

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Thèse n°13

THESE

Pour le **DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 29 Janvier 2018

Par

M. CHALVET VIRGILE

Né le 30 Juin 1993 à Lyon

**VALIDATION DE METHODE DU DOSAGE EN ELISA DE LA
CONCENTRATION DE LA LIPOPROTEINE LIPASE EN
LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE SELON LA NORME
15189**

JURY

Mme FERRARO-PEYRET Carole, Maître de Conférences

Mme DI FILIPPO Mathilde, Docteur en Pharmacie

Mme MARMONTEL Oriane, Docteur en Pharmacie

M. FOURIER Anthony, Docteur en Pharmacie

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-président de la Commission Recherche

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. Fabrice VALLÉE

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est

Directeur : M. Gilles RODE

UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux

Directeur : Mme Carole BURILLON

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme Christine VINCIGUERRA

UFR d'Odontologie

Directeur : M. Denis BOURGEOIS

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)

Directeur : M. Xavier PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. Fabien DE MARCHI

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)

Directeur : M. Yannick VANPOULLE

Polytech Lyon

Directeur : M. Emmanuel PERRIN

I.U.T LYON 1

Directeur : M. le Professeur Christine VITON

Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)

Directeur : M. N. LEBOISNE

ESPE

Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

Observatoire des Sciences de l'Univers

Directrice : Mme Isabelle DANIEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB- Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET
PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)

Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)

Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)

Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Florence RANCHON (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**

Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Madame Morgane GOSSEZ (AHU)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE
AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)

Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)

Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)

Madame Emilie BLOND (MCU-PH)

Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)

Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)

Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)

Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)

Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Stéphanie SENTIS (MCU)

Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Monsieur Alexandre JANIN

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Monsieur Karim MILADI (85^{ème} section)

Monsieur Antoine ZILLER (87^{ème} section)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

REMERCIEMENTS

A Madame C. FERRARO-PEYRET – Présidente du jury

Veillez trouver ma plus sincère gratitude pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

A Madame M. DI-FILIPPO – Directeur de thèse

Pour m'avoir si bien accueilli au cours de mon stage Hospitalo-Universitaire, pour m'avoir proposé ce sujet et m'avoir dirigé tout au long de ce travail, je vous adresse mes plus sincères remerciements.

A Madame O. MARMONTEL – Co-encadrant et membre du jury

Pour avoir contribué à l'élaboration de ce travail, pour m'avoir consacré beaucoup de temps et pour les nombreux conseils, veuillez trouver ma sincère reconnaissance.

A Monsieur A. FOURIER – Membre du jury

Pour vos conseils sur ce travail et pour avoir accepté de prendre part au jury, je vous adresse mes remerciements.

Mes remerciements s'adressent également :

A mes parents,

Pour m'avoir poussé à réaliser ces études, pour vos encouragements et votre soutien, je ne vous remercierais jamais assez. Et à toi papa qui aurait été si fier de pouvoir m'appeler confrère.

A mon frère et ma sœur,

Pour les bons moments passés ensemble et les prochains à venir.

A mon grand-père,

Pour ton affection, ta générosité et l'intérêt que tu as pu porter au cours de mes études.

A Mathilde,

Pour ton soutien ainsi que pour le bonheur que tu m'apportes.

A Flavien,

Pour avoir tant squatté mon appartement au point de croire que tu étais mon colocataire et avoir partagé tellement de bons moments au cours de ces années.

A mes ami(e)s de fac,

Pierre, Célia, Alexandre, Antoine, Vanessa, et tant d'autres, pour avoir rempli ces années d'études de bons souvenirs.

Et à vous Ségolène, Victor et Camille même si vous ne faites pas parti des pharmas.

TABLE DES MATIERES

LISTES DES TABLEAUX :	15
LISTES DES FIGURES :	16
LISTES DES ABBREVIATIONS	17
LISTE DES ANNEXES	18
INTRODUCTION.....	19
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. RAPPELS : LES LIPOPROTEINES.....	21
2. LA LIPOPROTEINE LIPASE	25
2.1. Généralités.....	25
2.2. Structure de la LPL	25
2.2.1. Structure.....	25
2.2.2. Structure et fonction du site catalytique.....	27
2.2.3. Activité non catalytique.....	28
2.2.4. Site de liaison à l'héparine.....	28
2.2.5. Site de liaison lipidique	29
2.2.6. Site de liaison à l'ApoC-II	29
2.2.7. Site des résidus Cystéine	29
2.2.8. Site de Glycosylation	29
2.3. Le gène de la LPL.....	30
2.3.1. Structure du gène	30
2.3.2. Lieux de Synthèse.....	31
2.3.3. Transcription.....	31
2.3.4. Traduction	32
2.4. Régulation de la LPL.....	32
2.4.1. LMF1	33
2.4.2. GPIHBP1.....	34
2.4.3. ApoC-II	34
2.4.4. ApoAV	35
3. PLACE DE LA LPL DANS LE DIAGNOSTIC DES HYPERTRIGLYCERIDEMIES	36
3.1. Les hypertriglycémies	36

3.1.1.	Le syndrome d'hyperchylomicronémie familial	36
3.1.2.	L'hyperchylomicronémie multifactorielle	37
3.2.	<i>Méthodes d'exploration</i>	37
3.2.1.	Explorations génétiques	37
3.2.2.	Explorations phénotypiques : Technique de dosage de la LPL	38
3.2.2.1.	Dosage Immuno-Enzymatique	39
3.2.3.	Mesure de l'activité LPL	41
4.	LE SYSTEME QUALITE	42
4.1.	<i>Définition de la qualité</i>	42
4.2.	<i>Norme ISO 15189</i>	42
4.3.	<i>L'accréditation</i>	43
4.4.	<i>Le COFRAC</i>	43
4.5.	<i>Validation de Méthode</i>	44
4.5.1.	Définition	44
4.5.2.	Validation de méthode.....	45
4.5.3.	Portée flexible de Type A/Type B	45
	PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.....	48
1.	OBJECTIF DE L'ETUDE.....	48
2.	MATERIELS ET METHODES	48
2.1.	<i>Prélèvements</i>	48
2.2.	<i>Sujets</i>	48
2.3.	<i>ELISA</i>	49
2.3.1.	Kits commercialisés disponibles	49
2.3.2.	Etapas du dosage	50
2.3.3.	Technique de détection : Lecteur PerkinElmer EnSpire 2300	50
2.4.	<i>Comparaison Modèles de Régression</i>	51
2.5.	<i>Critères de Validation</i>	52
2.5.1.	Fidélité.....	52
2.5.1.1.	Répétabilité	52
2.5.1.2.	Fidélité Intermédiaire.....	52
2.5.2.	Etendue de Mesures	52
2.5.3.	Intervalles de Référence.....	53
2.5.4.	Diagnostic moléculaire	53

2.5.5.	Sensibilité et Spécificité	53
2.5.6.	Analyse Statistique	54
3.	RESULTATS	55
3.1.	<i>Sélection du kit</i>	55
3.1.1.	Etudes Bibliographiques.....	55
3.1.2.	Résultat Préliminaire	55
3.1.3.	Etude de faisabilité	56
3.1.4.	Comparaison modèles de régression	57
3.1.5.	Répétabilité	59
3.1.6.	Fidélité Intermédiaire	60
3.1.7.	Etendue de mesure	60
3.1.8.	Intervalle de Référence	61
3.1.9.	Distribution chez les témoins et les patients.....	62
3.1.10.	Concentration et activité de la LPL en fonction du diagnostic moléculaire	63
3.1.11.	Sensibilité et Spécificité.....	65
4.	DISCUSSION	67
	CONCLUSION.....	73
	BIBLIOGRAPHIE.....	82

Listes des Tableaux :

Tableau 1: Caractéristiques et Composition des principales lipoprotéines.....	22
Tableau 2: Performances à évaluer lors d'une validation/vérification méthode quantitative/qualitative (102).....	47
Tableau 3: Classification des groupes de patients en fonction des résultats de génétique.....	53
Tableau 4: Caractéristiques des kits ELISA	55
Tableau 5: Comparaison du prélèvement sérum et EDTA	56
Tableau 6: Comparaison des pourcentages de récupération obtenus sur quatre dosages. (¹ : Moyenne des pourcentages de récupération et ² : [minimum – maximum] obtenus sur les 4 dosages).....	57
Tableau 7: Comparaison des coefficients de détermination sur 4 dosages	58
Tableau 8: Intervalles de références à T0, T10 en 4PL.....	58
Tableau 9: Intervalles de références à T0, T10 en 3e ordre polynomial.....	58
Tableau 10: Synthèse des diagrammes des différences et des droites de régression.....	59
Tableau 11: Evaluation de la répétabilité	59
Tableau 12: Evaluation de la fidélité intermédiaire	60
Tableau 13: Limite de linéarité	60
Tableau 14: Diagnostic moléculaire et quantification de la concentration et de l'activité de la LPL à T10 (10 minutes après injection d'héparine).....	64
Tableau 15 : Détermination de la sensibilité et de la spécificité - Concentration de LPL en fonction du profil génétique	65
Tableau 16 : Détermination de la sensibilité et de la spécificité – Concentration LPL en fonction de l'activité.....	66

Listes des Figures :

Figure 1: Schéma d'une Lipoprotéine (4)	21
Figure 2 : Voie endogène des lipides (8).....	23
Figure 3: Hydrolyse des LRTG (11).....	24
Figure 4 : Structure de la LPL. D'après Mysling, eLife (29) Le domaine acide de la protéine de la membrane endothéliale GPIHBP1 stabilise l'activité des lipoprotéines lipases en empêchant le déploiement de son domaine catalytique. (NTD : N-terminal Domain, CTD : C-terminal Domain).....	26
Figure 5: Réaction d'hydrolyse des TG par la LPL (35).....	27
Figure 6: Représentation schématique des 10 exons du gène de la lipoprotéine lipase (55)	30
Figure 7: Spécificités fonctionnelles des exons du gène de la LPL (47).....	31
Figure 8 : Topologie membranaire de LMF1 (64)	33
Figure 9: Courbe de calibration en régression linéaire (94)	40
Figure 10: Courbe de calibration en polynomial (94)	40
Figure 11: Courbe de calibration en 4 paramètres logistiques (94).....	41
Figure 12: Principe de la méthode ELISA en Sandwich (105)	50
Figure 13: Distribution de la concentration de LPL à T0 chez des patients HTG et des sujets contrôles.....	62
Figure 14: Distribution de la concentration de LPL à T10 chez des patients HTG et des sujets contrôles.....	63

LISTES DES ABBREVIATIONS

4PL : 4 Paramètres Logistiques

ApoC-II : Apolipoprotéine C-II

COFRAC : Comité Français d'accréditation

CPP : Comité de Protection des Personnes

CV : Coefficient de Variation

DO : Densité Optique

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

GPIHBP1: Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding
1

HDL: High Density Lipoprotein

HSPG: Heparan sulphate-proteoglycans

HTG : Hypertriglycémie

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

LBMMS : Laboratoire de Biologie Médicale Multisites

LDL: Low Density Lipoprotein

LMF1: Lipase Maturation Factor

LPL : Lipoprotéine Lipase

LRTG : Lipolyse des particules riches en TG

TG: Triglycéride

VLDL: Very Low Density Lipoprotéin

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Pourcentages de récupération obtenus sur quatre dosages en fonction des modèles de régression

Annexe 2 : Essais préliminaire avec le kit Cell Biolabs

Annexe 3 : Comparaison de la méthode 4PL versus Log-log

Annexe 4 : Comparaison de la méthode 4PL versus Ln

Annexe 5 : Comparaison de la méthode 4PL versus 2^e ordre polynomial

Annexe 6 : Comparaison de la méthode 4PL versus 3^e ordre polynomial

INTRODUCTION

Les lipoprotéines plasmatiques sont des particules composées à la fois d'une partie lipidique et d'une partie protéique spécifique. Elles sont considérées comme une forme de transport des lipides vers les tissus. Les principaux lipides transportés sont les triglycérides et le cholestérol. Sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), le contenu en triglycérides (TG) des lipoprotéines plasmatiques, plus spécifiquement des chylomicrons et des Very Low Density Lipoprotein (VLDL), va être hydrolysée. Cette enzyme, liée aux héparanes sulfates des cellules endothéliales vasculaires, régule la triglycéridémie. D'autres part, de nombreuses protéines vont indirectement jouer un rôle dans l'hydrolyse des triglycérides, comme l'apolipoprotéine C-II (ApoC-II) qui est un cofacteur activateur de la lipoprotéine lipase. Dans le cas de mutations du gène de la LPL ou de protéines spécifiques, des dysfonctionnements ou un déficit de cette enzyme peuvent survenir, entraînant de ce fait une accumulation des triglycérides et donc une hypertriglycéridémie. L'hypertriglycéridémie est une pathologie se caractérisant par une concentration en triglycérides au-dessus de 1.7mmol/L à jeun. A ce jour, les études génétiques ne permettent d'expliquer qu'un faible nombre de cas. Il est par conséquent nécessaire de mieux caractériser les patients sur un plan phénotypique.

La lipoprotéine lipase joue donc un rôle clé dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. En cas d'hypertriglycéridémie, il est important d'évaluer sa fonctionnalité afin de déterminer son rôle dans la pathologie. Au sein de l'unité des Dyslipidémies dans le service de Biochimie et Biologie Moléculaire au Centre de Biologie Est, la détermination de l'activité de cette protéine a déjà été mise en place. Cette mesure nécessite cependant une injection d'héparine afin de libérer l'enzyme dans la circulation générale : il ne peut donc pas être réalisé en cas de contre-indication à l'injection d'héparine et ne permet pas d'évaluer la sécrétion basale de la LPL. Il a donc été décidé d'installer et de valider le dosage de la concentration par enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) au sein du laboratoire.

Depuis l'ordonnance du 13 Janvier 2010, les Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) sont tenus d'obtenir une accréditation auprès du Comité Français d'accréditation (COFRAC) selon la norme ISO 15189. La validation des méthodes de dosage, partie intégrante du processus d'accréditation, est devenue un enjeu important pour les LBM car elle permet de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale et d'attester que les laboratoires sont compétents dans la réalisation des essais. La démarche d'accréditation se décompose en deux catégories, la portée flexible standard ou type A et la portée flexible étendue ou type B. La portée de type A permet d'obtenir une accréditation des méthodes pour lesquelles le principe technique général reste inchangé. A l'inverse, la portée de type B est utile aux laboratoires de biologie médicales (LBM) souhaitant adapter ou développer leurs méthodes d'analyses.

Le but de ce travail était l'évaluation du dosage ELISA de la LPL. Dans un premier temps le kit répondant le mieux à nos critères a été sélectionné. Ensuite, 5 modèles de régression ont été évalués afin de déterminer le plus sensible et performant pour calculer les concentrations. Les performances de la méthode ont ensuite été évaluées selon la norme 15189, en portée de type B puisque certaines spécifications du fournisseur ont dû être modifiées. Ce travail débutera par un bref rappel sur les lipoprotéines, les caractéristiques et le rôle de la LPL puis sur le système qualité dans les LBM. La méthodologie et les résultats expérimentaux obtenus seront détaillés lors de la deuxième partie.

Partie I : Etude Bibliographique

1. Rappels : Les lipoprotéines

Les lipides sont des molécules insolubles en milieu aqueux et doivent se complexer à des protéines : les apolipoprotéines, pour pouvoir circuler librement dans le milieu plasmatique (1, 2).

Les complexes lipides-protéines formés se nomment « lipoprotéines ». Ces structures assurent la solubilisation des lipoprotéines. Elles sont composées de noyaux de TG et de cholestérol estérifié qui sont recouverts par une couche de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéine (2) et permettent le transport de ces dernières pour procurer de l'énergie aux tissus (2, 3).

Le catabolisme des lipoprotéines est crucial afin de diminuer le taux de lipides plasmatiques et éviter par la même occasion des pathologies cardiovasculaires (1).

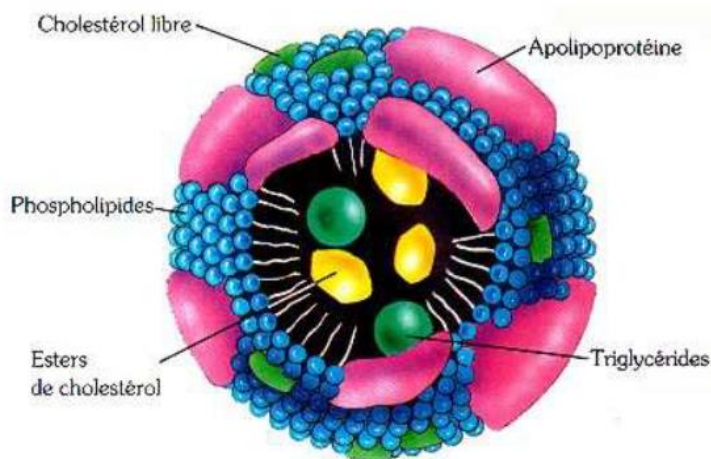


Figure 1: Schéma d'une Lipoprotéine (4)

Les lipoprotéines ont été regroupées en différentes classes selon : leur poids moléculaire, leur densité et de leur diamètre (tableau 1). Les différences de densités et de tailles sont dues à la proportion de protéines et de lipides. Plus il y a de protéines, plus les lipoprotéines sont petites et plus elles sont denses. Inversement pour le taux de lipides (5, 6).

Lipoprotéine	Densité (g/MI)	Diamètre (nm)	TG	Cholestérol	Phospholipide	Protéine
Chylomicrons	<0.95	100-1000	84%	8%	7%	<2%
VLDL	0.950-1.006	30-80	50%	22%	18%	10%
Low Density Lipoprotein (LDL)	1.019-1.063	18-28	8%	50%	21%	25%
High Density Lipoprotein (HDL)	>1.063	5-15	4%	30%	29%	33%

Tableau 1: Caractéristiques et Composition des principales lipoprotéines

Des fonctions ont été identifiées pour chacune des lipoprotéines :

- Les chylomicrons sont synthétisés par l'intestin : ils transportent les TG d'origine alimentaire vers le tissu adipeux périphérique (7). Ils sont catabolisés en remnants sous l'action de la LPL.
- Les VLDL transportent les TG synthétisés par le foie vers le tissu adipeux périphérique (7) : il s'agit de la voie endogène (cf figure 2 ci-dessous). Elles subissent l'action de la LPL et de la lipase hépatique et sont ainsi catabolisées successivement en IDL puis LDL.
- Les LDL transportent principalement le cholestérol aux tissus. Des concentrations élevées en LDL augmentent des risques d'apparition de pathologies cardiovasculaires (2, 7).
- Les HDL assurent la voie de retour des lipoprotéines (voie « reverse »), c'est-à-dire qu'elles récupèrent l'excès de cholestérol libre des tissus et le ramènent au niveau du foie. Elles sont aussi des réservoirs en apoprotéine A, E et C (7).

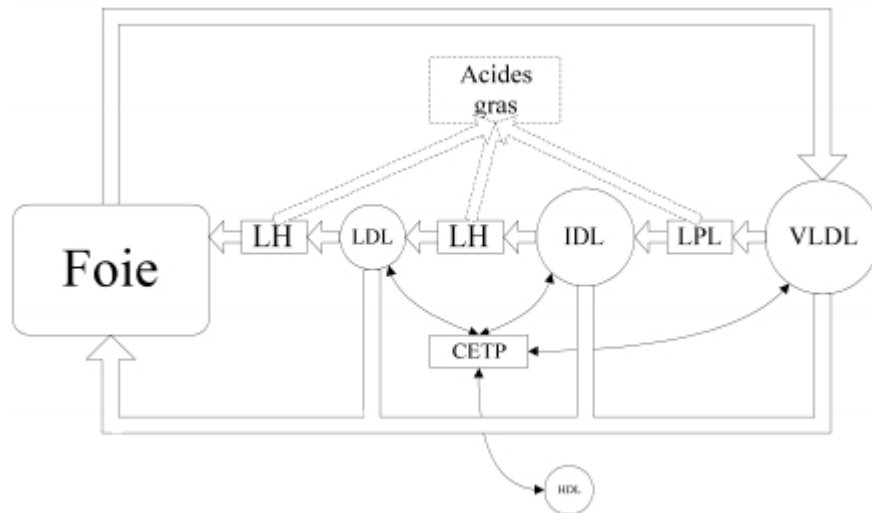


Figure 2 : Voie endogène des lipides (8)

Après un repas, les graisses alimentaires sont absorbées par l'intestin et sont incorporées dans le noyau des chylomicrons sous la forme de TG, initiant alors la voie de transport exogène des lipides (9).

Les chylomicrons sont sécrétés de la lymphe mésentérique vers la circulation sanguine. Pendant ce transport, ils vont acquérir des apolipoprotéines de surface (apoC-I, apoC-II, apoC-III et apoE) leurs conférant des fonctions métaboliques. La LPL, présente à la surface des capillaires, est activée par l'apoC-II des lipoprotéines. Les chylomicrons sont alors rapidement épurés de leurs triglycérides. L'hydrolyse des TGs va former des acides gras qui sont transportés, vers le muscle pour produire de l'énergie, et vers les adipocytes pour en stocker (9). La réduction des TGs des chylomicrons provoque une modification de la structure de cette lipoprotéine qui va ensuite se scinder en « remnants » de chylomicrons. Ces particules enrichies en cholestérol estérifié et en apoE vont rapidement être capté par le foie via les récepteurs de l'ApoE (9, 10).

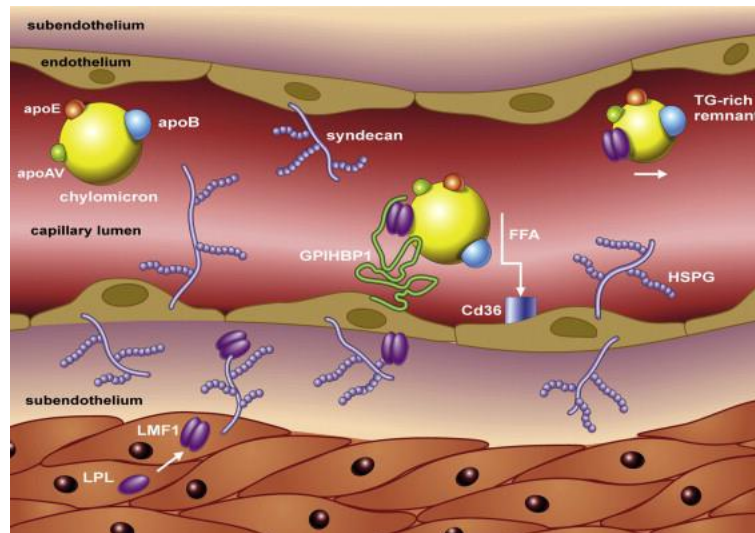


Figure 3: Hydrolyse des LRTG (11)

Contrairement aux chylomicrons qui sont responsables du transport des lipides alimentaires, les VLDL sont chargés de délivrer les lipides endogènes vers les tissus périphériques (9). Leur dégradation dépend de la lipoprotéine lipase qui est activée par l'apoC-II présente à la surface des VLDL. Celle-ci va alors hydrolyser le contenu en TG pour ainsi fournir de l'énergie aux tissus adipeux et musculaires. Au cours du catabolisme, les VLDL vont se restructurer en lipoprotéines de densité intermédiaire. Ce remnant va subir l'action de la LH pour être transformé Intermediate Density Lipoprotein puis en LDL (9).

La lipoprotéine lipase joue donc un rôle clé dans le catabolisme des TG. Un déficit en LPL entraîne une accumulation de chylomicrons et de VLDL qui vont s'accumuler et la concentration de TG va augmenter, pouvant provoquer des hypertriglycéridémies.

2. La Lipoprotéine Lipase

2.1. Généralités

En 1943, Paul Hahn découvre qu'une injection intraveineuse d'héparine entraîne une diminution de la lipémie. Ces observations l'ont conduit à la découverte d'une enzyme lipolytique: la LPL (12, 13). La LPL (EC 3.1.1.34), est un acylglycerol hydrolase de 55 kDA (14) qui permet comme vu précédemment, d'hydrolyser les TG contenus dans les chylomicrons et VLDL (3).

Dans sa forme physiologiquement active, la lipoprotéine lipase existe sous la forme d'un homodimère lié de façon non-covalente et d'orientation tête bêche (11, 12), et requiert la présence de l'ApoC-II pour être activée (12).

A l'opposé, dans sa forme monomérique, la LPL perd son activité catalytique (11, 12). De plus, elle est membre de la "superfamille des lipases" qui inclut: la lipase hépatique (LH) et la lipase pancréatique (LP) et les Drosophila yolk protéines (YP1, YP2, YP3) (17), (18). La LH, LP et LPL partagent des structures similaires et semblent dériver d'un ancêtre commun. En effet, ces lipases possèdent une séquence d'acides aminés proche et sont capables d'hydrolyser les TG (13, 14).

La LH, située dans le foie, a une fonction hydrolytique similaire à la LPL : elle hydrolyse les TG et les phospholipides des lipoprotéines et joue un rôle de médiateur sur l'administration du cholestérol aux tissus périphériques (15, 16, 17). La LP hydrolyse les lipides alimentaires dans l'intestin (18).

2.2. Structure de la LPL

2.2.1. Structure

La famille des lipases partage différentes caractéristiques structurales et fonctionnelles (23). Afin de déterminer la structure de la LPL, la Lipase pancréatique a été soumise à une cristallographie aux rayons X permettant d'établir la structure tridimensionnelle de la LPL (24, 25).

Les résultats ont montré une organisation en 2 régions structurellement distinctes reliées entre elles par un peptide flexible (26, 27, 28). La première

consiste en un grand domaine amino-terminal (residus 28-339) et la deuxième en une petite extrémité carboxy-terminale (residus 340-475) (26, 27, 28).

Ces régions sont cruciales pour l'activité de la LPL car :

- L'extrémité N-terminale est responsable de l'activité catalytique
- L'extrémité C-terminale permet la liaison au substrat

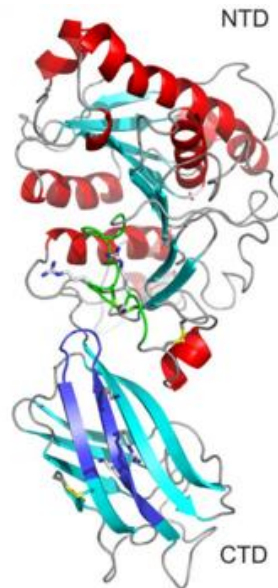


Figure 4 : Structure de la LPL. D'après Mysling, eLife (29) Le domaine acide de la protéine de la membrane endothéliale GPIHBP1 stabilise l'activité des lipoprotéines lipases en empêchant le déploiement de son domaine catalytique. (NTD : N-terminal Domain, CTD : C-terminal Domain)

La numérotation officielle, pour décrire les variations des séquences, est basée sur la séquence de l'ADNc, avec une numérotation débutant à partir de de l'adénine du triplet codant la méthionine 1. La description qui suit, de la structure et des relations structure-activité, est référencée sur le transcrit NM_000237.2. Ce transcrit contient 475 acides aminés dont les 27 premiers acides aminés correspondent au peptide signal.

2.2.2. Structure et fonction du site catalytique

Les études de relation structure/fonction ont permis de révéler plusieurs fonctions et domaines (30). L'étude de la région N-terminale a permis d'identifier un trou oxyanion (Trp-82, Leu-160), et 3 acides aminés responsables de l'activité catalytique (Ser159-Asp183-His268). Cette triade catalytique se situe dans une cavité constituée de chaînes hydrophobes. Dans sa forme inactive, ce site est bloqué par une boucle β 5 (résidus 81 à 91) et par un polypeptide "couvercle" (résidus 243 à 266) (25, 31, 32). Un changement de conformation a lieu lorsque la LPL se lie à son substrat entraînant alors l'ouverture du polypeptide "couvercle" ainsi qu'un repliement de la boucle β 5. Le site actif devient accessible et le trou oxyanion se trouve dans une position catalytiquement active (33). Autour du site catalytique, l'hydrophobicité va augmenter, les chaînes d'acides gras du substrat vont être attirées ce qui permet à la liaison au glycérol d'être hydrolysé par le trou oxyanion (33, 34). Grâce à son activité catalytique, la LPL va hydrolyser les TG présents dans les chylomicrons et les VLDL circulants. Cette réaction va former 2 acides gras libres et du 2-monoacylglycérol (12).

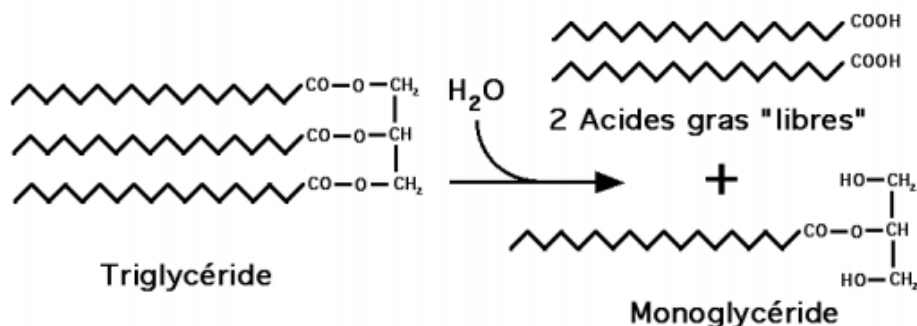


Figure 5: Réaction d'hydrolyse des TG par la LPL (35)

Les acides gras ainsi libérés pourront soit subir une nouvelle estérification pour stocker de l'énergie sous la forme de TG dans le tissu adipeux blanc ou alors, être oxydé afin de procurer de l'énergie au niveau musculaire et réguler la thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun (36).

2.2.3. Activité non catalytique

En plus de son activité catalytique, la LPL possède une fonction non catalytique de pontage moléculaire lui permettant de lier simultanément des lipoprotéines et des surfaces cellulaires spécifiques telles que : les Heparan sulphate-proteoglycans (HSPG), le LRP (LDL receptor-related protein), le récepteur LDL, le récepteur VLDL, le récepteur de l'apolipoprotéine E de type 2 et gp330 (37, 38, 39). Ces interactions peuvent conduire à une importante accumulation et à une capture cellulaire des lipoprotéines (12). La LPL serait également capable de former des ponts en se liant aux HSPG exprimés à la fois sur les monocytes et les cellules endothéliales (39, 40). De plus, il a été montré que la LPL joue un rôle dans l'activation macrophagique (41), et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (42). Cet effet requiert : l'activité enzymatique de la LPL, sa capacité à activer la protéine kinase C et sa capacité à se lier aux HSPG des cellules musculaires lisses vasculaires (42).

2.2.4. Site de liaison à l'héparine

Les domaines de liaison à l'héparine ont été identifiés en calculant la surface du potentiel électrostatique de la LPL (43, 44). Leur implication dans la liaison à l'héparine a été confirmée par mutagenèse dirigée (45).

Quatre groupements chargés positivement de liaison à l'héparine ont été décrits. Les deux principaux font partis d'une boucle située à la jonction des domaines N et C terminaux : Arg290-Arg306-Lys307-Arg309 (groupement 1) et Arg321-Lys323-Arg324-Lys327 (groupement 2), les deux sites secondaires sont : Lys174-Lys175-Arg178 (groupement 3) et Lys346-Lys430-Arg432-Lys434-Lys440-Lys441. L'affinité à l'héparine de la forme dimérique est 6000 fois plus élevée par rapport à la forme monomérique et les HSPG (12), expliquant la plus grande abondance de la forme dimérique à la surface de l'endothélium vasculaire.

2.2.5. Site de liaison lipidique

Le domaine C-terminal de la lipoprotéine lipase intervient dans la liaison avec le substrat lipidique. Cette liaison va provoquer un changement conformationnel provoquant l'ouverture du polypeptide « couvercle ». Des sites de liaison au substrat ont été identifiés : un cluster composé de tryptophanes (Trp417-Trp420-Trp421²) et une région 442-438² (46, 47). L'hypothèse la plus acceptée jusqu'à maintenant est que la LPL interagit avec les apolipoprotéines à la surface des lipoprotéines et notamment avec l'extrémité N-terminale de l'apolipoprotéine B. A l'inverse, une autre étude montre que des modifications chimiques de l'apoB100 n'empêchent pas la liaison de la LPL au substrat lipidique. Ce résultat montre que la liaison ne se ferait pas par l'apoB mais plutôt par des phospholipides, notamment la phosphatidylcholine (48).

2.2.6. Site de liaison à l'ApoC-II

L'apoC-II est nécessaire pour atteindre une activité maximale de LPL *in vivo* et *in vitro* et produire ainsi une activité hydrolytique optimale (30, 36, 49, 50). Des sites de liaisons de la LPL pour l'ApoC-II ont été identifiés sur le domaine N-terminale et le domaine C-terminal (44).

2.2.7. Site des résidus Cystéine

La LPL contient 10 résidus cystéine impliqués dans la formation de 5 ponts disulfures (Cys-54 et Cys-67, Cys-243 et Cys-266, Cys-291 et Cys-310, Cys-302 et Cys-305, Cys-445 et Cys-465) (26, 51).

2.2.8. Site de Glycosylation

Au moins deux sites de glycosylation liés à l'asparagine ont été identifiés sur la LPL humaine. Le premier est situé sur l'Asn-70 dans le domaine N-terminal et le second est situé sur l'Asn-386 dans le domaine C-terminal (52). La mutagenèse dirigée a permis de démontrer que l'Asn-70 est primordial pour la synthèse et la sécrétion de la LPL active. Au contraire, un changement d'acide aminé en position 386 n'affecte pas l'expression de l'enzyme (53).

2.3. Le gène de la LPL

2.3.1. Structure du gène

Le gène de la LPL est localisé sur le chromosome 8p22. Ce gène est composé de 10 exons correspondant à environ 30kb. Cette séquence peptidique a été déterminée à partir de l'ADNc de la LPL (54).

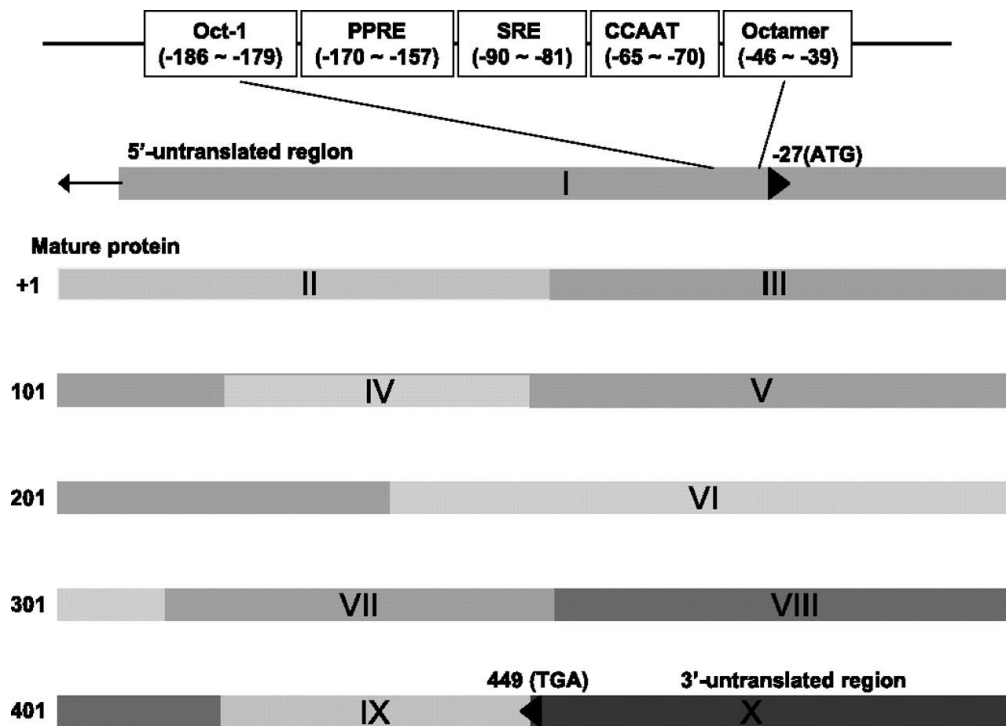


Figure 6: Représentation schématique des 10 exons du gène de la lipoprotéine lipase (55)

Exons	Longueur (pb)	Nombre d'acides aminés	Domaines protéiques correspondants
1	276	29	Extrémité 5' non codante. Peptide signal.
2	161	54	Site de glycosylation, essentiel à l'activité et à la sécrétion de l'enzyme.
3	180	60	...
4	112	37	Interaction hydrophobe avec le substrat. Liaison avec l'apo-CII.
5	234	78	Site catalytique probable*. Hautement conservé parmi les LPL de mammifères. Interaction hydrophobe avec le substrat. Intégrité essentielle à l'activité enzymatique.
6	243	81	Interaction avec l'héparan sulfate de l'endothélium vasculaire**.
7	121	41	...
8	183	61	Site de glycosylation.
9	105	34	...
10	1948	...	Extrémité 3'-non codante comportant deux sites de polyadénylation. Rôle possible dans la modulation de l'expression.

Figure 7: Spécificités fonctionnelles des exons du gène de la LPL (47)

2.3.2. Lieux de Synthèse

Les sources de synthèse du gène LPL ont été identifiées en utilisant une sonde d'ARN par hybridation in situ (12). L'hybridation a été positive au niveau des adipocytes (blancs et bruns), des myocytes et des glandes mammaires en lactation mais, il n'y a pas eu d'hybridation positive au niveau des cellules endothéliales alors que, le site d'action de la LPL, se situe à la face luminale des capillaires endothéliaux (12, 56).

2.3.3. Transcription

En premier lieu, le gène LPL est transcrit dans le noyau de cellule parenchymateuse des tissus exprimant la LPL (49). Elle débute dans la région 5' dans laquelle 4 sites d'initiation, 2 promoteurs et de nombreux motifs amplificateurs ont été identifiés (57).

L'homme présente deux types d'ARNm de 3350 et 3750 paires de bases provenant de sites alternatifs de polyadénylation en position 3' (54), ce qui suggère que la transcription est régulée par des tissus spécifiques cis-régulateurs (58).

2.3.4. Traduction

Après la transcription, l'ARNm de la LPL est traduit dans le réticulum endoplasmique rugueux en un polypeptide naissant qui subit ensuite des modifications post-traductionnelles.

La première étape après la synthèse du polypeptide naissant est une glycosylation. Elle implique le transfert "*en bloc*" d'un oligosaccharide lié à un lipide [Glc3-Mang (GlcNAc)₂] sur des résidus d'arginines, dans le réticulum endoplasmique, provenant du polypeptide naissant. Lors du transfert du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, la protéine subit de nombreuses modifications. A la fin des modifications on aboutit donc à une LPL mature contenant 8-12% de carbohydrates et 2 chaînes d'oligosaccharides (49).

Des études ont démontrées que l'ajout des résidus glucose provenant de l'oligosaccharide correspond à une étape critique dans l'acquisition de l'activité catalytique de la LPL, cette addition provoquerait la dimérisation et l'activation de la LPL (59).

2.4. Régulation de la LPL

L'activité catalytique de la LPL vis-à-vis des TG est soigneusement contrôlée afin d'ajuster, en fonction des besoins des tissus, l'absorption des acides gras (60). Cette régulation implique de multiples mécanismes agissant à différents niveaux et est la réponse aux variations nutritionnelles (jeun, prise alimentaire, ...), pathologiques (diabète, athérosclérose, ...) et hormonales (insuline, glucocorticoïdes, ...) (61).

Il existe des protéines impliquées dans régulation de la synthèse ou du métabolisme de la LPL : APOC2, APOA5, GPIHBP1, LMF1. Des mutations au niveau de ces gènes vont provoquer des pertes d'activité de la LPL et vont contribuer à l'émergence d'hypertriglycéridémies sévères (62).

2.4.1. LMF1

LMF1, lipase maturation factor 1, est une protéine membranaire polytopique du réticulum endoplasmique (63). Elle est composée de 5 segments transmembranaires qui séparent la protéine en 6 domaines (figure 8) (64). Cette protéine est impliquée dans la maturation post-traductionnelle des lipases homodimériques suivantes : la lipoprotéine lipase, la lipoprotéine hépatique et la lipoprotéine endothélial. Elle serait impliquée dans l'assemblage de monomères partiellement pliés et/ou dans la stabilisation des homodimères de lipase (63).

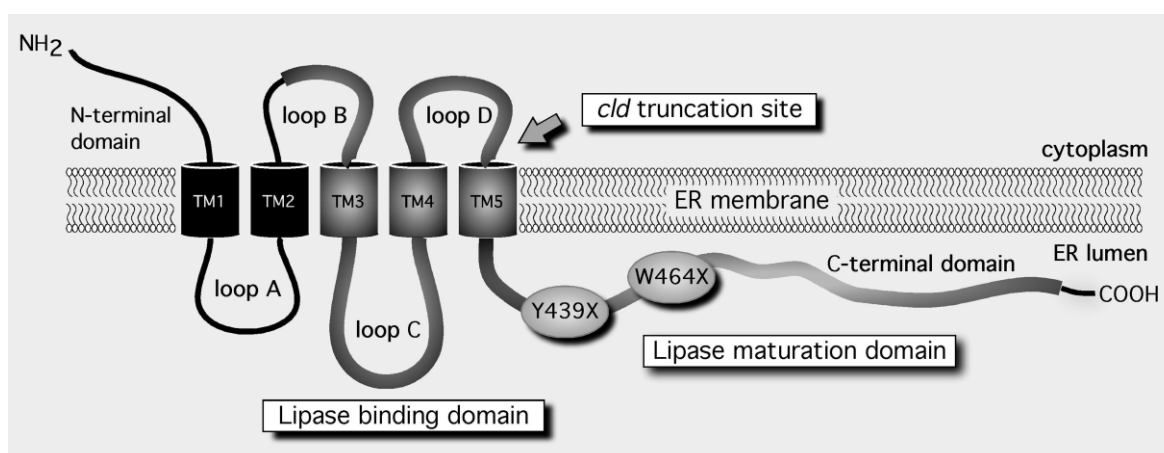


Figure 8 : Topologie membranaire de LMF1 (64)

Toutes les mutations connues de LMF1 associées à un déficit combiné en lipases provoquent une troncature du domaine C-terminal indiquant alors le rôle prédominant de cette région dans la maturation des lipases. Dans les régions cld et p.Tyr439* on note une perte complète de la fonction de maturation (65) alors qu'une mutation en aval de la région p.Trp464* entraîne une perte de fonction d'environ 60% (66). De plus, la boucle C a été identifiée comme étant un site de liaison des lipases, elle permet leurs assemblages et leurs pliages (64). Ce

domaine est le plus fortement conservé au sein de LMF1 suggérant que sa fonction de liaison tolère de très faible divergence de séquence (63).

L'implication de LMF1 dans l'activation post-traductionnelle des lipases soulève la possibilité d'un éventuel rôle régulateur dans l'activité des lipases ainsi que dans le métabolisme des lipoprotéines (63).

2.4.2. GPIHBP1

La glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding 1 (GPIHBP1), une protéine GPI ancrée aux cellules endothéliales capillaires (67). GPIHBP1 se lie à la LPL dans l'espace interstitiel et assure le transport à travers les cellules vers la lumière capillaire pour se lier ensuite aux HSPG afin d'hydrolyser les TG des lipoprotéines (67). En l'absence de GPIHBP1, la LPL est piégée dans l'interstitium entre les cellules parenchymateuses et n'est pas disponible pour la lipolyse des LRTG circulantes.

Elle a également été identifiée comme étant fortement impliquée dans l'hydrolyse des TG des lipoprotéines (11). Une étude sur des souris déficientes en GPIHBP1 a montré que la protéine fournit une plate-forme importante dans l'hydrolyse des TG des chylomicrons en réalisant un site de liaison pour la LPL et les chylomicrons. En effet ces souris ont présenté une forte accumulation des chylomicrons dans le plasma (68). L'expression de GPIHBP1 pourrait donc jouer un rôle dans la régulation de la distribution des lipides aux tissus.

Le complexe GPIHBP1-LPL est responsable de la margination des lipoprotéines riches en triglycérides dans les capillaires (61, 69).

2.4.3. ApoC-II

L'ApoC-II joue un rôle primordial dans la lipolyse des TG en activant la LPL (70). Des études ont montré que la séquence C-terminale est nécessaire pour interagir avec la LPL.

Cependant, en cas de concentration élevée, cette protéine va inhiber l'activité de la LPL alors qu'à des concentrations physiologiques elle va l'activer (71), (72) . En effet des souris surexprimant l'ApoC-II humaine ont présenté des

hypertriglycéridémies causées par une accumulation de VLDLs. Ces résultats suggèrent donc que cette protéine joue un rôle complexe dans le métabolisme plasmatique des TGs (71).

2.4.4. ApoAV

L'apolipoprotéine AV (ApoAV) est synthétisée majoritairement par le foie et circule dans le plasma, liée aux chylomicrons, VLDL et HDL (73, 74). Elle régule les lipides plasmatiques en activant la LPL liée aux protéoglycannes, accélérant ainsi l'hydrolyse des TGs (75).

Des études de ciblage chez la souris et de génétique chez l'homme ont établi l'effet de réduction des TGs plasmatique par l'ApoAV. En effet, les mutations provoquant une perte de fonction du gène ApoAV donnent lieu à l'apparition d'hyperchylomicronémie chez l'homme. Toutefois, le mécanisme d'accélération de l'hydrolyse n'est pas encore clairement établi mais il semble inclure des interactions entre ApoAV-LPL et protéoglycannes-GPIHBP1 (76).

3. Place de la LPL dans le diagnostic des hypertriglycériémies

3.1. Les hypertriglycériémies

Les déficits en LPL sont une cause des HTG sévère, plus communément de l'HTG de type I et V selon la classification de Frederickson. Elles sont définies par un taux de TG > 10 mmol/L (77).

3.1.1. Le syndrome d'hyperchylomicronémie familial

Le syndrome d'hyperchylomicronémie familial (FCS Familial Chylomicronemia Syndrom), est caractérisée par une élévation des chylomicrons d'origine génétique (78). La prévalence de cette pathologie dans la population générale est d'environ 1 personne par million d'individus (79). Ce syndrome apparaît la plupart du temps pendant l'enfance ou l'adolescence (79).

Ce syndrome peut être consécutif à :

- Un déficit familial en LPL : c'est une maladie autosomique récessive rare Il a été proposé de classer ce déficit en 3 groupes :
 - o Absence de LPL
 - o Production d'une protéine inactive
 - o Production d'une protéine inactive dépourvue d'affinité aux héparanes sulfates (80)

Les signes cliniques rapportés chez les patients sont des douleurs abdominales sévères et fréquentes, des pancréatites aiguës (ce dernier facteur est déterminant dans le déficit familial en LPL car il peut être létal), des xanthomes, une lipémie rénale et des hépatosplénomégalies (78). Le diagnostic des mutations du gène *LPL* est alors relativement important du fait de la sévérité des signes cliniques.

- Un déficit familial en ApoC-II : c'est une maladie autosomique récessive causée par des mutations au niveau du gène *APOC2* (78). Les signes cliniques sont proches de ceux décrits dans le déficit familial en LPL.

Cependant les symptômes sont souvent plus faibles car la LPL est partiellement activée par cette apolipoprotéine. Le diagnostic est donc établi plus tardivement (78).

- Des inhibiteurs ou auto-anticorps anti-LPL ont été identifiés dans le sang (81). Il a été reporté chez ces patients une activité de la LPL abaissée dans le sang et normale dans les tissus. Les symptômes sont identiques à ceux du déficit familial en LPL.
- Des mutations sur les gènes *GPIHBP1* ou *LMF1* ont aussi été reportées dans le cas d'hyperlipoprotéinémie de type I (68, 82).

3.1.2. L'hyperchylomicronémie multifactorielle

C'est une entité (appelée Multifactorial Chylimocronemia, MCM) due à l'association de prédispositions génétiques, et de facteurs environnementaux (78). Elle se manifeste le plus souvent par une hyperlipidémie majeure ou de type V selon la classification de Frederickson, définie par une élévation des CM et des VLDL (83). La prévalence de cette pathologie dans la population générale est d'environ 1 personne pour 600 individus (79, 83). Le principal critère de distinction entre l'hyperlipidémie de type V et la chylomicronémie familiale est l'âge de début de l'apparition. Les patients atteints d'hyperlipidémies mixtes sont généralement adulte (79, 83, 84).

3.2. Méthodes d'exploration

3.2.1. Explorations génétiques

Les mutations entraînent des pertes de fonction de la protéine LPL conduisant à une hypertriglycéridémie très sévère avec des taux typiquement supérieurs 17 mmol/L (85, 86, 87). Dans la littérature, il a été décrit plus de 150 mutations sur le gène *LPL*. Une analyse systématique et classification sur la nature délétère des mutations a été rapportée récemment (85).

Comme nous avons pu le citer plus haut, la LPL est régulée par différentes protéines : *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *LMF1*. Des mutations peuvent également survenir sur ces protéines entraînant alors un défaut de la LPL et provoquant de

ce fait l'apparition d'hypertriglycéridémie. La recherche de mutation sur les gènes codants ces protéines est donc tout aussi primordiale pour déceler l'origine de la pathologie. Cependant, l'étude génétique seule n'est pas suffisante pour l'exploration et la compréhension de la pathologie. En effet les anomalies génétiques des gènes LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 et LMF1 ne sont retrouvées que dans 30% des cas d'hypertriglycéridémie familiale. Il est alors nécessaire de procéder à des explorations phénotypiques telles que le dosage de l'activité ou/et de la concentration de la LPL afin d'avoir la capacité de qualifier et de quantifier les capacités fonctionnelles de la LPL.

3.2.2. Explorations phénotypiques : Technique de dosage de la LPL

Le bilan lipidique est évalué grâce à : la mesure du cholestérol total, du cholestérol-LDL, du cholestérol-HDL et enfin des triglycérides. Cet examen permet de mettre en évidence des anomalies du métabolisme des lipoprotéines. La majorité des TGs sont contenus dans les VLDL et les CM et que ces deux lipoprotéines sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase. Cette enzyme jouant un rôle déterminant dans la clairance des TGs il est donc intéressant d'évaluer sa fonctionnalité en cas d'hypertriglycéridémie.

Le dosage de la LPL (taux basal, préhéparinique) a longtemps été indisponible en raison d'un manque de sensibilité. Cette détermination était impossible avant l'utilisation des ELISA. Ces méthodes immuno-enzymatiques ont permis de montrer sur des prélèvements pré-hépariniques que le dosage pondéral de la LPL pouvait permettre de caractériser des hyperlipidémies de type 1 (80, 88, 89). La quantification de sa concentration est donc une mesure importante afin d'évaluer son implication dans l'étiologie des HTG.

Dans le cas de la mesure de l'activité, il est nécessaire de procéder à l'injection d'héparine pour décrocher la LPL de l'endothélium vasculaire.

Toutefois, certaines mutations n'impacteront pas sa concentration mais seulement son activité. Pour rappel, la LPL possède une forme inactive dépourvue d'activité catalytique (monomère) et d'une forme active (homodimère) qui nécessite la présence de l'ApoC-II. Contrairement à la méthode du dosage de la concentration, le dosage de l'activité de la LPL est une méthode enzymatique capable de différencier la forme active de la forme inactive.

3.2.2.1. Dosage Immuno-Enzymatique

La technique immunoenzymatique ELISA est un dosage basé sur la reconnaissance sélective et spécifique entre un antigène (Ag) et un anticorps (Ac). La révélation de la réaction Ag-Ac est faite par une enzyme (ex : peroxydase) qui est conjuguée soit à l'Ag soit à l'Ac. Une réaction colorée est produite en agissant sur un substrat chromogénique.

Il existe plusieurs méthodes de dosage : ELISA par compétition, ELISA indirect, ELISA en Sandwich (90, 91).

Ces méthodes possèdent de nombreux avantages :

- Technique sensible en raison de l'utilisation d'Ac
- Technique spécifique en raison de l'utilisation d'Ag monoclonaux
- Un appareillage spécialisé n'est pas nécessaire pour la détection d'un signal

Pour estimer avec précision les concentrations d'un analyte, des courbes de calibrations sont modélisées en utilisant des concentrations connues d'une protéine purifiée. Les concentrations inconnues sont estimées sur la base du point où la densité optique (DO) tombe sur la courbe d'étalonnage (92).

En fonction de l'essai, la courbe de calibration est calculée par des modèles de régression différents : 4 paramètres logistiques, régression linéaire, 3^e ordre polynomial etc. Le modèle 4PL est le plus communément utilisé pour estimer les concentrations des échantillons en ELISA (92, 93).

Des exemples de modèle de régression sont illustrés ci-dessous :

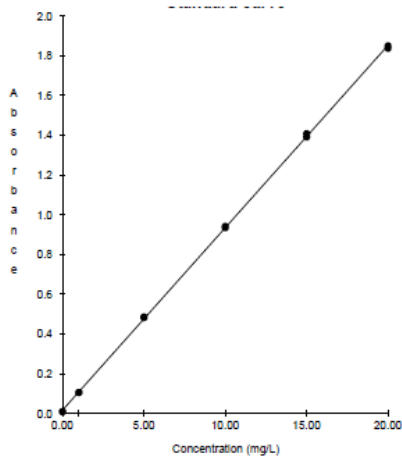


Figure 9: Courbe de calibration en régression linéaire (94)

Ce modèle de régression cherche à établir une relation linéaire entre la variable Y et la variable X suivant la formule (94) : $Y = aX + b$

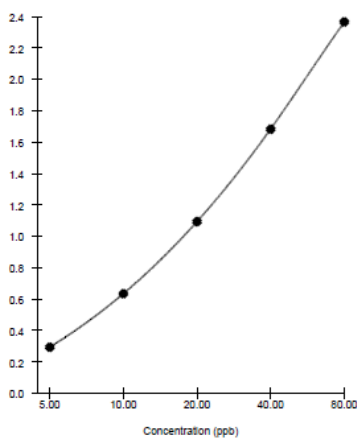


Figure 10: Courbe de calibration en polynomial (94)

Le modèle polynomial ne concerne qu'une seule variable X, qui est élevée à plusieurs puissances croissantes. Cette équation permet de tracer une courbe qui aura autant de points d'inflexion qu'il y a de degrés au polynôme (95):

$$Y = B_0 + B_1X + B_2X^2 + B_3X^3 + \dots$$

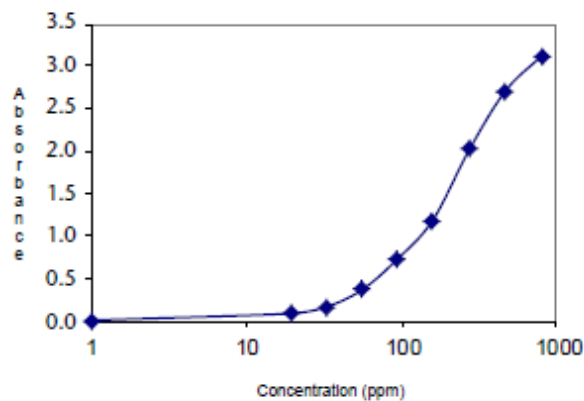


Figure 11: Courbe de calibration en 4 paramètres logistiques (94)

Le modèle logistique à 4 paramètres est un modèle de régression non linéaire comprenant 4 paramètres (94) :

- Asymptote inférieure
- Pente au point d'inflexion
- Concentration au point d'inflexion
- Asymptote supérieure

3.2.3. Mesure de l'activité LPL

La majorité des techniques destinées au dosage de l'activité de la LPL repose sur une injection préalable d'héparine afin de décrocher la lipase de l'endothélium vasculaire. Un pic d'activité est ensuite observé au bout de 10-15 minutes. Malheureusement, d'autres lipases vont être relarguées nécessitant alors l'utilisation de technique capable de doser spécifiquement la LPL.

Initialement, le substrat utilisé pour mesurer l'activité enzymatique était un substrat trioléïne marqué. Au laboratoire des Dyslipidémies du groupement GHE de Lyon, une méthode de mesure de l'activité LPL en post-héparine a été développée. Elle repose sur l'utilisation d'un substrat VLDL naturel, cette technique est à la fois robuste et reproductible et permet d'identifier les patients présentant un déficit majeur en LPL (96).

4. Le système qualité

4.1. Définition de la qualité

Selon l'association française de normalisation, la qualité correspond à « *l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins explicites ou implicites d'un client ou des utilisateurs* ».

Cet outil s'applique dans de nombreux secteurs et contribue à répondre aux exigences du client mais aussi à entretenir une organisation performante par le biais d'un système de management de la qualité (97).

La mise en place de la qualité va permettre de répondre à des enjeux d'ordres économiques, sociaux et fonctionnels mais aussi de se conformer aux contraintes réglementaires (97). Il est demandé aux laboratoires de biologie médicale (LBM) d'être accrédités selon la norme ISO 15189 et d'appliquer l'ensemble des exigences fixées.

4.2. Norme ISO 15189

La norme décrit l'ensemble des exigences de compétences et de qualité propres aux LBM.

Le laboratoire doit : « *déterminer les processus nécessaires pour le système de management de la qualité et garantir leur application au sein du laboratoire, déterminer la séquence et l'interaction de ces processus, déterminer les critères et les méthodes nécessaires pour assurer l'efficacité du fonctionnement et de la maîtrise de ces processus, assurer la disponibilité des ressources et des informations nécessaires au fonctionnement et à la surveillance de ces processus, surveiller et évaluer ces processus, et mettre en œuvre les actions nécessaires pour obtenir les résultats prévus et l'amélioration continue de ces processus.* » (98).

4.3. L'accréditation

Selon le Comité français d'accréditation (COFRAC), l'accréditation est une « *attestation délivrée par une tierce partie, ayant rapport à un organisme d'évaluation de la conformité, constituant une reconnaissance formelle de la compétence de ce dernier à réaliser des activités spécifiques d'évaluation de la conformité* » (99).

L'organisme accréditeur délivre l'accréditation en évaluant le système de management de la qualité et de compétence technique. En cas d'une première accréditation, celle-ci est délivrée pour une durée de 4 ans pour, durant cette période des audits sont programmés pour vérifier l'application correcte des exigences préalablement établies.

Une fois la période écoulée, l'établissement est soumis à une évaluation de renouvellement. En cas de renouvellement, l'accréditation est attribuée pour une période de 5 ans (100).

4.4. Le COFRAC

Le COFRAC, créé en 1994, est désigné comme étant l'unique instance nationale d'accréditation par décret du 19 Décembre 2008. L'accréditation est alors reconnue comme une activité de puissance publique.

Le COFRAC est une association composée d'un Conseil Administratif regroupé dans 3 collèges (A, B et C) et d'une Assemblée Générale (101).

Les collèges sont définis comme suit :

- Le collège A comprend des organismes accrédités ou leurs groupements.
- Le collège B comprend des groupements professionnels d'entreprises ou de personnes ou des structures représentatives d'acheteurs recourant ou pouvant recourir aux services des organismes du collège A.
- Le collège C comprend des représentants d'intérêts publics (Etat, agences de l'Etat, institut nationaux, associations de consommateurs, d'usagers ou

de protection de l'environnement) assurant soit une fonction régalienne, soit la défense d'intérêts collectifs.

Quatre sections sont responsables du processus d'accréditation :

- Section 1 : Laboratoire
- Section 2 : Inspection
- Section 3 : Certifications
- Section 4 : Santé Humaine

Les LBM sont évalués et accrédités par la section Santé Humaine du COFRAC. L'accréditation est basée sur la norme ISO 15189, complétée pour des examens de biologie délocalisée par la norme NF ISO 22870. A terme son domaine d'intervention pourrait s'étendre à de nouveaux actes médicaux techniques (102).

4.5. Validation de Méthode

4.5.1. Définition

Une **méthode** est définie comme : *“un ensemble ordonné de manière logique de principes, de règles, d'étapes qui constitue un moyen pour parvenir à un résultat”*.

La validation de méthode correspond à *“la confirmation que les méthodes non reconnues sont utilisées dans leur domaine d'application, qu'elles correspondent aux besoins “des clients” (patients prescripteurs) et qu'elles sont maîtrisées par le laboratoire.”*

Les méthodes non reconnues sont des *“méthodes développées par le laboratoire (ou méthodes internes) qui doivent être validées de manière appropriée pour l'utilisation prévue et parfaitement documentées.”* (103)

4.5.2. Validation de méthode

La validation de méthode est une des principales exigences de la norme NF ISO 15189. Elle s'applique dans les LBM et permet d'assurer la qualité, le suivi ainsi que la maîtrise de risque des méthodes.

Cette validation suit un protocole validé dans lequel sont définis les critères de performance à vérifier pour déclarer l'aptitude de la méthode.

Le dossier doit contenir les items suivants :

- Présentation du processus analytique (étape(s), méthode(s), éléments à vérifier/valider)
- Maîtrise des risques
- Détermination des critères de performances (paramètres) à vérifier
- Détermination des spécifications ou limites acceptables (objectifs à atteindre) de ces critères
- Vérification bibliographique
- Plan d'expérience et mis en œuvre expérimentale dans le laboratoire
- Compilation et traitement statistique des données obtenues
- Conclusion et décision quant à la validation opérationnelle de la technique, au regard des spécifications (limites acceptables) initialement fixées. (103)

Pour établir la maîtrise technique, le laboratoire devra démontrer au COFRAC que les dispositions prises permettent de répondre aux exigences de la norme NF ISO 15189.

4.5.3. Portée flexible de Type A/Type B

L'adoption de portée de type flexible est imposée aux laboratoires désirant valider/vérifier une méthode amenée à évoluer. **La portée flexible est** : *“énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité (demande d'accréditation).”*(104)

Les demandes d'accréditation sont classées en 2 catégories :

- **Portée flexible standard (A)** : *“portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, d'utiliser sous accréditation les révisions successives des méthodes reconnues et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées.”*
- **Portée flexible étendue (B)** : *“portée correspondant à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'il a adaptées ou développées.”*

Les critères de performances à évaluer lors d'une validation/vérification de méthode sont différents suivant le type de portée adopté.

Critères à Évaluer	Portée Type A		Portée Type B	
	Méthode Qualitative	Méthode Quantitative	Méthode Qualitative	Méthode Quantitative
<i>Fidélité (Répétabilité et Fidélité Intermédiaire)</i>	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>Justesse/Exactitude</i>	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>Incertitudes/Facteurs de variabilités et évaluation</i>	Oui	Maîtrise des Facteurs de Variabilité	Oui	Maîtrise des Facteurs de Variabilité
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire</i>	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>Intervalle de mesure (Limite de quantification et Limite de Linéarité)</i>	Bibliographie	/	Oui	/
<i>Interférence</i>	Bibliographie	Bibliographie	Oui	Oui
<i>Contamination</i>	Bibliographie	Bibliographie	Oui	Oui
<i>Stabilité des réactifs</i>	Bibliographie	Bibliographie	Oui	Oui
<i>Intervalle de référence</i>	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Oui	Oui
<i>Limite de détection</i>	/	Bibliographie	/	Oui
<i>Spécificité/Sensibilité Analytique</i>	/	Bibliographie	/	Oui

Tableau 2: Performances à évaluer lors d'une validation/vérification méthode quantitative/qualitative (102)

Partie II : Etude Expérimentale

1. Objectif de l'étude

Précédemment, la méthode du dosage de la concentration de la LPL n'était pas pratiquée dans l'unité des dyslipidémies du service de Biochimie et Biologie Moléculaire au Centre de Biologie Est. Le but de cette étude est de valider cette méthode de dosage en portée de type B. Tout d'abord, nous avons procédé à une recherche des kits ELISA LPL déjà présents sur le marché. Ensuite, la validation de cette méthode de dosage s'est appuyée sur la procédure de validation des méthodes quantitatives – Vérification/ Validation du Laboratoire de Biologie Médicale Multi-Sites (LBMMS), MU-ANA-PG-001. Cette procédure suit les exigences établies par le COFRAC, celles-ci sont indiquées dans le SH REF 08.

Nous détaillerons ci-dessous l'évaluation des critères de performance.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Prélèvements

Les prélèvements sont réalisés à 0 minutes (T0) et à 10 minutes (T10) après une injection d'héparine. Cette injection d'héparine permet d'atteindre une concentration maximale de LPL au bout de 10-15 minutes. Les sujets inclus dans l'étude sont des patients présentant une hypertriglycéridémie sévère. En parallèle, 30 patients ne présentant pas d'hypertriglycéridémie ont été sélectionnés pour constituer les sujets témoins.

2.2. Sujets

Un total de 54 patients (37 hommes, 17 femmes, moyenne d'âge : 43 +/- 13,7 ans) a été sélectionnés avec les critères suivants : présence d'une hypertriglycéridémie >15mmol/L ou >10mmol/L avec des antécédents d'hypertriglycéridémie.

Un total de 30 sujets contrôles (17 hommes, 13 femmes, moyenne d'âge : 60 +/- 15.8 ans) ont été recrutés avec les critères suivants : TG<3mmol/L, LDL<4.9mmol/L, absence de diabète, aucune prise de fibrates.

Les échantillons de sang veineux ont été prélevés sur des tubes EDTA en pré héparine (T0) puis 10 minutes après l'injection intraveineuse de 50 UI/kg d'héparine (T10). Les échantillons de plasma sont conservés à -80°C.

Un consentement écrit des patients et des témoins, après avis d'un comité de protection des personnes (CPP), a été obtenu avant tout prélèvement et analyse

2.3. ELISA

2.3.1. Kits commercialisés disponibles

Par ailleurs, différents critères ont été fixés par le LBM pour doser la LPL :

- Les dosages doivent pouvoir être réalisés en pré et post héparine
- Prélèvements sur des tubes EDTA
- La détection doit être la plus sensible possible

L'état des lieux réalisé en 2015 a permis d'identifier quatre kits différents :

- Cell Biolabs (STA-611)
- ALPCO (47-LPLHU-E01)
- Biovendor (RSC73871-2R)
- Cusabio (CSB-E08493h)

2.3.2. Etapes du dosage

Les étapes du dosage en ELISA sont les suivantes :

- Incubation du Plasma dilué sur une plaque coatée avec un anticorps spécifique à la LPL, c'est-à-dire que les puits sont recouverts d'anticorps anti LPL
- Lavages
- Incubation avec un anticorps spécifique de la LPL
- Lavages
- Incubation avec un anticorps couplé à une enzyme (ex : phosphatase alcaline, peroxydase, ...)
- Lavages
- Incubation avec le substrat
- Arrêt de la réaction
- Lecture de la coloration au spectrophotomètre (492nm)
- Calcul des concentrations

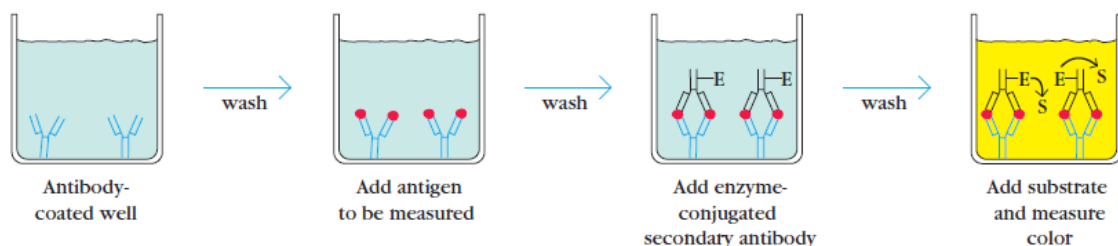


Figure 12: Principe de la méthode ELISA en Sandwich (105)

2.3.3. Technique de détection : Lecteur PerkinElmer EnSpire 2300

Nous avons utilisé le lecteur de microplaques PerkinElmer EnSpire 2300 pour la lecture finale des DO par absorption lumineuse. Un programme a été préenregistré dans lequel : l'absorption est fixée à 492 nm, la hauteur de mesure est de 7.5 mm et 100 flashs sont émis dans chaque puits. La moyenne de ces flashs est calculée pour obtenir la DO.

2.4. Comparaison Modèles de Régression

Premièrement, les données de quatre calibrations contenant sept standards ont été utilisées pour comparer :

- Les pourcentages de récupération (rapport de la concentration observée à la concentration théorique). Ils doivent être compris entre 80 et 120% et être le plus proche possible de 100% (106).
- Les coefficients de détermination des droites de régression. Ils doivent être supérieurs à 0.999

Deuxièmement, une comparaison de méthode a été effectuée sur 160 échantillons. Le modèle 4PL a été considéré comme modèle de référence d'après l'étude de Herman *et al* (92).

Nous l'avons alors choisi nous aussi comme modèle de référence pour construire les diagrammes des DI, les diagrammes des QI et les courbes de corrélation.

La formule des limites de suivi, calculée pour les diagrammes des DI, est :

$$LS = 3 * \sqrt{(\text{écart-type}^2 (\text{méthode 1}) + \text{écart-type}^2 (\text{méthode 2}))}$$

La formule du diagramme des QI est :

$$\frac{\text{Concentration méthode 2}}{\text{Concentration méthode 1}}$$

2.5. Critères de Validation

2.5.1. Fidélité

2.5.1.1. Répétabilité

Dans le SH GTA 04 qui est le guide technique d'accréditation des méthodes en biologie médicale, il est précisé que le CV obtenu est comparé à celui annoncé par le fournisseur ou à des sociétés savantes (104).

La répétabilité (n=6) a été évalué en intra-série sur deux niveaux de pool de plasma.

2.5.1.2. Fidélité Intermédiaire

La fidélité intermédiaire (n=8) a été évaluée sur deux niveaux de pool de plasma sur une durée de 15 mois.

2.5.2. Etendue de Mesures

La LD correspond à la plus faible concentration d'un analyte qui peut être distinguée du blanc tandis que la LQ correspond à la limite de linéarité basse.

Nous avons évalué la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) à l'aide de six mesures du blanc provenant d'une même série. Pour transposer ces valeurs en une concentration, nous avons utilisé le logiciel MyAssays et un facteur de dilution égal à 3 et 10 a été appliqué.

- La LD a été estimée comme suit : moyenne + 3*écart-type
- La LQ a été estimée comme suit : moyenne + 10*écart-type

Les dilutions théoriques utilisées sur nos échantillons sont de l'ordre du 1/10^e en pré-héparine et du 1/20^e en post-héparine.

La limite supérieure de l'étendue de mesure a été vérifiée par différentes dilutions (1/10^e ; 1/12,5^e ; 1/15^e ; 1/17,5^e, 1/20^e). Les échantillons ont été dilués dans le « Dilution Buffer » (fournit dans le kit ELISA).

2.5.3. Intervalles de Référence

Les intervalles de référence ont été établis à T0 (n=29) et T10 (n=29), comme suit : IR = moyenne \pm écart-type.

2.5.4. Diagnostic moléculaire

Après l'extraction de l'ADN génomique, les régions codantes et les jonctions introniques des gènes *LPL*, *APOA5*, *APOC2* et *GPIHBP1* ont été amplifiées par PCR puis analysés soit par dHPLC soit par séquençage dans le laboratoire du Dr Marçais. Une analyse des mutations sur ces gènes a été effectuée afin de réaliser une corrélation entre le génotype et la quantification de la LPL masse.

Le tableau 3 ci-dessous identifie les différents groupes de patients en fonction des résultats génétique obtenus.

Groupe 0	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Groupe 6
Contrôle (n=30)	Aucune variation sur les gènes <i>LPL</i> , <i>GPIHBP1</i> , <i>APOA5</i> et <i>APOC2</i> (n=14)	Polymorphisme mineur	Variation délétère hétérozygote : <i>LPL</i> , <i>GPIHBP1</i> , <i>APOA5</i> et <i>APOC2</i> (n=6)	Variation délétère hétérozygote avec présence d'un polymorphisme : <i>LPL</i> , <i>GPIHBP1</i> , <i>APOA5</i> et <i>APOC2</i> (n=3)	Variation délétère homozygote ou hétérozygote composite : <i>LPL</i> (n=3), <i>GPIHBP1</i> (n=2)	Patients avec des anticorps anti-LPL (n=1)

Tableau 3: Classification des groupes de patients en fonction des résultats de génétique

2.5.5. Sensibilité et Spécificité

La sensibilité et la spécificité ont été évaluées par rapport à :

- La présence ou non de mutation au niveau du gène *LPL* ainsi qu'au niveau du gène des protéines de régulation : *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *LMF1* (n=49)
- L'activité LPL (n=78)

2.5.6. Analyse Statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec Excel, le logiciel GraphPad et le logiciel Myassays (107) (MyAssays Limited).

Les variables quantitatives ont été comparées à l'aide du test de Student, elles sont considérées significatives lorsque $p < 0,05$. Les régressions ont été évaluées grâce à quatre modèles : double logarithmique, logarithme népérien, 2^{ème} ordre polynomial, 3^{ème} ordre polynomial, 4 paramètres logistique (4PL).

3. Résultats

3.1. Sélection du kit

3.1.1. Etudes Bibliographiques

Le tableau ci-dessous illustre les caractéristiques des quatre kits ELISA identifiés lors de l'état des lieux :

	Cusabio	Biovendor	Cell Biolabs	ALPCO
Echantillons	Pré- et post-héparine	Post-héparine	Pré et post-héparine	Pré- et post-héparine
Unités de mesure	ng/L	µg/L	µg/L	µg/L
Conclusion	Rejet : Les intervalles de références du kit sont incohérents avec ceux identifiés dans la bibliographie	Rejet : Dosage uniquement en post héparine	Conservé : Vérification du kit sur des dosages	Conservé : Vérification du kit sur des dosages

Tableau 4: Caractéristiques des kits ELISA

3.1.2. Résultat Préliminaire

En premier lieu, le kit de Cell Biolabs a été testé en incluant les standards, des patients et des témoins.

Dans le premier essai, l'absorbance du point le plus haut de la gamme standard (500ng/ml) a obtenu une DO=0.5. En théorie celle-ci devrait se trouver entre 1.2-2. De plus, les valeurs entre la DO1 et la DO2 (duplicats) sont censées être proches. Mais dans notre cas on observe une non répétabilité entre les deux DO à la fois sur des patients, des blancs et sur la gamme standard. Les deux autres dosages ont révélé des résultats identiques (Annexe 2).

Après avoir contacté le fournisseur et réalisé ces trois dosages, ce kit a été abandonné. Notre second choix s'est porté sur le dernier kit restant : le kit ALPCO.

Dans le premier essai, le point le plus haut de la gamme standard (23 ng/mL) obtient bien une DO comprise dans l'intervalle 1.2-2. De plus, une répétabilité entre les DO1 et DO2 est observée. Les dosages suivants ont présenté des résultats identiques. Nous avons donc décidé de nous orienter sur l'utilisation de ce kit.

3.1.3. Etude de faisabilité

Les prélèvements effectués pour les patients et les témoins ont été réalisés sur tube EDTA. Mais, le fournisseur recommande de réaliser les prélèvements avec des tubes hépariné ou sans anticoagulant (sérum).

Nous avons donc procédé à une étude comparative entre des prélèvements EDTA et sérum pour vérifier s'il était possible de doser la LPL avec les tubes EDTA. Les résultats de la comparaison sont présentés ci-dessous :

Prélèvement	[Sérum] µg/L	[EDTA] µg/L	Différence
P1 T0	32,6	21,9	33 %
P1 T10	285	288	1 %
P1 T10	374	301	20 %

Tableau 5: Comparaison du prélèvement sérum et EDTA

Les résultats ont montré qu'il est possible de doser une concentration de LPL avec des prélèvements EDTA. Et bien qu'une différence entre les deux prélèvements apparaisse, l'interprétation des résultats n'est pas impactée.

3.1.4. Comparaison modèles de régression

La moyenne ainsi que les valeurs extrêmes des pourcentages de récupération sont présentées dans le tableau 6 ci-dessous :

	Log-log	Ln	2e ordre polynomial	3e ordre polynomial	4PL
Std 23ng/ml	78% ¹	92%	89%	92%	100%
	[76,24 - 81,02] ²	[94,91 - 100,17]	[81,29 - 93,96]	[82,26 - 96,10]	[99,34 - 100,75]
Std 11,5ng/ml	107%	113%	99%	100%	100,96%
	[104,28 - 110,27]	[111,11 - 118,90]	[97,98 - 99,55]	[99,81 - 100]	[99,77 - 101,8]
Std 5,75ng/ml	118%	109%	102%	101%	98%
	[116,26 - 119,21]	[105,15 - 106,83]	[101,01 - 103,74]	[99,85 - 101,13]	[97,34 - 100,76]
Std 2,875ng/ml	114%	96%	101%	99%	99%
	[111,63 - 115,07]	[88,24 - 91,37]	[98,81 - 102,54]	[97,74 - 100,99]	[98,34 - 101,76]
Std 1,437ng/ml	106%	90%	100%	100%	103%
	[103,01 - 108,44]	[82,58 - 84,94]	[99,36 - 100,84]	[98,95 - 100]	[101,07 - 106,4]
Std 0,719ng/ml	94%	92%	95%	99%	100%
	[86,29 - 99,35]	[86,59 - 93,81]	[90,20 - 98,85]	[93,16 - 102,46]	[94,88 - 103,05]
Std 0,359ng/ml	88%	114%	108%	107%	86%
	[85,22 - 96,13]	[120,42 - 127,49]	[101,65 - 114,94]	[102,39 - 112,15]	[73,04 - 95,17]

Tableau 6: Comparaison des pourcentages de récupération obtenus sur quatre dosages. (¹ : Moyenne des pourcentages de récupération et ² : [minimum – maximum] obtenus sur les quatre dosages)

Les pourcentages de récupération sont compris entre 80 et 120% avec tous les modèles de régression. Toutefois, les moyennes des pourcentages de récupération des modèles double logarithmique et logarithmique népérien fluctuent (log-log : 76% à 119% ; ln : 83% à 127%) et sont éloignés des 100% désirés. La moyenne d'éloignement des 100% attendu sur les sept standards est de 12.14% +/- 6,28% pour le modèle double logarithmique et, est de 9.42% +/- 3,35% pour le modèle logarithmique népérien. A l'inverse, les pourcentages de récupération des modèles 4PL et polynomiaux avoisinent les 100%.

Le tableau ci-dessous (tableau 7) permet d'apprécier les coefficients de détermination obtenus à partir des quatre dosages pour les modèles de régression du 2^e ordre polynomial, 3^e ordre polynomial et des 4 paramètres logistiques.

4PL	3e ordre polynomial	2e ordre polynomial
0,9978	0.9980	0.9980
0,9994	0.9994	0.9991
0,9996	0.9998	0.9997
0,9995	0.9996	0.9994

Tableau 7: Comparaison des coefficients de détermination sur 4 dosages

Les intervalles de référence recalculés permettent de déterminer que les modèles de régression 4PL (tableau 8) et du 3^e ordre polynomial (tableau 9) ne sont pas significativement différents.

	T0 (=29)	T10 (n=29)
Moyenne	41,75	272,51
Ecart Type	17,77	77,16

Tableau 8: Intervalles de références à T0, T10 en 4PL

	T0 (n=29)	T10 (n=29)
Moyenne	41,86	271,29
Ecart Type	18,00	75,43

Tableau 9: Intervalles de références à T0, T10 en 3e ordre polynomial

Le tableau ci-dessous (tableau 10) regroupe les résultats obtenus à partir des diagrammes des différences et des droites de régression pour chacun des modèles (voir Annexe 3 à 6). Le modèle de régression des 4 paramètres logistiques a été choisi comme modèle de référence pour la construction de ces diagrammes.

Modèle de régression	Diagramme des DI	Droite de régression
Log-log	1 déviant	$y = 0,9034x + 12,298$ $R^2 = 0,9813$
Ln	8 déviants	$y = 1,0362x + 2,928$ $R^2 = 0,981$
2 ^e ordre polynomial	1 déviant	$y = 0,9387x + 3,8498$ $R^2 = 0,9974$
3 ^e ordre polynomial	2 déviants	$y = 0,9976x - 1,6741$ $R^2 = 0,9925$

Tableau 10: Synthèse des diagrammes des différences et des droites de régression

3.1.5. Répétabilité

Le tableau ci-dessous (tableau 11) montre les résultats obtenus lors de l'étude de la répétabilité :

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) dans la littérature (108)	Conclusion
Pool Pré Héparine 25/03/2015	6	23,78	0.79	3.3%	10%	1.8%	Conforme
Pool Post Héparine 25/03/2015	6	259.0	8.9	3.4%	10%	2.1%	Conforme

Tableau 11: Evaluation de la répétabilité

La répétabilité est conforme car les CV sont inférieurs aux spécifications du fournisseur.

3.1.6. Fidélité Intermédiaire

Le tableau ci-dessous (tableau 12) montre les résultats obtenus lors de l'étude de la fidélité intermédiaire :

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) dans la littérature (108)	Conclusion
Pool Pré Héparine	8	25.39	1.57	6.21%	NA	14.5%	Conforme
Pool Post Héparine	8	249,91	14,50	5.81%	NA	13.1%	Conforme

Tableau 12: Evaluation de la fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire est conforme car les CV sont inférieurs à ceux trouvés dans la littérature.

3.1.7. Etendue de mesure

Le modèle des 4 paramètres logistiques ne permet pas de déterminer la limite de détection car la DO est en-dehors des limites de tolérance.

La limite de quantification a pu être déterminée et, elle est égale à 1.352 µg/L.

Le tableau ci-dessous (tableau 13) montre les résultats obtenus lors de l'étude de la limite de linéarité :

Facteur de dilution	Concentration attendue (µg/L)	Concentration observée (µg/L)	Pourcentage de Récupération
20	402	402	100%
17,5	402	405	99%
15	402	407	98%
12,25	402	572	70%
10	402	1203	33%

Tableau 13: Limite de linéarité

D'après ces résultats, on peut observer qu'une linéarité est présente jusqu'à la dilution au 15^e. Les examens étant réalisés au 20^e, il a fallu transposer la concentration obtenue au 15^e pour calculer la concentration correspondant à la limite de linéarité : $\frac{407 \cdot 20}{15} = 543$

Le test de linéarité permet donc d'apprécier des concentrations linéaires jusqu'à 543 µg/L. La limite supérieure de linéarité a donc été retenue à la valeur de 500 µg/L qui correspond aux spécifications indiquées par le fournisseur.

3.1.8. Intervalle de Référence

Nos dosages étant réalisés sur des tubes d'EDTA, nous avons dû réévaluer les intervalles de référence. Les intervalles de références à T0 et T10 ont été déterminés à partir des concentrations obtenues sur les sujets contrôles (n=29).

On obtient à :

- T0 : 41.75 +/- 17.77 µg/L (1 écart-type)
- T10 : 272.51 +/- 77.16 µg/L (1 écart-type)

Ces intervalles de références ne sont pas significativement différents de ceux annoncés par le fournisseur (T0 = 45-63 ng/mL et T15=164-284 ng/mL, *test statistique non indiqué par le fournisseur*). Ces résultats ne sont pas non plus différents des intervalles rapportés par *Kimura et al* (109) qui ont obtenu 15 minutes après l'injection d'héparine 257 +/- 59 µg/L avec le kit MARKIT-F (p=0.39) et 267 +/- 53 µg/L avec un kit ELISA maison (p=0.7646).

3.1.9. Distribution chez les témoins et les patients

En complément des intervalles de référence, la distribution des concentrations de LPL a été étudiée. Chez les témoins, les concentrations de LPL à T0 et T10 présentent une distribution normale ($p > 0.10$). Chez les patients, la distribution des concentrations à T0 et T10 ne suit pas la loi normale. Les cuts off mis en évidence par les histogrammes (figure 13 et 14) sont de à 15 $\mu\text{g/L}$ à T0 et à 125 $\mu\text{g/L}$ à T10.

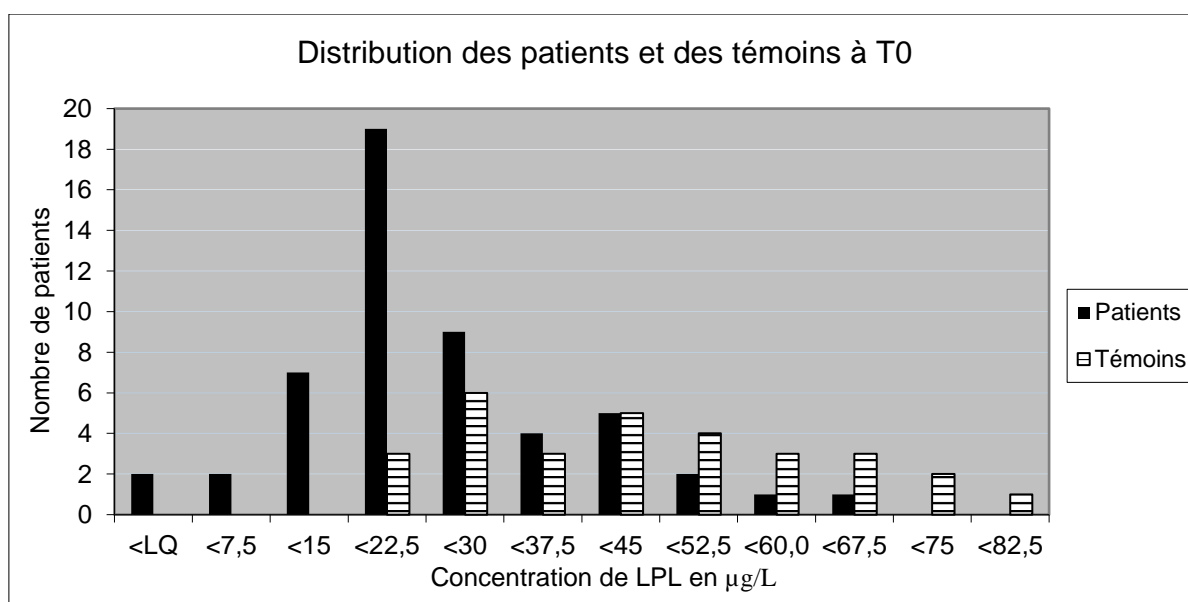


Figure 13: Distribution de la concentration de LPL à T0 chez des patients HTG et des sujets contrôles

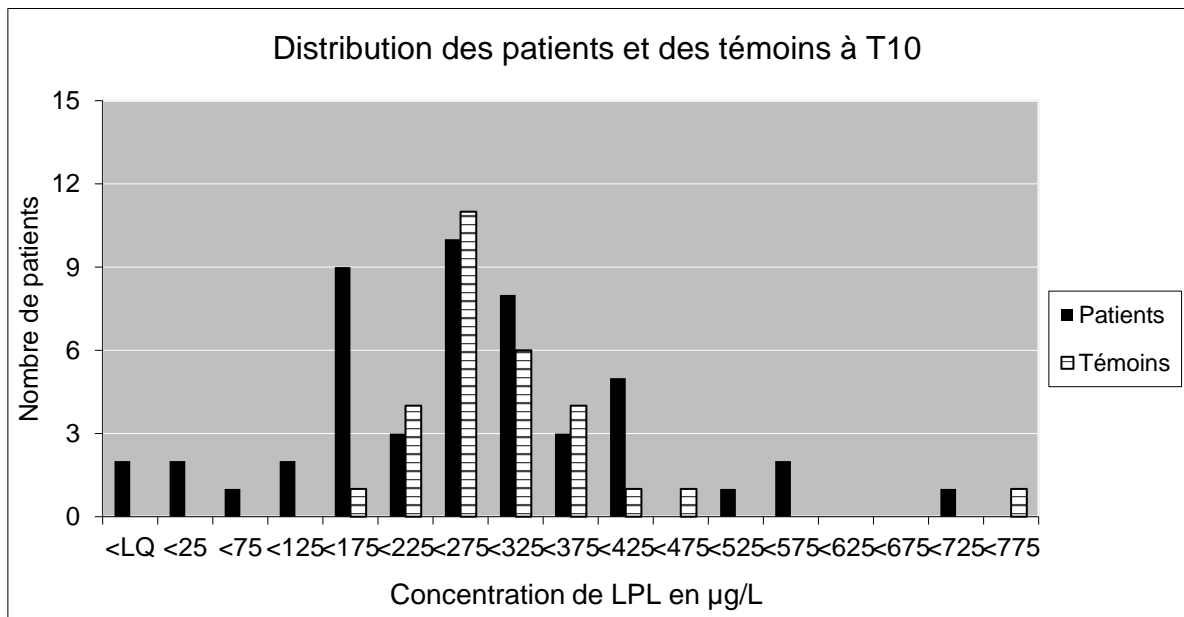


Figure 14: Distribution de la concentration de LPL à T10 chez des patients HTG et des sujets contrôles

3.1.10. Concentration et activité de la LPL en fonction du diagnostic moléculaire

Parmi les 54 patients de l'étude présentant une hypertriglycémie, un résultat de recherche de mutation sur les gènes *LPL*, *APOA5*, *GPIHBP1*, et *APOC2* était disponible pour 48 d'entre eux. Ces patients ont été classés dans le tableau ci-dessous (tableau 14) en fonction de la sévérité des variations. (Les valeurs entre parenthèses correspondent aux valeurs minimum et maximum obtenues dans chaque groupe).

Groupe	Catégories	N (effectifs)	Moyenne TG en mmol/L	LPL masse à T10 en µg/L	Activité LPL en µmol/L/min
0	Contrôle	30	1.22 (0.56 – 2.79) ¹	296.27 (145.2 – 742.8)	34.70 (10.6 – 62.2)
1	Aucune variation sur LPL, GPIIb/IIIa, APOA5, APOC2	14	14.63 (1.5 – 61.66)	222.94 (131.9 – 318.9)	33.29 (14.6 – 53.8)
2	Polymorphisme mineur	19	14.33 (1.53 – 31.46)	296.09 (19.07 – 565.8)	37.33 (1.8 – 53.2)
3	Variation délétère hétérozygote	6	15.17 (2.89 – 51.63)	340.85 (169.6 – 535.7)	33.25 (7.6 – 38.8)
4	Variation délétère hétérozygote avec présence d'un polymorphisme	3	7.00 (2.58 – 13.99)	187.18 (91.16 – 317.9)	26.43 (16.1 – 41.6)
5	Variation délétère homozygote ou hétérozygote composite	5	12.43 (3.6 – 34.95)	(< limite de quantification – 165,3)	(< 1,8 – 5,6)
6	Patient avec des anticorps anti-LPL	1	35.4	686.1	74.8

Tableau 14: Diagnostic moléculaire et quantification de la concentration et de l'activité de la LPL à T10 (10 minutes après injection d'héparine).

Des polymorphismes mineurs ont été retrouvés chez 14/48 patients (groupe 2). Deux patients de ce groupe présentent des concentrations de LPL en dehors des valeurs normales, le premier présente à la fois une concentration et activité effondrée (19.07µg/L, 1.8µmol/L/min), le second présente une concentration

légèrement abaissée et une activité à la limite de la normale (110,3µg/L, 11,6µmol/L/min).

Des variations délétères hétérozygotes ont été retrouvées chez 6/48 patients (groupe 3). La plupart des patients de ce groupe présentent une concentration et une activité LPL normale et 1 patient montre seulement une activité LPL abaissée (7.6 µmol/L/min).

Le groupe 4 comprend 3/48 patients et se compose de patients comprenant une variation délétère hétérozygote ainsi qu'un polymorphisme. L'un d'eux montre une baisse uniquement de la concentration de LPL à T10 (91.16µg/L).

Des variations délétères homozygotes ou hétérozygotes composites ont été retrouvées chez 5/48 patients (groupe 5). L'ensemble de ces patients présente une concentration et/ou une activité inférieure à l'intervalle de référence. Le dosage pondéral de la LPL aurait pu être suffisant pour deux d'entre eux car la concentration en LPL masse est inférieure à la limite de quantification. A l'opposé, un des patients présente une concentration normale (165.3µg/L) et une activité effondrée (< 1.8µmol/L/min). Les deux derniers ont montré à la fois une concentration et une activité inférieure aux cut-off déterminés (19.87µg/L, 5.5µmol/L/min et 43.09µg/L et 5.6µmol/L/min).

3.1.11. Sensibilité et Spécificité

Le tableau ci-dessous (tableau 15) permet d'apprécier la sensibilité et la spécificité de la technique en confrontant les profils génétiques des patients aux concentrations de LPL relevées à T10 (cut off : 125 µg/L).

	Génétique		Total
	Homozygote	Non Homozygote	
LPL < 125 µg/L	4	3	7
LPL > 125 µg/L	1	41	42
	5	44	49

VPP	57%	Sensibilité	80%
VPN	98%	Spécificité	93%

Tableau 15 : Détermination de la sensibilité et de la spécificité - Concentration de LPL en fonction du profil génétique

Il y a 80% de probabilité que des variations délétères homozygotes soient présentes chez des individus pour lesquels la concentration de LPL est inférieure à 125 µg/L et 93% de probabilité que des individus arborant une concentration de LPL supérieure à 125 µg/L ne présentent pas de variations délétères homozygotes ou hétérozygotes composites.

Le tableau ci-dessous (tableau 16) permet d'apprécier la sensibilité et la spécificité de la technique en confrontant à T10 les concentrations LPL des patients à l'activité LPL.

	Activité		Total
	LPL < 10 µmol/min	LPL > 10µmol/min	
LPL < 125 µg/L	5	2	7
LPL > 125 µg/L	2	69	71
	7	71	78

VPP	71%	Sensibilité	71%
VPN	97%	Spécificité	97%

Tableau 16 : Détermination de la sensibilité et de la spécificité – Concentration LPL en fonction de l'activité

Il y a 71% de probabilité que l'activité soit inférieure à 10 µmol/L/min chez les individus arborant une concentration de LPL inférieure à 125 µg/L et 97% de probabilité que l'activité soit supérieure à 10 µg/L/min chez les individus arborant une concentration de LPL supérieure à 125 µg/L.

4. Discussion

L'étude présentée ici a permis de valider une méthode analytique capable de déterminer des concentrations de LPL en pré- et post-héparine.

La validation de méthode s'est déroulée avec le kit ALPCO en portée de type B car des modifications ont été apportées aux spécifications du fournisseur. L'utilisation de tube EDTA nous a conduit à vérifier la possibilité de doser la LPL avec cet anticoagulant. La première étude opposant les tubes EDTA versus les tubes sérum a montré qu'il était possible d'utiliser les tubes EDTA. Toutefois, une seconde étude est programmée en incluant un plus grand nombre d'échantillons et en suivant les mêmes conditions d'acheminement pour recueillir plus de données. Par ailleurs, les intervalles de références ont été établis en utilisant des prélèvements réalisés sur tube EDTA.

L'étude des modèles de régression, réalisée sur cinq modèles différents, a permis de déterminer lequel estime le plus précisément les concentrations de LPL dans les échantillons analysés. Le pourcentage de récupération est fréquemment calculé pour évaluer la précision d'un modèle au cours d'une technique ELISA (106, 110) . Nous l'avons donc déterminé pour chacun des modèles. Le modèle double logarithmique, celui recommandé par le fournisseur, s'est révélé être l'un des moins précis, les pourcentages de récupérations ont présenté de grandes variations (minimum : 76%, maximum : 119%) (Annexe 1) tout comme le modèle logarithmique népérien (minimum : 90%, maximum : 114%). En 2008, *Herman et al.* ont comparé le modèle de régression de référence des ELISA (4PL) aux modèles du 2^e et 3^e ordre polynomial (92). Ils ont évalué le pouvoir prédictif des valeurs résiduelles pour les comparer ensuite entre les modèles. Ils en ont conclu que les deux modèles polynomiaux génèrent moins de biais et fournissent des estimations plus précises sur leurs échantillons d'analyses par rapport au modèle 4PL. Les mêmes conclusions ont été obtenues dans notre étude. En effet, la comparaison a montré des pourcentages de récupération similaire (avoisinant les 100%) pour les trois méthodes confirmant bien la haute performance de celles-ci. Les coefficients de détermination sont tous supérieurs à 0.999, ce qui démontre le fort pouvoir prédictif de ces trois modèles mais il a montré des valeurs légèrement

supérieures pour le modèle du 3^e ordre polynomial. Nous avons toutefois décidé de nous servir du modèle des 4 paramètres logistiques pour différentes raisons. La première étant que ce modèle correspond au modèle de régression recommandé pour réaliser des ELISA (92, 93), la seconde est que, contrairement aux modèles polynomiaux, la limite de quantification a pu être déterminée et, il est directement programmable sur le lecteur Perkin EnSpire limitant ainsi les risques de retranscription sur le logiciel Myassays. Nous avons donc choisi de nous baser, pour notre étude, sur le modèle des 4 paramètres logistiques.

L'ensemble des critères de performances sont satisfaisants et répondent aux exigences du laboratoire, à la littérature ainsi qu'aux recommandations du fournisseur (108). La fidélité intermédiaire et la répétabilité ont été évaluées uniquement sur six simplicats car, le coût total du kit s'élève à 11.63€ par puits (96 puits), en déduisant les puits de la gamme, du blanc et des CIQ (86 puits), le montant s'élève à 12.99€ par puits. Le fournisseur indique des coefficients de variation de 10% pour la répétabilité en pré- et post-héparine, aucun CV n'est indiqué pour la fidélité intermédiaire. Nous avons trouvé dans la littérature des CV de 1,8% et 2,1% pour la répétabilité et des CV de 14,5% et 13,1% pour la fidélité intermédiaire respectivement en pré- et post-héparine. Nos CV ont été calculés à 3,3% et 3,4% pour la répétabilité et à 6,21% et 5,81% pour la fidélité intermédiaire en pré- et post-héparine respectivement. Nous respectons donc les données fournisseur. L'étude de stabilité n'a pas pu être réalisée mais est considérée comme non critique car nous respectons les recommandations de conservation du fournisseur (conservation avant utilisation à une température entre 2-10°C jusqu'à la date de péremption) et que le kit est utilisé en une seule fois. A notre connaissance, il n'existe pas de contrôle de qualités internes commerciales et de contrôle externe de la qualité pour la détermination de la justesse et de l'exactitude. Un échange inter-laboratoire pourrait être envisagé pour pallier cette problématique.

Comme indiqué précédemment, les intervalles de références ont dû être réévalué en raison de modification des spécifications du fournisseur. Ils ont été trouvés à 41.75 +/- 17.77µg/L pour T0 et à 272.51 +/- 77.16µg/L pour T10. Aucun article n'a été trouvé pour identifier une équivalence de l'intervalle de référence à

T0. Le fournisseur du kit indique dans ses spécifications un intervalle de référence de 45-63ng/mL. Cette différence peut provenir soit de la différence d'anticoagulant, soit de conditions pré-analytiques, soit de notre population témoin. En effet, nous avons conduits nos essais avec des tubes EDTA tandis que le fournisseur a utilisé des tubes secs et héparinés. Pour démontrer la possibilité de doser la LPL dans des tubes EDTA nous avons au préalable conduits une étude comparative entre des prélèvements sérums et EDTA (trois échantillons). De cette étude nous avons pu conclure qu'il était possible d'utiliser les tubes EDTA, toutefois une étude comprenant plus d'une dizaine d'échantillons est à prévoir. Lors de nos essais, nos tubes ont été immédiatement mis dans la glace pour éviter la dégradation de l'enzyme, ce qui ne devrait donc pas diminuer nos intervalles de référence, nous ne connaissons cependant pas comment le fournisseur a procédé pour réaliser ses essais. Concernant le prélèvement obtenu 10 min après injection de 50UI/kg d'héparine, une seule étude a été trouvée dans la littérature afin de réaliser une comparaison. Au cours de cette étude (109), ils ont cherché à développer et évaluer une méthode ELISA pour quantifier la LPL masse en post-héparine (10-15 minutes après injection de 30UI/kg d'héparine). Cette étude s'est déroulée sur 33 sujets sains et avec des tubes Na₂-EDTA. Afin d'établir la fiabilité de leur kit, ils l'ont comparé avec un kit déjà commercialisé. Les intervalles de références qu'ils ont obtenus sont de 267,53ng/mL (kit maison) et 257,59ng/mL (kit commercialisé). La différence que l'on observe avec notre intervalle de référence peut être expliquée par le fait que nous avons injecté une quantité différente d'héparine (50UI/kg) : en effet la quantité de LPL libérée dépend de la quantité d'héparine injectée (111). Nous pouvons donc conclure sur la concordance entre notre intervalle de référence et les leur.

A partir de ces intervalles de références et des histogrammes de distribution (figure 25 et 26) nous avons pu déterminer la valeur à laquelle on considère que le patient présente un déficit quantitatif (cut-offs : T0 15µg/L et T10 125µg/L). Le cut-off se calcule normalement en soustrayant deux fois l'écart-type à la moyenne. En procédant ainsi la valeur obtenue est de 6,21µg/L à T0. En se rapportant à l'histogramme, on constate que quatre patients sont en dessous de cette valeur. Ces patients ont tous des variations délétères homozygotes et présentent donc un déficit total en LPL, l'inconvénient de cette limite est qu'elle va exclure les déficits partiels. Pour éviter d'exclure des patients déficitaires nous avons décidé de

soustraire un écart-type à la moyenne et nous obtenons 23,98µg/L à T0 et 195,35µg/L à T10. Cependant, avec ces valeurs un certain nombre de témoins étaient inclus comme présentant un déficit. Nous avons donc choisi au vu des histogrammes de fixer les cut-offs à 15µg/L pour T0 et 125µg/L pour T10. Ces seuils permettent à la fois d'exclure les témoins et à la fois d'inclure des patients présentant des déficits totaux et partiels de LPL. Grâce à ces cut-offs, nous avons pu déterminer la sensibilité et la spécificité du dosage de la concentration de la LPL. On peut conclure que cette méthode présente une forte sensibilité pour détecter les patients présentant des variations délétères homozygotes mais aussi pour relier un déficit de l'activité avec un déficit de la concentration. Cette méthode montre aussi une forte spécificité pour détecter l'absence de variation délétère homozygote ou hétérozygote composite dans le cas d'une concentration supérieure au cut-off mais aussi pour corrélérer une élévation de l'activité lorsque la concentration est supérieure au cut-off.

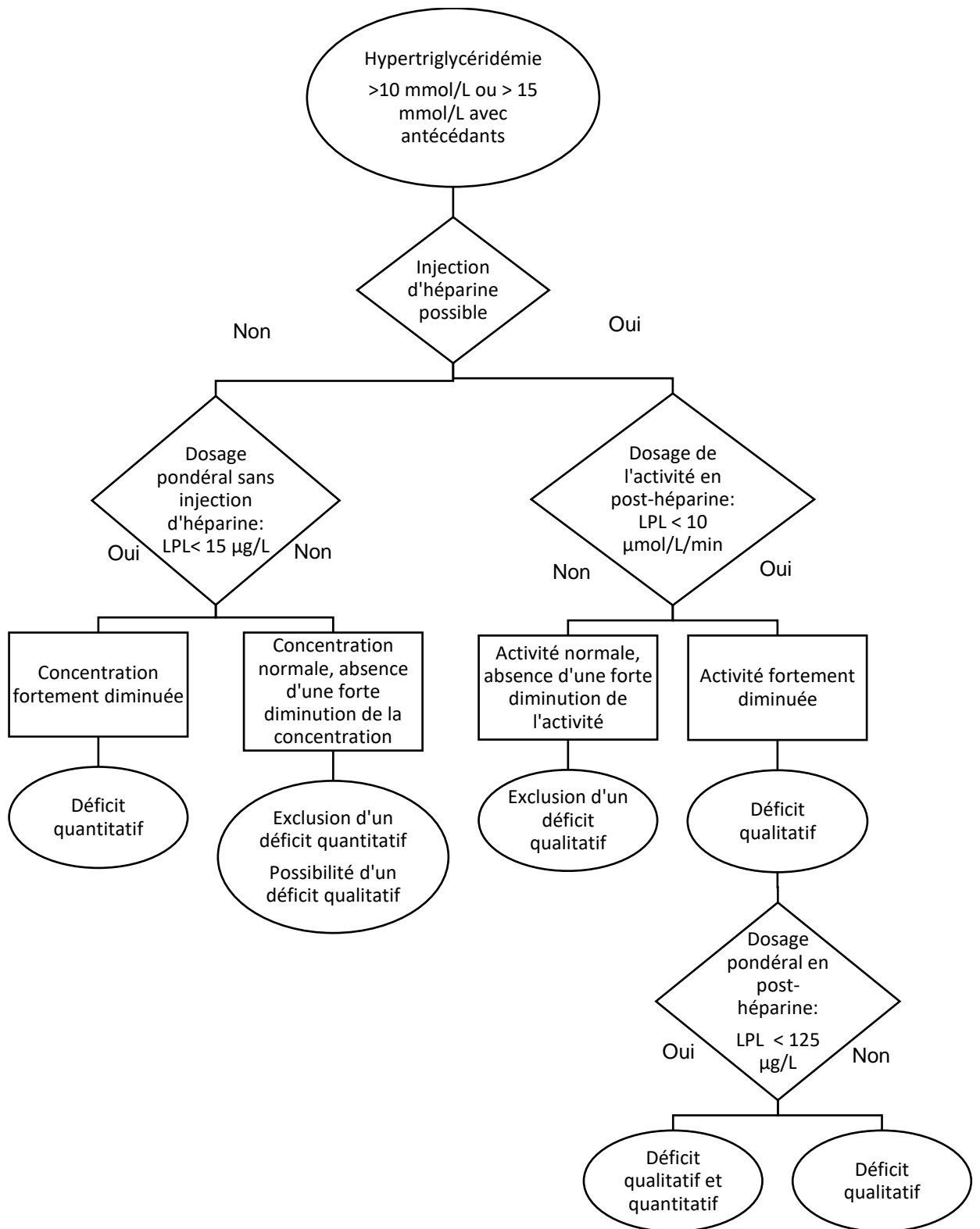
L'intérêt majeur de cette technique par rapport au dosage de l'activité, est la possibilité d'obtenir des concentrations de LPL sans injection d'héparine. Elle permet ainsi d'offrir aux patients présentant une contre-indication à l'héparine un outil de diagnostic adapté à leurs profils. Un déficit quantitatif peut donc être mis en évidence sans injecter d'héparine. Cependant, le diagnostic d'une hypertriglycéridémie due à un déficit en LPL ne peut être établi que lorsque des concentrations de l'enzyme sont inférieurs à 15µg/L en pré-héparine. Dans le cas où les concentrations obtenues sont supérieurs à 15µg/L, il faudra procéder à une injection d'héparine pour décrocher la LPL de l'endothélium vasculaire et déterminer ainsi l'activité et la concentration de LPL.

Combiner le dosage pondéral et le dosage de l'activité de cette enzyme se révèle être intéressant pour évaluer l'implication de la LPL chez les patients hypertriglycéridémiques. Le dosage pondéral de la LPL est un moyen moins contraignant que celui de l'activité pour observer la répercussion des mutations sur l'enzyme. En effet, il est possible d'observer des concentrations en pré-héparine et cette détermination est plus rapide que la technique du dosage de l'activité (une matinée pour le dosage de la concentration de 86 échantillons et deux jours pour le dosage de l'activité de 10 échantillons maximum). On peut

constater sur plusieurs patients présentant des variations délétères homozygotes sur le gène *LPL* des concentrations effondrées dès T0. Dans ces cas, le dosage pondéral de la LPL est suffisant pour conclure à l'implication de la LPL dans l'HTG. Mais parfois, il arrive que des individus présentent des mutations au niveau du gène *LPL* tout en présentant des concentrations normales : c'est notamment le cas lors de mutations faux sens n'empêchant pas la sécrétion de la LPL mais la rendant inactive. De plus, l'enzyme existe sous deux formes (active et inactive) ce qui peut entraîner des erreurs d'interprétation. Il est donc indispensable de coupler le dosage pondéral au dosage de l'activité pour déterminer ainsi une activité spécifique d'enzyme (IU/mg).

D'après les résultats obtenus après injection d'héparine, il s'avère que le dosage de la concentration de la LPL est un paramètre moins pertinent que le dosage de l'activité mais il permet d'obtenir un complément d'information. En effet, comme nous l'avons précédemment constaté avec les résultats de diagnostic moléculaire, certains patients peuvent présenter des concentrations normales de LPL avec une activité effondrée. Pour les patients ayant des variations délétères homozygotes on observe une baisse conjointe de la concentration et de l'activité. Cette observation est cependant aussi constatée chez des patients ayant uniquement un polymorphisme mineur. Différentes hypothèses sont possibles pour expliquer cette diminution conjointe : la présence d'inhibiteurs ou d'auto-anticorps de la LPL qui empêchent sa synthèse ou neutralisent l'activité LPL, la surexpression d'enzyme régulatrice diminuant la synthèse, sa sécrétion ou son transport, la surexpression d'enzyme augmentant sa catalyse, un défaut de relargage depuis l'endothélium vasculaire. Ces éléments sont à étudier chez ces patients pour déterminer la cause de la diminution de leurs TGs.

Posséder ces deux techniques au sein d'un laboratoire de biologie médicale permet de mieux comprendre l'étiologie de l'hypertriglycéridémie. Il convient donc d'établir une méthodologie de diagnostic en fonction de la pertinence de chacune d'entre elles suite à cette étude, nous pouvons proposer le logigramme ci-après :



Conclusion

THESE SOUTENUE PAR : M. CHALVET Virgile

La lipoprotéine lipase est une enzyme clé dans le métabolisme des lipoprotéines. Sa capacité à hydrolyser les triglycérides contenus dans les chylomicrons et les VLDL lui permet d'assurer un rôle primordial dans la régulation des lipides. Le déficit de cette enzyme est une des causes de la survenue des hypertriglycéridémies sévère. On distingue une forme récessive, monogénique, extrêmement rare appelée syndrome de chylomicronémie familiale (Familial Chylomicronemia Syndrom) et une forme plus fréquente, polygénique et multifactorielle, la chylomicronémie multifactorielle (Multifactorial Chylomicronemia). Les résultats des études moléculaires permettent d'expliquer la survenue de ces pathologies que pour une minorité d'individu. Le recours à des explorations phénotypiques comme le dosage de la concentration ou de l'activité de la lipoprotéine lipase est alors nécessaire. Il est donc primordial de valider des techniques sensibles pour pouvoir déterminer des concentrations de LPL en pré- et post-héparine, ainsi que pour doser l'activité de la LPL en post-héparine. Cette injection d'héparine permet de libérer la LPL fixée à l'endothélium vasculaire.

Le Laboratoire de Biologie Médicale Multisites des Hospices Civiles de Lyon s'est engagé dans la démarche d'accréditation des examens de biologie médicale qui a été rendue obligatoire par l'ordonnance du 13 Janvier 2010. S'appuyant sur la norme en ISO 15189, cette démarche impose aux laboratoires de biologies médicales la validation des méthodes analytiques pour répondre aux spécifications et aux exigences fixées. Notre étude expérimentale, nous a permis de valider la méthode de dosage de la concentration de la lipoprotéine lipase. Cette validation s'est déroulée en portée de type B car nous avons dû adapter la méthode en fonction des outils à notre disposition.

Tout d'abord, la validation de méthode a débuté par le recensement des kits ELISA en fonction des critères suivants : dosage sensible, dosage en pré- et post-héparine et prélèvement sur des tubes EDTA. Quatre kits ont été identifiés : CellBiolabs, Biovendor, ALPCO et Cusabio. En fonction des critères établis et des tests effectués, nous avons choisi de conserver le kit ALPCO. Par la suite, nous avons décidé de comparer cinq modèles différents de régression afin de

déterminer celui rendant des concentrations les plus précises possible. Ces modèles sont les suivants : log-log, logarithmique népérien, 2^e ordre polynomial, 3^e ordre polynomial et 4 paramètres logistiques. En se basant sur les pourcentages de récupération et sur les coefficients de détermination, le modèle de régression préconisé par le fournisseur (log-log) s'est révélé être le moins précis d'entre eux. Suite aux résultats des tests, nous avons choisi de conserver le modèle des 4 paramètres logistiques. En effet, avec ce modèle, les pourcentages de récupération des standards et les coefficients de détermination sont proches de 100% et de 1 respectivement et la limite de quantification peut être calculée. Les critères de performances se sont avérés conformes aux exigences et aux spécifications attendues. Notre méthode s'est montrée reproductible : répétabilité (n=6) 3,3% et 3,4%, fidélité intermédiaire (n=8) 6,21% et 5,81%, respectivement pour des concentrations de 23 et 250 µg/L). Les intervalles de références ont été réévalués à 41.75 +/- 17.77 µg/L à T0 et 272.51 +/- 77.16 µg/L à T10 après injection de 50UI/kg d'héparine (échantillon recueilli avec EDTA). Ils sont similaires à ceux retrouvés dans l'article de *Kimura et al ; 1999*. La sensibilité et la spécificité déterminées à T10 (cut off :125µg/L) de la concentration en LPL pour détecter des patients FCS sont respectivement égales à 80% et 93%. La sensibilité et la spécificité déterminées à T10 (cut off :125µg/L) de la concentration en LPL pour détecter des patients avec une activité diminuée sont de 71% et 97%.

Pour finir, cette méthode analytique offre la possibilité de doser des concentrations de lipoprotéine lipase sans injecter d'héparine permettant de rechercher une étiologie à l'hypertriglycéridémies chez des patients présentant une contre-indication à l'héparine. Cependant une limite demeure, cette technique ne permet pas de différencier la forme active de la forme inactive de la lipoprotéine lipase. De plus, elle est relativement onéreuse. L'intérêt est donc de coupler le dosage pondéral au dosage de l'activité pour pouvoir déterminer une activité spécifique d'enzyme (IU/mg).

Le Président de la thèse,

Nom :

Carole Ferraro-Reperet
Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **- 8 JAN. 2018**
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon



Professeure C. VINCIGUERRA

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon est engagée dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

Annexe 1 : Pourcentages de récupération obtenus sur quatre dosages en fonction des modèles de régression

Dosage n°8	Log-log	Ln	4PL	3e Ordre Polynomial	2e ordre polynomial	Dosage n°7	Log-log	Ln	4PL	3e Ordre Polynomial	2e ordre polynomial
Std 23ng/ml	76%	95%	100%	82%	81%	Std 23ng/ml	81%	100%	100%	96%	94%
Std 11,5ng/ml	108%	118%	101%	100%	100%	Std 11,5ng/ml	104%	111%	99%	100%	98%
Std 5,75ng/ml	119%	107%	98%	101%	101%	Std 5,75ng/ml	116%	105%	100%	101%	104%
Std 2,875ng/ml	114%	88%	99%	98%	99%	Std 2,875ng/ml	112%	89%	98%	98%	101%
Std 1,437ng/ml	108%	84%	106%	100%	100%	Std 1,437ng/ml	107%	85%	101%	99%	100%
Std 0,719ng/ml	96%	91%	102%	100%	99%	Std 0,719ng/ml	99%	94%	103%	102%	96%
Std 0,359ng/ml	85%	123%	73%	105%	102%	Std 0,359ng/ml	86%	120%	95%	107%	-
		Moyenne	97%	98%	97%			Moyenne	99%	101%	99%
Dosage n°6	Log-log	Ln	4PL	3e Ordre Polynomial	2e ordre polynomial	Dosage n°5	Log-log	Ln	4PL	3e Ordre Polynomial	2e ordre polynomial
Std 23ng/ml	78%	95%	99%	94%	91%	Std 23ng/ml	78%	96%	99%	95%	91%
Std 11,5ng/ml	110%	119%	101%	100%	99%	Std 11,5ng/ml	107%	115%	100%	100%	98%
Std 5,75ng/ml	118%	106%	97%	100%	101%	Std 5,75ng/ml	118%	106%	98%	100%	102%
Std 2,875ng/ml	115%	91%	101%	101%	103%	Std 2,875ng/ml	115%	91%	99%	99%	102%
Std 1,437ng/ml	103%	83%	104%	99%	99%	Std 1,437ng/ml	107%	85%	103%	100%	101%
Std 0,719ng/ml	86%	87%	94%	93%	90%	Std 0,719ng/ml	96%	91%	101%	99%	94%
Std 0,359ng/ml	96%	127%	91%	112%	115%	Std 0,359ng/ml	86%	121%	87%	102%	-
		Moyenne	98%	100%	100%			Moyenne	98%	99%	98%

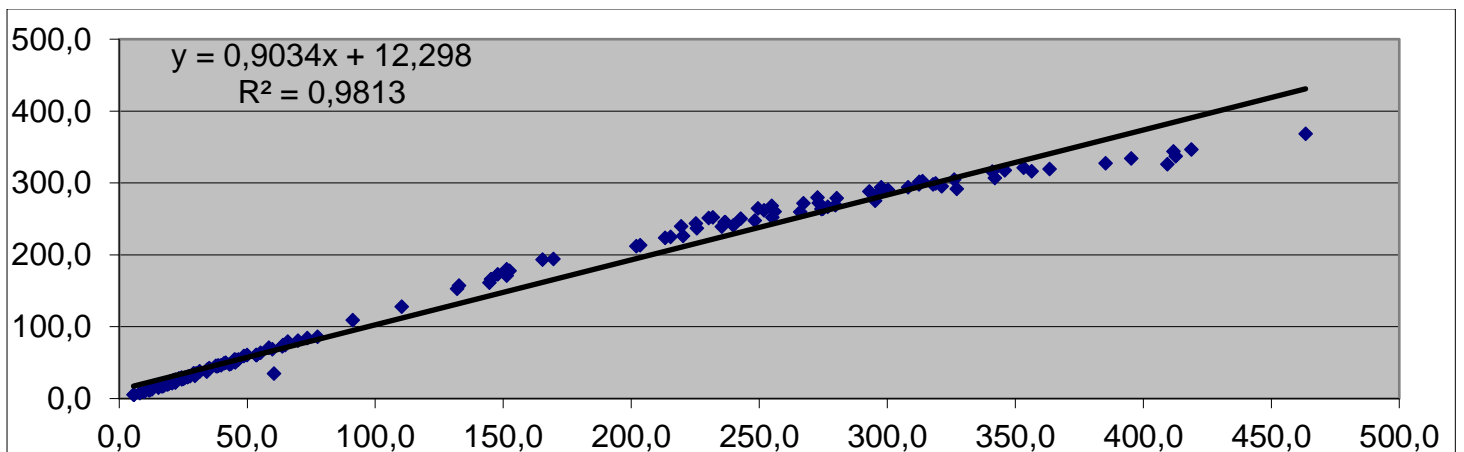
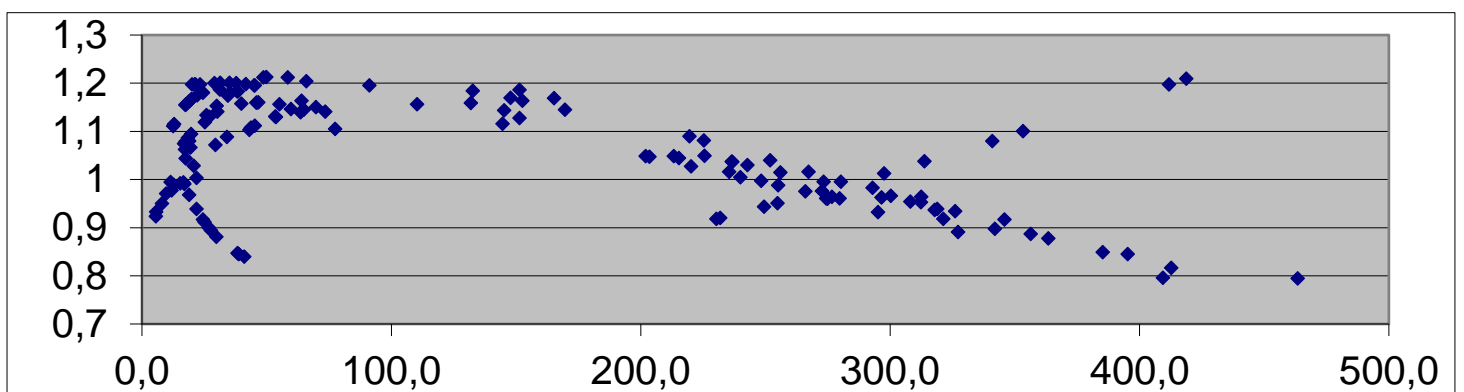
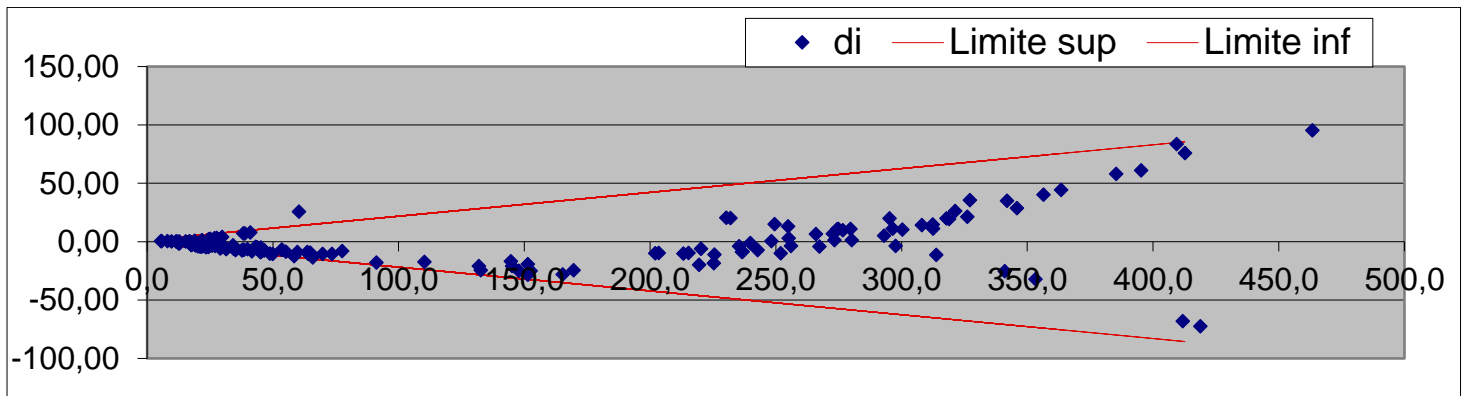
Annexe 2 : Essais préliminaire avec le kit Cell Biolabs

Dosage 1	[]	Dilution	DO1	DO2
Std 500ng/ml	500		0,4974	0,5322
Std 520ng/ml	250		0,1519	0,4069
Std 125ng/ml	125		0,1198	0,0803
Std 62,5ng/ml	62,5		0,0844	0,1111
Std 31,25ng/ml	31,25		0,1111	0,0752
Std 15ng/ml	15		0,0918	0,0799
Std 7,5ng/ml	7,5		0,0837	0,0591
Blanc			0,0463	0,0774
T-Pre 1/2		2	0,1231	0,1275
T-Posst 1/2		2	0,6452	0,4971
T-Post 1/5		5	0,2377	0,2019
T-Post 1/10		10	0,0967	0,0767
P1 T0 1/2		2	0,071	0,1138
P1 T10 1/5		5	0,1192	0,1678
P1 T60 1/5		5	0,1035	0,0876
P2 T0 1/2		2	0,0835	0,0896
P2 T10 1/10		10	0,2172	0,2345
P2 T60 1/5		5	0,169	0,1971

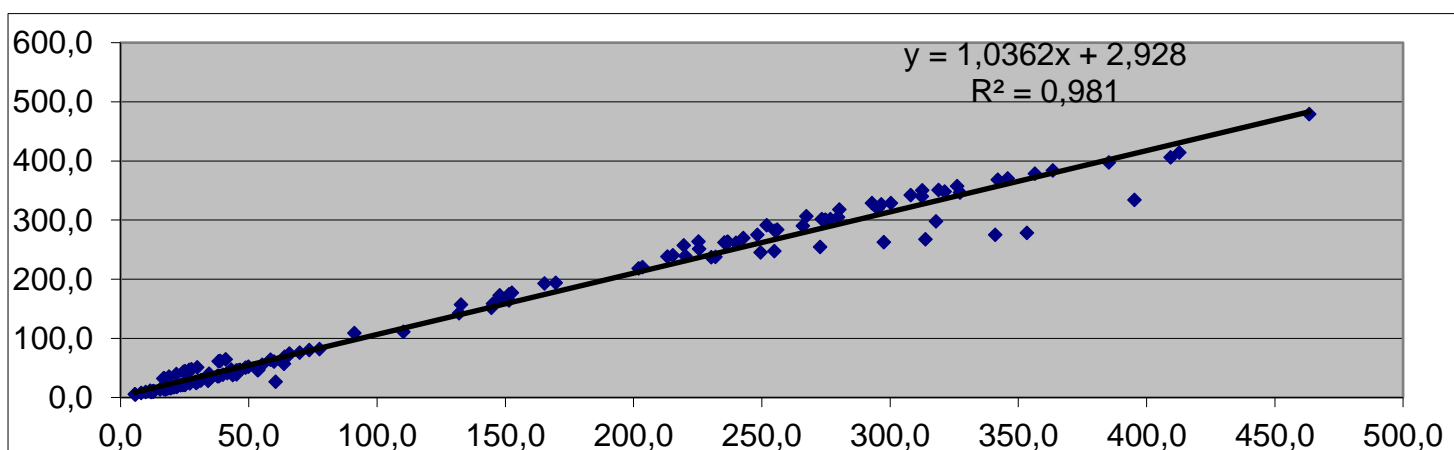
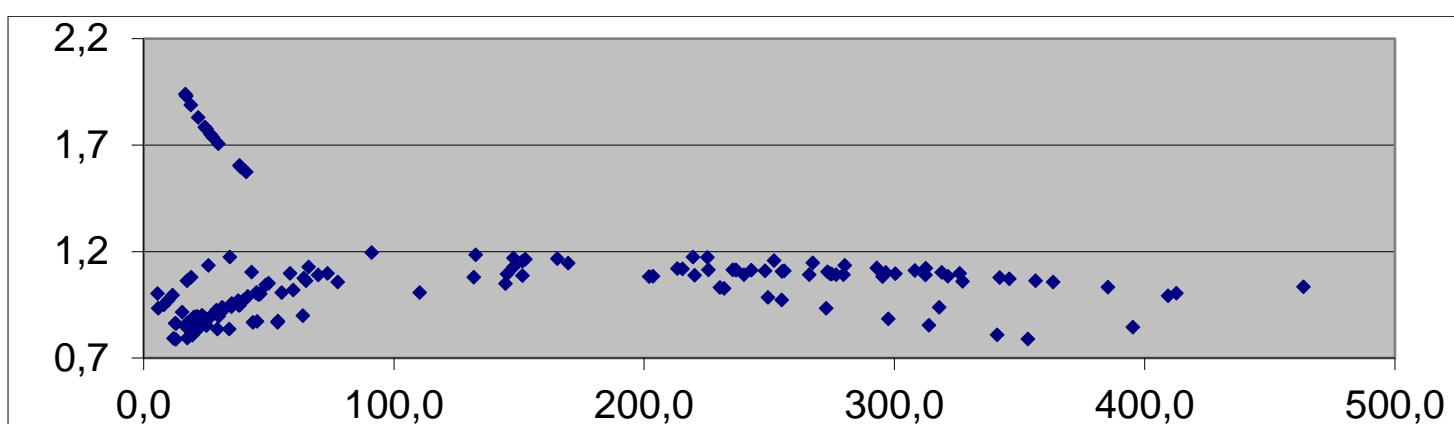
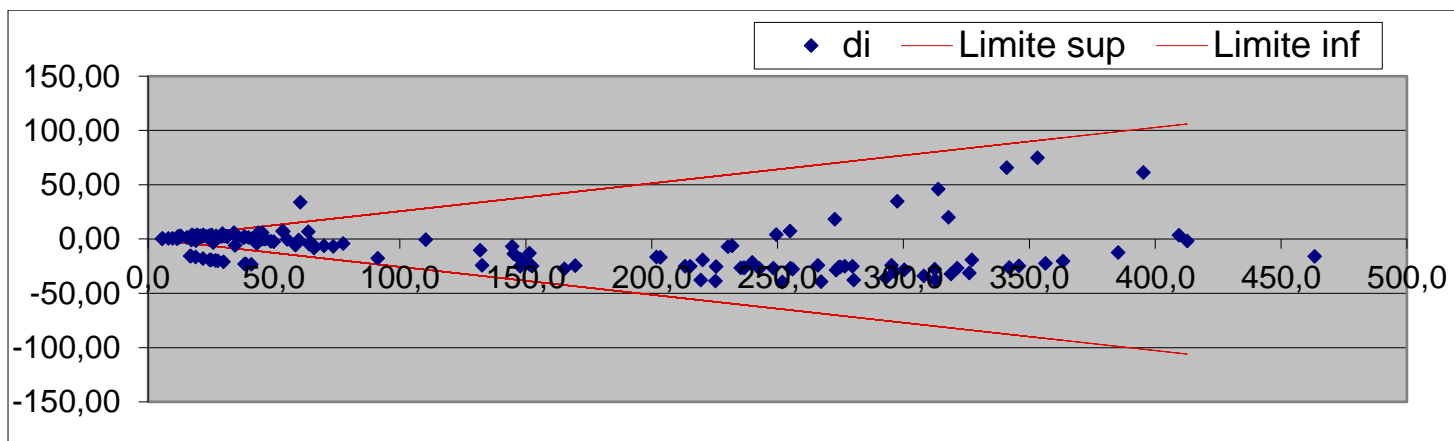
Dosage 3	[]	Dilution	DO1	DO2
Std 500ng/ml	500		0,4974	0,5322
Std 520ng/ml	250		0,1519	0,4069
Std 125ng/ml	125		0,1198	0,0803
Std 62,5ng/ml	62,5		0,0844	0,1111
Std 31,25ng/ml	31,25		0,1111	0,0752
Std 15ng/ml	15		0,0918	0,0799
Std 7,5ng/ml	7,5		0,0837	0,0591
Blanc			0,0463	0,0774
T-Pre 1/2		2	0,1231	0,1275
T-Post 1/2		2	0,6452	0,4971
T-Post 1/5		5	0,2377	0,2019
T-Post 1/10		10	0,0967	0,0767
P1 T0 1/2		2	0,071	0,1138
P1 T10 1/5		5	0,1192	0,1678
P1 T60 1/5		5	0,1035	0,0876
P2 T0 1/2		2	0,0835	0,0896
P2 T10 1/10		10	0,2172	0,2345
P2 T60 1/5		5	0,169	0,1971

Dosage 2	[]	Dilution	DO1	DO2
Std 500ng/ml	500		0,5931	0,3926
Std 520ng/ml	250		0,1386	0,2207
Std 125ng/ml	125		0,1263	0,1284
Std 62,5ng/ml	62,5		0,0381	0,0638
Std 31,25ng/ml	31,25		0,0399	0,0556
Std 15ng/ml	15		0,0368	0,0553
Blanc			0,0514	0,0634
T-Post 1/5		5	0,3549	0,2354

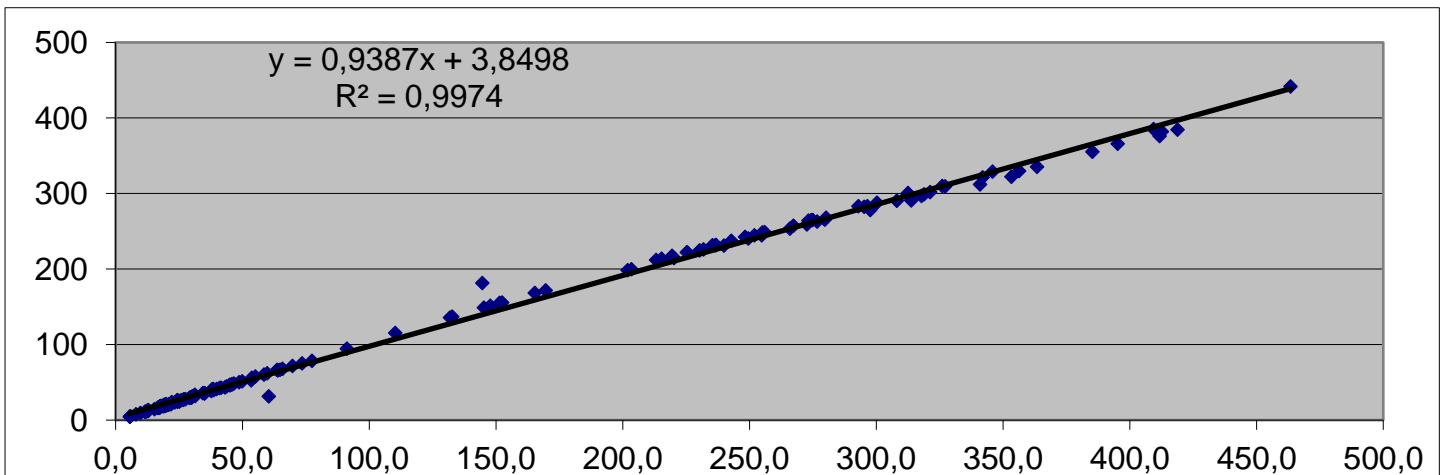
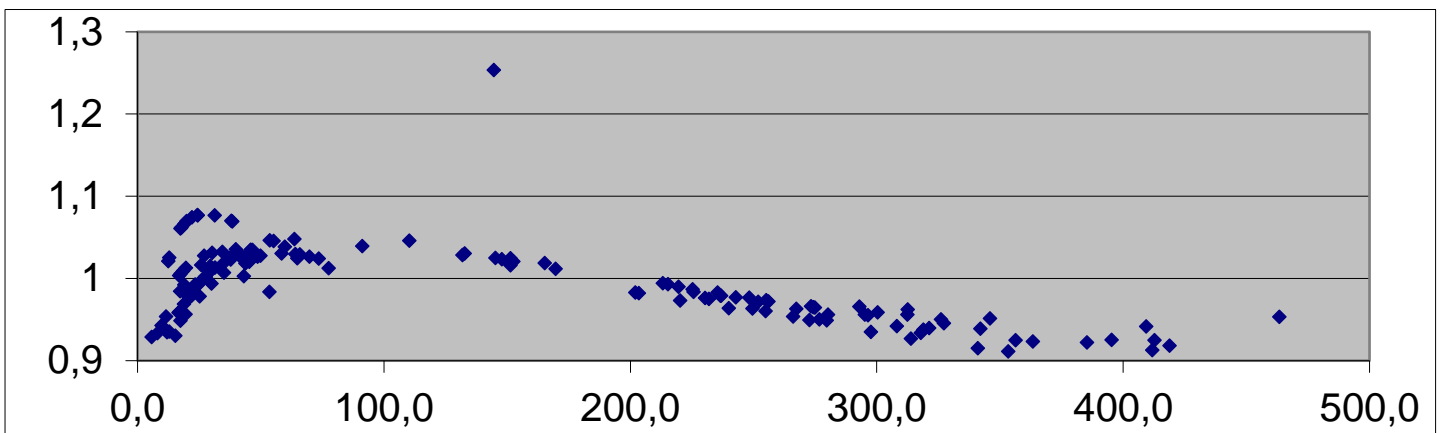
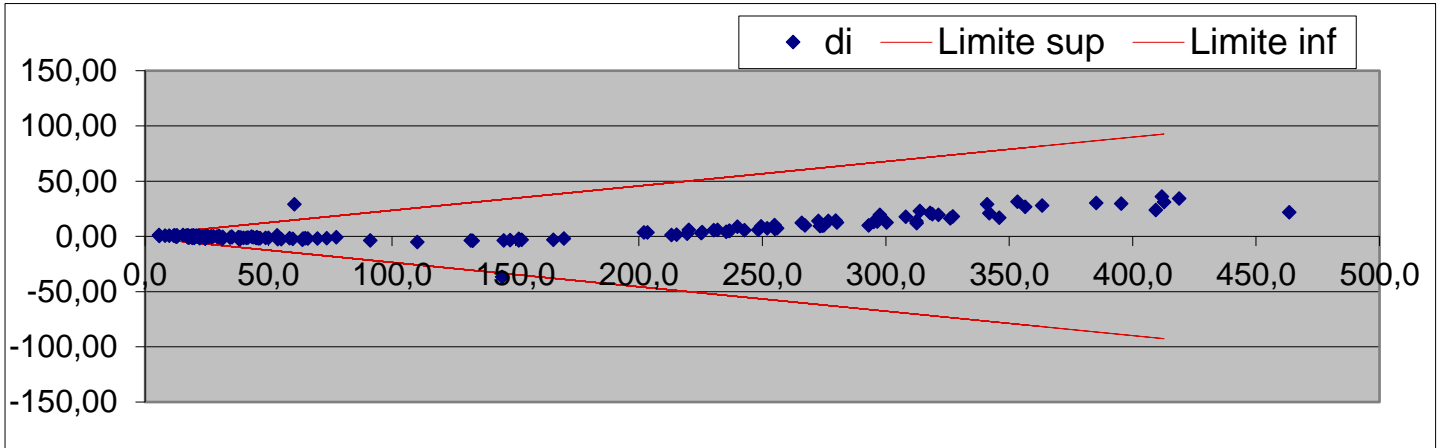
Annexe 3 : Comparaison de la méthode 4PL versus Log-log



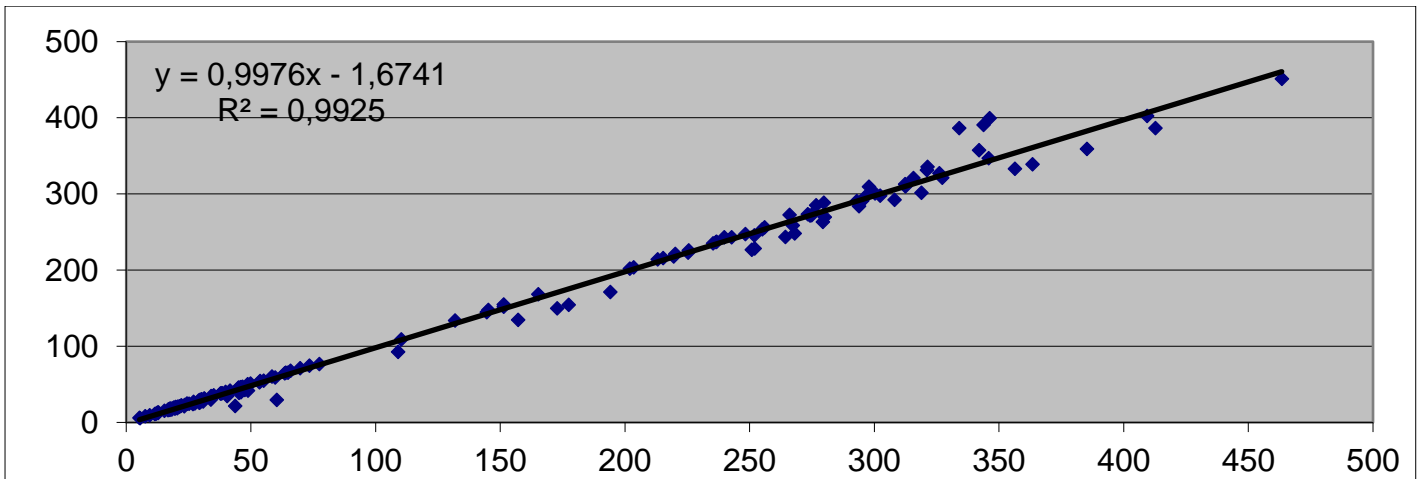
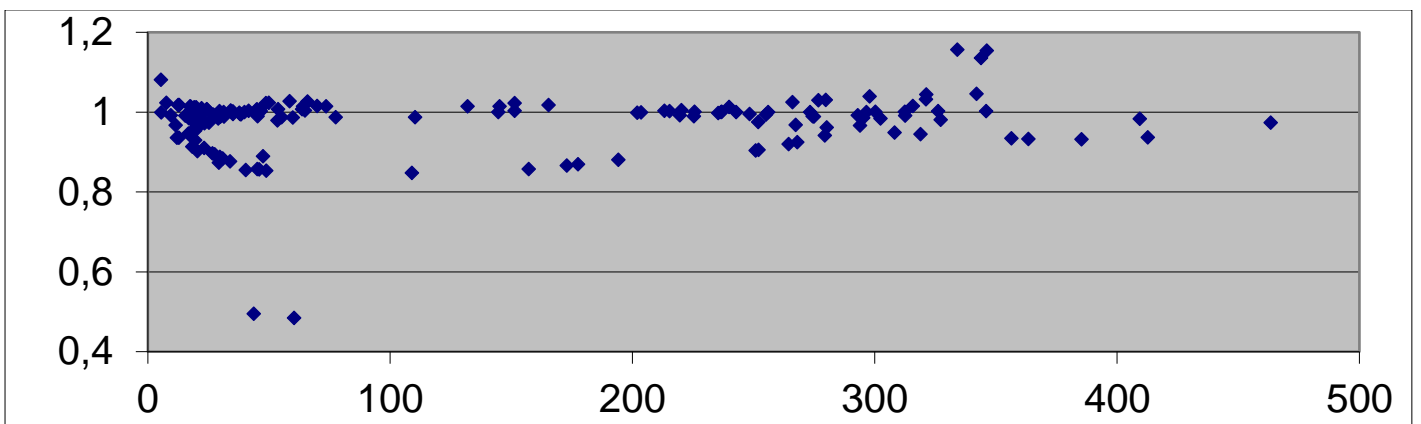
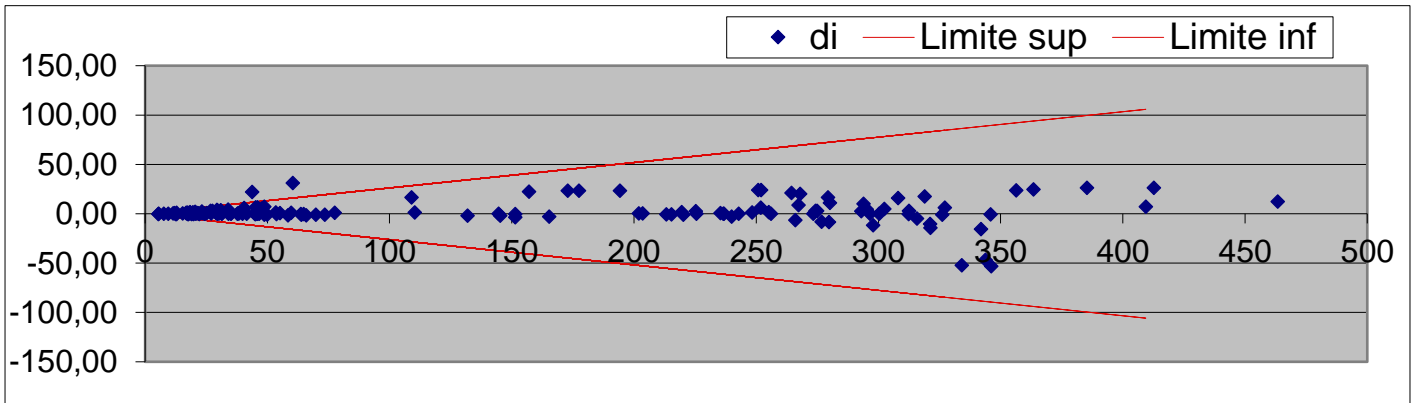
Annexe 4 : Comparaison de la méthode 4PL versus Ln



Annexe 5 : Comparaison de la méthode 4PL versus 2^e ordre polynomial



Annexe 6 : Comparaison de la méthode 4PL versus 3^e ordre polynomial



BIBLIOGRAPHIE

1. S.A HAMMA. Métabolisme des lipoprotéines. [Internet]. [cité 20 nov 2016]. Disponible sur: http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/biochimie2an-metabolisme_lipoproteines.pdf
2. Biochimie Clinique [Internet]. [cité 20 nov 2016]. Disponible sur: <https://www.fichier-pdf.fr/2015/04/12/biochimie-clinique/biochimie-clinique.pdf>
3. Les apolipoprotéines & transports des lipides – Cours Pharmacie [Internet]. [cité 20 nov 2016]. Disponible sur: <http://www.cours-pharmacie.com/biochimie/les-apolipoproteines-transports-des-lipides.html>
4. Role of the lipoprotein associated with hepatitis C virus particles and microtubules in HCV cell entry and infection - Scientific Figure on ResearchGate. [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Figure-19-Schema-d-une-lipoproteine-La-lipoproteine-est-une-structure-spherique-composee-dun-coeu_278642814_fig15
5. Yolanda SMITH. Catégorie de Lipoprotéine [Internet]. [cité 20 nov 2016]. Disponible sur: [http://www.news-medical.net/life-sciences/Lipoprotein-Classification-\(French\).aspx](http://www.news-medical.net/life-sciences/Lipoprotein-Classification-(French).aspx)
6. General structure and classification of lipoproteins | Biochemistry for Medics – Lecture Notes [Internet]. [cité 20 nov 2016]. Disponible sur: <http://www.namrata.co/general-structure-and-classification-of-lipoproteins/>
7. Claude ZINSOU. Métabolisme des Lipoprotéines [Internet]. [cité 20 nov 2016]. Disponible sur: <http://cbzinsou.pagesperso-orange.fr/PDFDocuments/Chapitre%2019.pdf>
8. Jean-Charles HOGUE. Contribution de la protéine de transfert des esters de cholestérol à l'hétérogénéité des particule LDL dans l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote. Québec: Canada: Université Laval; 2004.
9. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. Clin Chem Lab Med CCLM [Internet]. 1 janv 2014 [cité 28 déc 2016];52(12). Disponible sur: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.2014.52.issue-12/cclm-2013-0358/cclm-2013-0358.xml>
10. Havel RJ. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Plasma Lipid Transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1 janv 2010;30(1):9-19.

11. Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, et al. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis*. juill 2010;211(1):1-8.
12. Mead J, Irvine S, Ramji D. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med*. 1 déc 2002;80(12):753-69.
13. Hahn PF. ABOLISHMENT OF ALIMENTARY LIPEMIA FOLLOWING INJECTION OF HEPARIN. *Science*. 2 juill 1943;98(2531):19-20.
14. Vilella E, Joven J, Fernandez M, Vilaro S, Brunzell JD, Olivecrona T, et al. Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J Lipid Res*. 1993;34(9):1555–1564.
11. Iverius PH, Ostlund-Lindqvist AM. Lipoprotein lipase from bovine milk. Isolation procedure, chemical characterization, and molecular weight analysis. *J Biol Chem*. 1976 Dec 25;251(24):7791–5.
12. Osborne JC, Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS, Olivecrona T. Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry (Mosc)*. 1985 Sep 24;24(20):5606–11.
13. Baker ME. Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human low-density lipoprotein and human lipoprotein lipase? *Biochem J*. 1988 Nov 1;255(3):1057–60.
14. Terpstra P, Ab G. Homology of *Drosophila* yolk proteins and the triacylglycerol lipase family. *J Mol Biol*. 1988 Aug 5;202(3):663–5.
15. Goldberg IJ, Le N-A, Paterniti JR, Ginsberg HN, Lindgren FT, Brown WV. Lipoprotein Metabolism during Acute Inhibition of Hepatic Triglyceride Lipase in the *Cynomolgus* Monkey. *J Clin Invest*. 1982 Dec;70(6):1184–92.
16. Kuusi T, Kinnunen PKJ, Nikkilä EA. Hepatic endothelial lipase antiserum influences rat plasma low and high density lipoproteins in vivo. *FEBS Lett*. 1979 août;104(2):384–8.
17. Bamberger M, Lund-Katz S, Phillips MC, Rothblat GH. Mechanism of the hepatic lipase-induced accumulation of high-density lipoprotein cholesterol by cells in culture. *Biochemistry (Mosc)*. 1985 juillet;24(14):3693–701.
18. Mickel FS, Weidenbach F, Swarovsky B, LaForge KS, Scheele GA. Structure of the canine pancreatic lipase gene. *J Biol Chem*. 1989 Aug 5;264(22):12895–901.

19. Hide WA, Chan L, Li WH. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res.* 1992;33(2):167–178.
24. Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature.* 22 févr 1990;343(6260):771-4.
25. van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel JM, Cambillau C. Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J Biol Chem.* 11 févr 1994;269(6):4626-33.
26. Yang CY, Gu ZW, Yang HX, Rohde MF, Gotto AM, Pownall HJ. Structure of bovine milk lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 5 oct 1989;264(28):16822-7.
27. Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T, Jörnvall H. Lipoprotein lipases from cow, guinea-pig and man. *Eur J Biochem.* décembre 1986;161(2):281-8.
28. Lookene A, Bengtsson-Olivecrona G. Chymotryptic cleavage of lipoprotein lipase. Identification of cleavage sites and functional studies of the truncated molecule. *Eur J Biochem.* 1 avr 1993;213(1):185-94.
29. Mysling S, Kristensen KK, Larsson M, Beigneux AP, Gårdsvoll H, Fong LG, et al. The acidic domain of the endothelial membrane protein GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase activity by preventing unfolding of its catalytic domain. *eLife.* 3 janv 2016;5:e12095.
30. Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ. Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta.* 3 janv 1992;1123(1):1-17.
31. Faustinella F, Smith LC, Chan L. Functional topology of a surface loop shielding the catalytic center in lipoprotein lipase. *Biochemistry (Mosc).* 18 août 1992;31(32):7219-23.
32. Wong H, Davis RC, Thuren T, Goers JW, Nikazy J, Waite M, et al. Lipoprotein lipase domain function. *J Biol Chem.* 8 avr 1994;269(14):10319-23.
33. Derewenda U, Brzozowski AM, Lawson DM, Derewenda ZS. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry (Mosc).* février 1992;31(5):1532-41.
34. Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Bouthillier F, Smith P, Harrison D, et al. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem.* 15 juin 1993;268(17):12843-7.

35. FMPMC-PS - Lipides et lipoprotéines - Objectifs au cours de Biochimie PCEM2 Biochimie Métabolique et Régulations [Internet]. [cité 24 sept 2017]. Disponible sur: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/LLbioch/POLY.Chp.8.html>
36. Cryer A. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *Int J Biochem.* 1981;13(5):525-41.
37. Mead JR, Cryer A, Ramji DP. Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS Lett.* 26 nov 1999;462(1-2):1-6.
38. Mead JR, Ramji DP. The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 1 août 2002;55(2):261-9.
39. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res.* avr 1996;37(4):693-707.
40. Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G. Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res.* sept 1997;38(9):1722-9.
41. Renier G, Lambert A. Lipoprotein lipase synergizes with interferon gamma to induce macrophage nitric oxide synthetase mRNA expression and nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mars 1995;15(3):392-9.
42. Mamputu JC, Levesque L, Renier G. Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* oct 2000;20(10):2212-9.
43. van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel JM, Cambillau C. Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J Biol Chem.* 11 févr 1994;269(6):4626-33.
44. Kobayashi Y, Nakajima T, Inoue I. Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *Eur J Biochem.* sept 2002;269(18):4701-10.
45. Ma Y, Henderson HE, Liu MS, Zhang H, Forsythe IJ, Clarke-Lewis I, et al. Mutagenesis in four candidate heparin binding regions (residues 279-282, 291-304, 390-393, and 439-448) and identification of residues affecting heparin binding of human lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* nov 1994;35(11):2049-59.
46. Keiper T, Schneider JG, Dugi KA. Novel site in lipoprotein lipase (LPL415;-438) essential for substrate interaction and dimer stability. *J Lipid Res.* août 2001;42(8):1180-6.

47. Lookene A, Groot NB, Kastelein JJP, Olivecrona G, Bruin T. Mutation of Tryptophan Residues in Lipoprotein Lipase EFFECTS ON STABILITY, IMMUNOREACTIVITY, AND CATALYTIC PROPERTIES. *J Biol Chem.* 10 janv 1997;272(2):766-72.
48. Boren J, Lookene A, Makoveichuk E, Xiang S, Gustafsson M, Liu H, et al. Binding of low density lipoproteins to lipoprotein lipase is dependent on lipids but not on apolipoprotein B. *J Biol Chem.* 20 juill 2001;276(29):26916-22.
49. Braun JE, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J.* 15 oct 1992;287(Pt 2):337-47.
50. Enerbäck S, Gimble JM. Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta.* 11 août 1993;1169(2):107-25.
51. Raisonnier A, Etienne J, Arnault F, Brault D, Noé L, Chuat J-C, et al. Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* juillet 1995;111(3):385-98.
52. Ben-Zeev O, Stahnke G, Liu G, Davis RC, Doolittle MH. Lipoprotein lipase and hepatic lipase: the role of asparagine-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme. *J Lipid Res.* sept 1994;35(9):1511-23.
53. Semenkovich CF, Luo CC, Nakanishi MK, Chen SH, Smith LC, Chan L. In vitro expression and site-specific mutagenesis of the cloned human lipoprotein lipase gene. Potential N-linked glycosylation site asparagine 43 is important for both enzyme activity and secretion. *J Biol Chem.* 5 avr 1990;265(10):5429-33.
54. Wion KL, Kirchgessner TG, Lusic AJ, Schotz MC, Lawn RM. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science.* 27 mars 1987;235(4796):1638-41.
55. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1 août 2009;297(2):E271-88.
56. Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaró S, Olivecrona T. Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *Am J Physiol.* avr 1990;258(4 Pt 1):C673-681.
57. Deeb SS, Peng RL. Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry (Mosc).* 16 mai 1989;28(10):4131-5.

58. Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, et al. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1989;86(24):9647-51.
59. Semb H, Olivecrona T. The relation between glycosylation and activity of guinea pig lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 5 mars 1989;264(7):4195-200.
60. Preiss-Landl K, Zimmermann R, Hämmerle G, Zechner R. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13(5):471–481.
61. Jean Bergeron, Pierre Julien, Ven M.R. Murthy. Expression de la lipoprotéine lipase humaine : mutations et physiopathologie. [Internet]. [cité 7 déc 2016]. Disponible sur : http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/4506/MS_1991_10_1061.pdf?sequence=1
62. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. août 2012;272(2):185-96.
63. Doolittle MH, Ehrhardt N, Péterfy M. Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly: *Curr Opin Lipidol*. juin 2010;21(3):198-203.
64. Doolittle MH, Neher SB, Ben-Zeev O, Ling-Liao J, Gallagher CM, Hosseini M, et al. Lipase maturation factor LMF1, membrane topology and interaction with lipase proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 27 nov 2009;284(48):33623-33.
65. Paterniti JR, Brown WV, Ginsberg HN, Artzt K. Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse. *Science*. 8 juill 1983;221(4606):167-9.
66. Cefalù AB, Noto D, Arpi ML, Yin F, Spina R, Hilden H, et al. Novel LMF1 nonsense mutation in a patient with severe hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab*. nov 2009;94(11):4584-90.
67. Goulbourne CN, Gin P, Tatar A, Nobumori C, Hoenger A, Jiang H, et al. The GPIHBP1–LPL Complex Is Responsible for the Margination of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Capillaries. *Cell Metab*. mai 2014;19(5):849-60.
68. Beigneux AP, Davies BSJ, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab*. avr 2007;5(4):279-91.

69. Davies BSJ, Beigneux AP, Barnes RH, Tu Y, Gin P, Weinstein MM, et al. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab.* 7 juill 2010;12(1):42-52.
70. Olivecrona G, Beisiegel U. Lipid Binding of Apolipoprotein CII Is Required for Stimulation of Lipoprotein Lipase Activity Against Apolipoprotein CII-Deficient Chylomicrons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 août 1997;17(8):1545-9.
71. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in Lipoprotein Metabolism: Functional Differences Between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 mars 1999;19(3):472-84.
72. Havel RJ, Fielding CJ, Olivecrona T, Shore VG, Fielding PE, Egelrud T. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources. *Biochemistry (Mosc).* 24 avr 1973;12(9):1828-33.
73. O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem.* févr 2005;51(2):351-9.
74. van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem.* 30 nov 2001;276(48):44512-20.
75. Smith CE, Tucker KL, Lai C-Q, Parnell LD, Lee Y-C, Ordovás JM. Apolipoprotein A5 and lipoprotein lipase interact to modulate anthropometric measures in Hispanics of Caribbean origin. *Obes Silver Spring Md.* févr 2010;18(2):327.
76. Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis.* 1 nov 2011;219(1):15-21.
77. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias | *European Heart Journal* | Oxford Academic [Internet]. [cité 6 janv 2018]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/32/14/1769/528352>
78. Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, Oikawa S, et al. Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(1):1-12.
79. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 10 avr 2007;176(8):1113-20.

80. Auwerx JH, Babirak SP, Fujimoto WY, Iverius PH, Brunzell JD. Defective enzyme protein in lipoprotein lipase deficiency. *Eur J Clin Invest.* oct 1989;19(5):433-7.
81. Brunzell JD. Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., éditeurs. *GeneReviews(®)* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 28 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/>
82. Péterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, et al. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet.* déc 2007;39(12):1483-7.
83. Brahm A, Hegele R. Hypertriglyceridemia. *Nutrients.* 22 mars 2013;5(3):981-1001.
84. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet.* févr 2009;10(2):109-21.
85. Rodrigues R, Artieda M, Tejedor D, Martínez A, Konstantinova P, Petry H, et al. Pathogenic classification of LPL gene variants reported to be associated with LPL deficiency. *J Clin Lipidol.* mars 2016;10(2):394-409.
86. Berglund L, Brunzell JD, Goldberg AC, Goldberg IJ, Sacks F, Murad MH, et al. Evaluation and Treatment of Hypertriglyceridemia: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2 juill 2013 [cité 28 mars 2017]; Disponible sur: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jc.2011-3213>
87. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, et al. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 1 août 2014;2(8):655-66.
88. Kobayashi J. Pre-heparin lipoprotein lipase mass. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11(1):1-5.
89. Identification of Lipoprotein Lipase Immunoreactive Protein in Pre- And Postheparin Plasma From Normal Subjects and Patients With Type I Hyperlipoproteinemia [Internet]. *PubMed Journals.* [cité 2 févr 2017]. Disponible sur: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/2313202/>
90. Ryan Robinson. ELISA Introduction (Resources) [Internet]. 2015 [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.anticorps-enligne.fr/resources/17/1461/elisa-introduction/>

91. Interchim. Kits ELISA : La solution aux méthodes immuno-enzymatique Interchim – Blog_fr [Internet]. 2016 [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: http://www.interchim.com/blog_fr/kits-elisa-methodes-immuno-enzymatique/
92. Herman RA, Scherer PN, Shan G. Evaluation of logistic and polynomial models for fitting sandwich-ELISA calibration curves. *J Immunol Methods*. 31 déc 2008;339(2):245-58.
93. Findlay JWA, Dillard RF. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS J*. juin 2007;9(2):E260-7.
94. R-Biopharm. Good ELISA Practice Manual. [Internet]. [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/534/2015-07_Good_ELISA_Practice_Manual_EN_LowRes.pdf
95. Régression multiple et non linéaire [Internet]. [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/biostats/?q=book/export/html/263>
96. Oriane Marmontel. Activité lipoprotéine lipase post-héparinique: intérêt de la mesure de l'activité à différents temps de prélèvement [Thèse d'exercice]. Lyon, France: Université Claude Bernard Lyon 1; 2013
97. AFNOR. ISO 9000 - Système de manangement de la qualité - Principes essentiels et vocabulaire. [Internet]. [cité 2 févr 2017]. Disponible sur: <http://197.14.51.10:81/pmb/GESTION2/PRODUCTION/ISO%209000-2005.pdf>
98. AFNOR. ISO 15189. Laboratoires d'analyse de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. [Internet]. [cité 28 déc 2016]. Disponible sur: <http://qualite.labomaisonblanche.fr/COFRAC/NF%20EN%20ISO%2015189%20LABM%20MAISON%20BLANCHE.pdf>
99. Cofrac. Définition, cadre légal et normatif. [Internet]. [cité 28 déc 2016]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/fr/accreditation/>
100. Cofrac. Processus d'accréditation [Internet]. [cité 28 déc 2016]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/fr/cofrac/processus.php>
101. Cofrac. Présentation générale du Cofrac [Internet]. [cité 28 déc 2016]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/fr/cofrac/>
102. Cofrac. Santé humaine. [Internet]. [cité 28 déc 2016]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/fr/activites/sante.php>

103. Cofrac. SH-GTA-04 - Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/ Validation (portée B) des méthodes en biologie médicale [Internet]. [cité 2 févr 2017]. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
104. Cofrac. SH-REF-08 - Expression et évaluation des portées d'accréditation. [Internet]. [cité 2 févr 2017]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>
105. Giri D. ELISA : Principle, Procedure, Types, Applications and Animation [Internet]. LaboratoryInfo.com. 2015 [cité 14 févr 2017]. Disponible sur: <http://laboratoryinfo.com/elisa/>
106. Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, et al. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol* [Internet]. 19 août 2015 [cité 1 avr 2017];6. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fneur.2015.00179/abstract>
107. Assay Data Analysis Software for Microplate and Rack-Based Assays - MyAssays [Internet]. [cité 24 sept 2017]. Disponible sur: <https://www.myassays.com/>
108. Tornvall P, Olivecrona G, Karpe F, Hamsten A, Olivecrona T. Lipoprotein lipase mass and activity in plasma and their increase after heparin are separate parameters with different relations to plasma lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* août 1995;15(8):1086-93.
109. Kimura H, Ohkaru Y, Katoh K, Ishii H, Sunahara N, Takagi A, et al. Development and evaluation of a direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of lipoprotein lipase mass in human plasma. *Clin Biochem.* févr 1999;32(1):15-23.
110. Abcam. Calculation and evaluating ELISA data. [Internet]. [cité 1 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.abcam.com/protocols/calculating-and-evaluating-elisa-data>
111. Di Filippo M, Marçais C, Charrière S, Marmontel O, Broyer M, Delay M, et al. Post-Heparin LPL Activity Measurement Using VLDL As a Substrate: A New Robust Method for Routine Assessment of Plasma Triglyceride Lipolysis Defects. *Ho PL, éditeur. PLoS ONE.* 2 mai 2014;9(5):e96482.

CHALVET Virgile

VALIDATION DE METHODE DU DOSAGE EN ELISA DE LA CONCENTRATION DE LA LIPOPROTEINE LIPASE EN LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE SELON LA NORME 15189

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2017.

RESUME

La lipoprotéine lipase est une enzyme capable d'hydrolyser les triglycérides des chylomicrons et VLDL. Un déficit de celle-ci provoque une accumulation des triglycérides et par conséquent le développement des hypertriglycéridémies sévères. Actuellement, des anomalies moléculaires ne sont retrouvées que dans 30% des formes familiales. L'étude phénotypique comme le dosage de la concentration ou de l'activité de LPL est nécessaire pour identifier des déficits post traductionnels et ainsi la cause de cette pathologie. Cette étude a pour but de mettre en place et de valider la méthode du dosage pondéral de la lipoprotéine lipase. Pour ce faire, quatre kits ont été identifiés en fonction de critère préétabli : dosage en pré et post héparine, prélèvement sur tube EDTA et dosage sensible. Le kit ALPCO permettant l'obtention de densités optiques d'intensité satisfaisante a été retenu. Par la suite, une comparaison de 5 modèles de régression a permis de déterminer que le modèle 4 paramètres logistiques était capable de fournir des résultats de manière la plus précise possible. La méthode s'est montrée reproductible avec des coefficients de variation pour la fidélité intermédiaire de : 6,21% et 5,81% et pour la répétabilité de : 3,3% et 3,4%. Les intervalles de références ont été réévalués à 41.75 +/- 17.77 µg/L en pré-héparine et à 272.51 +/- 77.16 µg/L en post-héparine. L'avantage de cette technique est la possibilité de fournir des concentrations de lipoprotéine lipase en pré-héparine et donc de pallier à une éventuelle contre-indication à l'héparine. Cependant une limite persiste, la méthode ne permet pas de différencier la forme active de la forme inactive de l'enzyme entraînant donc des erreurs d'interprétation. Il peut alors être intéressant de coupler cette méthode au dosage de l'activité afin de déterminer une activité spécifique d'enzyme.

MOTS CLES

Lipoprotéine lipase
Kit ELISA
Modèle de régression
Pré et post-héparine
Héparine

JURY

Mme FERRARO-PEYRET Carole, Maître de Conférences
Mme DI-FILIPPO Mathilde, Docteur en Pharmacie
Mme MARMONTEL Oriane, Docteur en Pharmacie
M. FOURRIER Anthony, Docteur en Pharmacie

DATE DE SOUTENANCE 29 Janvier 2018

ADRESSE DE L'AUTEUR 66 Ter Rue Feuillat – 69003 Lyon