la molécule, et servant pour certains domaines comme site de liaison cellulaire et de réticulations entre les chaînes (20). Chaque chaîne mature présente deux extrémité : une partie 7S à l'extrémité N-terminale et un domaine non collagénique (NC1) à l'extrémité C-terminale (21). La partie 7S N-terminale est riche en cystéine et en lysine, permettant notamment les liaisons inter-chaînes à l'aide de ponts disulfures (22) (**Figure 2**). De manière importante, l'assemblage des trimères entre eux commence par la reconnaissance des motifs NC1 des différentes chaînes, et s'étend ensuite comme « une fermeture-éclair » dans le sens NC1 vers 7S (extrémité 3' vers 5' sur le gène correspondant). Ceci pourrait avoir un impact fonctionnel important, les mutations correspondant aux exons « terminaux » (plus proches de NC1) étant de fait à même de pouvoir conduire à des phénotypes potentiellement plus sévères par défaut de trimérisation (*Cf partie VII)A)1)ii*).

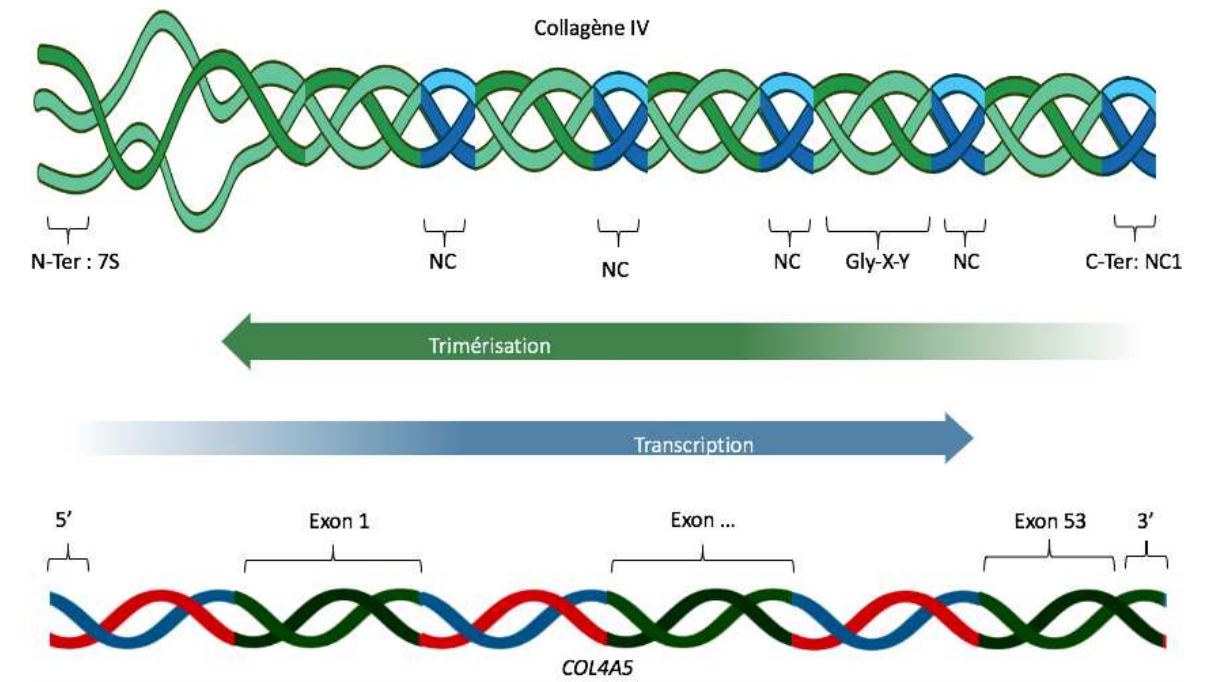


Figure 2. Représentation schématique de COL4A5 et du trimère de collagène IV correspondant (schéma personnel).

Le Collagène IV (en haut) est un hétérotrimère formé par l'assemblage de trois chaînes de collagène possédant chacune une séquence collagénique intermédiaire faite de répétition de triplets Gly-Xaa-Yaa, interrompus par des domaines non collagénique (NC), avec une partie 7S à l'extrémité N-terminale et un domaine NC1 à l'extrémité C-terminale. La transcription du gène COL4A5 (en bas) se fait dans le sens 5' vers 3', tandis que la trimérisation des chaînes se fait comme une « fermeture à éclair » dans le sens contraire, du domaine NC1 vers l'extrémité 7S (3' vers 5').

Parmi les 56 potentiels hétérotrimères statistiquement possibles, seules trois combinaisons sont retrouvées chez l'Homme : $\alpha1\alpha1\alpha2$, $\alpha3\alpha4\alpha5$ et $\alpha5\alpha5\alpha6$, prédéterminées par des interactions entre les domaines NC1 de chaque chaîne (23) (**Figure 3**). Les extrémités 7S et NC1 établissent ensuite les liaisons avec les autres glycoprotéines de la lame basale (23) (**Figure 4**).

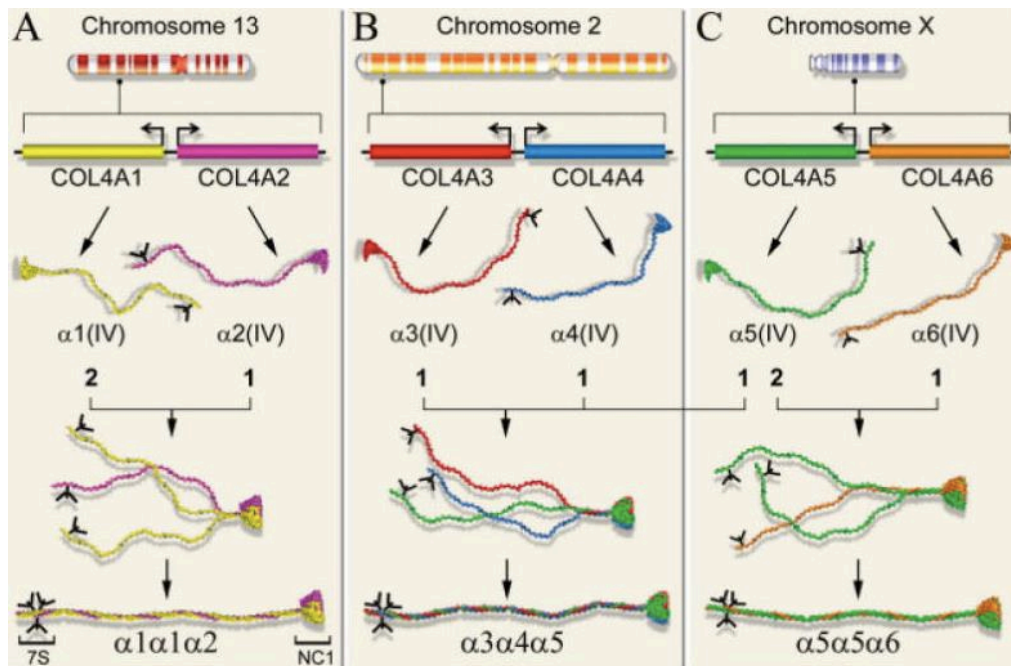


Figure 3. Représentation schématique de la localisation génique, de l'organisation, de l'expression génique et de l'assemblage protéique des six différents isoformes des chaînes de collagène IV humain, selon Khoshnoodi J *et al.* (24)

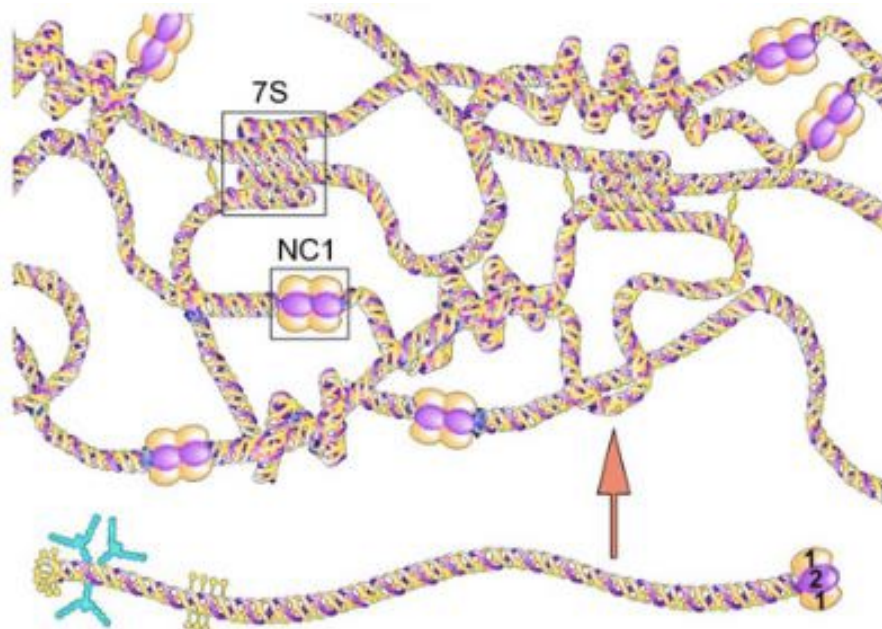


Figure 4. Représentation schématique de l'assemblage des protomères de Collagène IV, selon Cosgrove D *et al.* (23).

L'assemblage dans la superstructure de la membrane basale se fait *via* les interactions des domaines NC1 et 7S. Les réticulations disulfure inter-chaînes fournissent une stabilité supplémentaire au réseau.

Dans le glomérule mature, la MBG est essentiellement composée de l'hétérotrimère $\alpha3\alpha4\alpha5$, fortement réticulé, synthétisé par les podocytes. L'hétérotrimère $\alpha3\alpha4\alpha5$ du collagène de type IV est également présent dans les membranes basales des tubules distaux, la cornée (membranes de Descemet et de Bowman), la capsule cristallinienne, la rétine (membrane limitante interne et membrane de Bruch), et enfin la cochlée (25). Le réseau $\alpha1\alpha1\alpha2$ est quant à lui surtout présent dans les membranes vasculaires, mais se trouve également dans la plupart des membranes basales de l'organisme. Les trimères $\alpha5\alpha5\alpha6$ sont enfin présents dans les capsules de Bowman, les membranes basales tubulaires distales ainsi que dans les membranes basales épidermiques (26).

C. Genèse des lésions glomérulaires

Le SA est une maladie génétique, affectant la synthèse, l'assemblage, le dépôt ou la fonction de l'hétérotrimère $\alpha3\alpha4\alpha5$ du collagène de type IV (6). L'absence ou le défaut de structure d'une des trois chaînes ($\alpha3$, $\alpha4$ ou $\alpha5$), entraîne une augmentation compensatoire des hétérotrimères $\alpha1\alpha1\alpha2$ et de la synthèse de molécules de laminines (25). Le réseau $\alpha1\alpha1\alpha2$, prédominant dans la vie *in utero*, est beaucoup plus fragile du fait d'un nombre réduit de réticulations inter-chaînes disulfures, et est donc plus sensible aux contraintes biomécaniques. Avec le temps, on observera une séparation et un épaissement des MBG, à l'origine initialement d'une hématurie microscopique, puis d'une protéinurie faite de protéines de haut poids moléculaires. En microscopie électronique (ME), la MBG prend une forme en tissage de panier (27). Dans un second temps, ces anomalies seront responsables du développement d'une insuffisance rénale chronique, d'expression et d'évolutivité variable. Les récentes avancées des années 2000 dans le domaine de la médecine génomique ont permis

de mieux comprendre le Syndrome d'Alport, et d'appréhender notamment les tenants et les aboutissants de cette diversité d'expression.

III. Génome humain et développement des méthodes de séquençage

A. Le génome humain

1) Définition

Le génome correspond à l'ensemble des molécules d'ADN, soit environ 3.1 milliards de paires de bases, responsables de l'ensemble des caractéristiques physiques d'un individu. Chaque brin d'ADN, enroulé en collier de perle autour des histones, est inclus dans une chromatide reliée à son homologue par un centromère, l'ensemble formant ainsi les chromosomes. Les 23 paires de chromosomes humains sont présents dans le noyau de chacune de nos cellules nucléées (28).

2) Découverte de la molécule d'ADN et progrès de la médecine génomique

En 1953, Crick et Watson décrivent pour la première fois la structure de la molécule d'ADN, support de l'information génétique. Il s'agit d'une macromolécule composée d'un enchainement d'acides désoxyribonucléiques (correspondant à l'association d'une base purique (adénine, guanine) ou pyrimidique (cytosine, thymine) à un désoxyribose et à un groupement phosphate), assemblés généralement sous la forme d'une double-hélice. Cette découverte leur vaudra le prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1962 (29). Quelques années plus tard, en 1977, Sanger et Gilbert, développeront la première méthode de séquençage de l'ADN à l'aide d'une technique enzymatique qui leur permettra également d'obtenir un Prix Nobel en 1980 (30). Fin 1988, est lancé le Projet Génome Humain (*Human Genome Project*), collaboration internationale visant à déterminer l'ensemble des bases de l'ADN du génome humain (31). Ce projet se base sur la méthode de Sanger, et permet en 2001 de publier la première séquence brute de référence, la France ayant notamment effectué le

génotypage complet du chromosome 13 (32). Au cours des cinquante dernières années, l'évolution de la médecine génomique a été exponentielle. En 2005, le génome de James Watson, codécouvreur de la double hélice d'ADN, a été séquencé en 2 mois pour 2 millions de dollars. En 2013, il fallait compter 3 à 5000 dollars pour séquencer un génome complet en 15 jours environ. En 2017, ce délai était réduit à une semaine, pour un coût divisé par deux. L'objectif du Plan France Génomique 2025 est de pouvoir séquencer un génome complet en 1 heure pour 100 dollars (33). Plus que l'enjeu économique, c'est l'orientation vers une médecine personnalisée, s'appuyant sur l'analyse du génome de chaque individu, et permettant le déploiement d'une démarche diagnostique et thérapeutique ciblée sur la pathologie propre de chaque patient qui est le but visé par ce projet.

3) L'unité fonctionnelle du génome : le gène

On définit le gène comme l'unité fonctionnelle du génome. Un allèle correspond à chacune des versions possibles d'un même gène. Le gène est composé de séquences « codantes », les exons, où chaque triplet de nucléotides sera transcrit puis traduit en protéines (34). Le gène débute par un codon START (Codon ATG, correspondant à une méthionine) et se termine par un codon STOP (Codons TGA, TAG ou TAA), mettant un terme à la transcription. Avant le premier exon, on note une partie non codante nommée 5'UTR, ou partie « promotrice », où va se fixer le facteur de transcription permettant de lancer la transcription du gène. La séquence du gène s'achève enfin par une partie non codante 3'UTR. La transcription d'un gène par l'ARN polymérase va donner lieu à un ARN messager (ARNm) complémentaire de la séquence d'ADN, qui sera exportée hors du noyau. Dans le cytosol, le ribosome permettra enfin la traduction de l'ARNm en protéine, en associant selon un code prédéfini (code génétique) un acide aminé à trois nucléotides (35). Chaque gène n'est

pas forcément traduit en protéines. Ainsi, entre les exons, se trouvent les introns, séquences « non codantes » non transcrites, mais présentant néanmoins de multiples fonctions, notamment de régulation. Ces fonctions régulatrices s'expriment notamment *via* la synthèse de micro-ARN interférents (miARN), capables de bloquer la transcription des gènes, cliver l'ARNm ou encore de bloquer directement la traduction (36). Les introns peuvent présenter également en leur sein plusieurs séquences responsables d'un phénomène appelé « épissage alternatif ». Ce mécanisme, consistant à exclure certains exons ou non de manière aléatoire sur l'ARN pré-messager, permet ainsi de former à partir d'un même ARN pré-messager plusieurs ARNm, conduisant à la synthèse de protéines distinctes. Ainsi, 20 000 gènes permettent de coder chez l'Homme pour plus de 100 000 protéines différentes (37). L'épissage alternatif se fait *via* un complexe appelé spliceosome, composé de particules ribonucléoprotéiques, permettant l'excision des introns et la sutures des exons (38). Il existe plusieurs séquences régulatrices de l'épissage, exonique ou intronique. Certaines séquences activent l'épissage, tels que les sites promoteurs exoniques (exonic splicer enhancer : ESE) ou les sites promoteurs introniques (intrinsic splicer enhancer : ISE). A l'inverse certaines régions inhibent ce phénomène, tels que les sites inhibiteurs exoniques (exonic splicer silencer : ESS) ou les sites inhibiteurs introniques (intrinsic splicer silencer : ISS) (39) (**Figure 5**).

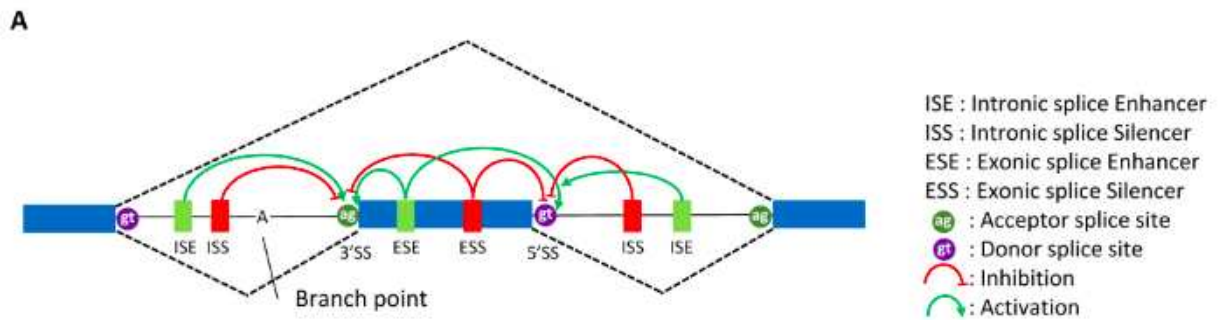


Figure 5. Représentation schématique des sites régulateurs de l'épissage alternatif, selon Boisson *et al.* (39).

B. Mutations génétiques

1) *Variants et polymorphismes génétiques*

Un variant est défini comme une variation de la séquence de nucléotides par rapport à une séquence de référence du génome humain. Toute la difficulté face à un variant est de définir son caractère pathogène. Le « polymorphisme » est un variant génomique d'une fréquence supérieure ou égale à 1% dans la population générale, généralement considéré comme non pathogène.

2) *Types de mutations*

La **substitution d'un nucléotide** est définie par le remplacement d'un nucléotide par un autre. Le plus fréquemment, il s'agit d'un mécanisme de transition, c'est à dire le remplacement d'une base de même nature : purine par une autre purine (Adénine-Guanine) ou base pyrimidique par une autre base pyrimidique (Cytosine-Thymine). Plus rarement, il peut s'agir d'une transversion, correspondant au remplacement d'une base purique par une base pyrimidique (ou inverse), plus sévère et plus rare car plus facilement accessible aux mécanismes de réparations de l'ADN (40).

La **délétion de nucléotides** consiste en la perte d'une ou de plusieurs paires de bases au niveau d'un *locus* d'ADN. Elle peut être étendue, avec parfois une perte d'exons entiers (40).

A l'inverse, l'**insertion de nucléotides** consiste en l'ajout d'une ou de plusieurs paires de bases dans la séquence d'ADN.

Enfin, la **duplication** désigne la répétition d'un nombre de nucléotides, pouvant concerner ou non un multiple de trois, entraînant ainsi des conséquences fonctionnelles très variables (40).

3) Conséquences sur la protéine synthétisée

La plupart des mutations génétiques sont responsables d'une altération de la traduction. La substitution d'un nucléotide par un autre aboutit généralement à une mutation « **faux-sens** », correspondant au remplacement sur la protéine d'un acide aminé par un autre, aboutissant à une protéine de fonctionnalité variable, avec un retentissement plus ou moins important en fonction du site touché (perturbation de la maturation ou de la stabilité de la protéine, inhibition des sites importants pour son activité enzymatique etc... (40)). Du fait de la redondance du code génétique, il est possible qu'une substitution aboutisse au codage du même acide aminé : la mutation est alors décrite comme « **silencieuse** ». Lorsque la substitution induit l'apparition d'un codon STOP (TAG, TGA ou TAA), la transcription est prématurément stoppée, et la protéine en résultant sera tronquée. On parle dans ce cas de mutation « **non-sens** ». Si une délétion, une insertion ou une duplication ne concerne pas un multiple de trois, elles seront à l'origine d'un **décalage de cadre de lecture** (Frameshift), pouvant également être responsable de la synthèse d'une protéine tronquée par apparition probable d'un codon STOP prématuré (41).

Certaines mutations affectent les **sites accepteurs (AG) ou donneurs (GU) de l'épissage** dans les introns, et peuvent entraîner un saut d'exons. Il peut également se créer un site cryptique de l'épissage intronique, avec apparition d'un AG au milieu d'un intron, ayant pour conséquence la prise en compte et donc la transcription d'une

partie de l'intron (pseudo-exon), entraînant la synthèse d'une protéine plus longue et parfois dysfonctionnelle (42). Enfin des variants peuvent atteindre directement **les séquences régulatrices de l'épissage** (ESE, ESS, ISE, ISS) donnant lieu à un épissage aberrant en inhibant des sites d'épissages normalement actifs, ou en créant de nouveaux sites. Ces mutations peuvent avoir une conséquence très variable sur la traduction, engendrant parfois des mutations silencieuses ou faux-sens, mais conduisant parfois à la synthèse d'une protéine dysfonctionnelle, voire précocement tronquée si la mutation fait apparaître un codon STOP prématuré (43).

C. Méthodes de séquençage du génome et interprétation des variants

1) *Méthodes de séquençages*

Les premières méthodes de séquençages sont des techniques semi-quantitatives. Le Southern Blot, développé dans les années 1975 par Edwin Southern, permet l'hybridation de l'ADN sur un support solide. Sera secondairement développé le Northern Blot, un dérivé permettant l'hybridation d'ARN disposé sur une membrane. Ces techniques permettent de détecter des remaniements importants de l'ADN ou de l'ARN (inversion, délétion ou insertion étendue) (44). En parallèle, se développent les méthodes d'amplification de l'ADN utilisant la réaction de polymérase en chaîne (PCR). Couplée à une phase pré-analytique de transcription inverse (RT), la RT-qPCR a permis dans un second temps de quantifier de manière indirecte les molécules d'ARN (45). Dans les années 80, Sanger laissera à la postérité une technique portant son nom, qui restera pendant plusieurs décennies la technique de référence. A partir d'un ADN dénaturé et amplifié, une ADN polymérase reproduit la séquence en utilisant des désoxyribonucléotides (dNTP), ainsi qu'une portion minime de didésoxyribonucléotides fluorescents (ddNTP), ayant la caractéristique de ne pas porter de groupement hydroxyle en position 3' et de ne pas pouvoir réaliser de liaison

phosphodiester avec le nucléotide adjacente, entraînant ainsi la fin de l'amplification (30). La réaction permet l'obtention plusieurs fragments d'ADN de taille différentes, séparés selon leur taille par méthode d'électrophorèse. L'émission fluorescente des ddNTP terminaux est détectée au laser, permettant le séquençage à l'acide nucléique près. La méthode est longue, et ne permet le séquençage que de 500 bases en moyenne, car le gène se lit à partir de multiples fragments prédéfinis, mais son automatisation et les différentes avancées techniques (46) expliquent qu'elle soit toujours la plus utilisée. Elle permet également un degré de précision très fin, indisponible par les nouvelles techniques à « haut débit ».

Le développement du séquençage dit de « nouvelles générations » (NGS), ou à « haut débit » constitue une avancée spectaculaire en médecine génomique. Il s'agit d'une technique beaucoup plus rapide, permettant la lecture en parallèle de plusieurs gènes (47). Les techniques utilisées sont diverses, Illumina SBS étant la plus utilisée (48). La qualité du NGS est déterminé par son recouvrement, correspondant au pourcentage de paires de bases lues par rapport à la totalité de la zone étudiée, et par sa profondeur, correspondant au nombre de répétitions de la lecture des séquences d'ADN couvertes. En pratique, le clinicien peut prescrire un panel de gènes pour des maladies spécifiques, allant de quelques dizaines à plusieurs centaines de gènes (*HSF cortico-résistante, néphropathies kystiques...*) en cas de suspicion clinique ciblée, pour lequel sera réalisé un séquençage des régions codantes et introniques flanquantes des gènes d'intérêts. De façon plus complète, le Whole Exome Sequencing (WES) correspond au séquençage de l'ensemble des exons d'un individu, soit près de 1-2% de la totalité de son génome. Enfin, le Whole Genome Sequencing (WGS), ou séquençage de la totalité du génome (exons et introns) d'un individu, devient de plus en plus accessible à la clinique.

2) *Interprétation des données obtenues par séquençage à haut débit*

Une fois le NGS réalisé, une première étape consistera à comparer les séquences obtenues par rapport au génome de référence, ce dernier étant mis à jour en temps réel par un groupe d'expert international (Génome Reference Consortium). A titre d'exemple, pour un individu donné, on recense en moyenne 40 000 variants avec un WES, et plus de 4 millions avec un WGS. La seconde étape va consister en une analyse des variants obtenus, notamment leur position dans le génome, la description des bases, leur mode de transmission, avec pour cela l'aide des analyses de ségrégation intrafamiliale. La difficulté vient de l'interprétation de ces variants, et notamment la définition de leur caractère potentiellement pathogène ou non. Plusieurs bases de données sont à disposition du généticien pour l'aider dans ce travail, notamment des bases permettant de savoir si le variant est déjà décrit comme pathogène (exemple : LOVD...), ou permettant d'estimer sa fréquence dans la population générale (exemple : FREX : The French EXome, gnomAD, PubMed...). On s'attachera également à regarder si le variant affecte un site conservé au cours de l'évolution, et à étudier la relation « cause à effet » entre un variant et un phénotype particulier. Les études de prédiction « *in silico* » sont de plus en plus utilisées pour prédire la pathogénicité d'un variant, en s'appuyant sur les caractéristiques de l'acide-aminé substitué, et sa position sur la protéine (site catalytique d'une enzyme par exemple...), en s'appuyant généralement sur différents programmes (Mutation Taster, SIFT, PolyPhen-2, Condel, Panther...) (49).

3) *Classification de l'American College of Medical Genetics and Genomics et de l'Association for Molecular Pathology (ACMG-AMP),*

La complexité des données obtenues après NGS, a nécessité en 2013 l'élaboration par un groupe de travail composé de représentants de l'American Collège of Médical

Genetics (ACMG) et de l'Association for Molecular Pathology (AMP), d'une terminaison commune permettant de définir les variant des séquences. On distingue ainsi les variants « Pathogènes » (classe V), « Probablement pathogènes » (classe IV), de « signification indéterminée » (classe III), « Probablement bénins » (classe II) et « Bénins » (classe I). Cette classification repose sur des données de populations, données informatiques, tests fonctionnels, et données de ségrégation, et est régulièrement actualisée (47).

IV. Transmission génétique du syndrome d'Alport

La transmission génétique du SA est complexe, et fait appel à des mécanismes de transmission Mendéliens et non Mendéliens.

A. Modèle de transmission lié à l'X

Le SA peut se transmettre par l'X lorsqu'il existe un variant pathogène du gène *COL4A5* (situé sur ce chromosome). La maladie touche classiquement tous les hommes hémizygotés. Les femmes sont historiquement considérées comme porteuses « saines » du variant pathogène, avec un risque de transmission à leur descendance masculine de $\frac{1}{2}$. Néanmoins, il existe des situations où les femmes hétérozygotes peuvent présenter des symptômes, par phénomènes d'inactivation de l'X (désacétylation des histones, ou « lyonisation » de l'X), ou lorsque l'allèle muté sur le chromosome X se comporte comme dominant par rapport à l'allèle concordant. Ces symptômes sont toutefois généralement moins sévères. Il peut également exister des mutations *de novo*, estimées chez près de 12% hommes mutés pour *COL4A5* par exemple (48).

B. Hérité mendélienne autosomique récessive

Lors d'une maladie autosomique récessive, il est nécessaire d'avoir deux allèles d'un même gène mutés pour présenter la maladie. Le phénotype pathogène s'exprime chez

les homozygotes ou chez les hétérozygotes composites en *trans* (présentant deux mutations différentes, sur deux allèles distincts dans les deux chromosomes homologues). La répartition est égale entre les sexes, et un couple hétérozygote a une chance sur quatre de transmettre la maladie. Sur l'arbre généalogique, la transmission est dite « horizontale ». Dans certains cas plus complexes, un seul des deux parents peut être porteur de variant(s) pathogène(s), variant qui se combinera à une mutation *de novo* sur l'autre allèle. Le risque de maladie autosomique récessive est majoré en cas de consanguinité. Dans le SA, l'hérédité mendélienne autosomique récessive est présente lorsqu'il existe deux variants pathogènes sur *COL4A3* et/ou sur *COL4A4* sur deux allèles distincts.

C. Hérédité mendélienne autosomique dominante

Lors d'une maladie autosomique dominante, la présence d'un seul allèle pathogène conduit à l'expression de la pathologie. La maladie s'exprime donc chez les hétérozygotes. La maladie est présente dans les deux sexes, et la transmission se fait par l'homme ou la femme à la moitié de la descendance. La répartition sur un arbre généalogique est dite « verticale ». La pénétrance peut être incomplète : des hétérozygotes porteurs de l'allèles mutés peuvent ne pas avoir de phénotype clinique correspondant à la maladie. L'expressivité peut également être variable, avec des caractéristiques cliniques différentes chez des hétérozygotes, et ce même au sein d'une même famille. Dans certains cas, le variant n'est pas hérité par le père ou la mère, mais apparaît *de novo*. Dans d'autres cas il peut exister deux variants pathogènes sur le même chromosome hérité de la mère ou de père. Dans le SA, cette hérédité concerne les gènes *COL4A3* et *COL4A4*.

D. Hérédité digénique

Grâce au séquençage à haut débit, des formes d'hérédité digénique ont pu être décrites dans le SA (5). On parle de mutation digénique lorsque deux gènes distincts sont mutés (exemple : présence d'une mutation sur un allèle de *COL4A3* et d'une autre mutation sur *COL4A4*). Lorsque chacun des allèles mutés est apportés par un des deux parents, on parle de transmission autosomique récessive en « *trans* » (une mutation *COL4A3* sur un chromosome et une autre mutation sur *COL4A4* sur un autre chromosome par exemple). Lorsque les deux allèles sont transmis par le même parent (donc sur le même chromosome), on parle de transmission autosomique dominante en « *cis* » (le même chromosome 2 présente une mutation sur *COL4A3* et une autre mutation sur *COL4A4*). Enfin, en cas d'hérédité digénique impliquant *COL4A5* (sur le chromosome X) et un autre gène autosomique (*COL4A3* ou *COL4A4*) (sur le chromosome 2), l'hérédité est alors non mendélienne (50).

V. **Phénotype clinique**

A. Néphropathie glomérulaire

La principale manifestation clinique du SA correspond au développement d'une insuffisance rénale chronique, grevant le pronostic de la maladie. Les signes cliniques témoignent de l'atteinte de la barrière de filtration glomérulaire. L'hématurie microscopique, asymptomatique, révélant la présence de globules rouges urinaires dysmorphiques en taille et en forme, est le signe biologique le plus fréquent et le plus précoce. Dans une cohorte de 401 hommes atteints de SA lié à l'X (XLAS), elle était présente chez tous les patients (51). C'est également un signe décrit comme constant chez les patients SA autosomiques récessifs (ARAS), et parfois, le seul témoin de l'atteinte de la MBG chez les patients SA autosomiques dominants (ADAS) (52). Elle peut être longtemps méconnue, ou découverte à l'occasion d'un examen de dépistage

- par exemple en médecine du travail – ou lors d’une grossesse. Dans certains cas, celle-ci peut être accompagné d’un ou de plusieurs épisodes d’hématuries macroscopiques, souvent favorisés par des triggers infectieux. Dans la cohorte de Jais *et al.* 62% des 401 patients XLAS avaient présenté au moins un épisode d’hématurie macroscopique (51). Ce signe semblait moins fréquent dans les cohortes d’ARAS, où seuls 34% des enfants et 7% des adultes rapportaient au moins un épisode (53). La protéinurie, faite en majorité d’albumine, est plus tardive, et est présente chez 95% des hémizygotés pour *COL4A5* (51). De manière notable, Yamamura *et al.*, rapportent la présence d’une protéinurie chez 72.6% de 275 femmes atteintes de XLAS, pourtant historiquement considérées comme «porteurs saines », avec un âge médian de survenue de 7 ans (54). La présentation clinique peut être celle d’un syndrome néphrotique impur, accompagnée souvent d’une hématurie microscopique, avec lésions ou non de hyalinose segmentaire et focale en histologie (55). L’hypertension artérielle est très variable, et généralement tardive. Chez les hétérozygotés, une étude a mis en évidence un sur risque d’hypertension artérielle de 35% par rapport à une population témoins (56). L’insuffisance rénale chronique survient généralement lorsque la protéinurie glomérulaire est abondante, et progresse jusqu’au stade terminal à une vitesse variable (57).

B. Surdité neurosensorielle

Une surdité de perception bilatérale peut apparaître au cours de l’histoire de la maladie. Elle porte généralement d’abord sur les fréquences élevées, mais peut s’étendre par la suite vers les fréquences conversationnelles. Elle est probablement sous-évaluée, notamment parce que le dépistage des formes précoces nécessite un audiogramme, malheureusement réalisé de manière inconstante. La surdité est estimée à 67% des XLAS masculins (58), 15% des XLAS féminins (54), et 66% des

ARAS (59). Certaines études anciennes ne retrouvaient pas d'association entre la « maladie des membranes basales fines » (TBMN) et l'atteinte ORL (60). La surdité est cependant probablement sous-estimée dans les populations hétérozygotes. Ainsi, sur une cohorte de 131 patients hétérozygotes pour *COL4A3*, Furlano *et al.* ne retrouvaient pas moins de 36% d'atteinte auditive, dont 8% présentaient une surdité sévère (61).

C. Atteinte ophtalmologique

Les atteintes oculaires caractéristiques du SA incluent les dystrophies cornéennes, le lenticône antérieur, et les rétinopathies centrales (péri-maculaires) et/ou périphériques (62). L'atteinte cornéenne peut être superficielle en cas d'atteinte de la membrane de Bowman, caractérisé par des érosions douloureuses récidivantes, d'évolution spontanée favorable, parfois responsables de cicatrices à type d'opacifications (63,64). Elles peuvent être plus profondes, et responsable d'une dystrophie cornéenne postérieure polymorphe, avec formation de vésicules en forme de « donuts » au niveau de l'endothélium, rare mais caractéristique, nécessitant parfois une greffe cornéenne en cas d'atteinte de la membrane de Descemet associée (65). Le lenticône désigne la saillie en forme de cône du cristallin à travers la partie antérieure, ou plus rarement postérieure de la capsule fragilisée par l'absence de l'hétérotrimère $\alpha3\alpha4\alpha5$ (66). Il s'agit de la seule atteinte pathognomonique du SA (66). La cataracte se développe suite à la guérison de multiples ruptures de la capsule cristallinienne, moins épaisse et plus fibrillaire (67). La rétinopathie centrale et périphérique est caractérisée par des tâches jaunâtres, un amincissement rétinien, et un trou maculaire, et est liée à une atteinte de la limitante élastique interne. L'acuité visuelle est souvent normale. Dans le cas de patients ARAS, la rétinopathie centrale et périphérique est l'atteinte la plus fréquente (87%) après le lenticône (80%) (68). Chez les XLAS masculins, la

rétinopathie périphérique, la rétinopathie centrale et le lenticône affectaient respectivement 83, 59 et 56% des sujets (68). Dans le cas de XLAS masculins et d'ARAS, la rétinopathie périphérique semblait plus fréquente en cas d'insuffisance rénale et de perte auditive, et pouvait être présente en l'absence d'atteinte centrale, ce qui justifie un examen soigneux de la rétine (69). Dans la cohorte de Jais *et al.*, seules 3 femmes XLAS sur les 349 testés présentaient un lenticône antérieur (51). Dans une autre cohorte de 22 femmes XLAS, aucune n'avait développé de lenticône, mais 14% présentait une rétinopathie centrale (70). Chez les hétérozygotes pour *COL4A3* ou *COL4A4*, le lenticône antérieur et la rétinopathie ne semblent pas se développer (71). On peut cependant retrouver chez ces patients des points cornéens, cristallins et rétiniens, survenant légèrement plus souvent que chez les patients présentant une autre néphropathie ou chez des individus sains (71). Dans une étude incluant 75 examens ophtalmologiques, seuls 2 patients hétérozygotes présentaient des anomalies pouvant être rattaché au SA : un présentait des érosions cornéennes récidivantes, et un autre souffrait d'une dystrophie cornéenne (61).

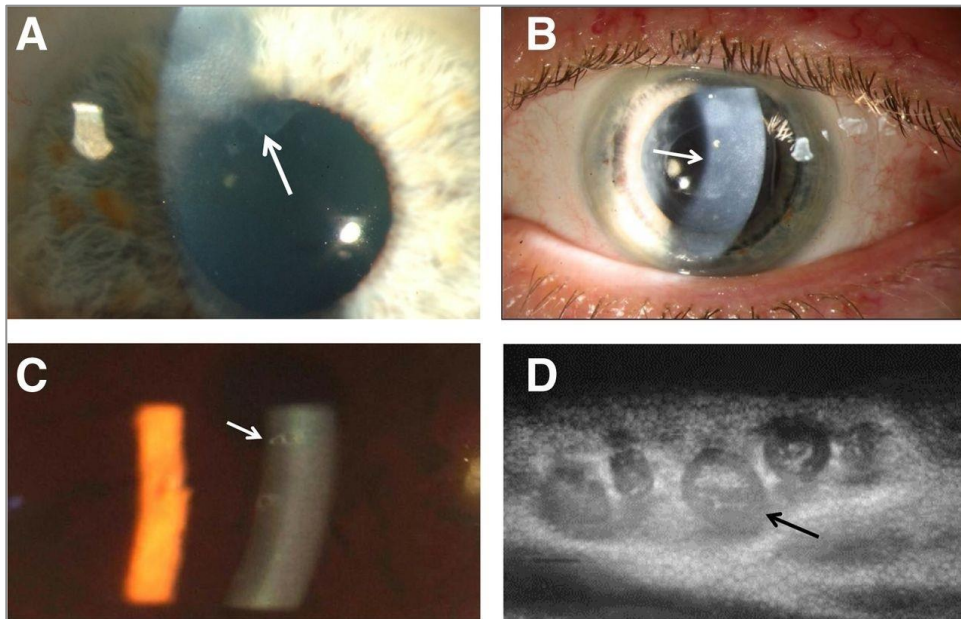


Figure 6. Anomalies cornéennes dans le Syndrome d'Alport, selon Savige *et al.* (65)

A) Cicatrices cornéennes post érosions cornéennes récurrentes à la lampe à fente chez un homme XLAS. **B)** Dystrophie cornéenne postérieure polymorphe au niveau de la membrane de Descemet à la lampe à fente chez un homme XLAS. **C)** Dystrophie cornéenne postérieure polymorphe à la lampe à fente présentant une forme caractéristique de « donuts ». **D)** Microscopie spéculaire de l'endothélium cornéen du patient en C) mettant en évidence que les lésions « en donuts » correspondent à des vésicules entourant des clusters de cellules endothéliales.

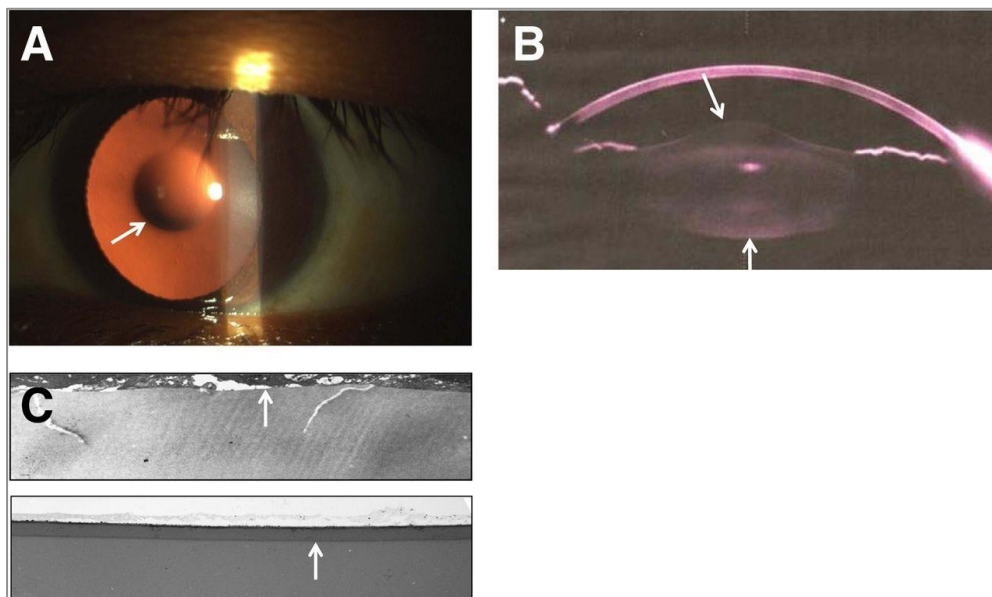


Figure 7. Anomalies cristalliniennes dans le Syndrome d'Alport, selon Savige *et al.* (65)

A) Lenticonne antérieur à la lampe à fente chez un homme XLAS. **B)** Bombement antérieur du cristallin chez le même patient à l'aide d'une caméra de Scheimpflug. **C)** Microscopie électronique du segment antérieur cristallinien d'un homme XLAS obtenu après chirurgie (**en haut**), mettant en évidence une capsule amincie et des déchirures verticales, absentes sur un cristallin sain (**en bas**).

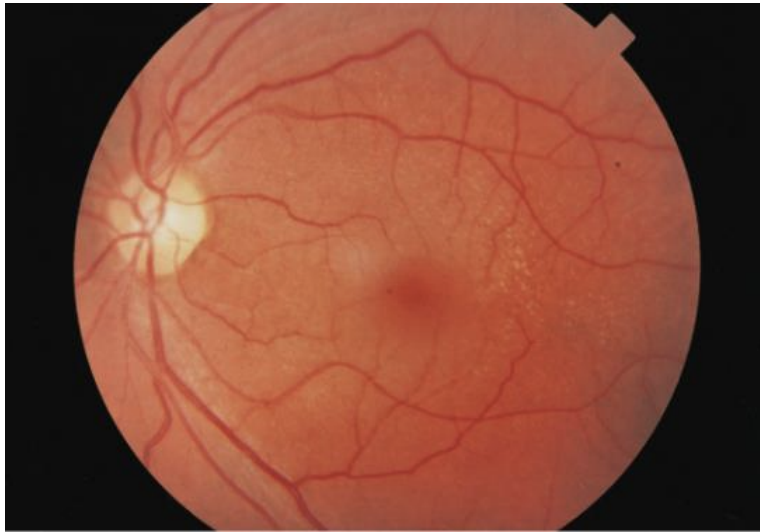


Figure 8: Anomalies rétinienne dans le Syndrome d'Alport, selon Savige *et al.* (72)
Fond d'œil mettant en évidence une rétinopathie tachetée, avec présence de multiples tâches blanches péri-maculaires.

D. Atteinte vasculaire

Bien que ne faisant pas partie de la description clinique « classique » du syndrome d'Alport, plusieurs études suggèrent la présence d'un phénotype vasculaire plus discret également associé. Chez l'homme, plusieurs case reports suggèrent un sur-risque d'atteinte vasculaire. Est ainsi rapporté le cas de jeunes hommes (entre 13 et 48 ans), suivis pour un SA, présentant des dilatations anévrysmales de l'aorte et de ses branches, notamment des artères carotides et de leurs ramifications intracrâniennes, parfois compliquées de dissections vasculaires (73)(74)(75) et/ou de ruptures hémorragiques (76)(77). Une de ces études rapportait de manière notable l'agrégation intra-familiale de ces anomalies vasculaires chez deux frères, l'un étant décédé suite à la rupture d'un anévrisme aortique à l'âge de 13 ans et l'autre présentant un élargissement de 44 mm de la racine de l'aorte à 15 ans (78). Notons que tous les patients présentaient une transmission évocatrices d'un mécanisme lié à l'X, que lorsque le génotypage était réalisé on retrouvait une mutation sur *COL4A5*, et enfin que lorsque la biopsie cutanée était disponible cette dernière était pathologique

pour le marquage de la chaîne $\alpha 5$ (75). De manière intéressante, la chaîne $\alpha 5$ a pu être identifiée dans le collagène IV des muscles lisses d'aortes de veau (79). Dans un modèle murin KO pour *COL4A5*, la chaîne $\alpha 5$ était absente dans les couches d'élastine de l'aorte, alors qu'elle était présente chez les souris sauvages. Ces souris ne développaient toutefois pas de dissection ou d'anévrisme aortique (73). Notons enfin que l'atteinte vasculaire est rapportée dans d'autres pathologies associées au collagène IV, comme le syndrome de HANAC, associant néphropathie kystique et malformations vasculaires. Ce syndrome est le fruit de la production altérée de la chaîne $\alpha 1$, secondaire à une mutation de *COL4A1*. La chaîne $\alpha 1$ étant présente dans les membranes basales artériolaires, son caractère dysfonctionnel dans ce syndrome entraîne la formation d'anévrismes et d'hémorragies, notamment à l'étage intracrânien (80,81).

E. La léiomyomatose diffuse

La léiomyomatose est une tumeur bénigne caractérisée par la prolifération des cellules musculaires lisses. Elle est associée au syndrome d'Alport lié à l'X dans moins de 5% des cas (82). Classiquement, elle touche l'œsophage, mais peut également toucher les voies respiratoires, les organes génitaux féminins (clitoris, grandes lèvres et utérus), et le périnée (83). La leiomyomatose œsophagienne peut être asymptomatique dans 50% des cas, ou responsable de dysphagie, de vomissements ou de dyspepsie. Celle-ci peut apparaître avant toute atteinte rénale, ou même en l'absence complète de néphropathie (84). Sur le plan génétique, les patients présentant une leiomyomatose diffuse (LD) présentent une délétion supprimant le promoteur commun des extrémités 5' des gènes *COL4A5* et *COL4A6*, avec un point de rupture situé dans le deuxième intron de *COL4A6*. Elle n'est jamais présente dans les cas de mutation limitée à *COL4A5* (51).

VI. Phénotype histologique

A. Microscopie optique

En microscopie optique (MO), il n'existe aucune lésion spécifique du SA. A un stade précoce, on peut observer une hypertrophie podocytaire, puis une expansion mésangiale, avec parfois une hypercellularité des cellules mésangiales. Cette dernière était retrouvée à titre d'exemple chez près de 22% des 54 patients suivis pour une TBMN dans l'étude de Cosio *et al.* (85). L'épaississement de la MBG en coloration argentique n'a qu'une valeur d'orientation. A un stade plus avancé, on observe dans les glomérules une sclérose segmentaire du flocculus, avec dépôts hyalins non spécifiques. L'interstitium est le siège de fibrose, avec présence de lipophages de façon assez constante mais non spécifique. On observe enfin une atrophie tubulaire d'installation progressive, et là encore non spécifique.

B. Microscopie électronique

Les lésions les plus caractéristiques sont l'épaississement irrégulier, avec lamellation et fragmentation de la *lamina densa* (86). Les lésions peuvent être segmentaires ou diffuses. Dans certaines familles de TBMN, la seule anomalie observable est un amincissement étendu ou focal de la MBG, qui ne dépasse pas 150 nm (87). On ne retrouve pas de dépôts denses aux électrons (87). On peut également retrouver dans certains cas un effacement des processus du pied des podocytes (88).

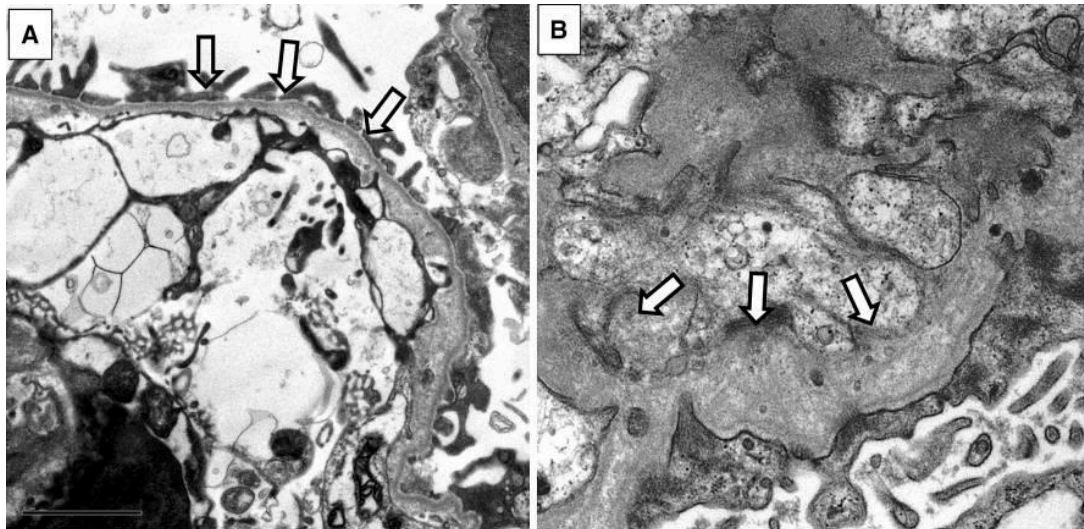


Figure 9. Anomalies de la membrane basale glomérulaire observées dans le Syndrome d'Alport en microscopie électronique, selon Nozu *et al.* (4)

A) Membrane basale fine, classiquement observée chez les femmes XLAS ou les ADAS. **B)** Membrane basale épaissie, souvent présente dans le syndrome d'Alport.

C. Immunofluorescence

L'immunofluorescence (IF) standard est négative, ou retrouve des dépôts glomérulaires non spécifiques, diffus et globaux de C3 ou d'IgM en cas de présence conjointe de lésions de HSF. L'immunomarquage des chaînes $\alpha 5$ peut classiquement être déterminant pour poser le diagnostic. Dans un rein normal, le marquage par les anticorps anti- $\alpha 5$ est linéaire et continue au niveau de la MBG, de la capsule de Bowman (CB) et de la membrane basale tubulaire (MBT) (composition majoritaire en trimères $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ pour la MBG et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ pour la CB et la MBT). La membrane basale cutanée est également marquée de manière physiologique par l'anticorps anti- $\alpha 5$ (composition en trimères $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$). Théoriquement, dans le cas d'hémizygotie pour *COL4A5*, on n'observe pas de coloration au niveau de la capsule de Bowman, de la MBG et de la membrane basale épidermique (84). Dans les cas XLAS de féminin, le marquage a tendance à être segmentaire (90). Chez les patients ARAS (déficients en $\alpha 3$ et/ou $\alpha 4$), on n'observe pas de marquage anti- $\alpha 5$ au niveau de la MBG, du fait de la déstabilisation de l'hétérotrimère $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$. A l'inverse, le marquage anti- $\alpha 5$ est

conservé chez ces patients au niveau épidermique (hétérotrimères $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$) et au niveau de la CB et de la MBG (hétérotrimères $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$) (91). Néanmoins un marquage anti- $\alpha 5$ complètement normal ne permet pas d'exclure de manière formelle un XLAS chez les femmes. En effet, certaines femmes XLAS asymptomatique peuvent avoir un marquage conservée, en lien avec un très faible niveau d'allèle mutant de *COL4A5* (92). De plus, des cas de faux négatifs sont décrits, Oka *et al.* rapportant par exemple chez 30 patients ARAS prouvés génétiquement un marquage anti- $\alpha 5$ de la MBG parfaitement conservé chez pas moins de 20% d'entre eux (93).

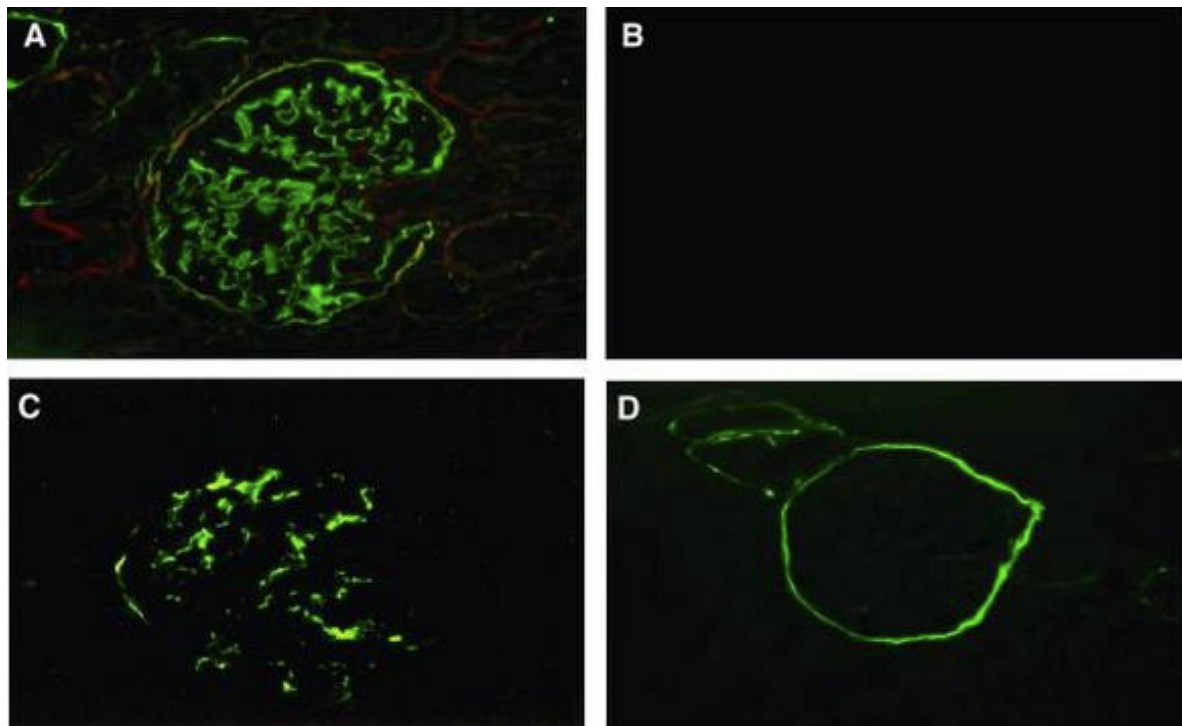


Figure 10. Marquage en immunofluorescence des chaînes $\alpha 5$ du collagène IV glomérulaires dans le Syndrome d'Alport, selon Nozu *et al.* (4)

A) Rein sain contrôle, montrant un marquage intense de la chaîne $\alpha 5$ au niveau de la membrane basale glomérulaire (MBG) et de la capsule de Bowman (CB). **B)** Absence complète de marquage de la chaîne $\alpha 5$ au niveau de la MBG et de la CB chez un homme XLAS. **C)** Marquage partiel « en mosaïque » de la chaîne $\alpha 5$ sur la MBG et sur la CB chez une femme XLAS. **D)** Absence complète de marquage de la chaîne $\alpha 5$ sur la MBG avec de manière conjointe la présence d'un marquage intense de la CB chez un patient ARAS.

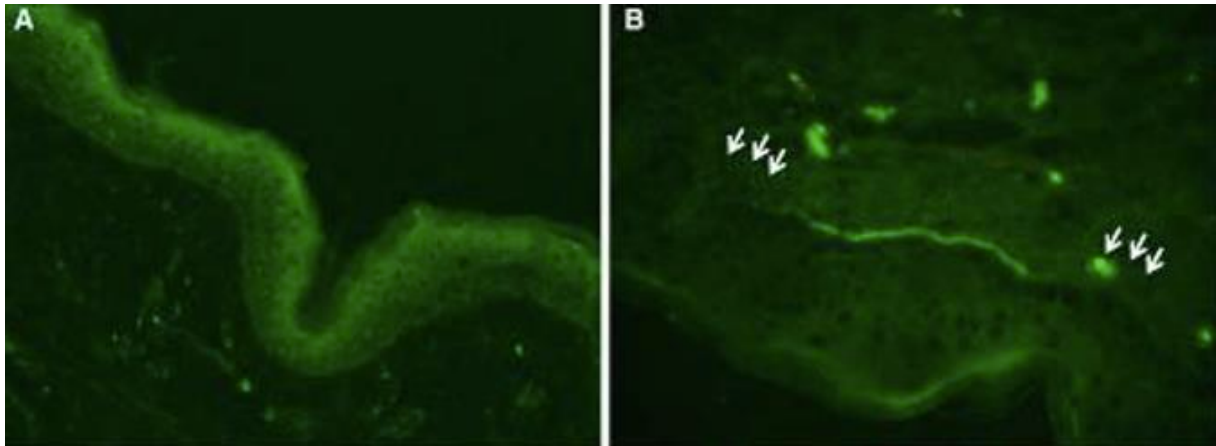


Figure 11. Marquage en immunofluorescence des chaînes $\alpha 5$ du collagène IV sur la membrane basale épidermique dans le Syndrome d'Alport, selon Nozu *et al.* (4)
A) Absence complète de marquage de la chaîne $\alpha 5$ au niveau de la membrane basale épidermique (MBE) chez un patient XLAS. **B)** Marquage partiel « en mosaïque » de la chaîne $\alpha 5$ sur la MBE chez une femme XLAS.

D. Corrélation entre l'immunomarquage anti- $\alpha 5$, le génotype et le phénotype clinique

Comme décrit précédemment, le schéma classique de marquage attendu de la chaîne $\alpha 5$ peut varier en fonction du mode de transmission. Bien que de nombreux cas de faux-négatifs aient été décrits, il semblerait exister une association entre la gravité clinique de la maladie, le type de mutation et la conservation ou non d'un marquage pour les chaînes $\alpha 5$. Une étude incluant 25 patientes XLAS retrouvait ainsi une corrélation négative entre l'expression d' $\alpha 5$ et la gravité de la maladie, évaluée ici par le taux de protéinurie (r^2 ajusté = 0.71, $p = 0.0001$) (94). Le marquage $\alpha 5$ de la MBG semblait également être corrélé à la gravité de la mutation, avec par exemple disparition complète du marquage en cas de mutation par délétion ($n=2$), persistance d'un marquage faible mais présent pour quatre patients porteurs d'une mutation faux-sens avec substitution de la glycine (91), et enfin conservation du marquage $\alpha 5$ de la MBG en cas de mutations faux-sens sans décalage du cadre de lecture (95).

VII. Corrélation entre le phénotype clinique et le génotype

A. Transmission liée à l'X

1) *Chez les hommes porteurs d'une mutation de COL4A5*

i) Phénotype selon la nature des variants,

Dans le cas des XLAS, 90% des hommes présentent une IRCT à l'âge de 40 ans (53), avec une moyenne d'âge de survenue de 24.3 ans (96). De nombreuses études suggèrent que le pronostic rénal et la présence d'atteintes extra-rénales sont intimement liés à la nature des variants présentés. La principale hypothèse tâchant expliquer ce phénomène est qu'en cas de mutations tronquantes, l'ARNm serait dégradé par le podocyte, empêchant ainsi la chaîne $\alpha 5$ de s'incorporer dans le trimère. A l'inverse, en cas de mutations faux-sens ou non décalante, la chaîne $\alpha 5$ pourrait être produite de façon anormale ou en quantité réduite, conduisant tout de même à la synthèse d'un trimères $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$, qui bien que déficients, serait toujours incorporé à la MBG (97). Une méta-analyse compilant ainsi 267 sujets, individualisait trois groupes de gravités cliniques distinctes (98). Le premier comprenait des patients présentant de grands réarrangements géniques, des mutation non-sens, des mutations décalant le cadre de lecture, et enfin des mutations affectant le site donneur d'épissage. Les patients de ce groupe présentaient le phénotype clinique le plus sévère, avec développement d'une IRCT à un âge moyen de 19.8 +/- 5.7 ans. Le deuxième groupe comprenait des patients présentant des mutations faux-sens, y compris celles touchant la glycine dans les exons 21 à 47, des mutations affectant le site accepteur d'épissage, ainsi que des délétions ou insertions ne modifiant pas le cadre de lecture, avec une évolution vers l'IRCT à un âge à 25.7 +/- 7.2 ans. Enfin, le troisième et dernier groupe regroupait les patients présentant des mutations faux-sens entraînant une substitution de la glycine par un autre acide aminé dans les exons 1 à 20. Les patients

de ce groupe présentaient un meilleur pronostic, avec un âge moyen d'IRCT de 30.1 +/-7.2 ans (98). Dans une seconde cohorte de 681 patients masculins XLAS issus 175 familles américaines, les auteurs ont mis en évidence un âge moyen d'IRCT de 37 ans pour les mutations faux-sens, de 28 ans pour les variants pathogènes affectant le site d'épissage, et de 25 ans pour les variants responsables de protéines tronquées (58). Savige *et al.* (96), dans une cohorte de 237 patients, ont de même mis en évidence que les hommes XLAS présentaient une IRCT à un âge moyen de 22.5 +/- 7 ans ($n=131$) pour des mutations dites sévères (réarrangements, grandes délétions, insertions/délétions ou mutations non-sens), âge significativement inférieur à celui des patients porteurs d'un autre type de mutations (26.7 +/- 8.1 ans) ($n=106$) ($p < 0.01$). Dans une autre étude, Jais *et al.* rapportent de même un risque d'IRCT avant 30 ans pour les hémizygotes *COL4A5* de près de 90% en cas de grandes délétions, de mutations non-sens, ou de mutations avec décalage du cadre de lecture ; de 70% en cas de mutations affectant les sites d'épissage ; et enfin de 50% seulement en cas de mutation faux-sens (51). L'étude des mutations du site d'épissage par RT-qPCR de l'ARNm dans une population d'hommes atteints de XLAS a révélé un pronostic plus défavorable lors de variants transcriptionnels tronquants ($n=21$) que de variants transcriptionnels non tronquants ($n=25$), avec un âge moyen d'IRCT significativement différent (20 ans (IC 14-23 ans) vs 29 ans (IC 25-40 ans), $p = 0.001$) (99). Il existe également une corrélation entre la gravité de la mutation et le risque d'atteinte extra-rénale chez les hommes XLAS (58). Tan *et al.* rapportent par exemple que les hommes porteurs de mutations sévères (réarrangements, décalages du cadre de lecture, mutation non-sens, variants affectant le site donneur d'épissage, mutations faux-sens des exons 23 à 51) présentaient un risque plus important de développer une insuffisance rénale précoce ($p = 0.0009$), une perte auditive ($p = 0.009$), un lenticône

antérieur ($p = 0.009$), et/ou une rétinopathie centrale ($p = 0.0256$) par rapport aux hommes porteurs d'une autre mutation de *COL4A5* (70). Les substitutions les plus fréquentes sont celles intéressant la glycine (Gly) (100). Certains auteurs relèvent des degrés d'instabilité différent selon l'acide aminé remplaçant cette dernière ; ainsi l'arginine (Arg), la valine (Val), l'acide glutamique (Glu), l'acide aspartique (Asp), ou le tryptophane (Trp) sont considérés comme hautement déstabilisants (19), notamment du fait de l'encombrement allostérique qu'ils engendrent (101), et seraient responsables d'un phénotype rénale et extra-rénale plus sévère (102). A titre d'exemple, Gibson *et al.* retrouvaient un délai médian d'apparition de l'IRCT de 7 ans plus précoce chez les patients présentant une substitution concernant un de ces cinq résidus (97). Cela pourrait également expliquer la sous-représentation des substitutions de Gly par alanine (Al) et sérine (Ser) dans les bases de données (101), probablement sous-diagnostiquées du fait d'un phénotype potentiellement moins sévère. Ces résultats ont toutefois été récemment contredits par la cohorte de Savige *et al.*, dans laquelle aucune différence de délai de survenue de l'IRCT n'était retrouvée entre les différents groupes (Gly \rightarrow Arg/Glu/Asp *versus* Gly \rightarrow autre acide aminés *versus* autre substitution n'intéressant pas la Gly) (103).

ii) Phénotype selon la localisation de la substitution

Outre la nature de la substitution, sa localisation au sein de la chaîne semble également pouvoir influencer sur le pronostic. Tout d'abord, comme pour ce qui a pu être démontré sur d'autres gènes collagénopathies – notamment dans l'ostéogénèse imparfaite, par mutation de *COL1A1* (104) - les variants Gly faux-sens apparaissant dans le domaine collagénique près de l'extrémité C-terminale (NC1) peuvent être associés à des phénotypes plus sévères. Tel que décrit précédemment (**Figure 2**), l'assemblage des trois chaînes du trimères se fait en effet dans le sens NC1 vers 7S

(soit 3' vers 5' sur le gène correspondant). Les substitutions proches de l'extrémité NC1 (correspondant donc sur le gène aux exons « distaux », proches de 3') pourraient alors être responsables d'un impact fonctionnel plus important sur la protéine, perturbant « plus précocement » l'assemblage du trimère. Dans une méta-analyse, Gross *et al.* rapportent ainsi une survenue de l'IRCT significativement plus précoce chez les patients présentant une mutation faux sens de Gly-X-Y dans les exons « distaux » (21 à 47) de *COL4A5* (plus proches de NC1) par rapport aux exons « proximaux » (1 à 20) (plus proches de 7S) (98). Gibson *et al.* retrouvent également des résultats allant dans ce sens, avec un risque accru d'IRCT pour les substitutions sur les exons « distaux » par rapport à celles touchant la région « centrale » (97). *A contrario*, Bekheirnia *et al.* n'avaient quant à eux pas retrouvé de relation entre la position de la substitution et l'âge de survenue de l'IRCT (HR à 0.87 par incrément de 1 000 pb vers l'extrémité 3' du gène, $p=0.343$) (58).

Deuxièmement, la localisation de la substitution au sein d'un domaine non collagénique (NC) ou adjacent à ce domaine semble être associée à un phénotype moins péjoratif, responsable d'une réduction de la flexibilité du protomère, sans entraîner de déstabilisation complète de la triple hélice (105)(106). Dans ces cas, l'hétérotrimère $\alpha3\alpha4\alpha5$ est toujours produits, et le collagène de type IV de la MBG est de fait constitué de protomères matures. A titre d' exemple, p.G624Asp, située sur une courte séquence non collagénique et p.P628L, située juste après la 12^e interruption non collagénique, sont deux substitutions bien décrites, à l'origine d'un phénotype moins sévère de XLAS masculins (107)(108)(109), avec un âge de survenue de l'IRCT plus tardif (110). Pour p.G624Asp, l'âge moyen de début de la dialyse était ainsi de 54 ans (50-62) contre 26 ans (22-30) pour les autres patients XLAS (111). Aucun de ces patients ne présentaient de manifestations extra-rénales dans cette étude (110). Si

Gibson *et al.* rapportent une diminution du risque d'IRCT lorsque la substitution du résidu Gly se trouve aux limites non collagénique (NC) ($p=0,025$), il n'y avait pas dans leur étude de différence significative sur l'âge de survenue de la perte auditive (97). Ces résultats sont bien-sûr à pondérer par quelques observations allant dans un sens contraires, comme le cas de cette famille porteuse du variant p.G624Asp et présentant une évolution clinique plus sévère (112).

Pour finir, de manière surprenante, il semblerait que d'autres substitutions retrouvées directement au sein du domaine NC1, p.C1564S, p.L1649R, p.R1677Q, p.C1638Y, puissent être associées à des phénotypes moins sévères. Une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène propose un assemblage plus tardif des protomères dans le réticulum endoplasmique, avec toutefois synthèse *in fine* de trimères matures, se traduisant donc sur le plan clinique par un phénotype d'hématurie microscopique bénigne, probablement de ce fait sous-diagnostiqués (106). Des recommandations d'experts récentes recommandent néanmoins de prêter attention aux mutations affectant les 12 cystéines de ce même domaine NC1, et de les considérées comme des domaines potentiellement critiques (100).

2) Chez les femmes porteuses d'une mutation de COL4A5

Il existe chez les femmes porteuses d'une mutation de *COL4A5* à l'état hétérozygote une grande variabilité phénotypique, avec une incidence de l'IRC plus tardive, et très inconstante. Jais *et al.* ont ainsi mis en évidence une prévalence de l'IRCT chez les femmes porteuses d'un variant pathogène sur *COL4A5* de près de 25% après 60 ans (92). Dans une autre étude, 52 des 336 patientes (15.5%) développaient une IRCT, à un âge médian de 65 ans (54). Contrairement à ce qui a pu être bien établi chez les hommes XLAS, les études de cohortes ne retrouvent pas de corrélation entre la sévérité de la mutation et l'évolution clinique (113), et peuvent au mieux faire

apparaître une tendance vers une diminution de l'IRCT en cas de mutations faux-sens (51). De la même façon il n'est pas retrouvé de corrélation entre le type de mutations et la présence ou non de manifestation extra-rénale. De manière notable, il existe une grande variabilité intrafamiliale d'évolution clinique chez ces patientes XLAS, avec dans une même famille des femmes qui développeront une IRCT avant l'âge de 30 ans, tandis que d'autres présenteront une simple hématurie microscopique à l'âge de 60 ans (92). Dans une même famille, Crawford *et al.* rapportent par exemple un âge d'IRCT allant de 12 à 83 ans (114). D'un point de vue pronostique, le seul facteur qui semble bien être documenté pour prédire l'insuffisance rénale est l'apparition de la protéinurie (57). Une étude a ainsi pu mettre en évidence un lien entre la gravité de l'atteinte rénale et la disparition de l'immunomarquage anti- $\alpha 5$ sur les biopsies cutanées (94), toutefois non retrouvé dans une autre cohorte (115). Certains auteurs (116) cherchent à expliquer ce résultat par un phénomène d'inactivation aléatoire du chromosome X, avec pour résultat un équilibre variable des allèles de type sauvage et mutant. Le phénotype sera d'autant plus sévère que le X sauvage (non muté) est inactivé, et que le X muté est donc en miroir exprimé (117). Vetrie *et al.* ont montré que dans les leucocytes périphériques des femmes XLAS, le rapport entre l'activité relative du chromosome X mutant et du X sauvage était variable, mais n'était toutefois pas corrélé à l'activité de la maladie (118). En s'intéressant spécifiquement à l'inactivation de l'X dans les cellules rénales dérivés du sang et de l'urine, une étude portant sur 56 femmes hétérozygotes pour *COL4A5* ne retrouvait de même pas de corrélation entre l'âge d'apparition de la première manifestation, la protéinurie et le déclin du débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) et le pourcentage de X sauvage inactivé (119). Ainsi il est, en l'état de nos connaissances, difficile de prédire le pronostic rénal des femmes XLAS. Il convient donc de rester prudent face à un état

asymptomatique, notamment pour ce qui est du conseil génétique. Se pose souvent aussi la question pour ces patientes du don de rein vivant à leur apparentés masculins.

3) Chez les digéniques non mendéliens COL4A5 / autre COL4A.

Comme expliqué précédemment, un patient présente une transmission digénique COL4A5 et COL4A en cas d'association de variants pathogènes sur COL4A5 et sur COL4A3, ou de l'association de variants pathogènes de COL4A5 et de COL4A4. L'évolution phénotypique est peu documentée, du fait du petit nombre de cas rapportée. La sévérité du tableau clinique dépend du type de variant et du sexe du patient. Si le variant pathogène touche COL4A5 chez un patient hémizygoté avec une atteinte déjà sévère (délétion étendue, protéine tronquée...), l'ajout d'un variant pathogène dans COL4A3 ou dans COL4A4 pourrait ne pas aggraver le phénotype, étant donné que tous les hétérotrimères sont déjà atteints. *A contrario*, si le variant pathogène pour COL4A5 est une mutation faux-sens ou un variant hypomorphe, l'ajout d'un autre variant pathogène codant pour la chaîne $\alpha 3$ ou $\alpha 4$, pourrait aggraver considérablement la présentation clinique (120). Savige *et al.* rapportent ainsi 16 cas d'hémizygotie pour COL4A5 présentant un variant pathogène surajouté sur COL4A3 ou sur COL4A4, qui présentaient une protéinurie dans 92% des cas, une perte auditive dans 60% des cas, une anomalie oculaire dans 50% des cas, et enfin une insuffisance rénale dans 33% de cas (121), ce qui n'apparaissait pas différent d'autres cohortes XLAS masculines déjà décrites (51). Les femmes hétérozygotes pour COL4A5 présentant un variant pathogène surajoutées sur COL4A3 ou sur COL4A4, présenteraient enfin une protéinurie d'apparition plus précoce (121), et un risque plus important d'insuffisance rénale comparativement aux femmes isolément hétérozygotes pour COL4A5 (50).

B. Patients homozygotes ou hétérozygotes composites en *trans* pour *COL4A3* ou pour *COL4A4*

1) *Évolution vers l'insuffisance rénale chronique terminale*

L'âge d'apparition de l'IRCT dans les cas de syndrome d'Alport autosomique récessif (ARAS) est précoce, avec une maladie évoluant jusqu'au stade terminal à un âge moyen compris entre 20 et 22 ans selon les différentes études (97)(93)(59). Dans une cohorte comparant ARAS et XLAS, aucune différence significative n'était retrouvée pour ce qui était de l'âge de survenue de l'IRCT (*COL4A3* : 23,2 +/- 9,3 ans ; *COL4A4* : 25,4 +/- 10,3 ans ; *COL4A5* (XLAS) : 24,4 +/- 7,8 ans) (96).

2) *Impact défavorable selon le type de variants*

De la même manière que pour les cas de XLAS masculins, il est possible de prédire l'évolution clinique grâce à l'étude du type de variant génétique. Les patients homozygotes ou hétérozygotes composites pour *COL4A3* présentaient ainsi dans une étude un âge d'IRCT plus précoce en cas de présence conjointe de deux variants sévères par rapport à la présence d'une seule mutation sévère ou par rapport à l'absence de mutation sévère (17.6 +/- 8.5 ans *versus* 20.8 +/- 5.1 ans *versus* 24 +/- 6.9 ans, respectivement (p=0.08)) (96). De la même manière, le fait de présenter deux variants pathogènes sévères dans *COL4A4* était associé dans la même étude à un âge moyen de survenue de l'IRCT plus précoce par rapport au fait de n'avoir qu'un seul variant, ou aucun variant (21.1 +/- 3.6 ans *versus* 25.5 ans +/- 7.8 ans *versus* 26.6 +/- 5 ans, respectivement (p=0.01)) (96). Dans une cohorte de 40 patients atteints de ARAS (homozygotes ou hétérozygotes composites), Storey *et al.* ont mis en évidence que la présence d'au moins un variant non-sens avec apparition d'un codon STOP prématuré était directement ou indirectement associé à un risque d'IRCT plus précoce que chez les patients porteurs d'un autre type de mutation (59). Dans le même sens,

dans une cohorte chinoise et européenne de 101 patients, incluant des cas pédiatriques (âge entre 1.5 et 46 ans), présentant un ARAS, le fait d'avoir une ou deux mutations faux-sens était associé à une évolution vers l'IRCT plus tardive, un déclin moins rapide du DFGe, et à une prévalence moins importante d'atteinte auditive que les autres types de mutations (122).

3) *Cas particulier de la transmission digénique de mutations de COL4A3 et de COL4A4*

Si la mutation de *COL4A3* et la mutation de *COL4A4* sont présentes sur le même chromosome (donc transmises par un même parent), c'est à dire en configuration *cis*, le pronostic semble être plus sévère par rapport à celui des sujets hétérozygotes (ADAS) pour *COL4A3* ou pour *COL4A4* (présentant de fait une seule mutation sur un des deux gènes). Fallerini *et al.* rapportent ainsi le cas de deux patients présentant une hérédité digénique en *cis*, qui évoluaient vers l'IRCT respectivement à 37 et 53 ans (123), soit un pronostic intermédiaire entre la forme autosomique dominante et la forme autosomique récessive. Pour ce qui est des mutations héritées en *trans* (une mutation sur le chromosome maternel et une autre mutation sur le chromosome paternel), le pronostic semble être également meilleur par rapport aux patients présentant une forme autosomique récessive (124).

C. Syndrome d'Alport « autosomique dominant », Néphropathie à « membrane basale fine », ou « Hématurie familiale bénigne » ?

Le terme Syndrome d'Alport autosomique dominant, (antérieurement parfois nommée « néphropathie à membrane basale mince » (TBMN) ou « hématurie familiale bénigne » ne fait aujourd'hui pas *consensus*. L'appellation « membrane basale fine » prête déjà le flanc à la critique. Il s'agit en effet d'une entité histologique, qu'il est possible de retrouver dans d'autres néphropathies (125), et pour laquelle au sein

même des hétérozygotes il existe de nombreux faux négatifs (126). Ainsi, dans une revue de la littérature incluant 777 patients porteurs d'un variant hétérozygote de *COL4A3* ou de *COL4A4*, 18.4% des patients présentaient un épaissement plutôt qu'un amincissement de la MBG (126). Deuxièmement, la prévalence des patients pouvant être inclus dans le groupe TBMN est probablement très sous-estimée. Un premier argument sous-tendant cette hypothèse, est la fréquence élevée de l'hématurie microscopique persistante dans la population générale, antérieurement rarement rattachée au SA (127,128). L'étude systématique de biopsies de greffons rénaux de donneurs considérés comme indemnes de toute néphropathie retrouvait également de manière intéressante un fréquent amincissement de la MBG (129). La généralisation du séquençage de haut débit a permis d'estimer que la présence d'un variant sur *COL4A3* ou sur *COL4A4* surviendrait très fréquemment sur des bases de données de patients sans maladie rénale connue (11,60) ou en cas de maladie rénale chronique indéterminée (130). Le terme de TBMN recouvre donc une très grande diversité de phénotypes cliniques, allant de patients indemnes de pathologies rénales, à d'autres limités à une simple hématurie microscopique, et enfin à d'autres présentant une insuffisance rénale chronique parfois rapidement évolutive (131). La principale critique de ce terme est qu'il sous-entend une certaine forme de « bénignité » de la pathologie, qui pour certains auteurs est impropre, devant une pathologie pouvant évoluer vers l'IRCT dans 10% des cas après 50 ans et près 30% des cas après 70 ans (106). Le risque moyen d'IRCT est ainsi estimé à 14% au cours de la vie, avec un âge moyen de survenue de 60 ans (132). Plusieurs études ont tenté d'expliquer cette variabilité phénotypique. Une première explication pourrait être une pénétrance incomplète de la mutation, estimée selon certaines études à seulement 5-10 % (106), expliquant ainsi la certaine variabilité intrafamiliale observée (133). Une autre

explication pourrait être son association avec d'autres néphropathies, telle que la néphropathie à IgA (IgAN), la hyalinose segmentaire et focale, le syndrome néphrotique à lésions glomérulaires et minimes (LGM), ou autres (55). L'association des mutations rapportée de *COL4A3-COL4A4* avec d'autres variants pathogènes de gènes exprimés par les podocytes, et jouant un rôle de modificateurs génétique peut également contribuer à la variabilité phénotypique en exacerbant les manifestations cliniques (134). Ces modificateurs génétiques codent pour des protéines exprimées dans la barrière de filtration glomérulaire ou dans le cytosquelette, fSNC et la liste est longue, avec notamment *NPHS1* (Néphrine), *NPHS2* (Podocine), *NEPH3* (Filtrine) (135), *LAMA5* (Laminine $\alpha 5$) (136), *MYO1E* (Non-muscle Myosin-1E), *SYNPO* (Synaptopodine), *TRPC6* (Canal calcique), *ACTN4* (alpha-actinin 4), *INF2* (Inverted formin 2) ou encore *CD2AP* (137). Cette hypothèse est soutenue par exemple par une étude réalisant le séquençage d'un panel de 26 gènes de syndromes néphrotiques cortico-résistant, mettant en évidence la présence conjointe de mutations associées aux HSF et au SA chez 3 des 50 patients génotypés (138). Ainsi, une première patiente présentera conjointement la présence d'un variant hétérozygote de *COL4A3* et deux variants de *NPHS1* (dont un avec décalage du cadre de lecture). Une autre patiente présentera une substitution pour *COL4A3* et un état d'hétérozygotie composite pour deux variants faux-sens de *NPHS2*, avec présence de lésions de HSF en histologie. Enfin, un dernier patient présentera une mutation du site d'épissage de *COL4A3*, responsable d'un saut de l'exon 46 conjointement avec la présence d'un variant faux-sens dans l'exon 12 d'*INF2* (138). Afin d'expliquer certains phénotypes plus sévères, certains auteurs ont par le passé émis l'hypothèse que l'association d'une mutation de *COL4A* avec le variant p.R229Q de *NPHS2* – impactant notamment la liaison entre la podocine et la néphrine - pouvait être responsable de l'apparition précoce d'une

protéinurie et d'une évolution clinique plus péjorative chez ces patients (139)(140). Cette hypothèse a cependant été depuis remise en question, notamment depuis la découverte d'une fréquence élevée de ce variant dans la population générale (141). Cela soutient cependant l'hypothèse que certains variants de la podocine à l'état hétérozygotes ne produisent pas d'effet phénotypique perceptible, alors que cohérités avec des variants hétérozygotes de *COL4A3/COL4A4*, ils contribuent à aggraver la présentation clinique (134).

Il est également possible qu'il existe d'autres variants « cachés » sur un autre allèle de *COL4A*, notamment intronique profond, puissent par exemple être responsable de l'apparition d'un site accepteur d'épissage conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée, classant en réalité le patient comme ayant un ARAS (142) (*Cf partie VII-D*). Par ailleurs, le poids des facteurs environnementaux tels que le tabagisme, alimentation riche en protéines animales, le surpoids ou le diabète, sur un terrain génétiquement déterminé peut aggraver la fragilité de la MBG (134). Ainsi, sur 155 patients porteurs de la mutation p.G1334E à l'état hétérozygote pour *COL4A3*, les présentations phénotypiques étaient extrêmement variables, avec après 50 ans 44% des patients présentant une insuffisance rénale chronique, alors que 29% présentaient uniquement une hématurie microscopique sans protéinurie, suggérant l'impact de facteurs exogènes environnementaux sur le développement du phénotype (106). Pour toutes ces raisons, aucune cohorte n'a réussi à notre sens à établir de lien génotype-phénotype précis dans le cas des ADAS. Beaucoup de questions persistent donc concernant cette entité. Est-ce que les cas de ADAS avec phénotype de SA ne sont pas simplement lié à un défaut des tests génétiques de routine (variant intronique profond sur l'autre allèle conduisant à un défaut d'épissage par exemple) ? Comment un même variant génétique peut-il provoquer un même phénotype à l'état homozygote

ou hétérozygote ? Quel conseil génétique apporter devant la difficulté à prédire le réel risque de transmission de la maladie à un descendant sur deux, comme habituellement admis pour les autres maladies « autosomiques dominantes » (143) ? Quelles précautions prendre en cas de dons vivants chez un donneur potentiel asymptomatique présentant un variant à l'état hétérozygote ?

D. Syndrome d'Alport avec recherche génétique négative.

Il existe des cas de SA typiques (hématurie microscopique, IF négative à la biopsie cutanée, antécédents familiaux...) pour lesquels aucun variant pathogène n'est retrouvé lors des méthodes classiques de séquençages de l'ADN. Il est estimé que le séquençage classique détecte entre 82 et 86% des variants pathogènes de *COL4A3-5* (144). Les variants non détectés peuvent par exemple atteindre des sites introniques profonds de régulation de l'épissage (145). Il peut également s'agir de mosaïcisme somatique (146), ou de variation du nombre de copies (147). Les mutations introniques profondes sont par nature indétectables dans l'analyse de l'exome (WES). Même le séquençage complet du génome (WGS) ne permet pas toujours d'identifier ce type de mutations. En effet, le très grand nombre de variants introniques retrouvés par rapport à la séquence de référence, et la faible prédictibilité des analyses *in silico* pour ces mutations introniques peuvent rendre le WGS à défaut. L'analyse du transcriptome, c'est-à-dire l'amplification de l'ensemble des ARNm exprimés par un tissu ou une cellule, pourrait être un outil intéressant pour « démasquer » ces mutations affectant l'épissage ou la régulation de ce dernier. Pour *COL4A5*, certaines équipes ont pu travailler à partir de fibroblastes de biopsies cutanées (148)(39). Pour *COL4A3* et *COL4A4*, l'isolement des podocytes est plus délicat. Une piste pourrait être de travailler à partir d'échantillons urinaires (149)(148). Ainsi, en analysant le transcriptome urinaire de cinq patients suspects de SA non apparentés

par cette technique, avec des résultats de WES négatifs, Wang *et al.* ont réussi à isoler chez quatre d'entre eux un variant intronique profond pathogène sur *COL4A4* (148). Dans le même sens, à partir de l'amplification des ARNm de fibroblastes cutanés, Boisson *et al.* ont récemment mis en évidence la présence de variants introniques profonds de *COL4A5* responsables d'un épissage aberrant chez 17 des 19 patients XLAS étudiés, ces derniers présentant par ailleurs un WES négatif (39). Il existait dans cette étude une corrélation significativement positive entre la proportion occupée par les transcrits aberrants parmi l'ensemble des transcrits de *COL4A5* et la sévérité clinique des patients (39). Notons que la concordance entre les prédictions *in silico* (NSPLICE, NetGene2, SpliceAI, MaxEntScan...) et transcriptomiques étaient faibles dans cette étude. Ces techniques ne sont pas encore déployées en routine, mais permettront probablement dans de prochaines années de « rattraper » un nombre non négligeable de diagnostics génétiques. Une meilleure connaissance de ces mutations affectant la régulation de l'épissage pourrait de même ouvrir la voie à de nouvelles thérapies spécifiques, tels que l'usages d'oligonucléotides spécifiques (39).

VIII. Association entre le Syndrome d'Alport et d'autres glomérulopathies

A. Hyalinose segmentaire et focale

Plusieurs études décrivent un lien entre lésions de HSF et SA (150). La HSF est une lésion anatomopathologique fréquente, caractérisée par des altérations podocytaires, avec dépôts hyalins et sclérose segmentaire. Elle peut être idiopathique (probablement auto-immune), adaptative (hyperfiltration relative du fait d'un phénomène de réduction néphronique) ou d'origine génétique. La physiopathologie des lésions de HSF dans le SA peut être génétique, avec des formes associant des variants *COL4A* et des variants affectant l'homéostasie podocytaire (*Cf supra*) (138). Elle est cependant le plus souvent d'origine adaptative. La MBG défectueuse dans le

SA serait à l'origine d'une perte des podocytes (151), susceptible d'induire une hyperfiltration glomérulaire, évoluant par la suite vers une progression de l'insuffisance rénale et l'apparition histologique de lésions de HSF constituées, apparaissant à un stade tardif de la maladie (152). Une origine génétique ne doit cependant pas être méconnue, notamment chez un sujet jeune et/ou avec présence d'antécédents familiaux. Cela complexifie ainsi la situation, et de nombreuses études révèlent des cas de HSF présumés génétique avec finalement mise en évidence de mutations de *COL4A* sur les données de WES (153), pouvant être retrouvées dans certaines séries chez près de 10% des HSF familiales (154). Certaines études suggèrent même que les mutations de *COL4A3*, *COL4A4* et/ou *COL4A5* pourraient être plus fréquentes que les mutations « propres au podocyte », apanage des HSF génétiques (155). La recherche génétique de mutations pour les chaînes $\alpha3\alpha4\alpha5$ devrait dès lors être réalisée systématiquement en cas de HSF suspect d'être d'origine génétique (155). Sur le plan pronostic, les lésions de HSF sont généralement associés à une protéinurie de débit souvent plus important que les SA « purs », parfois de rang néphrotique, et à une fonction rénale généralement plus altérée (156). Dans la cohorte de Cosio *et al.* incluant 1054 biopsies rénales, dont 54 présentant une TBMN, les patients qui présentaient de façon associée une HSF (n=10) présentaient cliniquement une protéinurie plus importante, une hypertension artérielle plus sévère et une fonction rénale plus dégradée (85). La cortico-sensibilité de certaines TBMN avec lésions d'HSF interpellent néanmoins quant à la pathogénicité de ces variants. Ainsi, Nogueira *et al.* rapportent le cas de cinq patients présentant des lésions de HSF ainsi qu'une MBG amincie en ME, dont deux présentaient un syndrome néphrotique et les trois autres une protéinurie importante. Tous présentaient une hématurie microscopique. Les trois patients ayant bénéficié d'une corticothérapie ont présenté une amélioration

significative de leur protéinurie (157), faisant discuter le diagnostic différentiel de HSF primitive (« auto-immune »).

A. Syndrome d'Alport et Néphropathie à IgA

1. Généralités

La néphropathie à IgA (IgAN) est la glomérulonéphrite primitive la plus courante dans le monde entier. Elle est plus fréquente chez les patients originaires d'Asie de l'Est, et est plus rare chez les patients d'origine Africaine ou Afro-américaine. Elle est associée à une grande hétérogénéité phénotypique, allant de l'hématurie microscopique isolée sans insuffisance rénale au syndrome de glomérulonéphrite rapidement progressive nécessitant parfois la dialyse en urgence. Le diagnostic est histologique, avec en IF des dépôts diffus dans le mésangium d'IgA1 polytypiques dominants par rapport aux IgG ou aux IgA2. En microscopie optique, on peut observer une expansion mésangiale, avec prolifération mésangiale, parfois associées à une prolifération endo-capillaire voire extra-capillaire (158). Sur le plan clinique, la néphropathie à IgA, associant classiquement hématurie microscopique et/ou macroscopique récidivante reste le principal diagnostic différentiel du SA. Seule une biopsie rénale permet de distinguer ces deux entités (159). Dans les deux cas, il peut exister des antécédents familiaux de néphropathie glomérulaire et/ou d'hématurie microscopique (160).

2. Association entre la néphropathie à IgA et le SA

En 1996, Berthoux *et al.* décrivent la présence d'un amincissement de la MBG chez 23 patients (39%) d'une cohorte de 59 patients présentant une IgAN (161). Plusieurs études ont par la suite mis en évidence un amincissement de la MBG dans d'authentique IgAN (162). Par ailleurs, des cas d'IgAN ont été décrits comme associés à des variants pathogènes de *COL4A*. Li *et al.* rapportent ainsi, le cas d'un jeune

patient de neuf ans, d'origine Chinoise, sans notion de consanguinité, présentant une mutation hémizygote pour *COL4A5* (c.1902delA) et une IgAN en histologie (Oxford M0S1E0T1). La mère et la sœur du patient présentaient toutes deux une hématurie microscopique (163). Une cohorte de 10 familles irlandaises, dont au moins un membre présentait une IgAN, a mis en évidence pour deux familles des variants dans *COL4A* : un variant probablement pathogène de *COL4A5* (p.Gly1143Ser) et un variant de classe III de *COL4A3* (p.Leu1474Pro) (160). Dans la même veine, un WES a été réalisé chez 46 familles dont un membre présentait une IgAN prouvée histologiquement, avec au moins un autre membre présentant une IgAN, une hématurie microscopique ou une néphropathie indéterminée. Douze de ces 46 familles présentaient un variant des gènes *COL4A*, dont 9 probablement pathogènes (classes IV ou V), avec dans le détail 6 hétérozygoties pour *COL4A3* ou *COL4A4* et 3 hémizygoties pour *COL4A5*. Ces variants incluaient 7 substitutions affectant la glycine et 2 décalage du cadre de lecture (164). De même, l'étude d'une cohorte de 36 IgAN pédiatriques retrouvait pour 4 enfants (11%) un variant pathogène dans *COL4A3*. Le phénotype était celui d'une IgAN, avec de manière notable un cas de récurrence après transplantation rénale. Les 4 enfants étaient répondeurs aux immunosuppresseurs sur le plan histologique et clinique, avec notamment une diminution de la prolifération cellulaire et une stabilisation du DFGe sous traitement. Néanmoins, par rapport aux autres IgAN sans variants, le pronostic paraissait plus sévère, avec plus de glomérulosclérose, et une moins bonne fonction rénale au cours du suivi (165).

3. Hypothèses physiopathologiques

La IgAN est liée à un défaut de galactosylation de l'IgA1, entraînant un défaut d'élimination de ces immunoglobulines, et un dépôt dans le mésangium (166). Une étude comparant un groupe de patients présentant une IgAN associée à un

amincissement de la MBG prouvé par biopsie rénale (n=22) à un groupe de patients présentant une IgAN « classique » (n=22), a montré une tendance à une sur-sialylation alpha de l'IgA1 native avec défaut de galactosylation terminale dans le groupe IgAN isolée, mécanisme non retrouvé chez les patient présentant en plus un amincissement de la MBG (167), sous-entendant une physiopathologie distincte pour cette dernière entité. Une autre hypothèse pourrait une fois encore celle de la théorie des « multiples hits », l'IgAN se surajoutant à une MBG « fragilisée » par un variant pathogène de *COL4A*, conduisant à une expression phénotypique peut-être plus marquée de la néphropathie.

IX. Néphropathie kystique et Syndrome d'Alport

La présence de mutations du collagène de type IV associé à un syndrome multi-kystiques a initialement était décrite en cas d'atteinte de la chaîne $\alpha 1$ (*COL4A1*), essentiellement présente dans les membranes basales vasculaires, mais également en plus faible quantité dans les membranes des tubules distaux et proximaux, et peut s'intégrer dans le syndrome de HANAC, caractérisé notamment par la présence d'anévrismes vasculaires, d'hémorragies intracérébrales spontanées et d'une multi-kystose rénale (80). La présence de kystes rénaux dans le syndrome d'Alport ne fait pas *consensus*, et n'appartient pas à la description « classique » de la maladie. Certaines études rapportent cependant la présence d'un nombre non négligeable de kystes chez ces patients. Ainsi, Savige *et al.* rapportent le cas d'un patient de 49 ans présentant de multiples kystes rénaux bilatéraux sans augmentation du volume des reins, et sans kystes hépatiques, associé à un XLAS (c.358G>A, p.Gly120Ser). Il ne présentait aucune mutation dans les gènes de multikystose habituels (*PKD1*, *PKD2*, *DNAJB11*, *HNF1B*, *GANAB*...). Les individus porteurs de la mutation dans sa famille ne présentaient quant à eux aucuns kystes à l'imagerie rénale (168). D'autres cohortes

décrivent de multiples kystes associés à des variants hétérozygotes de *COL4A3* et de *COL4A4*. Dans 4 familles hétérozygotes pour *COL4A3* (dont deux mutations, G1334E et G871C), les patients présentaient des kystes médullaires multiples, empêchant la biopsie rénale pour deux d'entre eux, tandis que les autres présentaient des lésions de HSF en MO (132). Dans une cohorte de 18 patients multikystiques ne présentant pas de variants pathogène pour *PKD1* ou pour *PKD2*, près d'un tiers (n = 5) présentaient une mutation des gènes *COL4A* (4 patients présentaient une mutation hétérozygote pour *COL4A4* (2 mutations du site d'épissage et 2 variants entraînant un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon STOP prématuré), et un patient présentait une mutation faux-sens de *COL4A5*). Notons qu'un sixième patient présentait quant à lui une mutation faux-sens de *COL4A1* (syndrome de HANAC) (169)). Dans un modèle de chiens bull-terrier présentant un ADAS, on notait de manière intéressante la présence de dilatation kystique de l'espace capsulaire de Bowman et des tubules rénaux (170). Les kystes se développant chez les patients ayant une atteinte des chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$ ou $\alpha 5$ semblent se différencier de ceux de la polykystose rénale autosomique dominante, comme étant notamment plus petits, sans néphromégalie, et sans déformation du pourtour des reins. Ils sont présents dans la corticale et dans la médullaire, et ne sont pas associés à des kystes hépatiques (169). Ils sont pour la plupart décrits avant l'âge de 50 ans, et leur croissance semblent très lente. Dans la cohorte de Sevillano *et al.*, des kystes bilatéraux et multiples étaient présents chez 56% (n=9) de leurs patients TBMN avec protéinurie, et absents en cas de protéinurie négative. Ils pouvaient être présents en cas d'altération de la fonction rénale ou non dans cette étude (156). Il ne semble pas y avoir de lien entre la gravité du variant pathogène sur la protéine (décalage du cadre de lecture, non-sens...) et la présence ou non de kystes (152). La physiopathologie exacte de l'apparition des

kystes dans le syndrome d'Alport n'est pas connue, mais il est probable que ceux-ci apparaissent à partir de la MBG et/ou de la membrane tubulaire distale étant donné la distribution de l'hétérotrimère $\alpha3\alpha4\alpha5$ dans le rein mature. Dans les récentes déclarations de la Conférence de Consensus sur le SA de 2023, les experts ont néanmoins estimé qu'il n'existait actuellement pas assez de preuve pour recommander la recherche de variants pathogènes de *COL4A* en cas de maladie rénale kystique (100).

X. Traitements

A. Inhibiteurs du système rénine-angiotensine.

En l'absence de traitement spécifique actuellement disponible, la base du traitement actuel du SA repose essentiellement sur la néphroprotection. Comme dans les autres néphropathies glomérulaires, la pierre angulaire du traitement repose donc sur les inhibiteurs du système rénine-angiotensine (SRA). L'essai EARLY PROTECT rapportait ainsi une efficacité des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) contre *placebo* pour ce qui était de la survie rénale, et ce d'autant que le traitement était instauré précocement (171). Les recommandations actuelles préconisent ainsi l'administration précoce d'un inhibiteur d'un IEC ou d'un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II (ARA2) (172). Certains auteurs vont jusqu'à recommander l'introduction d'un bloqueur du SRA dès le diagnostic chez les hommes XLAS et les homozygote ou hétérozygote composite pour *COL4A3-COL4A4* si l'âge est ≥ 24 mois, et ce même en l'absence d'anomalie du sédiment urinaire (hématurie et/ou protéinurie) (173). Pour les femmes XLAS ou pour les ADAS, les recommandations préconisent l'introduction de ce traitement en cas d'apparition d'une micro-albuminurie (173). Enfin, une méta-analyse de 2023 (compilant les données de 8 études, soient 1182 patients), va peut-être remettre en questions ces préconisations, comme l'effet protecteur

observé sur la pente de décroissance du DFGe semblait important chez l'ensemble des différents groupes de patients étudiés, et ce quelle que soit le mode de transmission de la maladie (XLAS masculins, XLAS féminins, ARAS ou ADAS) (174).

B. Inhibiteurs de SGLT2.

Sur le plan théorique les inhibiteurs de SGLT2 (SGLT2i) diminuent la pression intra-glomérulaire et la protéinurie en favorisant la diurèse osmotique par glycosurie, avec natriurèse concomitante et vasoconstriction des artérioles afférentes. Ils existent de nombreuses preuves de leur efficacité dans les néphropathies glomérulaires (glomérulosclérose diabétique, l'IgAN...), mais aussi dans la néphroprotection de l'IRC « tout venant ». Notons toutefois que l'essai DAPA-CKD incluait un faible nombre de patient présent un SA (175). Des cohortes avec un faible nombre de patients (n=5 et n=4 respectivement) se sont intéressées spécifiquement à l'utilisation de la Dapaglifozine chez les patients présentant un SA. Ces études mettaient en évidence une diminution de la protéinurie, toutefois sans modification du DFGe, sur des durées durée de suivi cependant courtes (176).

C. Thérapeutiques en cours d'essais

Beaucoup de thérapeutiques sont actuellement en cours d'études chez l'homme avec des données publiés ou non (177). Nous citerons par exemple :

- **Anti-miR-21.** miR-21 est un microARN (miARN), qui s'est avéré être hyper-exprimé chez les souris (178) et chez les patients COL4A3 -/- (179), favorisant ainsi une voie pro-fibrotique. L'utilisation d'oligonucléotides anti-miR-21 a montré une efficacité dans le ralentissement de la progression de l'IRC chez des rongeurs (178). L'étude de phase 2 HERA (*Clinical Trial # : SAR339375*) testant le Lademirsén (anti-miR-21) contre *placebo* chez 48 patients présentant un SA est actuellement en cours.

- Le **Bardoxolone Méthyl**, a deux mécanismes d'action : il inhibe d'un part le facteur nucléaire NF κ B, et induit d'autre part la liaison du facteur 2 au facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf2). L'ensemble conduit à une action anti-inflammatoire et anti-oxydante. Ce médicament améliorait la fonction rénale dans un essai clinique de phase 3 chez des patients diabétiques et IRC (180), mais suscite une controverse en raison d'un nombre non négligeable de complications cardiovasculaires. L'essai CARDINAL de phase 3 n'a pas fourni de preuves de l'efficacité du Bardoxolone Méthyl pour ralentir la progression de l'IRC chez les patients présentant un SA. On observait de plus chez ces patients une majoration de l'albuminurie (181). De ce fait, les principales agences de régulation du médicament, FDA et l'EMA (cette dernière en décembre 2022) se sont récemment opposées à la délivrance d'une autorisation de mise sur le marché du Bardoxolone, devant un rapport bénéfice-risque jugé défavorable.
- **Atrasentan**, est un bloqueur conjoint des récepteurs de type 1 de l'endothéline et de l'angiotensine de type II. L'endothéline est un puissant vasoconstricteur, et il a été montré que ce double blocage chez des patients présentant une HSF réduisait considérablement la protéinurie par rapport à l'usage d'Irbesartan seul (182). Ce type de médicament est actuellement en cours d'étude pour la néphropathie à IgA et le syndrome d'Alport (AFFINITY (NCT04573920)).

D. Recherche fondamentale.

De nombreuses molécules sont actuellement en cours de recherche sur des modèles animaux. Le Paricalcitol, forme de vitamine D active ayant la capacité d'inhiber la production de rénine, a permis de réduire de manière significativement plus importante la protéinurie chez les souris traitées conjointement avec un inhibiteur du SRA que

chez celles ayant uniquement reçu un inhibiteur du SRA (183). La Cérivastatine, inhibiteur de l'HMG-CoA-réductase, retarderait la survenue d'apparition de l'insuffisance rénale et des symptômes urémiques chez les souris (184). Notons que cette statine avait perdu son AMM en 2001 du fait d'effets indésirables graves significativement plus importants que pour les autres statines, avec un rapport bénéfice/risque pour lutter contre la dyslipidémie jugée défavorable dans cette dernière indication. Des molécules chaperonnes (185), pouvant favoriser la formation de la triple hélice en cas de mutation faux-sens sont également en cours d'étude. Enfin des modèles expérimentaux de « réparation » de l'ADN utilisant la thérapie d'édition du génome, notamment à l'aide de CRISPR/Cas9, pourraient être prometteurs (177).

PARTIE II: Article original:

Original article

Exon location of glycine substitutions impacts renal survival in Autosomal Dominant Alport Syndrome

Marie-Sophie Pagniez¹, Victor Fages¹, Clémence Gatinois², Romain Larrue³, Timothée Laboux¹, Rémi Lenain¹, Olivier Grunewald³, Thomas Robert⁴, Laurent Mesnard⁵, Claire Rigothier² and François Glowacki¹.

1. Department of Nephrology, Kidney Transplantation and Dialysis, CHU Lille, University of Lille, 59037, Lille, France
2. Department of Nephrology, Transplantation, Dialysis and Apheresis, CHU Bordeaux, 33076, Bordeaux, France
3. Department of Toxicology and Genopathies, CHU Lille, University of Lille, 59037, Lille, France
4. Department of Nephrology and Kidney transplantation, Conception Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, 13005, Marseille, France
5. Service de Soins Intensifs Néphrologiques et Rein Aigu (SINRA), French Intensive Renal Network, Tenon Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 75020, Paris, France

Corresponding author:

Marie-Sophie Pagniez, Department of Nephrology, Kidney Transplantation and Dialysis, CHU Lille, University of Lille, F-59037 Lille, France.

E-mail address: marie-sophiepagniez@hotmail.fr

Key words: Alport syndrome, Autosomal dominant Alport syndrome, *COL4A3*, *COL4A4*, Collagen IV, Glycine substitution.

Manuscript words count: 3254/4000 words

Abstract words count: 194/200 words

ABSTRACT:

Background: Unlike X-linked or autosomal recessive Alport Syndromes, no clear genotype/phenotype correlation as yet been demonstrated in patients carrying a single variant of *COL4A3* or *COL4A4* (ADAS).

Method: We carried out a multicenter retrospective study to assess the risk factors involved in renal survival in patients presenting a single pathogenic variant on *COL4A3* or *COL4A4*.

Results: 97 patients presenting a single pathogenic variant of *COL4A3* or *COL4A4* were included. The prevalence of ESKD during follow-up was 28.7% (median age: 62.8 [CI95, 49.8-NA] years). 23 patients carried a “severe” mutation (frameshift, stop gains, extensive deletion, impacting splicing), and 61 patients presented a glycine substitution in a collagen domain. The location of the mutation in the distal exons was associated with worse renal survival in patients with glycine substitution (HR=3.9 (1.2-13), $p=0.02$), with ESKD occurring 14 years earlier ($p=0.014$), and with a more pronounced decline in eGFR ($p=0.04$). Conversely, the presence of a severe mutation did not impact renal survival.

Conclusion: Our results confirm that ADAS can lead to ESKD. We demonstrated that a glycine substitution involving the distal exons had a negative impact on renal survival in ADAS patients, probably due to a trimerization defect.

ABBREVIATIONS LIST :

- ADAS: Autosomal dominant Alport syndrome
- ARAS: Autosomal recessive Alport syndrome
- AS: Alport syndrome
- eGFR: estimated Glomerular filtration rate
- EM: Electronic microscopy
- ESKD: End-stage kidney disease
- FSGS: Focal segmental glomerulosclerosis
- GBM: Glomerular basement membrane
- Gly: Glycine
- IQR : Interquartile range
- NC : Non-collagenous domains of type IV collagen
- NC1: Non-collagenous domain of the C-terminal end
- NGS: Next-generation sequencing
- RAAS: Renin-angiotensin-aldosterone system
- SD: Standard Deviation
- SNVs: Single nucleotide variants
- TBMN: Thin basement membrane nephropathy
- WES: Whole exome sequencing
- XLAS: X-linked Alport syndrome

INTRODUCTION

In 1927, Doctor Arthur Cecil Alport described for the first time a nephropathy associating hematuria, glomerular proteinuria (1), deafness and ocular abnormalities (2) which will posthumously be named Alport Syndrome (AS). After autosomal dominant polycystic kidney disease, AS is now considered to be the second cause of hereditary nephropathy, with an estimated prevalence of 1/5000 (3)(4), and is the most frequently detected genetic disease among end-stage kidney diseases (ESKD) of unknown origins (5).

Pathogenic variants in *COL4A3*, *COL4A4* and/or *COL4A5* genes (6)(7) lead to a defective synthesis of $\alpha3$, $\alpha4$ and/or $\alpha5$ chains of type IV collagen (8) which is the main constituent of several basement membranes, notably glomerular basement membrane (GBM) (9). Each of these chains consists of glycine (Gly)-Xaa-Yaa triplet repeats interrupted by non-collagenous domains (NC) (10). The chains recognize each other *via* their NC1 domain – located at the C-terminal end - and will trimerize between them like a “zipper” towards the 7S end – on the N-terminal side (11) - (from 3' to 5', *i.e.* in the opposite direction to that of the transcription), to thus form an $\alpha3\alpha4\alpha5$ heterotrimer (**Figure 1**). Missense variants resulting in Gly substitutions in the collagenous repeats are the most frequent pathogenic, variants with variable phenotypes (10).

Classical AS phenotype is usually seen in men with X-linked Alport syndrome (XLAS) and in patients with autosomal recessive AS (ARAS), while patients with heterozygous disease-causing variants in *COL4A3* or *COL4A4*, known as autosomal dominant AS (ADAS), present with highly variable phenotypes. These phenotypes range from asymptomatic patients or with isolated microscopic hematuria (historically “benign familial hematuria” or “thin basement membrane nephropathy” (TBMN)) (12)(13)(14), to patients with chronic renal failure, sometimes rapidly progressive (15)(16).

Thus, in 2018, a group of experts proposed a classification based exclusively on genetic sequencing results (17) now including ADAS patients for whom pathogenicity was once debated (18). In XLAS and ARAS patients, ESKD occurs early and multiple cohorts were able to establish a strong genotype-phenotype correlation, particularly in the case of truncating mutations (19)(20)(21)(22)(23)(24). In ADAS patients, ESKD prevalence could reach up to 30% of cases after the age of 70 (25) but clear genotype-phenotype correlations are still lacking (12)(13)(14).

In this multicentric study, we describe clinical, histopathological and genetic characteristics of patients with ADAS and we explore correlation between molecular features and renal outcomes.

METHODS

Participants

We collected data on all patients carrying a single pathogenic variant of *COL4A3* or *COL4A4*, identified between January 2011 and January 2023, followed in Nephrology in three university French hospitals of Lille, Bordeaux and Paris-Tenon. We excluded patients with digenic Alport syndrome (patients with 2 pathogenic variants of *COL4A3* and/or *COL4A4*), X-linked Alport syndrome, patients homozygous or compound heterozygous compounds for *COL4A3* and/or *COL4A4*. Genetic analyses were performed after obtaining written consent from patients. All patients were 18 years or older at the time of genetic testing.

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 DEC22-312#.

Clinical data

Clinico-biologic characteristics were recorded including longitudinal eGFR and renal outcomes. We recorded data from medical records including date of birth, sex, smoking status, blood-pressure, proteinuria and hematuria, treatment with renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) inhibitors, history of vascular disease,

ophthalmological damage and type of hearing loss. Kidney function was assessed by the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation for calculating estimated glomerular filtration rate (eGFR). Age at the time of ESKD was defined as the age at which the patient had a CKD-Epi-calculated eGFR < 15 mL/min/1.73m² or with preemptive transplantation or started on dialysis. Histopathological findings were collected for patients who underwent kidney biopsies.

Genetic Testing

Genetic testing was performed either by Sanger sequencing or next-generation sequencing (NGS) of a kidney disease gene panel or a whole exome sequencing (WES). Variant-calling was performed by GATK v3.7 or GATK v4.1.4.0 (Broad Institute, Cambridge, USA) for panel or DRAGEN v_3.9.5 (Illumina, San Diego, USA) for WES. We included patients with likely pathogenic and pathogenic variants (respectively class IV and V according to ACMG classification). Patients with a variant of undetermined significance (class III ACMG classification) were excluded. *In silico* analysis were performed to predict functional effects of the variants using SIFT or PolyPhen-2. For splicing defects prediction, we used SPiP (Raphael Leman, Centre Bacless) and SpliceAi (Illumina, San Diego, USA). Variants were classified into the following categories: frameshift variant, missense variant, splice variant, stop gains, short deletion or duplication, extensive deletion (one or more exons). We defined severe protein truncating variants as single nucleotide variants (SNVs) predicted to introduce a premature stop codon or to disrupt a splice site, small insertions or deletions predicted to disrupt a transcript's reading frame, and extensive deletions that remove the full protein coding sequence (26). Molecular features were examined for each substitution: molecular location of the variant (exons 1 to 20, or exons 21 to carboxyl

terminus (C-ter)) and the degree of instability caused by the substitution using the Grantham scoring. Missense mutations caused by glycine substitutions of collagenous domains were analyzed separately.

Statistical analysis

Quantitative parameters are presented as median and IQR or means and SD when appropriate and qualitative parameters are presented as number of observations with percentages. Kaplan-Meier curves were generated to display ESKD-free survival. We used date of birth as starting point. Patients who had not reached ESKD at the end of the study (outcome of interest not occurring during follow-up time) were considered censored individuals. Censoring time was defined as age at last follow-up. No patients died before reaching ESKD. Separate survival curves were produced for different molecular features using the Kaplan–Meier method, and compared using the log-rank test.

Group comparisons and hazard ratios with 95% CIs were calculated by means of the Cox proportional hazard model. For missense variants with glycine substitution, we performed only univariate Cox analysis since studied variables such as proteinuria and patients' clinical characteristics do not constitute confounders as they are on the pathway between exposure and outcomes (27). The raw associations between molecular features and renal outcomes can thus be considered as unbiased. Kidney function was assessed for patients with at least two eGFR measurements with mixed effect models with random intercept and random slopes. Data were analyzed with R software version 3.6.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

Study population

Baseline clinical characteristics of the cohort population are detailed in **Table 1**. A total of 82 families (n=97 patients) were included in our study, with 47 and 50 patients carrying a heterozygous disease-causing variant in *COL4A3* or *COL4A4*, respectively. 68 patients (70%) were women, and mean age at diagnosis was 38.5 (+/- 14.1) years. Median follow-up in nephrology was 4.1 [IQR 1.0-7.9] years.

Kidney disease

Mean eGFR at diagnosis was 80.9 (+/-37.6) mL/min/1.73m². 68 patients had proteinuria at diagnosis or during follow-up and notably 10 presented with a nephrotic syndrome. Microscopic hematuria was detected in 76 patients (78.4%), and episodes of macroscopic hematuria episodes were found in 2 patients. The majority of the patients (52.2%) had a first-degree family history of ESKD. 76% of patients used RAAS inhibitors during follow-up. Median renal survival was 62.8 years [CI95, 55.5-NA]. Mean eGFR slope was -2.12 (+/-1.36) mL/min/1.73m².

Extra renal manifestations

15/89 patients showed perception deafness at a median age of 35.7 [IQR, 22.1-53.9] years with two of them requiring hearing aid. 8/89 had ocular abnormalities, 4 patients with glaucoma, 3 with early cataract, 2 with peripheral retinopathy and none developed lenticonus.

Histologic features

41 patients underwent renal biopsy, at a mean age of 35.6 (+/-12.4) years. Main histologic features are described in **Table 2**. Patients were classified according to glomerular lesions: 16 patients with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), 6 with expansion of the mesangial matrix (including 4 with mesangial proliferation) and 2 with mesangial IgA deposits. 13 patients presented with vascular lesions (arteriolar hyalinosis, arteriosclerosis, intimal fibrosis, arteriolar thrombi in 10, 7, 6 and 2 patients respectively). Electronic microscopy (EM) was performed in 9 patients, 6 presenting with thin GBM and 3 with thick GBM. Skin biopsy was performed in 14 patients. All showed a normal $\alpha 5$ (IV) collagen chain staining pattern.

Genetic Testing

Genetic diagnosis was made using WES, NGS of a kidney disease gene panel or Sanger sequencing in 36, 48 and 7 patients respectively. Missense variants were the most frequent type of disease-causing variant (**Figure 2**), glycine substitution being the most commonly found variant (n=61 patients). Details of all substitutions are presented in **Supplemental Table S1**. Severe variants were found in 23 patients with transcript's reading frame disruption, nonsense mutation, extensive deletion or splice site mutation found in 13, 4, 3 and 3 patients, respectively.

Correlation between molecular features and renal survival

We found no significant difference in renal survival between *COL4A3* and *COL4A4* patients (p=0.28) (**Figure 3A**). Considering the whole study population, we found no significant difference in renal survival when comparing protein truncating and nontruncating variants (p=0.95) (**Figure 3B**), with median renal survival of 62.8 [CI95,

49.8-NA] and 62.1[CI95, 56.1-NA] years, respectively. Mean eGFR slopes were also non significantly different between truncating and nontruncating variants (**Table 3**). When focusing on patients with missense mutations caused by glycine substitutions (n=61 patients), we found that renal survival was significantly better (**Figure 4**) (p=0.014) in patients who had a variant in proximal exons (1 to 20) compared to distal exons (21 to C-ter), with a median survival of 69.5 [CI95, 67.6-NA] and 55.5 [CI95, 54.8-NA] years, respectively. Mean eGFR slopes were also significantly different according to variant location, -1.7 (+/-0.53) *versus* -2.3 (+/-1.26) mL/min/1.73m² *per* year, in patients with variant in exons 1 to 20 and exons 21 to Cter, respectively (**Table 3**).

Using Cox proportional hazards model (**Table 4**) for renal survival in patients with glycine missense variants, we found no significant associations with gender neither with molecular volume and polarity of the glycine-substituted amino-acid, predicted by the Grantham score. Variant molecular location in exons 21 to Cter compared to exons 1-20, was associated with a significantly worse renal survival (HR=3.9; 95%CI 1.2-13).

DISCUSSION

In this study, we described clinical, histological and genetic characteristics of a French multicentric cohort of 97 patients with a single pathogenic variant on *COL4A3* or *COL4A4*.

Until recently, autosomal dominant Alport syndrome (ADAS), was sometimes confusedly referred as “benign familial hematuria” or “thin basement membrane nephropathy” (TBMN). In the light of the recent literature, these terms should not be used anymore. Indeed, median renal survival in our study was only 63 years, and these results are consistent with those already published. Deltas *et al.* (25) showed an evolution towards ESKD in 10% of ADAS over 50 years old, and in 30% of those over 70. Likewise, Pierides *et al.* (28) also found an evolution towards ESKD of 14%, with a median age of 60 years. Likewise, “Thin Basement Membrane Nephropathy” does not seem appropriate to define these patients either. In our cohort, EM was performed in 9 patients, 6 had a thin basement membrane but 3 had a description of thick basement membrane. These different pathologic features have already been described (29)(30)(31). Our study therefore reinforces the data in the literature and supports the need to clearly abandon these improper terms, carrying a false idea of low pathogenicity.

We described only a few extrarenal manifestations (16.9% of deafness and 8.5% of ocular abnormalities (no patient had lenticonus), which was comparable with other studies, who described infrequent extrarenal involvements with only moderate ocular lesions (simple corneal erosions or retinal spots) in 2.5% (32), and severe hearing damage in only 8% of ADAS patients (12). This phenotype in ADAS patients is different from phenotypes described in male XLAS where deafness and ophthalmological

damage are associated with a more severe phenotype and a more rapid decline in renal function (33).

ADAS covers a very wide variety of clinical phenotypes, from asymptomatic patients to others presenting rapidly progressive kidney failure (34)(35). Several studies have attempted to explain this phenotypic variability, but, to our knowledge, none have succeeded in establishing a clear genotype-phenotype correlation. In male XLAS and ARAS, the impact of genetics on phenotype is well documented. First, numerous studies showed that age of onset of ESKD was correlated with the presence of so-called “severe” mutations (nonsense, frameshift, or responsible for large rearrangement) (20)(23)(24)(36)(37)(38). This phenomenon could be explained by the fact that in the case of truncating mutations, the mRNA would be degraded by the podocyte, preventing $\alpha 5$ chain expression, whereas in the case of missense substitutions, the $\alpha 5$ chain, although deficient, would still be produced and incorporated into the $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ heterotrimers (21). Conversely, no such clear relationship has been demonstrated in ADAS, the presence of a truncating variant being *i.e.* not associated with an earlier age of onset of ESKD compared to nontruncating variants in 252 patients with ADAS (12). These results are consistent with ours, the presence of a protein truncating variant showing no difference in renal survival.

As in other published series (10), nearly 2/3 of the mutations studied in our cohort were substitutions, most frequently impacting glycine in the collagen domains. These observations led us to focus more specifically on these substitutions, their nature and their location within the gene. In male XLAS, Gibson *et al.* have shown that the substitution of glycine by a “destabilizing” amino acid, particularly due to its allosteric bulking properties (arginine, valine, glutamic acid, aspartic acid, or tryptophan), was responsible for a median time to onset of ESKD of 7 years earlier (21). In ADAS, this

same study again did not find a correlation between these destabilizing substitutions and renal survival (21). In our cohort, we also challenged this hypothesis, with the use of the Grantham score. This score uses *in silico* predictions to assess the physicochemical characteristics of a substitution, by integrating in addition to the simple molecular volume, the polarity of the substituted amino acid. The Grantham score was not associated with renal survival in this study. It might not be the most accurate method for missense substitution classification, and other tools using validated computational algorithms could be useful (39). In addition to the nature of the substitution, it has been demonstrated that its location within the chain also seems to be able to influence prognosis in male XLAS patients. As described previously (**Figure 1**), the assembly of the three chains of the collagen trimer takes place from NC1 towards 7S (*i.e.* 3' towards 5' on the corresponding gene). Substitutions close to the NC1 end (therefore corresponding on the gene to the “distal” exons, close to C-terminal end (3')) could then be responsible for a greater functional impact on the protein, disrupting the assembly of the trimer “earlier” (**Figure 5**). This pejorative impact of the substitution location within distal exons has already been demonstrated in other collagenopathies, such as osteogenesis imperfecta (*COL1A1* mutation) (40). In male XLAS, a meta-analysis reported a significantly earlier onset of ESKD in patients with a missense Gly-Xaa-Yaa mutation, affecting the “distal” exons (21 to 47) of *COL4A5* (closer to NC1) compared to “proximal” exons (1 to 20) (closer to 7S) (24). Gibson *et al.* found similar results in male XLAS, but conversely did not demonstrate any correlation between the position of the substitution and the age of onset of ESKD in ADAS (21). To our knowledge, we demonstrate for the first time that glycine substitution occurring within the distal positions of the exons (21-C-ter) was associated with an increased risk of ESKD (HR=3.9, CI95% 1.2-13). Consistent with those results,

patients with a variant in the distal positions of the exons had a significantly higher decline in eGFR compared to those with a mutation in a proximal exon (-2.3 (+/-1.26) mL/min/1.73m²/year *versus* -1.7 (+/-0.53) mL/min/1.73m²/year, p=0.04).

Our results could suggest that correlation genotype-phenotype is less clear in ADAS than in male XLAS or in ARAS. Heterozygous disease-causing variants in *COL4A3/4* could be a genetic risk factor, causing a more "fragile" GBM, which in the context of added stress could then lead to a more severe kidney disease, which could even progress rapidly to ESKD. This "second hit" could be of different nature (environmental, cardiovascular risk factors, other nephropathy, other pathogenic variant) and could partly explain the great interindividual variability – sometimes even within the same family and presenting the same mutation (13) – which characterizes ADAS.

In our study, only 2/41 patients with renal biopsy presented with IgA deposits nephropathy but several associations between ADAS and have been previously described (41)(42)(43). Alport/FSGS associations are in fact frequently reported (44)(45), and among the ADAS patients with renal biopsy in our study, 41% presented this type of lesions. It has been demonstrated that FSGS was associated with greater proteinuria, more severe hypertension and more rapid decline of renal function in AS (46).

Phenotype variability could also be explained by the presence of another disease causing variant, notably variants affecting podocyte integrity (47)(48). Main associations reported in the literature are: *NPHS1* (Nephrin), *NPHS2* (Podocin) (49), *NEPH3* (Filtrin) (50), *LAMA5* (Laminin α 5) (51). It would then be a model of digenic transmission with a second variant contributing to a more severe clinical presentation (51).

Some authors support the possibility of another “hidden” variant, for example in deep intronic sequences regulating splicing (52), which is not accessible by traditional sequencing methods. The presence of such a variant in addition to a known *COL4A3/4* variant would reclassify ADAS into ARAS. For these patients, the analysis of the transcriptome could be an interesting tool to “unmask” these mutations, but is not routinely accessible yet (53)(22). Epigenetic signaling could also play a role through miRNA-mediated posttranscriptional regulation, notably microRNA21 (miR-21) which could contribute to kidney disease progression in Alport (54). Overall, clear prognosis factors are still lacking and make it difficult to give clear genetic counseling to ADAS patients (55).

Our study has several limitations. Firstly, it is a retrospective study, with inherent missing data. Second the limited number of patients might have induced discrepancies in genotype phenotype correlation, but it still remains one of the largest ADAS cohorts in the literature. Proteinuria was not followed in time so we did not include it as a time dependent variable but only as a categorical variable. In larger cohorts of ADAS patients, proteinuria appeared to be a predictive factor of renal survival (12). Third, we performed only univariate Cox analysis, but this was done purposely, taking birth as baseline to investigate molecular features for all patients as raw associations between molecular features and renal outcomes can be considered as unbiased. Proteinuria and patients' clinical characteristics were not included in the model as timing of 1st nephrology consult was different for all patients. Also, they do not constitute confounders as they are on the pathway between exposure and outcomes (27).

In conclusion, our results confirm that ADAS present with a wide phenotype variability and that it can lead to ESKD. Well-established risk factors for progression to ESKD in male XLAS and ARAS, such as the presence of a truncating mutation or the nature of the substitution, were not significantly associated with renal survival in our cohort. Predictors of renal survival are still lacking, but we describe for the first time that glycine substitution location in distal exons (21 to C-ter) is significantly associated with a worse renal survival. These results could help improve personalized genetic counseling and follow-up in ADAS patients. Our study thus provides new insight on the genotype-phenotype correlation in autosomal dominant Alport syndrome and underlines the need to explore other predictors for a better assessment of the progression of the disease. These results need to be confirmed in larger studies.

BIBLIOGRAPHY

1. Alport AC. HEREDITARY FAMILIAL CONGENITAL HAEMORRHAGIC NEPHRITIS. *Br Med J*. 1927 Mar 19;1(3454):504–6.
2. Savige J, Sheth S, Leys A, Nicholson A, Mack HG, Colville D. Ocular features in Alport syndrome: pathogenesis and clinical significance. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Apr 7;10(4):703–9.
3. Hertz JM, Thomassen M, Storey H, Flinter F. Clinical utility gene card for: Alport syndrome - update 2014. *Eur J Hum Genet*. 2015 Sep;23(9).
4. Gibson J, Fieldhouse R, Chan MMY, Sadeghi-Alavijeh O, Burnett L, Izzi V, et al. Prevalence Estimates of Predicted Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in a Population Sequencing Database and Their Implications for Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2021 Sep;32(9):2273–90.
5. Leenen E, Erger F, Altmüller J, Wenzel A, Thiele H, Harth A, et al. Alport syndrome and autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease frequently underlie end-stage renal disease of unknown origin—a single-center analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2022 Oct 1;37(10):1895–905.
6. Heidet L, Arrondel C, Forestier L, Cohen-Solal L, Mollet G, Gutierrez B, et al. Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jan;12(1):97–106.
7. Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Höyhty M, Shows TB, Tryggvason K. Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(4):1606–10.
8. Cosgrove D, Liu S. Collagen IV diseases: A focus on the glomerular basement membrane in Alport syndrome. *Matrix Biol*. 2017 Jan;57–58:45–54.
9. Peissel B, Geng L, Kalluri R, Kashtan C, Rennke HG, Gallo GR, et al. Comparative distribution of the alpha 1(IV), alpha 5(IV), and alpha 6(IV) collagen chains in normal human adult and fetal tissues and in kidneys from X-linked Alport syndrome patients. *J Clin Invest*. 1995 Oct;96(4):1948–57.
10. Savige J, Storey H, Watson E, Hertz JM, Deltas C, Renieri A, et al. Consensus statement on standards and guidelines for the molecular diagnostics of Alport syndrome: refining the ACMG criteria. *Eur J Hum Genet*. 2021 Aug;29(8):1186–97.
11. Sundaramoorthy M, Meiyappan M, Todd P, Hudson BG. Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. *J Biol Chem*. 2002 Aug 23;277(34):31142–53.
12. Furlano M, Martínez V, Pybus M, Arce Y, Crespí J, Venegas MDP, et al. Clinical and Genetic Features of Autosomal Dominant Alport Syndrome: A Cohort Study. *Am J Kidney Dis*. 2021 Oct;78(4):560-570.e1.
13. Kamiyoshi N, Nozu K, Fu XJ, Morisada N, Nozu Y, Ye MJ, et al. Genetic, Clinical, and Pathologic Backgrounds of Patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Aug 8;11(8):1441–9.

14. Savige J, Huang M, Croos Dabrera MS, Shukla K, Gibson J. Genotype-Phenotype Correlations for Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in X-Linked, Autosomal Recessive, and Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:865034.
15. Matthaïou A, Poulli T, Deltas C. Prevalence of clinical, pathological and molecular features of glomerular basement membrane nephropathy caused by COL4A3 or COL4A4 mutations: a systematic review. *Clin Kidney J*. 2020 Dec;13(6):1025–36.
16. Savige J, Rana K, Tonna S, Buzza M, Dagher H, Wang YY. Thin basement membrane nephropathy. *Kidney International*. 2003 Oct;64(4):1169–78.
17. Kashtan CE, Ding J, Garosi G, Heidet L, Massella L, Nakanishi K, et al. Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV α 345: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group. *Kidney Int*. 2018 May;93(5):1045–51.
18. Kashtan CE. Alport Syndrome: Achieving Early Diagnosis and Treatment. *American Journal of Kidney Diseases*. 2021 Feb;77(2):272–9.
19. Savige J, Gregory M, Gross O, Kashtan C, Ding J, Flinter F. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Feb;24(3):364–75.
20. Savige J, Storey H, Il Cheong H, Gyung Kang H, Park E, Hilbert P, et al. X-Linked and Autosomal Recessive Alport Syndrome: Pathogenic Variant Features and Further Genotype-Phenotype Correlations. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161802.
21. Gibson JT, Huang M, Shenelli Croos Dabrera M, Shukla K, Rothe H, Hilbert P, et al. Genotype-phenotype correlations for COL4A3-COL4A5 variants resulting in Gly substitutions in Alport syndrome. *Sci Rep*. 2022 Feb 17;12(1):2722.
22. Oka M, Nozu K, Kaito H, Fu XJ, Nakanishi K, Hashimura Y, et al. Natural history of genetically proven autosomal recessive Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2014 Sep;29(9):1535–44.
23. Storey H, Savige J, Sivakumar V, Abbs S, Flinter FA. COL4A3/COL4A4 mutations and features in individuals with autosomal recessive Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Dec;24(12):1945–54.
24. Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Jul;17(7):1218–27.
25. Deltas C, Pierides A, Voskarides K. Molecular genetics of familial hematuric diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Dec;28(12):2946–60.
26. Rivas MA, Pirinen M, Conrad DF, Lek M, Tsang EK, Karczewski KJ, et al. Impact of predicted protein-truncating genetic variants on the human transcriptome. *Science*. 2015 May 8;348(6235):666–9.
27. Ville S, Branchereau J, Cornuau A, Dantal J, Legendre C, Buron F, et al. The weekend effect in kidney transplantation outcomes: a French cohort-based study. *Transpl Int*. 2020 Sep;33(9):1030–9.
28. Pierides A, Voskarides K, Athanasiou Y, Ioannou K, Damianou L, Arsali M, et al. Clinico-pathological correlations in 127 patients in 11 large pedigrees, segregating one of

three heterozygous mutations in the COL4A3/ COL4A4 genes associated with familial haematuria and significant late progression to proteinuria and chronic kidney disease from focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Sep;24(9):2721–9.

29. Matthaïou A, Poulli T, Deltas C. Prevalence of clinical, pathological and molecular features of glomerular basement membrane nephropathy caused by COL4A3 or COL4A4 mutations: a systematic review. *Clin Kidney J*. 2020 Feb 10;13(6):1025–36.

30. Masuda Y, Yamanaka N, Ishikawa A, Kataoka M, Arai T, Wakamatsu K, et al. Glomerular basement membrane injuries in IgA nephropathy evaluated by double immunostaining for $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 2(\text{IV})$ chains of type IV collagen and low-vacuum scanning electron microscopy. *Clin Exp Nephrol*. 2015 Jun;19(3):427–35.

31. Dische FE, Anderson VE, Keane SJ, Taube D, Bewick M, Parsons V. Incidence of thin membrane nephropathy: morphometric investigation of a population sample. *J Clin Pathol*. 1990 Jun;43(6):457–60.

32. Colville D, Savige J, Branley P, Wilson D. Ocular abnormalities in thin basement membrane disease. *Br J Ophthalmol*. 1997 May;81(5):373–7.

33. Tan R, Colville D, Wang YY, Rigby L, Savige J. Alport retinopathy results from 'severe' COL4A5 mutations and predicts early renal failure. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Jan;5(1):34–8.

34. Tiebosch AT, Frederik PM, van Breda Vriesman PJ, Mooy JM, van Rie H, van de Wiel TW, et al. Thin-basement-membrane nephropathy in adults with persistent hematuria. *N Engl J Med*. 1989 Jan 5;320(1):14–8.

35. Temme J, Peters F, Lange K, Pirson Y, Heidet L, Torra R, et al. Incidence of renal failure and nephroprotection by RAAS inhibition in heterozygous carriers of X-chromosomal and autosomal recessive Alport mutations. *Kidney Int*. 2012 Apr;81(8):779–83.

36. Bekheirnia MR, Reed B, Gregory MC, McFann K, Shamshirsaz AA, Masoumi A, et al. Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2010 May;21(5):876–83.

37. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, Marchi MD, Rizzoni G, Renieri A, et al. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype- phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Apr;11(4):649–57.

38. Zhang Y, Böckhaus J, Wang F, Wang S, Rubel D, Gross O, et al. Genotype-phenotype correlations and nephroprotective effects of RAAS inhibition in patients with autosomal recessive Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2021 Sep;36(9):2719–30.

39. Tavgigian SV, Greenblatt MS, Lesueur F, Byrnes GB. In silico analysis of missense substitutions using sequence-alignment based methods. *Hum Mutat*. 2008 Nov;29(11):1327–36.

40. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat*. 2007 Mar;28(3):209–21.

41. Cambier A, Robert T, Hogan J, Rabant M, Peuchmaur M, Boyer O, et al. Rare Collagenous Heterozygote Variants in Children With IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep.* 2021 May;6(5):1326–35.
42. Stapleton CP, Kennedy C, Fennelly NK, Murray SL, Connaughton DM, Dorman AM, et al. An Exome Sequencing Study of 10 Families with IgA Nephropathy. *Nephron.* 2020;144(2):72–83.
43. Li Y, Groopman EE, D'Agati V, Prakash S, Zhang J, Mizerska-Wasiak M, et al. Type IV Collagen Mutations in Familial IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep.* 2020 Jul;5(7):1075–8.
44. Savige J, Harraka P. Pathogenic Variants in the Genes Affected in Alport Syndrome (COL4A3-COL4A5) and Their Association With Other Kidney Conditions: A Review. *Am J Kidney Dis.* 2021 Dec;78(6):857–64.
45. van Paassen P, van Breda Vriesman PJC, van Rie H, Tervaert JWC. Signs and symptoms of thin basement membrane nephropathy: a prospective regional study on primary glomerular disease-The Limburg Renal Registry. *Kidney Int.* 2004 Sep;66(3):909–13.
46. Cosio FG, Falkenhain ME, Sedmak DD. Association of thin glomerular basement membrane with other glomerulopathies. *Kidney Int.* 1994 Aug;46(2):471–4.
47. Machuca E, Benoit G, Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum Mol Genet.* 2009 Oct 15;18(R2):R185-194.
48. Deltas C, Papagregoriou G, Louka SF, Malatras A, Flinter F, Gale DP, et al. Genetic Modifiers of Mendelian Monogenic Collagen IV Nephropathies in Humans and Mice. *Genes (Basel).* 2023 Aug 25;14(9):1686.
49. Voskarides K, Arsali M, Athanasiou Y, Elia A, Pierides A, Deltas C. Evidence that NPHS2-R229Q predisposes to proteinuria and renal failure in familial hematuria. *Pediatr Nephrol.* 2012 Apr;27(4):675–9.
50. Voskarides K, Stefanou C, Pieri M, Demosthenous P, Felekis K, Arsali M, et al. A functional variant in NEPH3 gene confers high risk of renal failure in primary hematuric glomerulopathies. Evidence for predisposition to microalbuminuria in the general population. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174274.
51. Daga S, Fallerini C, Furini S, Pecoraro C, Scolari F, Ariani F, et al. Non-collagen genes role in digenic Alport syndrome. *BMC Nephrol.* 2019 Feb 26;20(1):70.
52. King K, Flinter FA, Nihalani V, Green PM. Unusual deep intronic mutations in the COL4A5 gene cause X linked Alport syndrome. *Hum Genet.* 2002 Dec;111(6):548–54.
53. Wang X, Zhang Y, Ding J, Wang F. mRNA analysis identifies deep intronic variants causing Alport syndrome and overcomes the problem of negative results of exome sequencing. *Sci Rep.* 2021 Sep 10;11(1):18097.
54. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, Kaimal V, Roach AM, Ren S, et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest.* 2015 Jan 2;125(1):141–56.
55. Savige J, Ariani F, Mari F, Bruttini M, Renieri A, Gross O, et al. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2019 Jul;34(7):1175–89.

FIGURES AND TABLES

Figure 1. Schematic view of *COL4A3* and the corresponding collagen IV trimer
Collagen IV (*on top*) is a heterotrimer formed by the assembly of three chains $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ of collagens, each presenting an intermediate collagenous sequence (*green*) made of Gly-Xaa-Yaa triplets' repetition, interrupted by non-collagenous (NC) domains (*blue*), with a 7S part at the N-terminus and an NC1 domain at the C-terminus. Transcription of the *COL4A3* gene (*bottom*) occurs from 5' to 3', while trimerization of the chains occurs like a "zipper" in the opposite direction, from the NC1 domain to the 7S end.

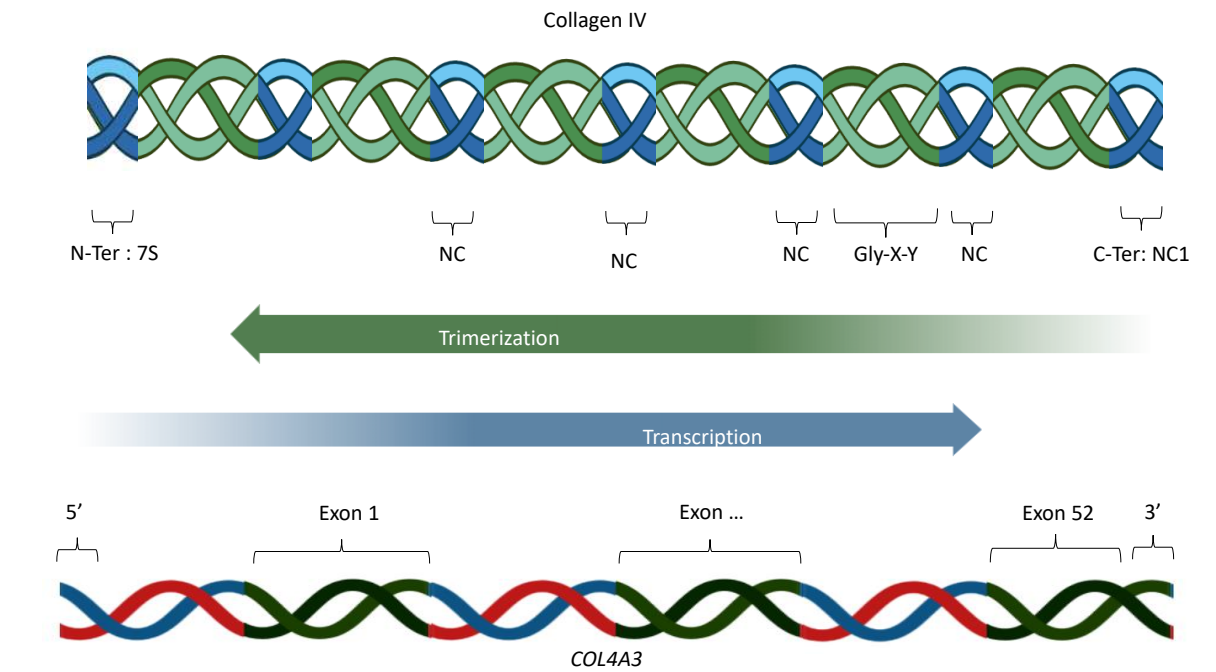


Figure 2. Type of disease-causing variants in COL4A3 and COL4A4 in patients with ADAS

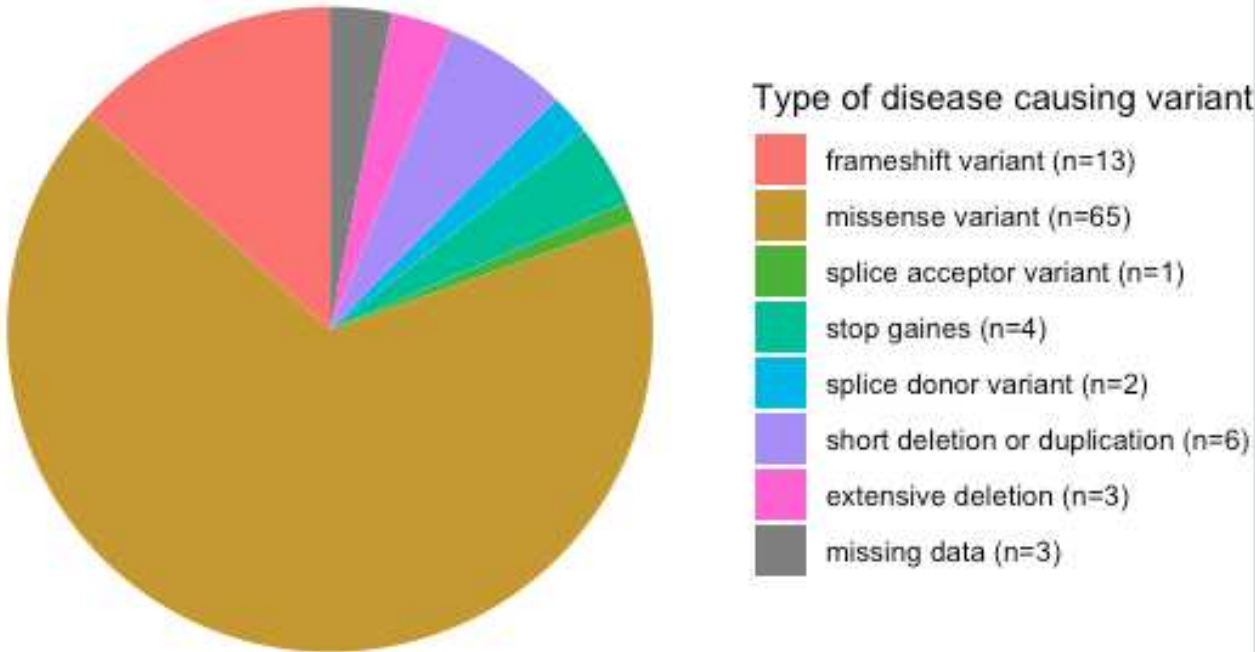


Figure 3A. Probability of reaching ESKD in patients with heterozygous disease-causing variants in COL4A3 or COL4A4.

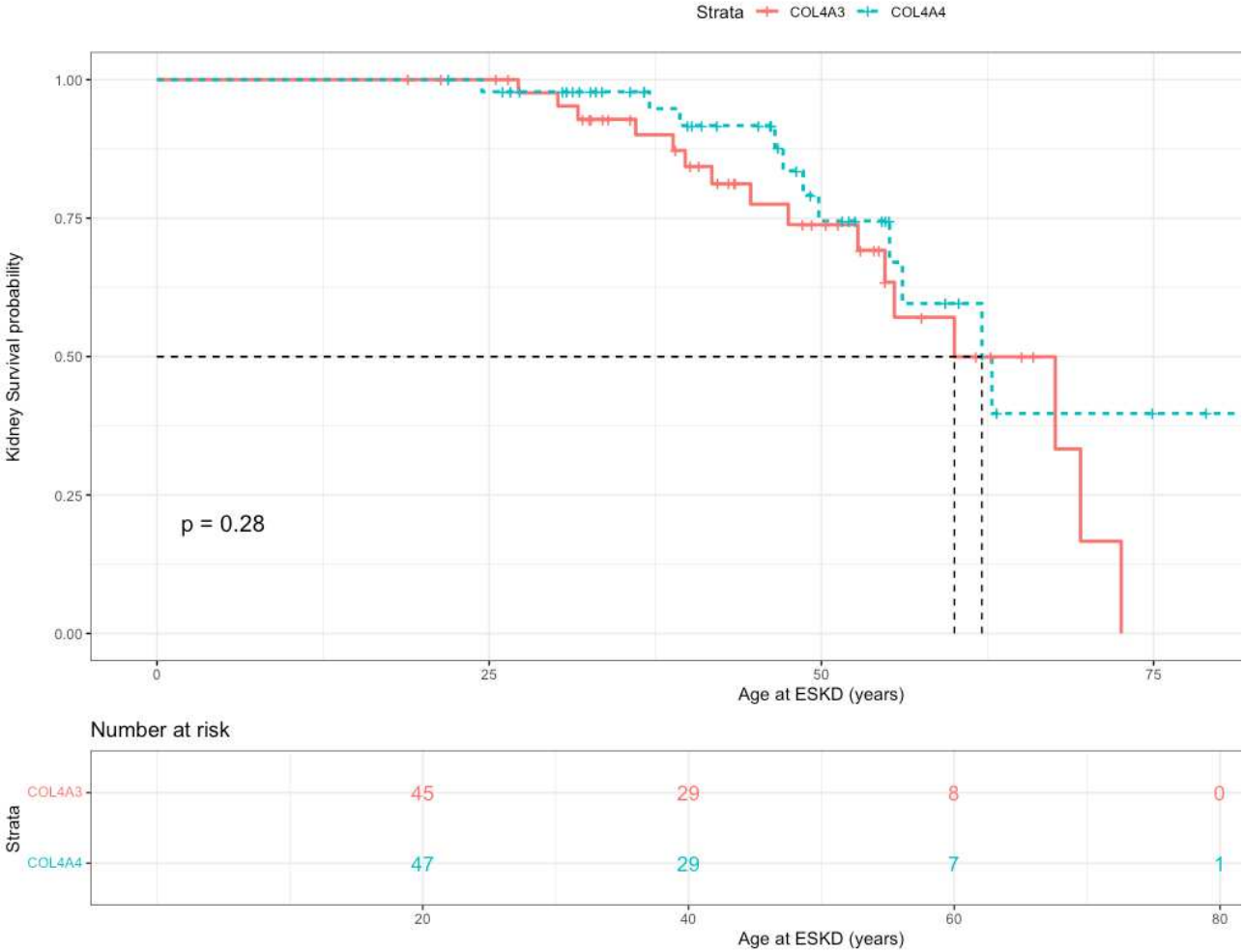


Figure 3B. Probability of reaching ESKD in patients with ADAS comparing truncating *versus* nontruncating disease causing variants.

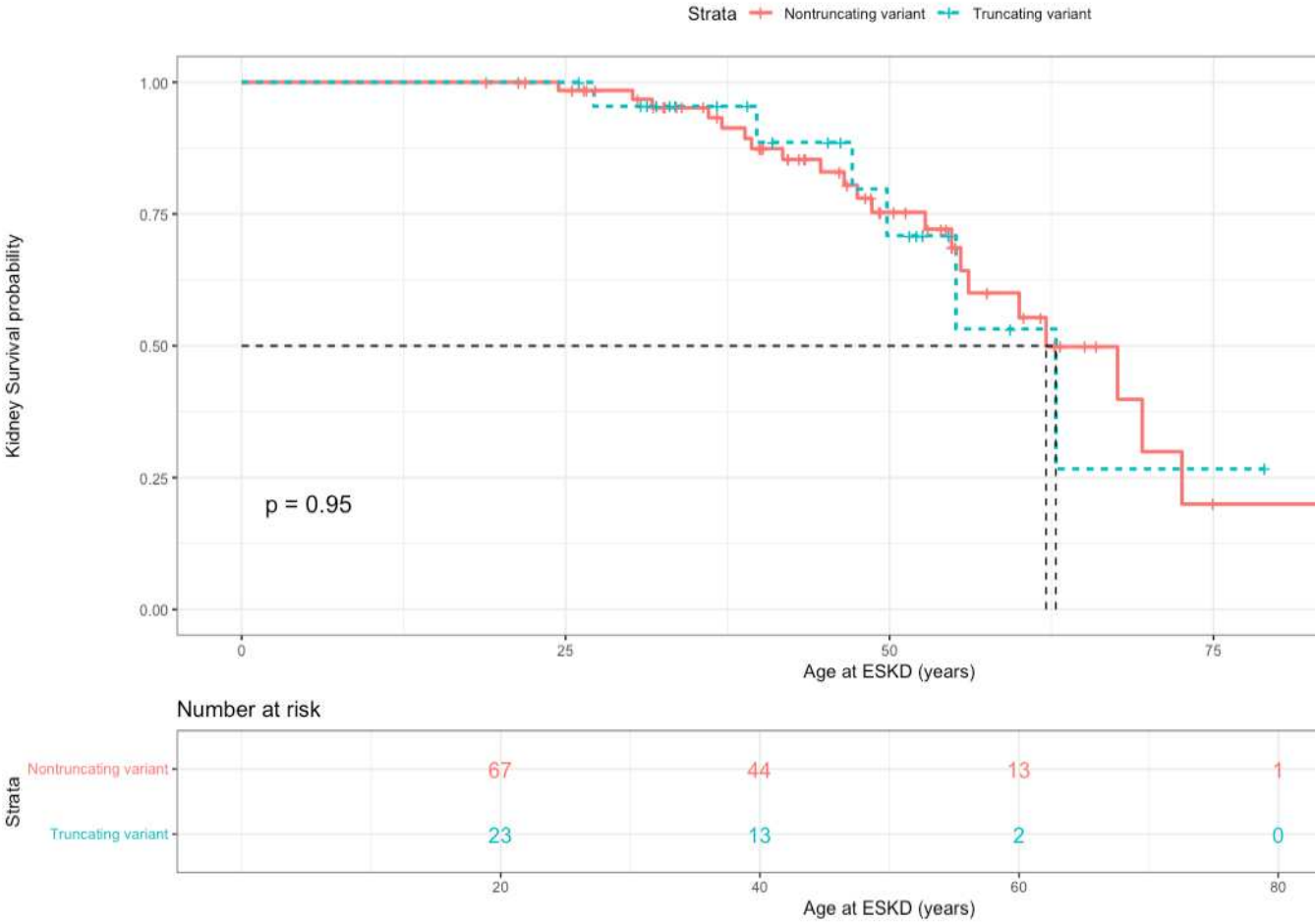


Figure 4. Probability of reaching ESKD in patients with missense glycine substitutions according to molecular location.

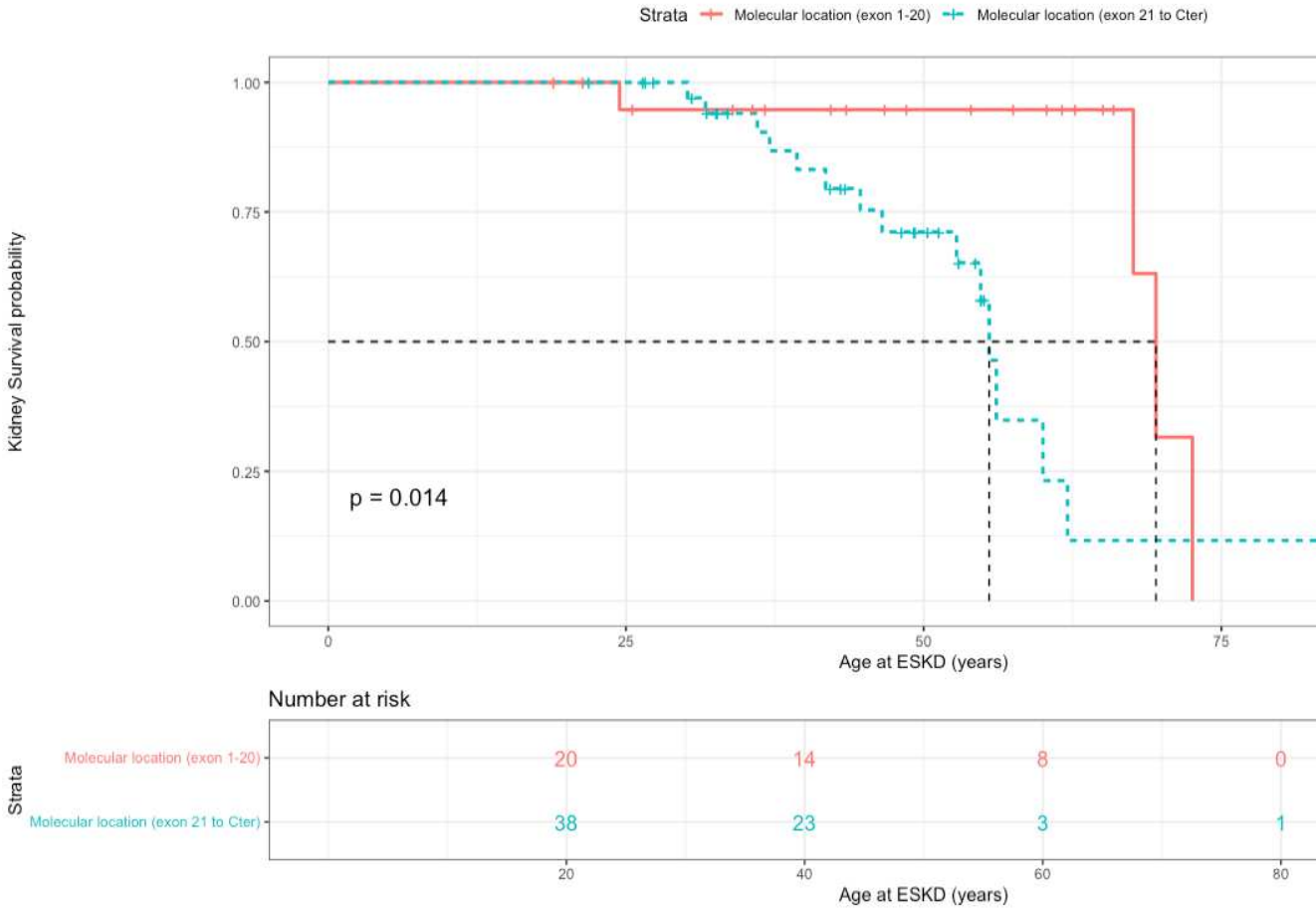
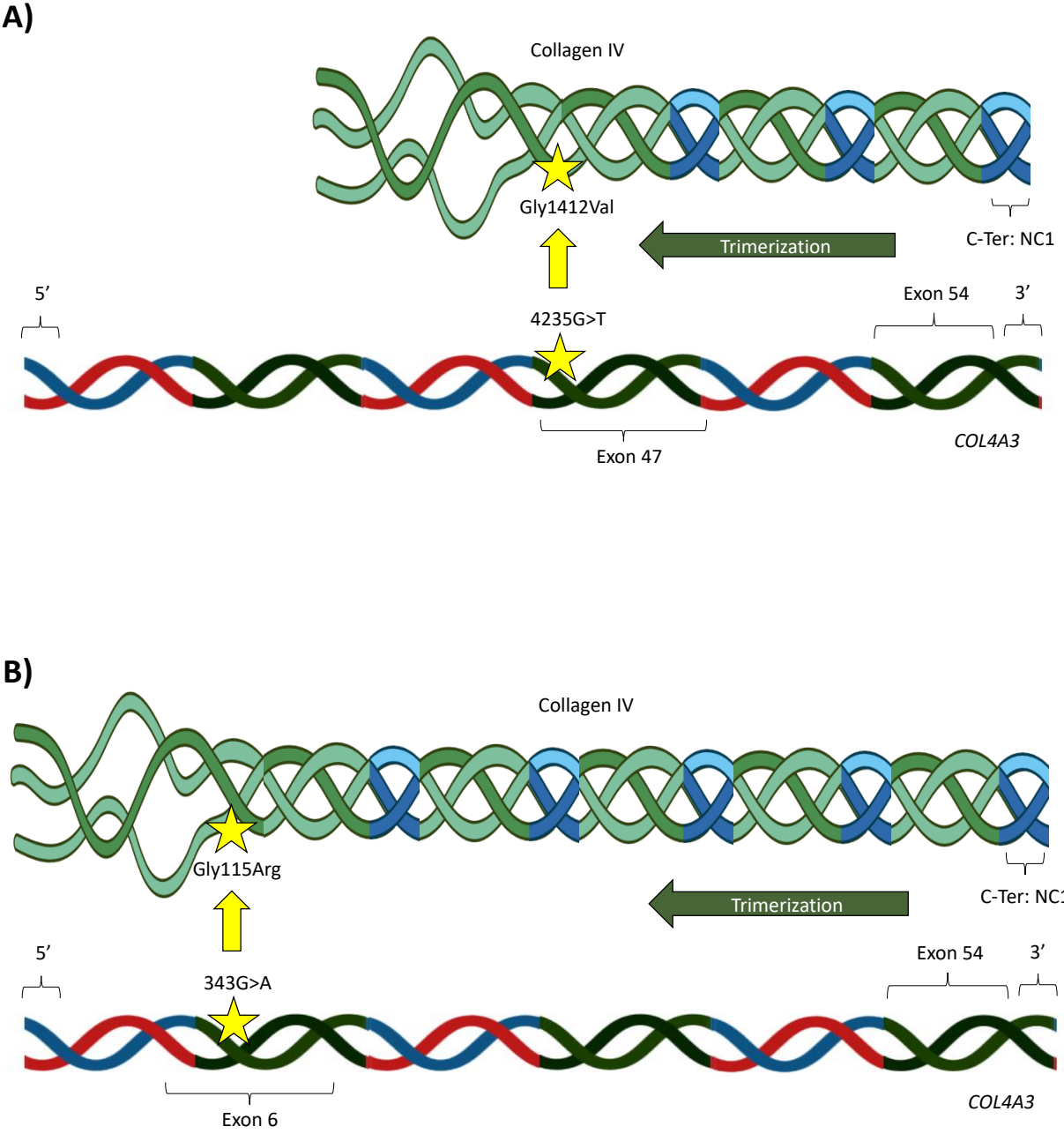


Figure 5. Exon location of glycine substitution impacts negatively renal survival in ADAS, possibly through an earlier trimerization impairment.

Examples of substitution of glycine affecting rather distal exons in **(A)** (*i.e.* patient 39, carrying a p.Gly1412Val substitution on exon 47 of COL4A3) or rather proximal exons in **(B)** (*i.e.* patients 3, 4 or 5, carrying a p.Gly115Arg on exon 6 of COL4A3), illustrating the earlier impairment of trimerization led by glycine substitution affecting distal exons.



	All n=97	COL4A3 n=47	COL4A4 n=50	Missing, n(%)
Age at diagnosis (mean), years (SD)	38.5 (14.1)	38.3 (14.4)	38.8 (14.0)	6 (6.10%)
Women, n (%)	68 (70.1%)	32 (68.1%)	36 (72.0%)	0
Family history of ESRD n (%)	48 (52.2%)	23 (50.0%)	25 (54.3%)	5 (5.10%)
Hypertension at diagnosis, n (%)	34 (39.1%)	20 (46.5%)	14 (31.8%)	10 (10.3%)
Smoker, n (%)	33 (34.0%)	15 (31.9%)	18 (36.0%)	0
Dyslipidemia, n (%)	26 (26.8%)	9 (19.1%)	17 (34.0%)	0
Diabetes, n (%)	4 (4.12%)	1 (2.13%)	3 (6.00%)	0
BMI > 30 kg/m ² , n (%)	11 (11.3%)	4 (8.51%)	7 (14.0%)	0
Use of RAAS inhibitors, n (%)	67 (76.1%)	38 (82.6%)	29 (69.0%)	9 (9.30%)
Microscopic hematuria at diagnosis, n (%)	76 (88.4%)	38 (86.4%)	38 (90.5%)	11 (11.3%)
Recurrent macroscopic hematuria, n (%)	2 (2.10%)	0	2 (4.00%)	4 (4.10%)
Proteinuria during follow-up, n (%)	68 (73.9%)	34 (73.9%)	34 (73.9%)	5 (5.10%)
Nephrotic syndrome at diagnosis, n (%)	10 (12.2%)	5 (12.2%)	5 (12.2%)	15 (15.4%)
eGFR at diagnosis (mL/min/1.73m ²), mean(SD)	80.9 (37.6)	72.7 (39.2)	89.2 (34.5)	23 (23.7%)
Ocular abnormalities, n (%)	8 (8.51%)	4 (8.70%)	4 (8.33%)	3 (3.10%)
Hearing loss, n (%)	15 (16.9%)	8 (17.4%)	7 (16.3%)	8 (8.20%)
Follow-up in nephrology (years), median (IQR)	4.1 [1.0-7.9]	4 [0.6-7.3]	3.9 [1.4-8.8]	6 (6.10%)

Table 1. Clinico-biologic characteristics of patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome (ADAS)

BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate (according to CKD-Epi equation) ; ESKD, end-stage kidney disease; RAAS, renin-angiotensin-aldosteron system.

	All n=41	COL4A3 n=21	COL4A4 n=20	Missing, n(%)
Age at renal biopsy (years), mean (SD)	35.6 (12.4)	36.7 (14.3)	34.5 (10.5)	1 (2.5%)
FSGS, n (%)	16 (41.0%)	8 (40.0%)	8 (42.1%)	2 (5.0%)
Interstitial fibrosis, n (%)				3 (7.5%)
<25%	26 (68.4%)	12 (60.0%)	14 (77.8%)	.
25-50%	8 (21.1%)	5 (25.0%)	3 (16.7%)	.
50-75%	1 (2.63%)	1 (5.00%)	0	.
>75%	3 (7.89%)	2 (10.0%)	1 (5.56%)	.
Tubular atrophy, n (%)				2 (5.0%)
<25%	29 (74.4%)	13 (65.0%)	16 (84.2%)	.
25-50%	6 (15.4%)	4 (20.0%)	2 (10.5%)	.
50-75%	1 (2.56%)	1 (5.00%)	0	.
>75%	3 (7.69%)	2 (10.0%)	1 (5.26%)	.
Mesangial expansion, n (%)	6 (15.4%)	3 (15.0%)	3 (15.8%)	2(5.0%)
Mesangial proliferation, n (%)	4 (10.3%)	2 (10.0%)	2 (10.5%)	2 (5.0%)
IgA deposits, n (%)	2 (5.00%)	1 (4.76%)	1 (5.26%)	1 (2.5%)
Vascular lesion, n (%)	13 (34.2%)	9 (45.0%)	4 (22.2%)	3 (7.5%)
Arteriolar hyalinosis	10/13	8 /9	2/4	.
Arteriosclerosis	7/13	5/9	2/4	.
Intimal fibrosis	6/13	5/9	1/4	.
Arteriolar thrombi	2/13	1/9	1/4	.
<i>Electronic microscopy n=9</i>				.
Thick basement membrane, n(%)	3/9	3/8	0/1	0
Thin basement membrane, n(%)	6/9	5/8	1/1	0
<i>Skin biopsy, n=14</i>				
Impaired $\alpha 5$ staining	0	0	0	0

Table 2. Histological characteristics of patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome (ADAS)

FSGS, focal segmental glomerulosclerosis

Table 3A

	All ADAS patients n = 97		p-value
	Truncating variant	Non-truncating variant	
eGFR rate slope (mL/min/1.73m ² per year), mean (SD)	-2.1 (1.77)	-2.1 (1.10)	0.98
Age at ESKD (years), median (CI95)	62.1 [CI95, 56.1-NA]	62.8 [CI95, 49.8-NA]	0.95

Table 3B

	Patients with missense glycine substitution n = 61		p-value
	Molecular location		
	Exons 1-20	Exons 21 to Cter	
eGFR rate slope (mL/min/1.73m ² per year), mean (SD)	-1.7 (0.53)	-2.3 (1.26)	0.04
Age at ESKD (years), median (CI95)	69.5 [CI95, 67.6-NA]	55.5 [CI95, 54.8-NA]	0.014

Table 3. Outcomes in eGFR and age at ESKD according to molecular characteristics

3A, age at ESKD and eGFR rate slope comparing truncating *versus* nontruncating variants in all ADAS patients

3B, age at ESKD and eGFR rate slope comparing variant molecular location (exons 1-20 *versus* exons 21 to Cter) in patients with glycine substitution

ADAS, Autosomal Dominant Alport Syndrome; eGFR, estimated glomerular filtration rate (according to CKD-Epi equation); ESKD, end-stage kidney disease

Characteristics	HR (95% CI)	p-value
<i>Gender</i>		
Woman (ref) (n=42)	.	.
Man (n=19)	0.7 (0.23-2.2)	0.54
<i>Molecular location</i>		
Exon 1 to 20 (ref) (n=21)	.	.
Exon 21 to C-ter (n=40)	3.9 (1.2-13)	0.02
<i>Grantham score</i>		
<100 (ref) (n=22)	.	.
>100 (n=39)	0.61 (0.23-1.7)	0.34

Table 4. Cox proportional hazards model for renal survival in patients with COL4A3/4 glycine missense variants
ref, reference group

SUPPLEMENTAL TABLE:

Patients	Variants		Exon
1	c.145G>C	Gly49Arg	3
2	c.145G>C	Gly49Arg	3
3	c.343G>A	Gly115Arg	6
4	c.343G>A	Gly115Arg	6
5	c.343G>A	Gly115Arg	6
6	c.361G>A	Gly121Ser	6
7	c.520G>A	Gly174Arg	9
8	c.656G>T	Gly219Asp	11
9	c.656G>C	Gly219Asp	12
10	c.656G>C	Gly219Asp	12
11	c.706G>C	Gly236Arg	13
12	c.725G>A	Gly242Glu	13
13	c.725G>A	Gly242Glu	13
14	c.725G>A	Gly242Glu	13
15	c.898G>A	Gly300Arg	16
16	c.890G>A	Gly297Glu	16
17	c.1025G>A	Gly342Asp	18
18	c.1219G>C	Gly407Arg	21
19	c.1219G>C	Gly407Arg	21
20	c.1219G>C	Gly407Arg	21
21	c.1297G>C	Gly433Arg	21
22	c.1487G>A	Gly496Asp	23
23	c.1487G>A	Gly496Asp	23
24	c.1651G>C	Gly551Arg	25
25	c.2083G>A	Gly695Arg	28
26	c.2083G>A	Gly695Arg	28
27	c.2083G>A	Gly695Arg	28
28	c.2083G>A	Gly695Arg	28
29	c.2083G>A	Gly695Arg	28
30	c.2083G>A	Gly695Arg	28
31	c.3256G>C	Gly1086Arg	38
32	c.3499G>A	Gly1167Arg	40
33	c.3454G>C	Gly1152Arg	40
34	c.3656G>T	Gly1219Val	42
35	c.3637G>C	Gly1213Arg	42
36	c.3829G>A	Gly1277Ser	43
37	c.3829G>A	Gly1277Ser	43
38	c.3829G>A	Gly1277Ser	43
39	c.4235G>T	Gly1412Val	47

Patients	Variants		Exon
40	c.677G>A	Gly226Glu	11
41	c.677G>A	Gly226Glu	11
42	c.737G>T	Gly246Val	13
43	c.1118G>A	Gly373Glu	19
44	c.1405G>C	Gly469Arg	21
45	c.1396G>A	Gly466Arg	21
46	c.1579G>T	Gly527Cys	22
47	c.1669G>T	Gly557Cys	23
48	c.2383G>C	Gly795Arg	28
49	c.2164G>A	Gly722Ser	28
50	c.2608G>C	Gly870Arg	30
51	c.2654G>A	Gly885Asp	30
52	c.2788G>A	Gly930Ser	31
53	c.2788G>A	Gly930Ser	31
54	c.3089G>T	Gly1030Val	33
55	c.3089G>T	Gly1030Val	33
56	c.3089G>T	Gly1030Val	33
57	c.3089G>T	Gly1030Val	33
58	c.3089G>T	Gly1030Val	33
59	c.3514G>A	Gly1172Arg	38
60	c.3637G>A	Gly1213Arg	39
61	c.3734G>A	Gly1245Asp	40

Supplemental Table S1. Variant description for each patient with a substitution impacting glycine in collagen domains in patients heterozygous for *COL4A3* (patients 1 to 39) or for *COL4A4* (patients 40 to 61)

PARTIE III: Résultats supplémentaires :

Description de la cohorte complète

**Patients présentant un Syndrome d'Alport prouvé
génétiquement, suivis aux CHU de Bordeaux, Lille et Paris
(Tenon)**

1. Caractéristiques génétiques :

Au total, 193 patients présentaient au moins un variant pathogène pour *COL4A3*, *COL4A4* et/ou pour *COL4A5*, défini comme un variant pathogène de classe IV ou V selon l'ACMG-AMP. Dans le détail, les patients étaient classés dans une des quatre catégories suivantes : 38 (19.6%) hommes présentaient un syndrome d'Alport lié à l'X (XLAS) défini par une mutation de *COL4A5* sur le chromosome X unique, 36 (18.7%) un XLAS féminin (mutation de *COL4A5* sur un des deux chromosomes X), 22 (11.4%) un syndrome d'Alport autosomique récessif (ARAS), caractérisé par des mutations homozygotes ou hétérozygote composite de *COL4A3* et/ou de *COL4A4*, et enfin 97 (50.3%) un syndrome d'Alport autosomique dominant (ADAS), avec une mutation à l'état hétérozygote pour *COL4A3* ou pour *COL4A4*. Le diagnostic était porté à l'aide d'un Whole exome sequencing pour 60 (31.1%) patients, un panel de gènes pour 95 (49.2%) patients, ou un enfin par un test de Sanger pour 18 (9.3%) patients.

Les types de variants génétiques retrouvés sont représentés **Figure 1**. Les variants responsables de mutations faux-sens étaient les plus fréquemment retrouvés (n=137 (63.7%)). Parmi-eux, 109 (79.6%) correspondaient à des substitutions impliquant la glycine. Seuls deux de ces substitutions étaient présentes dans un domaine non collagénique.

Les autres variants correspondaient quant à eux à :

- Une atteinte d'un site donneur ou accepteur de l'épissage pour 21 (9.8%) d'entre eux,
- Vingt-trois (10.7%) étaient responsables d'un décalage du cadre de lecture et onze (5.1%) correspondaient des mutations non-sens (faisant apparaître un

codon stop prématuré), l'ensemble concourant à la synthèse d'une protéine tronquée

- Sept (3.3%) conduisaient à la délétion étendue d'un ou plusieurs exons
- Enfin, neuf (4.2%) correspondaient à des délétions n'entraînant pas de décalage du cadre de lecture.

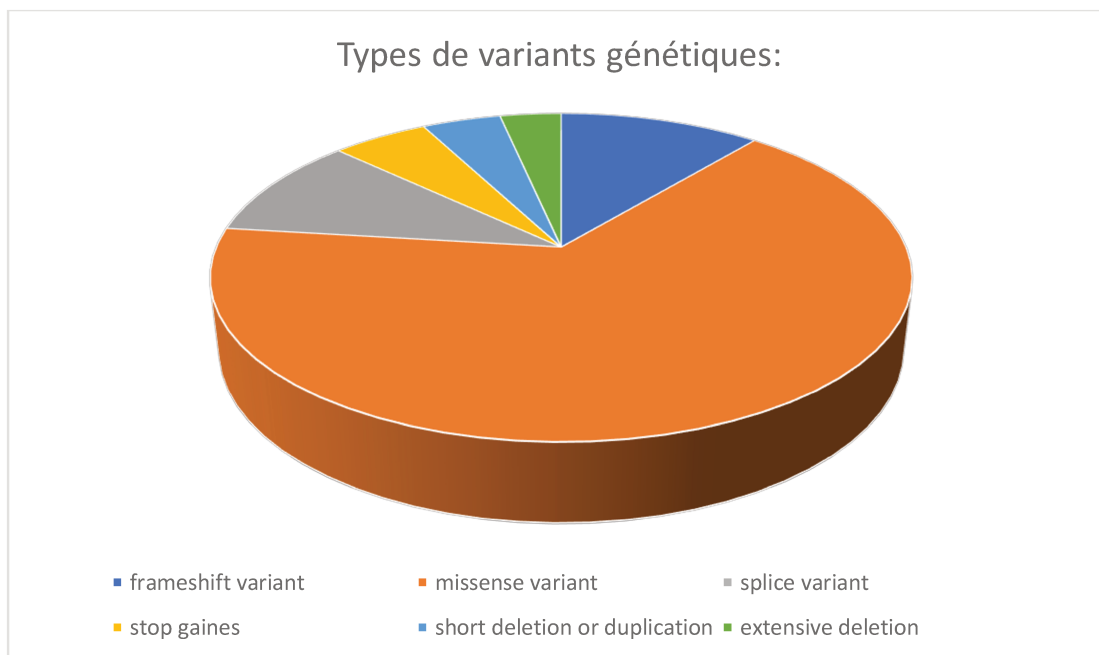


Figure 1. Nature des mutations identifiées dans la cohorte complète de patients suivis pour un Syndrome d'Alport

2. Diagnostic présumé :

De manière notable, le Syndrome d'Alport correspondait à l'hypothèse diagnostique évoquée par le Néphrologue avant le résultat du test génétique ou la biopsie rénale (si réalisée) dans seulement 58% des cas. Dans les autres cas, les diagnostics les plus fréquemment suspectés par les cliniciens étaient par ordre de fréquence les suivants : néphropathie indéterminée (n=22, 13.1%), néphropathie à IgA (n=14, 8.3%), néphroangiosclérose bénigne (n=12, 7.1%), et hyalinose segmentaire et focale (HSF) (n=11, 6.5%). Le détail des hypothèses diagnostiques est présenté ci-dessous **Figure 2**.

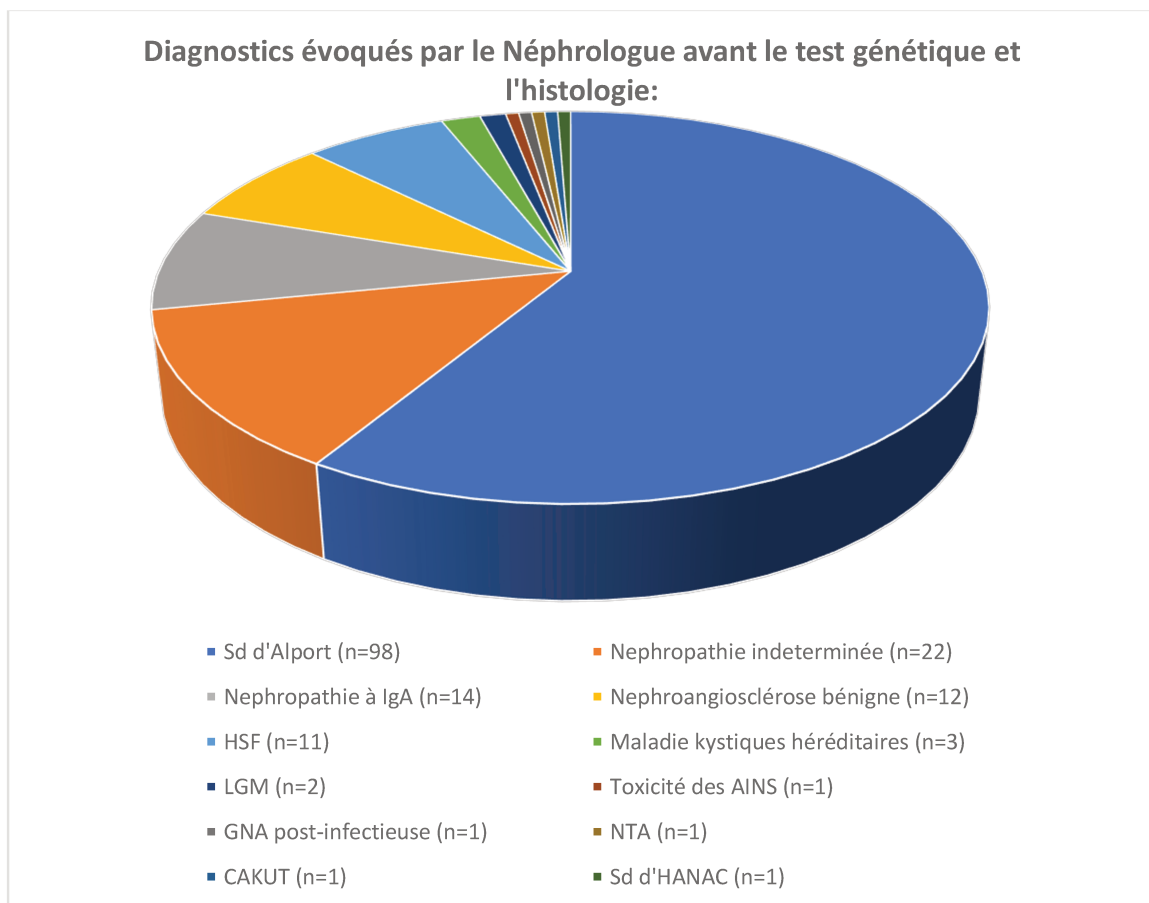


Figure 2. Diagnostiques évoqués par le néphrologue avant les résultats du test génétiques et/ou les résultats de de la biopsie rénale.

3. Caractéristiques cliniques :

L'âge moyen au début du suivi néphrologique était de 35.5 (+/-15.2) ans (XLAS ♂ : 28.9 (+/- 17.5) ans ; XLAS ♀ : 33.9 (+/-15.0) ans ; ARAS : 34.4 (+/-13.9) ans ; ADAS : 38.5 (+/-14.1) ans), et la durée de moyenne de suivi était de 7.27 (+/- 8.26) ans. Au début du suivi néphrologie, le DFG estimé (DFGe) paraissait plus bas chez les ARAS (40.9 mL/min/1.73m²) que chez les autres formes de SA. 128 (69.6%) patients présentaient une protéinurie au diagnostic, quand 21 (13.6%) étaient néphrotiques. De manière surprenante, l'hématurie microscopique n'était présente que chez 133 (85.3%) patients au début du suivi, et les épisodes d'hématurie macroscopique étaient quant à eux rares (n=6, 3.4%). Vingt-huit des 192 patients (15.1%) présentaient au moins un kyste sur chaque rein. Dix patients présentaient des anomalies malformatives du rein ou des voies urinaires, dont 5 une hypoplasie rénale congénitale. Les caractéristiques des patients de base sont résumées dans le détail **Tableau 1**.

	XLAS ♂ <i>n = 38</i>	XLAS ♀ <i>n = 36</i>	ARAS <i>n = 22</i>	ADAS <i>n = 97</i>	All <i>n=193</i>
Age at diagnosis, mean (SD)	28.9 (17.5)	33.9 (15.0)	34.4 (13.9)	38.5 (14.1)	35.5 (15.2)
Women, n(%)	0	36 (100%)	11 (50.0%)	68 (70.1%)	115 (59.6%)
Family history of ESKD, n(%)	18 (50.0%)	22 (61.1%)	12 (57.1%)	48 (52.2%)	100 (54.1%)
CVRF					
Hypertension at diagnosis, n(%)	7 (30.4%)	7 (20.6%)	10 (62.5%)	34 (39.1%)	58 (36.2%)
Smoker, n(%)	12 (33.3%)	11 (31.4%)	2 (9.09%)	33 (34.0%)	58 (30.5%)
Dyslipidemia, n(%)	11 (30.6%)	8 (22.9%)	4 (18.2%)	26 (26.8%)	49 (25.8%)
Diabetes, n(%)	2 (5.56%)	2 (5.71%)	0	4 (4.12%)	8 (4.21%)
BMI > 30kg/m ² , n(%)	3 (8.33%)	5 (14.3%)	4 (18.2%)	11 (11.3%)	23 (12.1%)
Renal features					
Use of ACEi/ARBs, n(%)	25 (86.2%)	19 (55.9%)	18 (85.7%)	67 (76.1%)	129 (75.0%)
Micro. hemat at diagnosis, n(%)	23 (95.8%)	26 (81.2%)	8 (57.1%)	76 (88.4%)	133 (85.3%)
Recurrent macro hemat, n(%)	4 (12.5%)	0	0	2 (2.15%)	6 (3.41%)
Proteinuria during follow up, n(%)	26 (76.5%)	21 (58.3%)	13 (59.1%)	68 (73.9%)	128 (69.6%)
Nephrotic Sd. at diagnosis, n(%)	4 (17.4%)	2 (5.88%)	5 (33.3%)	10 (12.2%)	21 (13.6%)
eGFR at diag. (mL/min/1.73m ²),	89.6 (58.2)	90.5 (37.0)	40.9 (28.2)	80.9 (37.6)	80.4 (42.0)
Kidney cyst, n(%)	6 (16.2%)	4 (12.5%)	4 (18.2%)	14 (14.7%)	28 (15.1%)
Extra-renal features					
Ocular abnormalities, n(%)	8 (22.2%)	2 (5.71%)	2 (9.09%)	8 (8.51%)	20 (10.7%)
Hearing loss, n(%)	20 (54.1%)	10 (30.3%)	12 (54.5%)	15 (16.9%)	57 (31.5%)
Follow-up in nephrology (years), mean (SD)	9.52 (9.66)	6.55 (6.47)	8.94 (9.94)	6.49 (7.99)	7.27 (8.26)

Table 1. Clinical characteristics of all AS-patients.

ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitors; ADAS, Autosomal Dominant Alport Syndrome; ARAS, Autosomal Recessive Alport Syndrome; ARBs, angiotensin II receptor blockers; BMI, body mass index; CVRF, cardiovascular risk factors; eGFR, estimated glomerular filtration rate (according to CKD-Epi equation); ESKD, end-stage kidney disease ; XLAS, X-linked Alport Syndrome.

4. Caractéristiques histologiques:

Soixante-neuf (35.8%) patients bénéficieront d'une biopsie rénale au cours du suivi. Les caractéristiques histologiques sont détaillées dans le **Tableau 2**. La principale lésion glomérulaire mise en évidence correspondait aux lésions de hyalinose segmentaire et focale (HSF) (n=28 (40.6%)). On retrouvait également chez 6 (8.7%) patients (tous ADAS) une expansion mésangiale, dont 4 (5.8 %) présentaient conjointement une prolifération mésangiale, et deux (2.9 %) des dépôts d'IgA mésangiaux. Les principaux dépôts glomérulaires correspondaient essentiellement à des dépôts sous-podocytaires d'IgM et de C3 faibles chez 7 patients (10.1%), en lien avec les lésions de HSF. Vingt-six (37.7%) patients présentaient des anomalies vasculaires, à savoir des lésions de hyalinose artériolaire chez 18 (26.1 %) patients, des lésions d'artériosclérose chez 13 (18.9 %) patients, de la fibrose intimale chez 12 (17.4 %) patients, de l'endartérite fibreuse chez 3 (4.35 %) patients, et enfin des thrombi artériolaires chez 2 (2.9 %) patients ADAS (ces deux derniers se présentant cliniquement sous la forme d'une HTA maligne).

Seuls 12 (6.2%) patients ont pu bénéficier d'une analyse en microscopie électronique (ME). Trois (25%) patients présentaient une MBG épaissie (tous des ADAS), quand 8 (66.6%) patients présentaient à l'inverse une MBG amincie (6 ADAS, mais aussi 1 XLAS masculin et 1 XLAS féminin). Dans notre cohorte, 34 (17.6%) patients ont également bénéficié d'une biopsie cutanée. Parmi-eux, seuls 11 (32.4%) présentaient un marquage $\alpha 5$ altéré au niveau de la membrane basale cutanée (8 XLAS masculin et 3 XLAS féminin).

	XLAS ♂ <i>n</i> = 13	XLAS ♀ <i>n</i> = 8	ARAS <i>n</i> = 7	ADAS <i>n</i> = 41
Age at renal biopsy, mean (SD)	36.2 (12.5)	33.2 (10.6)	40.0 (12.5)	35.6 (12.4)
Light microscopy				
FSGS, n(%)	5 (41.7%)	2 (33.3%)	5 (83.3%)	16 (41.0%)
Mesangial expansion, n(%)	0	0	0	6 (15.4%)
Mesangial proliferation, n(%)	0	0	0	4 (10.3%)
IgA deposits, n(%)	0	0	0	2 (5.0%)
Interstitial fibrosis, n(%)				
<25%	5 (41.7%)	4 (66.7%)	1 (100%)	26 (68.4%)
25-50%	4 (33.3%)	0	0	8 (21.1%)
50-75%	0	1 (16.7%)	0	1 (2.60%)
>75%	3 (25.9%)	1 (16.7%)	0	3 (7.69%)
Tubular atrophy, n(%)				
<25%	5 (45.5%)	4 (66.7%)	1 (100%)	29 (74.4%)
25-50%	4 (36.4%)	0	0	6 (15.4%)
50-75%	0	1 (16.7%)	0	1 (2.56%)
>75%	2 (18.2%)	1 (16.7%)	0	3 (7.69%)
Vascular lesions	7 (53.8%)	3 (37.5%)	3 (42.9%)	13 (31.7%)
Intimal fibrosis	4 (30.8%)	2 (25.0%)	0	6 (14.6%)
Fibro. endarteritis	1 (7.69%)	1 (12.5%)	1 (14.3%)	0
Arteriosclerosis	4 (30.8%)	0	2 (28.6%)	7 (17.1%)
Art. hyalinosis	4 (30.8%)	1 (12.5%)	2 (28.6%)	11 (26.8%)
Art. thrombi	0	0	0	2 (4.89%)
Electronic microscopy n=14				
Thinned GBM	0/1	0/1	0/1	3/11
Thickened GBM	1/1	1/1	0/1	6/11
Skin biopsy n=34				
Impaired α5	8/9	3/5	0/6	0/14

Table 2. Histological characteristics of all AS-patients

5. Survie rénale et déclin du DFGe dans toute la cohorte de SA :

Soixante-dix (38.0%) patients ont atteint l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) au cours du suivi, définie comme un DFGe $< 15 \text{ mL}\cdot\text{min}\cdot 1.73\text{m}^2$ et/ou le début de l'épuration extra-rénale et/ou la survenue d'une greffe préemptive durant le suivi. Pour 9 d'entre eux, l'information concernant la survie rénale n'était pas disponible.

Parmi les patients ayant atteints l'IRCT, on retrouvait 27/93 patients ADAS, avec un âge médian à l'IRCT de 62.8 [55.5-NA] ans, ce qui était significativement moins fréquent et plus tardif que pour les autres groupes (XLAS masculin : 23/37, âge médian : 36.1 [29.6-NA] ans ; XLAS féminin : 7/34, âge médian : 57 [54.6-NA] ans ; ARAS : 13/20, âge moyen : 43.5 [25.7-NA] ans, $p < 0.0001$) (**Figure 3**). La pente annuelle moyenne de DFGe était enfin plus importante chez les XLAS masculins ($-4.20 \text{ mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2/\text{an}$) et chez les ARAS ($-2.63 \text{ mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2/\text{an}$) que chez les ADAS ($-2.13 \text{ mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2/\text{an}$) et les XLAS féminins ($-1.56 \text{ mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2/\text{an}$) ($p < 0.001$) (**Table 3**).

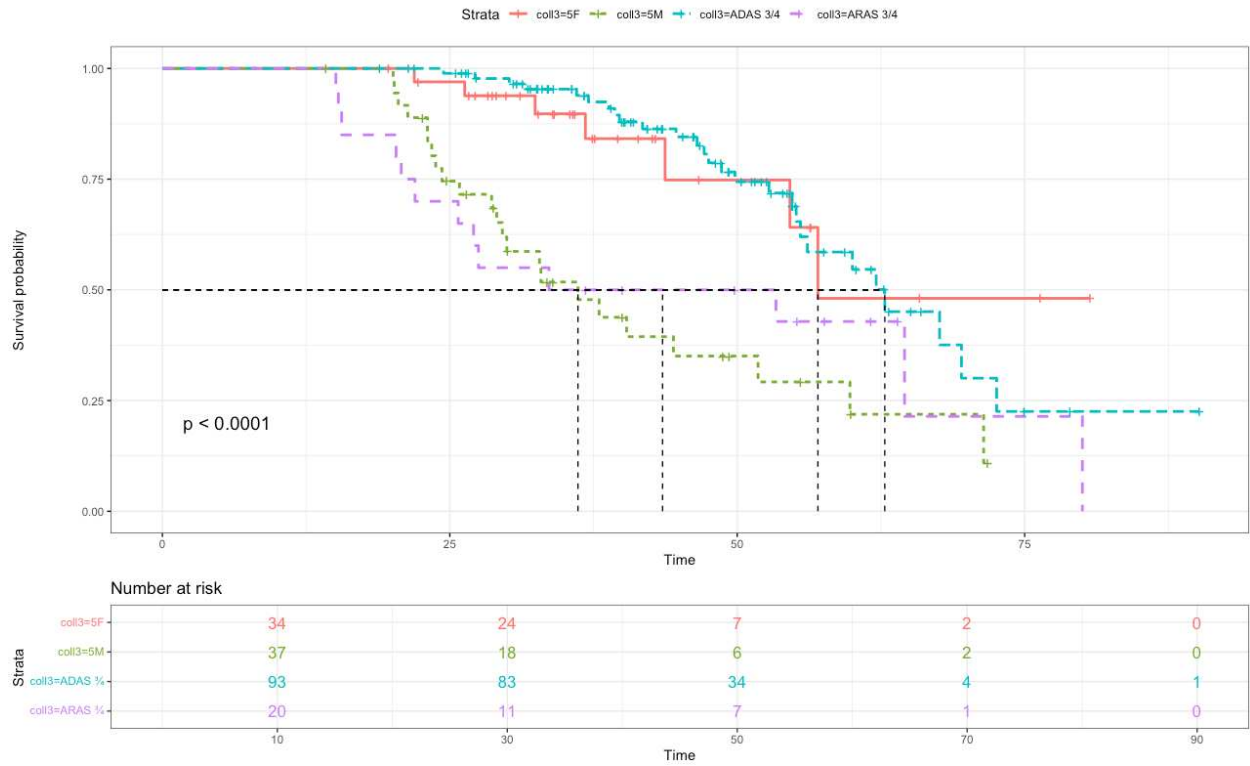


Figure 3. End-stage kidney disease-free survival of different Alport syndrome types in the whole AS-cohort

eGFR: estimated glomerular filtration rate (according to CKD-Epi equation); ESKD, end-stage kidney disease

Table 3. Outcomes in eGFR and age at ESKD according to different Alport syndrome types

	eGFR rate slope (mL/min/1.73m ² per year), mean (SD)		Age at ESKD (years), median [CI95]	
All n= 141	-2.37 (2.03)	59.8 [54.8-69.5]	57 [54.6-NA]	62.8 [55.5-
COL4A5 female n=30	-1.56 (1.09)		36.1 [29.6-NA]	
COL4A5 male n=23	-4.20 (3.71)			
COL4A3/ n=7	-2.13 (1.3			

6. Facteurs prédictifs d'IRCT parmi les patients ADAS

Les résultats du modèle de Cox univarié pour explorer les facteurs prédictifs d'IRCT parmi les patients ADAS sont présentés dans le **Tableau 4**. Le DFG_e au diagnostic était associé à une meilleure survie rénale (HR=0.94, 95%IC 0.92-0.97) ($p<0.001$) pour chaque mL/min/1.73m² supplémentaire. L'obésité, définie par un BMI > 30kg/m² était associée à une moins bonne survie rénale (HR=2.5, IC95% 1-6.3). Ces résultats n'ont pas été inclus dans l'article original ci-dessus en raison de la difficulté d'interprétation des résultats liés à une « baseline » différente pour chaque patient, la mesure du facteur étant réalisée au moment de la première consultation de néphrologie qui pouvait être à un stade d'avancée de la maladie variable selon les patients. Dans l'article, nous avons donc préféré nous concentrer sur les facteurs génétiques.

Characteristics	HR (95% CI)	p-value
Men	0.82 (0.35-2)	0.66
First-degree history of ESKD	0.85 (0.39-1.8)	0.67
Hypertension at diagnosis	1.7 (0.68-4.1)	0.26
eGFR at diagnosis (<i>per</i> mL/min/1.73m ²)	0.94 (0.92-0.97)	<0.001
Smoker	1.7 (0.8-3.7)	0.17
BMI >30 kg/m ²	2.5 (1-6.3)	0.049
Cardiovascular disease	1.7 (0.63-4.5)	0.29
Hearing loss	0.99 (0.33-2.9)	0.98
Use of ACEi/ARBs	2.7 (0.35-20)	0.34
Microscopic hematuria at diagnosis	1.2 (0.35-4.1)	0.77
Proteinuria during follow-up	1.9 (0.58-6.5)	0.29
Nephrotic syndrome at diagnosis	3.8 (1.1-13)	0.03
Protein-truncating variant	1 (0.41-2.6)	0.95

Table 4. Cox proportional hazards model for kidney survival in patients with ADAS

ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitors; ADAS, Autosomal Dominant Alport Syndrome; ARBs, angiotensin II receptor blockers; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate (according to CKD-Epi equation); ESKD, end-stage kidney disease.

CONCLUSION

Au travers de cette cohorte rétrospective multicentrique incluant 193 patients SA porteurs d'au moins un variant pathogène de *COL4A3*, *COL4A4* ou de *COL4A5*, nous avons pu confirmer certaines données établies, notamment sur l'âge survenue de l'IRCT chez les XLAS et chez les ARAS. Notre étude apporte des données nouvelles concernant la corrélation génotype/phénotype des ADAS. Chez ces derniers, nous avons mis en évidence pour la première fois à notre connaissance qu'une substitution de la glycine impliquant les exons distaux impactait péjorativement la survie rénale, probablement par défaut de trimérisation. Ces résultats mériteraient d'être confirmés par de plus larges études.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

1. Alport AC. HEREDITARY FAMILIAL CONGENITAL HAEMORRHAGIC NEPHRITIS. *Br Med J.* 19 mars 1927;1(3454):504-6.
2. Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Höyhty M, Shows TB, Tryggvason K. Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* févr 1990;87(4):1606-10.
3. Heidet L, Arrondel C, Forestier L, Cohen-Solal L, Mollet G, Gutierrez B, et al. Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* janv 2001;12(1):97-106.
4. Nozu K, Nakanishi K, Abe Y, Udagawa T, Okada S, Okamoto T, et al. A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome. *Clin Exp Nephrol.* févr 2019;23(2):158-68.
5. Kashtan CE, Ding J, Garosi G, Heidet L, Massella L, Nakanishi K, et al. Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV α 345: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group. *Kidney Int.* mai 2018;93(5):1045-51.
6. Kashtan CE. Alport Syndrome: Achieving Early Diagnosis and Treatment. *American Journal of Kidney Diseases.* févr 2021;77(2):272-9.
7. Warady BA, Agarwal R, Bangalore S, Chapman A, Levin A, Stenvinkel P, et al. Alport Syndrome Classification and Management. *Kidney Med.* 2020;2(5):639-49.
8. Hertz JM, Thomassen M, Storey H, Flinter F. Clinical utility gene card for: Alport syndrome - update 2014. *Eur J Hum Genet.* sept 2015;23(9).
9. Persson U, Hertz JM, Wieslander J, Segelmark M. Alport syndrome in southern Sweden. *Clin Nephrol.* août 2005;64(2):85-90.
10. Pajari H, Kääriäinen H, Muhonen T, Koskimies O. Alport's syndrome in 78 patients: epidemiological and clinical study. *Acta Paediatr.* nov 1996;85(11):1300-6.
11. Gibson J, Fieldhouse R, Chan MMY, Sadeghi-Alavijeh O, Burnett L, Izzi V, et al. Prevalence Estimates of Predicted Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in a Population Sequencing Database and Their Implications for Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* sept 2021;32(9):2273-90.
12. Mallett A, Tang W, Clayton PA, Stevenson S, McDonald SP, Hawley CM, et al. End-stage kidney disease due to Alport syndrome: outcomes in 296 consecutive Australia and New Zealand Dialysis and Transplant Registry cases. *Nephrol Dial Transplant.* déc 2014;29(12):2277-86.
13. Hattori M, Sako M, Kaneko T, Ashida A, Matsunaga A, Igarashi T, et al. End-stage renal disease in Japanese children: a nationwide survey during 2006-2011. *Clin Exp Nephrol.* oct 2015;19(5):933-8.
14. Miner JH. Organogenesis of the kidney glomerulus: focus on the glomerular basement membrane. *Organogenesis.* 2011;7(2):75-82.

15. Hudson BG. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol.* oct 2004;15(10):2514-27.
16. Kefalides NA. Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int Rev Connect Tissue Res.* 1973;6:63-104.
17. <https://slideplayer.fr/slide/1377442/>
18. Chioran A, Duncan S, Catalano A, Brown TJ, Ringuette MJ. Collagen IV trafficking: The inside-out and beyond story. *Dev Biol.* 15 nov 2017;431(2):124-33.
19. Persikov AV, Pillitteri RJ, Amin P, Schwarze U, Byers PH, Brodsky B. Stability related bias in residues replacing glycines within the collagen triple helix (Gly-Xaa-Yaa) in inherited connective tissue disorders. *Hum Mutat.* oct 2004;24(4):330-7.
20. Leinonen A, Mariyama M, Mochizuki T, Tryggvason K, Reeders ST. Complete primary structure of the human type IV collagen alpha 4(IV) chain. Comparison with structure and expression of the other alpha (IV) chains. *J Biol Chem.* 21 oct 1994;269(42):26172-7.
21. Sundaramoorthy M, Meiyappan M, Todd P, Hudson BG. Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. *J Biol Chem.* 23 août 2002;277(34):31142-53.
22. Spiro RG. Biochemistry of the renal glomerular basement membrane and its alterations in diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 21 juin 1973;288(25):1337-42.
23. Cosgrove D, Liu S. Collagen IV diseases: A focus on the glomerular basement membrane in Alport syndrome. *Matrix Biol.* janv 2017;57-58:45-54.
24. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech.* mai 2008;71(5):357-70.
25. Abrahamson DR. Role of the podocyte (and glomerular endothelium) in building the GBM. *Semin Nephrol.* juill 2012;32(4):342-9.
26. Peissel B, Geng L, Kalluri R, Kashtan C, Rennke HG, Gallo GR, et al. Comparative distribution of the alpha 1(IV), alpha 5(IV), and alpha 6(IV) collagen chains in normal human adult and fetal tissues and in kidneys from X-linked Alport syndrome patients. *J Clin Invest.* oct 1995;96(4):1948-57.
27. Suh JH, Miner JH. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol.* août 2013;9(8):470-7.
28. Lovell JT, Grimwood J. The first complete human genome. *Nature.* juin 2002;419(6914):468-9.
29. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 25 avr 1953;171(4356):737-8.
30. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1977;74(12):5463-7.
31. Green ED, Watson JD, Collins FS. Twenty-five years of big biology. *Nature.* 1 oct 2015;526(7571):29-31.

32. Weissenbach J. [The human genome project in the year 2000]. *Bull Acad Natl Med.* 2000;184(7):1371-8; discussion 1379-1382.
33. Le Plan France Médecine Génomique 2025 I SeqOIA [Internet]. [cité 2 mars 2023]. Disponible sur: <https://laboratoire-sequoia.fr/plan-france-genomique-2025/>
34. Kaessmann H. Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. *Genome Res.* oct 2010;20(10):1313-26.
35. Dai X, Rothman-Denes LB. DNA structure and transcription. *Curr Opin Microbiol.* avr 1999;2(2):126-30.
36. Sioud M. RNA Interference: Story and Mechanisms. *Methods Mol Biol.* 2021;2282:1-15.
37. Baralle FE, Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juill 2017;18(7):437-51.
38. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 15 févr 2003;17(4):419-37.
39. Boisson M, Arrondel C, Cagnard N, Morinière V, Arkoub ZA, Saei H, et al. A wave of deep intronic mutations in X-linked Alport Syndrome. *Kidney Int.* 23 mai 2023;S0085-2538(23)00376-9.
40. Hanna N, Parfait B, Vidaud D, Vidaud M. [Mutation mechanisms and their consequences]. *Med Sci (Paris).* nov 2005;21(11):969-80.
41. Ripley LS. Frameshift mutation: determinants of specificity. *Annu Rev Genet.* 1990;24:189-213.
42. Anna A, Monika G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet.* août 2018;59(3):253-68.
43. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* avr 2002;3(4):285-98.
44. Southern E. The early days of blotting. *Methods Mol Biol.* 2015;1312:1-3.
45. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 13 nov 1986;324(6093):163-6.
46. Rosenthal A, Charnock-Jones DS. New protocols for DNA sequencing with dye terminators. *DNA Seq.* 1992;3(1):61-4.
47. Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2017;1525:3-33.
48. Meyer M, Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb Protoc.* juin 2010;2010(6):pdb.prot5448.
49. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular

Pathology. Genet Med. mai 2015;17(5):405-24.

50. Mencarelli MA, Heidet L, Storey H, van Geel M, Knebelmann B, Fallerini C, et al. Evidence of digenic inheritance in Alport syndrome. *J Med Genet.* mars 2015;52(3):163-74.
51. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, Marchi MD, Rizzoni G, Renieri A, et al. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype- phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol.* avr 2000;11(4):649-57.
52. Savige J, Rana K, Tonna S, Buzzza M, Dagher H, Wang YY. Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int.* oct 2003;64(4):1169-78.
53. Savige J, Gregory M, Gross O, Kashtan C, Ding J, Flinter F. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* févr 2013;24(3):364-75.
54. Yamamura T, Nozu K, Fu XJ, Nozu Y, Ye MJ, Shono A, et al. Natural History and Genotype-Phenotype Correlation in Female X-Linked Alport Syndrome. *Kidney Int Rep.* sept 2017;2(5):850-5.
55. van Paassen P, van Breda Vriesman PJC, van Rie H, Tervaert JWC. Signs and symptoms of thin basement membrane nephropathy: a prospective regional study on primary glomerular disease-The Limburg Renal Registry. *Kidney Int.* sept 2004;66(3):909-13.
56. Nieuwhof CM, de Heer F, de Leeuw P, van Breda Vriesman PJ. Thin GBM nephropathy: premature glomerular obsolescence is associated with hypertension and late onset renal failure. *Kidney Int.* mai 1997;51(5):1596-601.
57. Gibson JT, de Gooyer M, Huang M, Savige J. A Systematic Review of Pathogenic COL4A5 Variants and Proteinuria in Women and Girls With X-linked Alport Syndrome. *Kidney Int Rep.* nov 2022;7(11):2454-61.
58. Bekheirnia MR, Reed B, Gregory MC, McFann K, Shamshirsaz AA, Masoumi A, et al. Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* mai 2010;21(5):876-83.
59. Storey H, Savige J, Sivakumar V, Abbs S, Flinter FA. COL4A3/COL4A4 mutations and features in individuals with autosomal recessive Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* déc 2013;24(12):1945-54.
60. Savige J, Rana K, Tonna S, Buzzza M, Dagher H, Wang YY. Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int.* oct 2003;64(4):1169-78.
61. Furlano M, Martínez V, Pybus M, Arce Y, Crespí J, Venegas MDP, et al. Clinical and Genetic Features of Autosomal Dominant Alport Syndrome: A Cohort Study. *Am J Kidney Dis.* oct 2021;78(4):560-570.e1.
62. Govan JA. Ocular manifestations of Alport's syndrome: a hereditary disorder of basement membranes? *Br J Ophthalmol.* août 1983;67(8):493-503.
63. Burke JP, Clearkin LG, Talbot JF. Recurrent corneal epithelial erosions in Alport's syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh).* août 1991;69(4):555-7.
64. Rhys C, Snyers B, Pirson Y. Recurrent corneal erosion associated with Alport's syndrome. Rapid communication. *Kidney Int.* juill 1997;52(1):208-11.

65. Savige J, Sheth S, Leys A, Nicholson A, Mack HG, Colville D. Ocular features in Alport syndrome: pathogenesis and clinical significance. *Clin J Am Soc Nephrol.* 7 avr 2015;10(4):703-9.
66. Cheong HI, Kashtan CE, Kim Y, Kleppel MM, Michael AF. Immunohistologic studies of type IV collagen in anterior lens capsules of patients with Alport syndrome. *Lab Invest.* avr 1994;70(4):553-7.
67. Streeten BW, Robinson MR, Wallace R, Jones DB. Lens capsule abnormalities in Alport's syndrome. *Arch Ophthalmol.* déc 1987;105(12):1693-7.
68. Wang Y, Sivakumar V, Mohammad M, Colville D, Storey H, Flinter F, et al. Clinical and genetic features in autosomal recessive and X-linked Alport syndrome. *Pediatr Nephrol.* mars 2014;29(3):391-6.
69. Shaw EA, Colville D, Wang YY, Zhang KW, Dagher H, Fassett R, et al. Characterization of the peripheral retinopathy in X-linked and autosomal recessive Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* janv 2007;22(1):104-8.
70. Tan R, Colville D, Wang YY, Rigby L, Savige J. Alport retinopathy results from « severe » COL4A5 mutations and predicts early renal failure. *Clin J Am Soc Nephrol.* janv 2010;5(1):34-8.
71. Colville D, Savige J, Branley P, Wilson D. Ocular abnormalities in thin basement membrane disease. *Br J Ophthalmol.* mai 1997;81(5):373-7.
72. Savige J, Rana K, Tonna S, Buzza M, Dagher H, Wang YY. Thin basement membrane nephropathy. *Kidney International.* oct 2003;64(4):1169-78.
73. Kashtan CE, Segal Y, Flinter F, Mäkanjuola D, Gan JS, Watnick T. Aortic abnormalities in males with Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* nov 2010;25(11):3554-60.
74. Earl TJ, Khan L, Hagau D, Fernandez AB. The spectrum of aortic pathology in alport syndrome: a case report and review of the literature. *Am J Kidney Dis.* nov 2012;60(5):821-2.
75. Patel J, Abt P, Cheng K, Aurigemma G, Rosenthal L. Type A Dissection in a Patient With Alport Syndrome. *Circ Cardiovasc Imaging.* déc 2020;13(12):e010701.
76. Lyons OTA, St John ERC, Morales JP, Chan YC, Taylor PR. Ruptured thoracoabdominal aortic aneurysm in a renal transplant patient with Alport's syndrome. *Ann Vasc Surg.* nov 2007;21(6):816-8.
77. Vaicys C, Hunt CD, Heary RF. Ruptured intracranial aneurysm in an adolescent with Alport's syndrome--a new expression of type IV collagenopathy: case report. *Surg Neurol.* juill 2000;54(1):68-72.
78. Tayel S, Kurczynski TW, Levine M, Brookfield E, Ehrlich R, Hennessy JR, et al. Marfanoid children. Etiologic heterogeneity and cardiac findings. *Am J Dis Child.* janv 1991;145(1):90-3.
79. Borza DB, Bondar O, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Todd P, et al. The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes. *J Biol Chem.* 27 juill 2001;276(30):28532-40.

80. Plaisier E, Gribouval O, Alamowitch S, Mougenot B, Prost C, Verpont MC, et al. COL4A1 mutations and hereditary angiopathy, nephropathy, aneurysms, and muscle cramps. *N Engl J Med*. 27 déc 2007;357(26):2687-95.
81. Gould DB, Phalan FC, van Mil SE, Sundberg JP, Vahedi K, Massin P, et al. Role of COL4A1 in small-vessel disease and hemorrhagic stroke. *N Engl J Med*. 6 avr 2006;354(14):1489-96.
82. Delteil C, Macagno N, Daniel L, D'Journo XB, Guisiano S, Garcia S, et al. [Diffuse esophageal leiomyomatosis and Alport's syndrome: A case report and review of the literature]. *Ann Pathol*. févr 2019;39(1):36-9.
83. Seremetis MG, Lyons WS, deGuzman VC, Peabody JW. Leiomyomata of the esophagus. An analysis of 838 cases. *Cancer*. nov 1976;38(5):2166-77.
84. Liu W, Wong JKL, He Q, Wong EHM, Tang CSM, Zhang R, et al. Chinese family with diffuse oesophageal leiomyomatosis: a new COL4A5/COL4A6 deletion and a case of gonosomal mosaicism. *BMC Med Genet*. 16 juill 2015;16:49.
85. Cosio FG, Falkenhain ME, Sedmak DD. Association of thin glomerular basement membrane with other glomerulopathies. *Kidney Int*. août 1994;46(2):471-4.
86. Hinglais N, Grünfeld JP, Bois E. Characteristic ultrastructural lesion of the glomerular basement membrane in progressive hereditary nephritis (Alport's syndrome). *Lab Invest*. nov 1972;27(5):473-87.
87. Spear GS, Slusser RJ. Alport's syndrome. Emphasizing electron microscopic studies of the glomerulus. *Am J Pathol*. nov 1972;69(2):213-24.
88. Voskarides K, Damianou L, Neocleous V, Zouvani I, Christodoulidou S, Hadjiconstantinou V, et al. COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. nov 2007;18(11):3004-16.
89. Kashtan CE. Alport syndrome and the X chromosome: implications of a diagnosis of Alport syndrome in females. *Nephrol Dial Transplant*. juin 2007;22(6):1499-505.
90. Meleg-Smith S, Magliato S, Cheles M, Garola RE, Kashtan CE. X-linked Alport syndrome in females. *Hum Pathol*. avr 1998;29(4):404-8.
91. Gubler MC, Knebelmann B, Beziau A, Broyer M, Pirson Y, Haddoum F, et al. Autosomal recessive Alport syndrome: immunohistochemical study of type IV collagen chain distribution. *Kidney Int*. avr 1995;47(4):1142-7.
92. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, et al. X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a « European Community Alport Syndrome Concerted Action » study. *J Am Soc Nephrol*. oct 2003;14(10):2603-10.
93. Oka M, Nozu K, Kaito H, Fu XJ, Nakanishi K, Hashimura Y, et al. Natural history of genetically proven autosomal recessive Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*. sept 2014;29(9):1535-44.
94. Nakanishi K, Iijima K, Kuroda N, Inoue Y, Sado Y, Nakamura H, et al. Comparison of

- alpha5(IV) collagen chain expression in skin with disease severity in women with X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* août 1998;9(8):1433-40.
95. Hashimura Y, Nozu K, Kaito H, Nakanishi K, Fu XJ, Ohtsubo H, et al. Milder clinical aspects of X-linked Alport syndrome in men positive for the collagen IV α 5 chain. *Kidney Int.* mai 2014;85(5):1208-13.
96. Savige J, Storey H, Il Cheong H, Gyung Kang H, Park E, Hilbert P, et al. X-Linked and Autosomal Recessive Alport Syndrome: Pathogenic Variant Features and Further Genotype-Phenotype Correlations. *PLoS One.* 2016;11(9):e0161802.
97. Gibson JT, Huang M, Shenelli Croos Dabrera M, Shukla K, Rothe H, Hilbert P, et al. Genotype-phenotype correlations for COL4A3-COL4A5 variants resulting in Gly substitutions in Alport syndrome. *Sci Rep.* 17 févr 2022;12(1):2722.
98. Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant.* juill 2002;17(7):1218-27.
99. Horinouchi T, Nozu K, Yamamura T, Minamikawa S, Omori T, Nakanishi K, et al. Detection of Splicing Abnormalities and Genotype-Phenotype Correlation in X-linked Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* août 2018;29(8):2244-54.
100. Savige J, Storey H, Watson E, Hertz JM, Deltas C, Renieri A, et al. Consensus statement on standards and guidelines for the molecular diagnostics of Alport syndrome: refining the ACMG criteria. *Eur J Hum Genet.* août 2021;29(8):1186-97.
101. Tsiakkis D, Pieri M, Koupepidou P, Demosthenous P, Panayidou K, Deltas C. Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome patients carrying missense mutations in the collagenous domain of COL4A5. *Clinical Genetics.* sept 2012;82(3):297-9.
102. Persikov AV, Pillitteri RJ, Amin P, Schwarze U, Byers PH, Brodsky B. Stability related bias in residues replacing glycines within the collagen triple helix (Gly-Xaa-Yaa) in inherited connective tissue disorders. *Hum Mutat.* oct 2004;24(4):330-7.
103. Savige J, Huang M, Croos Dabrera MS, Shukla K, Gibson J. Genotype-Phenotype Correlations for Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in X-Linked, Autosomal Recessive, and Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:865034.
104. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat.* mars 2007;28(3):209-21.
105. Deltas C, Pierides A, Voskarides K. The role of molecular genetics in diagnosing familial hematuria(s). *Pediatr Nephrol.* août 2012;27(8):1221-31.
106. Deltas C, Pierides A, Voskarides K. Molecular genetics of familial hematuric diseases. *Nephrol Dial Transplant.* déc 2013;28(12):2946-60.
107. Barker DF, Denison JC, Atkin CL, Gregory MC. Efficient detection of Alport syndrome COL4A5 mutations with multiplex genomic PCR-SSCP. *Am J Med Genet.* 15 janv 2001;98(2):148-60.

108. Slajpah M, Gorinsek B, Berginc G, Vizjak A, Ferluga D, Hvala A, et al. Sixteen novel mutations identified in COL4A3, COL4A4, and COL4A5 genes in Slovenian families with Alport syndrome and benign familial hematuria. *Kidney Int.* juin 2007;71(12):1287-95.
109. Pierides A, Voskarides K, Kkolou M, Hadjigavriel M, Deltas C. X-linked, COL4A5 hypomorphic Alport mutations such as G624D and P628L may only exhibit thin basement membrane nephropathy with microhematuria and late onset kidney failure. *Hippokratia.* 2013;17(3):207-13.
110. Demosthenous P, Voskarides K, Stylianos K, Hadjigavriel M, Arsali M, Patsias C, et al. X-linked Alport syndrome in Hellenic families: phenotypic heterogeneity and mutations near interruptions of the collagen domain in COL4A5. *Clin Genet.* mars 2012;81(3):240-8.
111. Źurowska AM, Bielska O, Daca-Roszak P, Jankowski M, Szczepańska M, Roszkowska-Bjanid D, et al. Mild X-linked Alport syndrome due to the COL4A5 G624D variant originating in the Middle Ages is predominant in Central/East Europe and causes kidney failure in midlife. *Kidney Int.* juin 2021;99(6):1451-8.
112. Macheroux EP, Braunisch MC, Pucci Pegler S, Satanovskij R, Riedhammer KM, Günthner R, et al. The Hypomorphic Variant p.(Gly624Asp) in COL4A5 as a Possible Cause for an Unexpected Severe Phenotype in a Family With X-Linked Alport Syndrome. *Front Pediatr.* 2019;7:485.
113. Hertz JM, Juncker I, Persson U, Matthijs G, Schmidtke J, Petersen MB, et al. Detection of mutations in the COL4A5 gene by SSCP in X-linked Alport syndrome. *Hum Mutat.* août 2001;18(2):141-8.
114. Crawford MD, Toghil PJ. Alport's syndrome of hereditary nephritis and deafness. *Q J Med.* oct 1968;37(148):563-76.
115. Massella L, Onetti Muda A, Faraggiana T, Bette C, Renieri A, Rizzoni G. Epidermal basement membrane alpha 5(IV) expression in females with Alport syndrome and severity of renal disease. *Kidney Int.* nov 2003;64(5):1787-91.
116. Rheault MN, Kren SM, Hartich LA, Wall M, Thomas W, Mesa HA, et al. X-inactivation modifies disease severity in female carriers of murine X-linked Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* mars 2010;25(3):764-9.
117. Migeon BR. X-linked diseases: susceptible females. *Genet Med.* juill 2020;22(7):1156-74.
118. Vetrie D, Flinter F, Bobrow M, Harris A. X inactivation patterns in females with Alport's syndrome: a means of selecting against a deleterious gene? *J Med Genet.* sept 1992;29(9):663-6.
119. Günthner R, Knipping L, Jeruschke S, Satanovskij R, Lorenz-Depiereux B, Hemmer C, et al. Renal X-inactivation in female individuals with X-linked Alport syndrome primarily determined by age. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:953643.
120. Choi M, Anistan YM, Eckardt KU, Gollasch M, Nickel P. Possible Digenic Disease in a Caucasian Family with COL4A3 and COL4A5 Mutations. *Nephron.* 2019;141(3):213-8.
121. Savige J, Renieri A, Ars E, Daga S, Pinto AM, Rothe H, et al. Digenic Alport Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* nov 2022;17(11):1697-706.

122. Zhang Y, Böckhaus J, Wang F, Wang S, Rubel D, Gross O, et al. Genotype-phenotype correlations and nephroprotective effects of RAAS inhibition in patients with autosomal recessive Alport syndrome. *Pediatr Nephrol.* sept 2021;36(9):2719-30.
123. Fallerini C, Baldassarri M, Trevisson E, Morbidoni V, La Manna A, Lazzarin R, et al. Alport syndrome: impact of digenic inheritance in patients management. *Clin Genet.* juill 2017;92(1):34-44.
124. Zhao X, Chen C, Wei Y, Zhao G, Liu L, Wang C, et al. Novel mutations of COL4A3, COL4A4, and COL4A5 genes in Chinese patients with Alport Syndrome using next generation sequence technique. *Mol Genet Genomic Med.* 9 avr 2019;7(6):e653.
125. Masuda Y, Yamanaka N, Ishikawa A, Kataoka M, Arai T, Wakamatsu K, et al. Glomerular basement membrane injuries in IgA nephropathy evaluated by double immunostaining for $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 2(\text{IV})$ chains of type IV collagen and low-vacuum scanning electron microscopy. *Clin Exp Nephrol.* juin 2015;19(3):427-35.
126. Matthaiou A, Poulli T, Deltas C. Prevalence of clinical, pathological and molecular features of glomerular basement membrane nephropathy caused by COL4A3 or COL4A4 mutations: a systematic review. *Clin Kidney J.* déc 2020;13(6):1025-36.
127. Ritchie CD, Bevan EA, Collier SJ. Importance of occult haematuria found at screening. *Br Med J (Clin Res Ed).* 8 mars 1986;292(6521):681-3.
128. Dodge WF, West EF, Smith EH, Bruce Harvey 3rd null. Proteinuria and hematuria in schoolchildren: epidemiology and early natural history. *J Pediatr.* févr 1976;88(2):327-47.
129. Dische FE, Anderson VE, Keane SJ, Taube D, Bewick M, Parsons V. Incidence of thin membrane nephropathy: morphometric investigation of a population sample. *J Clin Pathol.* juin 1990;43(6):457-60.
130. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, Petrovski S, Aggarwal VS, Milo-Rasouly H, et al. Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. *N Engl J Med.* 10 janv 2019;380(2):142-51.
131. Temme J, Peters F, Lange K, Pirson Y, Heidet L, Torra R, et al. Incidence of renal failure and nephroprotection by RAAS inhibition in heterozygous carriers of X-chromosomal and autosomal recessive Alport mutations. *Kidney Int.* avr 2012;81(8):779-83.
132. Pierides A, Voskarides K, Athanasiou Y, Ioannou K, Damianou L, Arsali M, et al. Clinico-pathological correlations in 127 patients in 11 large pedigrees, segregating one of three heterozygous mutations in the COL4A3/ COL4A4 genes associated with familial haematuria and significant late progression to proteinuria and chronic kidney disease from focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* sept 2009;24(9):2721-9.
133. Kamiyoshi N, Nozu K, Fu XJ, Morisada N, Nozu Y, Ye MJ, et al. Genetic, Clinical, and Pathologic Backgrounds of Patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 8 août 2016;11(8):1441-9.
134. Deltas C, Papagregoriou G, Louka SF, Malatras A, Flinter F, Gale DP, et al. Genetic Modifiers of Mendelian Monogenic Collagen IV Nephropathies in Humans and Mice. *Genes (Basel).* 25 août 2023;14(9):1686.

135. Voskarides K, Stefanou C, Pieri M, Demosthenous P, Felekis K, Arsali M, et al. A functional variant in NEPH3 gene confers high risk of renal failure in primary hematuric glomerulopathies. Evidence for predisposition to microalbuminuria in the general population. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174274.
136. Daga S, Fallerini C, Furini S, Pecoraro C, Scolari F, Ariani F, et al. Non-collagen genes role in digenic Alport syndrome. *BMC Nephrol*. 26 févr 2019;20(1):70.
137. Machuca E, Benoit G, Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum Mol Genet*. 15 oct 2009;18(R2):R185-194.
138. Bullich G, Trujillano D, Santín S, Ossowski S, Mendizábal S, Fraga G, et al. Targeted next-generation sequencing in steroid-resistant nephrotic syndrome: mutations in multiple glomerular genes may influence disease severity. *Eur J Hum Genet*. sept 2015;23(9):1192-9.
139. Voskarides K, Arsali M, Athanasiou Y, Elia A, Pierides A, Deltas C. Evidence that NPHS2-R229Q predisposes to proteinuria and renal failure in familial hematuria. *Pediatr Nephrol*. avr 2012;27(4):675-9.
140. Tonna S, Wang YY, Wilson D, Rigby L, Tabone T, Cotton R, et al. The R229Q mutation in NPHS2 may predispose to proteinuria in thin-basement-membrane nephropathy. *Pediatr Nephrol*. déc 2008;23(12):2201-7.
141. Mikó Á, K Menyhárd D, Kaposi A, Antignac C, Tory K. The mutation-dependent pathogenicity of NPHS2 p.R229Q: A guide for clinical assessment. *Hum Mutat*. déc 2018;39(12):1854-60.
142. Čomić J, Riedhammer KM, Günthner R, Schaaf CW, Richthammer P, Simmendinger H, et al. The multifaceted phenotypic and genotypic spectrum of type-IV-collagen-related nephropathy-A human genetics department experience. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:957733.
143. Savige J, Ariani F, Mari F, Bruttini M, Renieri A, Gross O, et al. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*. juill 2019;34(7):1175-89.
144. Morinière V, Dahan K, Hilbert P, Lison M, Lebbah S, Topa A, et al. Improving mutation screening in familial hematuric nephropathies through next generation sequencing. *J Am Soc Nephrol*. déc 2014;25(12):2740-51.
145. King K, Flinter FA, Nihalani V, Green PM. Unusual deep intronic mutations in the COL4A5 gene cause X linked Alport syndrome. *Hum Genet*. déc 2002;111(6):548-54.
146. Plant KE, Boye E, Green PM, Vetrie D, Flinter FA. Somatic mosaicism associated with a mild Alport syndrome phenotype. *J Med Genet*. mars 2000;37(3):238-9.
147. Nagano C, Nozu K, Morisada N, Yazawa M, Ichikawa D, Numasawa K, et al. Detection of copy number variations by pair analysis using next-generation sequencing data in inherited kidney diseases. *Clin Exp Nephrol*. août 2018;22(4):881-8.
148. Wang X, Zhang Y, Ding J, Wang F. mRNA analysis identifies deep intronic variants causing Alport syndrome and overcomes the problem of negative results of exome sequencing. *Sci Rep*. 10 sept 2021;11(1):18097.

149. Oka M, Nozu K, Kaito H, Fu XJ, Nakanishi K, Hashimura Y, et al. Natural history of genetically proven autosomal recessive Alport syndrome. *Pediatr Nephrol.* sept 2014;29(9):1535-44.
150. Norby SM, Cosio FG. Thin basement membrane nephropathy associated with other glomerular diseases. *Semin Nephrol.* mai 2005;25(3):176-9.
151. Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, Yang Y, Wang F, Chowdhury M, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol.* déc 2013;24(12):2081-95.
152. Savige J, Harraka P. Pathogenic Variants in the Genes Affected in Alport Syndrome (COL4A3-COL4A5) and Their Association With Other Kidney Conditions: A Review. *Am J Kidney Dis.* déc 2021;78(6):857-64.
153. Riedhammer KM, Braunisch MC, Günthner R, Wagner M, Hemmer C, Strom TM, et al. Exome Sequencing and Identification of Phenocopies in Patients With Clinically Presumed Hereditary Nephropathies. *American Journal of Kidney Diseases.* oct 2020;76(4):460-70.
154. Malone AF, Phelan PJ, Hall G, Cetincelik U, Homstad A, Alonso AS, et al. Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* déc 2014;86(6):1253-9.
155. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M, Bunyan DJ, Seaby EG, Graham N, et al. Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* juin 2016;31(6):961-70.
156. Sevillano AM, Gutierrez E, Morales E, Hernandez E, Molina M, Gonzalez E, et al. Multiple kidney cysts in thin basement membrane disease with proteinuria and kidney function impairment. *Clin Kidney J.* juin 2014;7(3):251-6.
157. Nogueira M, Cartwright J, Horn K, Doe N, Shappell S, Barrios R, et al. Thin basement membrane disease with heavy proteinuria or nephrotic syndrome at presentation. *Am J Kidney Dis.* avr 2000;35(4):E15.
158. Magistroni R, D'Agati VD, Appel GB, Kiryluk K. New developments in the genetics, pathogenesis, and therapy of IgA nephropathy. *Kidney Int.* nov 2015;88(5):974-89.
159. Packham DK. Thin basement membrane nephropathy and IgA glomerulonephritis: can they be distinguished without renal biopsy? *Nephrology (Carlton).* oct 2007;12(5):481-6.
160. Stapleton CP, Kennedy C, Fennelly NK, Murray SL, Connaughton DM, Dorman AM, et al. An Exome Sequencing Study of 10 Families with IgA Nephropathy. *Nephron.* 2020;144(2):72-83.
161. Berthoux FC, Laurent B, Koller JM, Nicolas J, Alamartine E, Berthoux P, et al. Primary IgA glomerulonephritis with thin glomerular basement membrane: a peculiar pathological marker versus thin membrane nephropathy association. *Contrib Nephrol.* 1995;111:1-6; discussion 6-7.
162. Sue YM, Huang JJ, Hsieh RY, Chen FF. Clinical features of thin basement membrane disease and associated glomerulopathies. *Nephrology (Carlton).* févr 2004;9(1):14-8.

163. Li Z, Zhu P, Huang H, Pan Y, Han P, Cui H, et al. Identification of a novel COL4A5 mutation in the proband initially diagnosed as IgAN from a Chinese family with X-linked Alport syndrome. *Sci China Life Sci.* déc 2019;62(12):1572-9.
164. Li Y, Groopman EE, D'Agati V, Prakash S, Zhang J, Mizerska-Wasiak M, et al. Type IV Collagen Mutations in Familial IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep.* juill 2020;5(7):1075-8.
165. Cambier A, Robert T, Hogan J, Rabant M, Peuchmaur M, Boyer O, et al. Rare Collagenous Heterozygote Variants in Children With IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep.* mai 2021;6(5):1326-35.
166. Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3 avr 2017;12(4):677-86.
167. Linossier MT, Palle S, Berthoux F. Different glycosylation profile of serum IgA1 in IgA nephropathy according to the glomerular basement membrane thickness: normal versus thin. *Am J Kidney Dis.* mars 2003;41(3):558-64.
168. Savige J, Mack H, Thomas R, Langsford D, Pianta T. Alport Syndrome With Kidney Cysts Is Still Alport Syndrome. *Kidney Int Rep.* 9 nov 2021;7(2):339-42.
169. Gulati A, Sevillano AM, Praga M, Gutierrez E, Alba I, Dahl NK, et al. Collagen IV Gene Mutations in Adults With Bilateral Renal Cysts and CKD. *Kidney Int Rep.* janv 2020;5(1):103-8.
170. Hood JC, Dowling J, Bertram JF, Young RJ, Huxtable C, Robinson W, et al. Correlation of histopathological features and renal impairment in autosomal dominant Alport syndrome in Bull terriers. *Nephrol Dial Transplant.* nov 2002;17(11):1897-908.
171. Gross O, Friede T, Hilgers R, Görlitz A, Gavénis K, Ahmed R, et al. Safety and Efficacy of the ACE-Inhibitor Ramipril in Alport Syndrome: The Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III EARLY PRO-TECT Alport Trial in Pediatric Patients. *ISRN Pediatr.* 2012;2012:436046.
172. Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tönshoff B, et al. Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney International.* 1 mars 2012;81(5):494-501.
173. Kashtan CE, Gross O. Clinical practice recommendations for the diagnosis and management of Alport syndrome in children, adolescents, and young adults-an update for 2020. *Pediatr Nephrol.* mars 2021;36(3):711-9.
174. Zeng M, Di H, Liang J, Liu Z. Effectiveness of renin-angiotensin-aldosterone system blockers in patients with Alport syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 22 mai 2023;gfd105.
175. Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, Chertow GM, Greene T, Hou FF, et al. Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med.* 8 oct 2020;383(15):1436-46.
176. Boeckhaus J, Gross O. Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors in Patients with Hereditary Podocytopathies, Alport Syndrome, and FSGS: A Case Series to Better Plan a Large-Scale Study. *Cells.* 18 juill 2021;10(7):1815.

177. Chavez E, Rodriguez J, Drexler Y, Fornoni A. Novel Therapies for Alport Syndrome. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:848389.
178. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, Kaimal V, Roach AM, Ren S, et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest*. janv 2015;125(1):141-56.
179. Guo J, Song W, Boulanger J, Xu EY, Wang F, Zhang Y, et al. Dysregulated Expression of microRNA-21 and Disease-Related Genes in Human Patients and in a Mouse Model of Alport Syndrome. *Hum Gene Ther*. juill 2019;30(7):865-81.
180. Pergola PE, Raskin P, Toto RD, Meyer CJ, Huff JW, Grossman EB, et al. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 28 juill 2011;365(4):327-36.
181. Chertow GM, Appel GB, Andreoli S, Bangalore S, Block GA, Chapman AB, et al. Study Design and Baseline Characteristics of the CARDINAL Trial: A Phase 3 Study of Bardoxolone Methyl in Patients with Alport Syndrome. *Am J Nephrol*. 2021;52(3):180-9.
182. Trachtman H, Nelson P, Adler S, Campbell KN, Chaudhuri A, Derebail VK, et al. DUET: A Phase 2 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Sparsentan in Patients with FSGS. *J Am Soc Nephrol*. nov 2018;29(11):2745-54.
183. Rubel D, Stock J, Ciner A, Hiller H, Girgert R, Müller GA, et al. Antifibrotic, nephroprotective effects of paricalcitol versus calcitriol on top of ACE-inhibitor therapy in the COL4A3 knockout mouse model for progressive renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. mai 2014;29(5):1012-9.
184. Koepke ML, Weber M, Schulze-Lohoff E, Beirowski B, Segerer S, Gross O. Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. avr 2007;22(4):1062-9.
185. Torra R, Furlano M. New therapeutic options for Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 1 août 2019;34(8):1272-9.



SERMENT D'HIPPOCRATE



Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

AUTEURE : Nom : PAGNIEZ

Prénom : Marie-Sophie

Date de soutenance : 26 octobre 2023

Titre de la thèse : Caractéristiques cliniques, histologiques et génétiques d'une cohorte de patients suivis pour un Syndrome d'Alport : une étude rétrospective multicentrique

Thèse - Médecine – Lille - 2023

Cadre de classement : Néphrologie - Génétique

DES : Néphrologie

Mots-clés : Basalopathie, COL4A3, COL4A4, COL4A5, Collagène type IV, Maladie rénale chronique, Substitution de la glycine, Syndrome d'Alport.

Résumé :

Contexte : Le syndrome d'Alport (SA) correspond à la seconde cause d'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) d'origine génétique. Si la corrélation génotype/phénotype est bien documentée pour les formes liées à l'X masculines (XLAS) ou autosomiques récessives (ARAS), aucun lien aussi clair n'a pu être à ce jour établi chez les patients porteurs d'un variant unique de *COL4A3* ou de *COL4A4*, ou SA autosomique dominant (ADAS).

Méthode : Etude de cohorte multicentrique, rétrospective, incluant les patients diagnostiqués SA sur la base de la présence d'au moins un variant pathogène (ACMG IV ou V) de *COL4A3*, *COL4A4* ou de *COL4A5*. Les données ont été recueillies à partir des dossiers médicaux et registres génétiques de chaque centre (CHU de Lille, Bordeaux et Paris-Tenon).

Résultats : 193 patients ont été inclus, dont 38 XLAS masculins, 36 XLAS féminins, 22 ARAS, et 97 ADAS. Le diagnostic était obtenu à l'aide d'un whole exome sequencing (n=60), un panel (n=95) ou un test de Sanger (n=18). Les mutations les plus fréquentes correspondaient à des substitutions impliquant la glycine (n=109, dont 61 ADAS). Comme attendu, l'âge de survenue de l'IRCT était significativement plus précoce chez les XLAS masculins (36.1 [29.6-NA] ans) et chez les ARAS (43.5 [25.7-NA] ans) que chez les XLAS féminins (57 [54.6-NA] ans) et les ADAS (62.8 [55.5-NA] ans) (p < 0.0001). Chez les ADAS, la localisation de la mutation dans les exons distaux (21 à C-ter) était significativement associée à un impact péjoratif sur la survie rénale (HR = 3.9 (1.2-13), p=0.02), à un âge de survenue plus précoce de survenue de l'IRCT (55.5 *versus* 69.5 ans, p=0.014), et enfin à un déclin annuel du DFGe plus prononcé (-2.3 ml/min/1.73m²/an *versus* -1.7 ml/min/1.73m²/an, p=0.04). Dans cette population, la présence d'une mutation sévère (non-sens, décalante, délétion étendue, atteinte des sites d'épissages), n'impactait à l'inverse pas péjorativement la survie rénale ou le déclin du DFGe.

Conclusion : Notre étude confirme les données établies sur les XLAS et les ARAS, et apporte des données nouvelles concernant la corrélation génotype/phénotype des ADAS. Chez ces derniers, nous avons mis en évidence pour la première fois à notre connaissance qu'une substitution de la glycine impliquant les exons distaux impactait péjorativement la survie rénale, probablement par défaut de trimérisation.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur François GLOWACKI

**Assesseurs : Madame le Professeur Claire RIGOTHIER
Monsieur le Professeur Laurent MESNARD
Monsieur le Docteur Romain LARRUE**

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Victor FAGES