



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

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



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

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

FACULTE DE PHARMACIE

INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2021

THESE n° 032

T H E S E

Pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 12 avril 2021

par Mr JABER Marwan

né le 27 mars 1995

à Vénissieux

**EVALUATION DE L'INTERET DU PANEL NGS DYSLISEQ DANS LE
DIAGNOSTIC DES HYPERLIPIDEMIES COMBINEES FAMILIALES**

JURY

Mme FERRARO-PEYRET Carole, MCU-PH

Mme MARMONTEL Oriane, PH

M. DI FILIPPO Mathilde, PH

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

• Président de l'Université	Frédéric FLEURY
• Présidente du Conseil Académique	Hamda BEN HADID
• Vice-Président du Conseil d'Administration	Didier REVEL
• Vice-Président de la Commission Recherche	Fabrice VALLEE
• Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire	Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE
Observatoire des Sciences de l'Univers	Directrice : Mme Isabelle DANIEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHEMIE ET PHARMACIE

GALENIQUE

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

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)

Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)

Madame Anne DENUZIERE (MCU)

Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)

Madame Christelle MACHON (MCU-PH)

Monsieur Waël ZEINYEYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)

Madame Françoise FALSON (Pr)

Monsieur Hatem FESSI (Pr)

Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)

Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)

Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)

Madame Giovanna LOLLO (MCU)

Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)

Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

- **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)

Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)

Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)

Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (Pr)

Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**
Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)
- **ECONOMIE DE LA SANTE**
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**
Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)
- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)
- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)

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

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

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

- **PHYSIOLOGIE**

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

- **PHARMACOLOGIE**

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

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Madame Sarah HUET (AHU)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**
Madame Pascale COHEN (Pr)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)

Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-PAST)
Madame Valérie VOIRON (MCU-PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques (AHU)**

Monsieur Alexandre JANIN

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

Madame Camille ROZIER

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

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

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Contenu

Remerciements	12
Liste des abréviations.....	14
Liste des figures.....	16
Liste des tableaux.....	17
Introduction :	18
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET ENJEUX DU TRAVAIL.....	21
I. Métabolisme des lipoprotéines	22
1. Lipoprotéines, Cholestérol & métabolisme.....	22
1.1. Les lipoprotéines :	22
1.2. Les chylomicrons	25
1.3. VLDL (very low density lipoproteins).....	26
1.4. Les LDL	27
1.5. Les HDL :	28
1.6. Conclusion	29
II. Hyperlipidémie combinée familiale	30
1. Introduction.....	30
2. Critère diagnostique :	31
3. Physiopathologie de l'HCF	32
3.1. Lipogenèse, β oxydation et tissus adipocytaires.....	32
3.2. Altérations de la sécrétion et de la dégradation de lipoprotéines	32
4. Comorbidités métaboliques dans l'HCF	33
5. Conséquences cliniques.....	33
6. Caractérisation génétique :	35
6.1. Introduction.....	35

6.2.	Gènes impliqués dans HCF	35
6.3.	Précisions concernant certains gènes d'intérêts de l'HCF	40
6.3.1.	<i>LDLR, PCSK9, APOB & APOE</i>	40
6.3.2.	<i>ANGPTL3</i>	41
6.3.3.	Le facteur de transcription <i>USF1</i>	41
6.4.	<i>CREB3L3</i>	43
III.	Le séquençage de l'ADN.....	45
1.	Les différents types de mutations	45
2.	Techniques de séquençage de l'ADN	47
2.1.	La méthode Sanger	47
2.2.	Le séquençage haut débit	49
2.3.	La technologie Illumina.....	52
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE		55
1.	Introduction.....	56
1.1.	Contexte	56
1.2.	Objectifs.....	57
2.	Matériels et méthodes	58
2.1.	Inclusion des patients	58
2.1.1.	Disponibilité bilan lipidique et historique médical	58
2.1.2.	Application des critères d'inclusion	59
2.1.3.	Disponibilité de l'ADN du patient	59
2.1.4.	Exemple d'inclusion d'un patient	61
2.2.	Réalisation NGS Nimblegen-Nextseq500 : Mode Opérateur Analyse Roche Illumina V2.3	63
2.2.1.	Déroulement de l'activité	63

2.3.	Analyse du séquençage par Illumina	64
2.4.	Filtrage des informations.....	65
2.5.	Interprétation des variants.....	67
3.	Résultats	68
3.1.	Constitution de la cohorte – logigramme	68
3.1.1.	Chiffres clés de la cohorte.....	69
3.1.2.	Bilans lipidiques des patients sélectionnés.....	70
3.2.	Variants identifiés.....	71
3.3.	Étude des variants d’intérêt	83
3.3.1.	Variants identifiés dans les gènes impliqués dans les dyslipidémies monogéniques.....	83
3.3.2.	Variants identifiés entraînant l’apparition d’un codon stop prématuré.....	84
3.3.3.	Variants identifiés compatible avec transmission récessive	84
4.	Discussion.....	86
	CONCLUSIONS.....	91
	Bibliographie	93

Remerciements

Au Docteur Oriane Marmontel,

Je te remercie de m'avoir dirigé dans ce travail de thèse et d'avoir permis sa réalisation. Merci de m'avoir transmis et partagé ton intérêt pour la recherche, ainsi que le temps que tu as pu m'accorder. Tu m'as toujours encouragé et donné confiance en moi, le chemin a été long mais c'est avec fierté que j'ai réalisé ce travail à tes côtés.

Aux membres du jury, le Professeur Carole Ferraro-Peyret et le Docteur Mathilde Di Filippo,

Je vous remercie pour l'intérêt porté à ce travail et d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Veuillez croire à ma plus grande estime.

A mes parents,

Merci pour tout. D'avoir cru en moi durant toute ces années, encouragé et accompagné. Je vous en serai toujours reconnaissant.

A ma famille,

Sofiane, Lina, mes Grands-parents, mes oncles et tantes ainsi que mes cousins et Hermès.

Rémi et toute la famille Guibout/Lardin,

Mon meilleur ami, qui a toujours été là pour moi. Merci aussi Valérie, Romain, Jeannot et Henriette pour tous ces bons moments passés en famille.

A Magalie,

Plus de 20 ans d'amitié, et d'incroyables moments passés ensemble, les études se terminent, c'est une page de nos vies qui se tourne, et une autre qui commence.

A Antoine,

Mon ami et mon coach, merci pour tous ces bons moments à tes côtés lors de nos entraînements, ta source de motivation et toutes nos discussions.

A Alexandra,

Merci d'avoir toujours été là pour moi, pour nos nombreux moments ensemble et les nombreux à venir.

Les copains,

Chloé, Victor, Vincent, Joris, Tiphaine, Calvin, Théo, Coralie, Cyndie, merci pour votre amitié qui m'est précieuse.

Les amis de la gym et mes entraîneurs,

Merci Bertrand mon entraîneur de m'avoir transmis la passion pour la gymnastique. Merci à tous les gym' (Enzo, Tom, Léo, Mathias, Dylan, Vincent) et entraîneurs (Jean-Lo, Fanny, Anaïs, Blandine, Aurélie, Fred) pour votre amitié, ainsi que les nombreuses heures d'entraînements que nous avons passées ensemble.

Hugo, Lucas, Barbato, Joris, Axel,

Merci pour votre amitié et toutes ces vacances passées ensemble

Marie, Oksana, les amis de pharmacie et de médecine,

Merci pour votre amitié ainsi que ces belles années à vos côtés.

Luxilla, Arielle & Robin ;

Merci pour votre amitié et tous ces bons moments ensemble.

L'équipe Boehringer Ingelheim,

Merci pour votre accueil et votre soutien lors de ma venue dans l'entreprise.

Liste des abréviations

ACMG = American College of Medical Genetics (Collège Américain de Génétique Médicale)

ADN = Acide DésoxyriboNucléique

AG = Acide gras

ANGPTL3 = Angiopoietin-like protein 3

ApoB = Apolipoprotéine B

CPK = Créatine Phosphokinase

CREB3L3 = Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein 3

CT = Cholestérol Total

ddNTP = didésoxynucléotides

dNTP = désoxynucléotides

GHE = Groupement Hospitalier Est

GUS = Gene of Uncertain Significance (Gène de signification non certaine)

HCF = Hyperlipidémie combinée familiale

HCL = Hospices Civils de Lyon

HDL = High density lipoprotein (Lipoprotéine de haute densité)

HF = Hypercholestérolémie familiale

HMGCoA = Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A

HTG = Hypertriglycéridémie

IDL = Intermediary Density Lipoproteins (Lipoprotéine de densité intermédiaire)

IDM = Infarctus Du Myocarde

IDOL = Improvement in Diagnosis of famililal cOmbined hyperLipidemiA (Amélioration du diagnostic de l'hyperlipidémie combinée familiale)

IMC = Indice de Masse Corporelle

LBMMS = Laboratoire De Biologie Médicale Multisite

LDL = Low density lipoprotein (Lipoprotéine de basse densité)

LMF1 = Lipase maturation factor 1

Lp(a) = Lipoprotéine A

LPL = Lipoprotéine Lipase

mRNA = messenger RiboNucleic Acid (Acide Ribonucléique messenger)

NGS = Next Generation Sequencing (Séquençage Nouvelle Génération)

OMS = Organisation mondiale de la santé

PCR = Polymerase Chain Reaction (Réaction en Chaîne par Polymérase)

RCP = Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

SNP = Single Nucleotid Polymorphism (Polymorphisme d'un seul nucleotide)

TG = Triglycérides

USF1 = Upstream Transcription Factor 1

VLDL = Very low-density lipoprotein (Lipoprotéine de très basse densité)

VUS = variant of unknown significance (Variant de signification inconnue)

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale des lipoprotéines

Figure 2 : Incidence des maladies cardiovasculaires chez des patients atteints d'HCF, des profils normaux et leurs conjoints

Figure 3 : Les différents types de variations de l'ADN

Figure 4 : Méthode Sanger, les dNTP et ddNTP

Figure 5 : Schéma général du séquençage haut débit

Figure 6 : Amplification sur support solide.

Figure 7 : Principe de la « bridge PCR » appliqué à la technologie Illumina®. D'après Metzker et al.

Figure 8 : Représentation des critères d'éligibilité d'un patient HCF à l'étude

Figure 9 : Logigramme représentant la sélection des patients pour l'étude

Figure 10 : Déroulement de l'analyse sous forme de logigramme

Figure 11 : Processus général de traitement des informations

Figure 12 : Constitution de la cohorte – logigramme

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines

Tableau 2 : Gènes sélectionnés comme étant lié et/ou associé à l'HCF Brahm AJ et Al

Tableau 3 : Données biologiques des 16 patients IDOL sélectionnés

Tableau 4 : Mise en évidence des variants des patients

Introduction :

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les facteurs de risque de ces maladies sont multiples et variés : tabac, alimentation, sédentarité, pression artérielle ou encore dyslipidémies (1).

Les anomalies du métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines constituent une cause essentielle d'athérosclérose. L'athérosclérose est une pathologie artérielle, à l'origine de la plupart des accidents cardiovasculaires graves. Elle se caractérise par le dépôt de plaques essentiellement composées de lipides sur la paroi des artères. Environ 80 % des cas de morts subites ont pour origine une rupture de plaque d'athérome. La rupture d'une plaque peut notamment provoquer un infarctus du myocarde (si l'athérome est localisé dans une artère coronaire), un accident vasculaire cérébral (athérome au niveau d'une carotide) ou encore une artérite oblitérante des membres inférieurs (2).

Il est donc important de comprendre et d'étudier ces facteurs de risques, afin de pouvoir cibler la maladie et de pouvoir proposer une thérapeutique adaptée aux patients : préventive et/ou curative.

L'hyperlipidémie combinée familiale (HCF) est l'une des dyslipidémies primaires les plus prévalentes, bien qu'elle reste sous diagnostiquée et controversée dans sa définition. L'HCF est caractérisée par une fluctuation du profil lipidique chez un individu et certains membres de sa famille ; et se présente comme une hyperlipidémie mixte avec une hypercholestérolémie et/ou une hypertriglycéridémie et des taux anormalement élevés d'apolipoprotéine B (ApoB). L'HCF est une dyslipidémie oligogénique, qui apparait du fait de l'interaction de plusieurs variants génétiques et de facteurs environnementaux.

Les patients atteints d'HCF ont des risques accrus de maladies cardiovasculaires et de mortalité, ainsi que d'autres comorbidités associées comme le diabète de type 2, la stéatose hépatique ou le syndrome métabolique.

A l'heure actuelle, de nombreux points d'ombre persistent et le nombre d'études concernant les HCF décroissent, notamment à cause des difficultés de diagnostic de la maladie (3).

Il est vrai que les avancées technologiques des outils d'exploration génétique permettent d'envisager une amélioration de la compréhension de la composante génétique de la maladie, et par conséquent une amélioration du diagnostic par les cliniciens.

L'étude présentée ici a été réalisée dans le cadre de mon stage de 5^{ème} année de pharmacie hospitalo-universitaire au sein du secteur Dyslipidémies du laboratoire de biologie médicale multisite (LBMMS) des Hospices Civils de Lyon (HCL).

Ce projet intitulé IDOL, pour *Improvement in Diagnosis of familial cOmbined hyperLipidemiA*, correspond à une étude préliminaire pour évaluer l'intérêt de l'utilisation d'une stratégie NGS explorant plus de 311 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans le diagnostic moléculaire des HCF (4).

En collaboration avec le service clinique d'endocrinologie, le recueil rétrospectif de données clinico-biologiques a permis d'identifier plus de 154 patients potentiellement atteints d'HCF. Ces derniers ont dû être triés afin de les inclure dans l'étude s'ils répondaient aux critères. Par la suite, ils ont bénéficié d'une analyse NGS ou d'une réinterprétation de leurs données précédemment obtenues pour une autre indication (exemple : patients initialement suspectés d'avoir une hypercholestérolémie familiale (HF)). L'objectif principal de cette étude est de mettre en évidence une cause génétique qui pourrait favoriser l'apparition de l'HCF.

Premièrement une étude bibliographique explicitera le métabolisme des lipides dans l'organisme, l'HCF ainsi que le séquençage nouvelle génération. Dans une deuxième partie, le travail expérimental correspondant au projet IDOL sera présenté.

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET
ENJEUX DU TRAVAIL

I. Métabolisme des lipoprotéines

La digestion, l'absorption et les sécrétions intestinales des graisses alimentaires sont des étapes importantes pour maintenir l'homéostasie lipidique et énergétique du corps (5).

1. Lipoprotéines, Cholestérol & métabolisme

Le cholestérol et les triglycérides (TG) sont des lipides insolubles dans les milieux biologiques aqueux. Ces derniers sont donc transportés en association avec des protéines. Les lipoprotéines sont des particules sphériques complexes avec un corps central hydrophobe contenant des esters de cholestérol et des TG, entouré par une membrane hydrophile constituée de cholestérol libre, phospholipides et d'apolipoprotéines qui facilite la formation et la fonction des lipoprotéines (6).

1.1. Les lipoprotéines :

Les lipoprotéines plasmatiques sont sphériques, de taille et composition variables. Les 7 classes de lipoprotéines sont définies en fonction de leur densité, leur taille, leur composition en lipides et en apolipoprotéines : CM (chylomicrons), remnants de CM, VLDL (very low density lipoproteins), IDL (intermediary density lipoproteins), LDL (low density lipoproteins), HDL (high density lipoproteins) et Lp(a) (Lipoprotéine A) (6).

Les remnants de CM, les VLDL, les IDL, les LDL et la Lp(a) ont tous des caractères pro-athérogènes contrairement aux HDL qui ont une fonction plutôt antiathérogène.

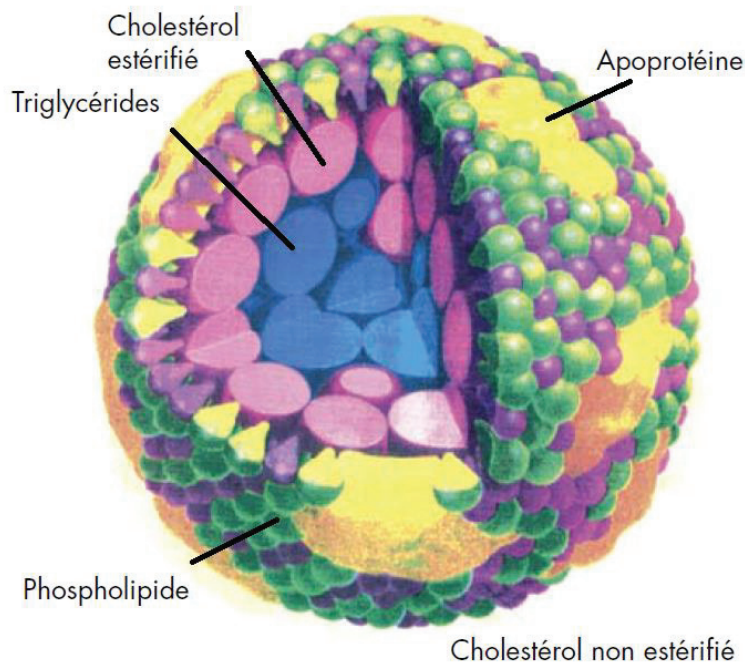


Figure 1 : Structure générale des lipoprotéines (7)

Les lipoprotéines sont caractérisées par la présence d'apolipoprotéines à leur surface qui assurent la stabilité et contrôlent le devenir métabolique de la macromolécule (figure 1) (8).

Les apolipoprotéines ont 4 fonctions majeures : rôle structural ; activateur de ligands pour les récepteurs aux lipoprotéines ; participation à la formation des lipoprotéines ; activateur ou inhibiteur des enzymes impliqués dans le métabolisme des lipides (tableau 1). Elles assurent la cohésion du complexe lipidique et sa solubilisation (9).

Lipoprotéines	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Lipides majeures	Apoprotéines majoritaires
Chylomicrons	<0.930	75-1200	Triglycérides	ApoB-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV
Chylomicron Remnants	0.930- 1.006	30-80	Triglycérides Cholestérol	Apo B-48, Apo E
VLDL	0.930- 1.006	30-80	Triglycérides	Apo B-100, Apo E, Apo C
IDL	1.006- 1.019	25-35	Triglycérides Cholestérol	Apo B-100, Apo E, Apo C
LDL	1.019- 1.063	18- 25	Cholestérol	Apo B-100
HDL	1.063- 1.210	5- 12	Cholestérol Phospholipides	Apo A-I, Apo A-II, Apo C, Apo E
Lp(a)	1.055- 1.085	~30	Cholestérol	Apo B-100, Apo (a)

Tableau 1 : Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines (6)

Certaines apoprotéines sont spécifiques de certaines lipoprotéines : l'ApoB-48 est spécifique des CM, l'apoA-I est associée aux HDL et CM quant à l'apo-B-100 elle est associée aux VLDL et au LDL.

1.2. Les chylomicrons

Les CM intestinaux et les VLDL dérivés du foie représentent les deux classes de lipoprotéines riches en TG responsables du transfert des lipides dans d'autres cellules du corps.

La majorité des lipides absorbés est incorporée au sein de CM dans l'entérocyte intestinal, sécrétée et transportée à travers le système lymphatique pour entrer dans la circulation sanguine et ensuite être livrée à divers tissus pour le stockage ou l'utilisation d'énergie (8). Les CM sont notamment impliqués dans le transport des TG alimentaires et du cholestérol vers les tissus périphériques et le foie (6).

Les TG sont les graisses les plus représentées dans l'alimentation, ils contribuent à 90-95% de l'énergie totale des graisses alimentaires (ces dernières étant également constituées de cholestérol et de vitamines liposolubles).

L'activité de la lipase pancréatique sur les TG génère des 2-monoacylglycérols et des acides gras (AG) qui formeront des micelles avec les acides biliaires afin de faciliter par la suite leur absorption au niveau de la bordure en brosse le long de la membrane apicale des entérocytes (10).

La taille des CM varie en fonction de la quantité de graisse ingérée lors d'un repas. Un repas riche en graisse mène à la formation de grands CM du fait de la grande quantité de TG transportée en opposition à une situation de jeûne où les CM transportent des quantités plus faibles de TG (6).

1.3. VLDL (very low density lipoproteins)

Les VLDL sont produits par le foie et sont riches en TG. L'ApoB-100, protéine structurale, est contenue dans chaque VLDL. Les VLDL sont similaires aux CM et leur taille varie selon la quantité de TG transportés. Quand la production de TG augmente dans le foie la sécrétion des VLDL augmente (6).

En comparaison aux CM qui sont les médiateurs du transport des lipides issus de l'alimentation, les VLDL assurent le transport des lipides endogènes vers les tissus périphériques. La production des VLDL a besoin d'être synchronisée avec leur élimination, afin d'éviter la stéatose hépatique ou encore une trop grande concentration de ces derniers dans le sang (11). Une fois dans la circulation les VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) pour générer par la suite des IDL (intermediate density lipoproteins).

1.4. Les LDL

Les LDL sont des particules enrichies en cholestérol qui dérivent des VLDL et des IDL. Ils transportent la majorité du cholestérol qui se trouve dans la circulation. L'apolipoprotéine majoritaire est la B-100 et chaque LDL contient cette molécule. Les particules de LDL petites et denses sont considérées comme pro-athérogènes contrairement aux grandes particules de LDL. Les particules de LDL petites et denses ont une affinité moindre pour les récepteurs LDL d'où leurs rétentions prolongées dans la circulation (6).

De manière simplifiée les particules de LDL ont le rôle de transport du cholestérol du foie vers les tissus périphériques. Le foie possède 70 % des récepteurs au LDL-cholestérol de l'organisme. La présence de variant délétère sur le gène *LDLR* à l'état homozygote ou hétérozygote peut conduire à l'HF.

L'HF est une maladie très athérogène par défaut d'épuration plasmatique du LDL-cholestérol. C'est grâce aux récepteurs LDL notamment que le cholestérol entre dans les cellules où il sera stabilisé par une estérification.

S'ajoutant au cholestérol alimentaire, du cholestérol endogène est synthétisé par le foie grâce à une enzyme clé, l'HMGCoA réductase. En cas d'excès de cholestérol intracellulaire, les cellules diminuent le nombre de leurs récepteurs LDL de surface, ce qui peut conduire à une augmentation de la concentration de LDL-cholestérol circulant (7).

1.5. Les HDL :

Les particules d'HDL sont enrichies en cholestérol et phospholipides. Ces dernières sont des particules importantes dans le transport « reverse » du cholestérol des tissus périphériques au foie, illustrant leur caractère antiathérogène.

Les particules d'HDL ont un caractère antioxydant, anti-inflammatoire, antithrombotique et anti-apoptotique ; ce qui contribuerait à leurs capacités d'inhibition de l'athérosclérose.

Le rôle des particules HDL est de redistribuer le cholestérol des cellules périphériques vers le foie. Des particules circulantes précurseurs des particules matures d'HDL vont récupérer au niveau des cellules périphériques le cholestérol. Le foie a ainsi un rôle fondamental pour permettre à l'organisme d'éliminer du cholestérol. Dans le tube digestif, une partie du cholestérol va être réabsorbée et retourner au foie, assurant ainsi un cycle entéro-hépatique. L'autre partie du cholestérol sera éliminée (6).

1.6. Conclusion

La corrélation entre les dyslipidémies (anomalies du métabolisme des lipides) et les retentissements cardiovasculaires, est connu et démontré d'après plusieurs recherches (12) (13) (14). Le métabolisme des lipoprotéines est donc important à prendre en compte car c'est un processus finement régulé qui permet de maintenir une homéostasie primordiale chez l'homme.

Concernant les dyslipidémies, ces dernières peuvent être secondaires et reliées à d'autres maladies, ou primaire et dû à des facteurs génétiques.

II. Hyperlipidémie combinée familiale

1. Introduction

L'HCF est l'une des dyslipidémies primaires les plus prévalentes. Cette dernière est caractérisée par une fluctuation du profil lipidique (chez un même patient et au sein d'une même famille).

L'HCF résulterait de l'interaction de plusieurs variants génétiques, fréquents ou rares, mais aussi des facteurs environnementaux. Les patients atteints d'HCF ont des risques accrus de mortalité (maladie cardiovasculaires, comorbidités associées à d'autres troubles métaboliques).

Certains groupes ethniques sont particulièrement prédisposés à l'HCF, comme l'a montré Paramsothy et al. dans une étude aux États-Unis, avec une prévalence de 4,8% qui a été rapportée dans les populations hispaniques (15) (16).

Cependant le nombre d'études se focalisant sur l'épidémiologie, la génétique, la physiopathologie et le traitement des HCF a tendance à diminuer. En effet de moins en moins d'articles liés à l'HCF sont publiés sur Pubmed depuis 2007 (3).

Cet intérêt décroissant est notamment dû au fait que la maladie est de nature complexe et de définition clinique hétérogène, ce qui rend notamment difficile l'estimation de son diagnostic (3).

2. Critère diagnostique :

Au cours des années, plusieurs critères de diagnostic ont été proposés pour l'HCF (17). De manière classique, le phénotype qui décrit l'HCF comprend une hypercholestérolémie isolée ou une hypertriglycéridémie ou un profil dit « mixte » (hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie). A cela s'ajoute une histoire familiale avec un parent du 1^{er} degré ayant une maladie artérielle prématurée (à l'exclusion des autres causes de dyslipidémies) (18). Récemment, le fait d'avoir des concentrations élevées d'ApoB a été inclus dans les critères diagnostiques (taux >1.2 g/L), car son élévation est très évocatrice de l'HCF en comparaison à l'HF ou l'hypercholestérolémie par augmentation des IDL (de classe III d'après la classification de Frederickson) (19).

De par sa nature oligogénique, les tests génétiques de l'HCF ne sont pas encore utilisés en diagnostic (20) (21) (22). En effet la variabilité clinique inter/intra-patients et le caractère multifactoriel de la pathologie rendent difficile le diagnostic génétique : il semblerait que la variation d'un gène à elle seule ne peut pas, a priori être responsable du phénotype d'un patient HCF. De plus les critères diagnostiques ne sont pas homogènes (23) (24) (25). Le diagnostic est donc établi à l'aide des antécédents personnels et familiaux et de l'évolution clinique du patient (20) (26).

3. Physiopathologie de l'HCF

3.1. Lipogenèse, β oxydation et tissus adipocytaires

Un déséquilibre entre la lipogenèse et la β oxydation est rencontré chez des patients souffrant d'HCF, ce qui engendre une accumulation de graisse hépatique et une surproduction de VLDL chez ces derniers (27).

Le dysfonctionnement du tissu adipeux est quant à lui lié à une surproduction d'AG, ce dysfonctionnement mène de surcroît à une augmentation de la synthèse des lipoprotéines (28) (22).

3.2. Altérations de la sécrétion et de la dégradation de lipoprotéines

Une synthèse normale ou élevée d'ApoB est souvent observée chez les patients atteints d'HCF (29) (30). Des altérations de la dégradation de lipoprotéines contenant de l'ApoB ont également été observés chez ces derniers (3). Ces altérations peuvent être dues à une résistance à l'insuline, à un défaut de clairance de l'ApoB ou à une augmentation de la régulation négative des LDLR, qui participeraient ainsi à ces taux élevés d'ApoB (21) (28) (31).

Concernant les ApoC, il a été montré qu'une augmentation des taux de production d'apoC-II et C-III retrouvée chez certains patients HCF a une influence sur la cinétique et la concentration des lipoprotéines riches en TG, incluant VLDL1 et 2 (32).

4. Comorbidités métaboliques dans l'HCF

L'HCF est souvent associée à de nombreuses maladies métaboliques comme le diabète de type 2, la stéatose hépatique et le syndrome métabolique (3).

Le syndrome métabolique est un trouble recoupant de nombreuses anomalies telles que l'obésité abdominale, l'hypertension, la dyslipidémie et l'hyperglycémie (33).

5. Conséquences cliniques

L'HCF est liée à un risque accru de maladies cardiovasculaires, les patients sont d'avantages exposés aux maladies coronaires comme l'infarctus du myocarde (IDM) (22) (34).

L'HCF est responsable de l'accroissement de l'athérosclérose coronaire. L'athérosclérose contribue à plus de 20% des accidents cardiovasculaires chez les hommes de moins de 60 ans (23) (35).

Des patients connus atteints d'HCF, et leurs familles au profil lipidique normal (dont leurs conjoints), ont été inclus dans une cohorte de 1998 à 2005 (596 personnes) et ont été convoqués pour un suivi clinique avec pour objectif de déterminer leurs surrisques d'incidence de maladies cardiovasculaires (coronaropathies, AVC ischémique, maladies périphériques des artères nécessitant un traitement invasif) en termes d'incidence.

Concernant les résultats, l'incidence cumulée des maladies cardiovasculaires était significativement plus élevée chez les patients HCF par rapport aux conjoints (23.6% versus 4.7%) (36).

En conclusion, le risque d'apparition de maladies cardiovasculaires est significativement plus élevé chez les patients HCF malgré la prise de mesures préventives (figure 2). Ces résultats suggèrent donc l'utilisation d'un traitement plus agressif afin d'éviter les risques de maladies cardiovasculaire chez les patients HCF (36). Étant donné la gravité de leur maladie, ces derniers nécessitent donc une prise en charge globale : il serait donc intéressant de reconnaître le phénotype HCF via séquençage génétique pour une prise en charge optimale.

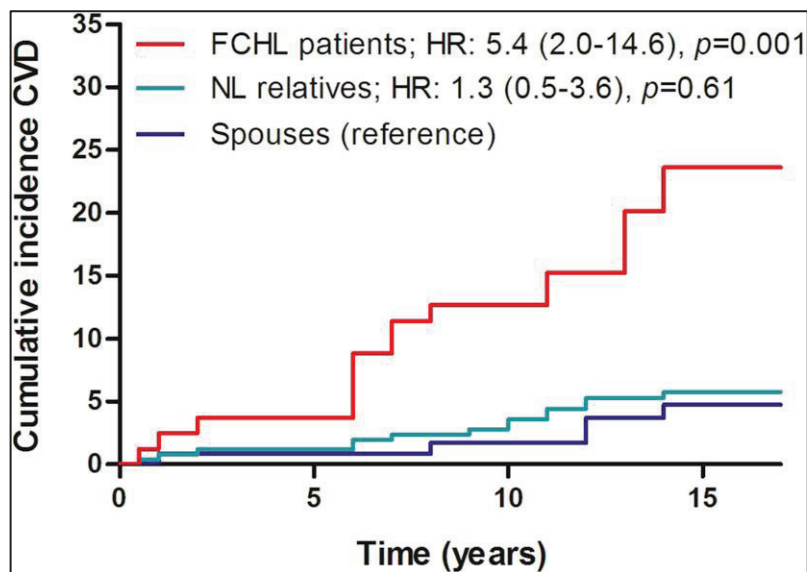


Figure 2 : Incidence des maladies cardiovasculaire chez des patients atteint d'HCF, des profils normaux et leurs conjoints (36).

6. Caractérisation génétique :

6.1. Introduction

De manière générale la caractérisation génétique de l'HCF est définie comme un trouble lipidique oligogénique de caractère assez variable (20) (21). De récentes études ont pu cependant identifier certains variants génétiques redondants chez les patients atteints d'HCF.

6.2. Gènes impliqués dans HCF

Des études récentes décrivent de nombreuses altérations génétiques sur plusieurs gènes qui contribueraient à l'induction des phénotypes des malades HCF.

Ces altérations génétiques présentent des ségrégations indépendantes sur les différents chromosomes, qui impactent les degrés d'expression dans les membres de la famille atteints, d'où l'expression hétérogène des signes cliniques même avec des liens de parentés : les symptômes varient d'un membre à l'autre dans une famille atteinte d'HCF.

Grâce à plusieurs études familiales, Brahm et al. (20) ont pu établir une liste d'environ 40 gènes et locus reliés à l'HCF (tableau 2).

Un locus particulier a été décrit chez des individus atteints d'HCF de populations ethniques différentes. Ce locus a été cartographié sur le chromosome 1q21-23 (37). Ces régions incluent plusieurs gènes qui contribueraient au phénotype HCF, incluant notamment un gène codant pour le facteur de transcription *USF1* (*upstream transcription factor 1 gene*) (20).

Locus Chromosome	Gène	Nom	Identifié par	Fonction de la protéine
1p31	<i>ANGPTL3</i>	Angiopoietin-like 3	GWAS targeted sequencing	Exprimé dans le foie ; Partie N-terminal impliqué dans le métabolisme des lipoprotéines ; gène causal dans les HCF
1p32 7	<i>PCSK9</i>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	Linkage ; GWAS	Lie et favorise la dégradation lysosomal de LDLR ; gène causal dans l'hypercholestérolémie
1p36	<i>TNFRSF1B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	Linkage ; GWAS	Protecteur contre le stress oxydatif en stimulant les voies anti oxydative ; impliqué dans l'ischémie-induit dans la néovascularisation
1q21-q23	<i>USF1</i>	Upstream transcription factor	Linkage	Facteur de transcription pour plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines
	<i>CRABP2</i>	Cellular retinoic acid-binding protein 2	Linkage	Facilite-la liaison/signalisation de l'acide rétinoïque
1q22-q23	<i>RXRG</i>	Retinoid X receptor γ	Linkage	Enhanceur de la fonction liaison/transcription de l'ADN de l'acide rétinoïque ; peut être impliqué dans l'expression de LPL
	<i>ATF6</i>	Activating transcription factor 6	Linkage	Facteur de transcription répondant au stress du réticulum endoplasmique ; associé aux niveaux de cholestérol sanguin
1q31	<i>LEPR</i>	Leptin receptor	GWAS	Régulation du métabolisme des graisse via interaction avec la leptine
1q41-q42	<i>GALNT2</i>	UDP-N-acetyl-a-Dgalactosamine: Polypeptide Nacetylgalactosaminyl transferase 2	GWAS	Impliqué dans la biosynthèse d'oligosaccharides de plusieurs molécules comme apoC-III, récepteurs aux VLDL et LDL

2p23	<i>GCKR</i>	Glucokinase regulator Linkage	GWAS	Inhibe la glucokinase dans le foie et les ilots cellulaires pancréatiques
2p23-p24 [14]	<i>APOB</i>	Apo B	GWAS; targeted sequencing	Protéine principale des CM, VLDL, LDL, deux isoformes d'ApoB-48 et ApoB-100 ; gène causal dans le variant défectueux ApoB de l'HF
3p22	<i>OSBPL10</i>	Oxysterol binding protein-like 10	NR	Récepteur de lipide intracellulaire ; peut être impliqué dans la lipogenèse hépatique et la production de VLDL
3p25 [15]	<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Linkage	Récepteur nucléaire et facteur de transcription ; régule la différenciation adipocytaire et l'homéostasie du glucose ; gène causal pour la lipodystrophie familiale partielle de type 3
4p16	<i>ADD1</i>	Adducin 1	Linkage	Protéine du cytosquelette, expression ubiquitine
4q22	<i>KLHL8</i>	Kelch-like family member 8	GWAS]; targeted sequencing	Non connu
4q26	<i>FABP2</i>	Fatty acid binding protein 2	GWAS	Impliqué dans l'absorption, le métabolisme et le transport des AG à longue chaîne
5q33	<i>TIMD4</i>	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4	GWAS ; targeted sequencing	Non connu
7q21	<i>PON1</i>	Paraoxonase 1	NR	Médiation de la protection enzymatique des LDL contre le stress oxydatif
8p21.3	<i>LPL</i>	Lipoprotein lipase	Linkage; GWAS; targeted sequencing	Hydrolyse les triglycérides du chylomicron et du VLDL et dirige l'absorption dans les tissus adipeux, cardiaque et musculaire
8q24	<i>TRIB1</i>	Tribbles pseudokinase 1	GWAS; targeted sequencing	Module la production de lipoprotéines hépatiques

10q21	<i>PCDH15</i>	Protocadherin-related 15	Association	Protéine d'adhésion cellulaire dépendante du calcium dans le foie et le pancréas ; essentiel pour la fonction rétinienne et cochléaire
10q25	<i>TCF7L2</i>	Transcription factor 7-like 2	Association	Rôle dans la signalisation Wnt (famille de glycoprotéines), impliqué dans l'homéostasie glycémique
11p15	<i>PNPLA2</i>	Patatin-like phospholipase domain containing 2	Linkage	Catalyse la première étape de l'hydrolyse des triglycérides dans le tissu adipeux ; associé à l'hépatostéatose
11q12-q13	<i>FADS1-2-3</i>	Fatty acid desaturases 1,2 and 3	Linkage; GWAS	Régule la désaturation des acides gras ; peut-être régulé par USF1
11q23-24	<i>APOA1-C3-A4-A5 gene cluster</i>	ApoA-1, apoC-III, apoA-IV; apoAV	Linkage; GWAS	Apo-A1 : composant HDL majeur ; favorise l'efflux de cholestérol vers le foie pour l'excrétion ; cofacteur pour LCAT ; ApoC-III : composant de VLDL, inhibe la LPL et HL ; peut ralentir le catabolisme des triglycérides les lipoprotéines ; apoA-IV: rôle principal dans la formation de chylomicrons intestin; Activateur LCAT; apoA-V: régule les niveaux de triglycérides plasmatiques comme enhanceur de LPL
12p13	<i>APOBEC1</i>	ApoB mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1	Candidate gene	Impliqué dans le traitement de l'ARNm d'ApoB dans l'intestin grêle
15q21-23	<i>LIPC</i>	Hepatic lipase	Linkage; GWAS	Hydrolyse les triglycérides et peut relier les récepteurs d'absorption des lipoprotéines ; gène causal dans le déficit hépatique en lipase
16q13	<i>CETP</i>	Cholesteryl ester transfer protein	Linkage; GWAS	Transfère les lipides entre HDL et d'autres lipoprotéines ; gène causal dans le déficit en protéine de transfert d'ester de cholestérol

16q22	<i>LCAT</i>	Lecithin-cholesterol acyltransferase	Linkage; GWAS	Estérifie le cholestérol pour le transport inverse du cholestérol ; gène causal dans le déficit en lécithine-cholestérol acyltransférase
16q23-24	<i>WWOX</i>	WW domain containing oxidoreductase	Linkage	Rôle dans l'induction de l'apoptose
16q24	<i>FOXC2</i>	Forkhead box C2	Linkage	Facteur de transcription pouvant jouer un rôle dans le tissu mésenchymateux
19p13	<i>CILP2</i>	Cartilage intermediate layer protein 2	GWAS targeted sequencing	Non connu
19p13	<i>LDLR</i>	LDL receptor	GWAS ; targeted sequencing	Se lie aux LDL et les transporte dans les cellules par endocytose ; principalement exprimé sur les hépatocytes ; gène causal de l'hypercholestérolémie familiale
19q13	<i>APOE</i>	Apo E	GWAS ; linkage	Apolipoprotéine majeure dans plusieurs classes de lipoprotéines ; ligand pour LDL ApoB / E récepteur ; impliqué dans les remnants
19p13	<i>CERS4</i>	Ceramide synthase 4 Linkage	GWAS	Impliqué dans la synthèse des céramides ; régulé par la leptine
20q13	<i>HNF4</i>	Hepatocyte nuclear factor 4a	Linkage; GWAS	Facteur de transcription régulant les taux sériques de lipide et de glucose ; Gène responsable du diabète de type 1
22q13	<i>PPARA</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor a	GWAS	Facteur de transcription nucléaire impliqué dans le cholestérol et les lipides métabolisme

Tableau 2 : Gènes sélectionnés comme étant liés et/ou associés à l'HCF d'après

Brahm AJ et Al. (20)

6.3. Précisions concernant certains gènes d'intérêts de l'HCF

6.3.1. *LDLR, PCSK9, APOB & APOE*

Les gènes *LDLR*, *PCSK9*, *APOB* et *APOE* sont causals d'HF et sont pourtant retrouvés dans le tableau 2 décrivant les gènes impliqués dans l'HCF. En effet des variants *LDLR* et *PCSK9* ont été associés à des concentrations élevées de LDLc dans l'HCF (20).

Minicocci et al ont montré que plus de 5% de patients initialement identifiés comme atteints d'HCF présentaient une variation délétère sur le gène *LDLR* et ont été reclassés à posteriori comme patients atteints d'HF (38). L'élévation de la concentration en TG a été considérée comme liée à l'association d'autres variants génétiques et/ou environnementaux (20) (38).

La frontière entre HCF et HF peut donc paraître mince, expliquant ainsi la difficulté du diagnostic.

6.3.2. *ANGPTL3*

Une étude du génome a démontré un lien étroit entre le gène codant pour l'angiopoïétin-like protein 3 (*ANGPTL3*) et les concentrations de TG chez certains patients HCF (39). *ANGPTL3* est une protéine qui affecte les concentrations de TG dans le sang en inhibant l'activité catalytique de la LPL. Des études chez des modèles animaux et humains ont montré que l'inactivation d'*ANGPTL3* faisait baisser les taux de TG, d'HDLc et de LDLc, et ainsi pourrait diminuer les risques d'athérosclérose dans les maladies cardiovasculaires (40). Cependant le rôle potentiellement protecteur de l'inactivation d'*ANGPTL3* chez les patients HCF n'a pas été déterminé (3,38). Il serait intéressant de connaître l'effet d'un gain de fonction d'*ANGPTL3* qui au contraire pourrait potentiellement faire augmenter les taux de TG.

6.3.3. Le facteur de transcription *USF1*

USF1 code un facteur de transcription qui régule plus de 40 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, des lipoprotéines, mais aussi de la réponse immunitaire. Il est localisé à plus de 1.5Mb de *TXNIP*, un gène lié à l'hyperlipidémie mixte chez la souris (22) (24). *USF1* code un facteur de transcription basique hélice-boucle-hélice leucine zipper 3 qui lie une séquence palindromique E-box (Enhanceur box).

USF1 a été décrit en premier par Sawadogo et Al. comme un point majeur dans la réplication des adénovirus (42). Son rôle dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose n'a été reporté que plus tardivement. *USF1* a été décrit comme régulateur de l'expression de la L-pyruvate kinase, de la synthèse d'AG, de la glucokinase mais aussi de l'apoA-V, apoC-III, apoA-II, apoE ainsi que d'autres enzymes impliquées dans les lipides (43) (44).

Une comparaison de l'expression d'*USF1* dans les muscles et les tissus adipeux a mis en évidence 13 gènes régulés par *USF1* : *FASN*, *FABP2*, *FOLH1*, *MADD*, *NR1H3*, *CETP*, *LCAT*, *APOE* et *PLTP* (45). Pajukanta et Al. caractérisent donc *USF1* comme un trait génétique majeur responsable d'HCF, qui sera démontré plus tard par Huertas-Vázquez dans une population mexicaine (24) (46). En effet, un haplotype pour *USF1* associé à la susceptibilité de développer de l'HCF et l'hypertriglycémie familiale a été identifié dans des familles mexicaines, avec cependant une association plus forte pour l'HCF (24) (46).

Le rôle d'*USF1* dans la pathogénicité des HCF n'a cependant pas encore été complètement élucidé. L'inactivation d'*USF1* chez les souris mène à une certaine protection face aux dyslipidémies induites diététiquement, à l'obésité, à la stéatose hépatique et à l'athérosclérose.

Le mécanisme proposé est lié à une augmentation des TG absorbés par le tissu adipeux brun via un mécanisme LPL dépendant, qui induit une réponse adrénergique et de la thermogénèse (43).

Ces observations suggèrent donc le rôle d'*USF1* dans la physiopathologie de l'HCF, cependant l'identification précise des mécanismes nécessite d'autres études chez l'homme atteint d'HCF.

6.4. *CREB3L3*

La famille de facteurs de transcription CREB3 (comprenant CREB3, CREB3L1 à L4) régule l'expression d'une large variété de gènes jouant un rôle dans le métabolisme des lipides, la différenciation, l'auto-régulation d'organites ou encore la sécrétion de protéines (47). Ce gène n'est pas répertorié dans le tableau 2 répertoriant les gènes décrits comme intervenant dans l'HCF, *CREB3L3* est cependant décrit chez l'homme comme intervenant dans le métabolisme des TG d'après plusieurs études (48) (49).

CREB3L3 (aussi appelé CREB-H) a été décrit à l'origine en tant que facteur de transcription exprimé de manière spécifique dans le foie (50). Les rôles de *CREB3L3* incluent le métabolisme des TG dans le foie, la réduction de l'absorption du cholestérol et le métabolisme du glucose et des lipides (51) (52) (53) (54). L'expression de *CREB3L3* est régulée par un certain nombre de récepteurs nucléaires, comprenant PPAR α (55), HNF4 α (56), le récepteur aux glucocorticoïdes (57) et ERR γ (58).

Dans une étude de Ruppert et al. (59), une analyse de l'expression génomique d'échantillons de foie de souris *CREB3L3* *-/-* ayant été soumis à un régime cétogène (faible consommation de glucides en faveur d'un apport plus important de lipides) a été réalisée. Cette analyse a souligné la pertinence de *CREB3L3* dans la régulation du métabolisme des apolipoprotéines. En effet les souris avec knock-out hépatique *CREB3L3* ont présenté une hyperlipidémie due à une augmentation des niveaux d'expression de gènes liés à la synthèse du cholestérol en comparaison aux souris témoins (59) (60).

L'importance de *CREB3L3* dans la régulation du métabolisme des apolipoprotéines et du PPAR α en tant que régulateur principal du métabolisme intracellulaire des lipides a également été mise en évidence chez la souris. Un petit nombre de gènes, dont *Fgf21* et *Mfsd2a*, étaient sous le double contrôle de PPAR α et *CREB3L3* (61) (62).

En conclusion ces données indiquent que l'inactivation de CREB3L3 (*CREB3L3*^{-/-}) chez la souris dissocie les effets métaboliques hépato prolifératifs et lipidiques du PPAR α . Globalement, à l'exception de la régulation partagée d'un nombre très limité de gènes, les rôles de PPAR α et CREB3L3 dans le métabolisme des lipides hépatiques sont clairement distincts et dépendent fortement du statut alimentaire.

Chez l'homme après revue de la littérature scientifique, plusieurs études se sont intéressées à la corrélation entre des patients présentant des hypertriglycémies sévères et des variants rares hétérozygotes responsables de pertes de fonctions. Il est intéressant de noter que ces articles relient des pertes de fonction *CREB3L3* et l'hypertriglycémie (avec au moins un épisode sévère) (48) (49) (63) (64) (65).

III. Le séquençage de l'ADN

Le diagnostic génétique des maladies héréditaires occupe actuellement une place prépondérante en matière de conseil génétique. Dans le cadre des dyslipidémies, en plus des examens cliniques et des analyses biologiques de routine (bilan lipidique) le praticien pourra aussi avoir recours à des explorations génétiques. Ces dernières visent à rechercher des anomalies pathogènes sur des gènes candidats, en comparant la séquence nucléotidique du patient à une séquence de référence.

1. Les différents types de mutations

De manière générale on distingue 3 grandes classes de mutations : les substitutions nucléotidiques, les insertions/délétions de quelques nucléotides (figure 3) (66).

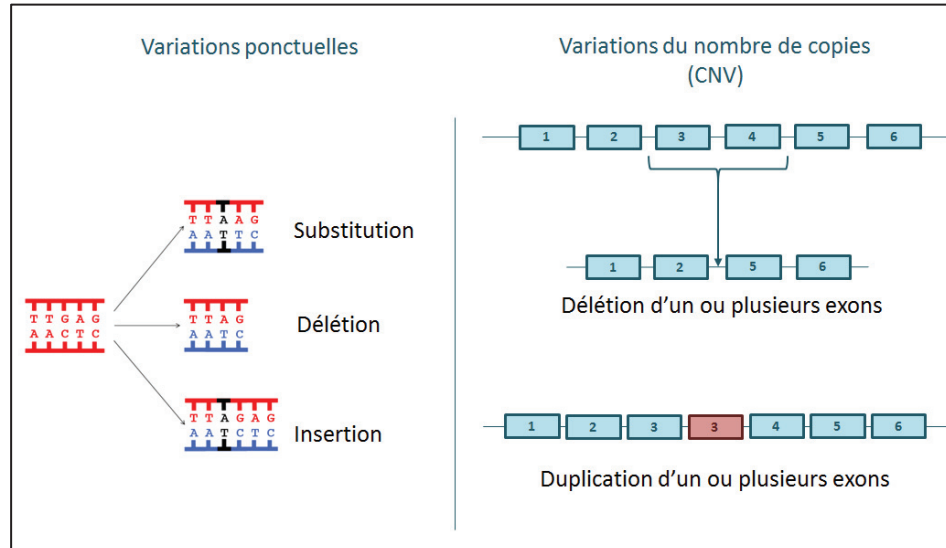


Figure 3 : Les différents types de variations de l'ADN

Les substitutions nucléotidiques représentent environ 70 % des variations : on distingue les transitions où l'on observe le remplacement d'une base pyrimidique ou purique par une autre base de même nature et les transversions qui sont le remplacement d'une base purique par une base pyrimidique, ou inversement.

Les substitutions nucléotidiques peuvent être induites par l'environnement parfois mutagène (rayonnements et radiations, substances chimiques, ...), par le métabolisme endogène, mais peut également être la conséquence d'erreurs dites « *de novo* » qui apparaissent spontanément lors de la réplication de l'ADN, qui sont non détectées et corrigées par les systèmes de réparation de l'ADN.

Les délétions ou les insertions d'un ou plusieurs nucléotides représentent environ 25 % des anomalies répertoriées dans la base de données HGMD (67). Des délétions ou insertions n'étant pas multiples de trois bases entraînent au niveau des séquences codantes un décalage du cadre de lecture (*frame shift*) qui peut aboutir à l'apparition d'un codon Stop qui est dit prématuré engendrant éventuellement une protéine tronquée, la plupart du temps non fonctionnelle ou instable avec une dégradation prématurée.

Dans un cas de figure de délétions ou insertions de trois bases ou d'un multiple de trois bases, la protéine codée présentera une délétion ou une insertion d'un ou plusieurs acides aminés avec un cadre de lecture conservé. La traduction de cette séquence anormale peut aboutir à une protéine non fonctionnelle si la variation est située dans un endroit clef de l'activité protéique (comme le site actif) ou si la variation induit une modification conformationnelle majeure.

2. Techniques de séquençage de l'ADN

2.1. La méthode Sanger

Frederick Sanger, pionnier du séquençage génétique, a mis au point le séquençage direct de l'ADN pour la mise en évidence de variations ponctuelles en 1977 (68). Le principe est basé sur l'interruption de l'élongation du brin d'ADN complémentaire c'est-à-dire un arrêt de la synthèse enzymatique du brin d'ADN.

Il y a une première étape de dénaturation de l'ADN par la chaleur qui entraîne la séparation des deux brins et donc un passage à un ADN monocaténaire. L'amplicon à séquencer est incubé avec une courte amorce oligonucléotidique servant de point de départ pour la synthèse du nouveau brin. On ajoute dans le milieu une ADN polymérase, des désoxynucléotides classiques (dNTP) et des didésoxynucléotides (ddNTP) en concentration plus faible (figure 4) qui vont permettre l'étape de polymérisation qui correspond au clonage partiel du brin d'ADN après l'ajout d'une amorce. L'incorporation des ddNTP dans le brin en cours de synthèse sera responsable d'un arrêt de l'élongation due à l'absence de groupement OH en 3' du désoxyribose (69).

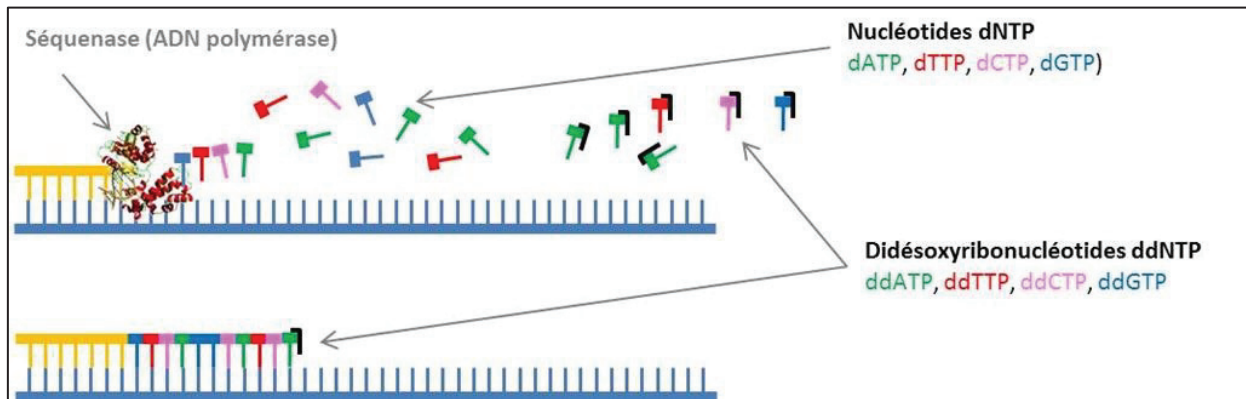


Figure 4 : Méthode Sanger, les dNTP et ddNTP. (70)

Ainsi, la longueur des fragments obtenus sera fonction du point d'insertion du ddNTP et la séparation de ces fragments par migration dans un gel d'acrylamide par exemple permettra la lecture de la séquence du gène.

En 1986, une évolution de la méthode Sanger est mise au point (71). Les ddNTP incorporés sont marqués par un fluorophore spécifique. Ainsi nous avons différents fragments d'ADN qui portent en 3' ce fluorophore, dont la longueur d'onde d'émission est spécifique du ddNTP incorporé. Cette évolution a permis l'automatisation du séquençage par séparation des fragments par électrophorèse capillaire. On obtient alors un fluorogramme qui peut être aligné contre la séquence de référence via un logiciel d'alignement pour permettre la mise en évidence des variants.

Cette technique est toujours considérée comme une technique de référence pour la détection de variations dites ponctuelles. Cependant cette technique est uniquement qualitative : le produit de PCR n'est pas quantifié, on ne peut donc pas savoir si les deux allèles ont été amplifiés. Des faux négatifs peuvent être détectés soit en cas de délétion hétérozygote avec un des deux sites de fixation des amorces ou lors de variations dites ponctuelles qui empêchent la fixation d'au moins une des deux amorces.

2.2. Le séquençage haut débit

En 2006, le monde scientifique a vu l'émergence de nouvelles techniques de séquençage dites « haut débit » ou encore « nouvelle génération » avec l'acronyme NGS (figure 5). Cette technique permet de séquencer un grand nombre de gènes en même temps de manière très rapide. Ces progrès sont les résultats du développement d'algorithmes bio-informatiques et du développement de techniques d'amplifications clonales (72) (73).

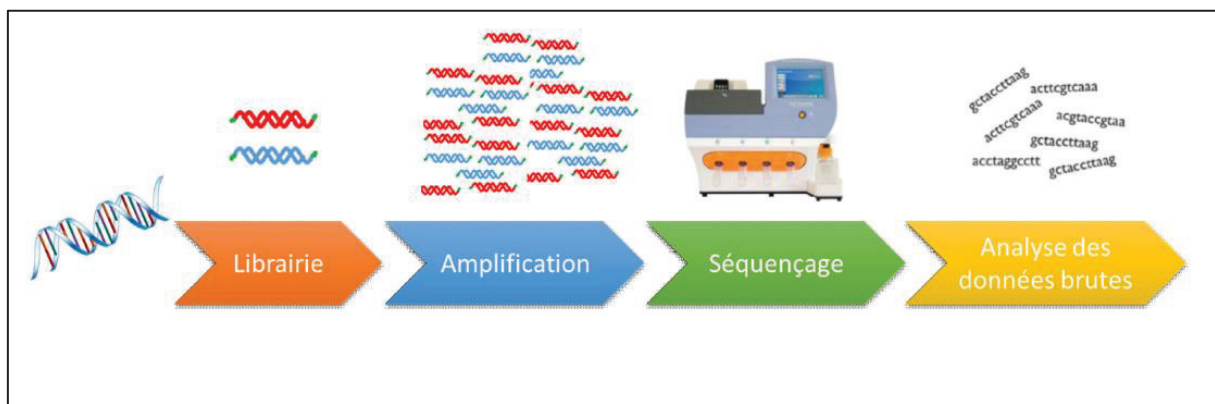


Figure 5 : Schéma général du séquençage haut débit (70)

Lors du séquençage haut débit, une première étape de préparation de fragments d'ADN est nécessaire. Cette préparation mène à ce que nous appelons une « librairie » ou « banque » d'acides nucléiques (ADN ou ADN complémentaire)(71).

Les librairies sont construites par fragmentation des échantillons d'ADN génomique. Ces fragments seront ensuite immobilisés sur un support solide afin de réaliser des millions de séquençages simultanés. Au préalable, ces fragments d'ADN sont ligaturés à leurs extrémités 3' et 5' afin de les identifier via :

- Des adaptateurs, ce sont des oligonucléotides synthétiques de séquence connue mis au bout de ces fragments d'ADN.
- Des « codes-barres » qui sont de courtes séquences d'une vingtaine de paires de base, permettant après l'analyse, de réattribuer l'ADN à un patient donné.

Cette librairie devra subir une étape de purification afin d'éliminer tous les contaminants comme les amorces, nucléotides ou enzymes résiduels (74).

Concernant la démarche générale du séquençage haut débit, on retrouve :

L'amplification clonale : c'est l'amplification des librairies, nécessaire afin qu'elles puissent être détectées par le séquenceur. Un grand nombre de fragments est alors amplifié (75).

Le séquençage : après l'amplification clonale, les fragments vont subir de manière simultanée la réaction de séquençage. Un signal sera détecté par l'appareil et correspondra à la somme des signaux émis par chacun des fragments lors de l'incorporation d'un nucléotide. L'étape de séquençage est ici basée sur des cycles durant lesquels les nucléotides sont ajoutés un à un en alternance avec une étape de lavage. On quantifie ensuite pour chaque position le nombre de lectures pour chaque base (A, C, G, T) (75).

L'analyse bio-informatique : aboutissant à l'alignement des séquences et à la comparaison à une référence afin de mettre en évidence les variations.

Le séquençage haut débit génère une grande quantité de données qu'il faut par la suite traiter. Des outils de bio-informatiques permettant le traitement de ces données se sont donc développés. Le « pipeline » bio-informatique est l'ensemble des étapes qui vont permettre le traitement de ces données dites « brutes » pour arriver à la détection d'altérations génomiques. Le signal issu du séquenceur est aligné sur un génome de référence, une comparaison à celui-ci permet l'identification de variations, ou variants. Ces derniers sont ensuite interprétés et triés.

Le pipeline bio-informatique peut être divisé en quatre étapes principales :

- L'appel des bases ou « base-calling »
- L'alignement au génome de référence

- L'appel ou l'identification des variants par comparaison au génome de référence
- L'annotation des variants et leur filtre

Ces étapes nécessitent des compétences statistiques et informatiques de pointe, et sont généralement réalisées par des organismes dédiés en interne (tel que le Service de Biostatistiques des Hospices Civils de Lyon) ou externes (telle que la société SOPHiA GENETICS™).

2.3. La technologie Illumina

Nous allons nous intéresser à l'amplification sur phase solide utilisée par la technologie Illumina (figure 6), qui est celle utilisée en laboratoire pour le projet IDOL.

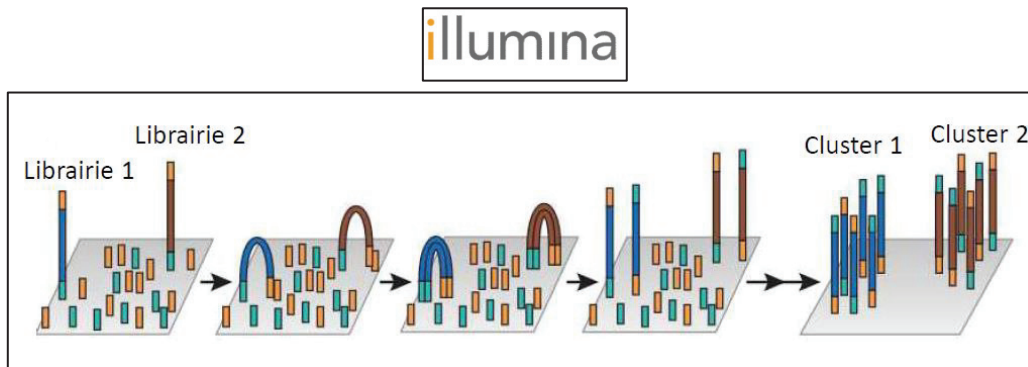


Figure 6 : Amplification sur support solide (70)

Toutes les étapes enzymatiques de la technique prennent place sur un milieu solide que l'on appelle un « flow-cell ». On a premièrement génération d'une banque d'ADN double brin à partir de l'échantillon à analyser par fractionnement aléatoire en séquences de 200 pb. Ensuite sont ajoutés des adaptateurs spécifiques aux extrémités des ADN. Il y a dénaturation de l'ADN double brin en simple brin, puis fixation de l'extrémité des simples brins aléatoirement à la surface du support solide (75).

Vient ensuite l'étape caractéristique de la technologie Illumina, la « bridge » PCR en phase solide. Il y a création d'un double brin, puis ce double brin est dénaturé. Chaque brin fixé forme alors un pont en s'hybridant localement avec l'amorce complémentaire de l'autre extrémité. Le brin complémentaire est synthétisé. L'opération est répétée plusieurs fois pour permettre la formation de "cluster" du même fragment d'ADN. (Figure 7)

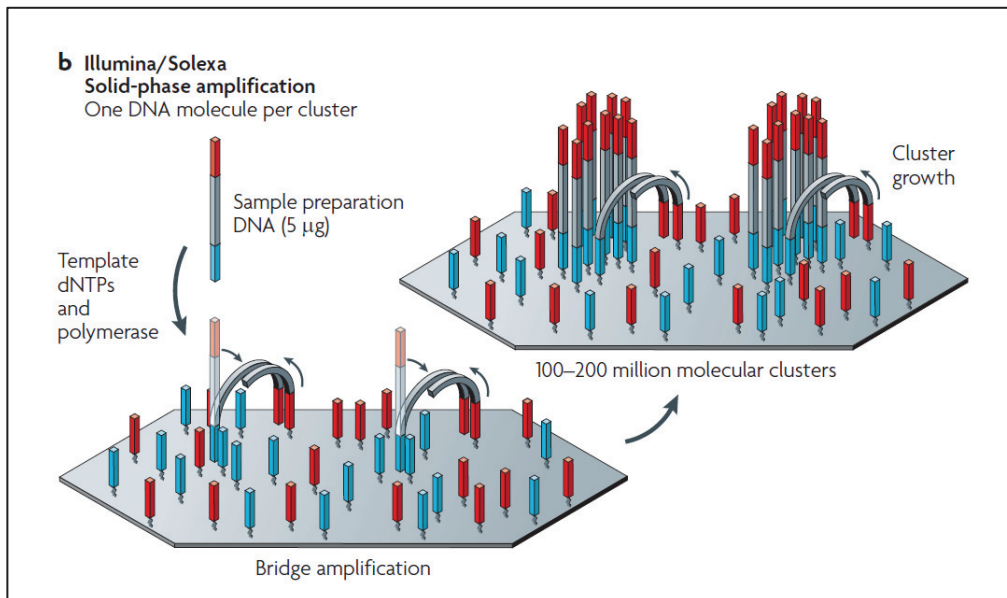


Figure 7 : Principe de la « bridge PCR » appliqué à la technologie Illumina®. D'après Metzker et al. (75)

Le séquençage par terminaison cyclique et réversible repose sur l'utilisation de dNTP modifiés, à la fois par l'ajout d'un fluorophore et par l'ajout d'un groupement chimique qui bloque de manière temporaire l'élongation (3'-O-azidomethyl 2'-deoxynucleoside triphosphates) (76) (77).

De plus, chaque base (A, T, C ou G) se voit attribuer un fluorophore qui lui est propre. Par la suite, chaque nucléotide modifié est incorporé de façon séquentielle et l'ajout des 4 nucléotides correspond à un cycle de séquençage qui dure environ 5 minutes. Après chaque cycle d'incorporation, l'identité de la base insérée est déterminée par excitation du fluorophore par un laser et lecture de la fluorescence 78 émise.

Après lecture, le groupement responsable de la fluorescence et de l'arrêt de l'élongation est hydrolysé par ajout d'un dérivé de la phosphine. Cette étape permet la régénération d'un groupe 3'-hydroxyl permettant la reprise de l'élongation et l'incorporation d'un nouveau nucléotide lors du prochain cycle de séquençage (76).

Le séquençage est réalisé en « *paired-end* » c'est-à-dire qu'un fragment est séquençé dans les deux sens : dans l'un, puis grâce à la réalisation d'un pont comme pour

l'amplification clonale, dans l'autre, soit par pair. La séquence de chacun des fragments est déterminée par la succession des fluorescences obtenues à la suite des différents cycles, les différents « *clusters* » seront repérés par leurs coordonnées géographiques sur la lame de verre.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

1. Introduction

1.1. Contexte

L'utilisation du NGS dans le diagnostic des dyslipidémies monogéniques et polygéniques est une stratégie en plein essor. Pour augmenter le nombre de gènes candidats recherchés, le laboratoire de dyslipidémie de Lyon a développé un diagnostic génétique basé sur la méthode NGS Illumina combinée à un pipeline bio-informatique développée par les Hospices Civils de Lyon (PapILyon), qui permet d'explorer plus 311 gènes. La méthode inclut les gènes impliqués dans toutes les dyslipidémies connues, ceux qui régulent le métabolisme des lipides, ou encore identifiés comme associés à des variations des taux de cholestérol et des TG (4).

Cette technique de NGS a été validée pour le diagnostic des hypercholestérolémies familiales et des hypocholestérolémies (4). Contrairement aux dyslipidémies monogéniques (78) (79), aucune stratégie diagnostique NGS n'a pas encore été décrite pour les patients présentant une HCF. Des efforts sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires de l'HCF, et la stratégie NGS peut nous être utile.

1.2. Objectifs

Comme expliqué dans la première partie, actuellement environ 40 gènes ont été décrits comme associés à l'HCF (24), sans que leur rôle dans cette pathologie ne soit pour autant entièrement compris. De plus, il est également possible que d'autres gènes qui ne sont pas encore identifiés participent à la survenue de l'HCF.

Ainsi, à l'aide d'une approche translationnelle et d'une coopération étroite avec le service clinique d'endocrinologie adulte du Pr Moulin, l'objectif de l'étude a été d'évaluer la stratégie NGS développée au laboratoire dans les HCF. Ceci permettrait d'acquérir de nouvelles connaissances dans la corrélation entre le génotype et le phénotype pour cette pathologie, mais aussi éventuellement d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans cette dyslipidémie (28).

Le nombre de sujets nécessaires à l'étude est d'une quarantaine de patients.

- Premièrement, un recrutement rétrospectif est réalisé : analyse des patients ayant bénéficié d'un séquençage pour HF et dont le diagnostic a été revu à posteriori (évolution du bilan lipidique, histoire familiale).

- Deuxièmement, mise en place d'une phase prospective avec inclusion de patients classés HCF et qui n'auraient pas encore bénéficié de séquençage NGS.

2. Matériels et méthodes

2.1. Inclusion des patients

La collaboration avec le service d'endocrinologie du Pr MOULIN nous a permis d'obtenir un fichier Excel recensant 154 patients étiquetés HCF dans leur dossier clinique Easily. Sur ce document Excel était renseignée la démographie du patient (nom, prénom, sexe). Ce document a servi de base de travail.

2.1.1. Disponibilité bilan lipidique et historique médical

A l'aide du logiciel Glims (MIPS®) qui est un logiciel de traitement d'information médicale, et notamment de bilans biologiques ; les bilans lipidiques les plus récents des patients ont pu être complétés sur le document Excel (date des bilans et concentration en : Cholestérol Total (CT), TG, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol calculé par la formule de Friedewald, LDL-cholestérol mesuré par ultracentrifugation et ApoB).

Ensuite à l'aide des dossiers médicaux, des informations sur les traitements hypolipémiants, le diabète et l'indice de masse corporelle (IMC) des patients ont été complétées.

2.1.2. Application des critères d'inclusion

A l'aide de la fonction filtre du logiciel Excel, les patients correspondant aux critères de l'étude ont été sélectionnés.

Les critères de sélections de l'étude étant (4) :

- **Au moins deux membres de la famille atteint** (ce critère d'inclusion a été validé en amont par le service clinique qui s'assurait qu'au moins deux membres de la famille étaient touchés)

- **TG > 1.5 mmol/L**

- **ApoB > 1.2g/L**

2.1.3. Disponibilité de l'ADN du patient

Les patients, en fonction de leurs historiques médicaux, pouvaient déjà avoir fait l'objet dans le passé d'un séquençage de leurs ADN pour d'autres suspicions de dyslipidémies (exemple : HF).

Ainsi, concernant la disponibilité en ADN des patients inclus, plusieurs cas se présentaient à nous :

- ADN non disponibles (patients n'ayant pas dans le passé bénéficié d'un séquençage ADN)
- ADN disponibles déjà séquencés par technique Illumina (patients ayant dans le passé bénéficié d'un séquençage ADN).
- ADN disponibles mais séquencés par des techniques différentes : Sanger ; Ampliseq (patients ayant dans le passé bénéficié d'un séquençage ADN).

Seuls les patients avec de l'ADN disponible en banque et ayant déjà subi un séquençage par les techniques Illumina ou Sanger ont été inclus. Les patients ayant été analysés par des techniques Sanger seront inclus dans les séries Illumina réalisés par les techniciennes du laboratoire.

2.1.4. Exemple d'inclusion d'un patient

Sexe	Date de naissance	Lieu de Naissance	Date BL	CT (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL calc (mmol/L)	LDL mesuré (mmol/L)	ApoB (g/L)	Traitement	Diabète (1=oui ;0=non)	IMC	ADN dispo	Technique	Série
M	24/06/1972	VALENCE	11/02/2017	9,73	15,1	0,61	2,26	1,76	1,52	NON	1	33,03	6629	illumina CHLS	1BG3SERIE 2017 03
M	17/04/1966	LYON											NON	NON	NON

Figure 8 : Représentation des critères d'éligibilité d'un patient HCF à l'étude

Nous pouvons voir sur cette figure 8, deux patients représentés : le patient 1 surligné en couleur verte et le patient 2 surligné en couleur orange. Le patient 1 a un bilan lipidique disponible et ces valeurs satisfont les critères de l'étude. Il a de plus de l'ADN disponible qui a déjà été séquencé par du NGS : il peut être donc inclus dans l'étude.

Le patient 2 quant à lui n'avait pas de bilan lipidique disponible sur Glims : il sera automatiquement exclu de l'étude.

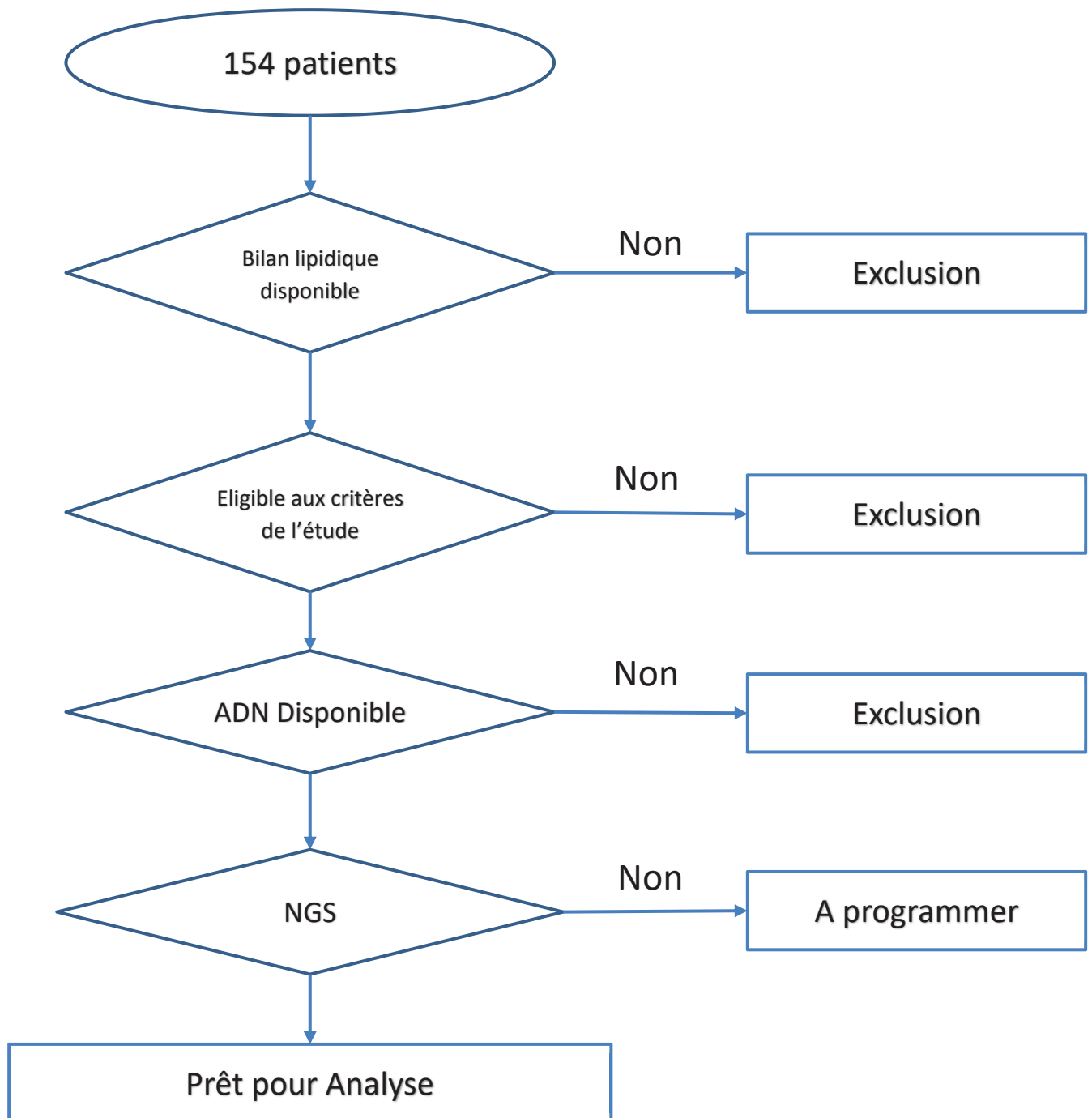


Figure 9 : Logigramme représentant la sélection des patients pour l'étude

2.2. Réalisation NGS Nimblegen-Nextseq500 : Mode Opérateur Analyse Roche Illumina V2.3

Le mode opératoire est celui utilisé au sein du laboratoire de Dyslipidémies du Centre de Biologie et Pathologie Est - Groupement Hospitalier Est- Laboratoire de Biologie médicale multi-site des Hospices Civils de Lyon. Les manipulations ont été effectuées par les techniciennes de laboratoire habilitées (figure 10).

2.2.1. Déroulement de l'activité

Le déroulement de l'analyse se fait en deux temps :

- Il y a préparation, pour chaque patient inclus dans la série, d'une bibliothèque de type SeqCapEZ (Roche, NimbleGen)
- Amplification clonale et Séquençage NGS sur NextSeq500 (Illumina) des bibliothèques préalablement réalisées et validées

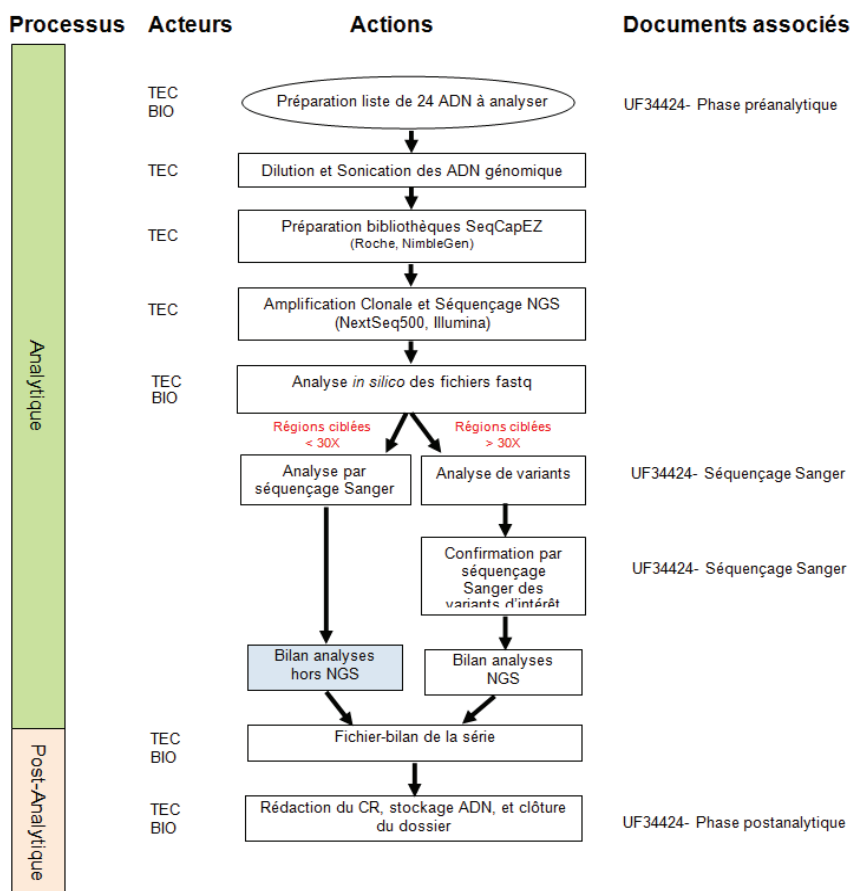


Figure 10 : Déroulement de l'analyse sous forme de logigramme

2.3. Analyse du séquençage par Illumina

Afin de mettre en évidence des variants rares, un certain nombre de procédures a dû être mis en place afin de trier et organiser les informations recueillies (figure 11).

Le traitement des données de séquençage s'effectue grâce à un pipeline bio-informatique développé par la cellule de bio-informatique des HCL.



Figure 11 : Processus général de traitement des informations

La détection de variants se fait sur un fichier VCF. Les variations nucléotidiques détectées par rapport au génome de référence sont indiquées.

2.4. Filtrage des informations

Les variants d'intérêt potentiel ont été sélectionnés sur les critères suivants :

- Une profondeur allélique > 30x
- Une fraction allélique > 0.35
- Une fréquence allélique < 1% d'après la base de données GnomAD
- Pour les variants silencieux et intronique : prédiction *in silico* d'effet d'épissage de 3 dans le logiciel (activation d'un site d'épissage cryptique et/ou une baisse de 10% du score du site d'épissage naturel)

Le tri a été réalisé manuellement à l'aide de la fonction filtre sur les fichiers Excel fournis par la cellule bio-informatique afin de répondre à ces critères.

1^{ère} sélection :

- Dans la colonne « occurrence » → Sélection des occurrences de 1 à 3 : c'est le nombre de fois que la variation a été retrouvée dans la série. Cela permet d'éliminer les erreurs aléatoires de séquençages et les variants fréquents.
- Dans la colonne « Prof_Allele » → Sélection d'une profondeur de l'allèle supérieur à 30 : représente la qualité du séquençage, c'est le nombre de fois que l'on a séquencé la position.
- Dans la colonne « Effets_Ecartes » → Sélection des effets écartés égal à 0 (codage binaire) : permet d'éliminer les variants sans effets comme les variants silencieux.
- Dans la colonne « Variants_Frequents » → Sélection des variants fréquents égal à 0 (codage binaire) : permet de garder uniquement les variants rares.
- Dans la colonne « Mosaïcisme » → Sélection d'un mosaïcisme compris entre 0.4 et 0.6 : C'est le rapport entre les profondeurs alléliques, il permet de repérer les vrais hétérozygotes. Si un éventuel déséquilibre apparaît, le ratio sera modifié et donc éliminé.

- Les « NM number » (exemple : NM_000384) quant à eux correspondent à la nomenclature du transcrit, c'est-à-dire dans quel système est donné la numérotation. Il est donc nécessaire de vérifier que les gènes séquencés par la technique Illumina et leurs « NM number » correspondent.

2.5. Interprétation des variants

Alamut Visual est un logiciel d'exploration des variations génomiques, qui rassemble les informations génétiques et génomiques provenant de différentes sources dans un environnement unique. Ce logiciel permet notamment aux biologistes d'interpréter les variants retrouvés en fonction du contexte clinique du patient.

En renseignant le nom du gène et la nomenclature de la variation sur le logiciel (exemple : gène *MTTP* et variation c.2433G>C), le logiciel Alamut nous renseigne le numéro de l'exon/intron de lieu de la mutation (ici exon 18) ; l'éventuelle conséquence traductionnelle induite par la variation (ici p.Leu811Phe, c'est-à-dire que la variation à engendrer le changement d'une leucine en position 811 par une phénylalanine) ; le numéro « rs » de la variation s'il existe (ici rs1445909) ; la fréquence allélique de cette variation décrite dans les bases de données (ici 0,15%) ; le degré de conservation de l'acide aminé au sein des espèces (ici moyennement conservé sur 12 espèces) ; la distance de Grantham (représente le changement de la distance moléculaire entre l'ancien acide aminé et le nouveau) ; la conséquence qu'engendre ce changement de distance moléculaire (c'est-à-dire si cette variation sera tolérée ou délétère pour la protéine en devenir).

3. Résultats

3.1. Constitution de la cohorte - logigramme

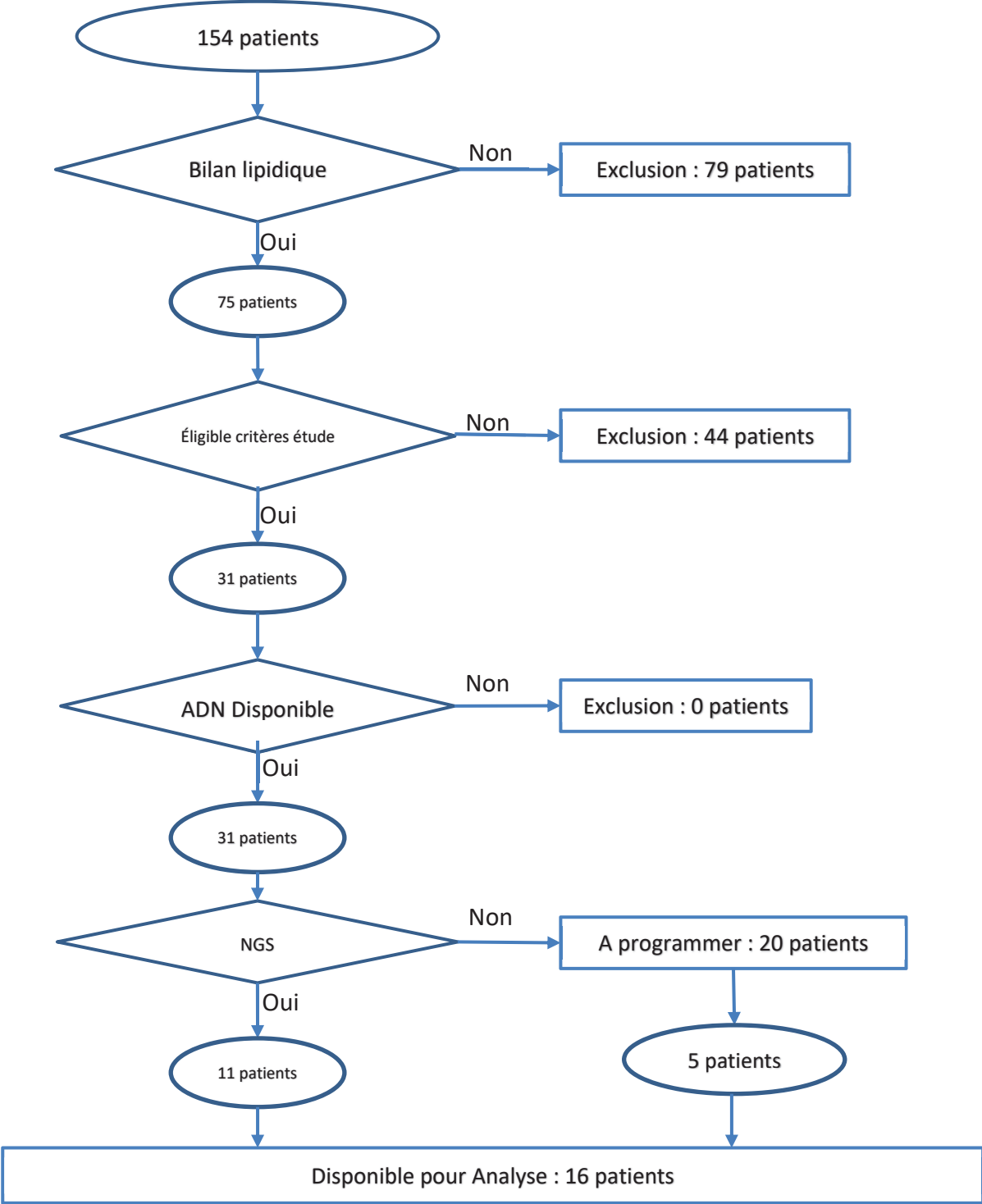


Figure 12 : Constitution de la cohorte – logigramme

Concernant la constitution de la cohorte, 5 patients sur 20 « à programmer » ont pu être intégrés dans les séries Illumina pendant la période de stage 5^{ème} année. Les fréquences de réalisation de séquençage Illumina (1 à 2 séries par mois) n'étant pas hebdomadaire, il a donc fallu intégrer ces patients dans des séries programmées auparavant. C'est donc finalement 16 patients qui étaient disponibles pour analyse.

3.1.1. Chiffres clés de la cohorte

Sur 154 patients :

- 79 avaient des bilans lipidiques non disponibles (exclusion) (48% des patients avaient des bilans lipidiques disponibles)
- 9 avaient des taux de TG < 1.5 mmol/L (exclusion)
- 15 avaient des taux d'ApoB < 1.2 g/L (exclusion)
- 4 avaient des bilans lipidiques disponibles mais des taux d'ApoB non renseignés (exclusion)
- 31 patients étaient éligibles aux 3 critères de notre étude (41% des patients avec un bilan lipidique disponible remplissaient les critères d'inclusion de l'étude)
Parmi les patients avec un bilan lipidique disponible 41% avaient des ADN séquencés par Illumina directement disponible.

3.1.2. Bilans lipidiques des patients sélectionnés

Ici sont représentés les moyennes et écarts-types des bilans biologiques des 16 premiers patients sélectionnés pour le projet IDOL.

Données Bilan Lipidique	Patients IDOL (n=16)
CT (mmol/L)	6.9±1.7
TG (mmol/L)	4.1± 3.9
HDL (mmol/L)	1.1±0.3
LDLc (mmol/L)	3.9±1.5
ApoB (g/L)	1.5 ±0.4

Tableau 3 : Données biologiques des 16 patients IDOL sélectionnés

3.2. Variants identifiés

Après extraction des données informatiques sur fichier Excel, un tri est effectué à l'aide des fonctions filtres du logiciel Excel afin de sélectionner les variants rares.

L'analyse des 16 premiers patients a permis l'identification de 148 variants rares, soit environ 11 variants rares par patients. Ces variants sont localisés sur 109 gènes différents (tableau 4).

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
A1CF	12	c.1216G>A	p.Gly406Ser	rs41274050	0.5300%	Très/12s	56	Deleterious	NA	6
A2ML1	8	c.814C>T	p.Arg272Trp	rs201215628	0.02%	Faible/12s	101	Deleterious	Possibly Damaging	10
ABCA1	43	c.5774G>A	p.Arg1925Gln	rs142688906	0.25%	Très/13s	43	Deleterious	Benign	13
ABCB11	18	c.2093G>A	p.Arg698His	rs138642043	0.37%	Moy/13s	29	Tolerated	Benign	12
ABCB11	21	c.2515A>G	p.Met839Val	rs372757355	0.01%	Moy/13s	21	Tolerated	Benign	15
ABCC8	4	c.524T>A	p.Leu175Gln	NA	0.00043%	Très/12s	113	Tolerated	Probably Damaging	13
ABCG5	3	c.293C>G	p.Ala98Gly	rs145164937	0.22%	Moy/13s	60	Deleterious	Damaging	2
ACOT1	1	c.85G>A	p.Glu29Lys	rs199573594	0.54%	Faible/17s	56	Tolerated	Benign	13
ACOT4	1	c.266C>G	p.Pro89Arg	rs763885582	0.00%	Moy/17s	103	Tolerated	Possibly Damaging	15
ACOT8	5	c.770A>G	p.His257Arg	NA	NA	Très/11s	29	Deleterious	Probably Damaging	1
ACOX1	11	c.1418C>T	p.Thr473Ile	rs200608977	0.0150%	Faible/14s	89	Tolerated	Benign	8
ACSF3	9	c.1406G>A	p.Arg469Gln	rs144681140	0.4500%	Faible/12s	43	Tolerated	Benign	8

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
ACSM5	3	c.370C>T	p.Arg124Trp	rs144548629	0.8100%	Très/12s	101	Deleterious	Probably Damaging	3
ACSM5	9	c.1157A>C	p.Lys386Thr	rs148243446	0.47%	Moy/12s	78	Tolerated	Benign	10
AKT1	3	c.138C>A	p.Asp46Glu	rs146875699	0.0310%	Moy/13s	45	Tolerated	Benign	5
AMPD1	8	c.1029G>T	p.Met343Ile	rs61752478	0.32%	Très/13s	10	Deleterious	NA	10
ANGPTL4	1	c.277C>A	p.Pro93Thr	NA	NA	Faible/13s	38	Tolerated	Benign	8
ANGPTL4	7	c.1081_1084dupGGCC	p.Gln362fs	rs757615320	0.0036%	NA	NA	NA	NA	3
ANXA9	11	c.724G>A	p.Gly242Arg	rs149528939	0.51%	Très/11	125	Deleterious	Probably Damaging	16
ANXA9	11	c.779C>G	p.Ala260Gly	rs762802671	0.00%	Très/11	60	Tolerated	Possibly Damaging	15
APLP2	18	c.2218C>T	p.Arg740Cys	rs1374684943	0.0011%	Très/12 s	180	Deleterious	Probably Damaging	2
APOA4	3	c.481G>T	p.Ala161Ser	rs12721043	0.71%	Moy/11s	99	Tolerated	Probably Damaging	14
APOB	26	c.8462C>T	p.Pro2821Leu	rs72653095	0.3900%	Moy/12s	98	Deleterious	Probably damaging	6
APOB	26	c.6639_6641delTGA	p.Asp2213del	rs541497967	0.5200%	NA	NA	NA	NA	5
APOB	29	c.12614C>T	p.Pro4205Leu	rs375471570	0.01%	Moy/12s	98	Deleterious	Probably Damaging	12
APOB	29	c.12794T>C	p.Val4265Ala	rs61743502	0.51%	Moy/12s	64	Deleterious	Benign	13
APOBEC1	2	c.1A>G	p.Met1?	rs139646668	0.1500%	NA	NA	NA	NA	3

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
<i>APOBEC1</i>	6	c.707G>A	p.Arg236Lys	rs12820011	0.0710%	Moy/11s	26	Deleterious	Probably damaging	3
<i>ARHGAP23</i>	2	c.71T>C	p.Leu24Pro	rs377612823	0.4100%	Faible/12s	98	Tolerated	Possibly Damaging	6
<i>ASAP3</i>	22	c.2150C>A	p.Ala717Asp	rs140136454	0.5000%	Moy/11s	126	Tolerated	Possibly Damaging	8,9
<i>ASAP3</i>	24	c.2636C>A	p.Pro879Gln	rs137927599	0.031%	Très/11 s	45	Deleterious	Benign	2
<i>BLOC1S3</i>	2	c.478G>T	p.Val160Leu	rs201502372	0.1600%	Moy/12s	32	Tolerated	Possibly Damaging	8
<i>CELSR2</i>	1	c.1616G>A	p.Arg539His	rs188263418	0.01%	Très/7s	29	Deleterious	Possibly Damaging	16
<i>CELSR2</i>	2	c.3922G>C	p.Gly1308Arg	NA	NA	Très/7s	125	Deleterious	Possibly Damaging	14
<i>CEP164</i>	16	c.2012C>T	p.Ser671Phe	NA	NA	Moy/10s	155	Deleterious	Probably Damaging	7
<i>CERS4</i>	4	c.269C>T	p.Thr90Met	rs150398356	0.01%	Faible/24s	81	Tolerated	Possibly Damaging	15
<i>CIDEA</i>	6	c.686C>T	p.Thr229Met	rs142408226	0.0460%	Moy/12	81	Deleterious	Probably damaging	5
<i>CILP2</i>	8	c.2067C>G	p.Gly689Gly	rs180948080	0.32%	NA	NA	NA	NA	2
<i>CILP2</i>	8	c.2303C>G	p.Ala768Gly	rs183579609	0.34%	Très/11 s	60	Tolerated	Damaging	2
<i>CILP2</i>	8	c.3202A>G	p.Ser1068Gly	rs147526697	0.23%	Moy/11s	56	Tolerated	Benign	2
<i>CMTM6</i>	1	c.91A>G	p.Met31Val	rs201598355	0.6600%	Faible/12s	21	Tolerated	Benign	7

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
COL4A3BP	16	c.2001T>A	p.Pro667Pro	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5
CREB3L3	4	c.523C>T	p.Arg175*	rs531932249	0.00%	NA	NA	NA	NA	13
CREB3L3	6	c.724C>T	p.Arg242*	rs201933439	0.00%	NA	NA	NA	NA	14
CUBN	24	c.3356T>C	p.Leu1119Ser	rs141164907	0.1200%	Moy/10s	145	Tolerated	Benign	5
CUBN	39	c.5913_5916delTACC	p.Thr1972fs	rs765301342	0.01%	NA	NA	NA	NA	10
CUBN	50	c.7742A>G	p.Asn2581Ser	NA	NA	Très/10	46	Deleterious	Benign	8
CUBN	53	c.8399C>T	p.Thr2800Ile	rs141737312	0.06%	Très/10	89	Deleterious	Possibly Damaging	11
CUBN	59	c.9340G>C	p.Gly3114Arg	rs117035284	0.0045%	Très/10	125	Deleterious	Possibly Damaging	8
CYP27A1	8	c.1471G>T	p.Ala491Ser	rs72551323	0.3600%	Faible/14s	99	Tolerated	Benign	9
CYP39A1	7	c.907A>C	p.Ile303Leu	rs41273656	0.34%	Moy/12s	5	Tolerated	Benign	16
CYP4Z1	9	c.1130C>G	p.Ala377Gly	rs138601503	0.4100%	Faible/11	60	Tolerated	Benign	5, 8
DGATI	7	c.607_609delIATC	p.Ile203del	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4
DGAT2	7	c.855C>A	p.Tyr285*	rs150303834	0.0470%	NA	NA	NA	NA	8
DNAH11	16	c.3045G>T	p.Glu1015Asp	rs72657303	0.3000%	Moy/14s	45	Tolerated	Benign	9
DNAH11	32	c.5519C>T	p.Thr1840Ile	rs374351807	0.0340%	Moy/14	89	Tolerated	Benign	5
DNAH11	55	c.9097A>G	p.Ile3033Val	rs72657373	0.6400%	Moy/14s	29	Tolerated	Benign	8
DNAH11	69	c.11260C>G	p.Gln3754Glu	rs372918576	0.0062%	Moy/14s	29	Tolerated	Benign	1

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
<i>DNAH11</i>	77	c.12632C>T	p.Pro4211Leu	rs142585703	0.1400%	Moy/14s	98	Tolerated	Benign	4
<i>DYNC1L1</i>	4	c.524A>G	p.Lys175Arg	NA	NA	Très/12s	26	Tolerated	Benign	9
<i>EHBP1</i>	14	c.1769A>T	p.Asp590Val	rs77187983	0.44%	Très/12s	152	Deleterious	Probably Damaging	12
<i>EHBP1</i>	14	c.2303A>G	p.Tyr768Cys	rs140508263	0.21%	Moy/12s	194	Tolerated	Benign	16
<i>EHBP1</i>	20	c.3176A>C	p.Glu1059Ala	rs376196443	0.0039%	Très/12s	107	Deleterious	Probably damaging	4
<i>ENPP7</i>	3	c.712C>A	p.Arg238Ser	rs144007702	0.13%	Faible/12s	110	Tolerated	Benign	13
<i>ERGIC3</i>	12	c.958G>A	p.Asp320Asn	rs373409776	0.02%	Moy/12s	23	Deleterious	Benign	14
<i>EVI5</i>	9	c.1193C>T	p.Ala398Val	rs1242849198	0.01%	Très/12s	64	Tolerated	Possibly Damaging	8
<i>EVI5</i>	19	c.2348T>C	p.Val783Ala	rs147173044	0.0730%	Faible/12s	64	Tolerated	Benign	4
<i>EXT2</i>	5	c.728C>G	p.Pro243Arg	rs200032672	0.0041%	Très/11s	103	Tolerated	Possibly Damaging	3
<i>FASN</i>	11	c.1850C>T	p.Pro617Leu	rs45444391	0.09%	Moy/16s	98	Tolerated	Benign	13
<i>FN1</i>	28	c.4486C>T	p.Arg1496Trp	rs139078629	0.48%	Très/12s	101	Deleterious	NA	15
<i>FOXC2</i>	1	c.583C>G	p.Pro195Ala	rs200751941	0.0200%	Moy/12s	27	Tolerated	Benign	4
<i>FOXC2</i>	1	c.1231A>C	p.Thr411Pro	NA	NA	Faible/12s	38	Tolerated	Benign	2
<i>GAS6</i>	5	c.444G>C	p.Trp148Cys	rs559031810	0.0012%	Très/12s	215	Deleterious	Probably damaging	4

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
<i>GAS6</i>	7	c.683C>T	p.Ala228Val	rs145586332	0.4300%	Faible/12s	64	Tolerated	Benign	3
<i>GDE1</i>	2	c.286G>A	p.Val96Met	rs752547994	0.00%	Très/12s	21	Deleterious	Probably Damaging	12
<i>GPD1</i>	3	c.295G>A	p.Gly99Ser	rs756025107	0.0025%	Faible/14s	56	Tolerated	Benign	5
<i>GSK3B</i>	10	c.1121A>G	p.Asn374Ser	NA	0.0011%	Moy/13s	46	Tolerated	Benign	9
<i>HBS1L</i>	14	c.1616A>C	p.Glu539Ala	rs199611639	0.0062%	Moy/13s	107	Tolerated	Probably Damaging	3
<i>HMGCR</i>	10	c.1178G>A	p.Arg393Gln	rs376488768	0.02%	Faible/13s	43	Tolerated	Benign	10
<i>HMGXB4</i>	6	c.864A>T	p.Glu288Asp	rs867517114	NA	Moy/12s	45	Tolerated	Benign	1
<i>HPR</i>	5	c.445A>T	p.Asn149Tyr	NA	NA	Faible/11s	143	Tolerated	Damaging	2
<i>HSPA6</i>	1	c.476C>T	p.Ala159Val	rs41297702	0.01%	Très/12s	64	Deleterious	Probably Damaging	12
<i>HSPA6</i>	1	c.1309C>T	p.Gln437*	rs140320557	0.2200%	NA	NA	NA	NA	6
<i>IGF2R</i>	24	c.3377A>G	p.Asn1126Ser	rs151180572	0.23%	Faible/12s	46	Tolerated	Benign	10
<i>IRF2BP2</i>	2	c.1157G>A	p.Gly386Glu	rs1038849753	NA	NA	NA	Tolerated	Probably Damaging	14
<i>IRS1</i>	1	c.2654T>C	p.Leu885Pro	NA	NA	NA	NA	Tolerated	Benign	11
<i>JMJD1C</i>	26	c.7591G>A	p.Glu2531Lys	rs71508957	0.4100%	Moy/12s	56	Tolerated	Probably Damaging	3
<i>KCNK17</i>	5	c.760G>C	p.Ala254Pro	NA	NA	NA	NA	Tolerated	Probably Damaging	13

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
<i>LDLR</i>	8	c.1069G>A	p.Glu357Lys	rs879254781	NA	Très/11	56	Deleterious	Probably Damaging	8
<i>LIPE</i>	2	c.1106C>T	p.Pro369Leu	rs138539064	0.0560%	Très/12s	98	Deleterious	Probably Damaging	8
<i>LMF1</i>	1	c.176C>T	p.Ala59Val	rs759181295	0.028	Faible/12s	64	Deleterious	Damaging	2
<i>LMF1</i>	9	c.1405G>A	p.Ala469Thr	rs181731943	0.08%	Très/12s	58	Deleterious	Probably Damaging	2
<i>LRP1</i>	14	c.2323G>C	p.Ala775Pro	rs34714459	0.37%	Très/11s	27	Deleterious	Benign	16
<i>LRP1</i>	60	c.9673G>A	p.Val3225Ile	rs775957964	0.0023%	Très/11s	29	Deleterious	Benign	4
<i>LRP1</i>	14	c.13231C>A	p.His4411Asn	rs34714459	0.37%	Très/11s	27	Deleterious	Benign	13
<i>MAMSTR</i>	8	c.729G>T	p.Lys243Asn	NA	NA	NA	NA	Deleterious	Probably Damaging	10
<i>MAP3K1</i>	3	c.710A>G	p.Gln237Arg	rs55694258	0.14%	Moy/12	43	Tolerated	Benign	11
<i>MAP3K4</i>	12	c.3009T>A	p.Asn1003Lys	rs55704622	0.5300%	Faible/12s	94	Tolerated	Benign	6
<i>MET</i>	21	c.4174A>G	p.Asn1392Asp	NA	NA	NA	NA	Tolerated	Benign	16
<i>MLXIPL</i>	6	c.620C>T	p.Ala207Val	rs61746652	0.10%	Faible/14s	64	Tolerated	Benign	1
<i>MPP3</i>	10	c.617C>A	p.Ser206Tyr	rs189143886	0.53%	Très/12s	144	Deleterious	Probably Damaging	12
<i>MSL2</i>	3	c.163A>G	p.Ile55Val	rs149929074	0.0110%	Moy/14s	29	Tolerated	Benign	6
<i>MSL2</i>	3	c.658G>T	p.Val220Leu	rs138484914	0.0040%	Très/14 s	32	Tolerated	Benign	1
<i>MTTP</i>	18	c.2433G>C	p.Leu811Phe	rs144590904	0.1500%	Moy/12s	22	Tolerated	Benign	3

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
MYLIP	6	c.1015G>A	p.Val339Ile	rs142124143	0.12%	Moy/12s	29	Tolerated	Benign	15
NCOA3	20	c.3759_3761dupGCA	p.Gln1254dup	rs761922431	NA	NA	NA	NA	NA	4
NPC1L1	16	c.3368C>G	p.Thr1123Arg	rs145342895	0.0020%	Très/12s	71	Deleterious	Probably damaging	6
NUMB	12	c.1159G>A	p.Val387Ile	rs17182272	0.2200%	Faible/12s	29	Tolerated	Benign	9
NYNRIN	9	c.3277G>A	p.Ala1093Thr	rs777933278	0.01%	Moy/11s	58	Deleterious	Possibly Damaging	10
OSBPL7	7	c.541C>T	p.Arg181Trp	rs35767160	0.3500%	Moy/13s	101	Deleterious	Probably damaging	7
PCDH15	NA	c.490-3C>T	.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10
PCDH15	23	c.3054G>T	p.Val1018Val	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16
PCDH15	33	c.4596C>T	p.Ile1532Ile	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14
PCSK9	1	c.60_65dupGCTGCT	p.Leu21_Leu22dup	rs371488778	0.27%	NA	NA	NA	NA	11
PDIA2	4	c.583C>T	p.Gln195*	rs45619835	0.8600%	NA	NA	NA	NA	8
PDIA2	7	c.946G>T	p.Ala316Ser	rs145351921	0.29%	Faible/12s	99	Tolerated	Benign	10
PDIA2	7	c.1055G>T	p.Gly352Val	rs45503792	0.6900%	Moy/12s	109	Tolerated	Benign	8
PEPD	13	c.1094C>T	p.Pro365Leu	rs200183031	0.05%	Très/11s	98	Deleterious	Probably Damaging	14
PICALM	12	c.1231G>C	p.Ala411Pro	rs34013602	0.1600%	Très/13s	27	Tolerated	Possibly Damaging	9
PINX1	7	c.475G>A	p.Asp159Asn	rs200616748	0.09%	Faible/12s	23	Tolerated	Benign	13

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
<i>PLA2G2A</i>	6	c.428G>A	p.Arg143His	rs34568801	0.4500%	Faible/18s	29	Tolerated	Possibly Damaging	5
<i>PLD1</i>	5	c.494G>A	p.Arg165His	rs148972595	0.25%	Moy/13s	29	Tolerated	Benign	2
<i>PLIN2</i>	3	c.214C>G	p.Leu72Val	rs149124591	0.68%	Très/12s	32	Deleterious	Probably Damaging	14
<i>PLTP</i>	9	c.785G>A	p.Arg262Gln	rs146481282	0.0053%	Très/12s	43	Tolerated	Probably damaging	5
<i>PNPLA2</i>	10	c.1217C>T	p.Pro406Leu	rs370098225	0.0200%	Moy/11s	98	Tolerated	Probably damaging	7
<i>PNPLA3</i>	2	c.415G>A	p.Val139Met	rs139263664	0.00%	Moy/12s	21	Deleterious	Probably Damaging	16
<i>PNPLA3</i>	3	c.484G>A	p.Val162Met	rs141106484	0.2500%	Moy/12s	21	Tolerated	Probably damaging	9
<i>PON1</i>	1	c.55A>G	p.Asn19Asp	rs141948033	0.1600%	Faible/12s	23	Tolerated	Benign	5
<i>PTRF</i>	NA	c.923A>G	p.Tyr308Cys	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5
<i>PXK</i>	16	c.1421A>T	p.Asn474Ile	rs140203295	0.89%	Faiblement conservé/12s	149	Tolerated	NA	1
<i>PYGM</i>	17	c.2009C>T	p.Ala670Val	rs113806080	0.5000%	Très/12s	64	Deleterious	Probably damaging	5
<i>RXRG</i>	5	c.683C>G	p.Thr228Ser	rs199977692	0.0054%	Faible/12s	58	Tolerated	Benign	7
<i>SCAP</i>	13	c.1693A>G	p.Ser565Gly	rs755480676	0.0047%	Faible/12s	56	Tolerated	Benign	6
<i>SDC1</i>	4	c.203C>T	p.Thr68Met	rs141315088	0.51%	Faiblement/10s	81	Tolerated	Benign	2

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
SNX17	13	c.1187A>C	p.Asp396Ala	rs552437005	0.0380%	Moy/12s	126	Tolerated	Possibly Damaging	4
SPINK1	4	c.163C>T	p.Pro55Ser	rs111966833	0.44%	Moy/12s	74	Tolerated	Benign	11
SPTY2D1	3	c.301A>G	p.Ile101Val	rs117446236	0.36%	Faible/12s	29	Tolerated	Benign	11
SREBF1	18	c.3178C>G	p.Pro1060Ala	NA	NA	Moy/12s	27	Tolerated	Possibly Damaging	6
ST3GAL4	4	c.148A>C	p.Lys50Gln	rs150998763	0.0190%	Moy/12s	53	Tolerated	Benign	6
SULF2	5	c.706T>G	p.Ser236Ala	rs115048626	0.0170%	Très/12s	99	Tolerated	Possibly Damaging	3
TNFRSF1B	10	c.1176C>G	p.Asp392Glu	rs781203144	0.0024%	Très/11 s	45	Deleterious	Benign	1
WRN	9	c.1149G>T	p.Leu383Phe	rs4987238	0.20%	Moy/12q	22	Tolerated	Benign	10
WRN	25	c.2983G>A	p.Ala995Thr	rs140768346	0.23%	Faible/12s	58	Tolerated	Benign	10
YJEFN3	7	c.722C>T	p.Ser241Leu	rs200289592	0.0620%	Faible/12s	145	Deleterious	Possibly Damaging	8
ZMPSTE24	2	c.251A>G	p.Tyr84Cys	rs764141945	0.00%	NA	NA	NA	NA	11

Légende code couleur

Gene	Exon/Intron	Systematic name (DNA level)	Trivial name (protein effect)	rs	gnomAD	Residue Conservation	Grantham distance	SIFT	PolyPhen	Numéro patient
		<i>Création d'un Codon stop</i>								
		<i>Frameshift</i>								
		<i>Patients porteurs de 2 variations sur le même gène</i>								
		<i>NA = Non applicable</i>								

Tableau 4 : Mise en évidence des variants des patients

3.3. Étude des variants d'intérêt

3.3.1. Variants identifiés dans les gènes impliqués dans les dyslipidémies monogéniques

Nous allons en premier lieu nous intéresser aux gènes responsables de l'hypertriglycémie qui sont *LPL*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *LMF1* et *APOC2* ; mais aussi de l'HF qui sont : *LDLR*, *PCSK9*, *APOB* et *APOE*.

Concernant les gènes les plus fréquemment responsables d'hypertriglycémie :

- 1 patient porteur de 2 variants hétérozygotes faux sens *LMF1*
- Pas de patients porteurs de variants sur : *LPL* ; *APOA5* ; *GPIHBP1* *APOC2*

Concernant les gènes les plus fréquemment responsables d'hypercholestérolémie :

- 1 patient porteur d'un variant sur le gène *LDLR*
- 1 patients porteurs d'un variant sur le gène *PCSK9*
- 4 patients porteurs d'un variant sur le gène *APOB*
- Pas de patients porteurs de variants sur le gène *APOE*

3.3.2. Variants identifiés entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré

Dans ce type de variation, le cadre de lecture est interrompu par un codon STOP prématuré. L'ARNm résultant est probablement dégradé (nonsense mediated decay) et la protéine résultante est quant à elle très probablement dégradée également.

- 2 variations non-sens (entraînant la formation d'un codon stop par substitution) sur le gène *CREB3L3*
- 2 variations Frameshift (Décalage du cadre de lecture et formation d'un codon stop plus tard) : *ANGPTL4* et *CUBN*
- 3 mutations non-sens sur les gènes *PDIA2*, *HSPA6*, *DGAT2*

3.3.3. Variants identifiés compatible avec transmission récessive

Les variants à transmission autosomique récessive ne sont pathogènes qu'à l'état homozygote, ou en cas d'haploinsuffisance de l'autre allèle (hétérozygotie composite, inactivation de l'autre allèle par modification épigénétique). Ainsi, si 2 variants délétères sont retrouvés sur le même gène, il est nécessaire de savoir s'ils se situent sur le même allèle (en cis) ou non (en trans). Pour cela, il est nécessaire de réaliser une étude de ségrégation familiale afin d'identifier les origines parentales des variants. Si chaque parent est porteur d'une mutation différente, une hétérozygotie composite est le plus probable. Si les 2 mutations sont retrouvées chez le même parent, elles sont probablement en cis chez l'enfant.

- Pas de patients homozygotes
- 1 patient porteur hétérozygote de 2 variants faux sens *APOBEC1*
- 1 patient porteur hétérozygote de 3 variants faux sens *CILP2*
- 1 patient porteur hétérozygote de 2 variants faux sens *CUBN*

- 1 patient porteur hétérozygote de 2 variants faux sens *WRN*
- 1 patient porteur hétérozygote de 2 variants faux sens *EHBP1*

4. Discussion

Grâce à la mise en place du projet IDOL et l'utilisation du panel NGS DysliSEQ, 148 variants rares ont pu être mis en évidence chez 16 patients atteints d'HCF. Concernant l'analyse de ces variants dans un premier temps, un intérêt a été porté aux gènes connus et causals de dyslipidémies. Des variants sur les gènes responsables de d'hypertriglycéridémies mais aussi d'hypercholestérolémies ont été mis en évidence. Au sein du LBMMS des HCL plusieurs variants retrouvés chez les patients du projet IDOL ont déjà été interprétés par les biologistes.

En effet la variation NM_000527.4 (LDLR) : c.1069G>A p.(Glu357Lys) mise en évidence chez un patient du projet IDOL a déjà été décrite chez des patients présentant une HF à plusieurs reprises, cette variation a été mis en évidence chez 11 autres propositus au sein du LBMMS. Ce variant est considéré comme causal d'HF. Cette observation souligne la difficulté du diagnostic : les frontières sur le plan phénotypique sont floues entre l'HF et l'HCF, avec des recouvrements. En effet des patients classés HCF porteurs de variants sur le gène *LDLR* ont été a posteriori reclassés comme patients atteints HF (24) (38). Il a été montré que plus de 25% d'individus atteints d'HF (hétérozygote) peuvent présenter une hyperlipidémie mixte chevauchant le phénotype de patients HCF (80). Cependant pour des concentrations de LDL équivalentes, les risques cardiovasculaires chez le patient HF sont supérieurs aux patients HCF. En effet il faut appliquer une stratégie médicamenteuse hypolipémiante plus agressive chez les patients HF d'où la nécessité d'un bon diagnostic. L'apport de la génétique est donc indispensable.

Le variant NM_000384.2 (APOB) : c.6639_6641del, p.(Asp2213del) a été mis en évidence chez des patients présentant une hypocholestérolémie, une hyperlipidémie mixte et chez des sujets témoins (81) (82). Ce variant a été considérée comme non causale d'hypercholestérolémie par Alves et al. (81). Le variant NM_000384.2 (APOB): c.12794T>C, p.(Val4265Ala) a lui déjà été rapporté dans la littérature chez un patient

présentant une HF (83) (84) sans qu'aucune ségrégation familiale ne soit rapportée. Selon les auteurs, elle est située dans une région de l'ApoB importante pour le repliement de la protéine. Au sein du LBMMS, cette variation a été retrouvée à l'heure actuelle chez 11 patients présentant une hypercholestérolémie (5 sans anomalie causale identifiée, et 6 avec une mutation causale) ainsi que chez un individu qui ne présentait pas d'anomalie du bilan lipidique. Ces deux variants *APOB* ne semblent donc pas être responsable du phénotype lipidique des patients IDOL mais pourraient avoir un rôle modulateur.

Le variant NM_174936.3(PCSK9):c.60_65dup, p.(Leu22_Leu23dup), a lui déjà été décrit dans la littérature chez des patients présentant une hypercholestérolémie ou une hyperlipidémie combinée familiale (85) (86). Cette variation est rapportée dans la base gnomAD à une fréquence de 0.27% toutes populations confondues mais à une fréquence plus importante dans certaines sous populations (ASJ : 0.74%). Une étude de ségrégation sur 3 familles a montré que ce variant était associé à une augmentation modérée du LDLc : LDLc moyen porteurs = 4,06 mmol/L (n=10) versus LDLc moyen des non porteurs = 3,13 mmol/L (n=11) (86). In vitro, une étude par Western Blott a montré que l'addition de deux leucines affectait modérément la maturation de la protéine, mais de façon équivalente à la variation p.Ser127Arg considérée comme hypocholestérolémiante (87). Compte tenu de la fréquence plutôt élevée rapportée dans la base gnomAD (0.27%), ce variant est a priori non causal dans l'HCF mais pourrait jouer le rôle de modulateur du phénotype lipidique du patient IDOL.

Concernant le variant NM_022773.2 (LMF1) : c.1405G>A, p.(Ala469Thr) qui implique le gène *LMF1*: il a été montré dans la littérature que 3 variations non-sens homozygotes pour ce gène ont été reliées à l'hyperchylomicronémie (88) (79). D'autres variants rares sur *LMF1* ont été identifiés dans la littérature comme associés à des hypertriglycéridémies modérées à sévères mais cette association et les fonctionnalités associées ne sont pas clairement définies (89). Le variant NM_022773.2 (LMF1) : c.1405G>A, p.(Ala469Thr) a été analysé au sein du groupement Sud des HCL et des

tests de fonctionnalités ont montré que ce dernier n'avait pas d'effets sur la sécrétion de LPL et n'était donc pas à priori causal d'hypertriglycéridémie. Ce variant n'explique donc pas le phénotype lipidique du patient IDOL.

Deux variations non-sens entraînant la formation d'un codon stop ont été mise en évidence sur le gène *CREB3L3* (NM_032607.3(CREB3L3) : c.523C>T, p.(Arg175*) ; NM_032607.3(CREB3L3) : c.724C>T, p.(Arg242*)). Des variations sur le gène *CREB3L3* n'ont pas encore été décrites chez des patients HCF (20) mais seulement chez des patients présentant une hypertriglycéridémie sévère (48) (49) (63) (64) (65). Les patients présentant une hypertriglycéridémie sévère ont 20.2% plus de risque d'être porteur d'un variant perte de fonction *CREB3L3* en comparaison aux patients contrôles normo-triglycéridémiques (90). Après l'étude de plusieurs articles scientifiques, 27 patients porteurs d'un variant *CREB3L3* ont été répertoriés comme présentant des hypertriglycéridémies (avec au moins un épisode sévère) avec des taux de TG variant de 2,92 à 56,3 mmol/L (48) (49) (63) (64) (65). Les variants *CREB3L3* pourraient participer au phénotype des patients IDOL : des études complémentaires sont nécessaires pour préciser le phénotype lipidique associé aux variations *CREB3L3*. Bien que *CREB3L3* soit décrit dans la littérature comme élément causal dans l'hypertriglycéridémie sévère (90), on ne retrouve pas ce dernier dans le tableau 2 répertoriant les gènes décrits comme impliqués comme l'HCF (20). *CREB3L3* est donc un gène candidat prometteur qui a attiré l'attention et a été évoqué en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) au sein des HCL. L'inclusion d'autres patients permettra donc des interprétations plus poussées.

Concernant la variation NM_139314.3 (*ANGPTL4*) : c.1081_1084dupGGCC, p.(Gln362fs) qui implique le gène *ANGPTL4* : il a été montré que ce gène a déjà été décrit comme intervenant dans le métabolisme des lipides et des études chez l'homme ont montré que des variants proches d'*ANGPTL4* étaient associés à des taux sanguins de TG décroissants et des niveaux élevés d'HDL (91). Cette protéine appartient à la même famille de gène qu'*ANGPTL3* et présente des fonctionnalités similaires. Bien

qu'*ANGPTL3* soit décrit comme gène associé dans l'HCF (cf tableau 2 répertoriant les gènes associés à l'HCF), les pertes de fonctions *ANGPTL3* ont également été associées à des hypolipidémies (39) (92). Ainsi le variant NM_139314.3 (*ANGPTL4*) : c.1081_1084dupGGCC, p.(Gln362fs) ne semble donc pas pouvoir expliquer les phénotypes lipidiques des patients IDOL.

Concernant les variations NM_001081.4 (*CUBN*): c.5913_5916delTACC, p.(Thr1972fs); NM_032564.5(*DGAT2*): c.855C>A, p.(Tyr285*); NM_006849.4 (*PDIA2*): c.583C>T, p.(Gln195*); NM_002155.5 (*HSPA6*): c.1309C>T, p.(Gln437*) entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré, les recherches dans la littérature scientifique ont recensé l'association de variants concernant ces gènes à des variations du LDLc au sein d'études GWAS (93) (94) (95) (96). Ces études d'association pangénomique ont eu pour but d'analyser de nombreux variants génétiques chez un large panel d'individus, afin de mettre en corrélation ces variants et des variations du LDLc. Ces études GWAS ne permettent donc pas d'associer ces variants retrouvés chez les patients du projet IDOL à une causalité dans l'HCF car aucun de ces gènes n'a encore été décrit en pathologie.

Concernant les gènes pour lesquels plusieurs variants ont été identifiés chez un même patient (exemple : patient 10 porteur de deux variants sur le gène *WRN* : NM_000553.6 (*WRN*) : c.1149G>T, p.(Leu383Phe) et NM_000553.6 (*WRN*) : c.2983G>A, p.(Ala995Thr) les interprétations restent complexes. En effet ce sont des gènes dont les rôles n'ont pas clairement été établis dans la littérature et ont été décrits chez un seul patient. Afin d'aller plus loin dans l'interprétation de ces variants, des études familiales seraient nécessaires mais ces dernières sont difficiles et coûteuses à mettre en place. Il n'est donc pas possible d'établir un lien entre la survenue de ces variants et la survenue de l'HCF.

Concernant la mise en place d'une étude rétrospective à l'hôpital, plusieurs limites sont ressorties. Mettre en place une étude clinique rétrospective n'est pas sans difficultés. Une fois les patients regroupés comme potentiellement atteints d'HCF, il est nécessaire de récupérer leurs bilans lipidiques sur la base de données des HCL : Glims. Quant à la disponibilité des bilans lipidiques, il est parfois nécessaire d'aller chercher une documentation papier au sein du service de biologie. Ces différents aléas sont souvent retrouvés au sein d'études rétrospectives : un manque de données, l'utilisation d'autres logiciels et des données « papier » engendrant des pertes de temps et du travail supplémentaire. Pour la suite de cette étude les patients seront désormais inclus de manière prospective : uniquement les nouveaux patients déclarés comme atteints d'HCF pourront être inclus.

En conclusion les résultats préliminaires du projet IDOL sont intéressants car déjà 2 variations non-sens sur un gène candidat *CREB3L3* ont été mises en évidence ; ces résultats doivent cependant être interprétés avec parcimonie car le panel de patients n'est pas encore assez représentatif, il est donc nécessaire d'inclure plus de patients afin d'aller plus loin dans leurs interprétations. Les familles de patients devront également être analysées afin de compléter les résultats préliminaires et pouvoir conclure sur de nouvelles avancées.

Concernant les perspectives d'études, les 15 patients en attente de séquençage Illumina ont pu être intégrés au fur et à mesure dans des séries. A cela s'ajoute 15 patients des HCL qui ont pu être intégrés de façon prospective. Une collaboration avec le CHU de Nantes est envisagée afin de pouvoir recruter des patients supplémentaires (5 à 10 personnes). Finalement 50 patients environ devraient être intégrés dans l'étude. La suite de l'étude sera donc importante dans l'avancée de la connaissance de la maladie.

CONCLUSIONS GENERALES *à intégrer dans la thèse

THESE SOUTENUE PAR MR JABER Marwan.

L'Hyperlipidémie Combinée Familiale (HCF), est une dyslipidémie se traduisant par une hypercholestérolémie isolée ou une hypertriglycéridémie ou un profil dit mixte (hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie). L'HCF est une maladie oligogénique et résulte de l'interaction de plusieurs variants génétiques, fréquents ou rares, mais aussi des facteurs environnementaux. Du fait de cette complexité, les tests génétiques de l'HCF ne sont pas utilisés en diagnostic. La variabilité clinique inter/intra-patients et les critères diagnostiques rendent difficile le diagnostic génétique. Dans le cadre de ce travail de thèse, le Projet IDOL a été présenté, il a eu pour finalité le progrès dans le diagnostic des HCF et une amélioration de la compréhension de la composante génétique de la maladie, en mettant en évidence notamment des variants rares de la maladie. Un tri et une organisation des informations recueillis sur plus de 154 patients potentiellement atteints d'HCF ont été réalisés en collaboration avec le service clinique d'endocrinologie afin d'inclure ces derniers dans l'étude selon plusieurs critères. 16 patients HCF ont pu être inclus dans l'étude. Les ADN des patients HCF inclus ont été analysés à l'aide d'un outil d'analyse génétique basé sur la méthode NGS Illumina combinée avec PaPlLyon, qui a permis d'explorer plus de 311 gènes. Cette technique permet d'étudier un panel des gènes impliqués dans les dyslipidémies monogéniques connues, ceux qui régulent le métabolisme des lipides, ou encore ceux associés à des variations au niveau du cholestérol et des TG. Concernant les résultats préliminaires de ce travail de thèse : 148 variants rares ont pu être identifiés sur 16 patients. Parmi ces variants, on retrouve des gènes impliqués dans les dyslipidémies monogéniques mais aussi deux variations « Frameshift » (décalage du cadre de lecture et formation d'un codon stop plus tard), 5 variations non-sens dont 2 sur le gène *CREB3L3* qui intervient notamment dans le métabolisme des triglycérides. Des variations sur le gène *CREB3L3* ont été décrites chez des patients présentant une hypertriglycéridémie sévère. D'après une étude les patients

présentant une hypertriglycéridémie sévère ont 20.2% plus de risque d'être porteur d'un variant perte de fonction CREB3L3 en comparaison aux patients contrôles normo-triglycéridémiques. CREB3L3 est donc un gène candidat prometteur qui pourrait participer au phénotype lipidique des patients du projet IDOL, ces variants ont attiré l'attention et ont été évoqués en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) au sein des HCL. Ce projet est donc très encourageant et l'augmentation future des effectifs pourra permettre de confirmer ou infirmer ces conclusions préliminaires.

Le Président de la thèse,

Nom : 

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 25 mars 2021

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

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



Professeure C. VINCIGUERRA

Bibliographie

1. Organisation Mondiale de la santé. Maladies cardiovasculaires [Internet]. Organisation Mondiale de la santé. Disponible sur: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/fr/
2. Xavier Jeunemaitre. Gènes et pression artérielle. Paris-Centre de recherche Cardiovasculaire (PARCC, Inserm U970), Hôpital européen Georges-Pompidou (HEGP);
3. Bello-Chavolla OY, Kuri-García A, Ríos-Ríos M, Vargas-Vázquez A, Cortés-Arroyo JE, Tapia-González G, et al. FAMILIAL COMBINED HYPERLIPIDEMIA: CURRENT KNOWLEDGE, PERSPECTIVES, AND CONTROVERSIES. *Rev Investig Clin Organo Hosp Enfermedades Nutr.* 2018;70(5):224-36.
4. Marmontel O, Rollat-Farnier PA, Wozny A-S, 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* [Internet]. [cité 15 oct 2020];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cge.13832>
5. Role of the Gut in Lipid Homeostasis | Physiological Reviews [Internet]. [cité 4 févr 2020]. Disponible sur: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00019.2011>
6. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., éditeurs. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cité 3 oct 2019]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
7. Delphine Jacquier FA. Place du foie dans le métabolisme des lipoprotéines. In: *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive.* 2006. p. 185-90.
8. Havel RJ. Triglyceride-rich lipoproteins and plasma lipid transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 2010;30(1):9-19.
9. Perret, Bertrand, Ross Milne, and Xavier Collet. Transport des lipides: Fonction des apolipoprotéines. In: *Annales de l'Institut Pasteur/Actualites.* Elsevier Masson. 2000. p. 3-20. (1; vol. 11).
10. Xiao C, Stahel P, Lewis GF. Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on Post-Assembly Mechanisms. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;7(3):487-501.
11. Wu Z, Wagner MA, Zheng L, Parks JS, Shy JM, Smith JD, et al. The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nat Struct Mol Biol.* sept 2007;14(9):861-8.
12. Stamler J, Daviglius ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term

coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA*. 19 juill 2000;284(3):311-8.

13. Koba S, Hirano T. [Dyslipidemia and atherosclerosis]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med*. janv 2011;69(1):138-43.
14. Tietge UJF. Hyperlipidemia and cardiovascular disease: inflammation, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. févr 2014;25(1):94-5.
15. Jacobson TA, Maki KC, Orringer CE, Jones PH, Kris-Etherton P, Sikand G, et al. National Lipid Association Recommendations for Patient-Centered Management of Dyslipidemia: Part 2. *J Clin Lipidol*. déc 2015;9(6 Suppl):S1-122.e1.
16. Escobedo-de la Peña J, de Jesús-Pérez R, Schargrotsky H, Champagne B. [Prevalence of dyslipidemias in Mexico city and Its relation to other cardiovascular risk factors. Results from the CARMELA study]. *Gac Med Mex*. avr 2014;150(2):128-36.
17. Wierzbicki AS, Graham CA, Young IS, Nicholls DP. Familial combined hyperlipidaemia: under - defined and under - diagnosed? *Curr Vasc Pharmacol*. janv 2008;6(1):13-22.
18. Sniderman AD, Ribalta J, Castro Cabezas M. How should FCHL be defined and how should we think about its metabolic bases? *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. août 2001;11(4):259-73.
19. Relimpio F, Losada F, Pumar A, Mangas MA, Morales F, Astorga R. Relationships of apolipoprotein B(100) with the metabolic syndrome in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. sept 2002;57(3):199-207.
20. Brahm AJ, Hegele RA. Combined hyperlipidemia: familial but not (usually) monogenic. *Curr Opin Lipidol*. avr 2016;27(2):131-40.
21. Ellis KL, Hooper AJ, Burnett JR, Watts GF. Progress in the care of common inherited atherogenic disorders of apolipoprotein B metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(8):467-84.
22. Mata P, Alonso R, Ruíz-García A, Díaz-Díaz JL, González N, Gijón-Conde T, et al. [Familial combined hyperlipidemia: consensus document]. *Semergen*. oct 2014;40(7):374-80.
23. Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, Grundy SM, Groszek E, McDonald GB. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*. févr 1983;24(2):147-55.
24. Brouwers MCGJ, van Greevenbroek MMJ, Stehouwer CDA, de Graaf J, Stalenhoef AFH. The genetics of familial combined hyperlipidaemia. *Nat Rev Endocrinol*. 14 févr 2012;8(6):352-62.

25. Pajukanta P, Porkka KV. Genetics of familial combined hyperlipidemia. *Curr Atheroscler Rep.* juill 1999;1(1):79-86.
26. Sahebkar A, Watts GF. New therapies targeting apoB metabolism for high-risk patients with inherited dyslipidaemias: what can the clinician expect? *Cardiovasc Drugs Ther.* déc 2013;27(6):559-67.
27. Lewis GF, Xiao C, Hegele RA. Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. *Endocr Rev.* févr 2015;36(1):131-47.
28. van Greevenbroek MMJ, Stalenhoef AFH, de Graaf J, Brouwers MCGJ. Familial combined hyperlipidemia: from molecular insights to tailored therapy. *Curr Opin Lipidol.* juin 2014;25(3):176-82.
29. Lapierre L, McLeod R. Regulation of hepatic production of lipoproteins containing apolipoprotein B by ER-associated degr.
30. Morita S. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(1):1-24.
31. Johansen RF, Søndergaard E, Sørensen LP, Jurik AG, Christiansen JS, Nielsen S. Basal and insulin-regulated VLDL1 and VLDL2 kinetics in men with type 2 diabetes. *Diabetologia.* avr 2016;59(4):833-43.
32. Ooi EM, Chan DC, Hodson L, Adiels M, Boren J, Karpe F, et al. Triglyceride-rich lipoprotein metabolism in women: roles of apoC-II and apoC-III. *Eur J Clin Invest.* août 2016;46(8):730-6.
33. Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Can J Diabetes.* avr 2018;42:S10-5.
34. Yameogo NV, Ndiaye MB, Mbaye A, Bennani R, Kagambega LJ, Bodian M, et al. [Myocardial infarction in the young adult--retrospective analysis of cases compile at the University Hospital of Dakar]. *Pan Afr Med J.* 2010;6:21.
35. Zambon A, Brown BG, Hokanson JE, Motulsky AG, Brunzell JD. Genetically determined apo B levels and peak LDL density predict angiographic response to intensive lipid-lowering therapy. *J Intern Med.* avr 2006;259(4):401-9.
36. Luijten J, van Greevenbroek MMJ, Schaper NC, Meex SJR, van der Steen C, Meijer LJ, et al. Incidence of cardiovascular disease in familial combined hyperlipidemia: A 15-year follow-up study. *Atherosclerosis.* janv 2019;280:1-6.
37. Aguilar-Salinas CA, Tusie-Luna T, Pajukanta P. Genetic and environmental determinants of the susceptibility of Amerindian derived populations for having hypertriglyceridemia. *Metabolism.* juill 2014;63(7):887-94.

38. Minicocci I, Prisco C, Montali A, Di Costanzo A, Ceci F, Pigna G, et al. Contribution of mutations in low density lipoprotein receptor (LDLR) and lipoprotein lipase (LPL) genes to familial combined hyperlipidemia (FCHL): a reappraisal by using a resequencing approach. *Atherosclerosis*. oct 2015;242(2):618-24.
39. Tikka A, Jauhiainen M. The role of ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism. *Endocrine*. mai 2016;52(2):187-93.
40. Stitzel NO, Khera AV, Wang X, Bierhals AJ, Vourakis AC, Sperry AE, et al. ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 25 avr 2017;69(16):2054-63.
41. Sentinelli F, Minicocci I, Montali A, Nanni L, Romeo S, Incani M, et al. Association of RXR-Gamma Gene Variants with Familial Combined Hyperlipidemia: Genotype and Haplotype Analysis. *J Lipids*. 2013;2013:517943.
42. Kurokawa R. Initiation of Transcription Generates Divergence of Long Noncoding RNAs. In: Kurokawa R, éditeur. *Long Noncoding RNAs: Structures and Functions* [Internet]. Tokyo: Springer Japan; 2015. p. 69-91. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-4-431-55576-6_5
43. Laurila P-P, Soronen J, Kooijman S, Forsström S, Boon MR, Surakka I, et al. USF1 deficiency activates brown adipose tissue and improves cardiometabolic health. *Sci Transl Med*. 27 janv 2016;8(323):323ra13.
44. Di Taranto MD, Staiano A, D'Agostino MN, D'Angelo A, Bloise E, Morgante A, et al. Association of USF1 and APOA5 polymorphisms with familial combined hyperlipidemia in an Italian population. *Mol Cell Probes*. févr 2015;29(1):19-24.
45. Berglund L, Brunzell JD, Goldberg AC, Goldberg IJ, Sacks F, Murad MH, et al. Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. sept 2012;97(9):2969-89.
46. Auer S, Hahne P, Soyak SM, Felder T, Miller K, Paulmichl M, et al. Potential role of upstream stimulatory factor 1 gene variant in familial combined hyperlipidemia and related disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juin 2012;32(6):1535-44.
47. Sampieri L, Di Giusto P, Alvarez C. CREB3 Transcription Factors: ER-Golgi Stress Transducers as Hubs for Cellular Homeostasis. *Front Cell Dev Biol*. 3 juill 2019;7:123.
48. Dron JS, Dillioott AA, Lawson A, McIntyre AD, Davis BD, Wang J, et al. Loss-of-Function *CREB3L3* Variants in Patients With Severe Hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. août 2020;40(8):1935-41.
49. Cefalù AB, Spina R, Noto D, Valenti V, Ingrassia V, Giammanco A, et al. Novel *CREB3L3* Nonsense Mutation in a Family With Dominant Hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. déc 2015;35(12):2694-9.

50. Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, et al. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res.* 15 mai 2001;29(10):2154-62.
51. Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, Wang J, Johansen CT, Brown JD, et al. The transcription factor cyclic AMP–responsive element–binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nat Med.* juill 2011;17(7):812-5.
52. Kikuchi T, Orihara K, Oikawa F, Han S, Kuba M, Okuda K, et al. Intestinal CREBH overexpression prevents high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia by reducing Npc1l1 expression. *Mol Metab.* 1 nov 2016;5(11):1092-102.
53. Nakagawa Y, Satoh A, Tezuka H, Han S-I, Takei K, Iwasaki H, et al. CREB3L3 controls fatty acid oxidation and ketogenesis in synergy with PPAR α . *Sci Rep.* 16 2016;6:39182.
54. Nakagawa Y, Shimano H. CREBH Regulates Systemic Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci.* mai 2018;19(5):1396.
55. Danno H, Ishii K, Nakagawa Y, Mikami M, Yamamoto T, Yabe S, et al. The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPAR α . *Biochem Biophys Res Commun.* 8 janv 2010;391(2):1222-7.
56. Luebke-Wheeler J, Zhang K, Battle M, Si-Tayeb K, Garrison W, Chhinder S, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α is implicated in endoplasmic reticulum stress–induced acute phase response by regulating expression of cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein H. *Hepatology.* 2008;48(4):1242-50.
57. Lee M-W, Chanda D, Yang J, Oh H, Kim SS, Yoon Y-S, et al. Regulation of Hepatic Gluconeogenesis by an ER-Bound Transcription Factor, CREBH. *Cell Metab.* 7 avr 2010;11(4):331-9.
58. Misra J, Chanda D, Kim D-K, Cho S-R, Koo S-H, Lee C-H, et al. Orphan Nuclear Receptor Erry Induces C-Reactive Protein Gene Expression through Induction of ER-Bound Bzip Transmembrane Transcription Factor CREBH. *PLOS ONE.* 22 janv 2014;9(1):e86342.
59. Ruppert PMM, Park J-G, Xu X, Hur KY, Lee A-H, Kersten S. Transcriptional profiling of PPAR α -/- and CREB3L3-/- livers reveals disparate regulation of hepatoproliferative and metabolic functions of PPAR α . *BMC Genomics.* 11 mars 2019;20(1):199.
60. Nakagawa Y, Satoh A, Yabe S, Furusawa M, Tokushige N, Tezuka H, et al. Hepatic CREB3L3 controls whole-body energy homeostasis and improves obesity and diabetes. *Endocrinology.* déc 2014;155(12):4706-19.

61. Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, et al. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature*. 22 mai 2014;509(7501):503-6.
62. Berger JH, Charron MJ, Silver DL. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFSD2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. *PloS One*. 2012;7(11):e50629.
63. Wójcik C, Fazio S, McIntyre AD, Hegele RA. Co-occurrence of heterozygous CREB3L3 and APOA5 nonsense variants and polygenic risk in a patient with severe hypertriglyceridemia exacerbated by estrogen administration. *J Clin Lipidol*. sept 2018;12(5):1146-50.
64. Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, Martins RA, Ban MR, Lanktree MB, et al. Excess of Rare Variants in Non-Genome-Wide Association Study Candidate Genes in Patients With Hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet*. févr 2012;5(1):66-72.
65. Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, Wang J, Johansen CT, Brown JD, et al. The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nat Med*. juill 2011;17(7):812-5.
66. Hanna N, Parfait B, Vidaud D, Vidaud M. [Mutation mechanisms and their consequences]. *Med Sci MS*. nov 2005;21(11):969-80.
67. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. juin 2003;21(6):577-81.
68. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1977;74(12):5463-7.
69. Gao J, Wu H, Shi X, Huo Z, Zhang J, Liang Z. Comparison of Next-Generation Sequencing, Quantitative PCR, and Sanger Sequencing for Mutation Profiling of EGFR, KRAS, PIK3CA and BRAF in Clinical Lung Tumors. *Clin Lab*. 2016;62(4):689-96.
70. Gros Audrey. Séquençage Haut Débit, outil incontournable de biologie moléculaire [Internet]. 2016 mai 13 [cité 12 janv 2021]; Cancéropôle Grand Sud-Ouest. Disponible sur: http://www.canceropole-gso.org/download/fichiers/3606/NGS+Canceropole+GSO+mai+2016+AGros_DIFF.pdf
71. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 12 juin 1986;321(6071):674-9.
72. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep*. 2015;3(4):158-65.
73. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical

microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. juin 2019;38(6):1059-70.

74. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol*. août 2013;133(8):e11.
75. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. janv 2010;11(1):31-46.
76. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 6 nov 2008;456(7218):53-9.
77. Guo J, Xu N, Li Z, Zhang S, Wu J, Kim DH, et al. Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 juill 2008;105(27):9145-50.
78. Hegele RA, Ban MR, Cao H, McIntyre AD, Robinson JF, Wang J. Targeted next-generation sequencing in monogenic dyslipidemias. *Curr Opin Lipidol*. avr 2015;26(2):103-13.
79. Cefalù AB, Spina R, Noto D, Ingrassia V, Valenti V, Giammanco A, et al. Identification of a novel LMF1 nonsense mutation responsible for severe hypertriglyceridemia by targeted next-generation sequencing. *J Clin Lipidol*. févr 2017;11(1):272-281.e8.
80. Wu LL, Hopkins PN, Xin Y, Stephenson SH, Williams RR, Nobe Y, et al. Co-segregation of elevated LDL with a novel mutation (D92K) of the LDL receptor in a kindred with multiple lipoprotein abnormalities. *J Hum Genet*. 2000;45(3):154-8.
81. Kanoni S, Masca NGD, Stirrups KE, Varga TV, Warren HR, Scott RA, et al. Analysis with the exome array identifies multiple new independent variants in lipid loci. *Hum Mol Genet*. 15 sept 2016;25(18):4094-106.
82. Johansen CT, Dubé JB, Loyzer MN, MacDonald A, Carter DE, McIntyre AD, et al. LipidSeq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *J Lipid Res*. avr 2014;55(4):765-72.
83. Radovica-Spalvina I, Latkovskis G, Silamikelis I, Fridmanis D, Elbere I, Ventins K, et al. Next-generation-sequencing-based identification of familial hypercholesterolemia-related mutations in subjects with increased LDL-C levels in a latvian population. *BMC Med Genet*. 28 sept 2015;16:86.
84. 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 Off J Am Coll Med Genet*. mai 2015;17(5):405-24.

85. Chen SN, Ballantyne CM, Gotto AM, Tan Y, Willerson JT, Marian AJ. A Common *PCSK9* Haplotype, Encompassing the E670G Coding Single Nucleotide Polymorphism, Is a Novel Genetic Marker for Plasma Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Severity of Coronary Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1611-9.
86. Abifadel M, Rabès J-P, Devillers M, Munnich A, Erlich D, Junien C, et al. Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (*PCSK9*) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mutat*. avr 2009;30(4):520-9.
87. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, et al. NARC-1/*PCSK9* and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*. 19 nov 2004;279(47):48865-75.
88. Péterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, et al. Mutations in *LMF1* cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet*. déc 2007;39(12):1483-7.
89. Serveaux Dancer M, Di Filippo M, Marmontel O, Valéro R, Piombo Rivarola MDC, Peretti N, et al. New rare genetic variants of *LMF1* gene identified in severe hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol*. sept 2018;12(5):1244-52.
90. Dron JS, Dillio AA, Lawson A, McIntyre AD, Davis BD, Wang J, et al. Loss-of-Function *CREB3L3* Variants in Patients With Severe Hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. août 2020;40(8):1935-41.
91. Aryal B, Rotllan N, Araldi E, Ramírez CM, He S, Chousterman BG, et al. *ANGPTL4* deficiency in haematopoietic cells promotes monocyte expansion and atherosclerosis progression. *Nat Commun*. nov 2016;7(1):12313.
92. Yin W, Romeo S, Chang S, Grishin NV, Hobbs HH, Cohen JC. Genetic variation in *ANGPTL4* provides insights into protein processing and function. *J Biol Chem*. 8 mai 2009;284(19):13213-22.
93. Bhatt-Wessel B, Jordan TW, Miller JH, Peng L. Role of *DGAT* enzymes in triacylglycerol metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 1 oct 2018;655:1-11.
94. Chitraju C, Walther TC, Farese RV. The triglyceride synthesis enzymes *DGAT1* and *DGAT2* have distinct and overlapping functions in adipocytes. *J Lipid Res*. juin 2019;60(6):1112-20.
95. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Peloso GM, Gustafsson S, Kanoni S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet*. nov 2013;45(11):1274-83.
96. Lange LA, Hu Y, Zhang H, Xue C, Schmidt EM, Tang Z-Z, et al. Whole-exome sequencing identifies rare and low-frequency coding variants associated with LDL cholesterol. *Am J Hum Genet*. 6 févr 2014;94(2):233-45.

Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,

En présence des Maîtres 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.

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.

JABER Marwan

EVALUATION DE L'INTERET DU PANEL NGS DYSLISEQ DANS LE DIAGNOSTIC DES HYPERLIPIDEMIES COMBINEES FAMILIALES

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2021, 103 p.

RESUME :

L'Hyperlipidémie Combinée Familiale (HCF), est une dyslipidémie se traduisant par une hypercholestérolémie isolée ou une hypertriglycéridémie ou un profil dit mixte (hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie). L'HCF est une maladie oligogénique et résulte de l'interaction de plusieurs variants génétiques, fréquents ou rares, mais aussi des facteurs environnementaux. Du fait de cette complexité, les tests génétiques de l'HCF ne sont pas utilisés en diagnostic. La variabilité clinique inter/intra-patients et les critères diagnostiques rendent difficile le diagnostic génétique. Dans le cadre de ce travail de thèse, le Projet IDOL a été présenté, il a eu pour finalité le progrès dans le diagnostic des HCF et une amélioration de la compréhension de la composante génétique de la maladie, en mettant en évidence notamment des variants rares de la maladie. Un tri et une organisation des informations recueillis sur plus de 154 patients potentiellement atteints d'HCF ont été réalisés en collaboration avec le service clinique d'endocrinologie afin d'inclure ces derniers dans l'étude selon plusieurs critères. 16 patients HCF ont pu être inclus dans l'étude. Les ADN des patients HCF inclus ont été analysés à l'aide d'un outil d'analyse génétique basé sur la méthode NGS Illumina combinée avec PapILyon, qui a permis d'explorer plus de 311 gènes. Cette technique permet d'étudier un panel des gènes impliqués dans les dyslipidémies monogéniques connues, ceux qui régulent le métabolisme des lipides, ou encore ceux associés à des variations au niveau du cholestérol et des TG. Concernant les résultats préliminaires de ce travail de thèse : 148 variants rares ont pu être identifiés sur 16 patients. Parmi ces variants, on retrouve des gènes impliqués dans les dyslipidémies monogéniques mais aussi deux variations « Frameshift » (décalage du cadre de lecture et formation d'un codon stop plus tard), 5 variations non-sens dont 2 sur le gène CREB3L3 qui intervient notamment dans le métabolisme des triglycérides. Des variations sur le gène CREB3L3 ont été décrites chez des patients présentant une hypertriglycéridémie sévère. D'après une étude les patients présentant une hypertriglycéridémie sévère ont 20.2% plus de risque d'être porteur d'un variant perte de fonction CREB3L3 en comparaison aux patients contrôles normo-triglycéridémiques. CREB3L3 est donc un gène candidat prometteur qui pourrait participer au phénotype lipidique des patients du projet IDOL, ces variants ont attiré l'attention et ont été évoqués en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) au sein des HCL. Ce projet est donc très encourageant et l'augmentation future des effectifs pourra permettre de confirmer ou infirmer ces conclusions préliminaires.

MOTS CLES

Hyperlipidémie Combinée Familiale
Génétique
NGS

JURY

Président : Mme FERRARO-PEYRET, MCU-PH
Membres du jury : Mme MARMONTEL Oriane Pierre, PH
Mme. DI FILIPPO Mathilde, PH

DATE DE SOUTENANCE

Lundi 12 avril 2021

CONTACT

Oriane.marmontel@chu-lyon.fr