

UNIVERSITE DE NANTES
UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNEE 2020

N°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
et
MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MEDICALE

par

Adeline GOUDAL

Présentée et soutenue publiquement le lundi 12 octobre 2020

<p>Mise en place du séquençage haut-débit dans le diagnostic moléculaire des hypercholestérolémies et hypocholestérolémies familiales</p>

Président du jury : Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD
Directeurs de thèse : Monsieur le Professeur Stéphane BEZIEAU
Monsieur le Professeur Bertrand CARIOU
Membres du jury : Monsieur le Professeur Thierry LE TOURNEAU
Madame le Docteur Mathilde DI FILIPPO
Monsieur le Docteur Jean-Jacques SCHOTT
Monsieur le Docteur Antoine RIMBERT

Remerciements

Au président du jury, Monsieur le Professeur Jean-Marie Bard, de me faire l'honneur de présider ce jury et de juger mon travail. Veuillez croire en mon profond respect.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Stéphane Bezieau, pour m'avoir confiée ce travail. Je te remercie pour ta confiance, ton soutien et ta bienveillance au quotidien. Je te prie de croire en mon plus grand respect et ma sincère reconnaissance.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Bertrand Cariou, pour m'avoir encadrée pour ce travail et pour votre confiance. Veuillez croire en mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Thierry Le Tourneau, pour me faire l'honneur de juger ce travail et de faire partie de ce jury. Veuillez croire en mon profond respect.

A Madame le Docteur Mathilde Di Filippo, pour me faire l'honneur de juger ce travail et de faire partie de ce jury. Je te remercie pour ton accueil chaleureux à Lyon et pour ton aide précieuse durant ce travail. Je te prie de croire en mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Jean-Jacques Schott, pour me faire l'honneur de juger ce travail. Je te remercie pour l'accueil et les connaissances apprises au sein de ton équipe durant mon année de M2. Je te prie de croire en mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Antoine Rimbart, pour me faire l'honneur de participer à ce jury. Je te remercie pour ton aide précieuse et ta disponibilité dans ce projet. Je te prie de croire en mon profond respect.

Merci à la société **Twist Bioscience®** et à la société **SeqOne®** pour leur aide dans la mise en place de ce projet.

À mes cointernes de biologie, Justine, Pierre, Charles, Dru, Clélia, Martin, Antoine, Clémence, Coralie, Nicolas, Cécile, Florian et tous les autres que je ne cite pas mais à qui je pense aussi. Merci pour ces semestres passés ensemble et ces soirées partagées.

A mes cointernes de génétique, Wallid, Solène, Leïla, Elise, Silvestre. Merci pour ces bons moments passés ensemble et pour votre soutien au quotidien.

Aux différents services dans lesquels je suis passée pendant mon internat. Merci pour l'accueil et la formation que vous m'avez transmise.

A toute l'équipe du laboratoire de génétique. Merci à chacun pour votre sourire, votre disponibilité et tout ce que vous m'avez appris.

Merci à **Marie** et **Mathilde**, de m'avoir aidée dans la mise en place de ce projet, de votre disponibilité et de votre bienveillance.

Merci à **Delphine** et **Ingrid**, pour votre motivation et votre enthousiasme. Merci d'avoir accepté de participer à ce projet.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Pierre**. Merci pour ta relecture, tes conseils avisés et ton soutien pour ce travail. Un grand Merci de répondre à mes questions de génétique sans oublier toutes les autres, toujours avec bonne humeur. C'est un réel plaisir de travailler à tes côtés. Merci de partager ton goûter, je ne pouvais espérer un meilleur voisin de bureau.

Je remercie également **Sébastien**. Merci pour ton soutien au laboratoire et ton encadrement. Merci également pour ces moments agréables chaque jour, j'ai plaisir à travailler avec toi.

A mes amis,

A Carole, ma meilleure amie. Merci infiniment d'avoir été là pour ces années de lycée et de fac. Merci pour tous ces bons moments passés inoubliables. Malgré la distance, notre amitié reste et elle m'est si précieuse.

A Marie-Laure, pour nos bons moments passés ensemble et ceux à venir. Merci de répondre toujours présente, après toutes ces années.

A la team « trop d'nanana » Wallid et Emma, Claire et Valentin, Raphaël et Pauline, pour vous avoir rencontrés pendant le M2. Merci pour toutes ces soirées jeux et votre amitié. Grâce à vous, j'enrichis ma pop' culture.

Aux trois petits chats Camille, Sophie, Alix sans oublier **Pierre, Olivier et Ronan**. Merci pour votre indispensable soutien et votre amitié. Ces soirées passées ensemble, et toutes celles à venir, embellissent mon quotidien.

A ma famille,

A la famille David, pour votre soutien chaleureux et votre présence.

A ma sœur Aurélie, pour ton soutien et ton écoute de chaque instant. Merci pour tous ces très beaux moments passés ensemble et ceux à venir. Merci aussi pour ta joie de vivre.

A mes parents, pour votre soutien infailible et votre présence rassurante. Un immense merci pour tout ce que vous faites pour moi. Merci de me rendre la vie si douce.

A Samuel, pour ton écoute et ton soutien dans l'aboutissement de cette thèse. Merci de toujours trouver les mots pour me rassurer. Et aussi de me chouchouter chaque jour. C'est un vrai bonheur de partager ma vie avec toi.

Tables des matières

Remerciements	1
Liste des abréviations	7
Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
I. Introduction	11
A. Les maladies cardiovasculaires	11
B. Les facteurs de risque cardiovasculaire	12
1. Cohorte de Framingham	12
2. Facteur de risque	12
C. Le risque cardiovasculaire total	16
1. Modèle de Framingham	16
2. Système SCORE	17
3. Méthodes non-invasives.....	19
D. Les lipoprotéines.....	20
1. Caractéristiques des lipoprotéines.....	20
2. Métabolisme des lipoprotéines.....	21
E. La régulation physiologique de l'homéostasie du cholestérol.....	24
1. Voie SREBP (<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>).....	24
2. Voie PCSK9 (<i>Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9</i>)	26
3. Voie LXR (<i>Liver X receptor</i>).....	27
F. L'athérosclérose	27
II. Les dyslipidémies	30
A. Bilan biologique	30
1. Exploration d'une anomalie lipidique.....	30
2. Autres paramètres de l'exploration lipidique.....	34
B. Etiologies des hypercholestérolémies.....	36
1. Hypothyroïdie	36
2. Hépatopathie, cholestase	36
3. Insuffisance rénale, syndrome néphrotique	36
4. Autres causes	36
C. Hypercholestérolémies familiales.....	37
1. Diagnostic de l'hypercholestérolémie pure familiale	37

2.	Stratégie diagnostique	42
3.	Gènes impliqués dans l'HF	42
4.	Hypercholestérolémie pure polygénique	48
5.	Prévention cardiovasculaire	51
D.	Hypocholestérolémies familiales.....	54
1.	Hypobêtalipoprotéïnémies de découverte fortuite	54
2.	Hypobêtalipoprotéïnémies associées à des diarrhées.....	55
3.	Score polygénique.....	57
4.	Prise en charge thérapeutique	58
E.	Hyperlipidémies mixtes	58
1.	Hyperlipoprotéïnémie de type III.....	58
2.	Hyperlipidémie familiale combinée.....	58
III.	Objectifs	60
IV.	Méthodes et matériels.....	61
A.	Méthodes	61
1.	Validation des méthodes	61
2.	Critères qualité	62
3.	Critères de performance	64
4.	Plan d'expérience.....	65
5.	Gestion d'une portée flexible.....	65
B.	Matériels	65
1.	Echantillons témoins	65
2.	Conception du panel de gènes.....	66
3.	Séquençage haut-débit	66
4.	Analyse bioinformatique.....	68
V.	Résultats	71
A.	Série 1 et Série 1-bis de validation	71
VI.	Discussion	73
A.	Critères qualité du séquençage	73
B.	Critères de performances	74
C.	Choix de la cellule de séquençage.....	75
1.	Couverture globale.....	75
2.	Choix de la fragmentation.....	75

D.	Evaluation de la technologie Twist Bioscience®	75
1.	Taux de duplicats et <i>fold-80 base penalty</i>	75
2.	Intérêts de la technologie Twist Bioscience®.....	76
3.	Limites du design	76
E.	Evaluation de la solution bioinformatique SeqOne®	80
1.	Intérêts.....	80
2.	Limites	80
VII.	Perspectives	81
A.	Diagnostic moléculaire au laboratoire	81
B.	Axes de recherche.....	81
VIII.	Conclusion	83
	Bibliographie.....	84
	Liste des annexes.....	91
	Serment de Galien	101

Liste des abréviations

AG : acides gras

ANPGM : Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire

AVC : accident vasculaire cérébral

CM : chylomicrons

CNV : Copy Number Variant - variations en nombre de copie

COFRAC : COmité FRançais d'ACcréditation

CT : cholestérol total

CV : cardiovasculaire

dAMP : désoxyadénosine monophosphate

FDR : facteur de risque

HF : hypercholestérolémie familiale

HFhe : hypercholestérolémie familiale hétérozygote

HFho : hypercholestérolémie familiale homozygote

HDL : high density lipoprotein - lipoprotéine de haute densité

HDL-c : HDL-cholestérol

HMG-CoA réductase : hydroxy3-méthyl glutaryl CoA réductase

IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire

IDM : infarctus du myocarde

LBM : laboratoire de biologie médicale

LDL : low density lipoprotein - lipoprotéine de faible densité

LDL-c : LDL-cholestérol

Lp(a) : lipoprotéine a

LPL : lipoprotéine lipase

MCV : maladie cardiovasculaire

MCVAS : maladie cardiovasculaire athérosclérotique

MTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein – protéine microsomale de transfert de TG

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pb : paires de base

RCV : risque cardiovasculaire

SHD : séquençage haut-débit

SNP : polymorphisme nucléotidique

TG : triglycérides

VLDL : very low density lipoprotein - lipoprotéine de très faible densité

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de la mortalité coronaire (RCV) en fonction du cholestérol total et de l'âge.....	15
Figure 2 : Risque SCORE en fonction du sexe, du statut tabagique, de la pression artérielle systolique et de l'âge.....	18
Figure 3 : Classification du risque cardiovasculaire	18
Figure 4 : Structure du LDL et du cholestérol	20
Figure 5 : Formation des CM et des VLDL sous l'action de la MTP	22
Figure 6 : Action de la LPL sur les lipoprotéines riches en TG (CM/VLDL)	22
Figure 7 : Transport inverse du cholestérol via le HDL-c.....	24
Figure 8 : Régulation de la synthèse du cholestérol et des LDLR chez un sujet sain	25
Figure 9 : Description de la voie SREBP dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire.....	25
Figure 10 : Récepteurs LXR et homéostasie du calcium intracellulaire	27
Figure 11 : Différentes étapes de développement d'une lésion athérosclérotique.....	28
Figure 12 : Effet de l'exposition cumulée du LDL-c sur la plaque d'athérosclérose et le RCV	29
Figure 13 : Réaction enzymatique de dosage du cholestérol total utilisant un chromogène phénolique	31
Figure 14 : Calcul du LDL-c selon la formule de Friedewald	33
Figure 15 : Calcul du LDL-c selon la formule de Planella	33
Figure 16 : Calcul du non-HDL-c	34
Figure 17 : Lipoprotéinogramme d'un sujet normolipémiant.....	35
Figure 18 : Représentation du LDL-c cumulé en fonction de l'âge chez des individus sains ou porteurs d'HF hétérozygote ou homozygote selon l'âge d'initiation d'un traitement hypocholestérolémiant par statines	38
Figure 19 : Impact du statut génétique sur le risque de développer une MCV en fonction du taux de LDL-c	40
Figure 20 : Impact du type de variant sur le développement d'une MCV et du taux de LDL-c	40
Figure 21 : Stratégie diagnostique d'une hypercholestérolémie biologique.....	42
Figure 22 : Structure du LDLR et représentation exonique	43

Figure 23 : Représentation exonique de l' <i>APOB</i> et variants pathogènes impliqués dans la HF	44
Figure 24 : Substitutions des acides aminés en fonction des 3 isoformes de l'ApoE.....	46
Figure 25 : Probabilité de ne pas avoir d'événement CV en fonction de l'âge et du statut génotypique	50
Figure 26 : Etiologie polygénique et monogénique de l'hypobétalipoprotéïnémie familiale..	57
Figure 27 : Préparation des bibliothèques de fragments selon la technologie Twist Bioscience®	67
Figure 29 : Interface d'interprétation – SeqOne®	69
Figure 28 : Processus d'analyse bioinformatique de la plateforme SeqOne®	69
Figure 30 : Représentation des variants en nombre de copies en fonction des régions exoniques et introniques : Exemple du <i>LDLR</i>	70
Figure 31 : Indice de qualité des bases (Q30) en fonction de la longueur des lectures	73
Figure 32 : Région 3'UTR du <i>LDLR</i> avec une couverture inférieure à 30X.....	77
Figure 33 : Représentation de la couverture de 2 gènes diagnostic du panel.....	77
Figure 34 : Etude du <i>off-target</i>	79

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de risque cardiovasculaire non modifiables.....	13
Tableau 2 : Facteurs de risque cardiovasculaire modifiables.....	14
Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines ...	21
Tableau 4 : Fréquence des phénotypes de l'ApoE dans la population générale.....	45
Tableau 5 : Gènes associés à l'HF.....	48
Tableau 6 : LDL-c score selon 12 SNP (GLGC).....	49
Tableau 7 : Gènes associés à l'HBL.....	57
Tableau 8 : Paramètres qualité en sortie du séquenceur et leurs seuils attendus.....	62
Tableau 9: Critères qualité de l'alignement des lectures.....	63
Tableau 10 : Définition des critères de performance.....	64
Tableau 11 : 12 gènes de diagnostic moléculaire dans le cadre des hypercholestérolémies et hypocholestérolémies familiales.....	66
Tableau 12 : Critères qualité et critères de performance des Séries 1 et 1-bis de validation...	71

I. Introduction

A. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité au niveau mondial. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2017), elles sont responsables du décès de 17.8 millions de personnes chaque année, soit 31% des décès. En Europe, 4 millions de décès sont recensés chaque année avec 2.2 millions de femmes et 1.8 millions d'hommes. En France, ces pathologies sont la première cause de mortalité chez les femmes et la deuxième cause de mortalité chez les hommes derrière les cancers avec près de 140 000 décès par an (chiffres du Ministère des Solidarités et de la Santé, 2019) (1).

Au sein des MCV, différentes pathologies sont regroupées (2) :

- les MCV athérosclérotiques (MCVAS) :
 - maladie cardiaque ischémique ou maladie coronarienne (infarctus du myocarde (IDM))
 - maladie cérébrovasculaire (accident vasculaire cérébral (AVC))
 - maladie de l'appareil vasculaire artérielle (incluant l'hypertension artérielle) et périphérique
- les MCV autres
 - maladie cardiaque congénitale
 - maladie cardiaque rhumatismale
 - cardiomyopathie
 - arythmie cardiaque

Au niveau mondial, la première manifestation des coronaropathies est un IDM pour près de la moitié des patients (soit 7.5 millions de personnes, OMS 2012) avec un taux de mortalité à 1 an de 15%.

Causes importantes de morbidité, de recours aux soins et de mortalité, ces pathologies cardiovasculaires ont un retentissement important sur la qualité de vie des patients. Il est donc nécessaire de prendre en charge ces pathologies le plus précocement possible et d'identifier les patients à risque de développer un événement cardiovasculaire (CV).

B. Les facteurs de risque cardiovasculaire

Les facteurs de risque cardiovasculaire (FDRCV) ont été définis à partir de nombreuses études épidémiologiques menées au cours des 4 dernières décennies.

1. Cohorte de Framingham

Dans les années 1940, les MCV représentent la première cause de mortalité aux Etats-Unis avec près d'un décès sur deux. Les facteurs de risque, les traitements et la prévention de ces pathologies sont encore méconnus. En 1948, sous l'impulsion du service de santé américain, la cohorte de Framingham (3) se met en place dans l'état du Massachussetts (Etats-Unis). L'objectif principal de cette étude est de comprendre le développement des MCV et d'identifier les facteurs susceptibles de jouer un rôle dans leur étiologie. Des familles sur 3 générations (n = 14531 individus issus de la population générale dont 2873 femmes) ainsi que 916 individus issus de différentes communautés ethniques sont inclus (4) entre les années 1948 à 2003. Cette étude prospective se base sur l'étude du risque CV absolu (mortalité CV). La notion de facteur de risque cardiovasculaire (FDRCV) apparait dans le début des années 1960, suite à l'analyse des résultats sur les patients inclus à cette période (3). Elle met en évidence une association entre l'âge, l'hypertension artérielle, le diabète, le cholestérol total (CT), le LDL-cholestérol (LDL-c) et les MCV.

La relation causale entre les facteurs de risques (FDR) identifiés par l'étude de Framingham et la survenue de MCV est aujourd'hui largement démontrée : c'est le cas de l'étude MONICA (MONItorage des maladies CARDiovasculaires) (5) menée entre les années 1980 et 1990, à travers 21 pays et incluant 10 millions d'individus.

2. Facteur de risque

Un FDR se définit comme un état physiologique, pathologique ou une habitude de vie associée à une incidence accrue d'une maladie. Selon l'OMS, un FDR est tout attribut, caractéristique ou exposition d'un sujet qui augmente la probabilité de développer une maladie ou de souffrir d'un traumatisme. L'impact du FDR dépend de son niveau et de sa durée d'exposition à celui-ci.

Pour retenir le terme de FDR, différents critères doivent être retrouvés (6) :

- La force de l'association (risque relatif observé entre les sujets exposés et non-exposés)

- L'association doit être graduelle : le risque augmente avec le niveau du FDR (ex : taux de LDL-c)
- Le FDR doit précéder la survenue de la pathologie
- Le FDR doit être retrouvé dans différentes populations
- La correction du FDR prévient la maladie (notion de réversibilité)

Un FDR ne doit pas être confondu avec un marqueur de risque. En effet, un marqueur est associé au risque mais sans lien causal : leur correction spécifique ne permet pas d'infléchir le cours de la pathologie (ex : les calcifications coronaires, l'épaisseur intima-média mesurée au niveau des carotides).

La mise en évidence de FDR permet d'évaluer un risque individuel de morbi-mortalité, un dépistage de la pathologie, une orientation de la thérapeutique et une stratégie préventive.

Selon la Haute Autorité de Santé (HAS), un FDRCV est défini comme une situation (état clinique et/ou biologique) qui majore le risque de survenue d'une MCV chronique, et en particulier de la maladie coronarienne (7). Il existe deux types de facteurs responsables de l'augmentation de l'incidence de l'athérosclérose et de développement de MCV : les facteurs de risques modifiables et non modifiables.

a. Les facteurs de risque cardiovasculaire non modifiables

Différents facteurs de risque cardiovasculaire non-modifiables sont identifiés et listés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Facteurs de risque cardiovasculaire non modifiables

Facteurs de risque cardiovasculaire	Définition du critère
Sexe et âge	Homme \geq 45 ans ; femme \geq 55 ans
Hérédité : Histoire personnelle et familiale	IDM ; revascularisation coronaire ou mort subite chez un parent 1 ^{er} degré, avant 50 ans chez un homme et avant 60 ans chez une femme

b. Les facteurs de risque cardiovasculaire modifiables

Différents facteurs de risque cardiovasculaire modifiables (selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé, juillet 2019 (7)), dus à un état pathologique et/ou un mode de vie, sont identifiés et listés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Facteurs de risque cardiovasculaire modifiables

Facteurs de risque cardiovasculaire	Définition du critère
Prédiabète*	Glycémie à jeun > 110 mg/dL (> 6 mmol/L) et < 126 mg/dL (< 7 mmol/L)
Hypertension artérielle	Pression artérielle systolique \geq 140 mmHg et/ou pression artérielle diastolique \geq 90 mmHg, confirmées par deux mesures réalisées en deux occasions séparées Administration d'un traitement antihypertenseur
Dyslipidémie	LDL-c \geq 130mg/dL (3.37mmol/L) ou HDL-c < 40 mg/dL chez l'homme (1.04 mmol/L) et < 50 mg/dL chez la femme (1.30 mmol/L) ou CT \geq 200 mg/dL (5.18mmol/L) Administration d'un traitement hypolipémiant
Obésité	Indice de Masse Corporelle \geq 30kg/m ² et/ou périmètre abdominal >102cm pour un homme ou >88cm pour une femme
Mode de vie	Physiquement inactif et/ou sédentaire
Tabagisme	Actif ou sevrage < 1 an
Alimentation/mode de vie	Déséquilibrée, consommation d'alcool
Facteurs psychosociaux	Niveau socio-économique bas, absence de soutien social, stress au travail, dépression

* : le diabète est considéré d'emblée comme une situation à haut risque cardiovasculaire

Le lien entre le cholestérol total et le risque cardiovasculaire est clairement établi depuis de nombreuses années (Figure 1). Une baisse de la concentration en cholestérol de 1 mmol/L (39 mg/dL) est associée à une diminution de la mortalité coronaire de moitié chez les sujets de 40 à 49 ans, d'un tiers chez les sujets de 50 à 69 ans et d'un sixième chez les plus de 70 ans (8). Les résultats sont similaires avec le LDL-c.

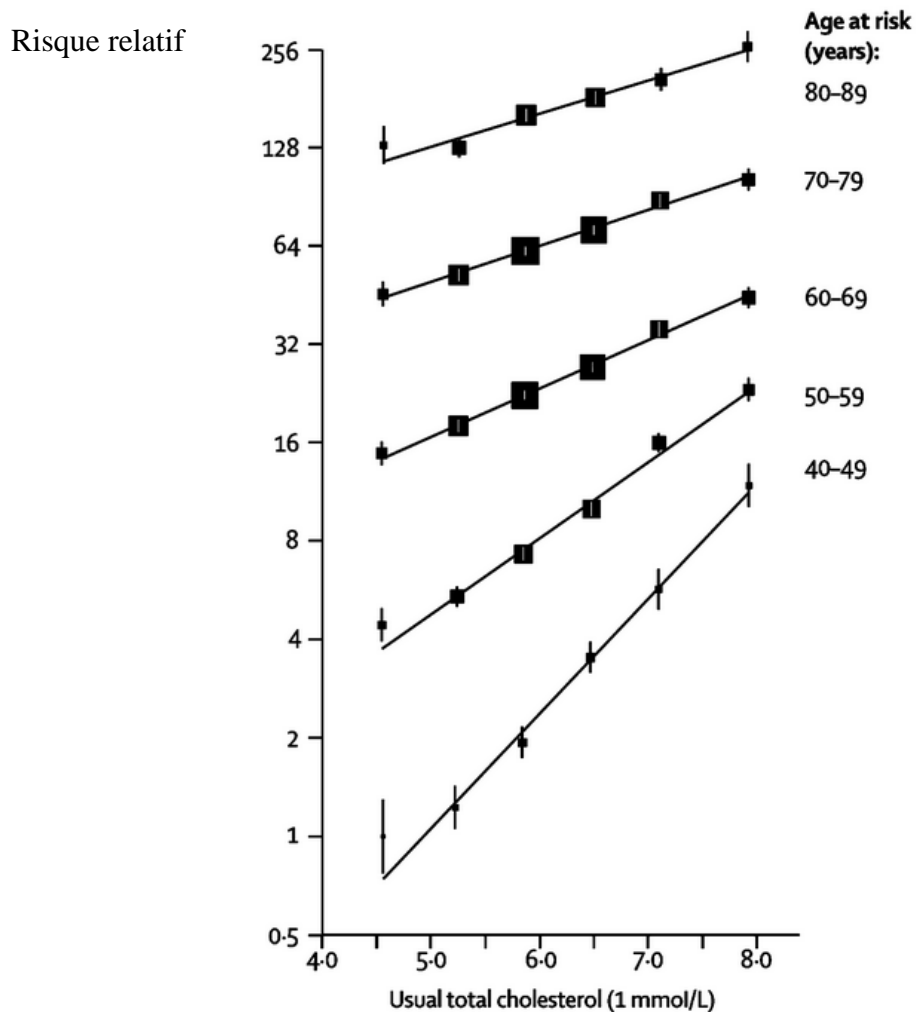


Figure 1 : Représentation de la mortalité coronaire (RCV) en fonction du cholestérol total et de l'âge
D'après Prospective studies collaboration, 2007

Il apparaît ainsi indispensable d'estimer le RCV d'un individu à partir des différents FDRCV afin de déterminer une prise en charge adaptée.

C. Le risque cardiovasculaire total

Le RCV (risque cardiovasculaire) total d'un individu est la probabilité de développer dans un temps donné un événement CV. Il s'exprime sous différentes formes :

- risque absolu : probabilité pour un sujet de survenue d'un événement CV sur une période de temps donnée
- risque relatif : probabilité de survenue d'un événement CV chez un sujet ayant un ou plusieurs FDR rapportée à la probabilité de survenue de ce même événement en l'absence de FDR.
- espérance de vie
- risque de vie entière : probabilité de survenue d'un événement CV estimée sur l'ensemble des années restant à vivre.

L'estimation du RCV global permet d'orienter la décision thérapeutique afin de réduire le risque d'événement CV et de diminuer le RCV quel que soit le niveau de chacun des facteurs de risque.

Il est recommandé d'évaluer le RCV total chez un patient avec :

- la recherche de pathologies chroniques : maladies cardiaques (IDM, syndrome coronarien aigu), maladies vasculaires périphériques (artériopathie oblitérante des membres inférieurs, anévrisme aortique), maladies cérébrovasculaires (accident ischémique transitoire, AVC), diabète de type 1 et 2, insuffisance rénale chronique, maladies auto-immunes ou inflammatoires, apnée du sommeil, grossesse
- le calcul du risque SCORE
- l'âge > 65 ans.

L'évaluation de ce risque CV global est permise par différents modèles développés à la suite d'études épidémiologiques menées en population générale (ex : cohorte prospective de Framingham). En fonction des populations et facteurs de risque étudiés, les performances de ces modèles diffèrent.

Le modèle de Framingham et l'équation de risque SCORE sont détaillés ci-dessous.

1. Modèle de Framingham

Le modèle de Framingham permet de calculer le risque absolu de survenue à 10 ans d'un événement CV chez des hommes et femmes de 30 à 79 ans indemnes de tout événement CV. Les facteurs pris en compte sont les suivants : le sexe (table de calcul différente entre les hommes et les femmes), l'âge entre 30 et 79 ans, le tabagisme, la pression artérielle systolique

avec ou sans traitement, le CT (cholestérol total) et le HDL-c (HDL-cholestérol). Les résultats permettent de chiffrer un risque selon :

- Un risque faible : < 10%
- Un risque modéré : 10-20%
- Un risque élevé : > 20%

Ce score a été établi à partir de données nord-américaines : il est donc difficilement extrapolable à la population européenne. De plus, ce modèle entraîne une surestimation du risque dans les pays européens où le taux de pathologies CV est faible. Il est donc nécessaire de développer une autre méthode de calcul du RCV total, adaptée à la population européenne.

2. Système SCORE

Les sociétés savantes européennes recommandent d'utiliser le système SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation) (9,10) car il est basé sur des données d'une large cohorte européenne (205 178 personnes 88 080 femmes et 117 098 hommes de la population générale de 12 pays européens) et est assez simple à calibrer pour chaque pays européen. Le SCORE permet de calculer le risque de MCV fatale à 10 ans en prévention primaire selon les principaux FDRCV. Les risques de mortalité CV ont été établis pour les pays à haut risque CV (Europe du Nord) et ceux à bas risque (Europe du Sud dont la France). Le calcul du risque se limite aux personnes âgées de 40 à 70 ans chez les hommes et 50 à 70 ans chez les femmes. Le chiffre indiqué dans la table du SCORE correspond au risque absolu de mortalité cardiovasculaire à 10 ans (Société de cardiologie européenne, 2019) (Figure 2 et Figure 3). Les personnes avec une MCVAS documentée, porteuses de diabète de type 1 ou de type 2, d'insuffisance rénale chronique, d'hypercholestérolémie familiale (HF) : cholestérol total > 8 mmol/L (> 310 mg/dL), LDL-c > 6 mmol/L (> 230 mg/dL), hypertension artérielle sévère > 180/110 mmHg sont d'emblée prises en charge pour les différents FDR et ne nécessitent pas un calcul de score de risque.

L'index SCORE intègre 5 facteurs de risque : le sexe, l'âge, le statut tabagique, la pression artérielle systolique et le CT. Un facteur correctif peut être appliqué au SCORE selon l'ethnie pour les immigrés de 1^{re} génération dans le pays.

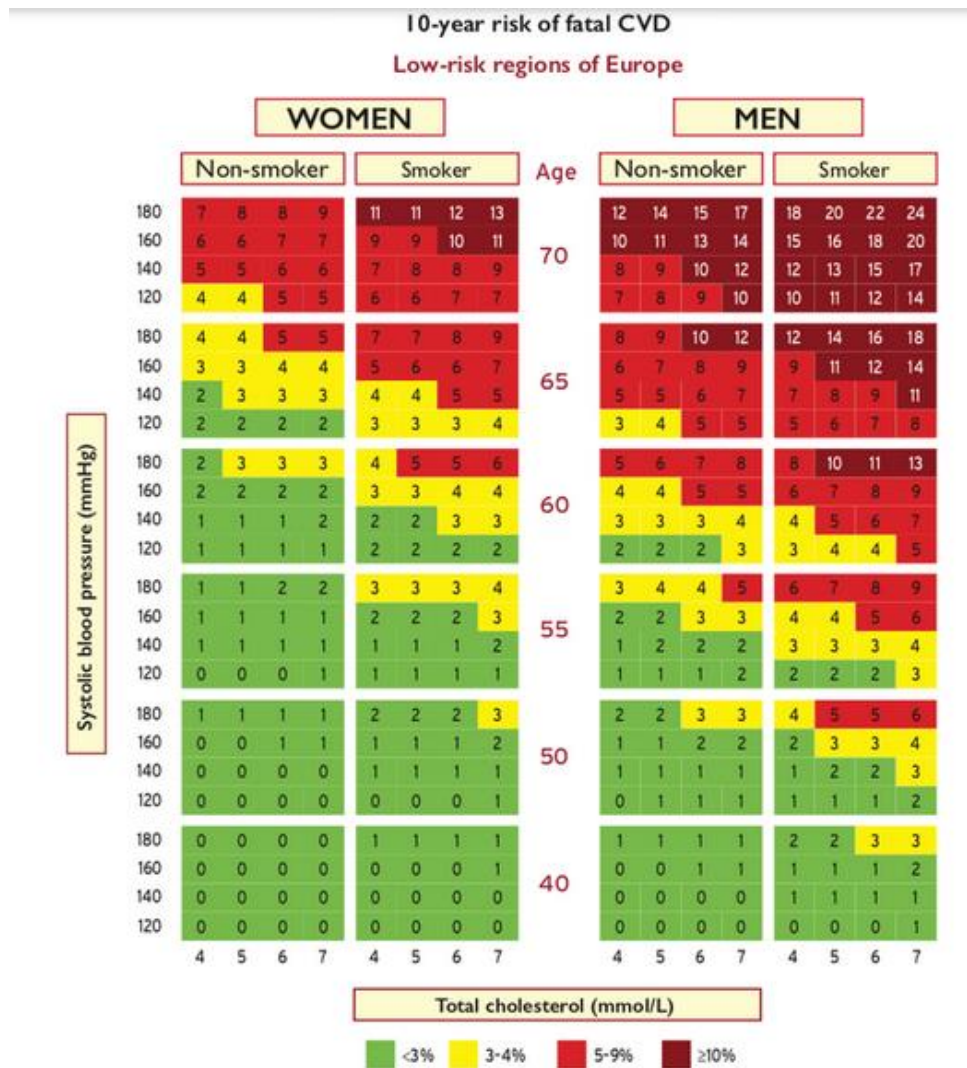


Figure 2 : Risque SCORE en fonction du sexe, du statut tabagique, de la pression artérielle systolique et de l'âge
D'après Mach *et al.*, 2019

Très haut risque CV	Prévention secondaire Diabète avec atteinte d'organe ou >3 FDRCV ou diabète de type 1 (DT1) >20 ans Insuffisance rénale sévère DFG<30mL/min SCORE> 10% Hypercholestérolémie familiale avec maladie cardiovasculaire ou un autre FDRCV
Haut risque CV	Un FDRCV majeur : PA>180/110 ; TG>3.1g/L ou LDLc >1.9g/l Hypercholestérolémie familiale sans autre FDRCV Diabète sans atteinte d'organe, avec durée >10 ans ou avec autres FDRCV Insuffisance rénale modérée avec 30<DFG<59mL/min 5%<SCORE<10%
Risque CV modéré	Patients jeunes (DT1<35 ans ; DT2<50 ans avec durée du diabète<10 ans sans autre FDRCV 1%<SCORE< 5%
Bas risque CV	SCORE<1%

Figure 3 : Classification du risque cardiovasculaire (recommandations européennes ESC/EAS)
D'après Mach *et al.*, 2019

Cette estimation du RCV global par le SCORE comporte néanmoins des limites. En cas d'HDL-c élevé, le RCV global est surestimé. En revanche, selon les situations listées ci-dessous, le RCV global est sous-estimé :

- antécédents familiaux de MCV prématurée chez les apparentés au 1^{er} degré avant 50 ans
- surpoids ou indice de masse corporelle élevé
- statut socio-économique défavorisé
- dépression
- index de pression systolique bas.

3. Méthodes non-invasives

Les méthodes non-invasives peuvent détecter la présence, estimer l'étendue et évaluer les conséquences cliniques des dommages vasculaires causés par l'athérosclérose.

La détection de la calcification des artères coronaires sans contraste (*i.e.* score calcique coronaire) représente une bonne estimation de la surcharge athérosclérotique et est fortement associée aux événements CV (marqueur de risque).

D. Les lipoprotéines

Le cholestérol est un composant lipidique des membranes cellulaires et un précurseur de nombreuses molécules comme les hormones stéroïdes, la vitamine D et les acides biliaires. Environ 20% du cholestérol circulant est d'origine alimentaire, la majorité restante provient de la synthèse endogène hépatique, sous l'action d'une enzyme clé : l'HMG-CoA réductase. Les différentes voies de transport et de métabolisme du cholestérol (*via* les lipoprotéines) sont détaillées ci-dessous.

1. Caractéristiques des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont découvertes par Gofman *et al.*,(11) en 1950. Elles permettent le transport plasmatique des lipides vers les tissus périphériques pour leur utilisation énergétique mais aussi pour la production d'hormones stéroïdes et la formation des acides biliaires. Les lipoprotéines ont une structure commune de base et sont composées :

- d'un cœur hydrophobe contenant le cholestérol estérifié et les triglycérides (TG)
- d'une monocouche externe amphiphile constituée de cholestérol non-estérifié, de phospholipides (PL), de TG et d'apolipoprotéines. Ces dernières agissent comme des composants structuraux, des ligands pour la liaison aux récepteurs cellulaires et des activateurs ou inhibiteurs enzymatiques.

D'après Goldstein et Brown (12), la structure du LDL est représentée ci-dessous. (Figure 4)

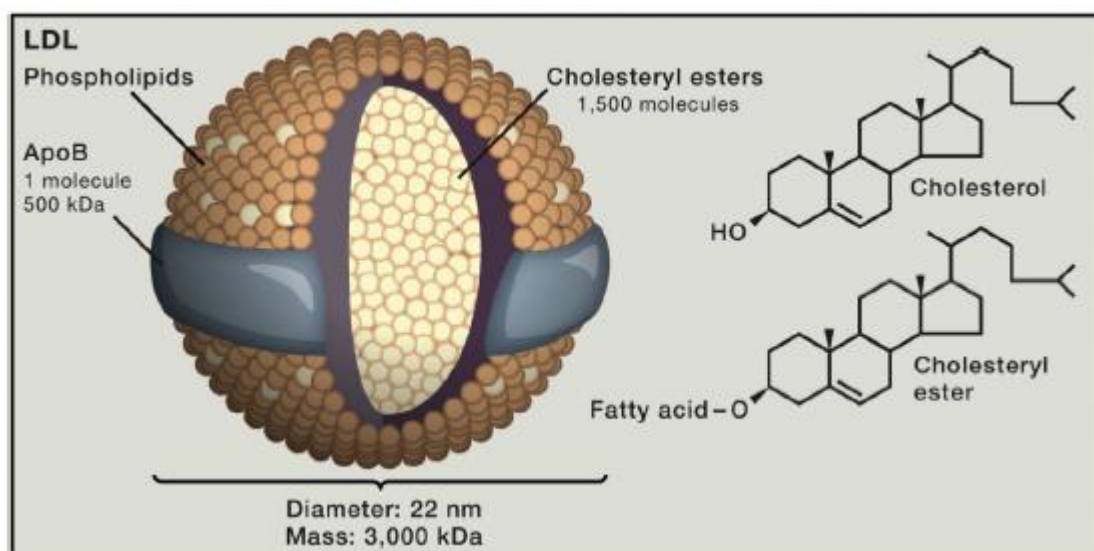


Figure 4 : Structure du LDL et du cholestérol

D'après Goldstein et Brown, 2015. Elle possède un diamètre de 22 nm et une masse de 3000kDa. 1500 molécules de cholestérol estérifié constituent le noyau lipophile. Autour de ce noyau se situe une couche hydrophile constituée de 800 molécules de phospholipides, de 500 molécules de cholestérol non estérifié et d'une molécule de 500kDa : l'apolipoprotéine B.

Il existe 6 types de lipoprotéines : les CM (chylomicrons), les VLDL (very low density lipoproteins), les IDL (intermediate density lipoproteins), les LDL (low density lipoproteins), les HDL (high density lipoproteins) et la Lp(a) (Lipoprotein (a)) dont les caractéristiques principales sont résumées dans le Tableau 3 (10).

Les apolipoprotéines sont des protéines incluses dans la masse lipidique. Elles sont réparties de manière spécifique au sein des lipoprotéines selon :

- ApoA1 : marqueur des lipoprotéines HDL antiathérogènes
- ApoB : marqueur des lipoprotéines LDL et VLDL athérogènes

Elles sont peu sensibles aux variations environnementales, notamment nutritionnelles.

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines

D'après Mach *et al.*, 2019

	Densité hydratée (g/mL)	Diamètre (nm)	TG (%)	Cholestérol estérifié (%)	Phospholipides (%)	Cholestérol non estérifié (%)	Apolipoprotéines majoritaires
CM	<0.95	80-100	90-95	2-4	2-6	1	ApoB-48
VLDL	0.95-1.006	30-80	50-65	8-14	12-16	4-7	ApoB-100
IDL	1.006-1.019	25-30	25-40	20-35	16-24	7-11	ApoB-100
LDL	1.019-1.063	20-25	4-6	34-35	22-26	6-15	ApoB-100
HDL	1.063-1.210	8-13	7	10-20	55	5	ApoA1
Lp(a)	1.006-1.125	25-30	4-8	35-46	17-24	6-9	Apo(a)

2. Métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme lipidique comprend 3 voies essentielles : la voie exogène, la voie endogène et le transport inverse du cholestérol.

- Voie exogène

Il s'agit du transport des lipides exogènes depuis l'intestin vers les tissus périphériques.

L'absorption lipidique de cholestérol exogène s'effectue par les entérocytes *via* un transporteur NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like 1*). Au sein de ces cellules entérocytaires, le cholestérol peut d'une part être véhiculé vers la lumière intestinale grâce aux transporteurs ABCG5 et ABCG8 mais cette voie est très minoritaire. De manière prédominante, le cholestérol est converti en esters de cholestérol *via* l'enzyme ACAT (acyl-CoA cholestérol acyl transférase) de type 2.

Les TG, les esters de cholestérol et l'ApoB sont assemblés pour former les CM, au niveau du réticulum endoplasmique de l'intestin sous l'action de la MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein). Les CM, concentrés sous forme de vésicules, migrent et fusionnent à la membrane basolatérale de l'entérocyte afin d'être déversés dans la circulation lymphatique mésentérique (Figure 5) (13).

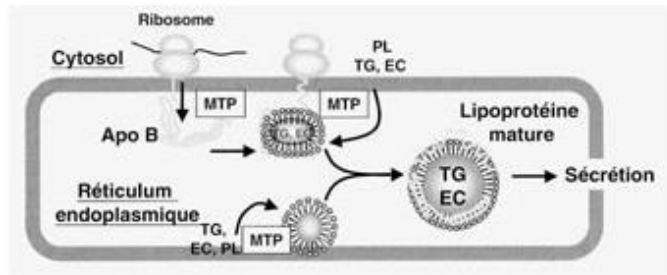


Figure 5 : Formation des CM et des VLDL sous l'action de la MTP
D'après NSFA (Nouvelle Société Française d'Athérosclérose)

Ils rejoignent la circulation sanguine *via* la veine sous-clavière gauche afin d'être acheminées vers les tissus adipeux et musculaires. Suite à la reconnaissance du cofacteur APOC2 présent sur les CM, la LPL (Lipoprotéine Lipase) présente au niveau de ces tissus périphériques hydrolyse les TG et entraîne la formation d'AG libres non estérifiés nécessaires pour la production énergétique (Figure 6).

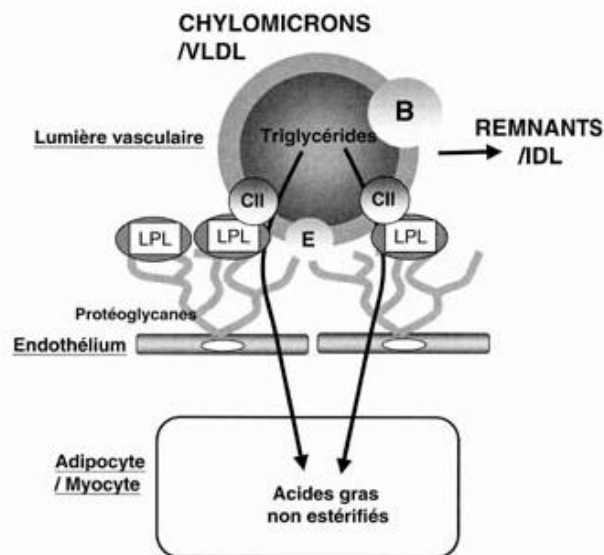


Figure 6 : Action de la LPL sur les lipoprotéines riches en TG (CM/VLDL)
D'après NSFA (Nouvelle Société Française d'Athérosclérose)

Les remnants des CM (moins riches en TG que les CM) sont éliminés en large partie par le foie *via* la liaison de l'ApoE au LDLR. Ces remnants sont ainsi protéolysés et le cholestérol ainsi libéré peut être intégré dans de nouvelles lipoprotéines synthétisées par le foie (VLDL) ou excrété dans les canalicules biliaires.

La voie exogène permet un transfert efficace des AG vers les tissus périphériques pour la production d'énergie. Le cholestérol estérifié éliminé vers le foie permet ainsi la synthèse endogène des lipoprotéines.

- Voie endogène

La voie endogène des lipoprotéines permet le transport centrifuge des lipides du foie vers les tissus périphériques.

Au niveau hépatique, les TG d'origine endogène et les esters de cholestérol sont transférés à l'APOB *via* l'enzyme MTP pour obtenir les VLDL (Figure 5). De la même manière que les CM, les VLDL sont ensuite sécrétés dans la circulation sanguine vers les tissus périphériques (ex : tissu musculaire, cardiaque, adipeux) où l'enzyme LPL hydrolyse les triglycérides et libère les AG (Figure 6). Il existe une compétition entre les CM et les VLDL en raison de la similarité du processus d'action de la LPL. Les particules d'IDL sont formées au terme de cette étape. Les IDL sont pour moitié captés par le foie pour être recyclés en VLDL. L'autre moitié sera hydrolysée par la LPL pour diminuer la teneur en TG de ces particules et par conséquent former les LDL. Ces lipoprotéines LDL sont issues essentiellement du catabolisme des VLDL et représentent plus de 50% des lipoprotéines circulantes. Elles sont constituées de cholestérol estérifié et d'APOB-100. Elles constituent ainsi le principal transporteur du cholestérol. Les deux tiers des LDL sont catabolisés par le foie, apportant ainsi leur cholestérol au foie. Le troisième tiers des LDL apportent leur cholestérol aux tissus extra-hépatiques. L'endocytose hépatique des LDL est suivie de la libération du cholestérol. L'augmentation intracellulaire du cholestérol entraîne l'inhibition de l'enzyme responsable de la synthèse endogène du cholestérol : l'HMG-CoA réductase.

- Transport inverse du cholestérol

Cette voie permet le transport centripète du cholestérol des tissus périphériques vers le foie et son excrétion biliaire (14).

Les HDL naissants sont formés au niveau hépatique et intestinal mais aussi à partir du catabolisme des CM et des VLDL en récupérant le cholestérol en excès dans le sang et les

tissus périphériques. Grâce à l'apolipoprotéine A1 présente au niveau de ces lipoprotéines, la LCAT (lécithine cholestérol acyl-transférase) transforme le cholestérol en esters de cholestérol. Sous l'action de la CETP (protéine de transfert d'ester de cholestérol), ces esters de cholestérol peuvent être échangés contre des TG présents au sein des VLDL/LDL et ainsi retourner au foie. Au niveau hépatique, le cholestérol est transformé en sels biliaires et en hormones stéroïdiennes au niveau des tissus stéroïdogéniques (surrénales, ovaires, testicules) (Figure 7).

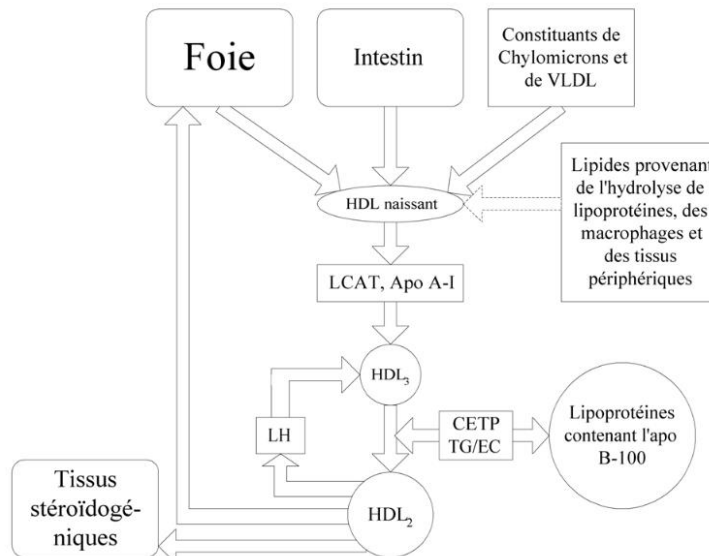


Figure 7 : Transport inverse du cholestérol via le HDL-c
D'après Hogue, 2004

E. La régulation physiologique de l'homéostasie du cholestérol

Différentes voies physiologiques sont responsables du maintien de l'homéostasie du cholestérol et agissent à la fois sur sa biosynthèse endogène mais aussi sur son recyclage hépatique *via* la voie du LDLR.

1. Voie SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*)

Le LDL-c se fixe sur le LDLR par reconnaissance *via* l'ApoB. Le LDL-c est pris en charge par les lysosomes, où les esters de cholestérol sont estérifiés. Le cholestérol est ensuite utilisé dans la synthèse membranaire mais aussi dans la biosynthèse de molécules ou substances actives. Le cholestérol exerce également un rétrocontrôle négatif sur la production de LDLR et de l'HMG CoA réductase. En effet, quand le taux de cholestérol intracellulaire est bas, les cellules produisent abondamment des LDLR et de l'HMGCoA réductase. Au contraire, lorsque le cholestérol intracellulaire augmente, le niveau de ces 2 protéines diminue.

L'objectif principal est de conserver l'homéostasie du cholestérol membranaire (15) (Figure 8).

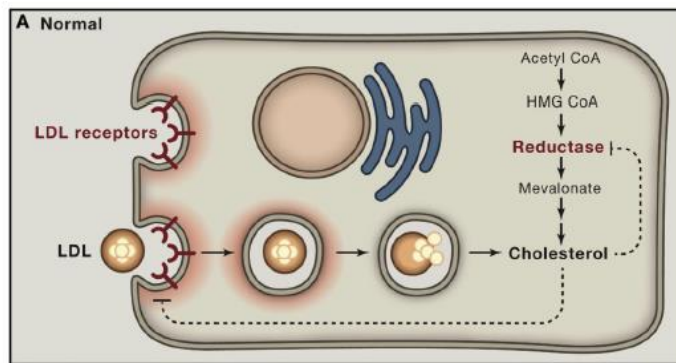


Figure 8 : Régulation de la synthèse du cholestérol et des LDLR chez un sujet sain

D'après Brown et Goldstein, 1986

Cette régulation s'effectue par voie transcriptionnelle. Au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, différentes protéines sont retrouvées : SREBP1 (*Sterol regulatory element binding protein-1*) et SCAP (*SREBP1 cleavage activating protein*). La protéine SCAP est le détecteur de la concentration membranaire en stérols (*cholesterol-sensor*) (12).

- En l'absence de cholestérol

Lorsque le cholestérol membranaire diminue, la protéine COPII (*Coat protein complex II*) vient se fixer au complexe SREBP1/SCAP et permet à ce dernier de former une vésicule qui bourgeonne vers l'appareil de Golgi. SREBP est alors clivée par 2 enzymes protéasiques successives permettant *in fine* la libération d'un segment actif. Il migre vers le noyau afin d'activer la transcription du gène du LDLR et d'autres gènes comme *PCSK9* (Figure 9A).

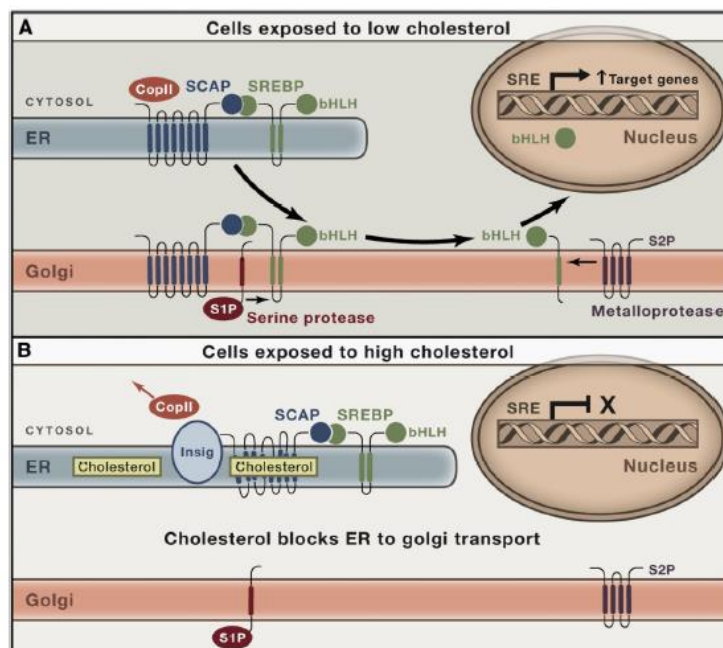


Figure 9 : Description de la voie SREBP dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire

D'après Goldstein et Brown, 2015

A : En cas d'hypocholestérolémie B : En cas d'hypercholestérolémie

- En présence de cholestérol

Lorsque le taux de cholestérol intracellulaire est élevée, il vient se fixer au niveau des membranes cellulaires. Lorsque le taux de cholestérol membranaire est supérieur à 5%, ce dernier vient se fixer au niveau de la boucle luminale de SCAP, entraînant un changement conformationnel de la protéine SCAP. Le site de fixation pour la protéine COPII se retrouve masqué, permettant ainsi la fixation de INSIG (*Insulin induced-genes*). Le complexe SCAP/SREBP est alors piégé dans le réticulum endoplasmique, empêchant la migration vers l'appareil de Golgi et aboutissant à la diminution de la transcription du gène du LDLR, et donc du taux de cholestérol intra-cellulaire (Figure 9B).

SREBP (isoforme 2) peut également activer le gène de l'HMGCoA réductase, les gènes des enzymes nécessaires à la biosynthèse du cholestérol, permet donc aux cellules de synthétiser du cholestérol en plus de l'absorber du LDL-c.

Cette régulation transcriptionnelle de l'homéostasie du cholestérol est également médiée par l'administration de médicaments hypocholestérolémiantes (*i.e.* statines) et par un régime alimentaire riche en lipides.

2. Voie PCSK9 (*Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9*)

L'expression de la protéine PCSK9 est régulée par le facteur de transcription SREBP décrit précédemment. La fonction majeure de PCSK9 est la dégradation des LDLR. Une fois sécrétée par le foie, PCSK9 se lie au LDLR *via* son domaine extracellulaire EGF-A (facteur de croissance épidermique) au niveau de la surface cellulaire ou en intracellulaire. En se complexant avec le LDLR, PCSK9 empêche son recyclage endocytaire et entraîne la dégradation lysosomale du complexe. Le mécanisme exact de dégradation est encore peu clair. Pour cibler le LDLR et induire sa dégradation, PCSK9 se lie directement au niveau des LDLR naissants de l'appareil de Golgi mais également au LDLR au niveau de la membrane plasmique.

Cette voie physiologique permet de maintenir un taux de LDL-c circulant en régulant le recyclage du LDLR et donc le catabolisme hépatique des LDL.

3. Voie LXR (*Liver X receptor*)

Le cholestérol intracellulaire hépatique peut être oxydé et active ainsi les récepteurs nucléaires LXR (*Liver X receptor* : récepteur d'hormone nucléaire, facteur de transcription). Ces derniers initient la diminution du cholestérol intracellulaire par inhibition de la biosynthèse du cholestérol, par inhibition de l'entrée du cholestérol (*via* les LDLR) et par activation de l'efflux du cholestérol *via* les transporteurs ABC (Figure 10) (16).

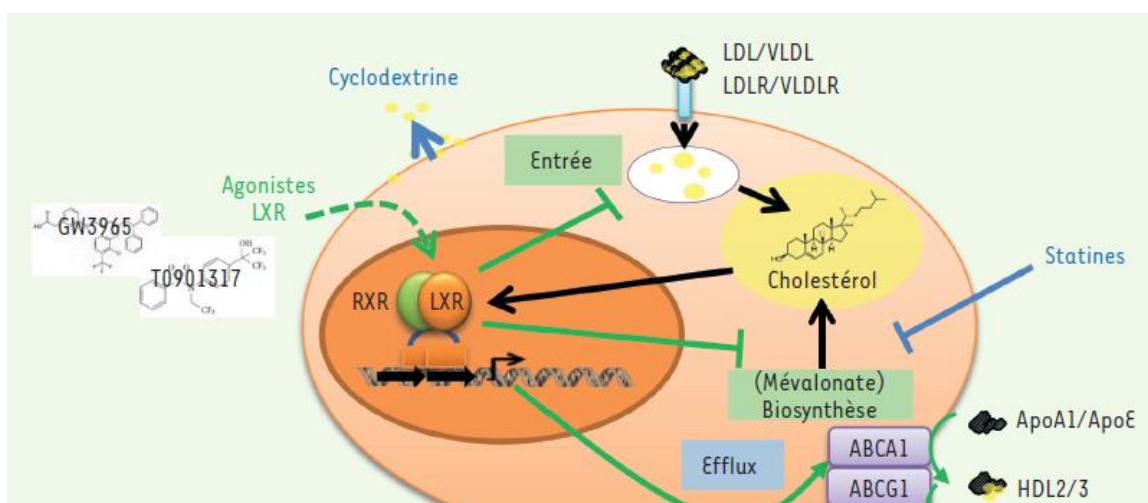


Figure 10 : Récepteurs LXR et homéostasie du cholestérol intracellulaire
D'après Ceroi *et al.*, 2017

Ces protéines constituant ces voies physiologiques représentent également des cibles d'intérêt majeur en situation pathologique.

F. L'athérosclérose

L'athérosclérose est un processus pathologique complexe, se déroulant au sein de la paroi des vaisseaux sanguins, et se développant sur de nombreuses années. L'événement clé initiateur de l'athérogénèse est la rétention de LDL-c au sein de l'intima artériel, à travers un endothélium dysfonctionnel (17).

La petite taille de ces lipoprotéines (<70nm) leur permet une entrée facilitée à travers la paroi de l'intima artériel (Figure 11a).

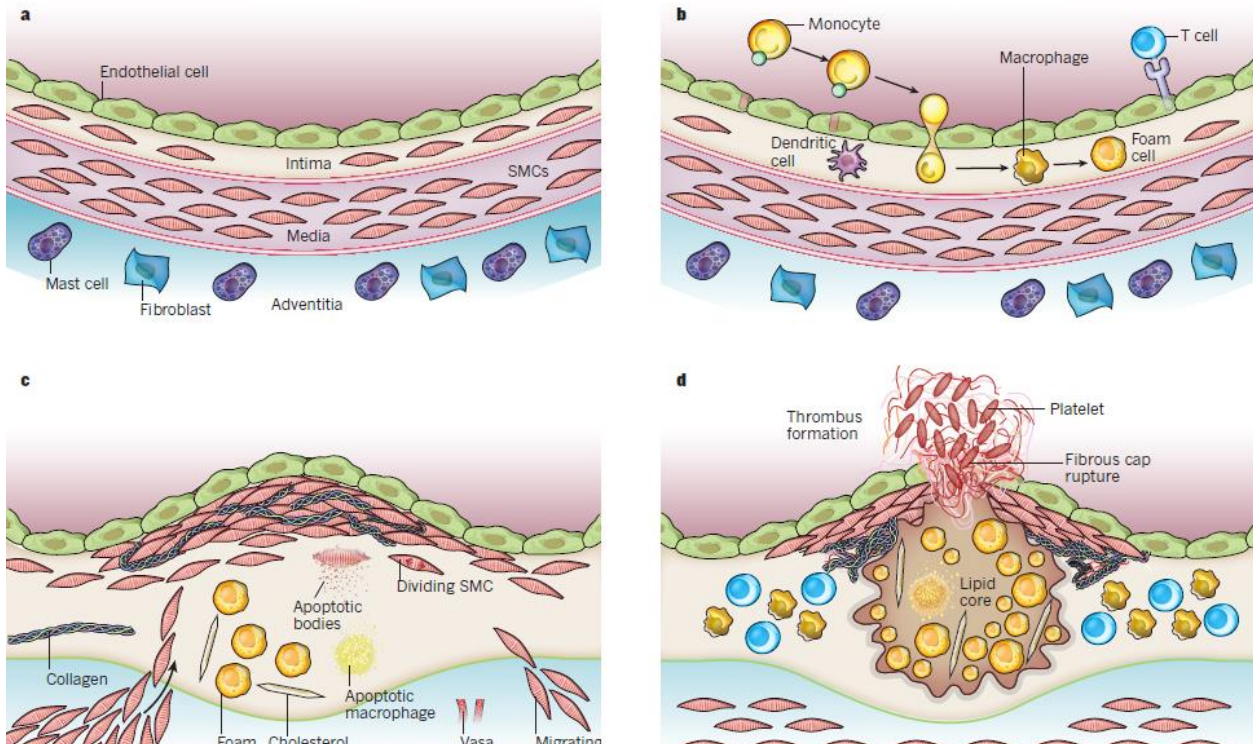


Figure 11 : Différentes étapes de développement d'une lésion athérosclérotique.

D'après Libby *et al.*, 2011

a : une artère normale est constituée de 3 couches : les cellules endothéliales recouvrent l'intima, la média constituée de cellules musculaires lisses (SMC) et de matrice extracellulaire, l'adventice constituée de mastocytes et fibroblastes

b : les monocytes migrent au travers de l'endothélium, évoluent en macrophages et se transforment en cellules spumeuses en absorbant des lipides (LDL-c)

c : Au milieu de l'intima, les lésions progressent avec la prolifération des SMC et la synthèse accrue de collagène, d'élastine et de protéoglycanes. La plaque progresse. Les lipides continuent de s'accumuler et d'amplifier le phénomène : c'est le noyau lipidique ou nécrotique.

d : La thrombose constitue l'étape ultime : Lorsque l'étendue de la plaque est importante, le capuchon fibreux se rompt. La coagulation sanguine se déclenche au contact du facteur tissulaire, formant un thrombus. Ce dernier s'étend, jusqu'à entraver la circulation sanguine.

Ces lipoprotéines séquestrées, se lient préférentiellement aux glycosaminoglycanes, s'agrègent et s'oxydent au sein de la matrice extracellulaire subendothéliale avec une modification des résidus lysines de l'ApoB (18). Un infiltrat de cellules macrophagiques se forme et reconnaît les résidus modifiés : les lipoprotéines sont endocytées par les macrophages et induisent une transformation de ces derniers en cellules spumeuses (Figure 11b) (19).

Elles sécrètent une variété de cytokines pro-inflammatoires (20) entraînant ainsi une réponse inflammatoire biologique inadaptée. Ce processus inflammatoire s'auto-amplifie avec l'accumulation de lipoprotéines au sein des lésions existantes. Les cellules musculaires lisses migrent au sein de l'intima, prolifèrent et produisent du collagène, témoignant d'une réponse

cicatricielle à la paroi de la lésion (Figure 11c). Au cours de la progression de la lésion, les macrophages meurent et laissent place à des zones de nécrose remplies de débris extracellulaires, de cristaux de cholestérol, de protéases et d'éléments prothrombotiques. Ces plaques d'athérome peuvent entraîner un amincissement de la calotte fibreuse, une érosion voire une rupture de la plaque conduisant à des événements thrombotiques. En effet, sous l'effet du facteur tissulaire, la coagulation sanguine se met en place et entraîne la formation progressive d'un thrombus (Figure 11d) avec une réduction progressive de la lumière interne entraînant une ischémie du territoire vascularisé : c'est la maladie athéromateuse chronique. En cas d'occlusion complète de l'axe artériel, on observe un infarctus du territoire anoxique (IDM, AVC ischémique).

La taille des plaques athérosclérotiques est déterminée à la fois par la concentration de LDL-c et de lipoprotéines contenant l'ApoB mais aussi par la durée totale d'exposition à ces lipoprotéines (notion d'exposition cumulée) (21). A partir de 40 ans, pour un taux de LDL-c constant, l'incidence d'un accident myocardique double chaque décennie (Figure 12).

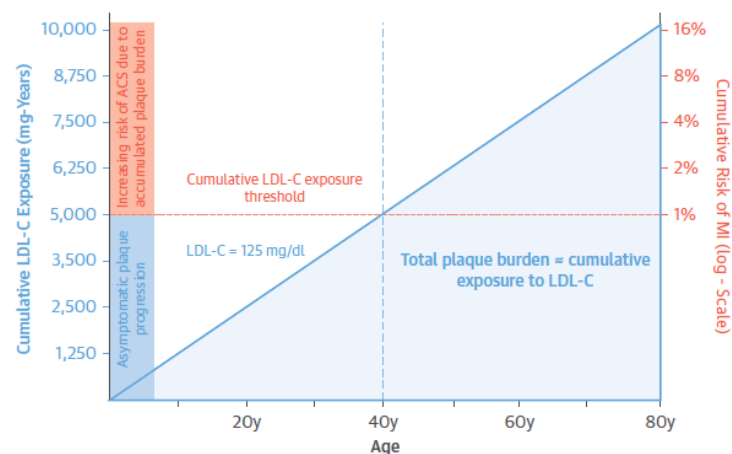


Figure 12 : Effet de l'exposition cumulée du LDL-c sur la plaque d'athérosclérose et le RCV

D'après Ference *et al.*, 2018

La ligne pleine bleue représente l'exposition constante à 125 mg/dL de LDL-c.

La ligne orange pointillée représente le seuil de LDL-c cumulé à partir duquel on observe un risque d'IDM (40 ans)

Pour un niveau donné de LDL-c, la formation de la plaque est accélérée par des facteurs de risques incluant le tabagisme, le diabète et l'hypertension artérielle. A cela s'ajoutent des facteurs génétiques modifiant la susceptibilité de l'endothélium à être endommagé.

II. Les dyslipidémies

Les taux plasmatiques lipidiques sont déterminés dans une très large mesure par des facteurs génétiques, le plus souvent sous la forme de dyslipidémies familiales. De nombreux désordres lipidiques monogéniques sont à ce jour identifiés. Les dyslipidémies sont des anomalies qualitatives ou quantitatives d'un ou plusieurs lipides plasmatiques : le CT et ses fractions, HDL-c et LDL-c et les TG. Largement retrouvées au niveau familial, elles représentent une cause génétique de MCV précoce, et nécessitent un diagnostic et une prise en charge adaptée. Ce chapitre détaillera particulièrement les hypercholestérolémies et hypocholestérolémies familiales, ainsi que les hyperlipidémies mixtes.

A. Bilan biologique

Le bilan biologique représente le plus souvent la porte d'entrée diagnostic d'une dyslipidémie, en dehors des antécédents personnels et familiaux de MCVAS. Il se compose en première intention de l'exploration d'une anomalie lipidique

1. Exploration d'une anomalie lipidique

Elle s'effectue sur sérum (prélèvement sur tube sec).

Elle est recommandée tous les 5 ans, sauf si événement cardiovasculaire, prise de poids, modification du mode de vie ou instauration d'un traitement susceptible de modifier le bilan lipidique ou les FDRCV. Si une anomalie est retrouvée, elle doit être contrôlée 3 semaines à distance, sans changement d'habitude ni traitement. Ce bilan est constitué des différents paramètres détaillés ci-dessous dont les techniques décrites et les valeurs normales (selon l'âge et le sexe) sont celles utilisées au laboratoire de biochimie du CHU de Nantes.

a. Aspect du sérum

Après décantation, l'aspect du sérum doit être observé. Chez un individu sain, il est retrouvé transparent jaune d'or. Un trouble ou une opalescence signe la présence de VLDL. Dans le cas d'une lactescence, la présence de CM est probable et un test de crémage à 24h à 4°C est préconisé : si on observe une couche crémeuse au niveau du surnageant, le test est positif et signe un défaut d'épuration des CM.

b. Dosage du cholestérol total

Le cholestérol total correspond au cholestérol libre mais aussi estérifié au niveau des cœurs hydrophobes des lipoprotéines.

La méthode de référence pour le dosage du cholestérol total est la dilution isotopique associée à la chromatographie (en phase gazeuse ou liquide) couplée à la spectrométrie de masse.

Dans les laboratoires de biologie médicale de diagnostic, les méthodes utilisées sont colorimétriques enzymatiques. Elles reposent sous l'action de 2 enzymes : la cholestérol estérase et la cholestérol oxydase (Figure 13). L'intensité du dérivé coloré formé mesurée par absorbance (505nm) est directement proportionnelle au taux de cholestérol

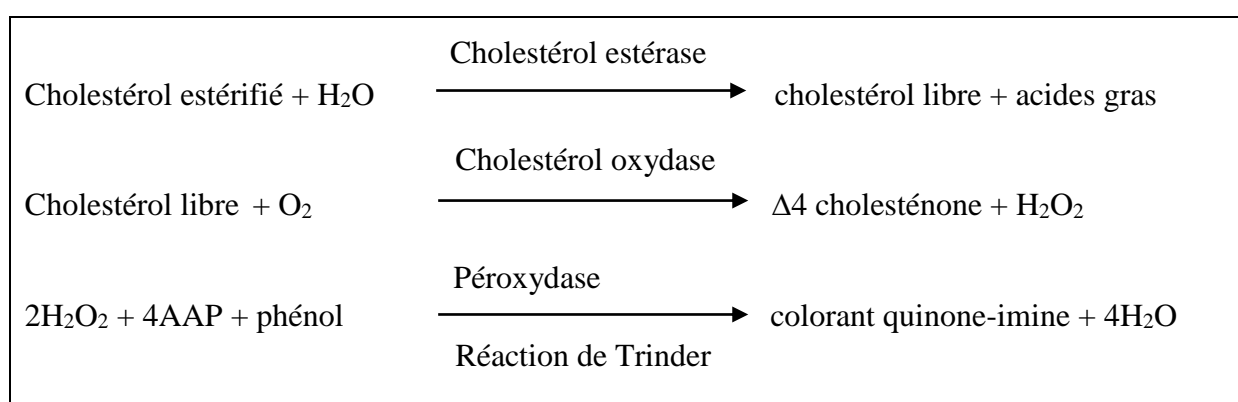


Figure 13 : Réaction enzymatique de dosage du cholestérol total utilisant un chromogène phénolique

Le cholestérol est libéré et oxydé sous l'action de l'estérase et l'oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec la 4-aminoantipyrine et le phénol entraînant ainsi une coloration rouge de la solution (505 nm)

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; 4AAP : 4-aminoantipyrine

Chez le sujet normal, les valeurs cibles se situent entre 3.5 à 7 mmol/L (136 à 271 mg/dL).

c. Dosage des triglycérides

Les TG sont constitués d'esters de glycérol et de 3 acides gras. Ils sont dosés à l'aide d'une méthode colorimétrique enzymatique. Elles reposent sur l'hydrolyse des triglycérides sous l'action de lipases avec la formation de glycérol total. Par oxydation, ce glycérol forme du peroxyde d'hydrogène qui réagit avec un chromogène phénolique et entraîne une coloration rouge de la solution mesurée par absorbance (505nm). L'intensité mesurée est directement proportionnelle au glycérol total et donc aux TG.

Chez le sujet normal, les valeurs cibles se situent entre 0.45 à 1.9 mmol/L (17 à 74 mg/dL).

Interférence

On note qu'il existe 5 à 10% de glycérol libre dans le sérum, dont le taux peut augmenter dans certaines conditions pathologiques (traitement à l'héparine, glycérol, dérivés nitrés, déficits congénitaux en glycérolkinase...) ou physiologiques (jeûne). Il est donc nécessaire de s'affranchir de fausses hypertriglycéridémies dues à des taux élevés de glycérol sérique libre. Une discordance entre un aspect limpide du sérum et un taux de TG augmenté mais aussi une absence de préβ-alipoprotéines (lipidoprotéinogramme) peuvent évoquer ces fausses positivités. Dans ce cas il est nécessaire de réaliser un dosage de glycérol libre.

d. Dosage du HDL-cholestérol

Cette fraction du cholestérol est dosée à l'aide d'une méthode colorimétrique enzymatique en phase homogène. Les lipoprotéines non-HDL (LDL, VLDL et CM) sont mises en présence de polyanions et d'un détergent pour former un complexe hydrosoluble. Au sein de ce complexe, les enzymes cholestérol oxydase et cholestérol estérase ne peuvent donc pas agir. Seules les HDL réagissent pour former le dérivé coloré rouge dont l'intensité est mesurée par absorbance (505nm). Cette coloration est directement proportionnelle à la concentration en HDL-c.

Chez le sujet normal, les valeurs cibles se situent entre 0.96 à 1.6 mmol/L (37 à 62 mg/dL).

Interférence

L'hypertriglycéridémie supérieure à 10 mmol/L (390 mg/dL) augmente le taux de HDL-c. Il existe également des interférences physiologiques. D'une part, l'hypertriglycéridémie (> 2 mmol/L, > 78 mg/dL) diminue la taille des HDL et LDL par la voie de la CETP. D'autre part, l'exercice physique et l'alcool augmentent le taux de HDL.

e. Dosage du LDL-cholestérol

Cette fraction athérogène du cholestérol est dosée à l'aide d'une méthode colorimétrique enzymatique en phase homogène. Les esters du cholestérol et le cholestérol libre contenus dans les LDL sont déterminés par la cholestérol estérase et la cholestérol oxydase en présence de surfactants qui induisent une solubilisation sélective des LDL. Les réactions enzymatiques sur les lipoprotéines autres que LDL sont inhibées par des tensioactifs et par un dérivé glucidique. Ces enzymes aboutissent à la formation de peroxyde d'hydrogène et entraînent une coloration rouge de la solution par peroxydase. L'intensité mesurée (600nm) est directement proportionnelle au LDL-c.

Chez le sujet normal, les valeurs cibles sont fonction des facteurs de RCV et de l'estimation du risque cardiovasculaire total (10) (Annexe 1B).

- < 55 mg/dL en prévention secondaire ou chez les patients à très haut risque
- < 70 mg/dL chez les patients à haut risque
- < 100 mg/dL chez les patients à risque modéré
- < 116mg/dL chez les patients à bas risque

Interférence

Il existe une possibilité de surestimer la fraction LDL-c s'il existe une hypertriglycéridémie supérieure à 10 mmol/L (390 mg/dL).

f. Calcul de la valeur du LDL-c

A partir des concentrations mesurées de TG, HDL et CT, le LDL-c peut être estimé *via* la formule de Friedewald (Figure 14).

$$\begin{aligned}\text{LDL-c} &= \text{CT} - \text{HDL-c} - (\text{TG}/2.2) \text{ mmol/L} \\ \text{LDL-c} &= \text{CT} - \text{HDL-c} - (\text{TG}/5) \text{ mg/dL}\end{aligned}$$

Figure 14 : Calcul du LDL-c selon la formule de Friedewald

L'estimation du LDL-c par la formule de Friedewald comporte toutefois certaines limitations :

- erreurs analytiques car elle nécessite 3 dosages de d'analytes
- au sein des VLDL, on assume un ratio constant cholestérol/TG
- non validité de la formule pour TG > 3.88 mmol/L (150 mg/dL), si présence de CM, si dyslipoprotéinémie de type 3.

La formule de Planella est également utilisée pour calculer le LDL-c, dans le cas d'une hypertriglycéridémie (Figure 15).

$$\text{LDL-c} = \text{CT} \times 0.41 - \text{TG} \times 0.32 + \text{ApoB} \times 1.7 - 0.27 \text{ mmol/L}$$

Figure 15 : Calcul du LDL-c selon la formule de Planella

Comme alternative au calcul du LDL-c, on peut calculer le non-HDL-c c'est-à-dire le cholestérol athérogène. Il s'agit de la mesure totale du cholestérol transporté par toutes les lipoprotéines athérogènes comptant de l'apoB, y compris les particules riches en TG que sont les VLDL et leurs remnants (22) (Figure 16).

$$\text{Non-HDL-c} = \text{CT} - \text{HDL-c}$$

Figure 16 : Calcul du non-HDL-c

2. Autres paramètres de l'exploration lipidique

a. Le lipoprotéinogramme

En fonction du type de lipoprotéines, les densités, tailles et compositions varient. On peut ainsi les caractériser en fonction de leur densité *via* une technique d'ultracentrifugation de flottation. La présence de lipides au sein des lipoprotéines leur confère une densité inférieure aux autres protéines du sérum. Cette technique est considérée comme la technique de référence pour la séparation et l'étude des différentes classes de lipoprotéines. Cependant, en raison de son caractère délicat, long et onéreux, elle reste réservée aux laboratoires de recherche uniquement.

Dans les laboratoires de biologie de diagnostic, on lui préfère le lipoprotéinogramme (Figure 17, (23)). Cette électrophorèse permet la séparation des lipoprotéines sous l'effet d'un champ électrique en raison de la présence de charges à leurs surfaces. Les protéines en proportions différentes dans les lipoprotéines permettent la séparation. Il s'agit d'une technique qualitative ou semi-quantitative des lipoprotéines permettant de confirmer la présence de CM, d'une hypertriglycémie et de mettre en évidence une dysbétalipoprotéïnémie de type III.

Trois zones distinctes de migration de ces lipoprotéines sont identifiées et permettent de classer les hyperlipoprotéïnémies selon les anomalies du lipoprotéinogramme (classification de Fredrickson) :

- Alpha lipoprotéines : zone la plus éloignée du dépôt. Elle apparaît faiblement colorée et étalée. Elle correspond aux HDL (20-40%).
- Pré-bêta lipoprotéines : zone de mobilité intermédiaire. Elle apparaît étroite et faiblement colorée. Elle correspond aux VLDL (2-34%).
- Bêta lipoprotéines : zone proche du dépôt. Elle apparaît étroite et très colorée. Elle correspond aux LDL (34-59%).

- Les CM normalement absents du sérum d'un sujet à jeun, restent au dépôt s'ils sont présents.

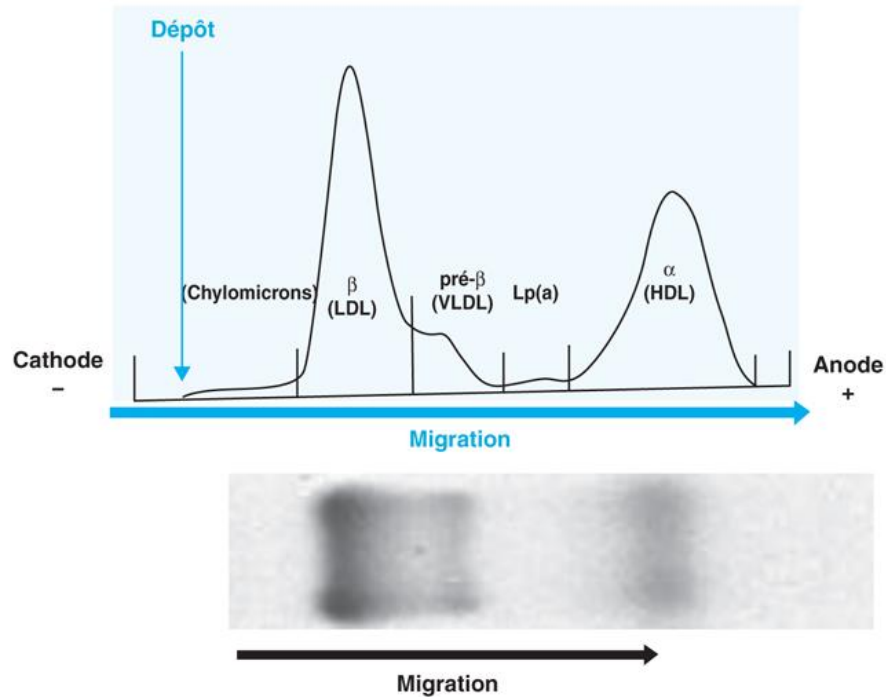


Figure 17 : Lipoprotéinogramme d'un sujet normolipémique

D'après Bittar *et al.*, Electrophorèse du sérum en gel d'agarose et coloration par le Noir Soudan

En cas de dysbétalipoprotéïnémie de type III, on observe une bande broad β témoignant de l'accumulation d'IDL et remnants de CM.

Afin de confirmer le dosage des HDL et LDL ou en cas d'interférence analytique, les dosages de l'ApoA1 et de l'ApoB peuvent être réalisés.

B. Etiologies des hypercholestérolémies

Devant le diagnostic biologique d'une hypercholestérolémie pure, il est nécessaire de s'affranchir et de rechercher dans un premier temps une hypercholestérolémie secondaire (24) dont les étiologies principales sont décrites ci-dessous.

1. Hypothyroïdie

Dans le cas d'une hypothyroïdie, les troubles lipidiques sont fréquents et il est nécessaire de les rechercher. L'effet hypocholestérolémiant des hormones thyroïdiennes est dû à une augmentation de l'expression de SREBP2 et à un effet direct de l'hormone T3 sur le promoteur du *LDLR* (24).

2. Hépatopathie, cholestase

En cas de cholestase hépatique et plus généralement d'hépatopathie, on observe une accumulation de cholestérol dans le sang sous forme de LDL-c, qui serait la double conséquence d'une augmentation d'activité HMG-CoA réductase hépatique et d'une altération de la transformation du cholestérol en acides biliaires. Par ailleurs, la production accrue de cholestérol dans la cholestase extra- et intrahépatique n'est pas inhibée par la lipoprotéine X (25).

3. Insuffisance rénale, syndrome néphrotique

Dans le cadre d'un syndrome néphrotique, l'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol est augmentée (voie SREBP).

4. Autres causes

Dans le cas d'un lymphome ou d'une gammopathie monoclonale, d'une anorexie mentale ou encore de la prise d'oestrogénostatifs, il est fréquent d'observer une hypercholestérolémie pure.

Dans la plupart des cas, une exploration biologique thyroïdienne (TSH), hépatique (phosphatases alcalines, gammaGT, 5'Nucléotidases, bilirubine), rénale associée à un interrogatoire du patient permettent de documenter ces causes secondaires d'hypercholestérolémie isolée. La mise en évidence d'antécédents familiaux associés à une hypercholestérolémie biologique orientent alors la recherche vers une hypercholestérolémie familiale.

C. Hypercholestérolémies familiales

1. Diagnostic de l'hypercholestérolémie pure familiale

L'hypercholestérolémie familiale (HF) (OMIM#144010, #603813, #143890, #603776) est l'une des maladies héréditaires autosomiques dominantes les plus fréquentes avec une incidence entre 1/200 à 1/300 en France chez les porteurs d'un variant hétérozygote (hypercholestérolémie familiale hétérozygote HFhe) et une pénétrance de 90-95% (26). Elle est décrite pour la première fois en 1938 par un médecin norvégien, au sein d'une famille où des taux élevés de cholestérol se transmettent sur un mode autosomique dominant (27). Il existe également une forme très rare et grave décrite au Liban pour la première fois en 1964 (28) (HFho hypercholestérolémie familiale homozygote) pour les porteurs de 2 allèles mutés (variant homozygote ou variants hétérozygotes composites) avec un effet dose de l'allèle muté (notion de codominance (29)) et une incidence de 1/ 300 000 à 1/10⁶. L'HF est responsable d'une maladie CV précoce en raison de taux persistants et élevés de LDL-c. D'après une étude norvégienne (30), en l'absence de traitement, on estime que 50% des patients HF hétérozygotes (HFhe) présentent un accident CV avant l'âge de 50 ans et les patients HF homozygotes (HFho) décèdent avant l'âge de 20 ans. Un diagnostic précoce et une prise en charge thérapeutique permettent de réduire drastiquement ce risque d'événement CV.

L'ampleur du sous-diagnostic, de l'absence de traitement et du sous-traitement des personnes atteintes de HF est inconnue à ce jour. D'après l'estimation de la prévalence, on évalue à moins de 10% d'individus diagnostiqués pour cette pathologie à travers de nombreux pays (France, Etats-Unis, Italie, Canada) (31).

a. Intérêt du diagnostic de l'HF

Le concept de LDL-c cumulé illustre l'importance d'un diagnostic et d'un traitement précoce de l'HF (31) (Figure 18). L'HF expose à un risque cardiovasculaire amplifié par rapport à celui de la population générale. En l'absence de traitement, 50% des hommes HF et 30% des femmes HF ont un événement coronarien avant l'âge de 50 ans et 60 ans, pour les hommes et les femmes respectivement.

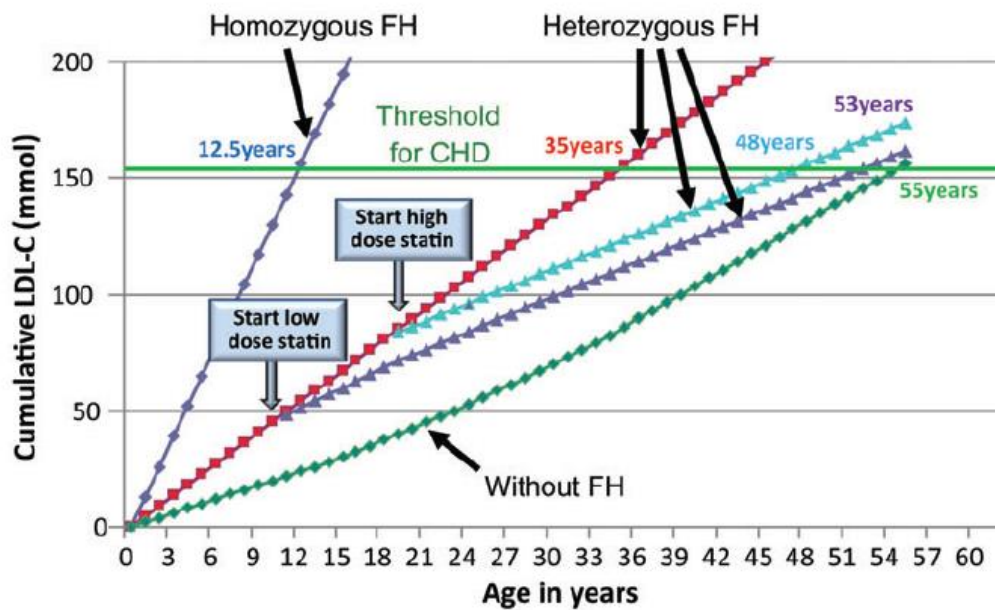


Figure 18 : Représentation du LDL-c cumulé en fonction de l'âge chez des individus sains ou porteurs d'HF hétérozygote ou homozygote selon l'âge d'initiation d'un traitement hypocholestérolémiant par statines

D'après Nordestgaard *et al.*, 2013

D'après Nordestgaard *et al.*, (31), à l'âge de 55 ans, un individu sain possède une charge cumulée de LDL-c autour de 150 mmol (ligne verte). Cette valeur représente le seuil compatible avec un RCV. Pour un individu HFhe, cette valeur est atteinte à 35 ans (courbe rouge) alors qu'elle est atteinte à l'âge de 48 ans si un traitement hypocholestérolémiant est instauré à l'âge de 18 ans (courbe bleue). De même, si on débute un traitement dès l'âge de 10 ans, cet individu retrouve un seuil compatible avec un RCV à l'âge d'un individu sain (courbe violette).

On comprend la gravité de l'HFho en raison de l'âge d'atteinte du RCV autour de 12 ans en l'absence de traitement.

Un traitement prolongé et adapté par hypocholestérolémiant permet de réduire le risque CV des patients HF au niveau de celui de la population générale.

b. Diagnostic clinicobiologique de l'HF

Le diagnostic de l'HF repose sur des critères biologiques et cliniques. D'après la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (32), il doit être évoqué devant un LDL-c supérieur à 4.95 mmol/L (190 mg/dL) chez les adultes et supérieur à 4.16 mmol/L (160 mg/dL) chez les enfants. Dans ce cas, il faut rechercher :

- Des antécédents personnels et familiaux d'HF détectée à partir d'un bilan biologique.

- Des signes cliniques de dépôts extravasculaires de cholestérol. Les xanthomes tendineux ou cutanés sont des signes quasi-pathognomoniques. Un arc cornéen est caractéristique chez un sujet avant l'âge de 45 ans.
- Des antécédents personnels et familiaux de MCV précoce

Le diagnostic biologique d'hypercholestérolémie est dans la plupart des cas le critère d'entrée diagnostique majeur. Ce bilan doit être complété *a minima* d'un dosage du cholestérol total, des triglycérides et du HDL-c, dans le cadre d'une exploration d'une anomalie lipidique.

Dans le cas où l'on retrouve une hypercholestérolémie associée à l'un des 3 éléments listés ci-dessus, le diagnostic moléculaire doit être proposé.

Le score DLCN (Dutch Lipid Clinic Network), recommandé par la société européenne d'athérosclérose et la société européenne de cardiologie permet d'estimer la probabilité du diagnostic d'HF (Annexe 2) :

- 0-2 : HF peu probable
- 3-5 : HF possible
- 6-8 : HF probable
- > 8 : HF certaine

c. Intérêt du diagnostic moléculaire de l'HF

Le diagnostic moléculaire de l'HF présente de multiples intérêts.

- Diagnostic génétique

Le diagnostic génétique apporte une certitude diagnostique au patient (33). En effet, le taux de LDL-c ne permet pas d'identifier les individus FH en raison d'un spectre élargi des taux de LDL-c (55% des patients FH ont un taux de LDL-c < 1.9 g/dL (34)).

- Relation génotype-phénotype

Par ailleurs, le risque de développer une MCV est plus élevé chez les patients porteurs de variants pathogènes par rapport aux patients non porteurs quelque soit le taux de LDL-c. D'après une étude menée en 2016 (34) sur 26025 individus issus de 7 études cas-contrôles (5540 cas, 8577 contrôles) et 5 cohortes prospectives, le risque de MCV est multiplié par 3 lorsqu'on est porteur d'un variant pathogène, pour un même taux de LDL-c. Lorsque ce dernier est supérieur à 190 mg/dL, les patients FH non porteurs de variants ont 6 fois plus de risque de développer une MCV et les patients FH avec un test génétique positif ont 22 fois plus de risque de développer une MCV (Figure 19).

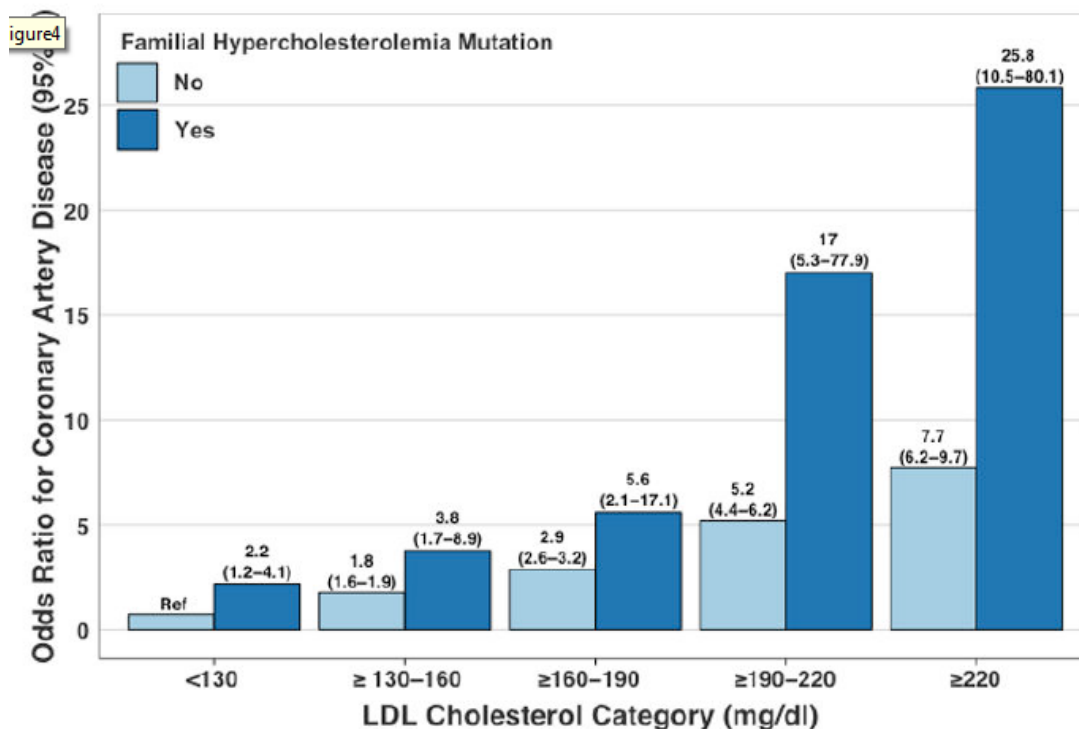


Figure 19 : Impact du statut génétique sur le risque de développer une MCV en fonction du taux de LDL-c

D'après Khera *et al.*, 2016

Le type de variant (faux-sens, tronquant) est associé avec le degré de l'hypercholestérolémie et le risque de développer une MCV. Les variants perte de fonction dans le *LDLR* entraînent une hypercholestérolémie sévère associée à un haut RCV. En revanche, les variants faux-sens du *LDLR*, *PCSK9* et *APOB* présentent un phénotype clinico-biologique intermédiaire (Figure 20).

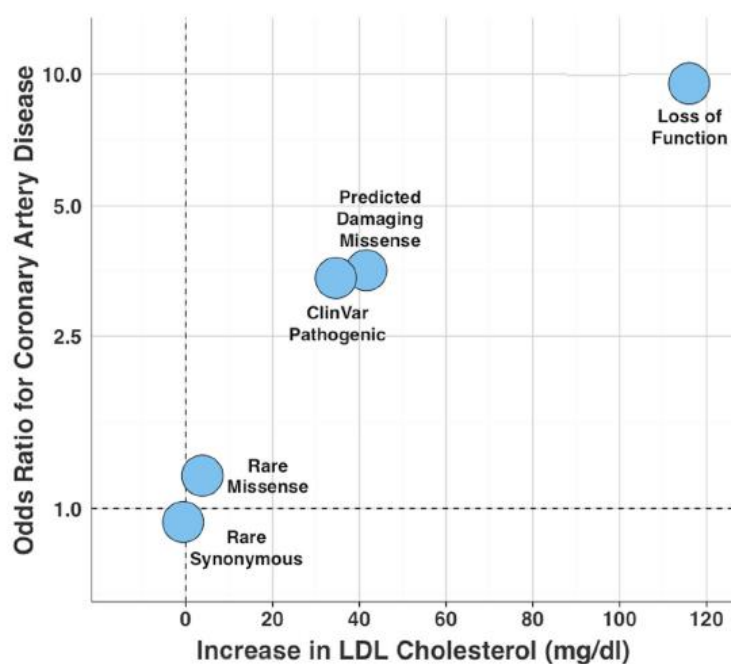


Figure 20 : Impact du type de variant sur le développement d'une MCV et du taux de LDL-c

D'après Khera *et al.*, 2016

- Conseil génétique et thérapeutique

Par ailleurs, le taux de LDL-c ne permet pas à lui seul de dépister les apparentés en raison d'un large spectre de taux de LDL-c retrouvés au sein d'une même famille. En effet, la pénétrance des variants étant variable à travers une famille, il est plus aisé d'identifier les apparentés à risque CV, surtout lorsque les dosages biologiques sont subnormaux. En cas de désir de grossesse chez une patiente FH, une évaluation du risque d'homozygotie de l'enfant doit être réalisée par un dosage lipidique du couple.

Le conseil génétique permet d'expliquer les intérêts de réaliser un diagnostic génétique et entraînent bien souvent une adhésion au traitement et donc une meilleure compliance (35).

Les choix thérapeutiques peuvent également être guidés par le statut génétique. Certains traitements n'ont en effet l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) uniquement pour l'HFho. Les patients FH porteurs d'un variant gain de fonction dans *PCSK9* sont particulièrement répondeurs aux inhibiteurs de PCSK9. Au contraire, les patients HFho ne sont que peu voire pas répondeurs (en cas de variants entraînant une activité nulle du LDLR) à ces inhibiteurs (36).

Chez la population pédiatrique, le test génétique est proposé car il permet une prise en charge thérapeutique. En cas d'HFho, le traitement par statine est proposé dès le diagnostic alors qu'en cas d'HFhe il est mis en place à partir de 8-10 ans. D'après une étude publiée en 2019 sur une population pédiatrique (n=214 enfants), ce traitement n'a pas d'effet indésirable sur la croissance et le développement de l'enfant (37). En l'absence de traitement, un événement CV survient précocement en raison d'un taux de LDL-c cumulé élevé.

Même si les tests génétiques ne permettent pas d'identifier une cause moléculaire chez tous les patients, ils établissent un diagnostic formel de FH, permettant ainsi un dépistage familial précoce et une prise en charge adaptée en fonction de l'histoire familiale, du taux de LDL-c et du variant identifié.

2. Stratégie diagnostique

La stratégie diagnostic d'une hypercholestérolémie biologique est présentée dans l'arbre décisionnel ci-dessous (Figure 21).

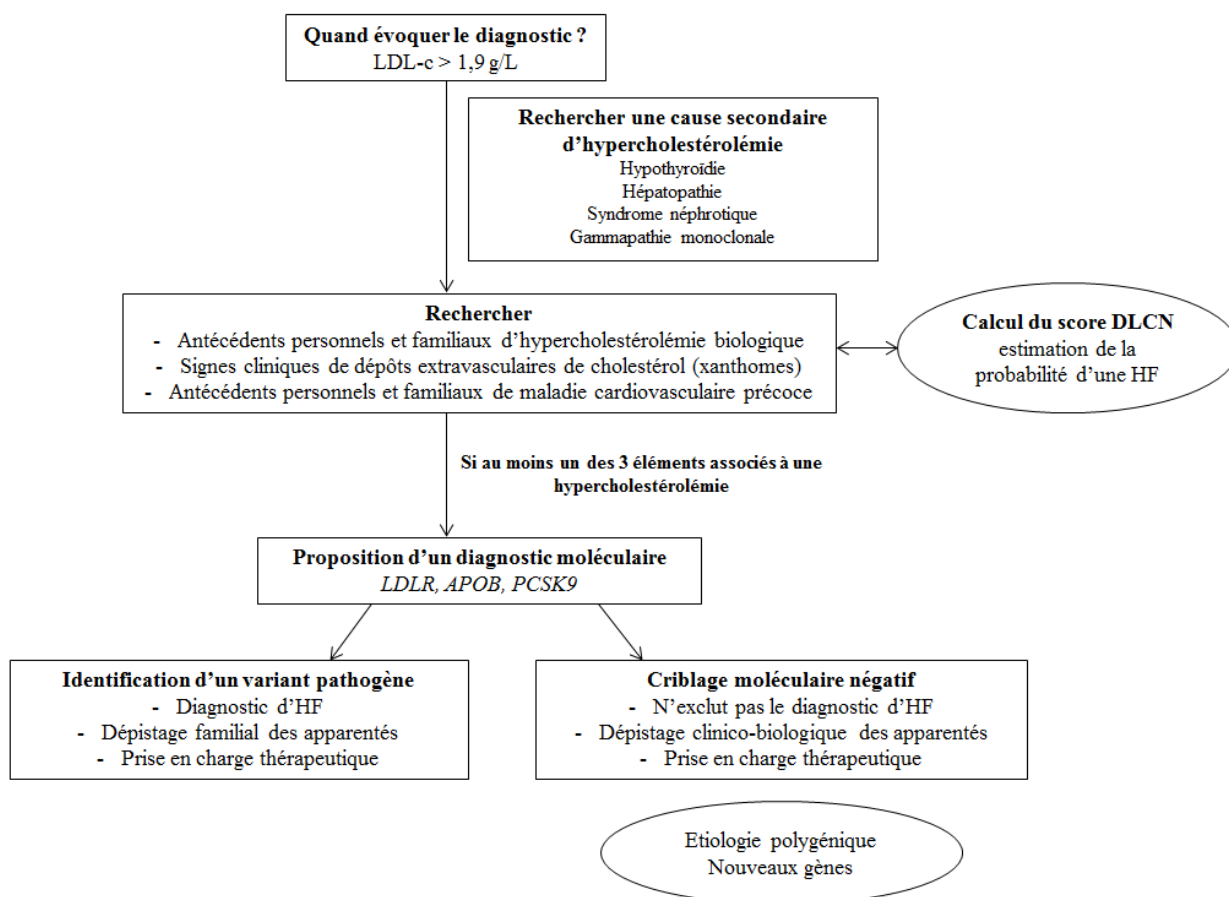


Figure 21 : Stratégie diagnostique d'une hypercholestérolémie biologique

Adaptée des recommandations européennes et de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA)

3. Gènes impliqués dans l'HF

L'HF est une maladie génétique hétérogène due à des variants portés dans des gènes différents. D'après le registre français en 2018 comptant 2054 cas index avec un score DLCN ≥ 5 , le gène *LDLR* est le plus fréquemment muté avec 93.5% des patients, suivi par l'*APOB* et *PCSK9* avec 4.7% et 1.8% respectivement (38). Les bases moléculaires de l'augmentation du LDL-c sont dans la plupart des cas :

- Une diminution du nombre de LDLR (quantitatif) ou de l'activité du LDLR (qualitatif) avec une diminution de la clairance plasmatique du cholestérol
- Une ApoB défectueuse au niveau du LDL-c conduisant à une absence de liaison aux LDLR

- Une surexpression ou hyperactivité de PCSK9 entraînant une dégradation rapide des LDLR et un nombre réduit de LDLR.

D'après une étude de Reeskamp (39), si on estime une probabilité d'HF probable ou définie (score DLCN ≥ 6), on retrouve des variants pathogènes chez 60 à 80% des patients. D'après une étude de Wang *et al.*, 2016 (40), des variants pathogènes sont retrouvés chez 40% des patients FH avec un LDL-c compris entre 5-6 mmol/L (194-233 mg/dL) et chez 90% des patients FH avec un LDL-c supérieur à 8 mmol/L (310 mg/dL).

Plus de 2000 variants sont reportés actuellement dont la moitié sont classés pathogènes/probablement pathogènes selon les recommandations de l'ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) (41).

a. LDLR (LDL Receptor)

Le gène codant pour le LDLR est localisé au niveau du bras court du chromosome 19 (19p13.2). Composé de 18 exons (NM_000527.4), il possède une taille de 45kb et code pour une protéine de 839 acides aminés. La structure du LDLR est représentée en Figure 22 (42).

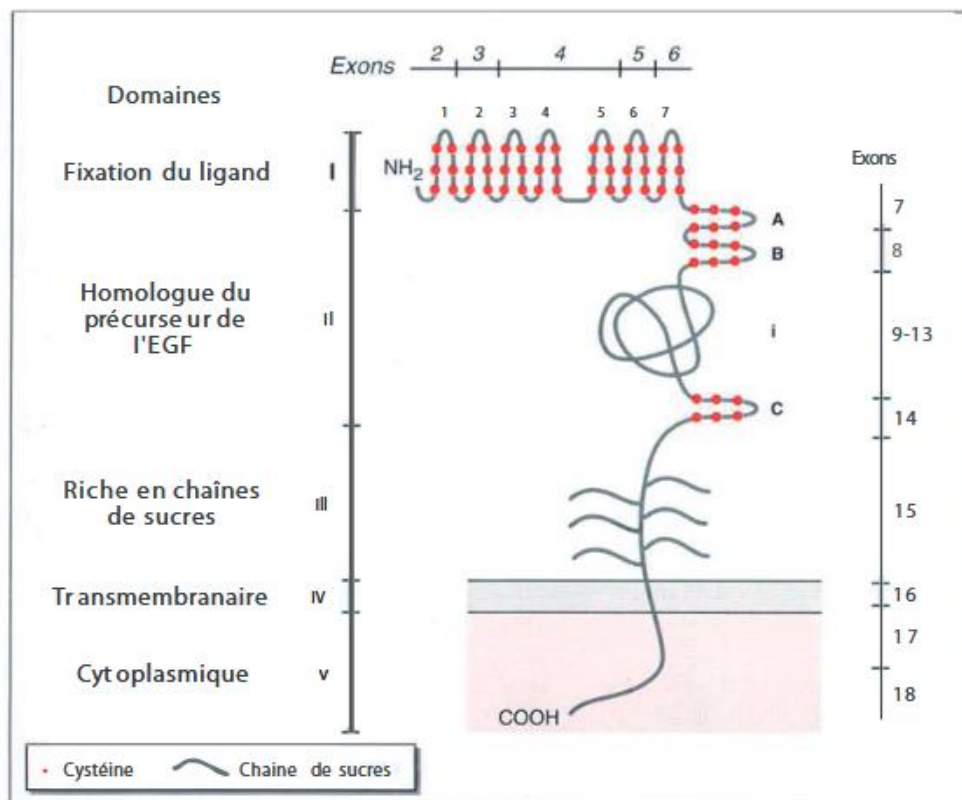


Figure 22 : Structure du LDLR et représentation exonique

D'après Varret *et al.*, 1997

Le domaine extérieur contient 7 régions répétées riches en cystéine et constitue le domaine de liaison du LDL-c. La région terminale cytoplasmique COOH est composée de 50 acides aminés et contient la séquence guidant le récepteur pour son internalisation.

Le gène du LDLR est très polymorphe et représente le gène majeur impliqué dans les HF. On y retrouve différents types de variants pathogènes au niveau des sites exoniques et canoniques d'épissage mais aussi dans les régions promotrices : non-sens, faux-sens, petites délétions-insertions, rarement synonymes.

De grands réarrangements sont également retrouvés dans une proportion non négligeable de 10%, impliquant notamment des séquences Alu.

b. APOB

L'apolipoprotéine B existe sous 2 formes différentes : l'apolipoprotéine B100 (ApoB100) et l'apolipoprotéine B48 (ApoB48), codée par le même gène *APOB* (NM_000384.3) situé sur le bras court du chromosome 2 (2p24.1). L'ApoB100 possède une masse moléculaire de 540kDa et 26 exons codant pour 4536 acides aminés. La masse moléculaire de l'ApoB48 est de 48% de la masse moléculaire de l'ApoB100 en raison de d'une modification post-transcriptionnelle du transcrit de l'APOB catalysée par APOBEC1 (*ApoB Editing Catalytic subunit 1*) au niveau des cellules intestinales. Suite à une désamination du nucléotide 6666 transformant la cytidine en uridine, on observe un changement protéique d'une glutamine en un codon stop p.(Gln2153*). Chez l'homme, 90% des ARN d'ApoB intestinaux subissent le mRNA editing (désamination décrite précédemment) (43).

L'ApoB48 est un polypeptide de 2152 acides aminés, avec une masse moléculaire de 264kDa. Les variants pathogènes, en majorité faux-sens, dans le gène *APOB* sont retrouvés chez 5-10% des patients FH (33,44). Le plus souvent, ils sont retrouvés au niveau de la région se liant au LDLR (Figure 23). D'après une étude d'Elbitar *et al.*, 2018 (45), dans la population européenne, les variants pathogènes p.(Arg3527Gln) et p.(Arg3527Trp) dans l'exon 26 sont les plus fréquemment identifiés (6-10% des patients FH). Des variants situés dans d'autres régions sont identifiés mais leur pathogénicité reste difficile à établir.

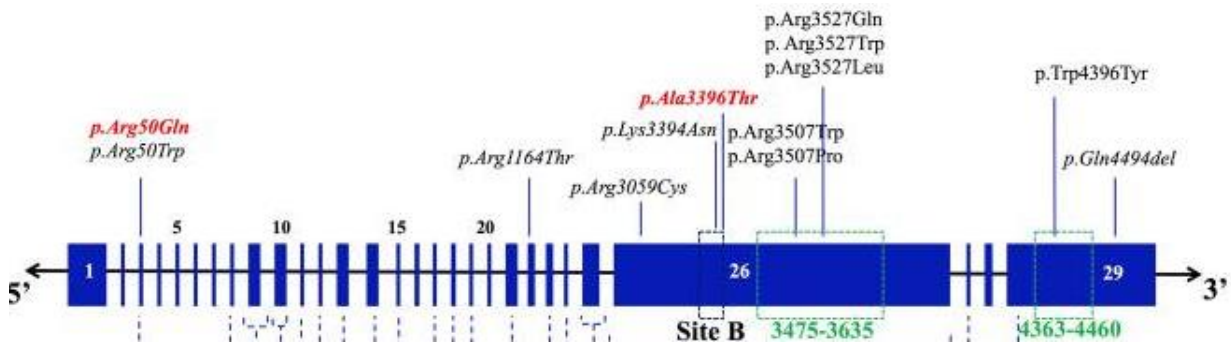


Figure 23 : Représentation exonique de l'APOB et variants pathogènes impliqués dans la HF

D'après Elbitar *et al.*, 2018. Site B : Domaine de liaison au LDLR

c. PCSK9

La protéine PCSK9 est codée par un gène localisé sur le bras court du chromosome 1 (1p32.3) et comporte 12 exons (NM_174936.4). A la suite des différents clivages autocatalytiques, on obtient la formation de PCSK9 mature (46).

Des variants pathogènes gain de fonction augmentent la faculté de PCSK9 à dégrader le LDLR, avec par conséquent une diminution du nombre de LDLR à la surface cellulaire. Les variants p.(Ser127Arg) (47) et p.(Asp374Tyr) (population anglo-saxonne) sont les plus fréquemment retrouvés (48).

d. APOE

Situé sur le bras long du chromosome 19 (19q13.32), ce gène code pour l'apolipoprotéine E (ApoE), responsable du recyclage hépatique des VLDL et CM *via* la liaison au LDLR. L'ApoE existe sous la forme de 3 allèles différents (E2, E3 et E4) codant chacun une isoforme de l'ApoE (NM_000041.4). Ces isoformes n'ont pas la même affinité pour le LDLR : l'ApoE4 a une affinité élevée et l'ApoE2 a une affinité moindre. L'allèle E3 est considéré comme la forme normale alors que les allèles E2 et E4 sont associés à différentes pathologies. Ce polymorphisme génétique révèle ainsi 6 phénotypes de l'ApoE :

- 3 phénotypes homozygotes (E2/2, E3/3, E4/4)
- 3 phénotypes hétérozygotes (E2/3, E2/4, E3/4)

La distribution des phénotypes (Tableau 4) dans la population générale montre que le phénotype le plus répandu est E3/3, et que l'allèle E3 est le plus fréquemment rencontré (49).

Phénotype	%
E4/4	3
E3/3	60
E2/2	1
E4/3	22
E4/2	2
E3/2	12

Tableau 4 : Fréquence des phénotypes de l'ApoE dans la population générale.
D'après Poirier *et al.*, 1993

Ces 3 allèles diffèrent au niveau des acides aminés en position 130 et 176 (Figure 24).

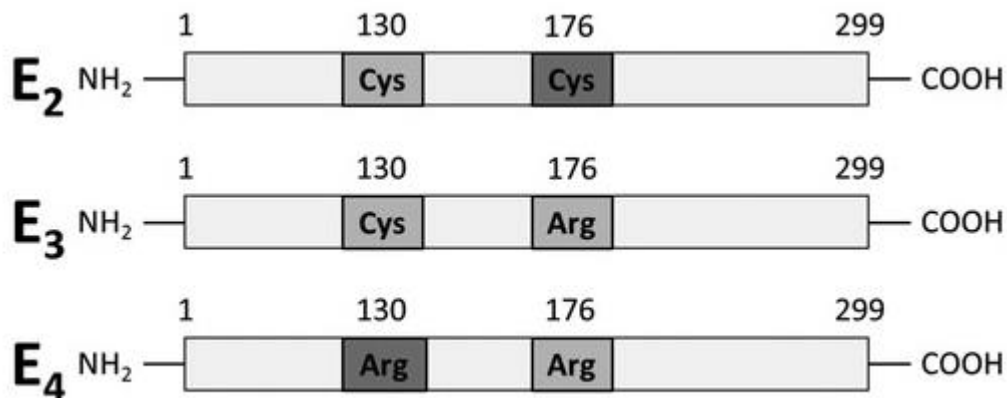


Figure 24 : Substitutions des acides aminés en fonction des 3 isoformes de l'ApoE
D'après Boot *et al.*, 2020

Ces variants non délétères sont décrits en rapport avec la maladie d'Alzheimer : près de 10% des porteurs d'un allèle E4 hétérozygote développeront une maladie d'Alzheimer à 75 ans tandis que 33% des porteurs homozygotes de l'allèle E4 développeront cette pathologie à 75 ans.

Dans le cadre d'un diagnostic moléculaire d'une hypercholestérolémie, le variant pathogène p.(Leu167del) est le plus fréquemment retrouvé (50). D'autres variants sont également décrits et retrouvés au niveau du domaine de liaison au LDLR (51).

e. Autres gènes

Des variants pathogènes sont retrouvés dans d'autres gènes chez les patients FH. Dans notre stratégie diagnostique, ils seront analysés dans un second temps, lorsque l'on ne retrouve aucun variant pathogène dans les gènes décrits précédemment. Des variants pathogènes dans les gènes décrits ci-dessous sont à rechercher en cas d'une transmission autosomique récessive.

- *LDLRAP1 (LDL receptor adaptator protein 1)*

Il est situé sur le bras court du chromosome 1 (1p36.11) et code pour une protéine cytosolique de 308 acides aminés qui interagit avec la queue cytoplasmique du LDLR (9 exons, NM_015627.3). Protéine chaperonne, elle permet l'internalisation du complexe LDL-c/LDLR *via* des puits de clathrine à la surface basolatérale des hépatocytes puis vers les endosomes.

Des variants pathogènes entraînent une dysfonction de la protéine LDLRAP1 conduit à une rétention des LDLR à la surface apicale et par conséquent une diminution de l'épuration plasmatique du LDL-c. A ce jour, on retrouve le plus souvent des variants faux-sens (52).

- *ABCG5/ABCG8 (ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5, 8)*

Les gènes *ABCG5* (NM_022436.3, 651 acides aminés) et *ABCG8* (NM_022437.3, 673 acides aminés), situés sur le bras court du chromosome 2 (2p21) en tandem opposé codent pour des protéines responsables du transport transmembranaire des stérols (en particulier végétaux). Elles forment un hétérodimère et transportent les stérols de l'entérocyte vers la lumière intestinale et du foie vers la bile. Les variants homozygotes ou hétérozygotes composites au sein de ces 2 gènes sont responsables de sitostérolémie. Il s'agit d'une pathologie héréditaire, à transmission autosomique récessive, se caractérisant par des taux élevés de cholestérol et de stérols végétaux. La relation entre des variants pathogènes dans ces gènes et une hypercholestérolémie n'est pas clairement identifiée. Il semblerait que le métabolisme du cholestérol du foie vers la bile soit diminué (53).

- *LIPA (Lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase)*

Ce gène code pour une lipase acide lysosomale (LIPA), qui participe à l'hydrolyse des TG et des esters de cholestérol provenant des LDL-c. Il est situé au niveau du bras long du chromosome 10 (10q23.31) et comporte (NM_000235.4, 399 acides aminés). En fonction du degré de dysfonction de la protéine, elle est responsable de 2 pathologies différentes :

- Maladie de Wolman, qui se manifeste dès les premiers mois de vie (décès dans la première année de vie) et se caractérise par une absence totale de LIPA
- Maladie de stockage des esters de cholestérol, qui se manifeste plus tardivement à l'âge adulte avec une activité de lipase acide lysosomale résiduelle

Quelques variants pathogènes sont décrits avec des faux-sens le plus souvent.

Le Tableau 5 résume les différentes caractéristiques retrouvées chez les gènes associés à l'HF.

Tableau 5 : Gènes associés à l'HF

Gènes	Proportion des variants retrouvés	Phénotype	Type de variants retrouvés	Hotspots mutationnels
<i>LDLR</i>	>90%	HF type 1	>2000 mutations décrites dans la base LOVD. Faux-sens largement, non-sens, épissage Larges réarrangements (10%)	Tous les exons, promoteur jusqu'à – 600pb
<i>APOB</i>	5-10%	HF type 2	Faux-sens 2 variants récurrents : c.10579 C>T p.(Arg3527Trp) c.10580G>A p.(Arg3527Gln)	Région de liaison entre l'APOB et le LDLR : exon 3, 22 26 (acides aminés 3367 à 3652) et 29 (acides aminés 4372 à 405)
<i>PCSK9</i>	<1%	HF type 3	Gain de fonction Variants récurrents : c.381T>A p.(Ser127Arg) et c.1120G>T p.(Asp374Tyr)	Tous les exons
<i>LDLRAP1</i>	Rare	HF type 4	Faux-sens	
<i>APOE</i>	Rare		Variant récurrent : c.500_502del p.(Leu167del)	Tous les exons
<i>ABCG5</i>	Rare	Sitostérolémie	Faux-sens	
<i>ABCG8</i>	Rare	Sitostérolémie	Faux-sens	
<i>LIPA</i>	Rare		Faux-sens	

On retrouve un variant pathogène chez environ 50% des patients FH testés. Lorsque le test génétique est retrouvé négatif, le diagnostic de FH n'est pas exclu. En effet, des gènes associés à cette pathologie restent encore à découvrir. Par ailleurs, une étiologie polygénique de l'hypercholestérolémie familiale est de plus en plus étudiée, avec notamment la mise en évidence de variants communs de l'ADN associés à cette pathologie.

4. Hypercholestérolémie pure polygénique

a. LDL-c SNP score

Les patients présentant une FH, sans variant identifié dans les gènes précédemment décrits ont une forte probabilité d'avoir une hypercholestérolémie d'origine polygénique.

En 2010, le GLNC (*Global Lipids Genetic Consortium*) a identifié à l'aide d'études d'association plus de 100 locus pour lesquels des polymorphismes nucléotidiques (SNP) influencent le taux de LDL-c. L'accumulation de variants communs ayant un faible effet serait à l'origine de l'augmentation du LDL-c. Parmi les locus identifiés, 12 SNP sont retenus (Tableau 6) et sont à l'origine du LDL-c score : il s'agit de la somme du nombre de SNP portés par chaque individu et la pondération de chaque SNP par la force de son effet (54). Plus le LDL-c score est élevé, plus le sujet est prédisposé à développer cliniquement une hypercholestérolémie.

Tableau 6 : LDL-c score selon 12 SNP (GLGC)

CHR	SNP	Gene	Minor ^a	Common ^a	GLGC weight
1	rs2479409	<i>PCSK9</i>	G	A	0.052
1	rs629301	<i>CELSR2</i>	G	T	0.15
2	rs1367117	<i>APOB</i>	A	G	0.10
2	rs4299376	<i>ABCG8</i>	G	T	0.071
6	rs1564348	<i>SLC22A1</i>	C	T	0.014
6	rs1800562	<i>HFE</i>	A	G	0.057
6	rs3757354	<i>MYLIP</i>	T	C	0.037
11	rs11220462	<i>ST3GAL4</i>	A	G	0.050
14	rs8017377	<i>KIAA1305</i>	A	G	0.029
19	rs6511720	<i>LDL-R</i>	T	G	0.18
19	rs429358	<i>APOE</i>	C	T	
19	rs7412	<i>APOE</i>	T	C	
		<i>ε2ε2</i>			-0.9
		<i>ε2ε3</i>			-0.4
		<i>ε2ε4</i>			-0.2
		<i>ε3ε3</i>			0
		<i>ε3ε4</i>			0.1
		<i>ε4ε4</i>			0.2

D'après Futema, *et al.*, 2018

Les allèles à risque sont représentés en gras (minor, common). Les gènes en gras sont ceux utilisés pour calculer le LDL-c score avec 6 SNP.

D'autres SNP ont été inclus et testés, sans démontrer une efficacité significative à discriminer les individus sains des patients FH sans variant identifié. Le LDL-c score peut même être réduit à 6 SNP (gènes en gras Tableau 6), avec une efficacité équivalente aux 12 SNP. Il est important de noter que ce score a été établi sur une population caucasienne. Selon les populations étudiées, les allèles à risque peuvent être différents.

On estime que 80% des personnes FH, sans variant pathogène identifié présenterait une étiologie polygénique. Chez les patients FH avec variant pathogène retrouvé, il existe une contribution du fond polygénique expliquant les variations phénotypiques et biologiques intrafamiliales, pour un même variant, en fonction de la ségrégation des SNP.

b. Utilité clinique du score polygénique

La distinction entre une FH monogénique et une FH polygénique présentent 2 intérêts majeurs. Tout d'abord, la prévalence des MCV est plus importante chez les patients FH avec variant(s) identifié(s) par rapport aux patients avec un test génétique négatif (55). Par ailleurs, on identifie un variant pathogène chez seulement 20 à 30% des patients FH possible (selon score de DLCN), suggérant ainsi une étiologie polygénique. Chez ces patients FH possible, le taux de mortalité CV est inférieur aux patients FH certaine ou probable, suggérant ainsi une étendue moindre de la pathologie athérosclérotique (54).

Selon la Figure 25, le RCV augmente graduellement selon la présence d'une étiologie polygénique, associée ou non à une étiologie monogénique (56).

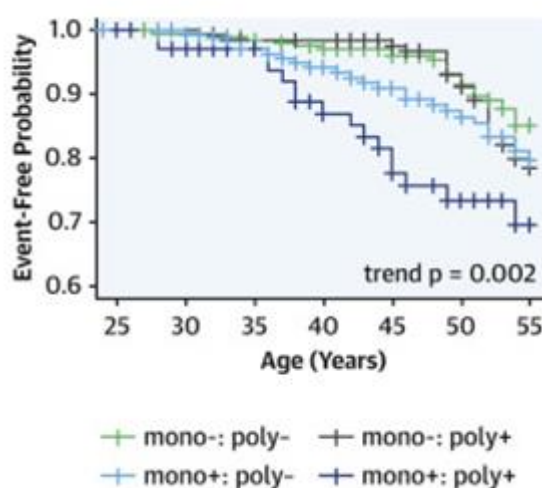


Figure 25 : Probabilité de ne pas avoir d'événement CV en fonction de l'âge et du statut génotypique
D'après Trinder *et al.*, 2019

c. Limites du score polygénique

Un seuil reste à déterminer, à partir d'une population contrôle, pour interpréter ce score polygénique. En effet, à ce jour, il n'y a pas de recommandation ni de consensus pour interpréter et utiliser ce score. De plus, l'estimation du RCV en fonction de ce score polygénique reste à établir. Enfin, des études sur les populations caucasiennes doivent être menées afin de pouvoir utiliser le score polygénique sur ces populations.

Actuellement, ce score n'est pas rendu dans le cadre du diagnostic moléculaire par les laboratoires de biologie médicale.

5. Prévention cardiovasculaire

L'objectif de la prévention CV est d'éliminer ou minimiser l'impact des MCV et leurs conséquences associées : prévention primaire de la MCVAS et prévention secondaire des événements cardiovasculaires.

A l'échelle individuelle, il s'agit de prévenir et de prendre en charge les différents facteurs de RCV et pathologies chroniques associées. Il existe une variabilité interindividuelle de réponse au régime et traitement hypocholestérolémiants. Par conséquent, l'individualisation du traitement et l'identification des objectifs du traitement sont nécessaires pour l'adhésion du patient au traitement. La prise en charge clinique est globale, c'est-à-dire que la médication associée, la tolérance et le coût du traitement doivent également être pris en compte. A l'échelle de la population, la promotion d'un mode de vie sain peut être faite.

a. Règles hygiéno-diététiques

Le rôle central de la nutrition dans la prévention de la MCVAS est démontré (57). Les facteurs diététiques influencent directement le développement de la MCVAS et indirectement *via* leurs actions sur les facteurs de RCV modifiables tels que la pression artérielle ou la glycémie. Néanmoins, il est difficile de mesurer l'impact d'un régime alimentaire sur le taux de LDL-c en raison du mélange de différents nutriments et composants au sein des aliments (58).

Un régime alimentaire riche en fruits et légumes, céréales complètes, noix, poissons, huiles végétales et en moindre mesure en viande, aliments riches en sucre raffiné et sel permet de diminuer l'incidence des événements cardiovasculaires (59). Les régimes alimentaires les plus évalués sont le régime DASH (*Dietary approaches to stop hypertension*) et le régime méditerranéen et sont associés avec une réduction des événements cardiovasculaires.

D'autres facteurs sont également à prendre en compte dans le mode de vie afin d'améliorer le profil lipoprotéique global : la maîtrise du poids associée à une activité physique régulière et une consommation d'alcool modérée.

En parallèle des mesures hygiéno-diététiques, un traitement pharmacologique hypocholestérolémiant est instauré selon les recommandations européennes (10) (Annexe 1A).

b. Traitement hypocholestérolémiant par statines

Il s'agit du traitement de première intention dans la prise en charge d'une hypercholestérolémie.

- Mécanisme d'action

Les statines diminuent la synthèse de cholestérol hépatique endogène de cholestérol en inhibant de manière compétitive l'enzyme HMGCoA-réductase. Cette réduction intracellulaire de cholestérol entraîne l'augmentation de l'expression du LDLR *via* la voie SREBP à la surface hépatocytaire avec une augmentation de l'internalisation du LDL-c. Ainsi le taux plasmatique de LDL-c diminue.

- Bénéfices

D'après les résultats de 4 études en double-aveugle (placebo/statines) chez plus de 38 000 individus à haut RCV traités par statines sur 5 ans, une diminution du LDL-c accompagnée d'une diminution significative des événements CV est observée. De même, une méta-analyse regroupant 22 essais sur les statines incluant 134 000 participants (12) démontrent que les événements cardiovasculaires sont réduits de 20% environ pour chaque réduction de 1 mmol/L (39 mg/dL) de LDL-c, même si les sujets sont à faible risque cardiovasculaire. Ces études démontrent ainsi le rôle prépondérant du LDL-c dans la MCV.

Malgré des effets indésirables retrouvés (myopathie, hépatotoxicité, surrisque modéré de diabète de type 2), cette molécule présente une bonne tolérance.

- Objectif thérapeutique

La diminution du LDL-c est dose-dépendante avec la réduction du RCV et varie en fonction des différentes statines. Une thérapie dite intensive a pour objectif une réduction d'au moins 50% du LDL-c, une thérapie modérée entre 30 et 50%.

Des traitements de seconde intention sont également utilisés en cas d'intolérance aux statines ou d'efficacité insuffisante des statines en monothérapie (Annexe 1A).

c. Autres traitements hypocholestérolémiants

- Inhibiteurs de l'absorption du cholestérol

L'ézétimibe inhibe l'absorption du cholestérol au niveau de la bordure en brosse de l'intestin en interagissant avec le transporteur NPC1L1. Le cholestérol intracellulaire diminue et l'expression des LDLR augmente entraînant ainsi une diminution du cholestérol plasmatique.

En monothérapie, l'ézétimibe entraîne une diminution de 15 à 20% du LDL-c et jusqu'à 20-25% en bithérapie avec les statines.

- Inhibiteurs de PCSK9

Des anticorps monoclonaux se fixent à la protéine PCSK9, empêchant ainsi sa liaison au LDLR et sa dégradation. On observe alors une augmentation d'expression du LDLR à la surface hépatocytaire avec *in fine* une diminution du cholestérol plasmatique. Actuellement, 2 anticorps monoclonaux sont sur le marché : alirocumab et evolocumab. Les statines augmentent les concentrations de PCSK9 (*via* la voie SREBP) et potentialisent l'action des inhibiteurs de PCSK9 en augmentant l'expression et le nombre de LDLR à la surface de la cellule. Ils entraînent une diminution du LDL-c de 60% seuls ou en association avec des statines et une diminution de 15 % du RCV d'après les essais d'intervention randomisés d'intervention cardiovasculaire FOURIER et ODYSSEY Outcomes (60,61).

Dans la majorité des cas, une monothérapie par statines permet d'atteindre le taux cible de LDL-c. Chez les patients à haut-risque CV ou avec des taux élevés de LDL-c, les traitements sont combinés afin de potentialiser leurs effets.

d. Traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote

Il repose sur un traitement hypocholestérolémiant intensif. Les statines et inhibiteurs de PCSK9 sont inefficaces en cas de variants nuls du LDLR et seuls certains médicaments agissant sur la production de l'ApoB ont une efficacité modérée (inhibiteur de la MTP : lomitapide ou anti-sens de l'ApoB : mipomersen). Les LDL-aphérèse sont le traitement de choix. Cette procédure, réalisée toutes les 1 à 2 semaines, permet de réduire considérablement le taux de LDL-c de 55-70%. Un traitement précoce dès l'enfance permet de diminuer l'enrichissement de l'intima en LDL-c, d'améliorer la fonction endothéliale et d'atténuer le développement de l'athérosclérose. Pour les enfants de plus de 10 ans, le niveau cible de LDL-c est < 3.5 mmol/L (< 136 mg/dL) et une diminution de 50% pour les plus jeunes.

Les hyperlipidémies, plus précisément les hypercholestérolémies, sont des affections fréquentes et connues des cliniciens. En revanche, les hypolipidémies primitives entraînant un taux bas de LDL-c le sont moins et passent souvent inaperçues.

D. Hypocholestérolémies familiales

L'hypobêtalipoprotéinémie (HBL) est définie par des concentrations plasmatiques de LDL-c et d'ApoB inférieures au 5^e percentile selon l'âge et le sexe. Des causes secondaires, comme un traitement hypolipémiant, une insuffisance hépatique, une hyperthyroïdie ou un régime végétalien, peuvent être responsable d'une HBL. Cette dernière inclut 3 pathologies héréditaires : l'hypobêtalipoprotéinémie familiale, l'abêtalipoprotéinémie et la maladie de rétention des CM.

1. Hypobêtalipoprotéinémies de découverte fortuite

L'hypobêtalipoprotéinémie familiale (HBLF) est une maladie autosomique dominante le plus souvent avec une prévalence comprise entre 1/1000 à 1/3000 chez les porteurs d'un variant hétérozygote (62). Les patients atteints de cette pathologie sont porteurs du syndrome de longévité, en raison de la protection cardiovasculaire (taux bas de LDL-c). On retrouve 3 gènes principaux : *APOB* (HBLF1 OMIM#615558) en majorité, *PCSK9* et *ANGPTL3* (HBLF2 OMIM#605019). Chez les sujets porteurs d'un variant hétérozygote (LDL-c compris entre 0.5 à 1 mmol/L (19 à 39 mg/Dl) ou inférieur au 30^e percentile selon l'âge et le sexe (63)), peu de symptômes sont retrouvés, avec rarement une stéatose hépatique et une intolérance alimentaire aux graisses.

Un variant pathogène est retrouvé dans 50% des cas de HBLF (64).

a. HBLF1 : variants pathogènes sur *APOB*

On retrouve des variants perte de fonction responsables d'une troncation de l'ApoB. La symptomatologie dépend le plus souvent de la position par rapport à l'ApoB48. Les porteurs de variants délétères du gène *APOB* présentent un sur-risque de stéatose hépatique avec évolution vers la fibrose hépatique et ses complications (cirrhose et carcinome hépatocellulaire) (65).

b. *PCSK9*

Des variants perte de fonction (66) et faux-sens perte de fonction (67) sont décrits dans ce gène dans le cadre d'une HBLF.

c. HBLF2 : variants pathogènes sur *ANGPTL3* (*angiopoietin-like 3*)

ANGPTL3 est une protéine de 460 acides aminés (NM_014495.3) codé par un gène situé sur le bras court du chromosome 3 (1p31.3). *ANGPTL3* régule les concentrations de CT et les TG

par inhibition de la LPL et de la lipase endothéliale. Des variants faux-sens et non-sens dans *ANGPTL3* sont retrouvés chez des individus atteints de HBLF de type 2 (HBLF2), appelée également hypolipidémie combinée familiale (OMIM #605019). Il s'agit d'une pathologie à transmission autosomique dominante et récessive (68) caractérisée par des taux bas de LDL-c, HDL-c et TG. Des variants perte de fonction augmentent l'activité de la LPL et diminuent le HDL-c par augmentation de 2 lipases endothéliales qui sont physiologiquement catabolisés par *ANGPTL3*. Des anticorps anti-*ANGPTL3* sont actuellement en cours de développement (evinacumab).

d. Variant dans le gène *LIMA1* (*LIM domain and actin binding 1*)

En 2018, l'équipe de Zhang *et al.*, (69) décrit un variant de décalage du cadre de lecture dans *LIMA1* au sein d'une famille avec des taux bas de LDL-c ségrégeant sur un mode autosomique dominant. La protéine *LIMA1* se lie avec le transporteur *NPC1L1* facilite l'absorption intestinale du cholestérol.

e. Intérêt du diagnostic moléculaire

Les hypobêtalipoprotéïnémies de découverte fortuite permettent d'évaluer un RCV en fonction du variant identifié : les variants perte de fonction *PCSK9* présenteraient une diminution du RCV alors que les variants tronquants dans le gène *APOB* seraient également à risque de stéatose hépatique.

2. Hypobêtalipoprotéïnémies associées à des diarrhées

Elles regroupent différentes pathologies avec une symptomatologie commune :

- Des vacuoles lipidiques sont retrouvées au niveau entérocytaire, entraînant une malabsorption lipidique.
- Diarrhées avec retard de croissance.
- Malabsorption des vitamines liposolubles : neuropathies, ataxie, rétinite pigmentaire.

a. HBLF1 homozygote

Les très rares formes homozygotes ou hétérozygotes composites de HBLF (variants *APOB*) présentent une symptomatologie clinique marquée avec une stéatorrhée, une acanthocytose et des anomalies neurologiques.

b. Abêtalipoprotéinémie

L'abêtalipoprotéinémie (ABL, OMIM#200100) est une pathologie à transmission autosomique récessive, découverte dans l'enfance en raison d'un retard de croissance et d'une malabsorption lipidique sévère. A ce jour, on retrouve des variants pathogènes, tronquants le plus souvent, dans le gène *MTTP* (*Microsomal triglyceride transfer protein*). Il s'agit d'un gène localisé sur le bras long du chromosome 4 (4q23), codant pour une protéine de 894 acides aminés (NM_000253.3). Cette protéine chaperonne MTP permet l'assemblage des lipoprotéines contenant l'ApoB. Une dysfonction de cette protéine entraîne un défaut de sécrétion de ces lipoprotéines (VLDL, CM) et de transport des vitamines liposolubles (70). Cette pathologie est très rare : moins de 100 cas sont rapportés dans la littérature soit moins de 1/1000000.

Les HBLF homozygotes et l'ABL partage une symptomatologie clinique et biologique similaires. La distinction est facilitée par l'exploration biologique lipidique des parents : les parents d'un individu ABL ont des valeurs de LDL-c dans la normale alors que les parents HBLF homozygotes ont des valeurs de LDL-c abaissés (63).

c. Maladie de rétention des chylomicrons

La maladie de rétention des CM (MRCM, OMIM#246700), également appelée maladie d'Anderson, est une pathologie autosomique récessive causée par des variants pathogènes dans le gène *SAR1B* (*Secretion associated Ras related GTPase 1B*) (5q31.1). Elle est caractérisée par l'accumulation de gouttelettes lipidiques au sein des entérocytes et l'absence sélective de lipoprotéines contenant l'ApoB. Au niveau biologique, on observe une absence sélective des CM et une baisse du LDL-c. En effet, cette protéine, constituée de 198 acides aminés (NM_001033503.2) permet le transport intracellulaire des CM (71). Cette pathologie est très peu retrouvée avec une prévalence de moins de 1/1 000 000.

d. Intérêt du diagnostic génétique

La connaissance de ces pathologies est indispensable pour diagnostiquer ces patients. Le criblage génétique offre un diagnostic de certitude, avec un dépistage familial et le suivi clinique des individus porteurs du variant en cause. Par ailleurs, la découverte de nouveaux gènes associés à ces pathologies permet une meilleure compréhension de la physiopathologie et donc des nouvelles voies thérapeutiques.

Les différents gènes impliqués dans l’HBL sont résumés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Gènes associés à l’HBL

Gènes	Phénotype	Type de variants retrouvés
<i>APOB</i>	HBLF type 1	Perte de fonction
<i>PCSK9</i>	HBLF	Perte de fonction et faux-sens perte de fonction
<i>ANGPTL3</i>	HBLF type 2, hypolipémie mixte familiale	Perte de fonction
<i>SARIB</i>	MA	Faux-sens et non-sens
<i>MTTP</i>	ABL	Tronquant
<i>LIMAI</i>	HBLF	Décalage du cadre de lecture

3. Score polygénique

D’après une étude Balder *et al.*, 2018 sur une population féminine âgée de 25 à 40 ans avec un LDL-c \leq 1^{er} percentile (72), le score polygénique détaillé dans le paragraphe C.3.a peut également être calculé chez les patients HBL (Figure 26).

On observe que les patientes sans variant pathogène identifié (50%, Figure 26A) ont un LDL-c score significativement inférieur à celui des contrôles ($p = 2.2 \cdot 10^{-16}$), dont 50% des patientes avec un LDL-c score inférieur au 10^e percentile (Figure 26B). Par conséquent ce score polygénique présente également un intérêt dans le cadre des HBLF.

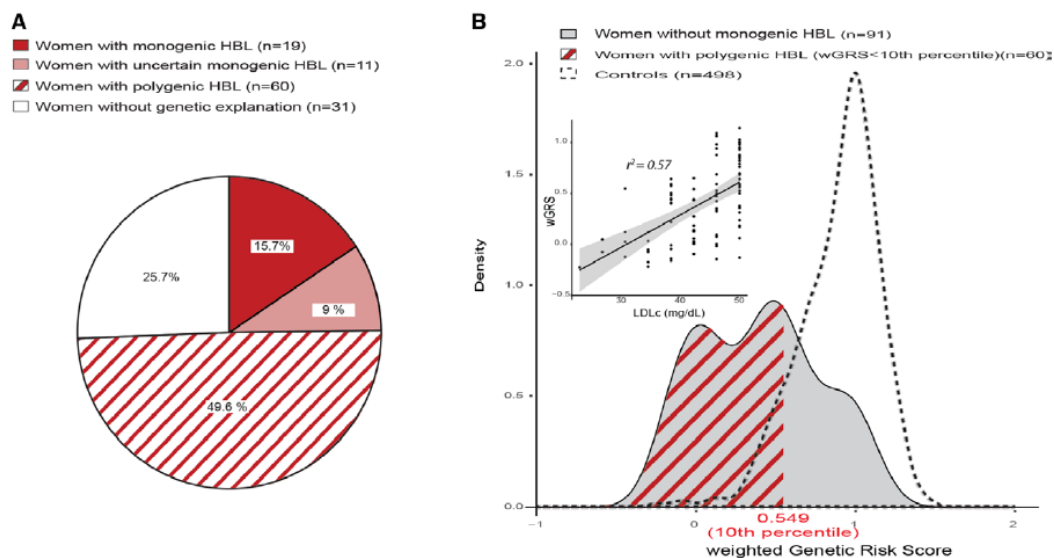


Figure 26 : Etiologie polygénique et monogénique de l’hypobétalipoprotéinémie familiale

D’après Balder *et al.*, 2018.

A : prévalence des étiologies génétiques de la HBLF

B : distribution du LDL-c score en fonction du statut génétique (présence ou absence d’un variant pathogène)

4. Prise en charge thérapeutique

La prise en charge des HBL modérées et sévères comprend une réduction des apports alimentaires en graisses et une supplémentation en vitamine E. La prise en charge des HBL sévères et de la maladie de rétention des CM est réalisée dans des centres spécialisés.

E. Hyperlipidémies mixtes

1. Hyperlipoprotéïnémie de type III

Cette pathologie, appelée aussi dysbétalipoprotéïnémie (OMIM#617347), se transmet sur un mode autosomique récessif le plus souvent. Elle est caractérisée par une accumulation de VLDL et de CM (recherche d'une broad β sur le lipoprotéinogramme) en réponse à une dysfonction ou une absence de l'ApoE. Le tableau clinico-biologique se caractérise par un taux de CT et de TG autour de 7-10 mmol/L (271-388 mg/dL) associé à un taux faible de LDL-c, des xanthomes palmaires striés (considérés comme un signe pathognomonique) et des xanthomes tubéro-éruptifs. Cette maladie ne s'exprime pas chez le plus jeune âge ou chez la femme avant la ménopause. Chez environ 90% des individus atteints de cette pathologie, on retrouve une homozygotie de l'ApoE pour l'isoforme E2 p.(Arg176Cys). L'ApoE2 se lie moins bien aux récepteurs hépatiques que les isoformes E3 et E4 et entraîne par conséquent une clairance hépatique moindre des CM et des IDL. On sait que 80% des individus porteurs du génotype E2/E2 ne développent pas la pathologie (génotype E2/E2 chez 7-8% de la population générale). En effet, cette dernière nécessite un second événement métabolique comme l'obésité ou le diabète de type 2 et est donc bien souvent non-diagnostiquée (73). Dans 10% des cas, cette pathologie est causée par des variants faux-sens pathogènes dans l'exon 4 de l'*APOE* se transmettant sous un mode autosomique dominant (environ 30 variants décrits) (74).

D'après Paquette *et al.*, 2020 (73), un ratio nonHDL-c/ApoB supérieur à 3.69 mmol/g (1.43 en unité conventionnelle) est fort évocateur de cette pathologie et permet de déterminer quels patients doivent réaliser un test génétique et un lipidogramme.

2. Hyperlipidémie familiale combinée

Il s'agit d'un désordre métabolique retrouvé dans 1 à 3% de la population générale et caractérisé par une hétérogénéité clinique et biologique. Elle est définie par une hypercholestérolémie isolée ou associée à une hypertriglycémie chez 2 individus d'une même famille (75). Cette pathologie coexiste avec d'autres maladies métaboliques telles que

l'obésité ou l'insulinorésistance. Elle se transmet sur un mode de transmission autosomique dominant même si une étiologie oligogénique est de plus en plus décrite. Il existe une contribution de variants rares à large effet associés à des variants fréquents à petit effet en présence de facteurs environnementaux (76). Certains gènes (*USF1*, *TXNIP*) codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides sont associés à cette pathologie.

III. Objectifs

L'objectif de ce travail est la mise en place du diagnostic moléculaire des hypercholestérolémies et hypocholestérolémies familiales au sein du laboratoire de diagnostic moléculaire du service de Génétique Médicale du CHU de Nantes.

IV. Méthodes et matériels

A. Méthodes

1. Validation des méthodes

a. Définition

Le laboratoire de génétique moléculaire (LBM) du CHU de Nantes est accrédité pour le séquençage haut-débit (SHD) en portée B selon la norme NF EN ISO 15189 depuis septembre 2019 (N°8-3293).

D'après cette norme, « Le LBM qui souhaite adapter, à ses besoins, des méthodes reconnues ou développer ses propres méthodes doit procéder à leur validation. La validation des méthodes reconnues adaptées sera aussi étendue que les modifications apportées le nécessiteront ». Il s'agit de la confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites (ici la détection de variants pathogènes dans le cadre des dyslipidémies familiales). Pour le SHD (77,78), il s'agit d'une validation de méthode qualitative basée sur des données quantitatives (détection de la présence d'une variation qualitative de séquence nucléotidique par rapport à une séquence de référence). En effet, le pourcentage de lectures alignées, la couverture d'une région génomique et la profondeur de lecture sont notamment mesurées.

b. Portée d'accréditation

Une portée d'accréditation représente l'énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité. Il existe 2 types de portées :

- portée A flexible standard : utilisation de méthodes reconnues
- portée B flexible étendue : utilisation de méthodes adaptées ou développées en interne.

Par conséquent, afin de mettre en place cette technique de SHD dans le cadre des dyslipidémies familiales, une validation des méthodes selon une portée de type B (flexible étendue) est effectuée. En effet, une portée B est choisie pour 2 raisons principales : le SHD au laboratoire de génétique moléculaire est déjà accrédité selon une portée B et cette dernière permet de réaliser des changements (ex : modification de la conception d'un panel de gènes).

c. Mise en place d'une validation des méthodes

Afin de respecter les exigences de la norme dans le cadre d'une validation des méthodes, différents points doivent être traités :

- description du processus analytique : description des étapes entre la prise en charge du prélèvement jusqu'au compte-rendu final
- choix de la méthode utilisée (performances analytiques)
- analyse bibliographique : critères attendus de performances, limites d'acceptabilité
- analyse des points critiques et maîtrise des risques
- plan d'expérience : définition des critères de performance
- résultats : analyse et exploitation des tests réalisés.

2. Critères qualité

Les critères qualité représentent des paramètres nécessaires et préalables à la validation de toute série de séquençage. Ils garantissent une confiance dans l'interprétation et l'exploitation des données générées par le SHD.

a. Critères de qualité du séquençage

Les séries de validation seront caractérisées à l'aide de différents paramètres qualité (Tableau 8) pendant et à la fin du séquençage sur le séquenceur NextSeq 550 (Illumina®). Ces différents critères représentent des indicateurs de suivi du SHD.

Tableau 8 : Critères qualité en sortie du séquenceur et leurs seuils attendus

Critères qualité	Définition	Seuils d'acceptabilité
Densité de <i>clusters</i> (K/mm ²)	Estime la saturation de la cellule de séquençage	170-230
<i>Cluster passing filter</i> (%)	Pourcentage de <i>clusters</i> franchissant le filtre de pureté déterminé par Illumina® (qualité des images)	>80
Q30 (%)	Indice de qualité des bases. Probabilité d'une définition des bases erronée. Q30 : une chance sur 1000 d'avoir une base erronée	>75 (2x150pb) >80 (2x75pb)

b. Critères qualité de l'alignement des lectures

La qualité des lectures générées et leurs alignements le long du génome de référence sont caractérisés par différents critères résumés dans le Tableau 9. Les seuils attendus sont définis selon les valeurs observées au laboratoire de génétique moléculaire sur SHD en panel avec les sondes de capture IDT™ (*Integrated DNA Technologies*).

Tableau 9: Critères qualité de l'alignement des lectures

Critères qualité alignement	Définition	Seuils d'acceptabilité
Nombre de séquences (millions)		NA
Séquences alignées %	Vérification de l'alignement sur le génome de référence	>90
<i>On-target</i> %	Vérification de l'alignement des lectures selon les régions génomiques définies dans le fichier bed (<i>Browser Extensible Data</i>). Spécificité	60-70
Duplicats %	Différentes lectures correspondant à la même séquence nucléotidique : introduction de faux positifs et surestimation de la couverture et de la fréquence allélique des variants	10-20
Transition/Transversion Ts/Tv	Qualité des SNP issus du séquençage	0.5-2
Couverture moyenne X	Nombre de lectures couvrant les régions génomiques définies dans le fichier bed	>30
<i>Fold80 base penalty</i>	Uniformité de la couverture	1-2

La couverture globale des régions capturées, y compris les régions répétées et les homopolymères, est analysée.

3. Critères de performance

Les critères de performance à vérifier selon les recommandations de la norme NF EN ISO 15189 et des recommandations de l'ANPGM (groupe de travail NGS-Diag de l'Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire) dans le cadre d'une validation de méthodes sont définis dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Définition des critères de performance

Critères de performance	Définitions
Spécificité analytique	Reflète de l'exactitude avec détection des faux-positifs (spécificité) et faux négatifs (sensibilité) générés en phase analytique (<i>wet-lab</i>) ou bioinformatique (<i>dry-lab</i>)
Sensibilité diagnostique	
Répétabilité	Analyse d'un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage, dans un délai le plus court possible.
Reproductibilité (fidélité intermédiaire)	Analyse d'un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs suivants : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, l'étalonnage.
Exactitude	Etalement de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande
Limite de détection	Seuil de positivité pour la détection des variants en phase bioinformatique
Contamination inter-échantillon	Etude de contamination entre les différents échantillons (inter et intra-série)
Stabilité des réactifs	Utilisation des réactifs selon les préconisations du fournisseur
Comparaison des méthodes	Comparabilité des résultats à l'aide d'une autre méthode (ici séquençage Sanger)

4. Plan d'expérience

Le plan d'expérience figure en Annexe 3 et définit les critères d'acceptabilité à valider selon les différents critères de performance. Ces seuils d'acceptabilité doivent être validés avant le passage en routine de la technique.

5. Gestion d'une portée flexible

Dans le cadre d'une gestion de portée flexible, la maîtrise des éléments suivants doit être précisée :

- Achats (cahier des charges ...)
- Processus pré-analytique (prélèvement, tube, condition de transport)
- Processus analytique (méthodes)
- Formation/habilitation du personnel
- Contrôles internes et évaluation externe de la qualité
- Processus post-analytique : validation des résultats, gestion du compte-rendu
- Intégration dans le programme d'audit interne et dans la revue de direction
- Information aux clients et au COFRAC

L'ensemble de ces éléments est nécessaire lors de la mise en place d'une nouvelle méthode afin de s'assurer de la maîtrise du processus pré-analytique, analytique et post-analytique.

B. Matériels

1. Echantillons témoins

Les échantillons biologiques utilisés dans le cadre de la validation des méthodes sont des ADN transmis par le laboratoire de génétique moléculaire du groupement hospitalier Est à Bron (Dr Mathilde DI FILIPPO). Ces 29 ADN sont issus de patients pour lesquels un variant pathogène a été identifié dans le cadre d'une recherche d'hypocholestérolémie ou d'hypercholestérolémie familiale après recueil du consentement éclairé du patient. Le détail des variants d'intérêt retrouvés au sein de ces ADN est résumé dans l'Annexe 4. On retrouve des variants ponctuels mais aussi 11 ADN avec variants en nombre de copie (CNV).

Un ADN humain de référence (NA12981, Coriell) issu d'une lignée cellulaire, caractérisé et standardisé, est également utilisé à l'aide des fichiers de séquences et de variants correspondants (79).

2. Conception du panel de gènes

Le panel a été réalisé selon la version du génome de référence GRCh37/hg18 en collaboration avec le Dr Antoine RIMBERT (équipe de recherche dirigée par le Pr Bertrand CARIOU (Dyslipidemias and lipotoxicity, UMR INSERM 1087, IRS-UN, Nantes) et le Dr Mathilde DI FILIPPO. Il est composé de 12 gènes dits « diagnostic », rendus dans le cadre du diagnostic moléculaire. Les régions exoniques (+/- 25pb) sont capturées et séquencées. Ces 12 gènes présentent un lien de causalité avec les hypercholestérolémies et hypocholestérolémies familiales (Tableau 11).

	Hypercholestérolémies	Hypocholestérolémies
Gènes	<i>LDLR, APOB, PCSK9, APOE, ABCG5, ABCG8, LDLRAP1, LIPA</i>	<i>APOB, PCSK9, ANGPTL3, LIMA1, MTP, SAR1B</i>

Tableau 11 : 12 gènes de diagnostic moléculaire dans le cadre des hypercholestérolémies et hypocholestérolémies familiales

Afin d'assurer l'identitovigilance des ADN des patients, 12 SNP sont sélectionnés pour leur informativité afin de déterminer leur génotype. Ces SNP sont séquencés selon la technique de SNaPshot (miniséquençage ou extension d'amorce) (Applied Biosystems®). Elle permet de détecter un changement nucléotidique (SNP ou mutation) à une position précise.

La validation des méthodes s'effectue uniquement sur cette partie diagnostique.

La conception comporte également une partie recherche avec les régions introniques (dont les régions 5'UTR et 3'UTR) des 12 gènes dits « diagnostic » cités précédemment, 126 gènes dits « recherche » et 432 SNP. Ces gènes de recherche représentent des gènes candidats potentiels impliqués dans les hypocholestérolémies et hypercholestérolémies familiales et faisant partie du panel du laboratoire de génétique moléculaire de Bron (Dr Mathilde DI FILIPPO) et, pour certains, mis en évidence par les travaux de recherche du Dr Antoine RIMBERT (Annexe 5). Les SNP choisis représentent les SNP utilisés pour le calcul du score polygénique (40,80,81) mais aussi des SNP indépendants associés au taux de LDL-c identifiés par les dernières GWAS (études d'association) (82,83).

3. Séquençage haut-débit

Le SHD sur ADN permet différentes options : le séquençage ciblé de gènes (panel), le séquençage de l'exome (séquences codantes) et le séquençage du génome entier. L'exome est la technique de choix dans la mise en évidence de variants sur des gènes non encore décrits

comme responsables de pathologie alors que le génome permet de détecter les variants présents sur les régions à la fois codantes et non-codantes. Le panel, quant à lui, permet de cribler directement les gènes impliqués dans une pathologie donnée. Ces différentes technologies sont largement utilisées dans le diagnostic moléculaire des hypercholestérolémies (84).

Suite à une étude intégrant le nombre et la taille des gènes à tester (taille du panel : 1Mb), le coût de ces différentes technologies, le nombre de patients attendus, le choix s'est porté sur un panel de gènes. Différents fournisseurs se partagent actuellement le marché. Suite à un appel d'offres, la société Twist Bioscience® a été choisie. Grâce à sa technologie d'impression sur silicium, elle synthétise des sondes double-brin biotinylées avec une uniformité de capture prometteuse.

a. Préparation des bibliothèques de fragments

La préparation des bibliothèques de fragments débute par une fragmentation enzymatique de l'ADN en segments selon une taille définie par l'opérateur. Les extrémités de ces fragments sont réparées *via* un processus de phosphorylation (*end-repair*) suivie d'ajout à l'extrémité 3' de dAMP (*A-tailing*) afin d'éviter la concatémérisation et permettre la ligation d'adaptateurs universels. Ces adaptateurs universels permettent le séquençage des fragments d'ADN et la fixation d'UDI (*unique dual indexes*). Les UDI permettent l'identification de l'ADN selon une séquence de 10 pb, spécifique à chaque échantillon (Figure 27).

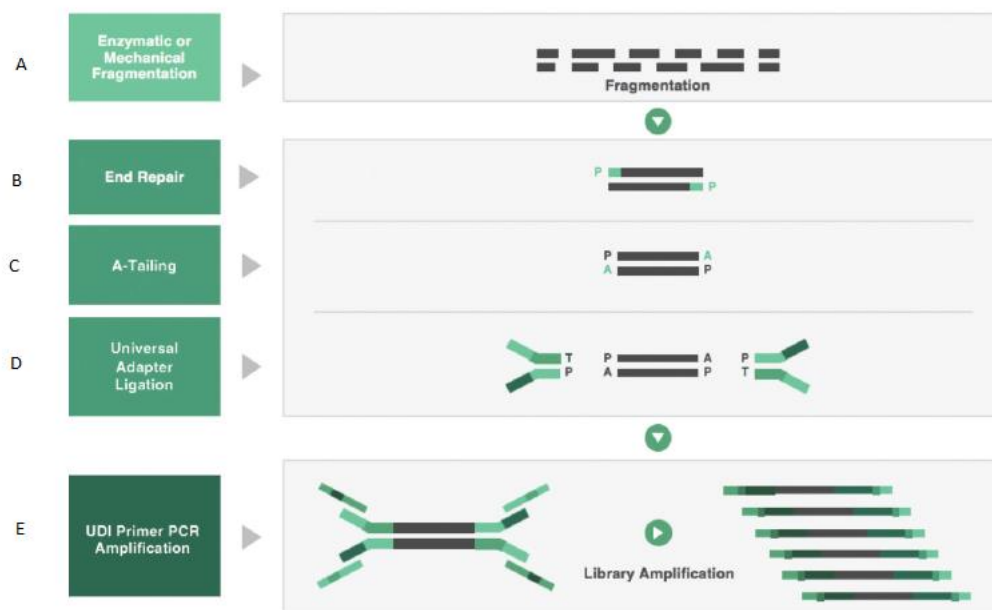


Figure 27 : Préparation des bibliothèques de fragments selon la technologie Twist Bioscience®

A : fragmentation enzymatique

B et C : *End-repair* et *A-tailing* D : Ligation des adaptateurs universels E : Ligation des UDI

b. Capture ou enrichissement de séquence

Les bibliothèques de fragments sont ensuite rassemblées par 8 échantillons. Les sondes d'ADN double-brin biotinylées peuvent ensuite s'hybrider au niveau des régions d'intérêt qui seront capturées par les billes de streptavidine. Les sondes d'amplification sont ajoutées, en vue du séquençage haut-débit.

c. Génération des clusters et séquençage haut-débit

Après dénaturation, la bibliothèque de fragments est chargée sur la cellule de séquençage *Mid-output* (surface de verre) du séquenceur NextSeq550 (Illumina®) en vue de son amplification « en ponts » avec la génération de clusters. Le séquençage s'effectue sur des millions de clusters simultanément, grâce à une chimie de terminateurs réversibles marqués par fluorescence.

A la suite du SHD, les données de séquençage générées (fichiers fastq) sont prises en charge par un système d'analyse bioinformatique permettant à la fois l'alignement des séquences et l'annotation des variants mais aussi une mise en évidence simplifiée des variants retrouvés.

4. Analyse bioinformatique

a. Processus d'analyse bioinformatique

Le logiciel d'analyse bioinformatique sélectionné lors de l'appel d'offres est un logiciel fourni par la société SeqOne®. Le processus d'analyse bioinformatique fonctionne selon l'enchaînement d'outils ci-dessous (Figure 28).

Après un contrôle qualité du fichier fastq (1), les séquences obtenues (lectures ou *reads*) sont alignées selon le génome de référence GRCh37(hg19) (2) *via* BWA (*Burrows-Wheeler Aligner*) et Minimap2, avec identification des amorces de séquençage et des duplicats (3) pour aboutir à la formation des fichiers BAM (*Binary Sequence Alignment/Map*). Les variants sont appelés par GATK4 (*Genome Analysis Toolkit*) et FreeBayes (4). En parallèle, la détection d'éléments mobiles s'effectue à l'aide d'Alumei (5). On obtient un fichier VCF (*Variant Call Format*), annoté par VEP (*Variant Effect Predictor*) (6).

L'interprétation de ce fichier, et par conséquent des variants retrouvés, est réalisée à l'aide d'une interface visuelle et intuitive. L'environnement d'interprétation est représenté en Figure 29. Il existe également un onglet spécifique à l'interprétation des CNV (variations en nombre de copie). Il permet la visualisation des délétions et duplications selon un découpage par taille de 300 pb (Figure 30).

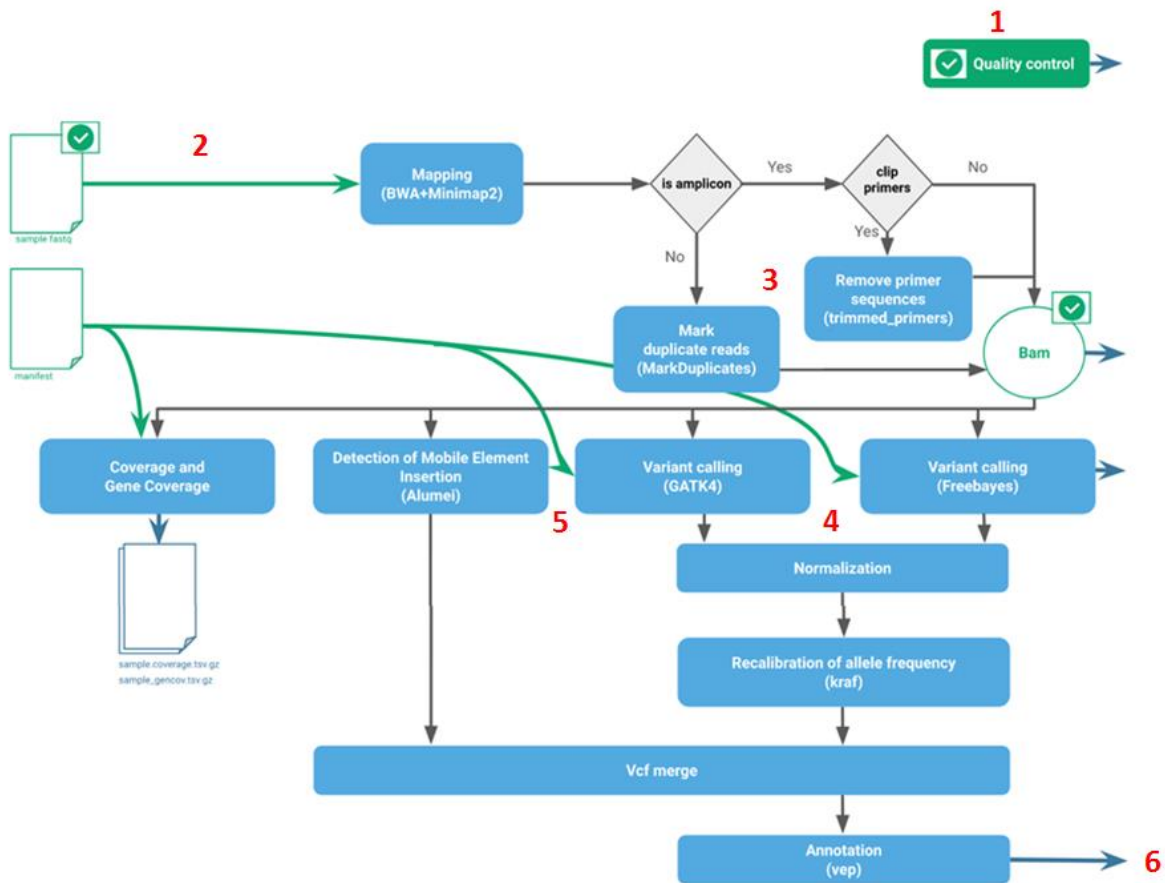


Figure 29 : Processus d'analyse bioinformatique de la plateforme SeqOne®

1 : contrôle qualité des fastq

2-3 : alignement sur le génome de référence et mise en évidence des duplicats et des primers : génération des fichiers BAM

4-5 : annotation des variants et des éléments mobiles : génération du fichier VCF

6 : annotation par VEP : génération du fichier VCF annoté

GermlineVar - 8018-2_S16 Reporting - validated
by chu_nantes_mg from August 6, 2020, 12:27

Results Gene Coverage 28 121 Variants CNVs Evaluations Files

Evaluations Edit report

Commented only 2

Filters Select profile

Sample Annotation Phenotype

Coverage A

Alternate Observations 1

Quality 1

F/R equilibration score 1

Allele Strand Ratio 1

Allele Frequency 1

Genotype 1

Sample frequency Beta

Seqone rank C Locus

Variants 1684 / 1684

	ACMG D	VKB	Gene	Transcript	NA Mutation	AA Mutation	Impact	Effect	Transmission	Databases
12	3	New	PNPLA2	NM_020376.3	c.1119C>G	p.I373M	Moderate	missense variant	[AR]	omim
1	3	New	LRP1	NM_002332.2	c.12038+2T>G		High	splice donor variant	[AR]	omim
2	3	New	LRP1	NM_002332.2	c.2798-2A>C		High	splice acceptor variant	[AR]	omim
2	3	New	LRP1	NM_002332.2	c.3819C>A	p.F1273L	Moderate	missense variant	[AR]	omim
1	3	New	CMT6	NM_017801.2	c.187A>G	p.T63A	Moderate	missense variant	N/A	dbnsnp omim
6	3	New	NAPA	NM_003827.3	c.421-2A>C		High	splice acceptor variant	N/A	omim
1	3	New	LRP1	NM_002332.2	c.11323G>C	p.D3775H	Moderate	missense variant	[AR]	dbnsnp omim
6	3	New	PNPLA2	NM_020376.3	c.152T>G	p.L51R	Moderate	missense variant	[AR]	omim
3	3	New	ZNF233	NM_181756.2	c.1983_1984del	p.L662CfsTer44	High	frameshift variant	N/A	
11	3	New	PNPLA2	NM_020376.3	c.758-8A>C		Low	splice region variant intron variant	[AR]	omim
2	3	New	LRP1	NM_002332.2	c.3794-7A>C		Low	splice region variant intron variant	[AR]	omim
4	3	New	SF3B4	NM_005850.4	c.981A>C	p.P327*	Low	synonymous variant	[AD]	omim
1	3	New	LRP1	NM_002332.2	c.12034A>C	p.R4012*	Low	synonymous variant	[AR]	omim

Figure 28 : Interface d'interprétation – SeqOne®

A : Filtrage des variants

B : Détail des variants (nomenclature nucléotidique, protéique, impact protéique, base de données, fréquence allélique)

C : Classe de pathogénicité du variant selon le score de l'ACMG (American College of Medical Genetics)

D : Priorisation du variant selon l'intelligence artificielle développée par SeqOne®

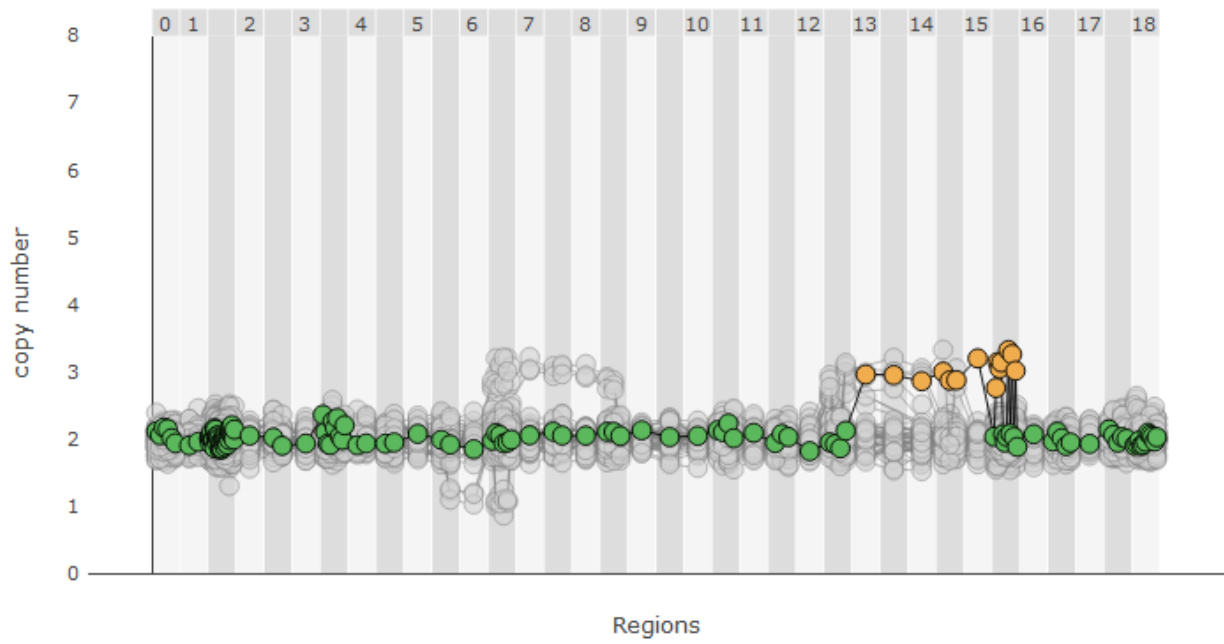


Figure 30 : Représentation des variants en nombre de copies en fonction des régions exoniques et introniques : Exemple du *LDLR*
 Mise en évidence d'une duplication de l'exon 13 à l'intron 15 du *LDLR*

V. Résultats

Les séries de validation des méthodes ont été effectuées selon le plan d'expérience défini et les résultats sont présentés ci-dessous à partir des critères qualité et des critères de performance définis précédemment.

A. Série 1 et Série 1-bis de validation

Les séries 1 et 1-bis correspondent respectivement aux mêmes échantillons témoins, à la différence près de la taille des fragments générés lors de la fragmentation (300 pb et 150 pb pour la Série 1 et la Série 1-bis). Les résultats sont présentés dans le Tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12 : Critères qualité et critères de performance des Séries 1 et 1-bis de validation

	Série 1 (300pb)	Série 1-bis (150pb)
METRIQUES QUALITE DU SEQUENCAGE		
- Densité des <i>clusters</i> (K/mm ²)	260	232
- <i>Cluster passing filter</i> (%)	85	90.1
- Q30 (%)	84.1	93.4
METRIQUES QUALITE ALIGNEMENT		
- Nombre de séquences (millions)	7.58±1.00	7.4±1.01
- Séquences alignées (%)	99.97±0.01	74±0.00
- <i>On-target</i> (%)	31.75±0.34	29.84±0.37
- Duplicats (%)	3.34±0.31	3.56±0.3
- Ts/Tv	1.30±0.06	1.35±0.06
- Couverture moyenne (X)	290.45±40.13	143.9±19.87
- ≥10X	99.88±0.12	99.84±0.11
- ≥30X	99.76±0.14	99.51±0.16
- ≥50X	99.59±0.18	98.81±0.59
- ≥100X	98.76±0.97	88.09±10
- <i>Fold-80 base penalty</i>	1.3	1.3
CRITERES DE PERFORMANCE		
- Spécificité analytique et sensibilité diagnostique	Validation	Validation
- Répétabilité	Validation	Validation
- Exactitude	Validation	Validation
- Contamination inter-échantillon	Validation	Validation

En vert : métriques validant le seuil d'acceptabilité

En rouge : métriques ne validant pas le seuil d'acceptabilité

En dehors de la densité de *clusters* et du pourcentage de *on-target*, les différents critères et les critères de performances sont validés.

VI. Discussion

A. Critères qualité du séquençage

En sortie de séquenceur NextSeq550, l'analyse de ces critères permet d'évaluer la qualité du séquençage et des lectures générées.

- Densité de *clusters*

La densité de *clusters* est un facteur important pour optimiser la qualité et le rendement des données. Lors des séries de validation, la densité de *clusters* est légèrement supérieure à la valeur attendue. L'ADN injecté est en surabondance. Entre la Série 1 et le Série 1-bis de validation, l'ADN injecté est diminué de 1.6 à 1.3 pmol/μL comme l'atteste la diminution de densité de *clusters* entre ces 2 séries.

- Cluster passing filter

Le pourcentage de *clusters* passant le filtre de pureté Illumina® pour les 2 séries de validation garantit une qualité des données et des images analysées.

- Q30

L'indice de qualité des bases (Q30) indique une confiance dans les bases lues par le séquenceur lors des 2 séries de validation. D'après la Figure 31, une diminution du Q30 à l'extrémité des lectures est observée. En effet, plus la taille des lectures demandées est importante, plus le Q30 aura tendance à diminuer à cause des limitations de la chimie.

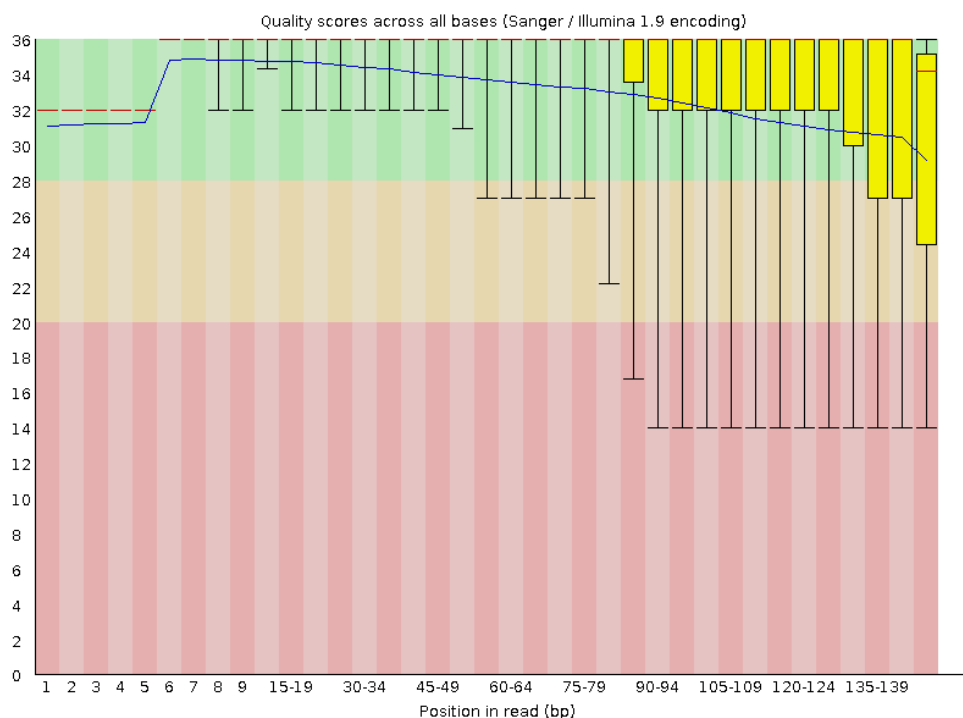


Figure 31 : Indice de qualité des bases (Q30) en fonction de la longueur des lectures

Les paramètres qualité du séquençage sont conformes et permettent ainsi une exploitation des résultats de la validation de méthodes.

B. Critères de performances

Chaque critère de performance est validé en fonction des seuils définis dans le plan d'expérience.

- Spécificité, sensibilité, répétabilité, reproductibilité intermédiaire, exactitude

La concordance est de 100% (pas de faux positif ou de faux négatif analytique détecté) pour les variants ponctuels, les indels (insertions, duplications, délétions et délétions/insertions) et les CNV, y compris au sein des régions difficiles (*APOE*), des régions répétées et des homopolymères.

Nous avons appliqué les recommandations européennes pour l'harmonisation des tests moléculaires à travers l'Europe (78) ainsi que celles pour l'Amérique du Nord (85), pour sélectionner les variants d'intérêt afin qu'ils représentent la diversité des variants (ponctuels/structuraux) retrouvés dans le panel de gènes pour le criblage moléculaire des dyslipidémies familiales.

De même, le nombre d'échantillons utilisés (n=30 dont un ADN issu d'une lignée cellulaire caractérisée) avec un nombre conséquent de variants à vérifier offre une puissance suffisante pour évaluer la spécificité et la sensibilité de la technique.

- Contamination inter-échantillons

Sur les 2 séries, aucune contamination (absence de données sur les fichiers fastq) n'a été mise en évidence. Ainsi, on s'affranchit d'une erreur de pipetage mais également de réactifs contaminés par un ADN.

- Comparaison des méthodes

Cette comparaison des méthodes s'effectue par séquençage Sanger et a permis de confirmer les variants d'intérêts.

Par conséquent, la validation des méthodes est conforme. Les éléments listés dans le paragraphe IV.A.5 Gestion d'une portée flexible devront être mis en place avant le passage en routine du SHD.

C. Choix de la cellule de séquençage

1. Couverture globale

Selon les recommandations du COFRAC et de l'ANPGM, une couverture minimale de 30X des régions d'intérêt permet la détection des variations ponctuelles et des petites insertions/délétions. Par ailleurs, une couverture minimale de 50X permet la détection des variants en nombre de copie (CNV). Ces critères sont vérifiés pour les deux séries et garantissent une détection optimale des variants ponctuels et en nombre de copies.

La diminution de moitié de couverture entre la Série 1 et la Série 1-bis s'explique par la différence de taille des fragments générés (150pb vs 75pb).

2. Choix de la fragmentation

La cellule de séquençage utilisée pour le séquençage 2x75pb a un coût moindre par rapport à celle du séquençage en 2x150pb. De plus, le séquençage en 2x75pb nécessite une durée de séquençage (16h environ) plus faible par rapport à celle du séquençage en 2x150pb.

Toutefois, l'analyse fine et précise de la couverture à 30X des différentes régions d'intérêts met en évidence certaines régions génomiques où la couverture est proche du 30X. Dans ce cas, la crainte est d'avoir à effectuer une grande quantité de séquençage Sanger de confirmation dès que la couverture chutera en deçà des 30X et de ne pas détecter certains CNV.

Le séquençage *paired-end* (double brin) 2x150pb est donc sélectionné afin de garantir une couverture optimale au niveau des régions d'intérêt.

D. Evaluation de la technologie Twist Bioscience®

1. Taux de duplicats et *fold-80 base penalty*

Le taux de duplicats et le *fold-80 base penalty* sont très satisfaisants.

En effet, le taux de duplicats est faible (3-4%), en comparaison avec les taux de duplicats observés par SHD au laboratoire (sondes *Integrated DNA Technologies* IDT™) autour de 15-20%. De même, l'uniformité de capture, atout majeur des sondes Twist Bioscience®, est vérifiée avec un *fold-80 base penalty* autour de 1.3-1.4. L'ensemble des sondes capture uniformément les régions d'intérêt.

Différentes explications justifient ces faibles taux (86):

- les sondes, sous leur forme double-brin, augmentent l'efficacité d'hybridation à la bibliothèque de fragments et limitent la formation de dimères
- après leur synthèse, les sondes subissent un contrôle qualité afin de vérifier l'efficacité de capture
- les UDI associés aux adaptateurs universels diminuent le nombre de cycles de PCR et augmentent le rendement d'amplification.

2. Intérêts de la technologie Twist Bioscience®

Le protocole Twist Bioscience® présente des performances en accord les recommandations des sociétés savantes sur les critères de validation de SHD en panel. Le pourcentage de *cluster passing filter*, de Q30 et de couverture à 30X est concordant avec les valeurs retrouvées dans une étude de 2014 sur une évaluation d'un panel de 73 gènes associés aux dyslipidémies familiales (LipidSeq, panel de 700kb) (87)).

Le protocole Twist Bioscience® est réalisé manuellement en 2 à 3 jours. En effet, il nécessite moins d'étapes de lavages notamment, que le protocole utilisé pour nos autres panels à façon (sondes *Integrated DNA Technologies IDT™*). Par ailleurs, le protocole de préparation des bibliothèques de fragments est compatible avec une automatisation, permettant ainsi une homogénéisation de cette préparation, une diminution du risque d'erreurs de pipetage, de contamination et un gain de temps.

3. Limites du design

a. Couverture et hypervariabilité

- Couverture

Certaines régions génomiques sont difficiles à séquencer en raison d'un fort pourcentage en GC, de séquences répétées ou la présence d'homopolymères (couverture <30X). C'est notamment le cas dans la région 3'UTR du *LDLR* (Figure 32) où la présence d'homopolymères A et G associés à un taux élevé de CG est observée.

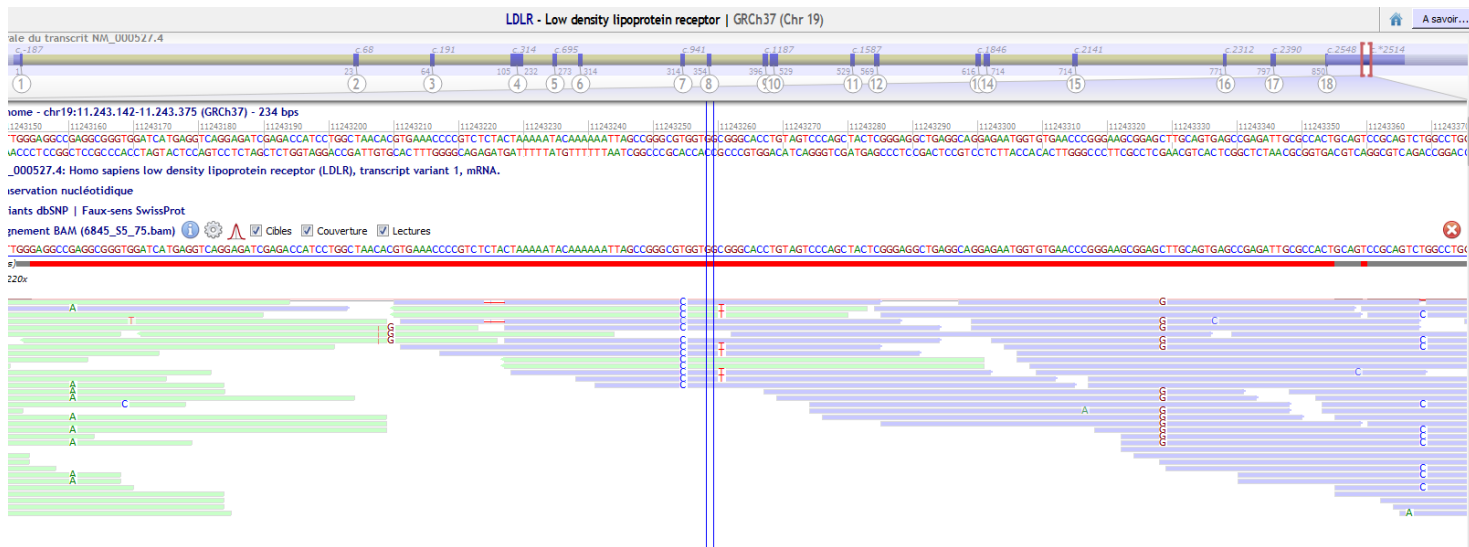


Figure 32 : Région 3'UTR du *LDLR* avec une couverture inférieure à 30X

Ces régions doivent être connues et répertoriées afin de ne pas méconnaître les zones difficiles à capturer et séquencées.

Par ailleurs, le *LDLR*, (Figure 33A) gène majeur du panel, dispose d'une hétérogénéité de capture, en comparaison avec les autres gènes du panel (ex : *APOB* Figure 33B).

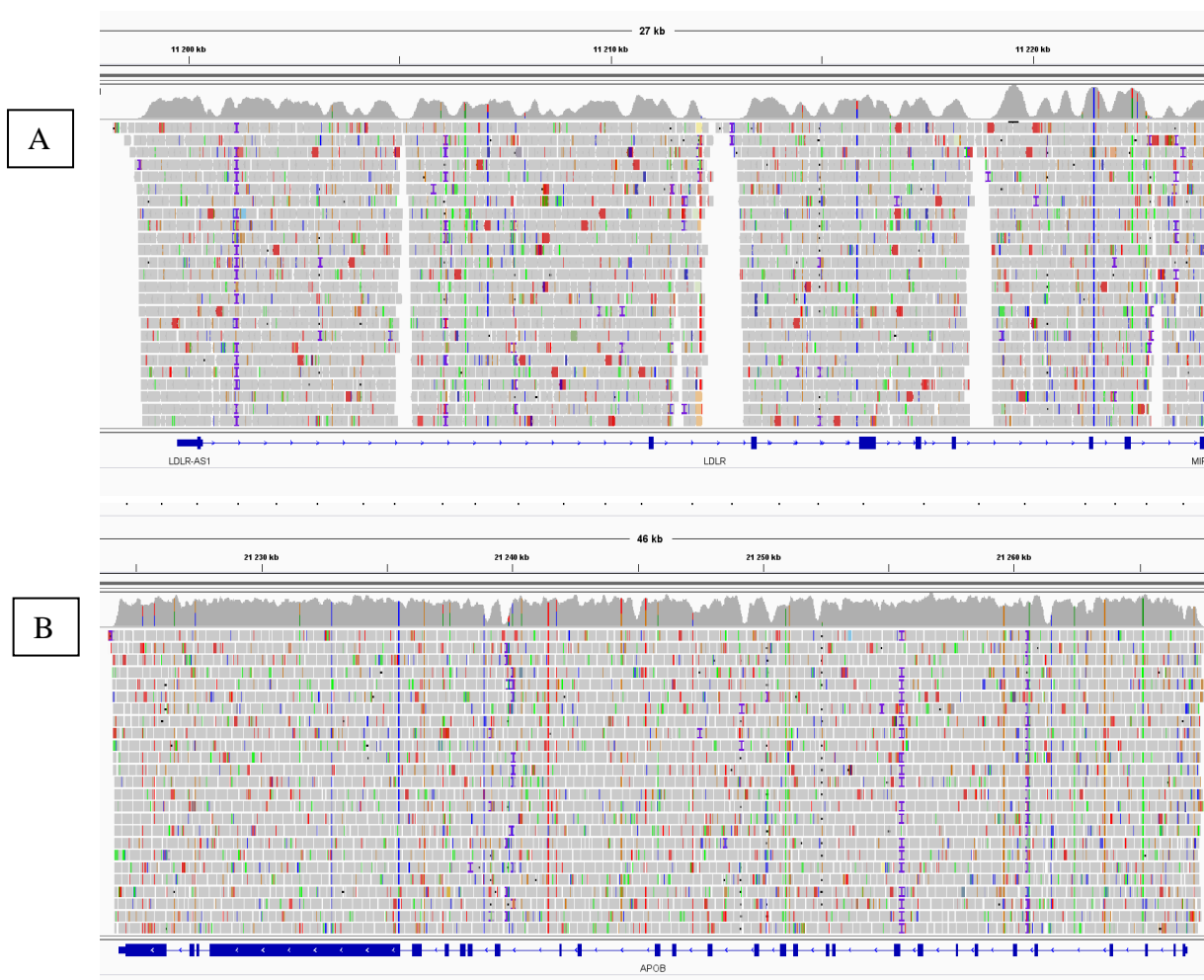


Figure 33 : Représentation de la couverture de 2 gènes diagnostic du panel

A : *LDLR*

B : *APOB*

On observe des chutes de couverture au niveau du *LDLR* en raison de la présence de nombreuses régions difficiles à séquencer qui sont des points de cassure potentiels ou l'on retrouve d'ailleurs un grand nombre de CNV décrits. Par conséquent, il apparaît indispensable d'enrichir ce gène en sondes afin de limiter l'hétérogénéité de couverture.

b. Analyse du *off-target*

Le *off-target* (%) représente la proportion de lectures générées en dehors du design initial. Pour les 2 séries de validation, il se situe autour de 30%. Cette valeur est faible en comparaison des valeurs observées sur nos panels de routine (70%).

Suite à une analyse du *off-target*, différentes causes sont identifiées :

- La conception du panel réalisé par Twist Bioscience® comprend des sondes (n=194) s'hybridant sur des régions répétées et homologues du génome (au niveau des introns le plus souvent) et générant du *off-target*
- des régions génomiques aspécifiques sont capturées (ex : *ZNF439*, *ZNF440*) alors qu'elles ne figurent pas sur le panel (Figure 34A) mais ont une forte homologie avec des séquences du panel
- des régions génomiques aspécifiques non capturées sont visibles et créent un bruit de fond, pouvant être significatif avec une couverture autour de 50-100X (Figure 34B).

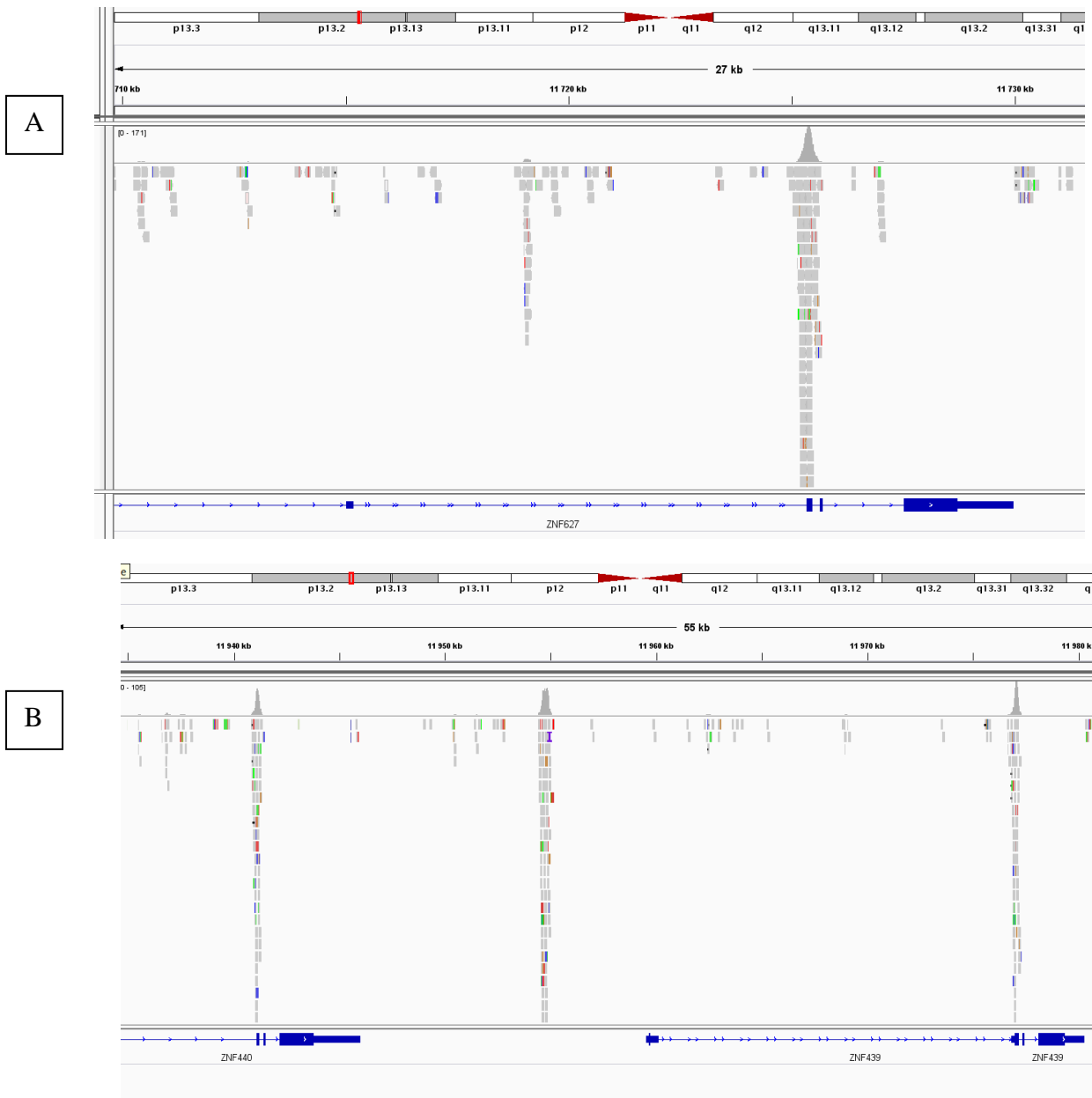


Figure 34 : Etude du *off-target*

A : Régions génomiques aspécifiques capturées

B : Régions aspécifiques non capturées

A la vue de ces résultats, une nouvelle conception du panel est demandée à la société Twist Bioscience® afin d'améliorer ces paramètres et d'optimiser la capture. Un enrichissement en sondes du *LDLR* est demandé pour obtenir une capture uniforme de ce gène. De plus, les 194 sondes générant le *off-target* seront ôtées ou décalées si la région génomique est indispensable. Les 3 gènes recherche (*ZNF101*, *ZNF229*, *ZNF233*) seront retirés du nouveau panel afin de limiter la capture des régions homologues de ces gènes.

Une revue du protocole sera rigoureusement effectuée avec identification des étapes et paramètres critiques afin de limiter la capture aspécifique (hybridation des sondes et température du thermocycleur).

E. Evaluation de la solution bioinformatique SeqOne®

1. Intérêts

Cette solution bioinformatique permet la visualisation et l'interprétation des variants facilement à l'aide de liens aux différentes bases de données internationales (gnomAD, ClinVar, Varsome). La prise en main est facilitée par un accompagnement réactif du support informatique. Le processus d'analyse et ses mises à jour sont transmis à l'utilisateur afin de garantir une transparence pour l'interprétation des variants (avec un système d'alerte s'il y a une reclassification d'un variant). Un dialogue permanent avec les bioinformaticiens de SeqOne® permet de transmettre des suggestions afin d'améliorer l'ergonomie du logiciel et son utilisation. Cette plateforme est également modulable car elle permet également d'intégrer nos propres algorithmes bioinformatiques. Ainsi, l'analyse du témoin positif, l'identitovigilance ou le calcul du score polygénique peuvent être générés automatiquement. Enfin, la génération d'un rapport de validation à la suite de chaque série de validation représente une aide précieuse à la validation des méthodes.

2. Limites

Les points de cassures des CNV introniques ne sont pas signifiés en position génomique. En effet, la détection des CNV étant réalisé par segments de 300pb, il est impossible de déterminé exactement le point de cassure.

Néanmoins, la visualisation sur un logiciel type IGV (*Integrative Genomics Viewer*) peut permettre d'identifier ces points de cassures à l'aide du positionnement des fragments de lectures.

VII. Perspectives

A. Diagnostic moléculaire au laboratoire

La mise en place du diagnostic moléculaire des hypocholestérolémies et hypercholestérolémies au laboratoire du CHU de Nantes est conforme selon une validation des méthodes en portée B.

Néanmoins, suite à l'analyse des résultats (*off-target* et couverture), un nouveau design est demandé au fournisseur afin d'optimiser l'homogénéité de la capture. Ainsi, deux séries de validation seront effectuées afin de qualifier et de valider ce nouveau panel.

Le passage des premiers patients (cas index) est prévu pour le courant du mois d'octobre, par séries de 48 patients, avec un recrutement local (Nantes et hôpitaux périphériques) et régional dans un premier temps. Le délai entre le prélèvement et les résultats de l'analyse moléculaire devra être inférieur à 6 mois.

Des réunions clinico-biologiques entre le laboratoire et les endocrinologues experts seront mises en place tous les 2 mois afin d'échanger sur les variants retrouvés. Des réunions nationales seront également organisées en lien avec les différents centres de diagnostic moléculaire des dyslipidémies (Bron : Dr Mathilde DI FILIPPO, Paris : Pr Alain CARRIE) afin d'homogénéiser nos pratiques d'interprétation des variants de séquence.

B. Axes de recherche

- 126 gènes recherche

L'étude et l'analyse des variants au sein de ces gènes peuvent permettre l'identification de variants candidats impliqués dans les hypocholestérolémies et les hypercholestérolémies familiales.

- SNP et score polygénique

Le criblage des SNP associés au taux de LDL-c permet notamment de calculer le LDL-c score. Le développement d'un outil bioinformatique facilitera le calcul de ce score polygénique dont l'utilisation en pratique clinique devra être évaluée sur la cohorte nantaise quand elle aura une taille statistiquement significative.

- Régions introniques des 12 gènes de diagnostic

A ce jour, peu de variants introniques profonds sont décrits dans la littérature (88) car, la plupart du temps, ils n'ont pas été recherchés. Le séquençage des régions introniques des 12 gènes de diagnostic sera l'occasion d'étudier et de tester ces variants, même s'il s'agit encore

d'une entreprise difficile et délicate à la lumière de nos connaissances actuelles et des outils à notre disposition. De plus, ces régions introniques permettront également de borner les grands réarrangements.

- Base de données de variants

A l'aide des fichiers VCF, tous les variants seront colligés, au sein d'une base de données bioinformatique développée avec l'aide du Dr Benjamin COGNE au sein du laboratoire. Consultable et requêtable à tout moment, elle permettra d'exploiter les variants retrouvés parmi les gènes du panel dans la cohorte des patients au sein des différentes séries et en regard avec les données des bases de variants internationales.

- Études fonctionnelles

Des études fonctionnelles peuvent être réalisées au sein de l'équipe de recherche dirigée par le Pr Bertrand CARIOU (Dyslipidemias and lipotoxicity, UMR INSERM 1087, IRS-UN, Nantes) afin d'étudier la pathogénicité de variants identifiés au sein de gènes recherche (étude du recyclage du LDL-c à partir d'un prélèvement sanguin périphérique), notamment dans le cadre du consortium mis en place autour du RHU CHOPIN (CHOLesterol Personalized INnovation).

VIII. Conclusion

Le diagnostic moléculaire des dyslipidémies familiales permet la mise en évidence de variants pathogènes expliquant l'absence de protéines ou la formation de protéines anormales impliquées dans le métabolisme du cholestérol. Le plus souvent, un taux élevé de LDL-c est retrouvé, et représente un FDRCV majeur. Ce dernier doit être maîtrisé et abaissé afin de diminuer le risque de morbidité et de mortalité CV du patient. Diagnostic de certitude, le criblage moléculaire de ces pathologies héréditaires permet également de réaliser un dépistage familial afin d'identifier et de prendre en charge précocement les individus à risque CV. A ce jour, il est retrouvé un variant pathogène dans les gènes impliqués dans l'HF chez environ 50% des individus HFhe. La compréhension de la physiopathologie des HF et l'identification de nouvelles voies moléculaires dans le métabolisme du LDL-c permettent également de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients atteints d'HF. Enfin, le diagnostic moléculaire des HBLF permet un suivi et une prise en charge adaptée des patients selon leur risque de stéatose hépatique. Enfin, des variants génétiques communs (calcul du score polygénique) semblent également être impliqués dans les HF et HBLF et nécessitent des investigations supplémentaires afin d'être utilisés dans le cadre du diagnostic moléculaire de ces pathologies.

Bibliographie

1. Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe — epidemiological update 2015. *Eur Heart J*. 21 oct 2015;36(40):2696-705.
2. CVD_WHO_2012.pdf.
3. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. juill 1961;55:33-50.
4. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the Epidemiology of Cardiovascular Diseases: A Historical Perspective. *Lancet*. 15 mars 2014;383(9921):999-1008.
5. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet Lond Engl*. 8 mai 1999;353(9164):1547-57.
6. Motreff DP. Facteurs de risque cardio-vasculaire. 2005;7.
7. guide_aps_chapitre_2_evaluation_du_niveau_de_risque_cardiovasculaire.pdf [Internet]. [cité 18 avr 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-10/guide_aps_chapitre_2_evaluation_du_niveau_de_risque_cardiovasculaire.pdf
8. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55 000 vascular deaths. *The Lancet*. 1 déc 2007;370(9602):1829-39.
9. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 1 juin 2003;24(11):987-1003.
10. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular riskThe Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 1 janv 2020;41(1):111-88.
11. Gofman JW, Lindgren F, Elliott H, Mantz W, Hewitt J, Strisower B, et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. *Sci New Ser*. 1950;111(2877):166-171+186.
12. Goldstein JL, Brown MS. A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. *Cell*. 26 mars 2015;161(1):161-72.
13. Lipoprotéines et métabolisme lipidique [Internet]. Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose | La Santé au Coeur de nos Artères. [cité 13 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.nsfa.asso.fr/professionnels/lipoproteines-et-metabolisme-lipidique/>

14. Hogue J-C. CONTRIBUTION DE LA PROTÉINE DE TRANSFERT DES ESTERS DE CHOLESTÉROL À L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES PARTICULES LDL DANS L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE FAMILIALE HÉTÉROZYGOTE. :94.
15. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 4 avr 1986;232(4746):34-47.
16. Ceroi A, Masson D, Garnache-Ottou F, Saas P. Un nouvel éLiXiR pour les cellules dendritiques plasmocytoïdes leucémiques ou dérégulées dans les pathologies inflammatoires. *médecine/sciences*. mars 2017;33(3):345-8.
17. Bonetti Piero O., Lerman Lilach O., Lerman Amir. Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 févr 2003;23(2):168-75.
18. Steinberg Daniel, Witztum Joseph L. Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 déc 2010;30(12):2311-6.
19. Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res*. avr 2009;50(Suppl):S282-6.
20. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. mai 2011;473(7347):317-25.
21. Ference BA, Graham I, Tokgozoglul L, Catapano AL. Impact of Lipids on Cardiovascular Health: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol*. 4 sept 2018;72(10):1141-56.
22. NOUVEAUTÉS 2016 EN DYSLIPIDÉMIE | Louvain Médical [Internet]. [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.louvainmedical.be/fr/article/nouveautes-2016-endslipidemie>
23. Bittar R, Pierrat G, Koujah N, Poignon C, Cherfils C, Fesel-Fouquier V, et al. Électrophorèse des lipoprotéines sériques (lipoprotéinogramme) par le kit Hydragel Lipo + Lp(a)[®] (Sebia) : évaluation de la coloration au Fat Red 7B. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 janv 2020;78(1):17-26.
24. Ramasamy I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin Chim Acta*. févr 2016;454:143-85.
25. abc-264950-1146-a_propos_de_deux_cas_dhypercholesterolemie_massive-valeyre-u.pdf [Internet]. [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: https://www.jle.com/download/abc-264950-1146-a_propos_de_deux_cas_dhypercholesterolemie_massive-valeyre-u.pdf
26. Garcia-Garcia A-B, Ivorra C, Martinez-Hervas S, Blesa S, Fuentes MJ, Puig O, et al. Reduced penetrance of autosomal dominant hypercholesterolemia in a high percentage of families: importance of genetic testing in the entire family. *Atherosclerosis*. oct 2011;218(2):423-30.
27. Müller C. Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris. *Acta Med Scand*. 1938;95(S89):75-84.

28. Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med.* 1 sept 1964;37(3):402-7.
29. Varret M, Rabès J-P, Lecerf J-M. Du nouveau dans la génétique de l'hypercholestérolémie familiale. *Corresp En Métabolismes Horm Diabète Nutr.* 2013;6.
30. Mundal Liv, Sarancic Mirza, Ose Leiv, Iversen Per Ole, Borgan Jens-Kristian, Veierød Marit B., et al. Mortality Among Patients With Familial Hypercholesterolemia: A Registry-Based Study in Norway, 1992–2010. *J Am Heart Assoc.* 3(6):e001236.
31. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. *Eur Heart J.* 1 déc 2013;34(45):3478-90.
32. Krempf M. Diagnostic et traitement des hypercholestérolémies familiales (HF) chez l'adulte : recommandations de la Nouvelle société française d'athérosclérose (NSFA) [Internet]. EM-Consulte. [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/816212/article/diagnostic-et-traitement-des-hypercholesterolemies>
33. Sturm AC, Knowles JW, Gidding SS, Ahmad ZS, Ahmed CD, Ballantyne CM, et al. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(6):662-80.
34. Khera AV, Won H-H, Peloso GM, Lawson KS, Bartz TM, Deng X, et al. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 07 2016;67(22):2578-89.
35. Lee S, Akioyamen LE, Aljenedil S, Rivière J-B, Ruel I, Genest J. Genetic testing for familial hypercholesterolemia: Impact on diagnosis, treatment and cardiovascular risk: *Eur J Prev Cardiol* [Internet]. 12 févr 2019 [cité 17 août 2020]; Disponible sur: https://journals-sagepub-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1177/2047487319829746?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
36. Raal FJ, Honarpour N, Blom DJ, Hovingh GK, Xu F, Scott R, et al. Inhibition of PCSK9 with evolocumab in homozygous familial hypercholesterolaemia (TESLA Part B): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet.* 24 janv 2015;385(9965):341-50.
37. Luirink IK, Wiegman A, Kusters DM, Hof MH, Groothoff JW, Groot E de, et al. 20-Year Follow-up of Statins in Children with Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* [Internet]. 16 oct 2019 [cité 13 sept 2020]; Disponible sur: <https://www-nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa1816454>
38. Rabès J-P, Béliard S, Carrié A. Familial hypercholesterolemia: experience from France. *Curr Opin Lipidol.* avr 2018;29(2):65–71.

39. Reeskamp LF, Tromp TR, Defesche JC, Grefhorst A, Stroes ES, Hovingh GK, et al. Next-generation sequencing to confirm clinical familial hypercholesterolemia. *Eur J Prev Cardiol.* 27 juill 2020;204748732094299.
40. Wang J, Dron JS, Ban MR, Robinson JF, McIntyre AD, Alazzam M, et al. Polygenic Versus Monogenic Causes of Hypercholesterolemia Ascertained Clinically. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* déc 2016;36(12):2439-45.
41. Chora JR, Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Analysis of publicly available LDLR, APOB, and PCSK9 variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. *Genet Med.* juin 2018;20(6):591-8.
42. Varret M, Rabès J, Boileau C. L'hypercholestérolémie familiale 25 ans après. I- Défauts du récepteur des LDL. *médecine/sciences.* 1997;13(12):1399.
43. Hadjiagapiou C, Giannoni F, Funahashi T, Skarosi SF, Davidson NO. Molecular cloning of a human small intestinal apolipoprotein B mRNA editing protein. *Nucleic Acids Res.* 25 mai 1994;22(10):1874-9.
44. Taylor A, Wang D, Patel K, Whittall R, Wood G, Farrer M, et al. Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project. *Clin Genet.* juin 2010;77(6):572-80.
45. Elbitar S, Susan-Resiga D, Ghaleb Y, El Khoury P, Peloso G, Stitzel N, et al. New Sequencing technologies help revealing unexpected mutations in Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Sci Rep [Internet].* 31 janv 2018 [cité 12 août 2020];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5792649/>
46. Reiss AB, Shah N, Muhieddine D, Zhen J, Yudkevich J, Kasselmann LJ, et al. PCSK9 in cholesterol metabolism: from bench to bedside. *Clin Sci.* 14 juin 2018;132(11):1135-53.
47. Abifadel M, Varret M, Rabès J-P, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* juin 2003;34(2):154-6.
48. Hopkins PN, Defesche J, Fouchier SW, Bruckert E, Luc G, Cariou B, et al. Characterization of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Caused by PCSK9 Gain of Function Mutations and Its Specific Treatment With Alirocumab, a PCSK9 Monoclonal Antibody. *Circ Cardiovasc Genet.* déc 2015;8(6):823-31.
49. Poirier J, Bertrand P, Poirier J, Kogan S, Gauthier S, Poirier J, et al. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *The Lancet.* 18 sept 1993;342(8873):697-9.
50. Rashidi OM, H.Nazar FA, Alama MN, Awan ZA. Interpreting the Mechanism of APOE (p.Leu167del) Mutation in the Incidence of Familial Hypercholesterolemia; An In-silico Approach. *Open Cardiovasc Med J.* 14 sept 2017;11:84-93.
51. Wintjens R, Bozon D, Belabbas K, MBou F, Girardet J-P, Tounian P, et al. Global molecular analysis and APOE mutations in a cohort of autosomal dominant hypercholesterolemia patients in France. *J Lipid Res.* mars 2016;57(3):482-91.

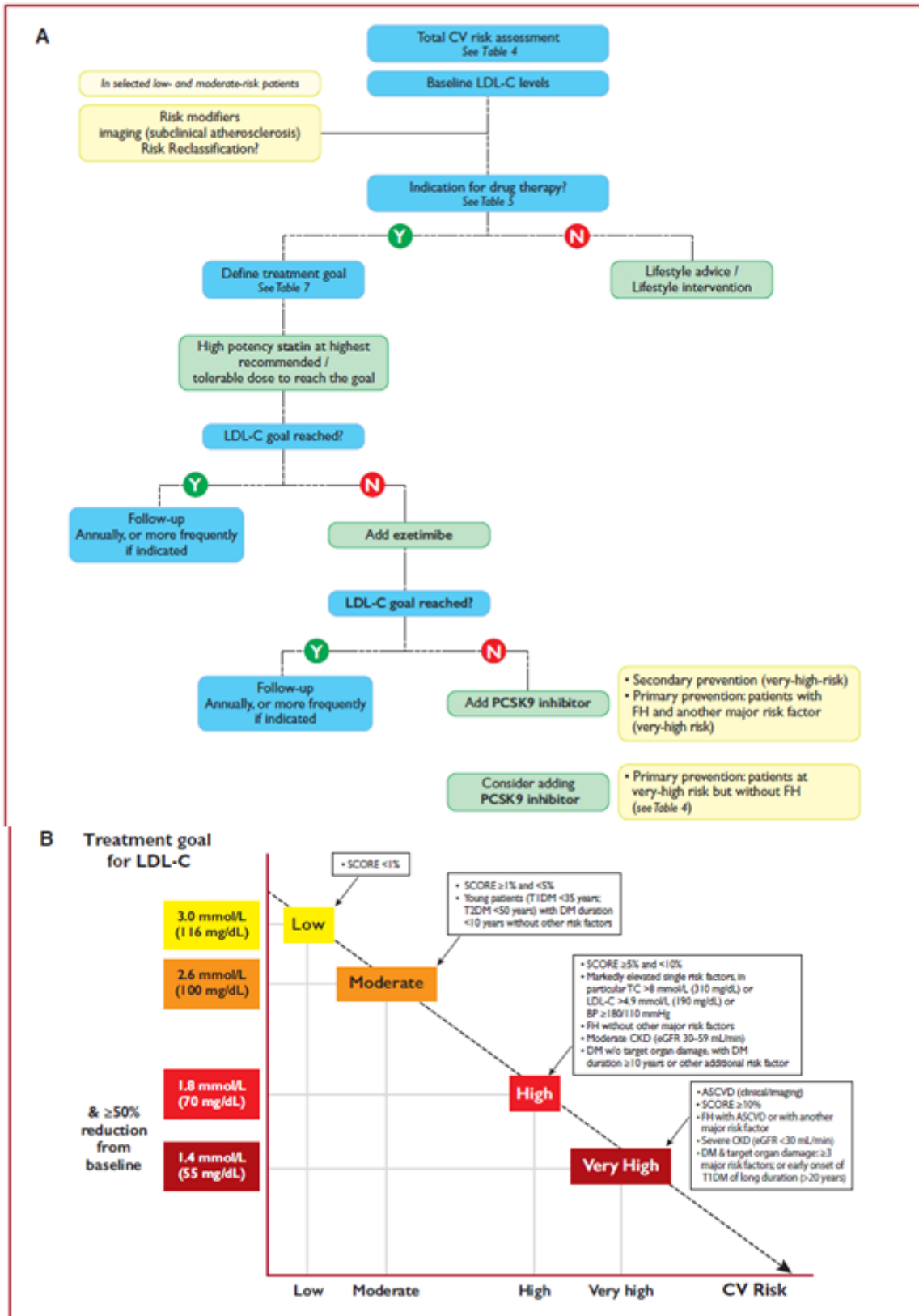
52. Shaik NA, Al-Qahtani F, Nasser K, Jamil K, Alrayes NM, Elango R, et al. Molecular insights into the coding region mutations of low-density lipoprotein receptor adaptor protein 1 (LDLRAP1) linked to familial hypercholesterolemia. *J Gene Med.* 2020;22(6):e3176.
53. Reeskamp LF, Volta A, Zuurbier L, Defesche JC, Hovingh GK, Grefhorst A. ABCG5 and ABCG8 genetic variants in familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 1 mars 2020;14(2):207-217.e7.
54. Futema M, Bourbon M, Williams M, Humphries SE. Clinical utility of the polygenic LDL-C SNP score in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2018;277:457-63.
55. Neil H a. W, Huxley RR, Hawkins MM, Durrington PN, Betteridge DJ, Humphries SE, et al. Comparison of the risk of fatal coronary heart disease in treated xanthomatous and non-xanthomatous heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. *Atherosclerosis.* sept 2003;170(1):73-8.
56. Trinder M, Li X, DeCastro ML, Cermakova L, Sadananda S, Jackson LM, et al. Risk of Premature Atherosclerotic Disease in Patients With Monogenic Versus Polygenic Familial Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 30 juill 2019;74(4):512-22.
57. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, de Jesus JM, Houston Miller N, Hubbard VS, et al. 2013 AHA/ACC Guideline on Lifestyle Management to Reduce Cardiovascular Risk: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 1 juill 2014;63(25, Part B):2960-84.
58. Forouhi NG, Krauss RM, Taubes G, Willett W. Dietary fat and cardiometabolic health: evidence, controversies, and consensus for guidance. *The BMJ [Internet].* 13 juin 2018 [cité 23 avr 2020];361. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6053258/>
59. Mozaffarian D. Natural trans fat, dairy fat, partially hydrogenated oils, and cardiometabolic health: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J.* 1 avr 2016;37(13):1079-81.
60. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease [Internet]. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMoa1615664>. Massachusetts Medical Society; 2017 [cité 24 juill 2020]. Disponible sur: https://www-nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa1615664?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
61. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome | NEJM [Internet]. [cité 24 juill 2020]. Disponible sur: https://www-nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa1801174?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed
62. Cariou B, Challet-Bouju G, Bernard C, Marrec M, Hardouin J-B, Authier C, et al. Prevalence of hypobetalipoproteinemia and related psychiatric characteristics in a psychiatric population: results from the retrospective HYPOPSY Study. *Lipids Health Dis.* 6 nov 2018;17(1):249.

63. Encyclopedia of Movement Disorders. Academic Press; 2010. 1634 p.
64. Tarugi P, Averna M, Di Leo E, Cefalù AB, Noto D, Magnolo L, et al. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: An ENID review. *Atherosclerosis*. 1 déc 2007;195(2):e19-27.
65. Bonnefont-Rousselot D, Condat B, Sassolas A, Chebel S, Bittar R, Federspiel M-C, et al. Cryptogenic cirrhosis in a patient with familial hypocholesterolemia due to a new truncated form of apolipoprotein B. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. janv 2009;21(1):104-8.
66. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, et al. Molecular Characterization of Loss-of-Function Mutations in PCSK9 and Identification of a Compound Heterozygote. *Am J Hum Genet*. sept 2006;79(3):514-23.
67. Cariou Bertrand, Ouguerram Khadija, Zaïr Yassine, Guerois Raphael, Langhi Cédric, Kourimate Sanae, et al. PCSK9 Dominant Negative Mutant Results in Increased LDL Catabolic Rate and Familial Hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 déc 2009;29(12):2191-7.
68. Minicocci I, Santini S, Cantisani V, Stitzel N, Kathiresan S, Arroyo JA, et al. Clinical characteristics and plasma lipids in subjects with familial combined hypolipidemia: a pooled analysis. *J Lipid Res*. déc 2013;54(12):3481-90.
69. Zhang Y-Y, Fu Z-Y, Wei J, Qi W, Baituola G, Luo J, et al. A LIMA1 variant promotes low plasma LDL cholesterol and decreases intestinal cholesterol absorption. *Science*. 8 juin 2018;360(6393):1087-92.
70. Lee J, Hegele RA. Abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: a framework for diagnosis and management. *J Inher Metab Dis*. 2014;37(3):333-9.
71. Shoulders CC, Stephens DJ, Jones B. The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b. *Curr Opin Lipidol*. avr 2004;15(2):191–197.
72. Balder Jan-Willem, Rimbert Antoine, Zhang Xiang, Viel Martijn, Kanninga Roan, van Dijk Freerk, et al. Genetics, Lifestyle, and Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Young and Apparently Healthy Women. *Circulation*. 20 févr 2018;137(8):820-31.
73. Paquette M, Bernard S, Blank D, Paré G, Baass A. A simplified diagnosis algorithm for dysbetalipoproteinemia. *J Clin Lipidol [Internet]*. 10 juin 2020 [cité 6 août 2020]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193328742030204X>
74. Koopal C, Marais AD, Westerink J, Visseren FLJ. Autosomal dominant familial dysbetalipoproteinemia: A pathophysiological framework and practical approach to diagnosis and therapy. *J Clin Lipidol*. 1 janv 2017;11(1):12-23.e1.
75. Mata P, Alonso R, Ruíz-García A, Díaz-Díaz JL, González N, Gijón-Conde T, et al. Hiperlipidemia familiar combinada: documento de consenso. *Aten Primaria*. oct 2014;46(8):440-6.
76. Familial Combined Hyperlipidemia: Current Knowledge, Perspectives, and Controversies | [Internet]. [cité 6 août 2020]. Disponible sur: https://clinicalandtranslationalinvestigation.com/frame_esp.php?id=187

77. GT4_Val_méthode_SHD_ANPGM_15072016.pdf.
78. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet.* déc 2010;18(12):1276-88.
79. Zook JM, Catoe D, McDaniel J, Vang L, Spies N, Sidow A, et al. Extensive sequencing of seven human genomes to characterize benchmark reference materials. *Sci Data.* 7 juin 2016;3(1):160025.
80. Futema M, Shah S, Cooper JA, Li K, Whittall RA, Sharifi M, et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem.* janv 2015;61(1):231-8.
81. Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper JA, et al. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: A case-control study. *The Lancet.* 2013;381(9874):1293-301.
82. Klarin D, Damrauer SM, Cho K, Sun YV, Teslovich TM, Honerlaw J, et al. Genetics of Blood Lipids Among ~300,000 Multi-Ethnic Participants of the Million Veteran Program. *Nat Genet.* nov 2018;50(11):1514-23.
83. Erdmann J, Kessler T, Munoz Venegas L, Schunkert H. A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead. *Cardiovasc Res.* 15 juill 2018;114(9):1241-57.
84. Moldovan V, Banescu C, Dobreanu M. Molecular diagnosis methods in familial hypercholesterolemia. *Anatol J Cardiol.* 2020;23(3):120-7.
85. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* sept 2013;15(9):733-47.
86. ProductSheet_NGS_UniversalAdapters_11Sep19_Rev1.1 (1).pdf.
87. Johansen CT, Dubé JB, Loyzer MN, MacDonald A, Carter DE, McIntyre AD, et al. LipidSeq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *J Lipid Res.* avr 2014;55(4):765-72.
88. Reeskamp LF, Hartgers ML, Peter J, Dallinga-Thie GM, Zuurbier L, Defesche JC, et al. A Deep Intronic Variant in LDLR in Familial Hypercholesterolemia. *Circ Genomic Precis Med.* 2018;11(12):e002385.

Liste des annexes

Annexe 1 : Organigramme d'une prise en charge thérapeutique hypocholestérolémiante (A) et objectifs thérapeutiques du LDL-c (B)	92
Annexe 2 : score DLCN (Dutch Lipid Clinic Network)	93
Annexe 3 : Plan d'expérience et critères d'acceptabilité.....	97
Annexe 4 : Détails des variants d'intérêt des 29 échantillons témoins.....	99
Annexe 5 : 126 gènes recherche.....	100



Annexe 1 : Organigramme d'une prise en charge thérapeutique hypocholestérolémiante (A) et objectifs thérapeutiques du LDL-c (B)

D'après Mach *et al.*, 2019

Antécédents familiaux (maximum 2 points^a)	
Parents du 1 ^{er} degré avec maladie coronarienne précoce ^b	1
Parents du 1 ^{er} degré avec LDL-c \geq 95 ^e percentile pour l'âge, le sexe et le pays	1
Parents du 1 ^{er} degré avec xanthomes tendineux et/ou arc cornéen précoce	2
Enfants < 18 ans avec LDL-c \geq 95 ^e percentile pour l'âge, le sexe et le pays	2
Sous-total	
<hr/>	
Anamnèse personnelle (maximum 2 points^a)	
Maladie coronarienne précoce ^b	2
Maladie vasculaire périphérique ou cérébrale précoce ^b	1
Sous-total	
<hr/>	
Examen physique (maximum 6 points^a)	
Xanthomes tendineux	6
Arc cornéen précoce < 45 ans	4
Sous-total	
<hr/>	
LDL-c (maximum 8 points^a) : NB : il faut indiquer le taux de LDL-c avant le traitement adéquat	
> 8.5 mmol/L (> 3.25 g/L)	8
6.5-8.4 mmol/L (2.51-3.25 g/L)	5
5.0-6.4 mmol/L (1.91-2.50 g/L)	3
4.0-4.9 mmol/L (1.55-1.90 g/L)	1
Sous-total	
<hr/>	
Analyse de génétique moléculaire	
Variant fonctionnel identifié sur les gènes <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> et <i>PCSK9</i>	8
Sous-total	
<hr/>	
TOTAL (somme des 5 sous-totaux)	
^a Pour calculer le nombre total de points par catégorie, seulement le score le plus haut sera applicable	
^b < 55 ans chez l'homme, < 60 ans chez la femme	
Le total des points indique la probabilité d'une hypercholestérolémie familiale HF :	
0-2 : HF peu probable	
3-5 : HF possible	
6-8 : HF probable	
>8 : HF certaine	

Annexe 2 : score DLCN (Dutch Lipid Clinic Network)



IMPRIME

Plan d'expérimentation - Validation / Vérification de méthode sur site

Processus : *Métier biologie\Analytique

Diffusion par :
BIOLOGIE

Type de méthode :	<input checked="" type="checkbox"/> Qualitative	<input type="checkbox"/> Quantitative
Vérification (portée A) : <input type="checkbox"/>		Validation (portée B) : <input checked="" type="checkbox"/>
Validation/vérification rétrospective : <input type="checkbox"/> Validation/vérification initiale : <input checked="" type="checkbox"/> Validation/vérification partielle : <input type="checkbox"/>		
Modification : <input type="checkbox"/>	Nature de la modification :	
TITRE :		N° :
Service :	Unité : Génétique moléculaire	

DESCRIPTION :

Nature du spécimen :	ADN
Référence(s) réactif(s) :	Cf tableau des réactifs
Biologiste responsable :	Pierre Boisseau Interne : Adeline Goudal Ingénieur : Mathilde Giraud
Techniciens :	

PLANIFICATION :

Date de début : janvier 2020	Date de fin prévue : décembre 2020
-------------------------------------	---

A faire :	DESCRIPTION	CRITERES D'ACCEPTABILITE	RESSOURCES NECESSAIRES
-----------	-------------	--------------------------	------------------------

Spécificité analytique :	<input checked="" type="checkbox"/>	Vérification du design (+ présence d'homopolymères) Concordance sur CQI genome in the bottle, 6 insertions/délétions/duplication, 13 SNV et 10 CNV.	Ensemble des régions d'intérêt couvertes. Taux de couverture >30X pour les 3 premiers runs	Temps technicien et ingénieur. Immobilisation des équipements et coûts réactifs.
Sensibilité diagnostique	<input checked="" type="checkbox"/>	Si nouveau design, penser à définir la stratégie.	100% de concordance + retrouver le variant d'intérêt et regarder les pourcentages de fréquence allélique	
Répétabilité	<input checked="" type="checkbox"/>	Type d'échantillon : ADN RUN 1 : 14 patients en triplicats en triplicate : CQI genome in the bottle, 5 indels, 1 variant compliqué, 2 faux-sens, 3CNV, 2 non-sens RUN 2 : 9 patients en triplicats En triplicate : CQI genome in the bottle, 3 indels, 1 variant compliqué, 2 épissages, 2 faux-sens Nombre de mesures : triplicats Période - conditions : sur le Nextseq dans la même série	100% de concordance + retrouver le variant regarder les pourcentages de fréquence allélique entre les triplicats	
Fidélité intermédiaire (reproductibilité)	<input checked="" type="checkbox"/>	Type d'échantillon : ADN RUN 2 : 15 patients passés dans le RUN 1 CQI genome in the bottle, 1 variant compliqué, 5 indels, 2 épissage, 2 CNV, 2 non-sens, 1 faux-sens, 1 synonyme Nombre de mesures : duplicat Période - conditions : sur deux runs de validation différents par 2 opérateurs différents	100% de concordance + retrouver le variant et regarder les pourcentages de fréquence allélique entre les duplicats	

Justesse	<input type="checkbox"/>			
Exactitude	<input checked="" type="checkbox"/>	Témoin ADN 14H1013 : genome in the bottle	100% de concordance	
Limite de quantification	<input type="checkbox"/>			
Limite de détection	<input checked="" type="checkbox"/>	Détection des indels ou des variants au sein des homopolymères en fonction du seuil fourni par SeqOne®	100% de concordance et regarder les pourcentages de fréquence allélique.	
Incertitude / facteur de variabilité	<input type="checkbox"/>			
Contamination inter échantillon	<input checked="" type="checkbox"/>	<p><u>Contamination Intra Run</u> : Test à réaliser avec un témoin négatif (blanc) suivant tout le parcours de l'échantillon dans les 3 runs de validation</p> <p><u>Contamination InterRun</u> : 1 run de Phix lancé entre 2 runs</p>	<p>Absence de contamination</p> <p>Ne pas retrouver d'homozygote <90% et d'hétérozygotes différents de 50%.</p> <p>Nombre de variants rares partagés entre les échantillons (<3)</p> <p>Blanc : nombres de reads <30X, Tailles moyennes des reads < 250</p>	
Contamination inter réactif	<input type="checkbox"/>			
Stabilité réactifs	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Tableau des réactifs utilisés avec les recommandations fournisseurs</p> <p>Ethanol absolu : test sur 1 patient en double et 2 pools différents avec de l'éthanol « neuf » et de l'éthanol ouvert depuis 6 mois</p>	<p>Suivi des recommandations fournisseur</p> <p>Test éthanol : satisfaisant aux critères fournisseur</p> <p>Labship : intervalle entre 150-1000pb avec taille moyenne des fragments entre 375-425pb</p> <p>Qubit : 70-100 ng/μL</p>	Temps ingénieur et interne

Robustesse	<input type="checkbox"/>			
Interférence	<input type="checkbox"/>			
Intervalle de référence	<input type="checkbox"/>			
Comparaison des méthodes	<input checked="" type="checkbox"/>	Vérification sanger		

Annexe 3 : Plan d'expérience et critères d'acceptabilité

échantillon	gène	exon	nucléotide	génomique	protéique	statut
NA12981						
7293	<i>APOE</i>	exon 4	c.526C>T	45412079C>T	p.(Arg176Cys)	hétérozygote
6786	<i>LDLR</i>	dup exon 13 et 14				hétérozygote
7246	<i>LDLR</i>	del exon 6				hétérozygote
2994	<i>SAR1B</i>		c.1-4482_58+1406del15946 insCGCATGATGGCGGGT			homozygote
7949	<i>APOB</i>	exon 29	c.12944_12959delAACAGCTGAAAGAGAT	21225335_21225350del	p.(Lys431fs*29)	hétérozygote
8011	<i>APOB</i>	exon 3	c.169delG	21265301del	p.(Glu57Argfs*36)	hétérozygote
	<i>LDLR</i>	dup exon 7 et 8				hétérozygote
8018	<i>MTTP</i>	exon 13	c.1731C>T	100530096C>T	p.(Ala577=)	hétérozygote
	<i>PCSK9</i>	exon 1	c.57_65dupGCTGCTGCT	55505567_55505575dup	p.(Leu21_Leu23dup)	hétérozygote
6966	<i>ABCG8</i>	exon 10	c.1412-9_1412-8insT			hétérozygote
	<i>PCSK9</i>	exon 4	c.63_65dupGCT	55505573_55505575dup	p.(Leu22dup)	hétérozygote
6706	<i>LDLRAP1</i>	exon 9	c.850G>A	25893406G>A	p.(Ala284Thr)	hétérozygote
	<i>LDLRAP1</i>	3'UTR	c.*985_986insTG	25894468_25894469insTG		homozygote
6845	<i>MTTP</i>	exon 3	c.136C>G	100503136C>G	p.(Arg46Gly)	hétérozygote
	<i>PCSK9</i>	exon 5	c.658-7C>T	55518316C>T		hétérozygote
6966	<i>APOB</i>	exon 26	c.7025A>G	21232715T>C	p.(His2342Arg)	hétérozygote
7086	<i>LDLR</i>	exon 4	c.429C>A	11216011C>A	p.(Cys143*)	hétérozygote
3415	<i>SAR1B</i>	exon 7	c.364G>T	133944178C>A	p.(Glu122*)	homozygote

8075	<i>LDLR</i>	dup exon 15 et 16				hétérozygote
6581	<i>LDLR</i>	dup exon 13,14,15				hétérozygote
	<i>ABCG5</i>	exon 9	c.1251G>A	44051125C>T	p.(Gln417=)	hétérozygote
	<i>ABCG8</i>	exon 5	c.576C>T	44079507C>T	p.(Ile192=)	hétérozygote
7824	<i>LDLR</i>	dup exon 13 et 14				hétérozygote
7308	<i>LDLR</i>	exon 8	c.1171G>A	11222300G>A	p.(Ala391Thr)	hétérozygote
7378	<i>ABCG8</i>	intron 12	c.1884+2T>C	44104829T>C	p.(?)	hétérozygote
	<i>ABCG8</i>	exon 13	c.1895T>C	44104925T>C	p.(Val632Ala)	homozygote
8482	<i>APOB</i>	intron 24	c.3842+2T>C	21237318A>G	p.(?)	hétérozygote
8498	<i>PCSK9</i>	exon 9	c.1405C>T	55524222C>T	p.(Arg469Trp)	hétérozygote
	<i>APOB</i>	exon 26	c.10580G>A	21229160C>T	p.(Arg3527Gln)	hétérozygote
	<i>APOB</i>	exon 26	c.7696G>A	21232044C>T	p.(Glu2566Lys)	hétérozygote
7268	<i>LDLR</i>	del promoteur et exon 1 à 6				hétérozygote
7302	<i>LDLR</i>	del exon 8 à 15				hétérozygote
8317	<i>ANGPTL3</i>	exon 6	c.998T>G	63069706T>G	p.(Ile333Ser)	hétérozygote
7794	<i>LDLR</i>	del exon 3 à 6				hétérozygote
7798	<i>LDLR</i>	dup exon 13 et 14				hétérozygote
7100	<i>LIPA</i>	exon 7	c.754A>T	90983509T>A	p.(Ile252Leu)	hétérozygote
7050	<i>MTTP</i>	exon 14	c.1784G>A	100532314G>A	p.(Arg595Gln)	hétérozygote
	<i>MTTP</i>	exon 14	c.1865G>A	100532395A>G	p.(Arg622Gln)	hétérozygote
8344	<i>LDLR</i>	exon 13	c.1934dupA	11230856dup	p.(Asn645Lysfs*24)	hétérozygote

Annexe 4 : Détails des variants d'intérêt des 29 échantillons témoins

Dup : duplication

Del : délétion

<i>AICF</i>	<i>CCDC93</i>	<i>HNF4A</i>	<i>PCSK6</i>	<i>TAP2</i>
<i>ABCA6</i>	<i>CCHCR1</i>	<i>HSD3B7</i>	<i>PCSK7</i>	<i>TIMD4</i>
<i>ABCA8</i>	<i>CD36</i>	<i>HSP90B1</i>	<i>PLCG1</i>	<i>TM6SF2</i>
<i>ABCB11</i>	<i>CELSR2</i>	<i>IGF2R</i>	<i>PNPLA2</i>	<i>TMEM97</i>
<i>ABCB4</i>	<i>CETP</i>	<i>INSIG2</i>	<i>PNPLA3</i>	<i>TTC39B</i>
<i>ABCG1</i>	<i>CMTM6</i>	<i>IZUMO1</i>	<i>PNPLA5</i>	<i>USP24</i>
<i>ACACB</i>	<i>COMMD1</i>	<i>KIF13B</i>	<i>POC5</i>	<i>VLDLR</i>
<i>ACAD11</i>	<i>COMMD9</i>	<i>LIPC</i>	<i>PROX1</i>	<i>VPS26A</i>
<i>ACLY</i>	<i>COPA</i>	<i>LPA</i>	<i>PSORS1C1</i>	<i>VPS26B</i>
<i>ACOX1</i>	<i>COPB1</i>	<i>LPL</i>	<i>PSRC1</i>	<i>VPS29</i>
<i>ANGPTL4</i>	<i>COPB2</i>	<i>LRP1</i>	<i>SARS</i>	<i>VPS35</i>
<i>ANGPTL8</i>	<i>COPG1</i>	<i>LRPAP1</i>	<i>SCARB1</i>	<i>WASHC1</i>
<i>ANKDD1B</i>	<i>CPNE1</i>	<i>MICA</i>	<i>SF3A1</i>	<i>WASHC3</i>
<i>ANKRD31</i>	<i>CYP27A1</i>	<i>MIR122</i>	<i>SF3B1</i>	<i>WASHC4</i>
<i>ANXA9</i>	<i>CYP7A1</i>	<i>MIR128-1</i>	<i>SF3B2</i>	<i>WASHC5</i>
<i>APOC1</i>	<i>DHCR7</i>	<i>MIR148a</i>	<i>SF3B4</i>	<i>ZNF101</i>
<i>APOC4</i>	<i>DHX38</i>	<i>MIR30C1</i>	<i>SF3B5</i>	<i>ZNF229</i>
<i>APOH</i>	<i>DNAH11</i>	<i>MIR30C2</i>	<i>SIK3</i>	<i>ZNF233</i>
<i>AQR</i>	<i>DYNC1L1</i>	<i>MIR33A</i>	<i>SLC10A2</i>	<i>ZPR1</i>
<i>ARCN1</i>	<i>FRK</i>	<i>MIR33B</i>	<i>SLC22A1</i>	
<i>ASGR1</i>	<i>FUT2</i>	<i>MYLIP</i>	<i>SMLR1</i>	
<i>BCAM</i>	<i>GCKR</i>	<i>NAPA</i>	<i>SNX17</i>	
<i>BCL3</i>	<i>GPR146</i>	<i>NCAN</i>	<i>SNX27</i>	
<i>CAP1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>NPC1L1</i>	<i>SNX5</i>	
<i>CBLC</i>	<i>HAVCR1</i>	<i>NR0B2</i>	<i>SORT1</i>	
<i>CCDC22</i>	<i>HLA-DRA</i>	<i>NR1H4</i>	<i>STARD10</i>	
<i>CCDC93</i>	<i>HMGCR</i>	<i>NYNRIN</i>	<i>STX1A</i>	
<i>CCHCR1</i>				

Annexe 5 : 126 gènes recherche

Serment de Galien

Université de Nantes



Faculté de Pharmacie

Serment

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

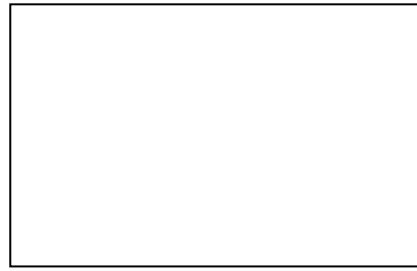
D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

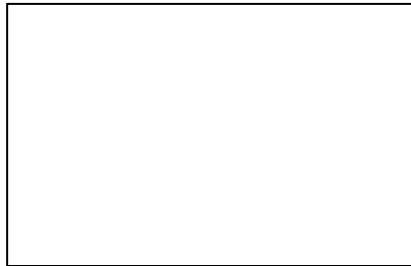
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Vu, le Président du jury,

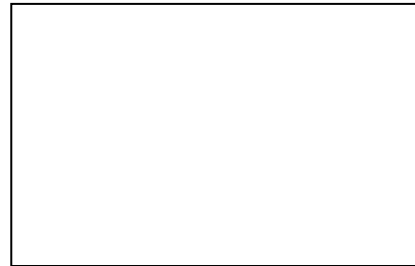


Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD

Vu, le Directeur de thèse,

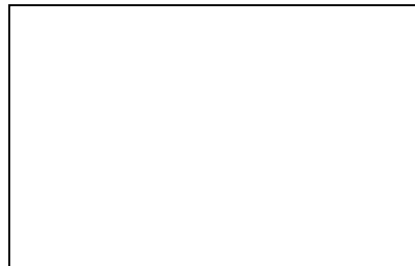


Monsieur le Professeur Stéphane BEZIEAU



Monsieur le Professeur Bertrand CARIOU

Vu, le Directeur de l'UFR,



Monsieur le Professeur Gaël GRIMANDI

Nom – Prénoms : GOUDAL Adeline, Amandine, Laetitia

Titre de la thèse : Mise en place du séquençage haut-débit dans le diagnostic moléculaire des hypercholestérolémies et hypocholestérolémies familiales

Résumé de la thèse :

Les dyslipidémies familiales, étiologies majeures d'hypercholestérolémie, sont des pathologies à risque cardiovasculaire élevé. L'enjeu est donc de les dépister précocement afin de diminuer la morbidité et mortalité des maladies cardiovasculaires, qui représentent la première cause de mortalité mondiale.

L'objectif de ce travail est la mise en place du diagnostic moléculaire des hypercholestérolémies et hypocholestérolémies familiales au laboratoire de Génétique Médicale du CHU de Nantes.

Une validation des méthodes selon une portée B flexible a été réalisée afin de mettre en place le séquençage haut-débit d'un panel de gènes impliqués dans ces pathologies.

Les différents critères de performance (sensibilité, spécificité, exactitude, répétabilité, reproductibilité) sont conformes et permettent la mise en place de cette technique au laboratoire de génétique moléculaire. Le criblage moléculaire de ces maladies héréditaires permet un diagnostic de certitude avec une prise en charge précoce et adaptée. Il permet également de réaliser un dépistage familial afin d'identifier les individus à risque de développer une pathologie cardiovasculaire.

MOTS CLES

HYPERCHOLESTEROLEMIE, RISQUE CARDIOVASCULAIRE, SEQUENCAGE HAUT-DEBIT, DEPISTAGE FAMILIAL

JURY

PRESIDENT : Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD (PU-PH, Biochimie)

DIRECTEURS DE THESE : Monsieur le Professeur Stéphane BEZIEAU (PU-PH, Génétique)

Monsieur le Professeur Bertrand CARIOU (PU-PH, Endocrinologie)

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur Thierry LE TOURNEAU (PU-PH, Cardiologie)

Monsieur le Docteur Mathilde DI FILIPPO (PH, Biologie-Biochimie)

Monsieur le Docteur Jean-Jacques SCHOTT (PhD, Directeur de recherche, Institut du thorax-UMR1087)

Monsieur le Docteur Antoine RIMBERT (PhD, Institut du thorax-UMR1087)

Adresse de l'auteur

10 Boulevard Robert Schuman, 44300 NANTES