



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale
- Pas de Modification 4.0 France (CC BY-NC-ND 4.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2025

Thèse n°8

Pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Présentée et soutenue publiquement le vendredi 24 janvier 2025 par
Mme VALEILLE Aurore
Née le 19 juillet 2001
A Saint-Etienne

Influence de la taille de la troncature de l'apoB sur sa sécrétion : Etude via un modèle cellulaire édité par CRISPR-Cas9

Jury

Présidente du jury : Mme Christine VINCIGUERRA, PU-PH

Directrice de thèse : Mme Mathilde DI FILIPPO, PH

Autres membres du jury : Mr Alexandre JANIN, MCU- PH

Mme Jennifer RIEUSSET, Directrice de Recherche

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- *De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- *De coopérer avec les autres professionnels de santé.*

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date :

Signatures de l'étudiant et du Président du jury



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé lors de mon stage hospitalier de 5^{ème} année d'octobre 2023 à mars 2024 dans le laboratoire lipides au Centre de Biologie et Pathologie Est au Groupement Hospitalier Est à Bron.

Je remercie tout d'abord le Pr Christine VINCIGUERRA, de me faire l'honneur de présider le jury et d'évaluer mon travail.

Je remercie également les autres membres du jury : Dr Mathilde DI FILIPPO, Dr Alexandre JANIN et Dr Jennifer RIEUSSET, pour leur temps consacré à la lecture et l'évaluation de ma thèse.

Je tiens particulièrement à remercier ma directrice de thèse, le docteur Mathilde DI FILIPPO pour sa confiance, sa bienveillance et sa disponibilité tout au long de ce projet. Merci de partager votre expérience et vos connaissances avec autant d'enthousiasme et de passion, ce stage a été très enrichissant.

Je remercie Séverine, ma technicienne référente pour sa pédagogie et sa patience.

Je remercie aussi toute l'équipe des Lipides : Oriane, Camille, Jade, Eléonore, et Sabrina pour leur accueil chaleureux dans le service et particulièrement Caro pour nos tiroirs toujours remplis de petites attentions.

Je remercie aussi Dr Firas SALAMEH depuis 1 mois maintenant. Merci pour ta bonne humeur et ton soutien tout au long du stage.

Un grand merci à mes amis pharma : A la team fuera : Ben, Camille, Carla et Sara pour ces belles années d'études, de soirées, de cookies du Crous et ce voyage en Espagne mémorable. A Maëva, pour ce concert inoubliable de Coldplay. Je n'oublierai jamais ces années de fac à vos côtés.

A mes amis stéphanois, merci de faire partie de ma vie depuis plus de 10 ans pour certaines ou un peu moins longtemps pour d'autres. Loin des yeux mais pas loin du cœur.

Et enfin un immense merci à ma famille pour votre présence et vos encouragements.

A Papa et Maman, Merci de me soutenir dans tout ce que j'entreprends même si cela inclut un déménagement à l'autre bout de la France ! Je peux grâce à vous faire les études qui me passionnent. Je vous aime très fort.

A ma grande soeur Anaïs, tu es pour moi un modèle de persévérance et de détermination. Merci d'être une sista stylée, généreuse et toujours de bon conseil.

A mon grand frère Aurélien, Merci de m'avoir supportée en coloc qui devait être « temporaire ». Je t'en suis très reconnaissante. Nos soirées Koh-Lanta et tes tiramisu me manquent déjà.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

| | |
|--|---------------------------------------|
| Président de l'Université | Frédéric FLEURY |
| Président du Conseil Académique et de la Commission Recherche | Hamda BEN HADID Philippe CASSAGNAU |
| Vice-Président Recherche, partenariats, innovation et ingénierie | |
| Vice-Président du Conseil d'Administration | Philippe CHEVALIER |
| Vice-Présidente de la Commission Formation | Christophe VITON |
| Vice-Président Relations Hospitalo-Universitaires | Jean François MORNEX |
| Directeur général des services | Pierre ROLLAND |

SECTEUR SANTE

| | |
|--|------------------------|
| Doyen de l'UFR de Médecine Lyon-Est | Gilles RODE |
| Doyen de l'UFR de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux | Philippe PAPAREL |
| Doyen de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB) | Claude DUSSART |
| Doyen de l'UFR d'Odontologie | Jean-Christophe MAURIN |
| Directeur de l'Institut des Sciences & Techniques de Réadaptation (ISTR) | Jacques LUAUTÉ |
| Présidente du Comité de Coordination des Études Médicales | Carole BURILLON |

SECTEUR SCIENCES ET TECHNOLOGIE

| | |
|---|-------------------|
| Directrice de l'UFR Biosciences | Kathrin GIESELER |
| Directeur de l'UFR Faculté des Sciences | Bruno ANDRIOLETTI |
| Directeur de l'UFR Sciences & Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Guillaume BODET |

| | |
|--|--------------------------|
| Directeur de Polytech Lyon | Emmanuel PERRIN |
| Directeur de l'Institut Universitaire de Technologie Lyon 1 (IUT) | Michel MASSENZIO |
| Directeur de l'Institut des Science Financière & Assurances (ISFA) | Nicolas LEBOISNE |
| Directeur de l'Observatoire de Lyon | Bruno GUIDERDONI |
| Directeur de l'Institut National Supérieur du Professorat & de l'Éducation (INSPÉ) | Pierre CHAREYRON |
| Directrice du Département-composante Génie Électrique & des Procédés (GEP) | Rosaria FERRIGNO |
| Directrice du Département-composante Informatique | Saida BOUAZAK BRONDEL |
| Directeur du Département-composante Mécanique | Marc BUFFAT |

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

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

- **CHIMIE GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**
Monsieur Raphaël TERREUX (PR)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)

- **CHIMIE ANALYTIQUE**
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Madame Stéphanie BRIANCON (PR)
Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU-HDR)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
Madame Eloïse THOMAS (MCU)

Guillaume PLET (ATER)

- **BIOPHYSIQUE**
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**
Madame Valérie SIRANYAN (PR)
Madame Maud CINTRAT (MCU)
- **ECONOMIE DE LA SANTE**
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (PR-HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)
- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**
Madame Maryem RHANOUI (MCU)
- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (PU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH-HDR)
Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)
- **SANTE PUBLIQUE**
Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (PR)
Madame Amanda GARRIDO (MCU)
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)
Monsieur François HALLE (MCU)
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 Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
Madame Delphine HOEGY (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Chloë HERLEDAN (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Madame Francesca ANGILERI (MCU)
Monsieur David BARTHELEMY(AHU)

- **PHYSIOLOGIE**

Madame Elise BELAIDI (PU)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU-HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Laurent BOURGUIGNON (PU-PH)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)

Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Monsieur Romain GARREAU (AHU)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**

Madame Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Monsieur Vincent LESCURE (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Hortense PRELY (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Agnès DUBOIS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)
Madame Anaïs NOMBEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)
Madame Sarah HUET (MCU-PH)
Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)

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

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
Madame Florence MORFIN (PU-PH)
Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)
Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Monsieur Alexandre GAYMARD (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)
Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)
Madame Floriane LAUMAY (MCU)

- **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)

Madame Emilie BLOND (MCU-PH)

Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)

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

Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)

Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU-HDR)

Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)

Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)

Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Stéphanie SENTIS (MCU)

Monsieur Jordan TEOLI (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 Philippe LAWTON (PR)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

Madame Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

PR : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
PHU : Praticien hospitalo-universitaire
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
ATER : Attaché temporaire d'enseignement et de recherche

Table des matières

| | |
|---|----|
| Liste des abréviations | 15 |
| Liste des Figures | 17 |
| Introduction | 19 |
| 1) Rappels bibliographiques | 20 |
| 1.1) L'apolipoprotéine B | 20 |
| 1.1.1) Généralités | 20 |
| 1.1.2) Le gène <i>APOB</i> | 21 |
| 1.1.3) Structure Secondaire de la protéine | 21 |
| 1.1.3.1) Le modèle pentapartite | 21 |
| 1.1.3.2) Un nouveau modèle structural | 24 |
| 1.2) Synthèse et sécrétion des lipoprotéines contenant l'apoB | 25 |
| 1.2.1) Synthèse et sécrétion de l'apoB | 26 |
| 1.2.2) Métabolisme des lipoprotéines | 27 |
| 1.2.3) Régulation de la production d'apoB | 28 |
| 1.2.4) Recapture des lipoprotéines contenant l'apoB | 29 |
| 1.3) L'hypobetalipoprotéïnémie familiale : HBLF-SD2 | 30 |
| 1.3.1) Tableau clinique | 31 |
| 1.3.2) HBLF-SD2 et MASLD | 32 |
| 1.3.3) Physiopathologie de la HBLF-SD2 | 33 |
| 1.3.3.1) Diminution de la sécrétion de la forme tronquée | 34 |
| 1.3.3.2) Clairance des lipoprotéines contenant de l'apoB tronquée | 35 |
| 1.3.3.3) Un effet dominant négatif | 35 |
| 1.3.4) Génétique | 36 |
| 1.4) Etude fonctionnelle <i>in vitro</i> des variants <i>apoB</i> | 37 |
| 1.4.1) Méthode classique : Transfection cellulaire | 37 |
| 1.4.2) Méthode d'édition du génome : CRISPR-Cas9 | 38 |
| 1.4.2.1) Découverte du système CRISPR-Cas | 38 |
| 1.4.2.2) CRISPR-Cas9 | 39 |
| 2. Objectif de L'étude | 42 |
| 3. Matériel et méthode | 44 |
| 3.1) Sélection des variants | 44 |
| 3.1.1) Variant NM 000384.3(APOB) : c.12181delGp.issu de la littérature | 44 |
| 3.1.2) Variant NM_000384.2 (APOB) : c.12944_12959del, p.(Lys4315Argfs*29) identifié chez un patient HBLFL-SD2 dans le laboratoire | 46 |
| 3.2) Clones CRISPR obtenus | 49 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1) Variant NM 000384.3(APOB) : c.12181delG, p.(Glu4034Argfs4040X) issu de la littérature : obtention des clones codant une apoB-89..... | 49 |
| 3.2.2) Variant NM 000384.2(APOB) : c.12944_12959del,p.(Lys4315Argfs*29) identifié au laboratoire : obtention des clones codant une apoB-95..... | 50 |
| 3.2.3) Clones générés | 51 |
| 3.2.4) Clones étudiés | 52 |
| 3.3) Culture et traitement des cellules pour l'étude fonctionnelle..... | 52 |
| 3.3.1) Culture cellulaire | 52 |
| 3.3.2) Traitement à l'acide oléique..... | 53 |
| 3.3.2.1) Préparation de la solution d'acide oléique à 0,6mM : Protocole 1..... | 53 |
| 3.3.2.2) Préparation de la solution d'acide oléique à 0,6mM : Protocole 2..... | 54 |
| 3.3.3) Traitement des cellules..... | 54 |
| 3.3.4) Quantification des transcrits <i>APOB</i> après traitement par acide oléique | 55 |
| 3.3.4.1) Principe de la qPCR | 55 |
| 3.3.4.2) Quantification..... | 57 |
| 3.3.5) Dosage de l'apoB par méthode ELISA | 57 |
| 3.3.5.1) Principe de l'ELISA sandwich..... | 57 |
| 3.3.5.2) Dosage ApoB | 58 |
| 4. Résultats | 59 |
| 4.1) Quantification de l'ARNm | 59 |
| 4.2) Concentration d'apoB du Témoin Positif : Troncature 7,9% | 60 |
| 4.3) Troncature 89% | 61 |
| 4.4) Troncature 95% | 62 |
| 5. Discussion..... | 63 |
| 5.1) Validation du modèle cellulaire | 64 |
| 5.2) Hypothèse de l'augmentation de sécrétion d'apoB | 65 |
| 5.3) Limites de l'étude..... | 66 |
| 5.2.1) Modèle cellulaire..... | 66 |
| 5.2.2) Mesure de concentration en apoB tronquée | 67 |
| 5.4) Perspectives | 68 |
| 7. Conclusions générales | 70 |
| 8. Bibliographie..... | 72 |
| 6. Annexe | 76 |

Liste des abréviations

AA : Acide aminé

ABL : Abêtalipoprotéinémie

ACMG : American college of medical genetics and genomics

ADNc : ADN complémentaire

ANGPTL3 : Angiopoietin-like protein 3

ApoB : Apolipoprotéine B

ARNcr : ARN crispr

ARNg : ARN guide

ARNm : ARN messenger

ARNtracr : ARN crispr trans-activant

ATB : Antibiotique

BCA : Bicinchoninic acid assay

CAP : Paramètre d'atténuation contrôlé

CM : Chylomicron

CRISPR-Cas9 : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

FACS : tri cellulaire activé par fluorescence

HBLF : Hypobêtalipoprotéinémie familiale

HBLF-SD2 : HBLF-secretion defect 2

HDL : High-density lipoprotein

Ho : Homozygote

Hz : Hétérozygote

HDR : Recombinaison homologue

IDL : Intermediate density lipoprotein

IDT : Intergrated DNA technologies

Kb : Kilobases

LC-MS/SM: Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

LDL : Low-density lipoprotein

LDL-c : LDL cholestérol

LDLR : Récepteur des LDL

LPL : Lipoprotéine Lipase

MASLD : Maladie hépatique stéatosique associée à un dysfonctionnement métabolique

MTP : Mitochondrial trifunctional protein

NGS : Next generation sequencing

NHEJ : Jonction d'extrémités non homologues

PBS : Phosphate-buffered saline

PCSK9 : Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9

PERPP : Protéolyse présécrétoire post-ER

qPCR : PCR quantitative

RE : Réticulum endoplasmique

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

SVF : Sérum de veau foetal

UTR : Untranslated regions

VLDL : Very low density lipoprotein

VSI : Variant de signification incertaine

WT : Wild type

Liste des Figures

| | |
|--|----|
| Figure 1- Schéma du mécanisme de synthèse de l'apolipoprotéineB48 à partir du gène APOB(7) | 20 |
| Figure 2- Représentation 3D de la sous-unité 4 de l'apoB-100(10)..... | 23 |
| Figure 3- Architecture de l'apoB-100 sur les lipoprotéines. (A) Représentation en rubans de l'apoB-100 sur les VLDL (C) Représentation en rubans de l'apoB-100 sur les LDL.(10)..... | 23 |
| Figure 4- Représentation de la structure secondaire de l'apoB-100 (5)..... | 24 |
| Figure 5- Schéma simplifié du métabolisme des lipoprotéines (20) | 28 |
| Figure 6- Classification des pathologies du métabolisme selon Bredefeld et al. (1) | 30 |
| Figure 7- Système CRISPR-Cas bactérien VS système CRISPR-Cas9 développé | 39 |
| Figure 8- Edition génomique par le système CRISPR-Cas9, disponible sur BioRender..... | 40 |
| Figure 9- Schéma des différentes étapes de l'étude | 43 |
| Figure 10- Arbre généalogique de la famille SH (45)..... | 45 |
| Figure 11- Tableau clinique et biologique de la famille SH (45) | 45 |
| Figure 12- Bilan biologique du patient | 47 |
| Figure 13- Schéma de la variation du gène APOB | 48 |
| Figure 14- Tableau des différents clones générés | 51 |
| Figure 15- Tableau des différents clones étudiés | 52 |
| Figure 16- Schéma de la méthode PCR et SYBR Green (51) | 57 |
| Figure 17- Schema de la méthode ELISA sandwich | 58 |
| Figure 18- Quantification de l'ARNm APOB-100 produit pendant 6h par le type sauvage HuH7 (WT), ou portants les variants d'intérêt à l'état hétérozygote ou homozygote | 60 |
| Figure 19- Graphique des concentrations d'apoB intracellulaire et extracellulaire normalisées par mg de protéines à T=6h des clones T7,9% Hz et Ho. * = p < 0,05 (test de Welch). ** = p < 0,05 (test ANOVA 1 facteur) | 61 |
| Figure 20- Graphique des concentrations d'apoB intracellulaire et extracellulaire normalisées par mg de protéines à T=6h chez les clones Hz et Ho T89%..... | 62 |
| Figure 21- Graphique des concentrations d'apoB intracellulaire et extracellulaire normalisées par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T95%. * = p < 0,05 (test de Welch) | 63 |
| Figure supplémentaire 1- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB intracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T7,9%..... | 76 |
| Figure supplémentaire 2- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB extracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T7,9%..... | 76 |

Figure supplémentaire 3- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB intracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T89%..... 77

Figure supplémentaire 4- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB extracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T89% 77

Figure supplémentaire 5- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB intracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T95%..... 78

Figure supplémentaire 6- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB extracellulaire normalisée par mg de protéines à t=6h pour les clones Hz et Ho T95%..... 78

Introduction

L'hypobêtalipoprotéïnémie familiale (HBLF) est une pathologie génétique rare du métabolisme des lipides. Elle se définit par des concentrations plasmatiques de cholestérol total, de cholestérol LDL et d'apolipoprotéine B (apoB) inférieures au 5^{ème} percentile de celles observées en population générale. Le plus souvent, la forme primitive monogénique de transmission autosomique semi-dominante est liée à des variations délétères du gène *APOB* qui conduisent à la synthèse de protéines de plus petite taille appelées « troncatures » et/ou une diminution de la sécrétion de l'apoB (1). En résultent des défauts dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines provoquant la HBLF-SD2 (HBLF-secretion defect 2) avec des formes bi-alléliques (incidence < 1/1 000 000) ou mono-alléliques (prévalence en population générale = 1/3000)(2) . Tous les variants identifiés sont classés selon leur pathogénicité en suivant les recommandations de l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (3) . L'interprétation des variants de signification incertaine (VSI), non-sens ou troncatures tardives, est cruciale pour confirmer le diagnostic et assurer une prise en charge adaptée des patients.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de deux troncatures tardives, apoB-89 et apoB-95, mise en évidence chez des patients présentant une hypocholestérolémie, sur la production et la sécrétion hépatique de l'apoB-100.

Afin d'étudier fonctionnellement ces variations, le génome des cellules hépatiques humaines HuH7 a été modifié par la technique CRISPR-Cas9. Selon les conditions un à trois clones ont été obtenus avec des variations à l'état hétérozygote et homozygote proches de celles initialement ciblées. Après incubation avec de l'acide oléique, le taux d'expression d'ARN *APOB* a été quantifié RT-qPCR, et les concentrations d'apoB-100 intra et extracellulaires ont été mesurées par tests ELISA.

1) Rappels bibliographiques

1.1) L'apolipoprotéine B

1.1.1) Généralités

L'apolipoprotéine B est une glycoprotéine amphiphile jouant un rôle essentiel dans la structure des lipoprotéines. Composée de régions lipophiles et hydrophiles, l'apoB agit ainsi comme un détergent, stabilisant leur taille et leur structure (4). Cette protéine d'environ 550 KDa fait partie des plus imposantes protéines du protéome humain (5). Un seul et même gène, le gène *APOB* code chez l'Homme deux protéines apoB. L'apoB-100 correspond à la protéine « complète » composée de 4536 acides aminés, sécrétée par le foie. Dans l'intestin une protéine fonctionnelle tronquée de 2152 acides aminés est traduite : l'apoB-48. La synthèse de cette forme tronquée physiologique fait suite à une désamination de la cytidine 6666 en uridine, par un complexe protéique contenant la protéine apoBEC1 (6). Cette désamination conduit à la traduction d'un codon stop UAA au lieu du codon glutamine. Cette apoB comporte les 48% de l'extrémité N-terminale de l'apoB-100 et est physiologiquement tolérée par l'organisme. Elle entre dans la composition des chylomicrons.

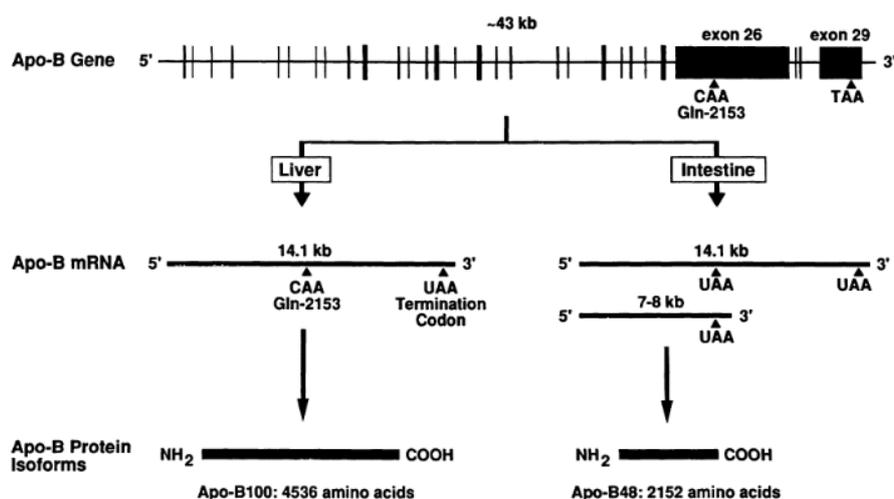


Figure 1- Schéma du mécanisme de synthèse de l'apolipoprotéine B48 à partir du gène APOB(7)

1.1.2) Le gène *APOB*

Le gène *APOB* humain se situe sur le bras court du chromosome 2 dans la région 2p23-24. D'une longueur de 43 kilobases (kb), il est structuré en 29 exons et 28 introns, codant pour un ARNm de 14 kb. L'exon 26 est le plus long avec 7572 paires de bases. Il code pour plus de la moitié de la protéine complète (8). L'ADNc de l'apoB est composé de 14121 nucléotides, les régions 5' et 3' non traduites (UTR) comportent respectivement de 128 et 301 nucléotides.

1.1.3) Structure Secondaire de la protéine

1.1.3.1) Le modèle pentapartite

Les premiers modèles structuraux de l'apoB-100 ont été construits à partir de son homologie structurale avec la lipovitelline. Ils couvraient les 1000 premiers résidus de l'apoB. Segrest et al. ont alors conclu à un modèle dit « pentapartite » où l'apoB est constituée de 5 domaines protéiques arrangés ainsi : NH₂-β_α1-β₁-α₂-β₂-α₃-COOH (4). Le dernier modèle théorique de l'apoB-100 proposé par Krisko et Etchebest divise l'apoB en 8 domaines avec leur structure 3D (9).

Fin 2022, Jeiran et al. proposent un nouveau modèle structural de l'apolipoprotéine B100 basé sur les derniers algorithmes de modélisation et des bases de données. L'apolipoprotéine B est alors divisée en 5 sous-unités et 11 domaines comportant 24% d'hélices α, 41% de feuillets β et 35% de spirales (10).

- La sous-unité 1 composée de 990 acides aminés (E28->S1017) est organisée en 3 domaines. Elle ressemble à un entonnoir pyramidal avec à son sommet un tonneau β (feuillelet β enroulé sous forme cylindrique et fermé par des liaisons hydrogènes). Sur les côtés de la pyramide on retrouve deux feuillets β antiparallèles, soutenus par deux couches incurvées d'hélices α.
 - Le domaine 1 de la sous-unité 1 (28-320 aa) est constitué de 11 feuillets β formant un entonnoir avec deux hélices α sur les côtés et au centre. Les

30 derniers acides aminés du domaine 1 s'enroulent aléatoirement et le relie au deuxième domaine.

- Le second domaine (321-616 aa) est constitué de 17 hélices α amphipathiques qui stabilisent la sous-unité.
- Le domaine 3 (617-1017 aa) constitue les 2 côtés de la pyramide ainsi que la base.

Cette extrémité N-terminale contient le site de liaison à la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP) (11) et aux récepteurs scavengers des macrophages (12). L'interaction entre la MTP et le domaine de l'apoB crée une poche lipidique qui facilite le recrutement des lipides au cours de l'assemblage des lipoprotéines (11).

- La sous-unité 2 est composée de 1055 acides aminés (A1018-P2072). Les hélices β du domaine 1 s'organisent en forme de boomerang avec 2 ailes. Shelness et al. suggèrent que cette région est impliquée dans l'initiation de l'assemblage des triglycérides dans l'apoB naissante (13).
- La sous-unité 3 comprend 478 aa (F2073-I2550) et deux domaines homologues aux apolipoprotéines échangeables (ApoA et E). Les domaines 1 (F2073-I2273) et 2 (D2293-I2550) sont entièrement constitués d'hélices et d'enroulements.
- La sous-unité 4 est constituée de 1507 aa (S2551-N4057) repartis en 3 domaines. La structure commence par 350 résidus sous forme de bobine. Puis, on retrouve des hélices β enroulées en forme de beignet. Les domaines 1 et 2 (respectivement 412 aa et 338 aa) sont parallèles et le domaine 3 (407 aa) leur est perpendiculaire. **Cette sous-unité 4 contient le domaine de liaison au récepteur LDL.**

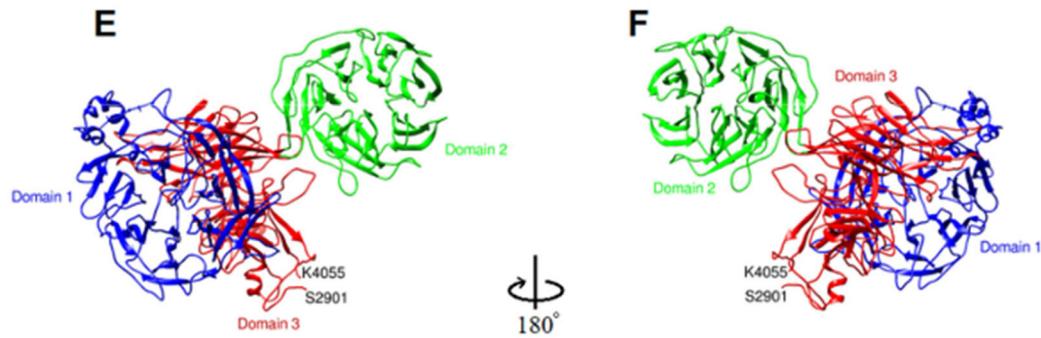


Figure 2- Représentation 3D de la sous-unité 4 de l'apoB-100(10)

- Enfin la sous-unité 5 est composée de 506 acides aminés organisés en 2 domaines perpendiculaires constitués d'hélices α amphipatiques.

L'architecture de l'apoB-100 est dynamique et flexible, ce qui lui permet de changer de conformation lors de la conversion des VLDL en LDL. En effet, Jeiran et al. suggèrent que les sous-unités riches en hélices α (III et V) sont étendues et en contact avec les lipides de surface dans les VLDL. Au contraire, les sous-unités riches en brins β (II et IV) seraient étroitement ancrées au noyau lipidique pour maintenir la protéine liée aux lipides. Elles seraient semblables à une corde ouverte sur les côtés opposés. Ainsi, lors de la lipolyse des triglycérides, les sous-unités 2 et 4 rapprocherait les cinq sous-unités. Cette modification de la structure régulerait et réduirait la pression exercée sur l'ensemble de la structure pour maintenir son intégrité (10)

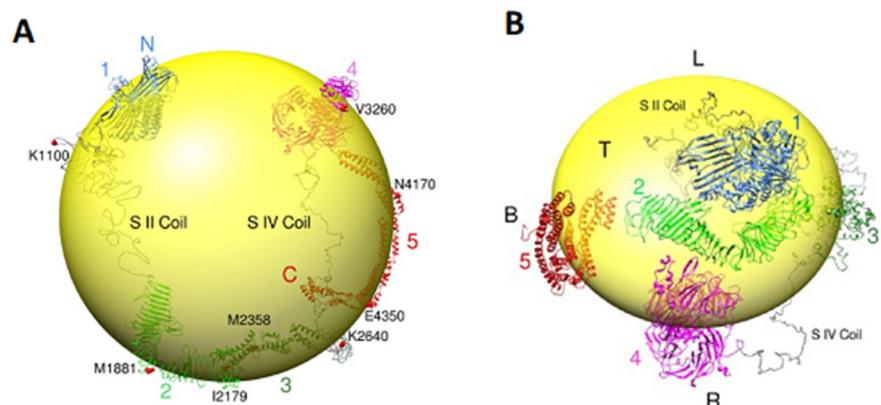


Figure 3- Architecture de l'apoB-100 sur les lipoprotéines. (A) Représentation en rubans de l'apoB-100 sur les VLDL (C) Représentation en rubans de l'apoB-100 sur les LDL.(10)

1.1.3.2) Un nouveau modèle structural

En mars 2024, Berndsen et Cassidy ont présenté la première structure de l'apoB-100 à l'aide de la cryo-microscopie électronique (cryo-EM) couplée au logiciel d'intelligence artificielle AlphaFold2(5) . La structure de l'apoB-100 étant enfin révélée, ils ont pu affiner le modèle déjà postulé depuis ces cinq dernières décennies.

Ils divisent la protéine en deux parties : un domaine N-terminal globulaire (NTD) d'une taille d'environ 1000 résidus et un grand domaine C-terminal (CTD) consistant en un feuillet β continu d'environ 58 nm de long et 4 nm de large, qu'ils nomment « la ceinture β », entrecoupé de 9 insertions inter-brins d'une longueur allant de 30 à 700 résidus.

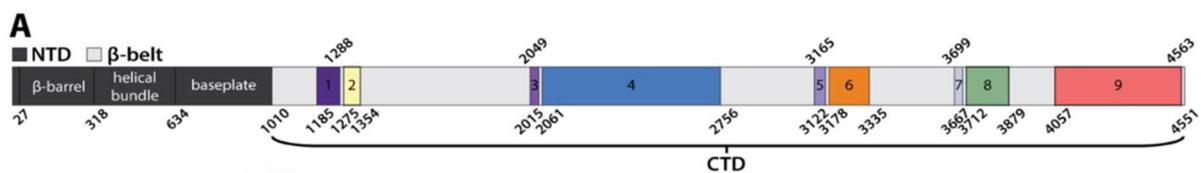


Figure 4- Représentation de la structure secondaire de l'apoB-100 (5)

Plus précisément, le NTD peut être divisée en 3 sous-domaines :

- Le tonneau- β (résidus 28-319) : composé de 11 brins et de 3 hélices, l'une bouchant le cœur du tonneau et l'autre entrant en contact avec la surface lipidique, et il contient la plus petite zone liée aux lipides de tous les domaines.
- Le faisceau hélicoïdal (résidus 320-634) : composé de 17 hélices courtes. Il est assimilé à un enroulement super-hélicoïdal droit avec une unité de répétition à deux hélices.
- La plaque de base (résidus 635-1010) : deux feuillets β amphipathiques séparés par une hélice amphipathique.

Ce domaine NTD présente une homologie de séquence de 30 à 40% avec la lipovitelline et la MTP.

Quant au domaine CTD de l'apoB-100, il est divisé ainsi : une ceinture β (1774 résidus) et 9 insertions inter-brins (1779 résidus). La ceinture β est le plus grand domaine de l'apoB-100 et est très conservée. Elle est composée de 120 brins d'une longueur comprise entre 3 et 16 résidus et d'une largeur moyenne d'environ 4 nm. Cette ceinture β peut se resserrer et se desserrer librement, en « glissant » le long du NTD lorsque cela est nécessaire, pour s'adapter à différentes tailles de particules. Les auteurs suggèrent que la ceinture β est le principal domaine structurel de l'apoB-100 responsable du maintien de la forme et de la cohésion des LDL.

Parmi les différents inserts, le 9 forme un appendice extensible en forme de trèfle et constitue le principal domaine structurel de la face L. L'insert 4 forme un appendice allongé en forme de faucille avec deux bras très articulés et constitue le principal domaine structurel de la face R. Enfin, les inserts 6 et 8 ont des structures similaires et se situent dans la région de liaison du récepteur aux LDL.

Finalement, ce nouveau modèle vient confirmer et affiner le modèle pentapartite précédemment établi. Le domaine NTD correspond à la sous-unité 1 de *Jeiran et al.* La nomenclature des trois sous-domaines correspond à celle utilisée dans la littérature, à l'exception du troisième sous-domaine, que les auteurs ont appelé « plaque de base », car il aurait un rôle de soutien des deux autres sous-domaines à la surface de la particule. Ensuite, Berndsen et Cassidy ont constaté que $\beta 1$ et $\beta 2$, que l'on croyait former deux domaines indépendants, font en fait partie de la même feuille β continue, qu'ils nomment « la ceinture- β ». En outre, ils révèlent aussi que les grandes insertions inter-brins 4 et 9, correspondent respectivement aux domaines $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du modèle pentapartite.

1.2) Synthèse et sécrétion des lipoprotéines contenant l'apoB

La production des lipoprotéines contenant l'apoB a lieu dans le foie et dans l'intestin et suit le modèle suivant : une apolipoprotéine B pauvre en lipides est initialement produite, puis les lipides sont ajoutés au noyau (14).

1.2.1) Synthèse et sécrétion de l'apoB

L'apolipoprotéine B est synthétisée par les ribosomes attachés à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (RER), voie de synthèse classique des protéines destinées à être sécrétées ou membranaires. Le polypeptide en cours de formation traverse le RE par un canal, lui évitant d'être exposé dans le cytosol. C'est dans ce compartiment que débute la formation des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) dans le foie (15).

Elle comprend trois types de particules (15) :

- Pré-VLDL, lipoprotéine qui ne sera pas sécrétée
- VLDL2 : une lipoprotéine VLDL pauvre en triglycérides (TG)
- VLDL1 : VLDL riche en TG

L'assemblage des lipoprotéines hépatiques riches en triglycérides dépend de l'interaction avec la MTP. Cet hétérodimère est constitué d'une sous-unité M qui transfère les lipides et d'une enzyme isomérase fonctionnelle appelée PDI, nécessaire pour empêcher l'agrégation et maintenir l'activité catalytique de la sous-unité M (16). Au fur et à mesure de sa biosynthèse, l'apoB-100 interagit avec la MTP et forme des « poches lipidiques » que la MTP remplit de lipides. De cette manière, l'apoB est lipidée et se replie sur un noyau hydrophobe composé principalement de triglycérides (15). Ce processus aboutit à une particule partiellement lipidée appelée pré-VLDL qui peut être soit retenue et dégradée, soit encore lipidée pour former les VLDL2. Ces particules sont ensuite transportées vers le Golgi et peuvent alors être sécrétées dans la circulation sous forme de VLDL2 ou converties en la forme riche en TG, VLDL1, après l'ajout de TG supplémentaires. Les deux formes sont donc retrouvées dans la circulation sanguine (17).

Dans l'intestin, la formation des chylomicrons (CM) suit le même principe. La synthèse débute dans le réticulum endoplasmique où l'apoB-48 nouvellement synthétisée acquiert des triglycérides, esters de cholestérol et phospholipides par interaction avec la MTP. Puis, ces chylomicrons primordiaux subissent une lipidation supplémentaire pour former des préCM qui seront ensuite exportés vers le Golgi dans des vésicules de transport de préCM. La liaison des vésicules contenant les préCM avec le Golgi est dépendante de la protéine Sar1B. Dans le Golgi, les préCM acquièrent de l'apoA-I et de l'apoA-II pour former des CM matures. Par la suite, les CM matures seront exportés vers la surface basolatérale de l'entérocyte puis libérées dans la lymphe. Enfin, les lipoprotéines atteindront la circulation sanguine (18).

1.2.2) Métabolisme des lipoprotéines

Les chylomicrons libérés dans la circulation, riche en TG, vont distribuer leurs lipides aux tissus adipeux et musculaires. A la surface de ces tissus, la lipoprotéine lipase (LPL) reconnaît l'apoC-II des CM et hydrolyse les triglycérides en acides gras. La lipoprotéine dépourvue de TG appelée « remnant de CM » est ensuite recaptée par le foie via l'apoE et pourra être sécrétée par le foie sous forme de particules VLDL (19).

Les VLDL sont responsables de la distribution des triglycérides qu'elles contiennent aux cellules périphériques. Elles sont catabolisées, également par l'action de la LPL en lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) qui peuvent, soit être absorbées par les hépatocytes, soit converties en LDL par la lipase hépatique. Les LDL, lipoprotéines enrichies en cholestérol peuvent ensuite, être renvoyés vers le foie pour y être stockées en vue d'une utilisation ultérieure, être décomposées pour en exploiter l'énergie ou approvisionner les tissus extra-hépatiques en cholestérol, indispensable au bon fonctionnement cellulaire. La reconnaissance est médiée par l'interaction de l'apoB-100 et du récepteur au LDL (LDLR) (19).

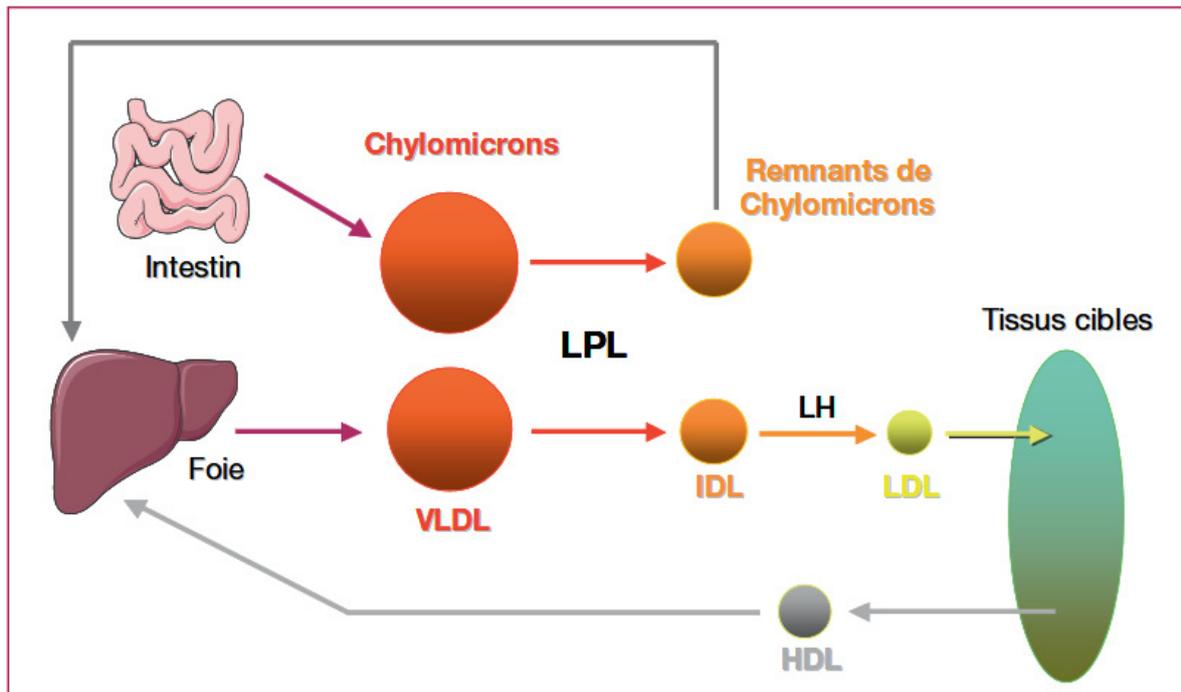


Figure 5- Schéma simplifié du métabolisme des lipoprotéines (20)

1.2.3) Régulation de la production d'apoB

L'expression de l'apoB est constitutive par conséquent sa sécrétion est régulée par des mécanismes post-traductionnels notamment par dégradation co-translationnelle ou dans la lumière du RE/Golgi. Le proportion d'apoB non dégradée est un déterminant important de la sécrétion des VLDL.

La dégradation intracellulaire se produit à différents niveaux :

- A proximité de la biosynthèse de l'apoB : la molécule d'apoB est rétractée de la lumière du RE vers le cytosol, par le même canal par lequel elle est entrée lors de la biosynthèse. Elle est ensuite ubiquitinée puis dégradée par le protéasome. Cette dégradation co-translationnelle de l'apoB est influencée par la disponibilité des lipides et l'activité de la MTP. Ainsi, la présence d'une quantité suffisante de lipides semble être un facteur essentiel au bon repliement de la protéine et donc de la sécrétion ou non de la lipoprotéine (14).

- Dans un compartiment séparé du RER par un mécanisme peu décrit, appelé protéolyse présécrétoire post-ER (PERPP). Ce processus est stimulé par les acides gras $\omega 3$, augmentant la production de produits de peroxydation lipidique intracellulaire et le stress oxydatif (14).
- Une protéine chaperonne localisée dans le RE, ER-60, a été associée à l'apoB dans les cellules HepG2 et semble être impliquée dans la dégradation de l'apoB par une voie non protéasomale (21) . Cependant, on ne sait pas si ER-60 agit directement sur l'apoB-100 en tant que protéase ou si elle est impliquée dans le ciblage de l'apoB en vue de sa dégradation.
- Par recapture de la molécule via le récepteur LDL (LDLR). Celui-ci peut se lier à l'apoB pré-sécrétoire dans le RE/Golgi et la cibler pour être dégradée. Les VLDL naissants peuvent également être "recapturés" par le LDLR immédiatement après leur sécrétion, empêchant ainsi leur libération dans la circulation. Après la recapture, les particules sont internalisées et acheminées vers les lysosomes pour être digérées par les protéases (14).

La quantité finalement sécrétée par la cellule n'est pas déterminée par la quantité synthétisée mais par la répartition de l'apoB-100 nouvellement synthétisée entre la dégradation intracellulaire et la progression dans la cellule jusqu'à la sécrétion finale (14).

1.2.4) Recapture des lipoprotéines contenant l'apoB

Au niveau du foie et des tissus périphériques, l'absorption médiée par le LDLR est le principal mécanisme du catabolisme des lipoprotéines contenant l'apoB. Le LDLR est une protéine monomérique constituée d'une région extracellulaire, transmembranaire et d'une queue cytoplasmique contenant le signal d'internalisation. Le LDLR reconnaît spécifiquement l'apoB-100 contenue dans la lipoprotéine, qui est ensuite endocytée. Le LDLR est alors recyclé vers la membrane plasmique en fonction de son affinité avec la protéine PCSK9 et la lipoprotéine est transférée dans un lysosome pour être digérée.

Les apolipoprotéines sont dégradées en acides aminés et l'ester de cholestérol est converti en cholestérol libre. Ce cholestérol libre régule alors l'homéostasie du cholestérol cellulaire en régulant l'expression du LDLR (14).

1.3) L'hypobetalipoprotéinémie familiale : HBLF-SD2

L'hypobetalipoprotéinémie familiale (HBLF) (OMIM 107730) est une maladie rare du métabolisme des lipoprotéines. Elle se caractérise par de faibles concentrations plasmatiques de cholestérol total, de cholestérol LDL et d'apoB inférieurs au 5^{ème} percentile des taux observés dans la population générale (22). Bredefeld et al. ont récemment proposé une nomenclature simplifiée des pathologies du métabolisme lipidique basée sur leur mécanismes moléculaires (1). Elles sont divisées en deux classes, HBLF par défaut de sécrétion (secretion defect, SD) ou par augmentation du catabolisme des lipoprotéines (enhanced catabolism, EC) (cf. figure 5)

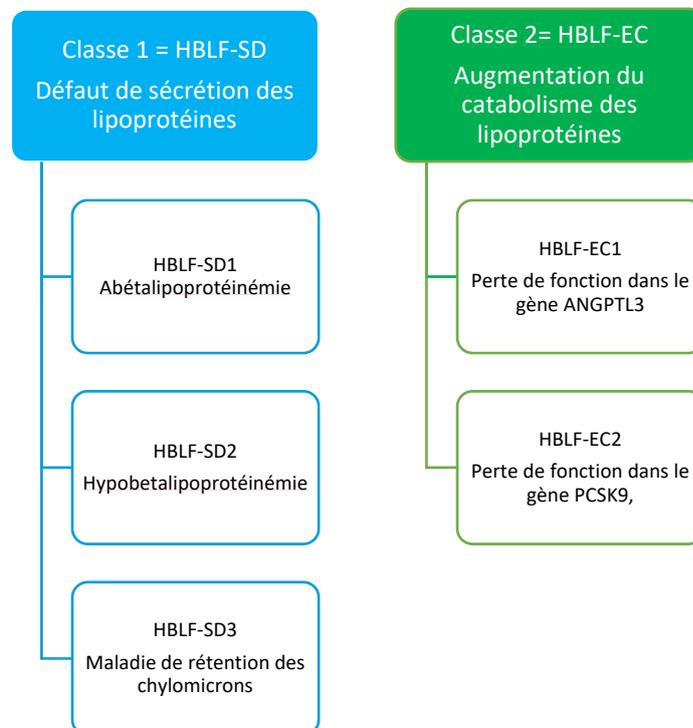


Figure 6- Classification des pathologies du métabolisme selon Bredefeld et al. (1)

L'hypobétalipoprotéinémie monogénique, HBLF-SD2 appartient actuellement à la classe 1 de cette classification. Les variations délétères autosomiques semi-dominantes du gène *APOB* empêchent la protéine apoB de former des lipoprotéines et provoquent la HBLF-SD2 avec des formes bi-alléliques ou mono-alléliques. Le biologiste moléculaire intervient pour confirmer le diagnostic grâce au génotypage.

1.3.1) Tableau clinique

Les individus homozygotes présentent des concentrations sériques d'apoB et de LDL-c extrêmement faibles voire indétectables. Le phénotype est alors sévère dès la naissance. En effet, la malabsorption intestinale des lipides entraîne un retard de croissance chez l'enfant ainsi qu'une carence en vitamines liposolubles A et E (23). Cette carence est responsable de complications neurologiques et ophtalmiques comme la dégénérescence rétinienne pigmentaire. Dans certains cas ce phénotype ne se distingue pas de celui de l'abétalipoprotéinémie, causée par une perte de fonction de l'activité MTP héritée de façon récessive. Le diagnostic différentiel se fait alors à partir du bilan lipidique des parents : leur concentration de cholestérol est normale dans le cas d'une ABL alors qu'elle est diminuée pour une FHBL-SD2. De plus, le génotypage moléculaire confirme le diagnostic. Chez les formes bi-alléliques, la prise en charge du patient doit être précoce pour limiter les symptômes digestifs, permettre une croissance optimale et prévenir les complications liées aux carences en vitamines liposolubles et autres nutriments.

Les hétérozygotes sont généralement cliniquement asymptomatiques. Leur prévalence dans la population générale est estimée entre 1/1 000 et 1/3 000 (2). Ils n'ont pas de troubles liés aux carences vitaminiques liposolubles, notamment en vitamine E, même si certains ont de très faibles concentrations d'apoB. Une légère acanthocytose et une stéatose hépatique peuvent être observées. La prise en charge des patients HBLF-SD2 mono-allélique repose essentiellement sur la surveillance hépatique et la diminution des facteurs de risque de stéatose/cirrhose hépatique.

Une surveillance des concentrations des vitamines liposolubles peut également être réalisée lors d'une grossesse.

Par ailleurs, la plupart des individus atteints de HBLF-SD2 présentent un risque plus faible d'athérosclérose et de maladie coronarienne. Dans une cohorte de 57973 participants atteints ou non de coronaropathie, être porteur d'une mutation perte de fonction du gène *APOB* réduit de 72 % le risque de coronaropathie (OR = 0,28 ; IC à 95 %, 0,12-0,64 ; P=0,002)(24). Par contre du fait de la sécrétion défectueuse des lipoprotéines contenant de l'apolipoprotéine B, ces individus auraient un risque de développer une maladie hépatique stéatosique associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD) six fois plus élevée (25).

1.3.2) HBLF-SD2 et MASLD

La MASLD est un groupe de maladies hépatiques allant de la stéatohépatite non alcoolique (MASH) à la fibrose et la cirrhose (26). De nombreuses données confirment l'existence d'associations entre plusieurs variations génétiques et différents traits de la MASLD. Plus précisément, les variations rares bi-alléliques du gène *APOB* entraînant une HBLF-SD2 peuvent également provoquer une stéatose hépatique (27). En outre, selon une étude d'association des variations génétiques et la présence de graisse hépatique par un modèle de machine learning à partir d'une biobanque anglaise, les variations du gène *APOB* confèrent un risque six fois plus élevé de stéatose hépatique (25).

A l'heure actuelle peu de données prospectives sont disponibles à propos des complications hépatiques dans la HBLF-SD2. Smati *et al.* ont déterminé la prévalence par FibroScan de la stéatose (score paramètre d'atténuation contrôlée CAP >275 dB/m) et de la fibrose hépatique (rigidité hépatique de 8 kPa et 12 kPa) dans l'HBL primitive chez 104 patients (28). Dans cette étude une stéatose hépatique a été détectée par FibroScan chez 31,7 % des participants (intervalle de confiance [IC] à 95 %, 23 %-42 %) et chez 32,1% (IC à 95 %, 22 %-43 %) par échographie hépatique.

De plus, la prévalence de stéatose hépatique augmentait avec l'âge, atteignant 68% (IC 95%, 43%-87%) après 50 ans, et elle était détectée à un âge plus précoce chez les individus atteints de FHBL-SD2. Par ailleurs, les patients HBLF-SD2 avec une stéatose hépatique étaient plus souvent des hommes (63.6 % vs 36.6 % ; $p = 0.011$), plus âgés (45.9 ans +/- 18.4 vs 30,5 ans +/- 12.9 ; $p < 0.001$), avec un indice de masse corporelle (IMC) plus élevé (28. 1 +/- 5.5 vs 21.8 +/-3.7 kg/m² ; $p < 0.001$) et une fréquence plus élevée de diabète de type 2 (27.3% vs aucun en l'absence de stéatose ; $p < 0.001$) et d'hypertension artérielle (39.4% vs 2.9% ; $P < 0.001$). Puis en prenant en compte les facteurs de confusion communs, seuls l'augmentation de l'IMC (odd ratio [OR], 3.68 ; IC 95 % 1.90-8.06 ; $p = 0.0003$) et la présence d'une variation délétère dans le gène *APOB* (OR, 5,56 ; IC 95 % 1.64-21.5 ; $p = 0.0078$) ont été associés à la stéatose hépatique. Finalement, cette étude montre que les individus HBLF-SD2 ont 5.6 fois plus de risque de développer une MASLD. Cette pathologie représente donc un facteur de risque majeur de complications hépatiques d'autant plus le risque augmente significativement avec l'âge (28).

Par ailleurs, la sévérité de la stéatose hépatique dépendrait de la capacité de l'apoB tronquée à être lipidée. Les troncatures plus courtes semblent être associées à une stéatose plus grave (29).

1.3.3) Physiopathologie de la HBLF-SD2

Les faibles concentrations sériques de lipoprotéines contenant une apoB tronquée peuvent s'expliquer par plusieurs mécanismes :

- **La forme tronquée est moins sécrétée ou est plus rapidement éliminée**
- **Un effet dominant négatif**

1.3.3.1) Diminution de la sécrétion de la forme tronquée

En 1992, Klaus *et al.* ont étudié pour la première fois le métabolisme *in vivo* de l'apoB-89 chez deux sujets hétérozygotes pour une forme d'apoB tronquée à 89%, apoB-89/apoB-100 par administration d'un traceur ¹³C-Leucine. Chez ces deux individus, la concentration totale d'apoB est inférieure de 30 % à la normale et l'apoB-89 est présente en plus faibles concentrations dans le plasma que l'apoB-100. Les données indiquent que l'apoB-89 et l'apoB-100 sont produites à des taux similaires, mais que les lipoprotéines contenant l'apoB-89 sont éliminées plus rapidement que celles contenant de l'apoB-100 (30). Ils expliquent ceci par des changements de conformation dans la région de reconnaissance de l'apoB-89 aux récepteurs LDL. Ceux-ci augmenteraient l'affinité de liaison aux récepteurs. Ainsi, l'augmentation de la clairance des lipoprotéines contenant de l'apoB tronquée pourrait expliquer leur concentration intracellulaire plus élevée et extracellulaire plus faible (30).

En 1996, ils ont étudié ensuite la sécrétion *in vivo* des apoB-31, -54,8, -75 et 89 par rapport à l'apoB-100 en utilisant la même méthodologie. Les taux de sécrétion de l'apoB-89, de l'apoB-75, de l'apoB-54.8 et de l'apoB-31 étaient respectivement de 92 %, 64 %, 37 % et 12 % par rapport à l'apoB-100. De plus, les lipoprotéines contenant de l'apoB-89, de l'apoB-75 et de l'apoB-54.8 présentaient une clairance accrue par rapport à celles contenant de l'apoB-31. Ils ont montré qu'il existe une corrélation entre la taille d'une troncation et son taux de sécrétion ($r^2 = 0,86$; $p < 0,0001$) : plus la forme tronquée est courte, plus sa sécrétion est faible. De plus, la sécrétion d'apoB était réduite d'environ 1,4 % pour chaque 1 % d'apoB tronquée (31).

1.3.3.2) Clairance des lipoprotéines contenant de l'apoB tronquée

Comme évoqué précédemment, les LDL apoB-75 et apoB-89 sont épurées plus rapidement par le foie que les LDL apoB-100, ce qui ne semblerait pas être le cas pour celles contenant l'apoB-31 (31). Zhu *et al.* se sont alors intéressés au métabolisme des lipoprotéines contenant les troncatures courtes apoB-31, -38,9 et 43,7. Les particules ont été isolées, marquées par tyramine radiomarquée à l'iode 125 ou 131 puis injectées à des lapins. Dans cette étude, le mécanisme d'élimination reste encore non élucidé. Les lipoprotéines contenant les apoB tronquées sont éliminés plus rapidement que celles contenant apoB-100. Cependant, les lipoprotéines contenant l'apoB100 sont prises en charges par le foie alors que celles contenant l'apoB-38.9 et l'apoB-43.7 sont principalement éliminées par le rein. Quant aux particules contenant l'apoB-31, elles sont équitablement éliminées par le rein et le foie. La longueur de la troncation influencerait donc son lieu de catabolisme (32).

1.3.3.3) Un effet dominant négatif

Chez les individus FHBL-SD2 hétérozygotes, ayant un allèle normal de l'apoB-100, les concentrations sériques d'apoB-100 et de LDL-C devraient être d'environ la moitié des concentrations normales. Cependant, généralement, les concentrations sériques typiques d'apoB-100 (et de LDL-C) ne représentent que 25 à 30 % de la normale. Cela suggère que le métabolisme de l'apoB-100 peut être affecté par la présence d'une mutation sur l'autre allèle codant l'apoB.

En 1995, Aguilar-Salina, Klaus *et al.* ont étudié le métabolisme *in vivo* de l'apoB100 chez 8 sujets HBLF-SD2 hétérozygotes (apoB-31 ; 52 ; -54,8 ; -75 et apoB-89). Ils ont montré que les hétérozygotes HBLF-SD2 avaient des taux de production de VLDL-apoB-100 inférieurs aux sujets contrôles apoB-100/apoB-100. Le taux de production était d'environ 30% de ceux des sujets témoins (33).

Ils expliquent la diminution de la sécrétion des VLDL apoB-100 chez les hétérozygotes par des altérations au niveau d'un ou plusieurs sites de régulation. Des changements pourraient avoir lieu au niveau de la transcription de l'ARNm de l'apoB-100, de la traduction de l'ARNm ou bien de la translocation dans le RER. Les modifications peuvent toucher aussi la dégradation dans le réticulum endoplasmique, l'assemblage des lipides avec l'apoB-100, le transfert des vésicules dans le Golgi et des vésicules sécrétoires jusqu'à la sécrétion (33). Ils formulent également l'hypothèse que les taux de recapture dans l'espace de Disse des particules VLDL naissantes contenant de l'apoB-100 soient affectés par la présence de formes tronquées d'apoB (33). L'apoB-100 synthétisée à partir de l'allèle normal est donc moins synthétisée et/ou également plus dégradée par le protéasome et/ou plus rapidement épurée de la circulation sanguine.

En résumé, les mécanismes responsables d'une HBLF-SD2 sont les suivants : une faible sécrétion hépatique des VLDL apoB-100, une faible sécrétion de VLDL contenant une apoB tronquée ainsi que leur clairance accrue. Ils conduisent à l'augmentation intracellulaire des triglycérides dans le foie.

1.3.4) Génétique

La FHBL-SD2 est causée par des variations rares et délétères du gène *APOB*. A l'heure actuelle plus de 200 variants sont classés pathogène ou probablement pathogène (34). Les variants non-sens, de décalage du cadre de lecture et d'épissage du gène *APOB*, conduisent à la formation de formes d'apoB prématurément tronquées.

Dans la littérature on retrouve des troncatures allant de 2% à 89% chez des patients atteints d'HBLF-SD2. Actuellement la plus petite troncature circulant dans le plasma et associée aux lipides est l'apoB-27,6. Elle a été identifiée dans une famille atteinte d'HBLF chez un homozygote et trois hétérozygotes. Le séquençage a révélé une transition T>C à + 2 de l'intron 24, perturbant le site donneur d'épissage 5' et interrompant la traduction de la sérine.

Cette mutation entraîne la production d'un ou de plusieurs nouveaux carboxy-peptides hydrophobes, ce qui pourrait expliquer la capacité de cette petite espèce d'apoB tronquée à s'associer à suffisamment de lipides pour éviter la dégradation (35). Par ailleurs, la plus grande apoB tronquée responsable d'hypobetalipoprotéinémie identifiée est l'apoB-89. La délétion d'une Guanine dans l'exon 29 génère une mutation frameshift codant pour les acides aminés suivants : Arg, Gln, Leu, Leu, Ala, Cys puis un codon stop(36).

En général, les troncatures plus longues (par exemple, apoB-89 et apoB-75) sont distribuées parmi les particules de densité VLDL, IDL et LDL. Les troncatures courtes (par exemple, apoB-31 et apoB-38.9) sont retrouvées dans les HDL (32). En effet, plus l'apoB est tronquée moins elle conserve de domaines impliqués dans la liaison des lipides : la lipoprotéine formée est pauvre en lipides donc plus dense (4).

Lorsque le variant identifié chez un patient FHBL-SD2 est un VUS, comme c'est le cas, selon les recommandations ACMG lorsque la délétion supprime 10% ou moins de la partie C-terminale de la protéine (protéine tronquée de taille $\geq 90\%$), des explorations fonctionnelles sont nécessaires.

1.4) Etude fonctionnelle *in vitro* des variants *apoB*

1.4.1) Méthode classique : Transfection cellulaire

La transfection cellulaire est une méthode d'étude des fonctions d'un gène. Le principe est le suivant : On choisit un modèle cellulaire ne produisant pas naturellement la protéine d'intérêt et on lui transfecte soit un plasmide contenant le gène à l'état sauvage (Wild-Type), soit un plasmide contenant le gène d'intérêt muté. Une fois la transfection réalisée on compare les phénotypes des différents clones cellulaires obtenus.

L'effet de variations faux-sens *APOB* a été étudié *in vitro* sur des cellules murines (McA-RH7777) (37,38) ou de singes COS-7(39). Cependant ce modèle de transfection présente des limites. Tout d'abord, la taille du gène *APOB* étant trop importante, le plasmide ne contient pas la séquence physiologique du gène d'intérêt mais seulement la partie codante, voire dans les cas de l'apoB, seulement la partie N-terminale (17 ou 48%) : il ne permet donc pas d'étudier les troncatures tardives. De plus, ce modèle ne permet pas de modéliser la zygote des variations. Or, il est intéressant d'étudier la sécrétion d'apoB de clones hétérozygotes et homozygotes afin de comprendre d'avantage l'effet dominant négatif.

C'est pourquoi la technique d'édition du génome CRISPR-Cas9 a été choisie pour cette étude : elle permet d'obtenir un modèle cellulaire plus proche des conditions physiopathologiques humaines.

1.4.2) Méthode d'édition du génome : CRISPR-Cas9

1.4.2.1) Découverte du système CRISPR-Cas

Le système CRISPR-Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) a été décrit pour la première fois par Ishino *et al.* lors de l'étude du génome d'*E.coli* en 1987 (40). Il est constitué d'un locus CRISPR composé de courtes séquences nucléotiques répétées intercalées de courtes séquences nucléotidiques variables et de gènes codant pour des protéines nommées Cas (CRISPR-associated).

La fonction biologique initiale du système CRISPR est la protection des procaryotes contre des infections par des bactériophages. Pour se protéger la bactérie produit de petits ARN CRISPR : les ARNcr. Ces ARN non codants associés aux protéines Cas agissent comme un complexe de surveillance. Ainsi lors d'une nouvelle infection ou d'une invasion par un acide nucléique étranger, les ARNcr reconnaissent les séquences étrangères et viennent s'y fixer complémentaiement. Les protéines Cas peuvent ensuite couper le matériel génétique envahisseur, protégeant ainsi la cellule (41).

Le processus est adaptatif, les protéines Cas agissent ensemble afin d'acquérir de nouveau espaceurs dans le locus CRISPR à partir d'ADN étranger (42). Les scientifiques se sont alors intéressés à ce système comme outil potentiel pour l'édition du génome.

1.4.2.2) CRISPR-Cas9

Le système CRISPR-Cas9 se compose de 2 éléments (43) :

- ARN guide : Fusion de l'ARNcr et de l'ARNtracr (active la Cas9 et la guide vers sa cible)
- L'endonucléase Cas9, coupant l'ADN double brin ciblé par l'ARNg

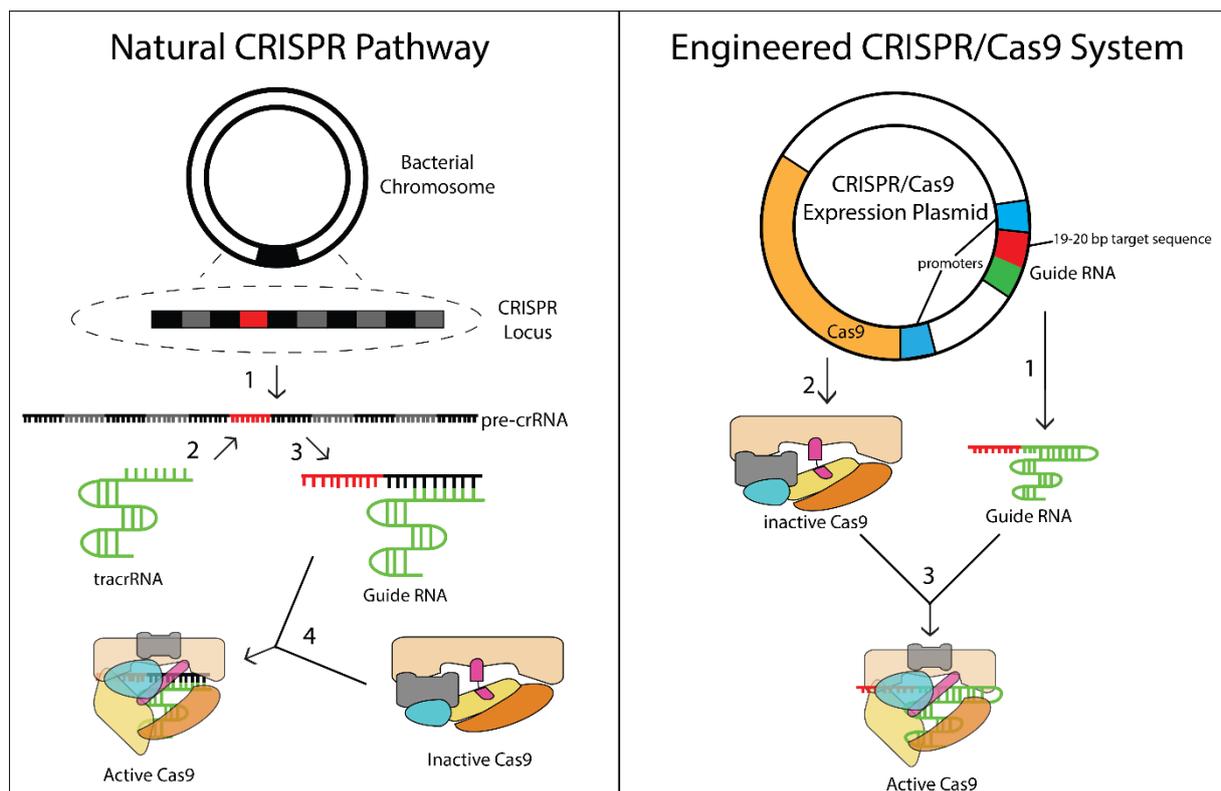


Figure 7- Système CRISPR-Cas bactérien VS système CRISPR-Cas9 développé

Pharmamirror.How CRISPR-Cas9 Gene Editing Is Revolutionizing Medical Research[en ligne].2019.cité le 18/12/2024.Disponible : <https://www.pharmamirror.com/pharmaceutical-articles/how-crispr-cas9-gene-editing-is-revolutionizing-medical-research/>

À la suite de la coupure d'ADN, la cellule procède à la réparation de son génome. Deux systèmes de réparation sont alors possibles. Le plus fréquemment, la cellule utilise le système de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). Ce mécanisme est non-conservatif c'est-à-dire qu'il ne restaure pas la séquence initiale de l'ADN, il assure seulement la continuité de l'ADN endommagé par la cassure double brin. Cette réparation conduit à l'apparition d'une mutation du gène ciblé et souvent à son inactivation (knockout, KO). Le second mécanisme appelé recombinaison homologue (HDR) est celui qui nous intéresse pour notre étude. En introduisant un fragment d'ADN que l'on appelle « ADN donneur », contenant notre mutation d'intérêt, nous permettons une édition du génome précise.

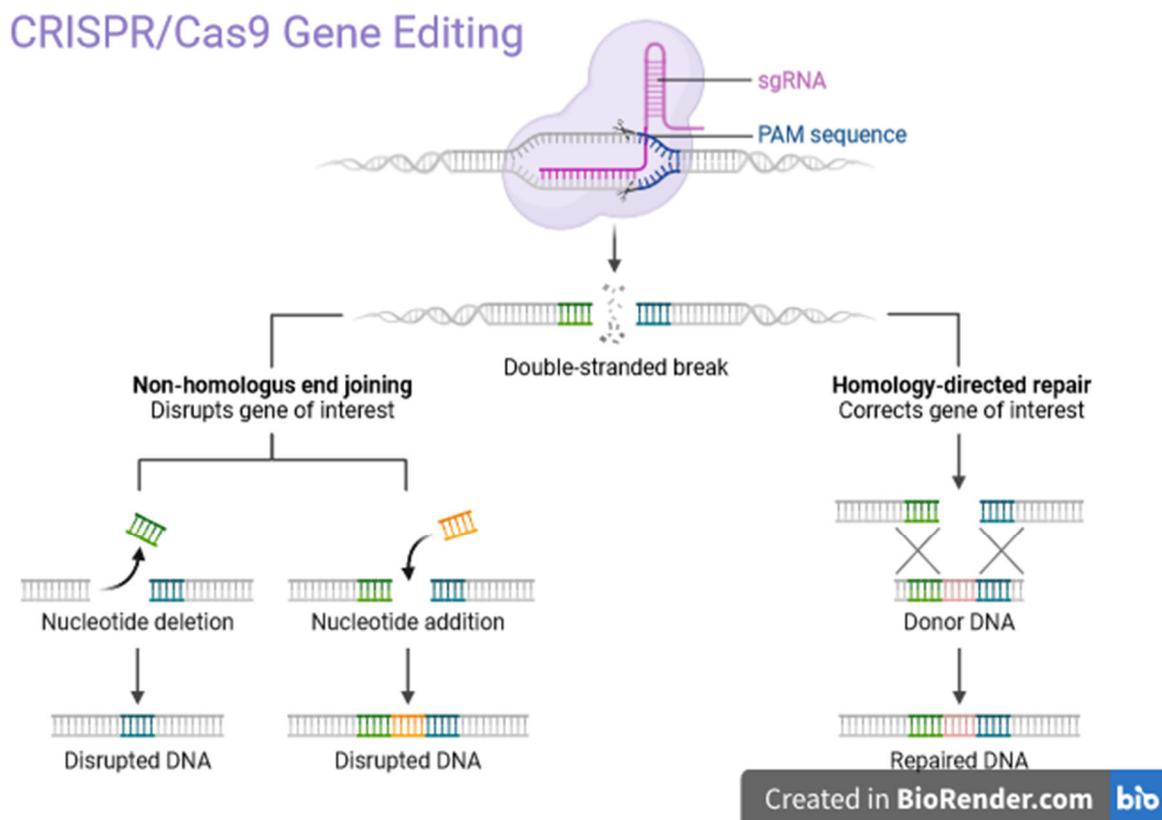


Figure 8- Edition génomique par le système CRISPR-Cas9, disponible sur BioRender

En résumé, un plasmide contenant la séquence codant pour un ARN guide de 20 nucléotides complémentaires de la séquence d'ADN cible, ainsi que la séquence de la Cas9 ou la Cas9 sous forme protéique, sont transfectés dans les cellules sélectionnées. Dans notre cas, le plasmide a été transfecté dans des cellules HuH7, lignée cellulaire permanente établie à partir de tissu d'hépatome, qui synthétisent et secrètent naturellement des VLDL. L'ARN guide se fixe sur la séquence homologue de l'ADN cible. Ensuite, la Cas9 reconnaît la séquence ARNtracr, qui est juxtaposée à l'ARN guide. La Cas9 va alors cibler une séquence de 3 nucléotides de NGG appelée PAM (Proto-spacer Adjacent motif) et couper les deux brins de l'ADN complémentaire à l'ARN. Cette cassure double brin sera réparée soit par NHEJ, pouvant être à l'origine d'insertion ou de délétion, soit par HDR qui permettra une modification précise du génome et l'obtention de notre mutation d'intérêt (44).

Finalement, les études fonctionnelles sont nécessaires car elles permettent d'étudier divers phénomènes biologiques dans des cellules spécifiques. Parmi ces différentes méthodes le système CRISPR-Cas9 est une technique de choix pour modifier le génome de cellules synthétisant la protéine apoB-100 étudiée, le but étant de se rapprocher au maximum des conditions physio-pathologiques humaines. En comparant ensuite l'expression, la production puis la sécrétion de protéines « anormales » versus « normales » il est possible d'évaluer l'impact des variations associées.

2. Objectif de L'étude

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet d'un variant de signification incertaine (VSI), identifié chez un patient présentant une hypocholestérolémie, sur la production et la sécrétion hépatique de l'apolipoprotéine B-100 afin de déterminer s'il est responsable de ce phénotype.

Le variant identifié chez un patient présentant une hypobetalipoprotéinémie avait été classés d'après la classification de la société savante « American college of medical genetics and genomics » (ACMG) selon les données épidémiologiques, structurale et de ségrégation (3). Il conduit à la formation de formes d'apolipoprotéine B prématurément tronquées à 95%. Nous avons aussi étudié la variation codant pour une apoB-89, plus grande troncature de la littérature identifiée dans le plasma responsable d'une hypobetalipoprotéinémie

Afin d'affiner la classification de ces variations, nous les avons caractérisées fonctionnellement par étude *in vitro*. Pour cela, nous avons modifié le génome de cellules humaines sécrétant naturellement de l'apoB à l'aide du système CRISPR-Cas9, pour analyser l'effet de ces variations. Nous avons choisi la lignée cellulaire HuH7, provenant d'un carcinome hépatocellulaire humain, pour sa capacité de sécrétion de l'apoB et sa disponibilité au laboratoire.

Les différents clones cellulaires obtenus ont été cultivés en présence d'acide oléique pour favoriser la sécrétion d'apoB-100. Puis l'étude phénotypique a été réalisée grâce aux techniques suivantes, en comparaison avec des clones normaux, (wild-type, WT)

- La RT-PCR en temps réel a permis de quantifier l'expression d'ARN *APOB*.
- La concentration d'apoB-100 intra et extracellulaire a été déterminée par la méthode immuno-enzymatique ELISA.
- La réalisation d'un dosage colorimétrique des protéines du lysat cellulaire (dosage BCA : BiCinchoninic acid Assay) nous a permis de normaliser les résultats de la quantification d'apoB-100.

Nous pouvons résumer le déroulé de l'étude par le schéma suivant :

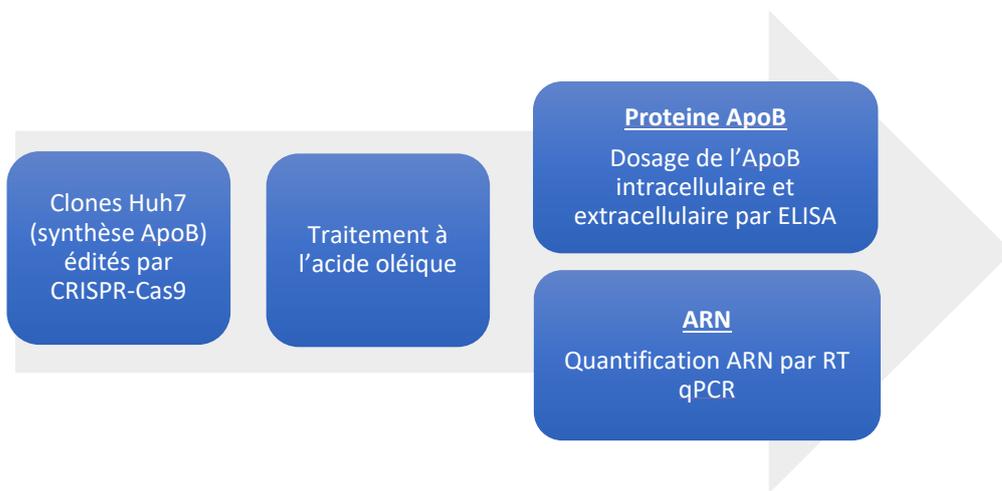


Figure 9- Schéma des différentes étapes de l'étude

3. Matériel et méthode

3.1) Sélection des variants

Les deux variants sélectionnés sont les suivants :

- NM_000384.3(APOB) : c.12181delG, p.(Glu4034Argfs4040X)
- NM_000384.2 (APOB) : c.12944_12959del, p.(Lys4315Argfs*29)

Le premier variant est issu de la littérature. Il correspond à la plus grande troncature de l'apoB retrouvée dans le plasma responsable d'hypocholestérolémie : l'apoB-89.

Le second variant a été identifié chez un patient HBLF de la cohorte de patients hypocholestérolémiques du laboratoire nommée CHOPIN. Il conduit à la synthèse d'une apoB tronquée à 95%.

3.1.1) Variant NM 000384.3(APOB) : c.12181delGp.issu de la littérature

En 1989, Krul *et al.* ont identifié deux formes tronquées d'apolipoprotéine B-100 dans une famille dont 5 membres ont été diagnostiqués HBLF (concentrations de cholestérol LDL inférieurs au cinquième percentile)(45). Ils les nomment apoB-40 et apoB-90. La ségrégation familiale (Fig.9) comprend onze frères et sœurs. Les auteurs ont utilisé la technique SDS-PAGE et des immunoblots avec quatre anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes définis de l'apoB. Trois sœurs, dont le cas index ont hérités des deux variants et présentent des concentrations d'apoB fortement réduites. Un frère a hérité de l'apoB-90/apoB-100 et un autre de l'apoB-40/apoB-100(45).

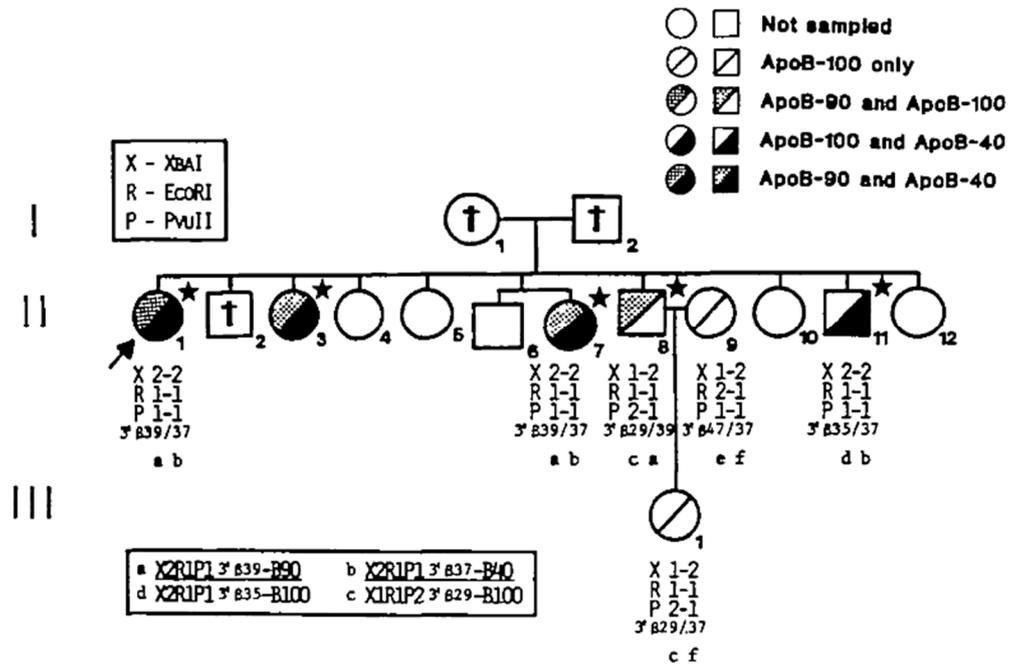


Figure 10- Arbre généalogique de la famille SH (45)

| Subject | Sex (M/F) | Age (yr) | Ht (cm) | Wt (kg) | Total chol | Total TG | LDL chol | HDL chol | Apo B (mg/dl) | Apo A-I (mg/dl) | Apo E phenotype | Apo B phenotype |
|---------|-----------|----------|---------|---------|------------|----------|----------|----------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| II-1 | F | 52 | 160 | 70 | 75 | 41 | 21 | 52 | 26 | 183 | E3/E3 | 90,40 |
| II-3 | F | 49 | 157 | 68 | 67 | 111 | 12 | 33 | 16 | 150 | E3/E3 | 90,40 |
| II-7 | F | 46 | 155 | 88 | 69 | 99 | 13 | 36 | 12 | 151 | E3/E3 | 90,40 |
| II-8 | M | 43 | 170 | 84 | 141 | 146 | 74 | 38 | 81 | 162 | E3/E3 | 100,90 |
| II-9 | F | 41 | 163 | 70 | 224 | 68 | 137 | 73 | 115 | 279 | E3/E3 | 100,100 |
| II-11 | M | 36 | 178 | 84 | 108 | 72 | 49 | 45 | 29 | 189 | E3/E3 | 100,40 |
| III-1 | F | 21 | 165 | 64 | 170 | 74 | 102 | 53 | 81 | 183 | E3/E3 | 100,100 |

Figure 11- Tableau clinique et biologique de la famille SH (45)

Puis, la même équipe publie ensuite les variants de l'ADN conduisant à ces formes tronquées de l'apolipoprotéine B-100 dans cette famille. Le séquençage de l'ADN amplifié du cas index a révélé que des délétions d'une ou deux bases nucléotidiques produisaient des mutations de type frameshift et génèrent des codons stop prématurés dans les deux cas.

Pour l'apoB-90 les auteurs ont amplifié par PCR les 263 pb du début de l'exon 29. L'ADN amplifié a ensuite été digéré avec *SmaI/EcoRI* et cloné dans M13 mp11. Sur les dix sous-clones séquencés, cinq présentaient une délétion G au niveau de la première base du résidu Glu 4034. Cette délétion d'une seule base entraîne une mutation de type frameshift générant les acides aminés Arg, Gln, Leu, Leu, Ala, Cys avant d'aboutir à un codon d'arrêt et à la terminaison de la protéine. Selon la nomenclature actuelle, ce variant est désigné par NM_000384.3(APOB) :c.12181del soit p.(Glu4061Argfs*7) La protéine résultante est l'apoB-89.04(36).

A l'heure actuelle, cette apoB-89.04 est la plus grande identifiée, sécrétée dans le plasma et responsable d'HBLF-SD2.

3.1.2) Variant NM_000384.2 (APOB) : c.12944_12959del, p.(Lys4315Argfs*29) identifié chez un patient HBLFL-SD2 dans le laboratoire

Le variant NM_000384.2 (APOB) : c.12944_12959del, p.(Lys4315Argfs*29) a été identifié chez un patient présentant une hypocholestérolémie provenant du CHU de Nantes. Les tableaux cliniques et biologiques de ce patient dans sa vingtaine évoquaient une HBL (faibles concentrations sériques de cholestérol total, LDL-c et d'apoB < au 5^{ème} percentile pour l'âge et le sexe).

Son bilan lipidique est présenté dans la figure 11. Son arbre généalogique n'apportant pas d'informations supplémentaire, il a été jugé pertinent de ne pas l'ajouter. Le patient a signé son consentement pour l'utilisation de ses données à des fins de recherche scientifique. L'étude a été approuvée par le comité scientifique CNIL n°920 424.

Le séquençage de l'ADN du patient, après extraction avait été réalisé au laboratoire en 2019 par séquençage NGS d'une bibliothèque (design SeqCap EZ choice Library, Roche diagnostics) ciblant les exons codants et jonctions intron/exon +/- 30 pb des gènes sur NextSeq500 (illumina)(46).

| | Concentrations sériques du patient | Référence |
|------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Cholestérol total (mmol/L) | 3,04 | < 5 ^{ème} percentile cohorte Lifelines (47) |
| Triglycérides (mmol/L) | 0,28 | < 1 ^{er} percentile cohorte Lifelines |
| HDL-c (mmol/L) | 2,06 | > 97,5 ^{ème} percentile cohorte Lifelines |
| LDL-c (mmol/L) | 0,85 | < 1 ^{er} percentile cohorte Lifelines(48) et HYPOBETA.fr (48) |
| apoB (g/L) | 0,36 | <5 ^{ème} percentile cohorte HYPOBETA.fr |
| Enzymes hépatiques : ASAT, ALAT | Normales | |

Figure 12- Bilan biologique du patient

L'analyse du panel de gènes de première intention des hypocholestérolémies génétiques a retrouvé une délétion hétérozygote de 16 pb dans l'exon 29 du gène *APOB* ainsi qu'une substitution faux-sens hétérozygote dans l'exon 4 du gène *PCSK9*. Aucune variation n'a été retrouvée sur le gène *ANGPTL3*.

○ **NM_000384.2 (APOB) : c.12944_12959del, p.(Lys4315Argfs*29)**

Ce variant provoque un décalage du cadre de lecture (frameshift) à partir du codon Lys4315. Le nouveau cadre de lecture se termine sur un codon STOP 29 positions en aval, conduisant à une troncature à 95% de l'apoB-100.

La liste d'arguments prise en compte pour son interprétation est la suivante :

- Critère PM2 : ce variant n'est pas décrit dans la base gnomAD, ni dans littérature.
- Critère PP4 : la variation entraîne cliniquement une concentration de LDL-c <5^{ème} percentile et une concentration d'apoB basse.
- Critère PSV1 : le variant est situé dans le dernier exon du gène *APOB* et entraîne une délétion de moins de 10% de la protéine. Cependant la fonctionnalité des dernier 5-10% n'est pas très bien connu.

Malgré plusieurs critères en faveur de la pathogénicité probable du variant, celui-ci a été classé VSI selon la classification ACMG par manque d'éléments tangibles.

Seq de référence : ATAGAAGATAACATTAACAGCTGAAAGAGATGAAATTTAC

Seq lue : ATAGAAGATAACATTAGAAATTTACTTATCTTATTAATTAT



Figure 13- Schéma de la variation du gène APOB

- **NM_174936.3(PCSK9) : c.526G>A, p.(Gly176Arg)**

La liste d'arguments prise en compte pour son interprétation est la suivante :

- Critère PM2 : ce variant a une fréquence de 0.0028% dans la base gnomAD.
- Critère PP3 : la variation touche un acide aminé faiblement conservé et l'écart-physico-chimique est important. Elle est considérée comme tolérée par les logiciels de prédiction *in silico* SIFT, Mutation Taster et PolyPhen2 et n'a pas d'effet sur l'épissage *in silico* (Alamut Visual). Ce critère n'est donc pas activable.

Le caractère délétère des variations retrouvées sur les gènes *APOB* et *PCSK9* est incertain. Une étude familiale de ségrégation est alors nécessaire pour déterminer si un phénotype lipidique co-ségrège avec ses variants. Cependant, l'étude de ségrégation familiale n'a pas pu être réalisée.

3.2) Clones CRISPR obtenus

Pour l'édition des clones 2019 et 2023, les ARN guides ont été désignés et commandés sur le site Integrated DNA technologies (IDT).

3.2.1) Variant NM 000384.3(*APOB*) : c.12181delG, p.(Glu4034Argfs4040X) issu de la littérature : obtention des clones codant une apoB-89

La première étape du projet CRISPR a été de générer les clones cellulaires portant notre variant d'intérêt issu de la littérature : c.12181delG (troncature 89%) et d'un clone témoin positif, porteur d'un variant entraînant un décalage du cadre de lecture dans l'exon 9 (troncature théorique à 9%). Les ARN guides ont été conçus sur le site IDT. Ils ont été sélectionnés de sorte que le score « on target » soit le plus important (>100) et que le score « off target » soit le plus faible possible (< 100) et qu'il soit à proximité du variant d'intérêt.

Pour ces deux types de clones, les éditions du génome ont été réalisées par la méthode suivante : deux plasmides distincts, BLADE et KBU2, contenant respectivement l'ADN codant pour les ARN guides CRISPR et pour la protéine Cas9 ont été transfectés dans les cellules Huh7. La transfection a été réalisée avec le réactif Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 (ThermoFisher), en suivant les instructions du fabricant.

24h plus tard, les cellules transfectées ont été triées par FACS. Les cellules sélectionnées ont été transférées dans des plaques à 96 puits puis 48 et enfin 24 : réalisation d'une dilution limite (ensemencement théorique de 0,75 cellule/puit).

Afin de sélectionner les clones porteurs du variant d'intérêt, une extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel), puis un séquençage Sanger de l'exon 9 et 29 d'APOB ont été réalisés (Big Dye Terminator, ABI Prism). Enfin, l'absence d'autres variants et la zygote du variant d'intérêt ont été confirmés par un séquençage de nouvelle génération (NGS)(49).

3.2.2) Variant NM 000384.2(APOB) : c.12944_12959del,p.(Lys4315Argfs*29) identifié au laboratoire : obtention des clones codant une apoB-95

Avant mon arrivée au laboratoire, une seconde campagne d'édition de clones avait été lancée ayant pour objectif l'obtention de clones codant une apoB-95. Les ARN guides et l'ADN donneur ont été conçus sur le site IDT. De même, ils ont été sélectionnés de sorte que le score « on target » soit le plus important (>100) et que le score « off target » soit le plus faible possible (< 100) et qu'il soit à proximité du variant d'intérêt. La technique d'édition du génome CRISPR-Cas9 étant en plein essor, celle utilisée pour ces clones s'est adaptée aux nouvelles connaissances sur le sujet. En effet, un seul plasmide contenant le complexe composé du sgRNA (single guide RNA) de l'ADN donneur et de la Cas9 a été transfecté dans les cellules. Après 48 heures de culture cellulaire, un séquençage de l'exon 29 a été réalisé afin de vérifier la présence ou non d'une coupure du génome. Une dilution limite a été réalisée pour les clones sélectionnés (ensemencement théorique de 0,75 cellule/puit) : transfert selon les observations de cellules dans des plaques à 96 puis 48, et 24 puits. Après sélection et amplification du ou des clones d'intérêt, un séquençage NGS a été réalisé afin de confirmer l'absence d'autres variants et le nombre de copies du variant d'intérêt.

3.2.3) Clones générés

Des incohérences de génotype ont été retrouvées pour certains clones. Les variations ont donc été vérifiées à posteriori à partir des extractions d'ARN disponibles à l'issue de chaque culture avec l'acide oléique. L'ARN a été rétrotranscrit à l'aide du Kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample (Roche, cat 0508/1866001). Puis des PCR ont été réalisées et vérifiées sur gel lonza et enfin le séquençage. Après analyse, 1 clone 89% hétérozygote, 1 clone 95% hétérozygote et 1 clone 95% homozygote ont été exclus.

Après vérifications des variations des clones par séquençage SANGER ou NGS ceux écrits en rouge n'ont pas été inclus dans l'étude.

| Gène | Exon | Hz/ Ho | Variation nucléotidique | Impact protéique | Troncature | Nombre de clones |
|-------------|------|-----------|---|-------------------------------------|------------|------------------------------|
| <i>APOB</i> | | WT | - | - | | 2 |
| <i>APOB</i> | 9 | Hz | c.1064dupT | p.(Arg356Glufs*5) | 7,9% = T+ | 2 |
| <i>APOB</i> | 9 | Ho | c.1064dupT | p.(Arg356Glufs*5) | 7,9% = T+ | 1 |
| <i>APOB</i> | 29 | Hz | c.12145_12147delinsAA | Stop*19 | 89% | 1 |
| <i>APOB</i> | 29 | Ho | c.12145delG | p.(Asp4049Metfs*19) | 89% | 1 |
| <i>APOB</i> | 29 | Hz | c.12145_12146insGATG | p.(Asp4049Glyfs*2) | 89% | 1 |
| <i>APOB</i> | 29 | Ho | c.12131_12160delGGGTCCGGGA ATCTGAGTAGGAACTCAGA | p.(Arg4044_Gln4053del) | 89% | 1 |
| <i>APOB</i> | 29 | Hz | c.12880delG | p.(E4294Gfs*16) | 95% | 1 |
| <i>APOB</i> | 29 | Hz | c.12881dupA | p.(V4295Gfs*4) | 95% | 3 |
| <i>APOB</i> | 29 | Ho | c.12881dupA + c.12883_12884insAG | p.(V4295Gfs*4) + p.(V4295Efs*16) | 95% | 2 |
| <i>APOB</i> | 29 | Ho | c.12881_12882delAG + c.12880delG | p.(VE294Gfs*4) + p.(E4294Afs*16) | 95% | 1 sélectionné et 1 non |

Figure 14- Tableau des différents clones générés

WT= Wild-type ; Hz = Hétérozygote et Ho = Homozygote ; Clones écrits en rouge non inclus

3.2.4) Clones étudiés

Finally, the different clones selected and preserved for further analyses are gathered in the following table :

| Gène | Exon | Hz/ Ho | Variation nucléotidique | Impact protéique | Troncature | Nombre de clones |
|-------------|------|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------|---------------------|
| <i>APOB</i> | | WT | - | - | | 2 |
| <i>APOB</i> | 9 | Hz | c.1064dupT | p.(Arg356Glufs*5) | 7,9% = T+ | 2 |
| <i>APOB</i> | 9 | Ho | c.1064dupT | p.(Arg356Glufs*5) | 7,9% = T+ | 1 |
| <i>APOB</i> | 29 | Ho | c.12145delG | p.(Asp4049Metfs*19) | 89% | 1 |
| <i>APOB</i> | 29 | Hz | c.12145_12146insGATG | p.(Asp4049Glyfs*2) | 89% | 1 |
| <i>APOB</i> | 29 | Hz | c.12881dupA | p.(V4295Gfs*4) | 95% | 3 |
| <i>APOB</i> | 29 | Ho | c.12881dupA + c.12883_12884insAG | p.(V4295Gfs*4) + p.(V4295Efs*16) | 95% | 2 |
| <i>APOB</i> | 29 | Ho | c.12881_12882delAG + c.12880delG | p.(VE294Gfs*4) + p.(E4294Afs*16) | 95% | 1 |

Figure 15- Tableau des différents clones étudiés

The study of knock-out clones in heterozygous and homozygous state: p.Arg356Glufs*5 allowed to validate the interest of this model and to provide *in vitro* evidence of the pathogenicity of an *APOB* variation (49). These two clones coding for apoB-7,9 were therefore chosen as positive controls.

3.3) Culture et traitement des cellules pour l'étude fonctionnelle

3.3.1) Culture cellulaire

The cell line HuH7 derives from a human hepatoma. It was obtained from a 57-year-old Japanese man in 1982. Its derivatives have been widely used in research as experimental substitutes for primary hepatocytes. These have notably played a

rôle déterminant dans la recherche sur l'hépatite C et ont été utilisés comme cellules hôtes pour la propagation du virus *in vitro*.

La plupart des cellules HuH7 ont un nombre de chromosomes compris entre 55 et 63 et se développent généralement en monocouches 2D. Le milieu de croissance est renouvelé 2 à 3 fois par semaine ou selon les besoins, en fonction du pH du milieu. La confluence des cellules est maintenue entre 30 et 90 % afin de ne pas bloquer la prolifération par inhibition de contact. Leur temps de doublement est de 24 à 50 heures.

Les cellules HuH7 ont été cultivées dans du DMEM (LIFE TECHNOLOGIES) contenant 10% de Sérum de Veau Fétal (EUROBIO SCIENTIFIC) et 1% d'ATB : pénicilline/streptomycine (OZYME). Les cellules ont été cultivées dans des flasques T25 en plastique dans un incubateur humidifié à 37°C à 5% de CO₂.

3.3.2) Traitement à l'acide oléique

L'acide oléique a été utilisé pour augmenter la sécrétion d'apoB par les cellules HuH7. Les manipulations de la série 1 et 2 ont été réalisées utilisant la solution d'acide oléique préparée selon le protocole 1. En analysant les résultats, nous nous sommes questionnées sur la répétabilité et la conservation de cette solution. Un second protocole a alors été utilisé pour les manipulations de la série 3.

Les acides gras tel que l'acide oléique sont insolubles dans les solutions aqueuses et doivent être délivrés aux cellules par une molécule porteuse. Ils sont donc généralement étudiés lorsqu'ils sont complexés à de l'albumine sérique bovine (BSA). Pour les expériences on utilise l'acide oléique à une concentration de 0,6mM.

3.3.2.1) Préparation de la solution d'acide oléique à 0,6mM : Protocole 1

Dans une bouteille en verre stérile d'un litre ont été ajoutés 100ml de DMEM sans rouge phénol et 1g de BSA. La solution a incubé 1h au bain-marie à 37°C. Puis 17,15 µl d'acide oléique à 3,5M ont été ajoutés. La solution a été ensuite placée sous agitation,

toujours au bain-marie pendant toute la nuit. Enfin, la solution a été congelée à -20°C en aliquots de 10 ml.

3.3.2.2) Préparation de la solution d'acide oléique à 0,6mM : Protocole 2

Une solution mère de concentration 20 fois celle voulue a été préparée. Elle est congelée à -20°C dans des tubes en verre car les lipides ont tendance à se fixer sur le plastique.

- Préparation de 24ml d'une solution mère d'albumine BSA à 20%
Dissoudre 5g de BSA dans 25 ml de DMEM sans rouge phénol (pour pas de prolifération) à 37°C dans une bouteille de 500 ml en verre stérile. Mélanger sous agitation pendant 30 min-1h à 37°C jusqu'à la dissolution complète ; Filtrer la solution à l'aide d'une seringue et d'un filtre 0.22µm. Aliquoter la moitié de la solution (12ml) en aliquots de 1ml tubes en verres et conserver à -20°C.

- Préparation de la solution mère de BSA-acide oléique 20%-12mM

Dans une bouteille de 250ml en verre stérile introduire 82,3 µl d'acide oléique (SIGMA ref 01383-1G lot SLBZS247) 50 à 3,5M. Ajouter 24 ml de solution BSA filtrée. Incuber dans le Bain-Marie avec agitation douce à 40°C pendant 2-3h. La formation du complexe est terminée lorsque la turbidité de la solution disparaît. Aliquoter en volume de 1ml et conserver à -20°C.

- Traitement à l'acide oléique

Dans une bouteille en verre stérile introduire 4 aliquots de 1ml de solution mère 20X de DMEM-BSA-Acide oléique + 76 ml de DMEM sans rouge phénol puis ajout de 4ml par T25.

3.3.3) Traitement des cellules

1. Pré-traitement au DMSO 2%

La solution DMSO à 2% a été préparée dans une T75 contenant du milieu DMEM-SVF10%-ATB1%. Après ajout de cette solution de traitement, les cellules HuH7 ont été incubées 4 jours à 37°C.

2. Traitement des T25 à l'acide oléique 0,6mM

Après lavage au PBS, les cellules T2h et T6h ont été traitées par la solution d'acide oléique.

- T0h : Les cellules ont été lavées au PBS puis 500 µl du tampon de lyse (HEPES pH7.5 50mM, KCL 1.0M, MgCl₂ 2mM, Triton×100 0.5%) ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées 30 min à -20°C. Puis les cellules ont été décollées à l'aide d'un grattoir. Les cellules ont été transférées dans un tube Eppendorf de 2ml puis soniquées sur glace 3 fois 10 secondes à puissance 40% avec 10 secondes d'attente. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 10 minutes à 10000g à +4°C. Le surnageant a été transféré dans 2 tubes Eppendorf d'1,5 ml : 400 µl pour analyse par spectrométrie de masse et 600 µl pour l'ELISA et BCA. Les échantillons ont été congelés en carboglace puis conservés à -80°C.
- Pour chaque temps T2H et T6h, les cellules ont été observés au microscope (×20). Le protocole suivi est le même que les cellules T0.

3.3.4) Quantification des transcrits *APOB* après traitement par acide oléique

3.3.4.1) Principe de la qPCR

La qPCR ou PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un réactif fluorescent. Cet émetteur fluorescent peut être un agent se liant à l'ADN double brin (ex : SYBR Green) ou une sonde fluorescente. Parmi les sondes, il existe quatre technologies principales : l'hydrolyse de sondes (Taqman assay), l'hybridation de 2 sondes (HybProbes), les balises moléculaires (Molecular Beacons) et les amorces scorpion (Scorpion primers).

L'augmentation du signal fluorescent est alors directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction de PCR.

Pour cette étude nous avons choisi d'utiliser l'agent intercalant le plus fréquemment utilisé, le SYBR Green. Il est économique, facile à utiliser et possède une bonne sensibilité sans inhiber la réaction d'amplification. Son émission fluorescente augmente lorsque qu'il est lié à l'ADN double brin. C'est pourquoi l'émission de fluorescence est mesurée pour chaque cycle à la fin de l'étape d'élongation.

Étant donné que le SYBR Green I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, cette technologie présente un certain biais puisque le même agent peut être utilisé pour détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle. En effet, on peut noter inconvénients suivants (50):

- L'ADN double brin total émettant des signaux, il devient impossible en cours de réaction de s'assurer de la spécificité des amplicons ou de discriminer les différents amplicons dans le cas de multiplexage.
- Un mauvais appariement peut conduire à des faux positifs ou une surestimation de la quantification.
- Dans une même réaction, un amplicon plus long fixera davantage de molécules fluorescentes qu'un amplicon plus court : l'émission fluorescente est alors biaisée.

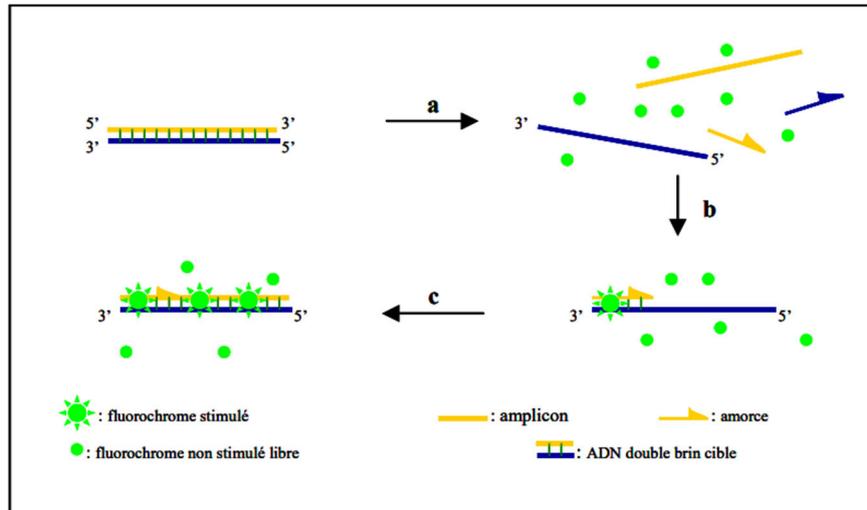


Figure 16- Schéma de la méthode PCR et SYBR Green (51)

3.3.4.2) Quantification

L'objectif est de quantifier la présence de transcrits apoB dans les cellules HUH7 CRISPR après traitement par acide oléique pendant 6h.

La présence de transcrits apoB, dans les cellules CRISPR après traitement par acide oléique pendant 6h, a été quantifiée par PCR en temps réel. L'ARN total a été extrait avec le kit : RNAqueous-4PCR (Ambion cat1914). La transcription inverse a été réalisée avec Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample (Roche, cat 0508/1866001). Un amplicon *APOB* spécifique (exon 17-18) a été amplifié et quantifié par qPCR sur un LC480 en utilisant du SYBR Green (Qiagen, France). Le B2M a été utilisé comme contrôle interne.

Afin d'estimer l'effet des variants sur la sécrétion des VLDL, nous avons mesuré la concentration en apoB à l'aide d'un test ELISA. Le but étant de mesurer l'apoB-100 produite et sécrétée par les cellules HuH7 à la suite de leur incubation avec la solution d'acide oléique 0,6 mM.

3.3.5) Dosage de l'apoB par méthode ELISA

3.3.5.1) Principe de l'ELISA sandwich

Le dosage d'immunoabsorption enzymatique (ELISA) est une technique simple et rapide permettant de détecter et quantifier les anticorps ou les antigènes fixés sur une surface solide.

Le principe est le suivant : Un anticorps de capture est « coaté » au fond des puits de la microplaque, il fixe l'antigène. Un second anticorps de détection conjugué à une enzyme se lie à l'antigène par un épitope différent. Après incubation du substrat on mesure l'absorbance des solutions colorées obtenues.

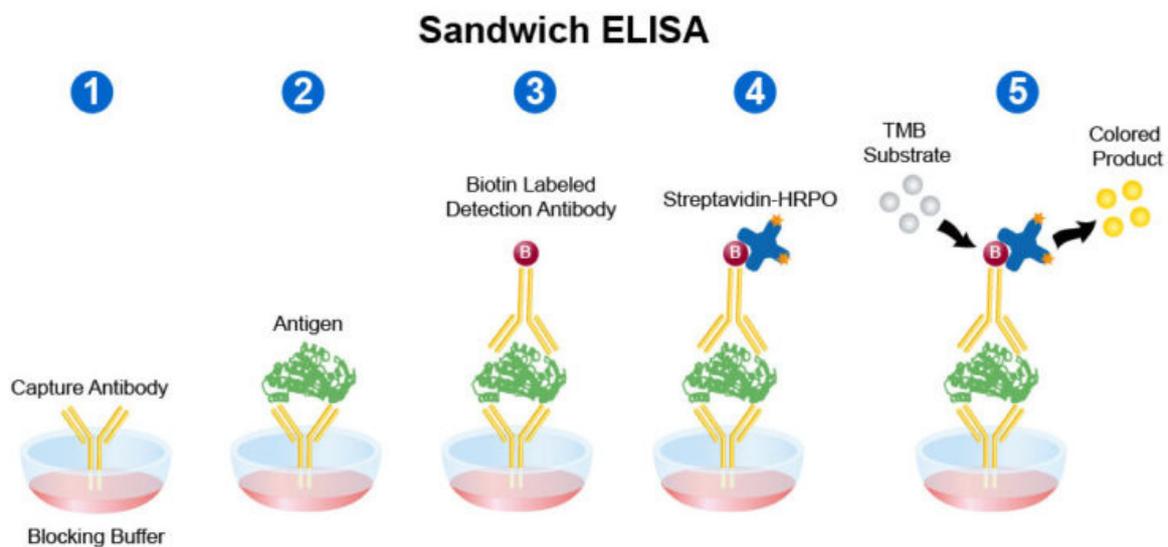


Figure 17- Schema de la méthode ELISA sandwich

Disponible sur Sandwich ELISA Protocol - Leinco Technologies

3.3.5.2) Dosage ApoB

La concentration en apoB-100 dans le milieu cellulaire et dans le surnageant a été déterminée à l'aide du kit ELISA apoB-100 (Mabtech AB, Nacka Strand, Suède) en

suivant les préconisations du fournisseur. Les concentrations d'apoB-100 ont été normalisées par rapport aux concentrations de protéines dans le lysat cellulaire déterminées à l'aide de la méthode Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFischer). L'absorbance est lue à 450nm.

4. Résultats

Pour rappel, nous avons obtenu et étudié :

- 3 clones codant une apoB-7.9 : 2 hétérozygotes et 1 homozygote
- 2 clones codant une apoB-89 : 1 hétérozygote et 1 homozygote
- 6 clones codant une apoB-95 : 3 hétérozygotes et 3 homozygotes

Les résultats sont synthétisés dans les graphiques ci-dessous. Des graphes détaillés par clone sont disponibles en annexe.

4.1) Quantification de l'ARNm

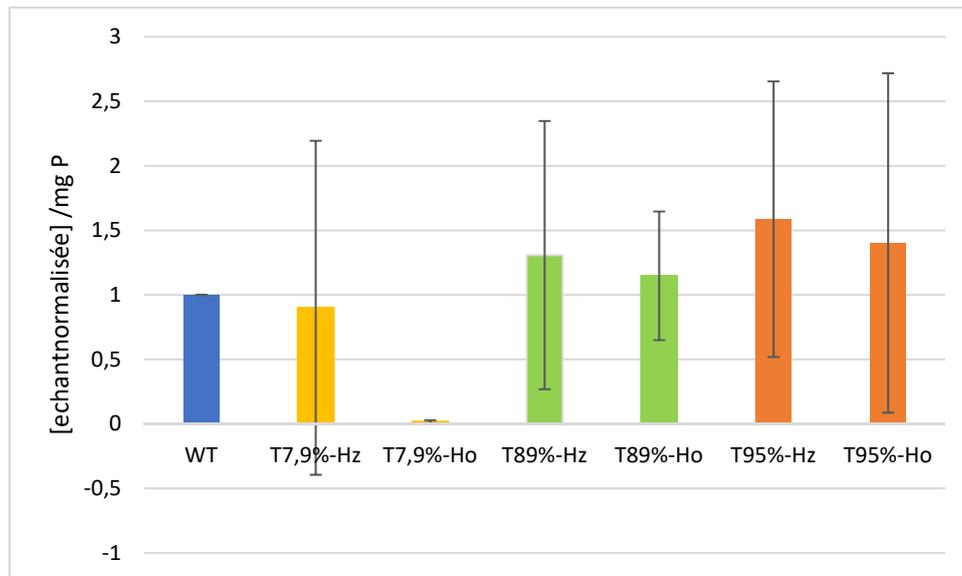


Figure 18- Quantification de l'ARNm APOB-100 produit pendant 6h par le type sauvage HuH7 (WT), ou portant les variants d'intérêt à l'état hétérozygote ou homozygote

La RT-PCR des transcrits *APOB* dans les cellules HuH7 a montré que le niveau d'expression était quasiment nul pour les clones T7,9% homozygotes. Pour les clones T7,9% hétérozygotes on remarque en moyenne une légère diminution de l'ARNm *APOB* mais une grande dispersion des valeurs.

Au contraire, la quantité d'ARNm *APOB* dans les cellules des clones T89% et T95% est augmentée par rapport à celles des clones WT à 1,3 fois et à 1,5 fois respectivement. De plus, le niveau d'expression dans les cellules hétérozygotes était supérieur à celui dans les cellules homozygotes. On observe aussi dans l'ensemble une grande dispersion des valeurs. Des études statistiques complémentaires sont en cours afin d'évaluer si ces différences sont significatives.

4.2) Concentration d'apoB du Témoin Positif : Troncature 7,9%

D'après la littérature, la troncature 7,9% n'est pas retrouvée dans le plasma : nous l'avons donc choisie comme témoin positif (témoin d'absence de sécrétion). De plus, ces clones ont déjà été testés au laboratoire et avaient permis de valider le modèle cellulaire (49).

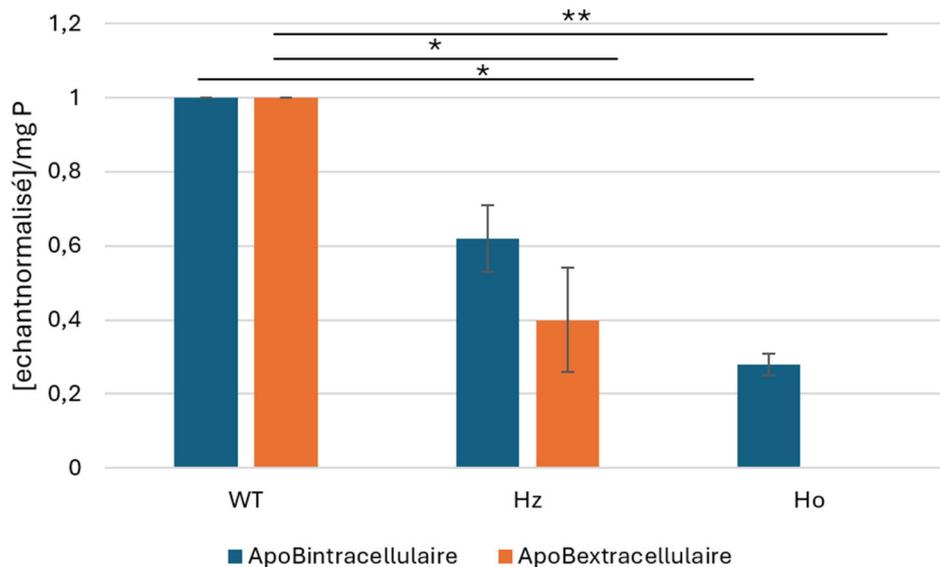


Figure 19- Graphique des concentrations d'apoB intracellulaire et extracellulaire normalisées par mg de protéines à T=6h des clones T7,9% Hz et Ho. * = $p < 0,05$ (test de Welch). ** = $p < 0,05$ (test ANOVA 1 facteur)

Légende :

WT apoB-intracellulaire : n=1 clone et 5 réplicas ; WT apoB-extracellulaire : n=1 clone et 5 réplicas

Hz apoB-intracellulaire : n = 2 clones et 2 à 3 réplicas / clone ; Hz apoB-extracellulaire : n = 2 clones et 2 à 3 réplicas / clone

Ho apoB-intracellulaire : n = 1 clone et 2 réplicas ; Ho apoB-extracellulaire : n = 1 clone et 2 réplicas

A t=6 heures, la concentration d'apoB intracellulaire est diminuée d'environ 40% chez les cellules hétérozygotes (test ANOVA 1 facteur, $p=0.053$) et de 70% chez les homozygotes par rapport au HuH7 WT (test de Welch, $p=0.019$). Concernant la concentration extracellulaire d'apoB on remarque une diminution de celle-ci d'en moyenne 60% dans les cellules hétérozygotes (test de Welch, $p=0.003$) et l'apoB n'est pas détectable dans le milieu extracellulaire des homozygotes (test ANOVA 1 facteur, $p=0,004$) , comme attendu : cela nous permet donc de valider les essais.

4.3) Troncature 89%

Cette protéine apoB tronquée a une taille inférieure à la plus grande troncation rapportée dans la littérature, qui a été retrouvée dans la circulation sanguine (89,2%).

Figure 20- Graphique des concentrations d'apoB intracellulaire et extracellulaire normalisées par mg de protéines à T=6h chez les clones Hz et Ho T89%

Légende :

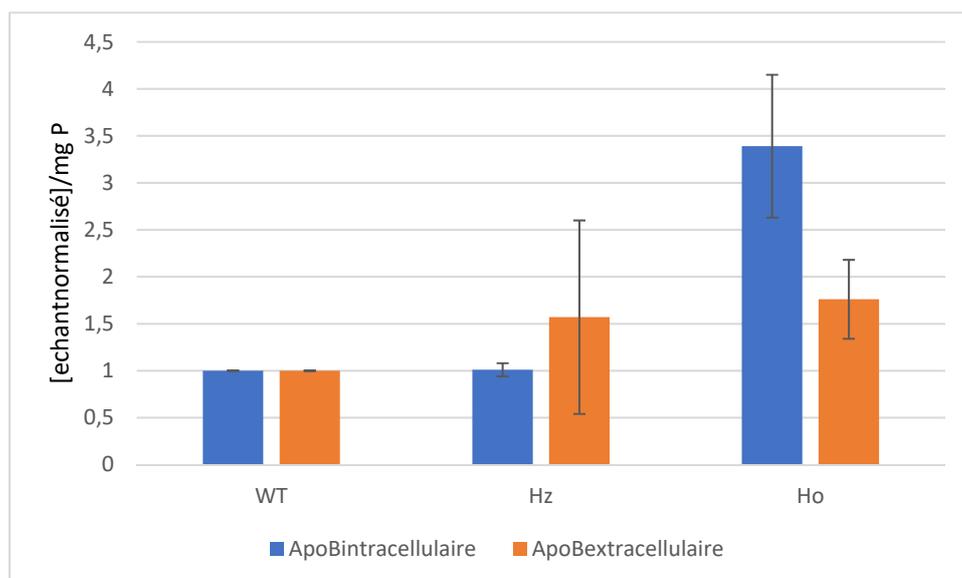
WT apoB-intracellulaire : n=1 clone et 3 réplicas ; WT apoB-extracellulaire : n=1 clone et 3 réplicas

Hz apoB-intracellulaire : n = 1 clone et 1 réplica ; Hz apoB-extracellulaire : n = 1 clone et 1 réplica

Ho apoB-intracellulaire : n = 1 clone et 2 réplicas ; Ho apoB-extracellulaire : n = 1 clone et 2 réplicas

A t=6 heures, les concentrations d'apoB intracellulaires et extracellulaires des clones hétérozygotes et homozygotes ne sont pas significativement différentes à celles du WT.

4.4) Troncature 95%



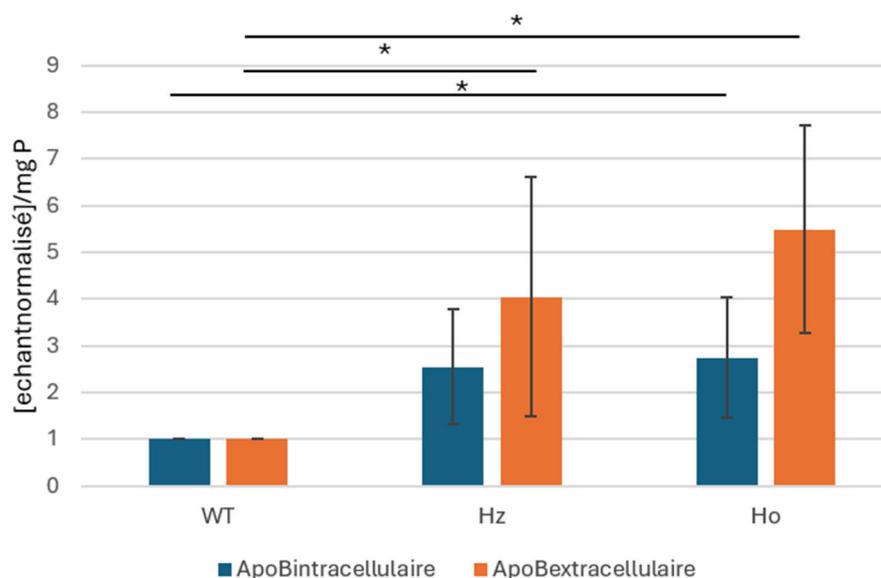


Figure 21- Graphique des concentrations d'apoB intracellulaire et extracellulaire normalisées par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T95%. * = $p < 0,05$ (test de Welch)

Légende :

WT apoB-intracellulaire : n=1 clone et 7 réplicas ; WT apoB-extracellulaire : n=1 clone et 7 réplicas

Hz apoB-intracellulaire : n = 3 clones et 2 à 3 réplicas / clone ; Hz apoB-extracellulaire : n = 3 clones et 2 à 3 réplicas / clone

Ho apoB-intracellulaire : n = 3 clones et 2 à 3 réplicas / clone ; Ho apoB-extracellulaire : n = 3 clones et 2 à 3 réplicas / clone

A t=6 heures, la concentration d'apoB intracellulaire mesurée chez les clones hétérozygotes n'est pas significativement différente à celle du WT. En revanche elle est 2.7 fois plus élevée chez les homozygotes par rapport au cellules WT (test de Welch, $p=0.027$). Quant à la concentration extracellulaire d'apoB, on remarque qu'elle a quadruplé chez les cellules hétérozygotes (test de Welch, $p=0.005$) et augmenté d'environ 5.5 fois chez les homozygotes (test de Welch, $p=0.004$) par rapport aux HuH7 WT. On note aussi une grande dispersion des résultats avec notamment des écarts-type supérieurs à 2 chez les clones homozygotes.

5. Discussion

Ces travaux ont permis l'étude de deux de variants de signification incertaine (VSI) non-sens sur *APOB*. Elles ont été identifiées chez des patients présentant une

hypocholestérolémie. De plus, elles conduisent à la formation de formes d'apolipoprotéineB prématurément tronquées à 89% et 95%.

L'objectif de cette thèse est d'étudier *in vitro* l'effet d'un nouveau variant NM_000384.2 (APOB) : c.12944_12959del, p.(Lys4315Argfs*29) sur la production et la sécrétion hépatique de l'apolipoprotéineB100 afin d'affiner sa classification. Pour le caractériser fonctionnellement, nous avons utilisé les cellules HuH7, un modèle cellulaire humain sécrétant naturellement l'apoB-100. Afin d'obtenir des lignées cellulaires porteuses des variations dans la zone d'intérêt (APOB, exon 29), leur génome a été modifié à l'aide du système CRISPR-Cas9. Après incubation de 6h avec de l'acide oléique, le taux d'expression d'ARN APOB a été quantifié par RT-PCR et le dosage d'apoB-100 intra et extracellulaire a été réalisée par la méthode immuno-enzymatique ELISA. Les résultats ont été normalisés par rapport aux protéines totales du lysat cellulaire.

5.1) Validation du modèle cellulaire

Le modèle cellulaire que nous avons utilisé pour notre travail a été validé au laboratoire en 2022 grâce à l'étude d'une variation délétère (49). En effet, celle-ci a été obtenue après coupure double brin de l'ADN cellulaire par CRISPR-Cas9 puis NHEJ. Deux clones porteurs de la variation NM_000384.2(APOB) : c.1064dup ; p.(Arg356Glufs*5), ont été sélectionnés à l'état hétérozygote et homozygote. L'apparition d'un codon stop prématuré après l'acide aminé 361 conduit à la traduction d'un polypeptide correspondant théoriquement à 8% de l'apoB totale. Partant du postulat décrit dans la littérature que les apoB tronquées d'une taille inférieure à 30% de l'apoB100 ne sont pas sécrétées (52), les résultats attendus étaient :

- Pour le clone He-KO : une diminution de moitié par rapport au clone WT des concentrations d'ARNm APOB et des concentrations normalisées d'apoB-100 dans le lysat cellulaire et dans le surnageant.

- Pour le clone Ho-KO : une quantité d'ARNm d'*APOB* nulle et ainsi qu'une absence de détection d'apoB-100 dans le lysat cellulaire et dans le surnageant.

Lors de nos expérimentations, nous avons trouvé des résultats en accord avec ceux obtenus en 2022. Nous pouvons donc valider notre témoin positif.

5.2) Hypothèse de l'augmentation de sécrétion d'apoB

L'hypobetalipoprotéinémie causée par une mutation du gène *APOB* se caractérise par une hypocholestérolémie liée à un défaut d'assemblage et/ou de sécrétion des lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B. Cependant d'après les résultats, nous pouvons dire que les hypocholestérolémies associées aux deux variations étudiées ne sont dues ni à un défaut de production ni de sécrétion. Cela résulte est en accord avec la littérature qui rapporte que les apoB plus courtes que l'apoB-29 ou -30 ne sont pas sécrétées sous forme de lipoprotéines par le foie car elles n'ont pas la capacité suffisante à lier les lipides (52). Le phénotype clinique est alors plus sévère se rapprochant de celui de l'abétalipoprotéinémie avec un sur-risque de développer une MASH. Chez les homozygotes et hétérozygotes dont les variations *APOB* induisent des troncatures plus longues que l'apoB-48, le phénotype clinique est généralement moins sévère, se caractérisant uniquement par une stéatose hépatique (MAFLD) (52).

Par ailleurs, il existe dans la littérature des hypothèses sur les mécanismes potentiellement compensatoires de la synthèse d'apoB mutée. Parmi celles-ci, la suivante ressort : les lipoprotéines contenant de l'apoB tronquée serait plus rapidement captées dans le sang et éliminées.

Dans l'étude de Klaus *et al.* précédemment décrite dans les rappels bibliographiques, présentent cette possibilité (32) : le domaine de reconnaissance du récepteur LDL de l'apoB-100 se situant entre les acides aminés 3100 et 3500, les particules contenant des troncatures d'apoB supérieures à 70% conservent ce domaine. De plus, ces

lipoprotéines seraient reconnues par les récepteurs LDL avec une affinité supérieure aux LDL apoB-100. Par conséquent les LDL apoB-75 et apoB-89, assez longue pour conserver ce domaine de reconnaissance aux LDL sont épurées plus rapidement par le foie que les LDL apoB-100. En revanche, les troncatures plus courtes comme l'apoB-31 ; - 38,9 et -43,7 ne conservant pas le domaine seraient éliminées par un autres mécanisme non élucidé (32). Cependant notre modèle cellulaire *in vitro* ne permet pas de tester cette hypothèse.

De plus, le gène *APOB* mutée dans la pathologie HBLF-SD2 est généralement semi-dominant. Nous devrions donc observer un rapport de deux entre sécrétion chez les clones hétérozygotes et chez clones homozygotes sauf si celle-ci est saturable.

Pour résumer, la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'HBLF est un enjeu important. Des études complémentaires et notamment *in vivo* permettraient de vérifier l'hypothèse de Klaus *et al.* En effet, si l'augmentation de la clairance des troncatures « longues » d'apoB peut être responsable de l'hypocholestérolémie observée alors la classification de l'hypobétalipoprotéïnémie primitive proposée par Bredefeld *et al.* serait à mettre à jour (1). A l'heure actuelle les hypobétalipoprotéïnémies familiales dues à un catabolisme accru des lipoprotéines (HBLF-EC) résultent de variations pertes de fonction des gènes *PCSK9* ou *ANGPTL3* (1). A ce jour, ces HBLF-EC ne sont pas associées à un risque de développer une MASLD (52–54). De plus, étudier la taille de troncature à partir de laquelle on bascule d'un défaut de sécrétion des lipoprotéines à une augmentation de leur catabolisme permettrait une meilleure classification et donc de mieux comprendre les conséquences hépatiques pour in fine une meilleure prise en charge des patients.

5.3) Limites de l'étude

5.2.1) Modèle cellulaire

Le modèle cellulaire édité par CRISPR-Cas9 présente des avantages par rapport à une méthode de transfection classique. Premièrement, les cellules HuH7 sont des cellules humaines synthétisant naturellement des VLDL et LDL (55). De plus, la technologie permet d'éviter les limites du modèle de transfection classiques : taille du gène d'intérêt limité, pas de modélisation de la zygote, expression de la protéine dépendante du promoteur du plasmide. Pour ces raisons, le modèle cellulaire édité par CRISPR-Cas9 est plus représentatif des conditions physio-pathologies humaines.

Cependant bien qu'innovante, cette approche présente quelques limites :

- Risque lié au Off target (activité non spécifique) qui peut conduire à des modifications d'autres parties du génome cellulaire aboutissant à des conséquences inconnues.
- Erreurs ou mutations non souhaitées dans d'autres parties du gène cible.
- Possibilité de générer des cellules cancéreuses

Par ailleurs, l'analyse NGS des différents clones révèle la présence d'autres mutations induites par la technique CRISPR-Cas9. Celles-ci pourraient potentiellement avoir un impact sur les mécanismes de production, la sécrétion ou la recapture de l'apoB. Il est cependant difficile de savoir si ces mutations interfèrent avec notre étude.

De plus, il est difficile d'obtenir la mutation précise identifiée chez un patient. En effet, bien que la technologie CRISPR-Cas9 cible un endroit précis du gène, les dommages sont corrigés par les systèmes de réparation de l'ADN des cellules. Ceux-ci sont dépendants de nombreux facteurs (type et âge de cellules, environnement...).

5.2.2) Mesure de concentration en apoB tronquée

L'utilisation du test ELISA pour estimer l'effet sur la sécrétion de VLDL peut aussi être discuté. Ce kit est basé sur une paire appariée d'anticorps monoclonaux spécifiques de

l'apoB-100 humaine. Il ne reconnaît donc pas l'apoB-48. Cependant il est possible qu'il lie d'autres protéines ayant des domaines similaires avec l'apoB si elles sont présentes en concentration importante(49). En effet, bien que la quantité détectée d'ARNm pour les clones T7,9%-Ho et la concentration intracellulaire d'apoB soient nulles, de l'apoB-100 est mesurée en intracellulaire. Ceci montre une mauvaise spécificité du test ELISA. De plus, la concentration nulle d'apoB-100 détectée en extracellulaire pour ces clones ne garantit pas une absence spécifique d'apoB tronquée dans le milieu.

De plus, nous ne connaissons pas le lieu de fixation des anticorps, limitant notre interprétation des résultats. Nous pouvons seulement supposer qu'ils ne lie pas en C-terminal et qu'ils se fixent sur un domaine se situant avant les 11 % terminaux de la protéine puisqu'un signal est bien détecté dans le milieu extracellulaire des clones homozygotes pour les troncatures à 89 et 95%.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) est de plus en plus reconnue comme une technique alternative ou complémentaire aux immunodosages pour le dosage des apolipoprotéines (56). Elle permet l'analyse ciblée et multiplexée de multiples protéines via leurs peptides signatures. Elle permet de surmonter de nombreux problèmes d'interférence associés aux dosages cliniques actuels des protéines par immunodosages. En revanche, une préparation particulière et rigoureuse des échantillons est nécessaire avant l'analyse. En 2015, Van der Broek *et al.* ont proposé une méthode de quantification de l'apoA-I et de l'apoB-100 automatisée par le spectromètre de masse Madi-Tof (57).

5.4) Perspectives

Les différentes lignées Huh7 obtenues au laboratoire à l'état hétérozygote et homozygote peuvent constituer des modèles cellulaires intéressants pour l'étude de la FHBL. En effet, la technologie CRISPR-Cas9 est aujourd'hui un outil précieux intervenant

dans la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans les maladies humaines. La maîtrise de cette technique révolutionnaire permettra d'exploiter pleinement son potentiel.

L'intérêt du modèle cellulaire HuH7 développé au laboratoire est qu'il possède des récepteurs aux LDL (55). A l'avenir il pourrait être intéressant de trouver une méthode physique ou chimique afin de les bloquer et pouvoir ainsi étudier la quantité d'apoB recapturée. L'analyse de la concentration intracellulaire sera d'autant plus pertinente car il sera possible d'estimer la quantité réellement produite en déduisant celle recapturée.

Par ailleurs, il a été décidé d'étudier une variation conduisant à la synthèse d'une apoB tronquée à 30%. Pendant ma période de stage, nous avons designé les ARN guides et l'ADN donneur. L'étude de ces clones permettra d'apporter des données complémentaires en ciblant la zone limite de sécrétion des lipoprotéines contenant de l'apoB tronquée (pour rappel, la plus petite sécrétée dans la circulation sanguine est l'apoB-27,6).

7. Conclusions générales

L'hypobétalipoprotéïnémie familiale due à un défaut d'assemblage et de sécrétion des lipoprotéines de type 2 (HBLF-SD2) est une pathologie génétique rare du métabolisme des lipides. Elle se définit par de faibles concentrations plasmatiques de cholestérol total, de cholestérol LDL et d'apolipoprotéine B inférieures au 5e percentile de la population générale. Le plus souvent, la forme primitive monogénique de transmission autosomique semi-dominante est liée à des variations délétères du gène *APOB* qui conduisent à la synthèse de protéines de plus petite taille appelées « troncatures ». En résultent des défauts dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines provoquant la HBLF-SD2 avec des formes bi-alléliques ou mono-alléliques. Les patients HBLF-SD2 mono-alléliques ont alors un risque six fois plus élevé de développer une stéatose hépatique. L'étude de la pathogénicité des variants de signification incertaine (VSI), faux sens ou troncatures tardives, est donc cruciale pour confirmer le diagnostic et assurer une prise en charge adaptée des patients. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'étudier l'effet de VSI, identifiés chez des patients présentant une hypocholestérolémie, sur la production et la sécrétion hépatique de l'apolipoprotéine B100.

Nous avons sélectionné deux variants du gène *APOB*. Le premier est issu de la littérature. Il conduit à la synthèse d'apoB89, la plus grande troncation de l'apolipoprotéine B retrouvée dans le plasma responsable d'hypocholestérolémie : NM_000384.3(APOB) : c.12181del p.(Glu4061fs). Le second variant a été identifié chez un patient HBLF-SD2 de la cohorte de patients atteint d'hypocholestérolémie du laboratoire. Il conduit à la synthèse d'apoB95 : NM_000384.2 (APOB) : c.12944_12959del, p.(Lys4315Argfs*29). Afin d'étudier fonctionnellement ces variations, le génome des cellules hépatiques humaines HuH7 a été modifié par la technique CRISPR-Cas9. Selon les conditions, un à trois clones cellulaires ont été obtenus avec des variations à l'état hétérozygote et homozygote proches de celles initialement ciblées. Les cellules ont été incubées avec de l'acide oléique pour stimuler leur production de VLDL. Puis les concentrations en apolipoprotéine B intracellulaire et extracellulaire dans ont été quantifiées par un test ELISA. L'expression des transcrits *APOB* a été mesurée par PCR quantitative.

L'étude des clones hétérozygotes et homozygotes pour les variations sélectionnées ont montré une différence entre les résultats attendus et obtenus. Les concentrations intra et extracellulaires d'apolipoprotéine B mesurées chez les clones apoB-89 hétérozygotes et homozygotes ne sont pas significativement différentes à celles du Wild-type. Pour les clones apoB-95, les concentrations extracellulaires d'apolipoprotéine B mesurées chez les hétérozygotes et homozygotes sont significativement supérieures au Wild-type, respectivement $p=0,005$

et $p=0,004$. Pour les concentrations intracellulaires, seule celle du clone homozygote est significativement supérieure à celle du Wild-type, $p=0,027$. Cette étude montre donc que l'apoB-95 est plus sécrétée que l'apoB100.

L'hypobetalipoprotéïnémie malgré l'augmentation de sécrétion d'apoB-95 pourrait s'expliquer en partie par le fait que les lipoprotéines contenant de l'apoB tronquée serait plus rapidement recaptées. En effet, les changements de conformation dans la région de reconnaissance de l'apoB tronquée par les récepteurs LDL augmenteraient leur affinité de liaison au récepteur par rapport à l'apoB100. L'étude de clones ayant des variations proches mais différentes de celles des patients et les limites de la technologies CRISPR-Cas9 sont aussi à prendre en compte.

Finalement, le modèle cellulaire édité par la technologie innovante CRISPR-Cas9 permet l'étude des variations sur des gènes de grandes tailles comme *APOB*. Il est cependant nécessaire de poursuivre des études cellulaires sur de nouveaux clones afin de comprendre d'avantage les mécanismes sous-jacents.

Le Président de la thèse,
Nom : Christine Vinciguerra

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 18 décembre 2024
Vu, le Directeur de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeur G. DUSSART



8. Bibliographie

1. Bredefeld C, Hussain MM, Aversa M, Black DD, Brin MF, Burnett JR, et al. Guidance for the diagnosis and treatment of hypolipidemia disorders. *J Clin Lipidol.* nov 2022;16(6):797-812.
2. Burnett JR, ChB M, Hooper AJ, Hegele A. APOB-Related Familial Hypobetalipoproteinemia.
3. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* mai 2015;17(5):405-24.
4. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res.* sept 2001;42(9):1346-67.
5. Berndsen ZT, Cassidy CK. The Structure of ApoB100 from Human Low-density Lipoprotein [En ligne]. 2024 [cité le 5 nov 2024]. Disponible: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.02.28.582555>
6. Davidson NO, Shelness GS. Apolipoprotein B: mRNA Editing, Lipoprotein Assembly, and Presecretory Degradation. *Annu Rev Nutr.* juill 2000;20(1):169-93.
7. Young SG. Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation.* American Heart Association; nov 1990;82(5):1574-94.
8. Blackhart BD, Ludwig EM, Pierotti VR, Caiati L, Onasch MA, Wallis SC, et al. Structure of the human apolipoprotein B gene. *J Biol Chem.* nov 1986;261(33):15364-7.
9. Kriško A, Etchebest C. Theoretical model of human apolipoprotein B100 tertiary structure. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2007;66(2):342-58.
10. Jeiran K, Gordon SM, Sviridov DO, Aponte AM, Haymond A, Piszczek G, et al. A New Structural Model of Apolipoprotein B100 Based on Computational Modeling and Cross Linking. *Int J Mol Sci.* 29 sept 2022;23(19):11480.
11. Hussain MM, Bakillah A, Nayak N, Shelness GS. Amino Acids 430–570 in Apolipoprotein B Are Critical for Its Binding to Microsomal Triglyceride Transfer Protein. *J Biol Chem.* oct 1998;273(40):25612-5.
12. Kreuzer J, White AL, Knott TJ, Jien ML, Mehrabian M, Scott J, et al. Amino terminus of apolipoprotein B suffices to produce recognition of malondialdehyde-modified low density lipoprotein by the scavenger receptor of human monocyte-macrophages. *J Lipid Res.* févr 1997;38(2):324-42.
13. Shelness GS, Thornburg JT. Role of intramolecular disulfide bond formation in the assembly and secretion of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J Lipid Res.* févr 1996;37(2):408-19.
14. Hooper AJ, Van Bockxmeer FM, Burnett JR. Monogenic Hypocholesterolaemic Lipid Disorders and Apolipoprotein B Metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci.* janv 2005;42(5-6):515-45.
15. Olofsson S -O., Borèn J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med.* nov 2005;258(5):395-410.

16. Koerner CM, Roberts BS, Neher SB. Endoplasmic reticulum quality control in lipoprotein metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* déc 2019;498:110547.
17. Sarac I, Backhouse K, Shojaee-Moradie F, Stolinski M, Robertson MD, Bell JD, et al. Gender Differences in VLDL₁ and VLDL₂ Triglyceride Kinetics and Fatty Acid Kinetics in Obese Postmenopausal Women and Obese Men. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 2012;97(7):2475-81.
18. Julve J, Martín-Campos JM, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin Chim Acta.* avr 2016;455:134-48.
19. Kounatidis D, Vallianou NG, Poulaki A, Evangelopoulos A, Panagopoulos F, Stratigou T, et al. ApoB100 and Atherosclerosis: What's New in the 21st Century? *Metabolites.* 12 févr 2024;14(2):123.
20. Charrière S, Moulin P. L'apolipoprotéine AV : un nouvel acteur du métabolisme des triglycérides. *Médecine Mal Métaboliques.* déc 2009;3(6):575-80.
21. Adeli K, Macri J, Mohammadi A, Kito M, Urade R, Cavallo D. Apolipoprotein B Is Intracellularly Associated with an ER-60 Protease Homologue in HepG2 Cells. *J Biol Chem.* sept 1997;272(36):22489-94.
22. Schonfeld G. Familial hypobetalipoproteinemia: a review. *J Lipid Res.* mai 2003;44(5):878-83.
23. Peretti N. Conséquences métaboliques des malabsorptions lipidiques : apports de l'étude des hypocholestérolémies familiales. *Ol Corps Gras Lipides.* juill 2012;19(4):228-31.
24. Peloso GM, Nomura A, Khera AV, Chaffin M, Won HH, Ardissino D, et al. Rare Protein-Truncating Variants in *APOB*, Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Protection Against Coronary Heart Disease. *Circ Genomic Precis Med.* mai 2019;12(5):e002376.
25. Haas ME, Pirruccello JP, Friedman SN, Wang M, Emdin CA, Ajmera VH, et al. Machine learning enables new insights into genetic contributions to liver fat accumulation. *Cell Genomics.* déc 2021;1(3):100066.
26. Holmer M, Ekstedt M, Nasr P, Zenlander R, Wester A, Tavaglione F, et al. Effect of common genetic variants on the risk of cirrhosis in non-alcoholic fatty liver disease during 20 years of follow-up. *Liver Int.* déc 2022;42(12):2769-80.
27. Chouik Y, Di Filippo M, Radenne S, Dumortier J, Moulin P, Levrero M. Combination of heterozygous *APOB* gene mutation with *PNPLA3* and *TM6SF2* variants promotes steatotic liver disease, cirrhosis and HCC development. *Liver Int.* juin 2024;44(6):1474-7.
28. Smati S, Wargny M, Boursier J, Moulin P, Di Filippo M, Cariou B. Prevalence of Liver Steatosis and Fibrosis in Adults With Primary Hypobetalipoproteinemia: Results From the HYPOCHOL Study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* juill 2024;S1542356524006062.
29. Vilar-Gomez E, Gawrieh S, Liang T, McIntyre AD, Hegele RA, Chalasani N. Interrogation of selected genes influencing serum LDL-Cholesterol levels in patients with well characterized NAFLD. *J Clin Lipidol.* mars 2021;15(2):275-91.
30. Parhofer KG, Barrett PH, Bier DM, Schonfeld G. Lipoproteins containing the truncated apolipoprotein, Apo B-89, are cleared from human plasma more rapidly than Apo B-100-containing lipoproteins in vivo. *J Clin Invest.* 1 juin 1992;89(6):1931-7.

31. Parhofer KG, Barrett PH, Aguilar-Salinas CA, Schonfeld G. Positive linear correlation between the length of truncated apolipoprotein B and its secretion rate: in vivo studies in human apoB-89, apoB-75, apoB-54.8, and apoB-31 heterozygotes. *J Lipid Res.* avr 1996;37(4):844-52.
32. Zhu XF, Noto D, Seip R, Shaish A, Schonfeld G. Organ Loci of Catabolism of Short Truncations of ApoB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* American Heart Association; juin 1997;17(6):1032-8.
33. Aguilar-Salinas CA, Barrett PHR, Parhofer KG, Young SG, Tessereau D, Bateman J, et al. Apoprotein B-100 Production Is Decreased in Subjects Heterozygous for Truncations of Apoprotein B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 1995;15(1):71-80.
34. Henry Z, Janin A, Nony S, Marmontel O, Cariou B, Marrec M, et al. Interest of minigene splicing reporter assay in familial hypobetalipoproteinemia genetic diagnosis: the example of the missense mutation *APOB* c.1468C>T. *Clin Chem Lab Med CCLM.* 27 nov 2023;61(12):e259-62.
35. Talmud PJ, Krul ES, Pessah M, Gay G, Schonfeld G, Humphries SE, et al. Donor splice mutation generates a lipid-associated apolipoprotein B-27.6 in a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res.* mars 1994;35(3):468-77.
36. Talmud P, King-Underwood L, Krul E, Schonfeld G, Humphries S. The molecular basis of truncated forms of apolipoprotein B in a kindred with compound heterozygous hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res.* nov 1989;30(11):1773-9.
37. Blackhart BD, Yao ZM, McCarthy BJ. An expression system for human apolipoprotein B100 in a rat hepatoma cell line. *J Biol Chem.* mai 1990;265(15):8358-60.
38. Yilmaz BS, Mungan NO, Di Leo E, Magnolo L, Artuso L, Bernardis I, et al. Homozygous familial hypobetalipoproteinemia: A Turkish case carrying a missense mutation in apolipoprotein B. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 15 janv 2016;452:185-90.
39. Walsh MT, Celestin OM, Thierer JH, Rajan S, Farber SA, Hussain MM. Model systems for studying the assembly, trafficking, and secretion of apoB lipoproteins using fluorescent fusion proteins. *J Lipid Res.* mars 2020;61(3):316-27.
40. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* déc 1987;169(12):5429-33.
41. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 4 nov 2010;468(7320):67-71.
42. Nuñez JK, Lee ASY, Engelman A, Doudna JA. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature.* 12 mars 2015;519(7542):193-8.
43. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science.* 15 févr 2013;339(6121):823-6.
44. Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. *médecine/sciences.* déc 2014;30(12):1066-9.
45. Krul ES, Kinoshita M, Talmud P, Humphries SE, Turner S, Goldberg AC, et al. Two distinct truncated apolipoprotein B species in a kindred with hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Off J Am Heart Assoc Inc.* nov 1989;9(6):856-68.

46. Marmontel O, Rollat-Farnier PA, Wozny A, Charrière S, Vanhoye X, Simonet T, et al. Development of a new expanded next-generation sequencing panel for genetic diseases involved in dyslipidemia. *Clin Genet.* déc 2020;98(6):589-94.
47. Balder JW, De Vries JK, Nolte IM, Lansberg PJ, Kuivenhoven JA, Kamphuisen PW. Lipid and lipoprotein reference values from 133,450 Dutch Lifelines participants: Age- and gender-specific baseline lipid values and percentiles. *J Clin Lipidol.* juill 2017;11(4):1055-1064.e6.
48. Wargny M, Goronflot T, Rimbert A, Boursier J, Kab S, Henny J, et al. Primary hypocholesterolemia is associated with an increased risk of hepatic complications in the general population. *J Hepatol.* juin 2024;80(6):846-57.
49. Vanhoye X, Janin A, Caillaud A, Rimbert A, Venet F, Gossez M, et al. APOB CRISPR-Cas9 Engineering in Hypobetalipoproteinemia: A Promising Tool for Functional Studies of Novel Variants. *Int J Mol Sci.* 13 avr 2022;23(8):4281.
50. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods.* janv 2008;44(1):31-8.
51. Bouladoux N. Rôle de l'interferon-gamma dans l'immunité cellulaire anti-microsporidienne. Etude du modèle de la souris déficiente pour le récepteur à l'interferon-gamma, infectée oralement avec la microsporidie *Encephalitozoon intestinalis*.
52. Tarugi P, Aversa M. Hypobetalipoproteinemia. Dans: *Advances in Clinical Chemistry* [En ligne]. Elsevier; 2011 [cité le 19 déc 2024]. p. 81-107. Disponible: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123870254000042>
53. D'Erasmus L, Di Martino M, Neufeld T, Fraum TJ, Kang CJ, Burks KH, et al. ANGPTL3 Deficiency and Risk of Hepatic Steatosis. *Circulation.* 7 nov 2023;148(19):1479-89.
54. Di Costanzo A, Pirona I, Buonaiuto S, D'Erasmus L, Bini S, Tramontano D, et al. Effect of Cholesterol-Lowering Variants in ANGPTL3 and APOB Genes on Liver Disease. *J Am Coll Cardiol.* oct 2024;84(18):1767-70.
55. Meex SJR, Andreo U, Sparks JD, Fisher EA. Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res.* janv 2011;52(1):152.
56. Blanchard V. Approches biochimique, épidémiologique et clinique du métabolisme intégré de la Lipoprotéine (a).
57. Van Den Broek I, Nouta J, Razavi M, Yip R, Bladergroen MR, Romijn FPHTM, et al. Quantification of serum apolipoproteins A-I and B-100 in clinical samples using an automated SISCAPA-MALDI-TOF-MS workflow. *Methods.* juin 2015;81:74-85.

6. Annexe

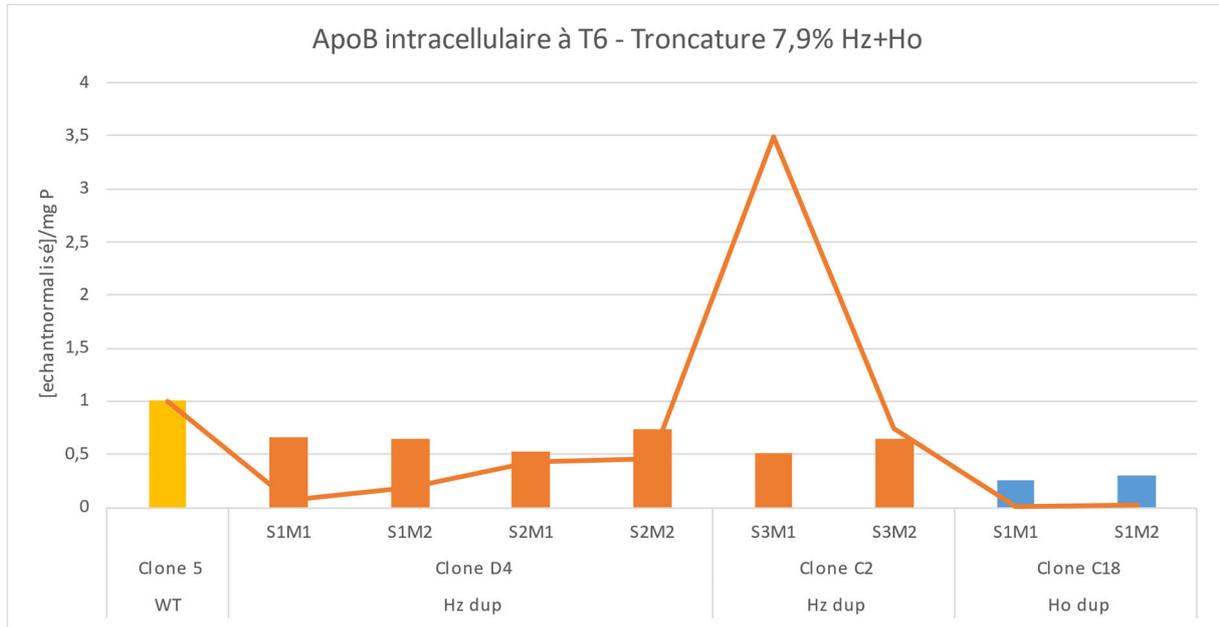


Figure supplémentaire 1- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB intracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T7,9%

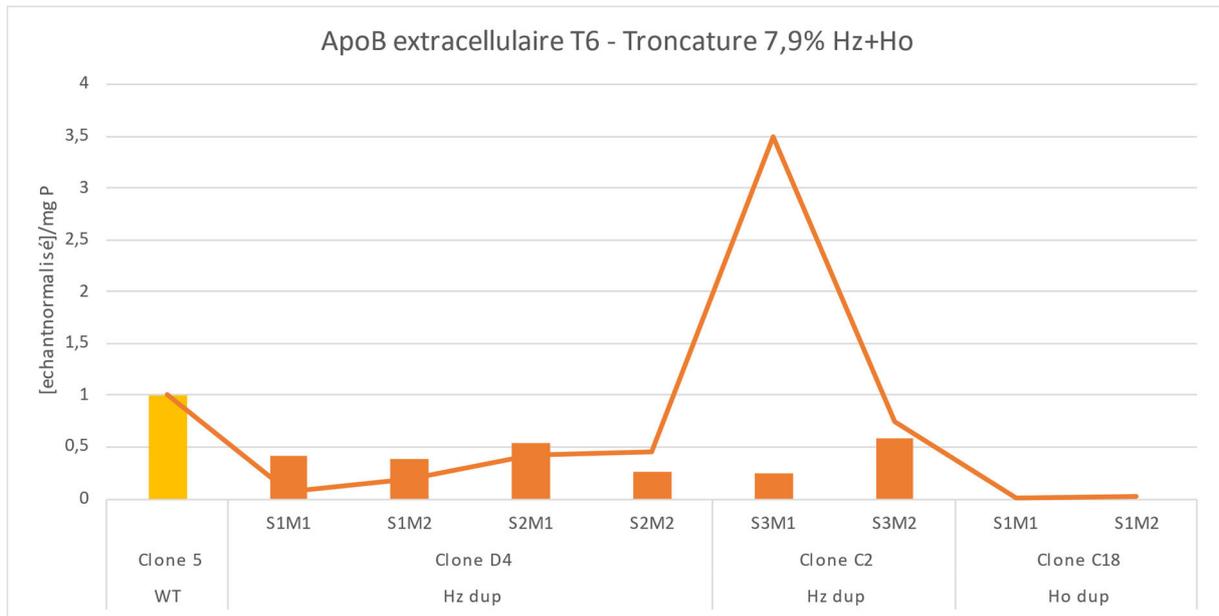


Figure supplémentaire 2- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB extracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T7,9%

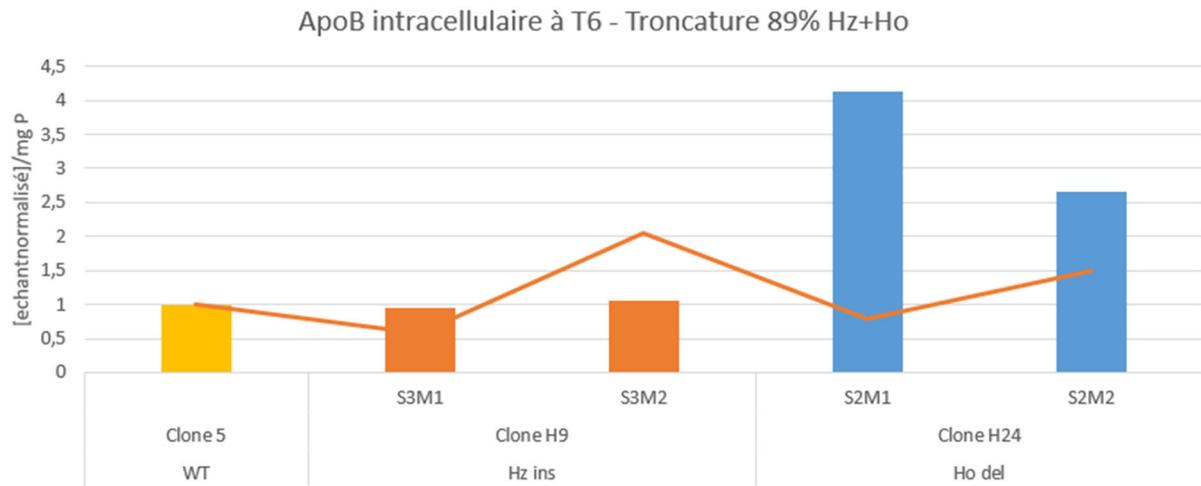


Figure supplémentaire 3- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB intracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T89%

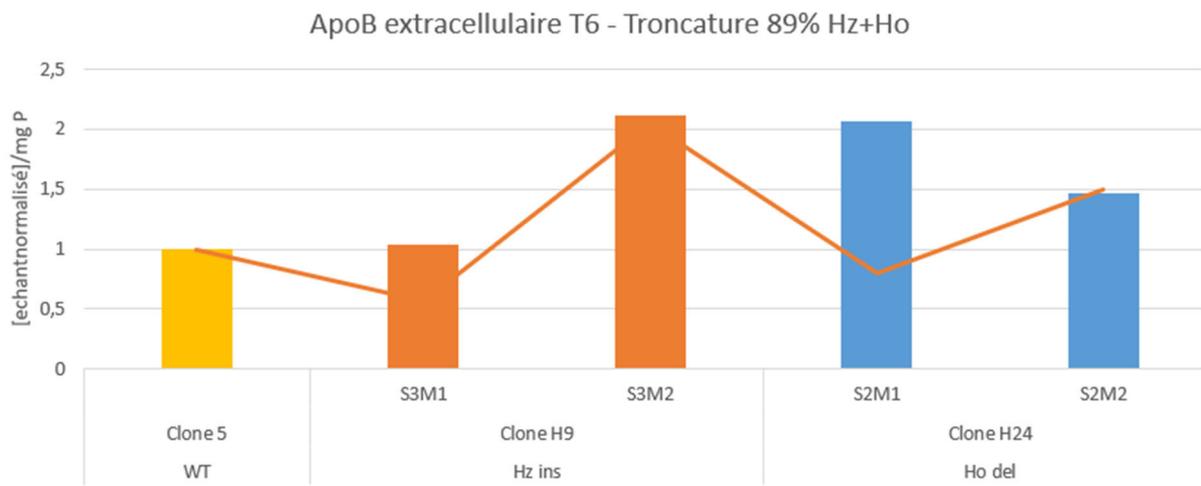


Figure supplémentaire 4- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB extracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T89%

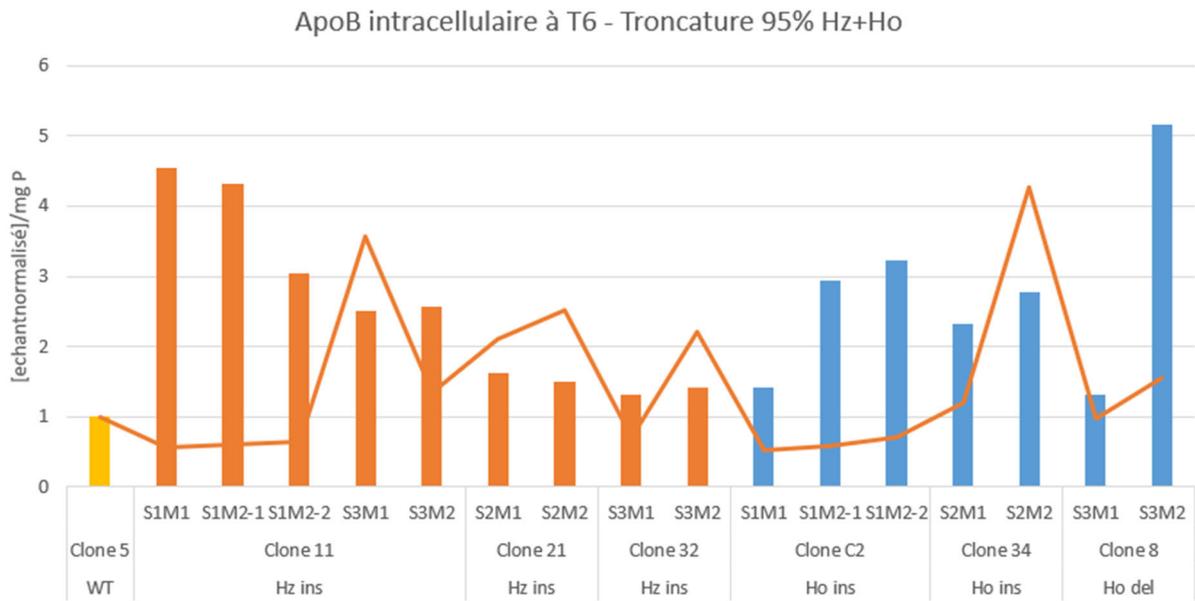


Figure supplémentaire 5- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB intracellulaire normalisée par mg de protéines à T=6h pour les clones Hz et Ho T95%

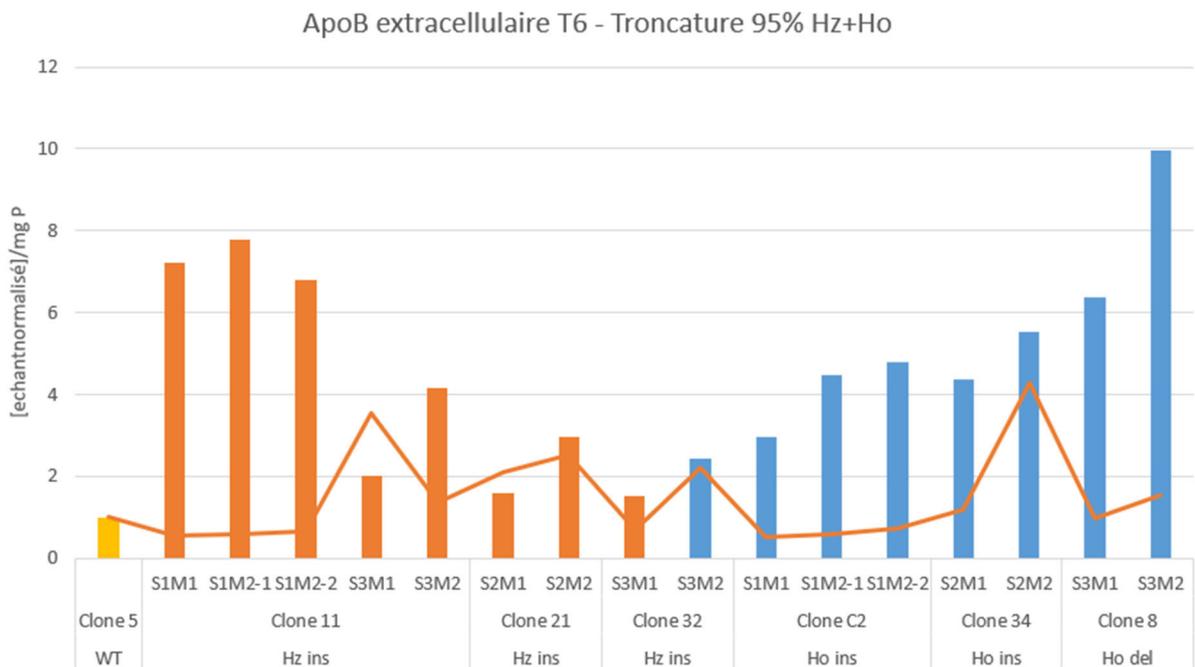


Figure supplémentaire 6- Graphique de la quantité d'ARNm et de la concentration d'apoB extracellulaire normalisée par mg de protéines à t=6h pour les clones Hz et Ho T95%

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 engagé 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.

VAEILLE Aurore**Influence de la taille de la troncature de l'apoB sur sa sécrétion : Etude via un modèle cellulaire édité par CRISPR-Cas9**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2025, 79 p.

L'hypobetalipoprotéinémie se définit par des concentrations plasmatiques de cholestérol total, de cholestérol LDL et d'apolipoprotéine B inférieures au 5^{ème} percentile de celles observées en population générale. La forme monogénique la plus fréquente est l'HBLF-SD2, une hypocholestérolémie primitive rare de transmission autosomique semi-dominante liée à des variants délétères ou probablement délétères du gène *APOB* empêchant la sécrétion d'apolipoprotéine B (apoB). Les variants non-sens et les troncatures tardives découvertes chez des patients avec un phénotype évoquant une HBLF-SD2 sont classés dans les variations de significations incertaines (VSI). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de deux troncatures tardives mise en évidence chez des patients présentant une hypocholestérolémie, sur la production et la sécrétion hépatique de l'apoB-100.

Afin d'étudier fonctionnellement ces variations, le génome des cellules hépatiques humaines HuH7 a été modifié par la technique CRISPR-Cas9. Des clones cellulaires ont été obtenus avec des variations à l'état hétérozygote et homozygote proches de celles initialement ciblées. Après incubation avec de l'acide oléique, le taux d'expression d'ARN *APOB* a été quantifié par RT-qPCR, et les concentrations d'apoB-100 intra et extracellulaire ont été mesurées par tests ELISA. Les résultats ont été normalisés par rapport au clone Wild-type.

Les concentrations intra et extracellulaires d'apolipoprotéine B mesurées chez les clones apoB-89 hétérozygotes et homozygotes ne sont pas significativement différentes à celles du Wild-type. Les concentrations extracellulaires d'apolipoprotéine B mesurées chez les clones apoB-95 hétérozygotes et homozygotes sont significativement plus élevées que celles du Wild-type, respectivement $p=0,005$ et $p=0,004$. Pour les concentrations intracellulaires, seule celle du clone homozygote est significativement plus élevée à celle du Wild-type $p=0,027$. Ces résultats suggèrent que la présence de cette troncature apoB-95% est associée à une augmentation de la sécrétion d'apoB-95 par rapport à l'apoB-100. L'hypocholestérolémie pourrait alors être liée à une recapture plus importante.

Des études cellulaires complémentaires sur de nouveaux clones permettraient de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et pouvoir évaluer la pathogénicité des variations étudiées.

MOTS CLES

Hypobetalipoprotéinémie, CRISPR-Cas9, Troncature, ApolipoprotéineB-100

JURY

Mme Christine VINCIGUERRA, PU-PH

Mme Mathilde DI FILIPPO, PH

Mr Alexandre JANIN, MCU-PH

Mme Jennifer RIEUSSET, Directrice de recherche

DATE DE SOUTENANCE

Vendredi 24 janvier 2025

CONTACT

Mail de la tutrice pédagogique : christine.vinciguerra@chu-lyon.fr

Mail de la directrice de thèse : mathilde.di-filippo@chu-lyon.fr